

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

KÁREN GERCYANE OLIVEIRA BEZERRA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TGC
01 E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAL
LIGNOCELULÓSICO**

RECIFE

2017

KÁREN GERCYANE OLIVEIRA BEZERRA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TGC
01 E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAL
LIGNOCELULÓSICO**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial à obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia Industrial.
Orientador: Profa. Dr^a. Ester Ribeiro
Gouveia

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Bezerra, Káren Gercyane Oliveira

Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* TGC 01 e sua aplicação na hidrólise enzimática de material lignocelulósico / Káren Gercyane Oliveira Bezerra. – Recife: O Autor, 2017.

80 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia Industrial, 2017.

Inclui referências

1. Biossurfactantes 2. Glicolípídeos 3. Biomassa I. Gouveia, Ester Ribeiro (orient.) II. Título

668.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-287

KÁREN GERCYANE OLIVEIRA BEZERRA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TGC
01 E SUA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAL
LIGNOCELULÓSICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 23/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia
UFPE

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
UFPB

Prof^a Dr^a Fernanda Leitão Vaz
CETENE

Recife, 23 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e ajuda constantes.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ester Gouveia, pela orientação, disponibilidade, paciência, compreensão, incentivo e zelo que foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

A todos os integrantes do LABBIO, pela troca de experiências, ajuda, conversas e risadas, que tornaram esse tempo mais prazeroso.

Aos colegas de turma pelo companheirismo e ajuda durante o período de aulas, em especial a Raphael, Italo e Henrique, pela amizade e bons momentos vividos.

A Darne, pela ajuda desde o processo de seleção e durante todo o mestrado, quando precisei medir tensão superficial na Unicap ou tive algumas dúvidas sobre biossurfactantes, sempre mostrando boa vontade e prontidão.

Ao Prof. Dr. Ricardo Silva pela ajuda essencial na etapa de caracterização.

Ao Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela linhagens TGC 01 usada neste trabalho.

Ao Dr. Henrique Baudel, pela doação do cavaco de eucalipto.

Aos meus pais, Claudio e Carmelia e irmão Kelvin, pelo incentivo, educação, apoio, suporte e confiança.

À toda minha família, em especial à Sara e Eliane, pelo acolhimento, prestatividade e carinho.

Às amigas Rosimere, Roseanny e Dayane, pela amizade, apoio e prontidão para ajudar sempre que precisei.

A todos os meus professores, que contribuíram de forma essencial para a minha formação tanto acadêmica, como quanto pessoa.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Foi investigada a produção de biossurfactante por duas linhagens de *P. aeruginosa*, para aplicação na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Inicialmente, uma seleção entre duas linhagens de *P. aeruginosa*, TGC 01 e UFPEDA 569, foi realizada no intuito de avaliar qual apresentaria o melhor desempenho quanto à produção de biossurfactante, usando quatro meios de cultura distintos. Após a comparação, os resultados mostraram que a maior produção de ramnolipídeo, expresso em ramnose, foi alcançada pela linhagem TGC 01 (570 mg/L), no meio M2B com glicerol bruto e nitrato de sódio como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente. Posteriormente foi analisada a influência da razão C/N (12 e 24) e da agitação (100 e 150 rpm) na produção de ramnolipídeo da linhagem selecionada no meio M2B utilizando um planejamento fatorial 2². A produção de ramnolipídeos foi favorecida com o aumento da razão C/N e da agitação. Para o estudo cinético utilizando a razão C/N e a agitação selecionadas na etapa anterior, dois inóculos (5 e 10% V/V) e dois volumes de meio de cultura (50 e 100 mL) em frascos de 500 mL foram usados. O menor volume de meio de cultura (50 mL) aumentou a produção de ramnolipídeo em 75,5%, entretanto, o tamanho do inóculo não influenciou na produção. Uma concentração de 11 g/L de biossurfactante bruto foi obtido após a extração, e esse biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 27 mN/m, e apresentou uma concentração micelar crítica (CMC) de 100 mg/L. O biossurfactante manteve-se estável após ser submetido às condições da hidrólise enzimática, apresentando índice de emulsificação de cerca de 64,5 %. A hidrólise enzimática de papel de escritório descartado (PED), papel jornal (JO) e cavaco de eucalipto (CE) foram realizadas com a adição do biossurfactante. O maior aumento na liberação de glicose, ocorreu quando o biossurfactante foi adicionado na hidrólises do JO (113% de aumento), mostrando que o ramnolipídeo produzido por TGC 01 pode potencializar a hidrólise enzimática dessa biomassa, aumentando a viabilidade deste processo pela diminuição da quantidade de enzimas e consequente redução de custos.

Palavras-chave: Biotensoativo. Glicolipídeo. Biomassa Lignocelulósica

ABSTRACT

A biosurfactant production by two strains of *P. aeruginosa* was investigated and its application in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. Initially, a selection between two strains of *P. aeruginosa*, TGC 01 and UFPEDA 569, was carried out in order to evaluate which presentation the best production of biosurfactant, using four different culture media. After comparison, the results showed that the highest rhamnolipid production, expressed as rhamnose, was reached by strain TGC 01 (570 mg/L) in M2B medium with crude glycerol and sodium nitrate as carbon and nitrogen sources, respectively. The influence of C/N ratio (12 and 24) and agitation (100 and 150 rpm) on rhamnolipid production of the selected strain in the M2B medium using a factorial design 2^2 was analyzed. The production of rhamnolipids was enhanced by the increase of C/N ratio and with increased agitation. For the kinetic study using the C/N ratio and the agitation selected in the previous step, two inocula (5 and 10% V / V) and two volumes of culture medium (50 and 100 ml) in 500 ml flasks was used. The smaller volume of culture medium (50 ml) increased rhamnolipid production by 75.5%, however, the size of inoculum did not influence the production. A 11 g/L concentration of crude biosurfactant was obtained after extraction, and this biosurfactant was able to reduce the surface tension of the medium to 27 mN/m and presented a critical micellar concentration (CMC) of 100 mg/L. The biosurfactant remained stable after being subjected to the conditions of the enzymatic hydrolysis, presenting an emulsion index about 64.5%. An enzymatic hydrolysis of waste paper (WOP), newspaper (NP) and eucalyptus wood chips (EWC) were carried out with addition of biosurfactant. The highest increase in glucose release occurred when the biosurfactant was added in hydrolysis of NP (113% increase), showing that the rhamnolipid produced by TGC 01 can potentiate the enzymatic hydrolysis of this biomass, increasing the viability of this process by reducing the amount of enzymes and costs.

Keywords: Biosurfactant. Glycolipid. Lignocellulosic Biomass

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Biossurfactantes: definição, propriedades e micro-organismos produtores	16
3.2 Ramnolipídeos: estrutura e biossíntese	19
3.3 Fatores importantes na produção e recuperação de ramnolipídeos	23
3.4 Extração de Ramnolipídeos	25
3.5 Glicerol bruto como substrato para a produção de bioprodutos	26
3.6 Hidrólise enzimática de material lignocelulósico: adição de tensoativos	27
3.7 Papel de escritório descartado, papel jornal e eucalipto como materiais lignocelulósicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Micro-organismos	34
4.2 Pré-tratamento do glicerol bruto	34
4.3 Preparo do inóculo	34
4.4 Condições de cultivo para a produção de biossurfactante	34
4.5 Extração do biossurfactante	35
4.6 Métodos analíticos	36
4.6.1 Biomassa	36
4.6.2 Quantificação do glicerol e da glicose	36
4.6.3 Quantificação de ramnose	36
4.6.4 Tensão superficial e concentração micelar crítica	37
4.6.5 Índice de Emulsificação (E_{24}) e Estabilidade do biossurfactante	37
4.6.6 Caracterização do biossurfactante	38
4.7 Cálculo das produtividades	38
4.8 Aplicação do biossurfactante na hidrólise enzimática	39
4.9 Análises estatísticas	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Comparação da produção de ramnolipídeos por duas linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
5.2 Influência da razão C/N e da agitação na produção de ramnolipídeos pela linhagem	49

TGC 01	49
5.3 Estudo cinético da produção do biossurfactante	55
5.4 Extração e Caracterização do Biossurfactante	58
5.5 Efeito da adição do ramnolípídeo produzido pela linhagem TGC 01 na hidrólise.....	62
enzimática de materiais lignocelulósicos	62
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1. Estrutura química de mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos	20
Figura 3. 2 Vias metabólicas da biossíntese de ramnolipídeos.	21
Figura 3. 3 Conversão do glicerol em piruvato em condições de aerobiose.	22
Figura 3. 4 Componentes do material lignocelulósico	28
Figura 3. 5 Ação catalítica do complexo celulase	29
Figura 5. 1 Produção de ramnose por <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 e <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 569, utilizando os meios quimicamente definidos e complexos	41
Figura 5. 2 Tensão superficial (TS) dos meios quimicamente definidos e complexos após 96 horas de cultivo, para <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 e <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 569.....	43
Figura 5. 3 . Redução da tensão superficial (TS) do meio de cultivo, promovida pelos ramnolipídeos produzidos por <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 e <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 569, utilizando os meios quimicamente definidos e complexos.	43
Figura 5. 4 Índice de emulsificação (E24) obtido pelos ramnolipídeos produzidos por <i>P. aeruginosa</i> TGC 01, utilizando os meios complexos.	45
Figura 5. 5 Variação do pH, em relação ao pH inicial de 7, nas quatro condições de cultivo, para <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 e <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 569.	46
Figura 5. 6 Variação de biomassa nas quatro condições de cultivo para <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 e <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 569.	48
Figura 5. 7 Consumo do glicerol nas quatro condições de cultivo para <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 e <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 569	49
Figura 5. 8 Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação na produção de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i> TGC-01.	50
Figura 5. 9 Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação na variação da biomassa de <i>P. aeruginosa</i> TGC-01.	51
Figura 5. 10 . Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação na variação do pH do meio de cultivo de <i>P. aeruginosa</i> TGC-01	52
Figura 5. 11 Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação no consumo do glicerol do meio de cultivo de <i>P. aeruginosa</i> TGC-01	53
Figura 5. 12 Superfície de resposta da influência da relação C/N e da agitação na produção de ramnolipídeo por <i>P. aeruginosa</i> TGC-01.	55
Figura 5. 13 . Biomassa, concentração de glicerol e pH durante o cultivo com <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 usando meio mineral 2 suplementado com glicerol bruto e nitrato de sódio.	57
Figura 5. 14 Concentração de ramnose e tensão superficial (TS) durante o cultivo com <i>P.</i>	

<i>aeruginosa</i> TGC 01 usando meio mineral 2 suplementado com glicerol bruto e nitrato de sódio.....	57
Figura 5. 15 Tensão superficial como uma função logarítmica da concentração de ramnolipídeo. O valor de tensão superficial de referência foi 50 mN/m	59
Figura 5. 16 Espectros do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 cultivada em meio mineral suplementado com glicerol bruto e nitrato de sódio. (A) Espectro 1H RMN (CDCl ₃ , 300 MHz). (B1) espectro 1H-1H COSY RMN (CDCl ₃ , 300 MHz) e (B2) espectro H-13C H.	61
Figura 5. 17 Liberação de glicose após 4 horas de hidrólise enzimática nas condições do planejamento fatorial 3 ² e seu aumento em relação ao controle (sem adição de tensoativo).....	62
Figura 5. 18 Superfície de resposta para a razão entre a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática com e sem a presença dos tensoativos nos ensaios do planejamento fatorial 3 ²	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores	18
Tabela 4. 1 Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2	35
Tabela 4. 2 Fatores e níveis do planejamento fatorial 3^2	40
Tabela 5. 1 Produtividades dos cultivos com <i>P. aeruginosa</i> TGC 01 realizados em diferentes níveis dos fatores do planejamento fatorial 2^2	53
Tabela 5. 2 Análise de variância (ANOVA) do modelo linear.....	54
Tabela 5. 3 Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	- Cavaco de eucalipto
CMC	- Concentração micelar crítica
C/N	- Razão carbono/nitrogênio
E24	- Índice de emulsificação
HAA	- 3-(3-hidroxi- <i>alcanoil</i> oxi)- <i>alcanoato</i>
IUPAC.	- International Union of Pure and Applied Chemistry
JO	- Jornal
M1B	- Meio 1 com glicerol bruto
M1C	- Meio 1 com glicerol comercial
M2B	- Meio 2 com glicerol bruto
M2C	- Meio 2 com glicerol comercial
PED	- Papel de escritório descartado
RLs	- <i>Ram</i> nolipídeos
TS	- Tensão Superficial

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial entre fluidos de diferentes polaridades (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Esses compostos apresentam alta taxa de biodegradabilidade e baixa toxicidade, além de possuírem estabilidade térmica e resistência a condições extremas de salinidade e pH (BANAT et al., 2000). São sintetizados por uma variedade de organismos vivos, e dentre eles, os micro-organismos (leveduras, bactérias e alguns fungos filamentosos), são capazes de produzi-los com diferentes estruturas moleculares e atividades de superfície usando diversos substratos como fonte de carbono (ARAÚJO et al., 2013). Vários tipos de resíduos renováveis, como o glicerol, são considerados fontes de carbono promissoras para a produção de biossurfactantes, pois reduzem os altos custos do processo (SOUSA et al., 2014).

Os ramnolipídeos são biossurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos, produzidos principalmente por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (NITSCHKE et al., 2007; ABYANEH e FAZAELIPOOR, 2016). São amplamente estudados devido a sua alta atividade de superfície, e possuem potencial para aplicações em vários setores industriais, como na indústria de alimentos, bebidas, detergentes, cosméticos, e farmacêutica (DALVIN, 2012). Em adição, estudos têm mostrado que a adição de ramnolipídeos na hidrólise enzimática de material lignocelulósico pode estimular a taxa de hidrólise reduzindo a necessidade do uso de grandes quantidades de enzimas (ZHANG et al., 2009; WANG et al., 2011; HOU et al., 2017).

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico é um tema bastante estudado para a utilização em processos de bioenergia, entretanto, a rápida conversão da celulose em açúcares fermentáveis é ainda um processo difícil de ocorrer. Isso ocorre devido a presença da lignina e a alta cristalinidade da celulose, sendo necessários altas concentrações de enzima e maior tempo de reação para alcançar alta conversão da celulose, encarecendo desta maneira o processo (CAO e AITA, 2013). Além disso, o reciclo das enzimas é difícil devido à adsorção das mesmas ao substrato e à lignina (FENG et al., 2013; MENEGOL et al., 2014). Desta maneira, a capacidade de tensoativos, como ramnolipídeos, em prevenir a adsorção improdutiva das enzimas, em aumentar sua estabilidade e em afetar a estrutura do substrato tornando-o mais acessível para a hidrólise enzimática, são os mecanismo responsáveis pelo seu efeito positivo na hidrólise da celulose (ERIKSSON et al., 2002; WANG et al., 2011).

Resíduos de papel, especialmente de escritório e jornal, são particularmente atraentes como matéria-prima lignocelulósica para originar moléculas fermentescíveis, pois são ricos em carboidratos, renováveis e gerados em grande quantidade (BRASIL, 2017), além disso, é uma alternativa útil e valiosa de gerir estes resíduos, uma vez que as fibras de papel só podem ser recicladas um número limitado de vezes (DUBEY et al., 2012; CHU e FENG, 2013.). Outra variedade de material lignocelulósico que tem sido explorada como potencial fonte de geração de açúcares fermentáveis e produção de energia é o eucalipto, que se destaca devido à sua alta produtividade e adaptabilidade ao clima brasileiro em comparação com outras espécies de madeira (SOUZA et al., 2011), tornando-o um recurso lignocelulósico promissor que pode produzir glicose e etanol de segunda geração.

Dessa maneira, no presente trabalho realizou-se a produção de biossurfactante a partir de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, usando glicerol como fonte de carbono, para adição na hidrólise enzimática de papel de escritório descartado (PE), papel jornal (JO) e cavaco de eucalipto (CE).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o processo de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* e a influência de sua adição na hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Comparar o desempenho de duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, UFPEDA 569 e TGC 01, na produção de biossurfactante utilizando quatro meios de cultura distintos;
2. Selecionar a linhagem e o meio de cultura que proporcionaram a maior produção de biossurfactante;
3. Investigar a influência da razão carbono-nitrogênio (C/N) e da agitação na produção de biossurfactante pela linhagem selecionada utilizando um planejamento fatorial 2^2 ;
4. Determinar as cinéticas de crescimento, consumo do substrato e produção do biossurfactante variando o tamanho do inóculo.
5. Recuperar e caracterizar o biossurfactante produzido;
6. Avaliar a estabilidade do biossurfactante nas condições da hidrólise enzimática;
7. Aplicar o biossurfactante na hidrólise enzimática da celulose de papel de escritório descartado, jornal e cavaco de eucalipto.
8. Avaliar o efeito do uso do biossurfactante sobre a liberação de glicose na hidrólise enzimática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes: definição, propriedades e micro-organismos produtores

Surfactantes são moléculas anfipáticas, compostas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, e que devido a essa estrutura possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial entre fluidos de diferentes polaridades (NITSCHKE e PASTORE, 2002). A porção hidrofóbica é geralmente composta por uma cadeia hidrocarbonada, enquanto que a porção hidrofílica pode ser um grupo éster, hidroxila, fosfato, carboxila ou açúcar (SILVA et al., 2014).

Dentre as principais propriedades dos surfactantes estão a capacidade de formar emulsões, espumas, suspensões, micro emulsões, propiciar umectação, formação de filmes líquidos e detergência de superfícies. Essas propriedades fazem com que os tensoativos sejam utilizados em aplicações diversas como detergentes, agroquímicos, cosméticos, tintas, cerâmica, em tratamento de couros e têxteis, formulações farmacêuticas e óleos lubrificantes (DALTIM, 2012).

Entretanto, a maioria dos surfactantes produzidos atualmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, o que lhes confere um caráter não biodegradável e tóxico ao meio ambiente (SILVA, 2011). Por outro lado, surfactantes de origem natural, ou biossurfactantes, apresentam alta taxa de biodegradabilidade e baixa toxicidade, além de possuírem alta atividade de superfície, estabilidade térmica e resistência a condições extremas de salinidade e pH (BANAT et al., 2010; SOUSA et al., 2014). Tendo isso em vista, o interesse da comunidade científica na busca por surfactantes de origem natural tem aumentado nas últimas décadas (ARAÚJO e FREIRE, 2013).

Os biossurfactantes são sintetizados por uma variedade de organismos vivos, como as saponinas produzidas por plantas, glicolípídeos produzidos por micro-organismos e os sais biliares produzidos pelos animais (SILVA et al., 2014). Os micro-organismos (bactérias, leveduras, e alguns fungos filamentosos) são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares e atividades de superfície usando diversos substratos como fonte de carbono, tais como, carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras e óleos (SOUSA, 2008; CAMPOS et al., 2013.)

A classificação dos biossurfactantes é feita de acordo com a composição química e tipo do micro-organismo produtor (NITSCHKE e PASTORE, 2002). As maiores classes de

biossurfactantes incluem: glicolipídeos, surfactantes poliméricos, lipopeptídeos, ácidos graxos, surfactantes particulados e fosfolipídeos (Tabela 3.1) (NICOLÒ et al., 2014; SOUSA et al., 2014). A maioria dos biossurfactantes são aniônicos ou neutros, enquanto que aqueles que têm grupos amina são catiônicos (SANTOS et al., 2016).

Os biossurfactantes de baixa massa molecular, como os pertencentes à classe dos glicolipídeos, apresentam maior atividade de superfície, enquanto que os de alta massa molecular, como os poliméricos e particulados, exercem melhor atividade de emulsificação. Tais propriedades estruturais e químicas dos biossurfactantes são fortemente influenciadas, além do micro-organismo produtor, pelo substrato e condições do cultivo (PRABU et al., 2015).

A eficiência de um biossurfactante, ou dos surfactantes em geral, pode ser determinada por parâmetros como tensão superficial/interfacial, índice de emulsificação (E_{24}) e concentração micelar crítica (CMC) (FILHO, 2009). A tensão superficial/interfacial se refere a capacidade do biossurfactante em reduzir a força existente nas superfícies (ar/líquido) e nas interfaces (líquido/líquido), enquanto que, no índice de emulsificação é possível avaliar a capacidade do biossurfactante em solubilizar diferentes hidrocarbonetos (COOPER e GOLDEMBERG, 1983). A CMC refere-se a concentração mínima de biossurfactante necessária para que se formem micelas (SOUZA, et al., 2014). Sendo assim, quanto menor é o valor da tensão superficial/interfacial e da CMC, e maior o índice de emulsificação, mais eficiente é o biossurfactante.

Os surfactantes de origem microbiana, considerados eficientes, apresentam valores de CMC na faixa de 5 a 200 mg/L (MONTEIRO, 2007; SARUBBO et al., 2015), e capacidade de reduzir a tensão superficial para valores entre 25 e 30 mN/m (LANG, 2002; FARIA, 2010). Atividade emulsificante variando de 50 a 90% são relatadas (COSTA et al., 2008; BEZERRA et al, 2012; DEEPIKA et al., 2016).

Tabela 3. 1 Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores

Fonte: SANTOS et al., (2016)

Classificação dos Biossurfactantes					
Glicolipídeos	Surfactantes poliméricos	Lipopeptídeos	Ácidos graxos	Surfactantes particulados	Fosfolipídeos
Micro-organismos Produtores					
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Capnocytophaga</i> sp.	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>insidibasseosum</i>		
<i>Candida antarctica</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>		
<i>Candida apicola</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Gluconobacter cerinus</i>	<i>Nocardia erythropolis</i>		
<i>Candida batistae</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium spiculisporem</i>		
<i>Candida bogoriensis</i>	<i>Halomonas eurihalina</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Talaromyces trachyspermus</i>		
<i>Candida bombicola</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptomyces sioyaensis</i>			
<i>Candida ishiwadae</i>	<i>thermoautotrophium</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>			
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>				
<i>Lactobacillus Fermentum</i>					
<i>Nocardia</i> sp.					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
<i>Pseudomonas</i> sp.					
<i>Rhodococcus erythropolis</i>					
<i>Rhodococcus erythropolis</i>					
<i>Rhodotorula glutinus</i>					
<i>Rhodotorula graminus</i>					
<i>Serratia marcescens</i>					
<i>Tsukamurella</i> sp.					
<i>Ustilago maydis</i>					

3.2 Ramnolipídeos: estrutura e biossíntese

Os ramnolipídeos são biossurfactantes aniônicos pertencentes à classe dos glicolipídeos, produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (NITSCHKE et al., 2007; ABYANEH e FAZAELIPOOR, 2016). São amplamente estudados devido a sua atividade de superfície, sendo capazes de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 29 mN/m. (KAYA et al., 2014; SANTOS et al., 2016) Além disso, apresentam rendimentos elevados, em comparação a outros biossurfactantes, após períodos de incubação relativamente curtos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

Foram descobertos por Bergström et al. (1946) que relataram a produção de um glicolipídeo oleoso produzido por *Pseudomonas pyocyanea* (agora *Pseudomonas aeruginosa*). A identificação das unidades estruturais foi feita por Jarvis e Johnson em 1949, que elucidaram a estrutura de um isolado de ramnolipídeo a partir *P. aeruginosa* (MURKHEJEE e DAS, 2010).

Diferentes linhagens de *P. aeruginosa* produzem diversos homólogos estruturais de ramnolipídeos. O tipo de ramnolipídeo produzido depende da linhagem bacteriana, da fonte do carbono usada, e da estratégia do processo (OLIVEIRA, 2010). As principais espécies homólogas produzidas por *P. aeruginosa* são RL1 (Rha-C₁₀-C₁₀), RL2 (Rha-C₁₀), RL3 (RhaRha-C₁₀-C₁₀) e RL4 (Rha-Rha-C₁₀) (ZHAO et al., 2013). Com o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis, como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, foi possível à descoberta de uma ampla diversidade de espécies homólogas (cerca de 60) que são produzidas em diferentes concentrações por várias espécies de *Pseudomonas* e por bactérias pertencentes a outras famílias, classes, ou mesmo filos, como por exemplo, espécies de *Bukholderia* (ABDEL-MAWGOUD et al., 2014; ARAÚJO e FREIRE, 2013).

A estrutura dos ramnolipídeos é composta por uma cabeça hidrofílica formada por uma ou duas moléculas de L-ramnose (mono-ramnolipídeos ou di-ramnolipídeos) ligada a uma cauda hidrofóbica composta por um, dois ou três ácidos graxos de cadeia alquil saturada ou insaturada entre C₈ e C₁₂ (Figura 3.1) (JARVIS & JOHNSON, 1949; ABDEL-MAWGOUD e al., 2011).

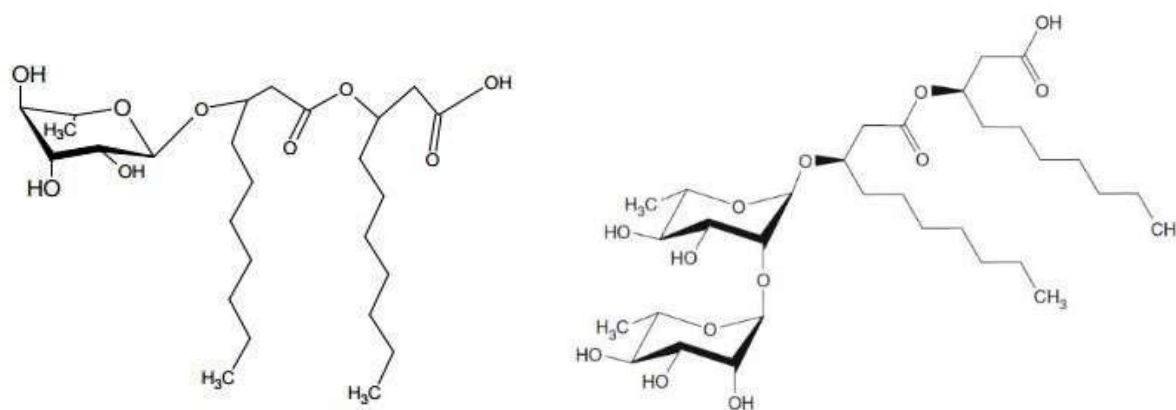


Figura 3. 1. Estrutura química de mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos

Fonte: MONTEIRO (2007); ABDEL-MAWGOUD et al., (2011).

A biossíntese de ramnolipídeos ocorre através de duas reações de transferência sequenciais do grupo ramnosil. Cada reação é catalisada por uma ramnosiltransferase específica (Rt1 e Rt2, respectivamente) sendo dTDP-L-ramnose o doador do grupo ramnosil e o β Dhidroxialcanoiloxi- β -D-alcanoato ou L-ramnosil- β -D-hidroxialcanoiloxi- β -D-alcanoato os receptores do grupo ramnosil (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

Na biossíntese da porção hidrofílica, a dTDP-L-ramnose, glicose é convertida em Dglicose-6fosfato, que dará origem a D-Glicose-1-fosfato, precursor inicial da via biossintética da dTDPL-ramnose (PHAM et al. 2004; MÜLLER e HAUSMANN, 2011). Na biossíntese da porção hidrofóbica, β -D-hidroxialcanoiloxi- β -D-alcanoato (HAA), a via putativa mais aceita é que o seu precursor, o 3-hidroxiacil-ACP, seja proveniente da síntese de novo dos ácidos graxos tipo II (FAS II), encontrada em bactérias e plantas (SOBERÓN-CHAVÉZ et al., 2005; ZHU e ROCK, 2008; ABDEL-MAWGOUD et al., 2011). Os mono-ramnolipídeos são formados pela condensação dos precursores (dTDP)-L-rhamnose e HAA que é feita pela enzima ramnosiltransferase I (RhlB), através de uma ligação O-glicosídica. Os di-ramnolipídeos são formados pela ação da ramnosiltransferase II (RhlC), que utilizando mais um precursor (dTDP)-L-rhamnose, adiciona outro grupo ramnosil ao mono-ramnolipídeo através de uma ligação α 1,2-glicosídica (CHRZANOWSKI et al., 2012; HONNA, 2013). As cadeias de ácidos graxos β -hidroxi são ligadas umas às outras através de uma ligação éster formada entre o grupo β hidroxi da cadeia distal (em relação à ligação glicosídica) com o grupo carboxila da próxima cadeia (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011) (Figura 3.2).

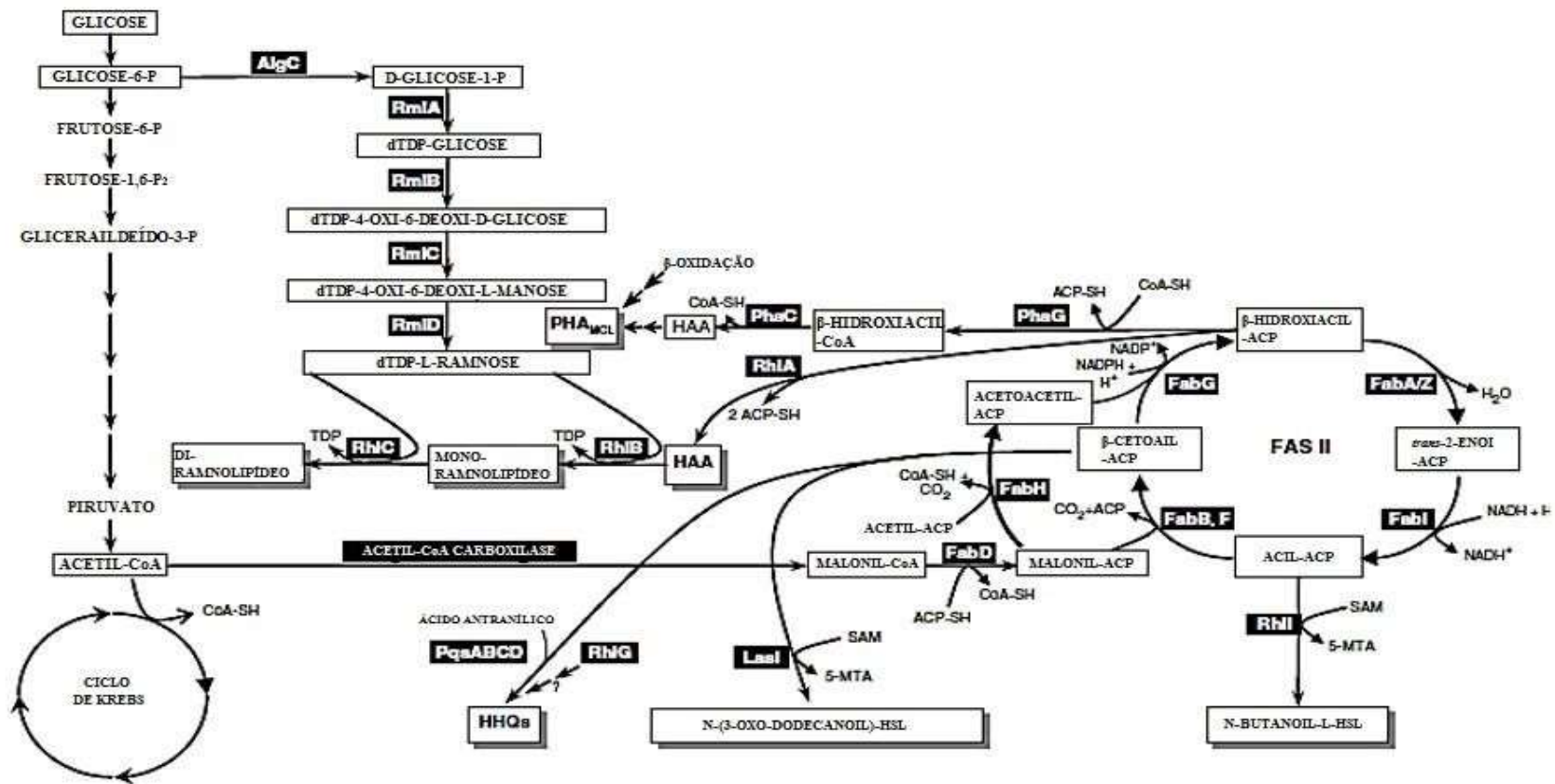


Figura 3. 2 Vias metabólicas da biossíntese de ramnolipídeos.

Fonte: Adaptado de ABDEL-MAWGOUD et al. (2011).

Para que a biossíntese de ramnolípídeos ocorra é necessário que glicose seja formada a partir da assimilação do substrato. Um exemplo de substrato que tem sido bastante utilizado para produção de ramnolípídeos é o glicerol (SOUSA et al., 2014), e sua assimilação em procariotos acontece por meio de difusão facilitada. Após a passagem através da membrana plasmática, o glicerol pode ser catalisado por várias rotas metabólicas independentes, por meio das vias oxidativa ou redutora (NIKEL et al., 2014).

Na via redutora, em condições de anaerobiose, o produto final do glicerol é o 1,3propanodiol, principal intermediário para produção de polímeros, resinas e aditivos de importantes aplicações industriais (RIVALDI et al., 2008; SILVA et al., 2009; KAUR et al., 2012 (GIRARDI, 2014). Em bactéria aeróbias como as pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, o glicerol é metabolizado pela via oxidativa, onde é fosforilado em uma reação catalisada pela glicerol-quinase (glpK), transformando-se em glicerol-3-fosfato (G3P). Em seguida, a enzima glicerol desidrogenase (DhaD) converte o glicerol-3-fosfato em di-hidroxiacetona-p, que é canalizada para a via glicolítica, para a formação de piruvato, gerando ATP e NADH (SILVA et al., 2009; FERREIRA, 2013) (Figura 3.3).

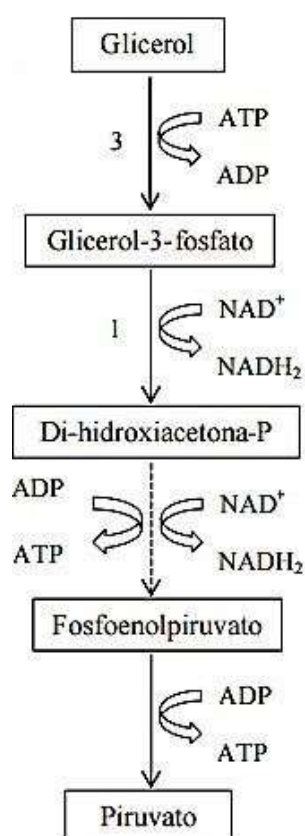


Figura 3. 3 Conversão do glicerol em piruvato em condições de aerobiose.

Fonte: GIRARDI (2014).

Após essa etapa, a glicose para utilização na biossíntese de ramnolipídeos será formada por meio da gliconeogênese, que é a síntese de glicose a partir de precursores mais simples, não glicídicos, como o piruvato, que é o produto final da metabolização do glicerol pela via oxidativa, como mencionado acima (NELSON E COX, 2006).

3.3 Fatores importantes na produção e recuperação de ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são um dos metabólitos secundários de *P. aeruginosa*, e a sua produção coincide com o início da fase estacionária. Portanto, muitas estratégias de cultivo para estimular a produção desse biotensioativo pela limitação de um ou mais componentes do meio, principalmente fontes de nitrogênio, fósforo, bem como de cátions multivalentes e alguns ânions têm sido estudadas (CLARKE et al., 2010; GLICK et al., 2010).

A limitação de nitrogênio, entretanto, é a estratégia mais comumente empregada para induzir a produção de ramnolipídeos. Isso ocorre porque níveis reduzidos de nitrogênio direcionam o metabolismo celular para a produção de metabólitos secundários e acúmulo de lipídeos dentro da célula (ABDEL-MAWGOUD et al. 2011). Embora *P. aeruginosa* seja capaz de metabolizar várias fontes de nitrogênio, como amônia e aminoácidos, por exemplo, muitos estudos afirmam que o nitrato é a melhor fonte para a indução da produção de ramnolipídeos (GUERRA-SANTOS et al., 1984; MA et al., 2016), pois possui uma assimilação mais lenta, devido a redução do nitrato a nitrito e depois à amônia, simulando desta maneira uma condição limitante de nitrogênio. Além disso, *P. aeruginosa* utiliza nitrato comoceptor final de elétrons em condições anaeróbias ou microaeróbias, provocando dessa maneira a escassez de nitrogênio no meio de cultivo (BARBER et al., 2000; ROSA, 2008; BHARALI et al., 2011; ONWOSI, et al., 2012; ZHU et al., 2012).

Além da limitação de nutrientes, a escolha da fonte de carbono é primordial no processo de produção desses biossurfactantes, pois, esse é um dos principais fatores que tem impedido a produção em larga escala e a comercialização dos ramnolipídeos, devido aos altos custos do processo associados ao uso de substratos caros (OLIVEIRA, 2010; CECCATO, 2013). Para superar tais obstáculos e poder competir com os surfactantes sintéticos no mercado, é necessário a busca de substratos baratos e micro-organismo eficazes na produção de biotensioativos (RIKALOVIC et al. 2011).

Pseudomonas aeruginosa é extensivamente relatada como produtora de biossurfactante ramnolipídico a partir de fontes renováveis e de baixo custo, como resíduos de indústria de óleo, glicerol, água residuais de agroindústrias, melaço de cana, milhocina, soro de leite, e efluentes ricos em amido, o que o torna um micro-organismo promissor para a produção em larga escala de ramnolipídeos (FILHO, 2009; MA et al., 2016; SANTOS et al., 2016). Vários tipos de resíduos industriais, como da indústria agrícola e do biodiesel, por exemplo, são considerados substratos promissores para a produção de biossurfactantes, pois são renováveis e seu reaproveitamento pode contribuir para a redução da poluição ambiental (DAMIÃO, 2012).

Dentre os resíduos industriais, o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, é uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras, e pelo fato de ser um substrato de origem renovável e de grande disponibilidade, torna-se uma alternativa ecologicamente viável e bastante promissora do ponto de vista econômico, com grande potencial para uso em processos biotecnológicos na obtenção de produtos de alto valor agregado. (SOUSA et al., 2014). Dessa maneira, o glicerol tem sido usado em muitas pesquisas como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (SOUSA et al., 2008; SILVA et al., 2011; RIKALOVIĆ et al., 2012; MOUSSA et al., 2014).

A razão Carbono-Nitrogênio (C/N) é outro parâmetro extremamente sensível que influencia consideravelmente a produção de ramnolipídeos (FILHO, 2009) logo, é possível encontrar na literatura vários estudos que procuram otimizar a razão C/N no meio de cultivo, buscando a melhor condição de produção de biossurfactante para cada linhagem. Em alguns casos, há uma linearidade entre o aumento da razão C/N e a produção de ramnolipídeos (PRIETO, 2007), por outro lado, há estudos em que é visto uma relação inversa (SOUSA et al., 2014). Valores ótimos de razão C/N de 18 (GUERRA-SANTOS et al., 1984), 10 (ABOUSEOUD et al., 2008), 20 (RAZA et al., 2007), 55 (MONTEIRO, 2007), 100 (PRIETO, 2007), 12 (SILVA et al., 2011) e 20 (MA et al., 2016) são reportados na literatura, mostrando que não há um consenso sobre razão C/N ideal para a produção de ramnolipídeos, pois é um fator que depende da linhagem de *P. aeruginosa* utilizada e das fontes de carbono e de nitrogênio. Sendo assim, cada pesquisa que envolva a produção de ramnolipídeos, deve investigar a razão C/N mais adequada para o aumento da produtividade (FILHO, 2009).

Além dos fatores nutricionais, fatores físicos tais como temperatura, pH e agitação podem também influenciar a síntese de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (SOUSA et al., 2011; JAMAL et al., 2014). A temperatura que tem se mostrado ideal para a produção de ramnolipídeos é por volta de $30^{\circ}\text{C} \pm 2$, enquanto que os valores de pH mais utilizados estão

entre 6 e 7 (SILVA et al., 2010; PINZON-GAMEZ, 2009; SOUSA et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2015). Como *P. aeruginosa* é uma bactéria aeróbica, a agitação é considerada crucial para a formação de biossurfactante. A velocidade da agitação afeta a eficiência de transferência de massa e de oxigênio no meio, e na literatura é possível encontrar relatos de que o aumento da agitação, para valores entre 150 rpm e 250 rpm, resultou no aumento da produção de ramnolipídeos (MOUSSA et al., 2014; ZHU et al., 2013).

3.4 Extração de Ramnolipídeos

Métodos de recuperação como a precipitação ácida, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, e adsorção em carvão ativado têm sido mencionados na literatura e aplicados para a recuperação de biossurfactantes (HEYD et al., 2008; SOUSA et al., 2014; BEHRENS et al., 2016). Contudo, alguns fatores importantes devem ser levados em consideração para que a escolha de um método adequado de recuperação seja feita, tais como: (1) a natureza do composto, ou seja, se ele é solúvel em água ou não, aniônico ou não iônico, intracelular ou extracelular, (2) o custo associado com o método de extração, que aumenta o preço do produto final, (3) a finalidade proposta para o produto final, que influencia o nível de pureza requerida, e (4) a adaptabilidade do método a um determinado processo de fermentação industrial (OLIVEIRA, 2010; ABDEL-MAWGOUD et al., 2011).

Na recuperação de ramnolipídeos a precipitação ácida e a extração líquido-líquido são as técnicas mais empregadas e descritas na literatura (SOUSA et al., 2014; BHARDWAJ et al., 2015; ERAQI et al., 2016; SANTOS et al., 2016). A precipitação em meio acidificado foi uma das primeiras maneiras utilizadas para a recuperação de ramnolipídeos, empregada por Jarvis e Johnson (1949). Nesta técnica o meio de cultura livre de células é acidificado, geralmente com H_2SO_4 ou HCl , a um pH final entre 2 e 3, neutralizando as cargas negativas dos ramnolipídeos, tornando-os menos solúveis em fase aquosa. Após um período de espera de 12 horas a 4°C o precipitado é recolhido por centrifugação e ressuspenso em um tampão apropriado, água (SOUSA et al., 2014), ou em um solvente. As vantagens de tal processo é que não envolve instrumentos ou aparelhos complexos, além de possuir um custo baixo e ser eficiente na recuperação do biossurfactante bruto (MUKHERJEE et al, 2006; HEYD, 2008; OLIVEIRA, 2010).

Os solventes mais utilizados são clorofórmio-metanol (SARIN e SARIN, 2008; SILVA et al., 2010; MA et al., 2016), porém, sulfato de alumínio (SCHENK et al., 1995), acetato de etila (YIN et al., 2009), acetona (ABOUSEOUD et al., 2008) e diclorometano (JOSHI et al., 2008) também são usados. Geralmente, o processo de extração apresenta maior rendimento quando é realizado após a precipitação ácida. As vantagens encontradas em processos de extração com solvente orgânico são a eficiência na recuperação do biossurfactante e em sua purificação parcial. Uma desvantagem são os custos elevados do processo por conta dos solventes (MANO et al. 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

3.5 Glicerol bruto como substrato para a produção de bioprodutos

O glicerol bruto é um subproduto gerado a partir da transesterificação de óleos vegetais ou de gordura animal na produção do biodiesel (NICOLÒ et al., 2014). No Brasil a produção de biodiesel cresceu de 736 milhões de m³ em 2005 para 3.503,873 milhões de m³ em 2016 (BRASIL, 2016), aumentando consequentemente quantidade de glicerol gerado, que corresponde a cerca de 20 % do biodiesel produzido, despertando uma crescente preocupação com relação à sua disposição final (QUISPE et al., 2013).

Sendo assim, devido ao seu alto teor energético, diferentes pesquisadores têm investigado a bioconversão do glicerol, especialmente do glicerol bruto que possui um baixo valor comercial, em vários produtos de valor agregado (ADNAN, et al., 2014). Outras vantagens da utilização do glicerol como fonte de carbono são sua origem renovável e sua facilidade de ser assimilado por diversos micro-organismos (SOUSA et al., 2014).

Na literatura é possível encontrar vários estudos onde a produção de ramnolipídeos é realizada através da utilização de glicerol como fonte de carbono. Wei et al. (2008) encontraram no glicerol uma fonte de carbono com rendimento comparável a glicose para produção de RL2 por *Pseudomonas aeruginosa* J16. Da mesma forma, Kumar et al. (2012), Sousa et al. (2014), Santana-filho et al. (2015), Hassan et al. (2016), Eragi et al., (2016) e Deepika et al. (2016) são alguns dos trabalhos em que o glicerol também foi usado como recurso para a produção de ramnolipídeos, mostrando a importância de tal substrato, cujas vantagens mencionadas anteriormente, fazem do mesmo uma alternativa para que a produção em larga escala desses biossurfactantes possa se tornar viável.

Além dos biossurfactantes, produtos como 1,3-propanodiol, ácido propiônico, ácido glicérico, ácido cítrico, ácido hidroxipirúvico, polihidroxialcanoato, e pigmentos têm sido produzidos a partir do glicerol bruto (KUMAR et al., 2012). Ainda, por possuir um elevado grau de redução, o glicerol assimilado pelos micro-organismos também pode gerar compostos reduzidos como o succinato, etanol, xilitol e propionato, em rendimentos altos quando comparados aos açúcares como fonte de carbono (SILVA, 2010).

Neto (2009) relata que existem vários estudos com *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* e *C. acetobutlicum*, que são capazes de converter o glicerol bruto em de 1,3 propanodiol, (1,3PD), composto amplamente empregado para produção de polímeros do tipo polítrimetileno tereftalatos (PTT), conhecido por suas propriedades elásticas e empregado amplamente na fabricação de resinas e tintas aquosas.

Os exopolissacarídeos (EPSs) são biopolímeros que também podem ser obtidos por meio da fermentação do glicerol bruto. São sintetizados por bactérias, fungos e leveduras, e possuem a propriedade de formar soluções viscosas em meio aquoso ou géis, e são aplicados na indústrias de alimentos, farmacêuticas e petroquímicas (BARRETO, 2011).

Outro produto de grande interesse que tem ganhado a atenção de muitos pesquisadores é o gás hidrogênio produzido por meio da digestão anaeróbia do glicerol bruto, sendo uma alternativa promissora a aplicação deste biogás como energia limpa (CHOOKAEW et al., 2015). A dihidroxiacetona (DHA), amplamente utilizada na indústria farmacêutica e química, os (Poli) hidroxialcanoatos, que possuem propriedades termoplásticas, biocompatíveis e biodegradáveis, são outros exemplos de bioprodutos de interesse industrial que podem ser obtidos através do reaproveitamento do glicerol bruto (ITO et al., 2005).

3.6 Hidrólise enzimática de material lignocelulósico: adição de tensoativos

O material lignocelulósico possui, em maior parte na sua composição, celulose, hemicelulose e lignina (Figura 3.3), podendo variar o percentual destes compostos dependendo da fonte lignocelulósica utilizada (GOUVEIA et al., 2009; WANG, et al., 2012).

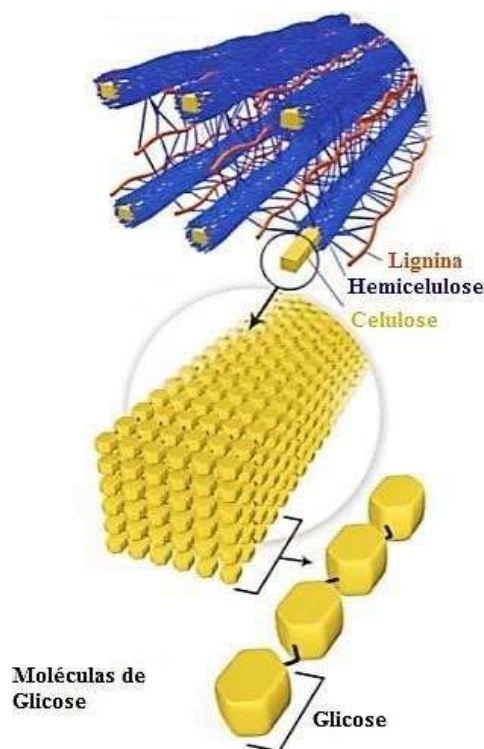


Figura 3. 4 Componentes do material lignocelulósico

Fonte: Adaptado de SANTOS et al. (2012)

A celulose é o principal constituinte de paredes celulares de plantas, proporcionando resistência e rigidez. A cada ano as plantas sintetizam 10^{11} toneladas de celulose, fazendo desse polímero um dos compostos mais abundantes da biosfera. A estrutura da celulose é formada por polímeros lineares de milhares de unidades de D-glicose com ligações β (1-4)-glicosídicas (NELSON & COX, 2014). A poliose ou hemicelulose é formada por açúcares como glicose, manose e galactose (pentoses) e xilose e arabinose (hexoses), e se apresentam na forma de polímeros ramificados de menor massa molar que a celulose (HU et al., 2012). A lignina é uma polímero rígido formado por unidades de fenilpropano que origina uma macromolécula tridimensional e amorfa (FERRAZ, 2001).

O processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é conduzido através da ação combinada de enzimas, incluindo três grandes grupos de celulasas: as endoglucanase, que atacam as regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose criando extremidades de cadeia livre, as exoglucanase ou celobiohidrolase, que degradam a molécula pela remoção de unidades de celobiose das pontas das cadeias livres, e as β -glicosidase, que hidrolisam a celobiose para

produzir glicose (Figura 3.4), que por sua vez pode ser utilizada em processo de bioenergia (WANG et al., 2011).

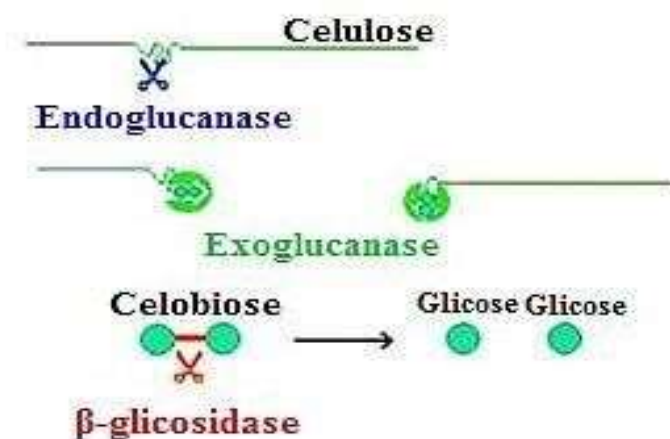


Figura 3. 5 Ação catalítica do complexo celulase
Fonte: Adaptado de OGEDA e PETRI (2010)

No entanto, há alguns fatores que limitam o processo de degradação da celulose em açúcares fermentáveis, resultando na diminuição da taxa de hidrólise durante o processo (YU et al., 2012). A alta cristalinidade da celulose é uma das barreiras que impedem a rápida conversão da celulose, pois dificulta a ação das enzimas. Outra limitação do processo de hidrólise enzimática ocorre devido à adsorção das celulasas no substrato lignocelulósico, dificultando o retorno das enzimas para o meio reacional (MENEGOL et al., 2014). Além disso, a presença da lignina também é outro fator limitante, pois cria uma barreira física que dificulta a acessibilidade das enzimas ao substrato, além de bloquear a remoção das celulasas a partir da cadeia de celulose. As enzimas também podem se adsorver improdutivamente à lignina, reduzindo a hidrólise produtiva do substrato (FENG et al., 2013). Devido a tais fatores, o tempo necessário para alcançar a conversão suficiente aumenta, juntamente com a necessidade de adicionar grandes quantidades de celulasas para acelerar o processo, encarecendo, dessa maneira, o custo da sacarificação (ZHANG et al., 2009).

Todavia, estudos têm mostrado que a adição de agentes tensoativos na hidrólise enzimática tem diminuindo a adsorção das enzimas à celulose e à lignina prevenindo-as da inativação, e consequentemente facilitando a dessorção das mesmas para o meio reacional,

aumentando significativamente a conversão enzimática da celulose em açúcares redutores (ERICKSSON ET AL., 2002; TU e SADDLER, 2010; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2009).

De acordo com Zhou et al., (2015), o efeito positivo da adição de tensoativos na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica deve-se pela prevenção da adsorção não produtiva de celulasas para a fração de lignina, o que aumenta a quantidade de enzimas livres beneficiando a hidrólise do substrato de celulose. Além desse, outros mecanismos têm sido propostos e investigados para o efeito estimulador de tensoativos sobre a hidrólise da celulose, tais como: os tensoativos podem atuar sobre a membrana celular causando libertação das enzimas, agentes tensoativos podem aumentar a estabilidade da enzima e evitar a desnaturação destas durante a hidrólise, e/ou tensoativos podem afetar a estrutura do substrato e torná-lo mais acessível para a hidrólise enzimática (WANG et al., 2011).

Cao e Aita (2013) adicionaram os surfactantes Tween 80, Tween 20, PEG 4000 ou PEG 6000 em combinação com hidróxido de amônio para o pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar, que posteriormente sofreu hidrólise enzimática. Os resultados indicaram que os pré-tratamentos com PEG 4000 e Tween 80 favoreceram maiores taxas de digestibilidade da celulose, 62% e 66%, e rendimentos de etanol, 73% e 69%, respectivamente, quando comparados aos pré-tratamentos apenas com amônio ou água. Os autores afirmam que a digestibilidade melhorada da biomassa quando houve a adição dos surfactantes pode ser atribuída a delignificação e a redução da cristalinidade da celulose.

No entanto, como citado anteriormente, os tensoativos quimicamente sintetizados, tais como os Triton, Tween e PEG, não são biodegradáveis e apresentam toxicidade para o meio ambiente, e portanto, não são adequados para utilização em larga escala. Biosurfactantes, por outro lado, não são tóxicos, possuem alta especificidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, sendo os mais adequados para a utilização biotecnológica (ERICKSSON et al., 2002; FENG et al., 2013).

Recentemente, tem-se verificado que os ramnolipídeos são aditivos eficazes que podem otimizar o processo de degradação de biomassa lignocelulósica, contribuindo assim, para a diminuição dos custos do processo pela diminuição da quantidade de enzimas (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Estudos realizados por Liu et al. (2006) e Zhang et al. (2009) relataram a atividade de ramnolipídeos estimulando a taxa da hidrólise de palha de arroz e reduzindo a necessidade de grandes quantidade de celulasas pelo seu reciclo. A melhoria da produção de

celulases e xilanases de *Penicillium expansum* através da adição de biossurfactante ramnolipídico foi também confirmada por Wang et al (2011). Os autores afirmam que o ramnolipídeo aumentou a atividade das celulases de 25,5% para 102,9%, e protegeu a celulase da degradação inativação. HOU et al (2017) obtiveram aumento de 65,22 e 44,65% na liberação de glicose, em relação ao controle, após a adição de di-ramnolipídeo e uma mistura de ramnolipídeos, respectivamente, na hidrólise de palha de arroz.

3.7 Papel de escritório descartado, papel jornal e eucalipto como materiais lignocelulósicos

O Brasil é o 4º maior produtor de papel no mundo, com uma produção anual de 10.260.000 toneladas (DEPEC, 2016). Desse total, grande parte se refere a papel de escritório. Entre janeiro e fevereiro de 2014 o país produziu 422.000 toneladas de papel de escritório, dos quais 262 mil foram destinadas às vendas domésticas (BRACELPA, 2014). O Brasil é autossuficiente na fabricação de papel, porém ainda é dependente da importação de papel Jornal (DEPEC, 2016). Atualmente, o consumo brasileiro de papel jornal é de cerca de 540.000 toneladas por ano, sendo que a produção local é 128.000 toneladas (BRACELPA, 2014; GAMBARATO et al., 2015).

A elevada produção e consumo de papel ocasiona, por conseguinte, uma elevada geração de resíduos no meio, e uma das maneiras utilizadas para a gestão de tais resíduos tem sido a reciclagem. Entretanto, as fibras que constituem o papel perdem suas características físico-químicas durante os vários processos de reciclagem, ou seja, chega um momento em que a qualidade desse material não é mais adequada para a reciclagem (BRASIL, 2017).

Sendo assim, resíduos de papel são particularmente atraentes como matéria-prima lignocelulósica para geração de moléculas fermentescíveis (glicose, xilose) e produção de diversos produtos, além de ser uma alternativa eficiente para gestão desses resíduos (DUBEY et al., 2012). O papel de escritório possui a vantagem de apresentar pouca lignina na sua composição, devido a utilização dos alvejantes químicos usados para o branqueamento do papel que extraem quase totalmente a lignina, favorecendo desta maneira o processo de hidrólise (FENG et al., 2013; SOUZA et al., 2016).

A ideia do aproveitamento dos carboidratos provenientes do papel vem crescendo ao redor do mundo, e trabalhos têm sido publicados sobre o tema. Wang et al. (2012) afirmam que a partir de vários resíduos de papel, como por exemplo, jornal, revista, papelão e papel de escritório, pode-se produzir etanol com um desempenho econômico melhorado de forma significativa, com a redução de até 25% no preço de venda do etanol, tornando-se uma alternativa economicamente competitiva.

Papel jornal e papel de escritório descartados foram avaliados quanto ao potencial para serem usados como matérias-primas renováveis para a produção de açúcares fermentáveis através da hidrólise enzimática de suas frações de celulose, e os resultados da pesquisa mostraram que o substrato de papel de escritório apresentou 4,8 vezes mais rendimento de açúcar em relação ao jornal (CHU e FENG, 2013).

Brummer et al. (2013) avaliaram diferentes tipos de resíduos de papel, em termos de composição e utilização, para utilização no processo de hidrólise enzimática. Dentre os resíduos testados (papel *offset*, papel cartão, papel reciclado, papel *offset* fosco), rendimentos de $24.4 \pm 1.3\%$ sem pré-tratamento, e $48,3 \pm 2,7\%$ com pré-tratamento foram obtidos na hidrólise do papelão. Subhedar et al. (2015), obtiveram uma concentração de 11,6 g/L e 27,6 g/L de açúcares redutores a partir da hidrólise enzimática de resíduos de jornal, com e sem tratamento com ultrassom, respectivamente.

No Brasil, pesquisas que utilizam o papel como material lignocelulósico também têm sido realizadas. Gouveia e Mota (2016) estudaram os efeitos da variação da carga enzimática, do aumento do tempo de hidrólise e da massa de substrato sobre a formação de glicose na hidrólise enzimática de resíduos de papel de escritório, após pré-tratamento química ou físico. Como resultado, após 24h de hidrólise, obtiveram a recuperação de 23 g/L de glicose a partir de 3,75 g de papel pré-tratado quimicamente, e com a menor quantidade enzima proposta no trabalho (5,2 FPU/g).

Ainda, Lima et al. (2015) encontraram no papel sulfite descartado uma matéria-prima promissora para a produção de etanol por *Spathaspora passalidarum* HMD 14. Após prétratamento com ácido sulfúrico diluído e hidrólise enzimática de 8 g de papel, foi obtido um rendimento de 42 g/L de glicose e 8 g/L de xilose, que fermentados pelo micro-organismo geraram uma concentração de 13 g/L do biocombustível.

Em outra pesquisa, uma concentração de 3,45 g/L de etanol foi produzida por *Spathaspora passalidarum* a partir de 8,45 g/L de glicose e 9,27 g/L de xilose, provenientes da

hidrólise ácida de papel de escritório descartado (ROCHA et al., 2016). Tais resultados mostram o potencial presente no papel como biomassa lignocelulósica para a geração de açúcares fermentáveis.

Outra variedade de biomassa lignocelulósica que tem sido explorada como potencial fonte de geração de açúcares fermentáveis e produção de energia, é o eucalipto, que se destaca por causa de sua alta produtividade e adaptabilidade ao clima brasileiro em comparação com outras espécies de madeira (MCINTOSH et al., 2016). O Brasil conta com seis milhões de hectares de florestas plantadas, principalmente de eucalipto, a principal matéria-prima florestal do país (CARVALHO et al., 2016; BRASIL, 2017).

O eucalipto representa a principal fonte de madeira para as cadeias produtivas de importantes segmentos industriais do país, como os de celulose e papel, painéis reconstituídos, móveis, siderurgia e carvão vegetal, energia e produtos sólidos de madeira (FOELKEL, 2016). Nos processos de industrialização do eucalipto realizados por essas indústrias, há a geração do cavaco, um resíduo constituído por pequenos pedaços de madeira, que apresenta grande potencial para reaproveitamento como fonte de lignocelulose, pois é sustentável e de baixo custo (IMA, 2017).

Na literatura científica alguns estudos têm sido descritos onde o eucalipto é utilizado como fonte lignocelulósica, todavia, no Brasil não há muitos registros do uso dessa biomassa como fonte de açúcares fermentáveis. McIntosh, et al. (2016), estudaram *Eucalyptus grandis* como matéria-prima lignocelulósica, onde um rendimento de 51,3% de glicose foi alcançado com a sacarificação de 15g de resíduos do Eucalipto, em escala laboratorial. Em escala piloto, usando 1,5Kg, os autores observaram um rendimento de 63,3% de glicose. Martin et al. (2014) obtiveram rendimento de 46,7% de glicose e 73,4% de xilose ao realizarem a hidrólise enzimática de *Eucalyptus globulus*. Yu et al. (2012) investigaram o rendimento de xilose após a hidrólise em água quente de bagaço de sorgo e madeira de eucalipto (20 g). Nas condições ótimas em reator agitado, a recuperação de xilose para a madeira de eucalipto (84,4%) foi 28,8% maior do que para o bagaço de sorgo (de 55,6%). Tais estudos mostram que o eucalipto é um recurso lignocelulósico promissor que pode gerar açúcares fermentáveis e etanol de segunda geração, entretanto, mais pesquisas na área, especialmente no Brasil, são necessárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste trabalho foram a UFPEDA 569, pertencente à Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, e a TGC 01 pertencente à biblioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) da Universidade Federal da Paraíba. Ambas foram mantidas a 5°C em TSA - Tryptone Soya Agar (peptona de caseína 15 g/L, peptona de farinha de soja 5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, ágar 15 g/L).

4.2 Pré-tratamento do glicerol bruto

O glicerol bruto, obtido no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), foi submetido a hidrólise ácida com H₂SO₄ concentrado (98 % m/m), à temperatura ambiente, até atingir pH 2. Posteriormente foi transferido para um funil de separação onde permaneceu por 24 horas para que houvesse a separação das fases glicerínica e de ácido graxo. A fase glicerínica foi usada como fonte de carbono na formulação dos meios de cultura.

4.3 Preparo do inóculo

Os inóculos foram obtidos a partir da transferência de um tubo de cada linhagens para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo nutritivo (extrato de carne 3 g/L, peptona 5 g/L). Os frascos foram incubados em mesa agitadora (Tecnal, TE-422) a 30°C e 150 rpm, durante 24 horas.

4.4 Condições de cultivo para a produção de biossurfactante

Suspensões de 5% V/V dos inóculos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 500 mL com 95 mL dos meios de cultura M1 (1,36 g/L KH₂PO₄, 1,42 g/L K₂HPO₄, 50 mg/L MgSO₄.7H₂O, 3 mg/L FeSO₄.7H₂O, 0,039 mg/L CuSO₄.5H₂O, 0,021 mg/L ZnCl₂, 10 mg/L

CaCl₂, 1,54 mg/L MnSO₄.H₂O, 0,041 mg/L CoCl₂.6H₂O, 0,025 mg/L Na₂MoO₄.2H₂O) (PATEL e DESAI 1997) e M2 (1 g/L K₂HPO₄:KH₂PO₄ (2:1), 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O) (ABALOS et al. 2002). Em ambos os meios, foi utilizado glicerol, bruto (M1B e M2B) ou comercial (M1C e M2C), e NaNO₃ nas concentrações de 40 e 4 g/L, respectivamente. O pH foi ajustado para 7,0 ± 0,2 usando HCl. Os cultivos foram realizados na mesma temperatura e agitação da etapa do inóculo. Todo o volume da suspensão microbiana, após 96 horas de cultivo foi centrifugado a 10.000 rpm por 15min, e o caldo livre de células foi utilizado para a determinação do glicerol, pH, tensão superficial, índice de emulsificação, ramnose, bem como para a extração do biossurfactante.

Para a definição da razão carbono/nitrogênio e da agitação foi aplicado um planejamento fatorial 2², cujos fatores e níveis são apresentados na Tabela 4.1. O cálculo da razão C/N foi baseado na determinação da quantidade de nitrogênio presente no nitrato de sódio (NaNO₃) e de carbono presente no glicerol bruto (C₃H₈O₃), que corresponde a 16,5% e 39,1%, respectivamente.

Tabela 4. 1 Fatores e níveis do planejamento fatorial 2²

Ensaio	C/N	Agitação (rpm)	X ₁	X ₂
1	12	100	-1	-1
2	24	100	1	-1
3	12	150	1	1
4	12	150	-1	1

Estudos cinéticos foram realizados utilizando-se inóculos de 5 e 10% V/V usando-se frascos Erlenmeyer de 500 mL, mas reduzindo o volume do meio para 47,5 e 45 mL, respectivamente. Nesta etapa foi utilizado o meio de cultura selecionado na etapa inicial. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas. Todos os cultivos, de todas as etapas, foram realizados em duplicata.

4.5 Extração do biossurfactante

O biossurfactante foi extraído do meio de cultura após a remoção das células por centrifugação (10.000 rpm por 15 min). O pH do sobrenadante foi ajustado para 2 utilizando uma solução de HCl 5,0 M, e um volume de clorofórmio:metanol (2:1) igual ao do sobrenadante

foi adicionado. A mistura, colocada em um funil de separação, foi agitada vigorosamente e deixada em repouso durante 20 minutos para a separação das fases. A fase orgânica foi removida e o procedimento foi repetido mais duas vezes (COSTA et al., 2009). O biossurfactante foi concentrado, a partir das fases orgânicas agrupadas em um béquer, usando uma chapa à 60°C por 4 horas. O produto viscoso, formado após a evaporação dos solventes, foi dissolvido em 50 mL de água destilada. Para a caracterização do biossurfactante por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Neste caso, a remoção dos solventes foi realizada usando-se um evaporador rotativo (TE-210, Tecnal) a 50°C e o produto viscoso produzido foi dissolvido em clorofórmio.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Biomassa

A concentração da biomassa celular foi determinada por gravimetria. Foram utilizadas membranas de acetato de celulose 0,2 µm, previamente taradas, para a quantificação da biomassa no início e no fim dos cultivos, após secagem em estufa a 80 °C por 24 horas.

4.6.2 Quantificação do glicerol e da glicose

As concentração de glicerol e da glicose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um sistema equipado com uma bomba quaternária com degaseificador, um forno para controle da temperatura da coluna, a 40°C, e um detector por índice de refração (Shimadzu Corporation - Kyoto, Japan). Foi utilizada uma coluna de troca iônica (300 mm x 7.8 mm) com partículas de 9 µm (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, USA), e a fase móvel empregada foi água ultrapura acidificada com eluição isocrática de H₂SO₄ 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. O tempo de corrida foi de 15 minutos e o volume de injeção de cada amostra foi de 20 µL. O coeficiente de determinação (R²) das curvas de calibração do glicerol e da glicose foram maiores que 0,999.

4.6.3 Quantificação de ramnose

A concentração de ramnose foi determinada pelo método colorimétrico usando ácido tioglicólico (RAHMAN et al., 2002). O método consiste em adicionar 4,5 mL de ácido sulfúrico diluído (6:1) a 1mL do caldo livre de células, em tubos, e agitar vigorosamente por 1 minuto. Em seguida a mistura deve ser aquecida a 100°C por 10 minutos e resfriada à temperatura ambiente. O volume de 0,1 mL de solução de ácido tioglicólico 3% recém preparada é adicionada a mistura, que é guardada em um local com ausência de luz, durante 3 horas. A absorbância é medida a 400 e 430 nm. A concentração de ramnose é determinada a partir da diferença entre os dois comprimentos de onda, usando-se uma curva de calibração, previamente preparada usando diferentes concentrações de L-ramnose (Sigma). A diferença entre os dois comprimentos de onda é realizada porque o valor de absorbância obtido na leitura de 430 nm indica a interferência de outros açúcares. O coeficiente de determinação (R^2) da curva foi maior que 0,998.

4.6.4 Tensão superficial e concentração micelar crítica

A tensão superficial do caldo livre de células foi determinada pelo método do anel, usando um Tensiômetro sigma 700 (KSV Instruments LTD - Finland) (SILVA et al., 2014). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em triplicata, e o equipamento foi calibrado com água destilada. A concentração micelar crítica (CMC) foi obtida a partir da determinação da tensão superficial de soluções de concentração conhecida do biossurfactante bruto. Para tanto, foram realizadas diluições sucessivas de uma solução concentrada do biossurfactante. A CMC foi determinada pelo ponto de inflexão da curva obtida plotando-se a tensão superficial versus o log 10 da concentração de ramnose.

4.6.5 Índice de Emulsificação (E_{24}) e Estabilidade do biossurfactante

A atividade emulsificante foi avaliada através da mistura de 2 mL do meio de cultura livre de células e 2 mL de óleo lubrificante de motor (marca Capella), em tubos de ensaio. Os tubos foram agitados vigorosamente por 1minuto e deixados em repouso durante 24 horas. Após esse período foram realizadas as medições das alturas das emulsões e o índice de emulsificação foi calculado pela razão entre a altura da camada de emulsão e a altura total multiplicado por 100 (COOPER & GOLDEMBERG, 1987). A estabilidade do biossurfactante foi testada pela

medida do índice de emulsificação da solução do biossurfactante bruto (2 mL) após ser submetida às condições da hidrólise enzimática, pH 4,8 e 50°C durante 4 horas.

4.6.6 Caracterização do biossurfactante

Os espectros de RMN foram realizados usando um espectrômetro Varian Unity Plus operando a 300 MHz e 75 MHz para núcleos ^1H e ^{13}C , respectivamente. Os espectros em CDCl_3 foram atingidos: ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC e ^1H - ^{13}C HMBC. Inicialmente, a amostra foram dissolvida em CHCl_3 . A amostra analisada continha uma mistura de CHCl_3 e CDCl_3 . Em seguida, obteve-se o espectro de RMN de ^1H utilizando a sequência PRESAT, para minimizar o sinal atribuído ao clorofórmio. O espectro de RMN de ^1H foi realizado utilizando tempo de aquisição igual a 1,7 s, atraso de relaxamento igual a 2,0 s, janelas espectrais iguais a 4,8 kHz, impulso de RF a 90° e 16 repetições. O espectro de ^{13}C RMN foi realizado usando tempo de aquisição igual a 0,86 s, atraso de relaxamento igual a 1,0 s, janelas espectrais igual a 18,9 kHz, pulso de 45° RF e 2000 repetições. O espectro foi processado utilizando um alargamento de linha igual a 0,5 Hz. Os espectros de RMN 2D foram realizados considerando $^1J_{\text{C,H}}$ igual a 140 Hz e $^3J_{\text{C,H}}$ igual a 8,0 Hz.

4.7 Cálculo das produtividades

A produtividade volumétrica de biomassa (P_x), expressa em mg/L.h, foi calculada a partir da equação (4.2).

$$P_x = \frac{x_f - x_0}{t} \quad (4.1)$$

Onde:

X_f e X_0 são os valores de biomassa no tempo final e inicial, respectivamente; t equivale ao tempo de cultivo, no caso 96 horas.

A produtividade volumétrica de biossurfactante (P_p), expressa em mg/L.h, foi calculada de acordo com a equação (4.3).

$$P_p = \frac{P_f - P_o}{t} \quad (4.2)$$

Onde:

P_o e P_f são as concentrações inicial e final de biossurfactante, respectivamente; t equivale a 96 horas.

4.8 Aplicação do biossurfactante na hidrólise enzimática

Foram utilizados como biomassa lignocelulósica, papel de escritório descartado (PED - 57% m/m de celulose, 15% m/m de hemicelulose, 3% m/m de lignina total), papel jornal (JO - 47% m/m de celulose, 18% m/m de hemicelulose e 18% m/m de lignina total) (MOTA et al., 2016), e cavaco de eucalipto (CE - 62% de celulose, 4% m/m de hemicelulose, 32% m/m de lignina total) (AMERICAN BIOMASS TECHNOLOGIES).

O papel de escritório descartado e o papel jornal foram coletados no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (UFPE), e cortados em círculos de 0,5 cm usando um furador de papel. O cavaco de eucalipto, pré-tratado com explosão a vapor (STEX 200 - America Biomass Technologies a 205°C durante 5 min), foi fornecido pela America Biomass Technologies (São Paulo, Brasil).

As hidrólises enzimáticas foram realizadas utilizando 0,2 g de material lignocelulósico e 4 mL de um tampão de citrato de sódio (pH 4,8; 50 mM), contendo o biossurfactante. Hidrólises enzimáticas sem o biossurfactante (controle) ou substituindo este pela mesma quantidade de surfactantes químicos (Tween-80 ou Triton-X) também foram realizadas. Soluções de celulasas (Cellic Ctec1) foram preparadas no tampão a uma concentração de 4,9 g/L (PED: 170 mg/g de celulose, JO: 208 mg/g de celulose, CE: 158 mg/g de celulose). As hidrólises foram realizadas em banho-maria a 50°C, e após 4 horas as amostras foram filtradas em membrana 0,45 µm de diâmetro de poro. A determinação da glicose formada foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. O tipo de material lignocelulósico e o tensoativo foram variados de acordo com um planejamento fatorial 3^2 (Tabela 4.2). Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Tabela 4. 2 Fatores e níveis do planejamento fatorial 3²

Ensaio	Biomassa	Tensoativo	X ₁	X ₂
1	PED	Tween-80	-1	-1
2	PED	Triton-X	-1	0
3	PED	Bio	-1	1
4	JO	Tween-80	0	-1
5	JO	Triton-X	0	0
6	JO	Bio	0	1
7	CE	Tween-80	1	-1
8	CE	Triton-X	1	0
9	CE	Bio	1	1

4.9 Análises estatísticas

O Origin para Windows foi utilizado para a análise estatística dos resultados. Utilizou-se a ANOVA para testar diferenças de pH, crescimento, consumo de glicerol, tensão superficial (TS), concentração de ramnose e índice de emulsificação (E₂₄). Os testes de Tukey foram utilizados para investigar estas diferenças ($p < 0,05$).

Na hidrólise enzimática e nas condições de cultivo foi utilizado o software Statistica 7.0 para calcular os efeitos dos fatores sobre a resposta. No caso da hidrólise enzimática os fatores foram o tipo de biomassa e tensoativo utilizados, e a resposta foi a razão entre a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática com e sem adição de tensoativo. Nas condições de cultivo os efeitos foram a razão C/N e agitação, e a resposta foi a concentração de ramnose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação da produção de ramnolipídeos por duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*

Uma seleção entre as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC 01 e UFPEDA 569 foi realizada com o intuito de avaliar qual apresentaria o melhor desempenho quanto a produção de ramnolipídeo (RL). As duas linhagens produziram ramnose em todos os meios utilizados (M1B, M1C, M2B e M2C), entretanto, a linhagem TGC 01 apresentou as maiores concentrações de ramnose (Figura 5.1). A maior concentração de ramnose foi observada no M2B com a linhagem TGC 01. O valor produzido (570 mg/L) foi cerca de 80% maior do que a maior produção obtida pela linhagem UFPEDA 569 (115,45 mg/L), quando cultivada no M2C.

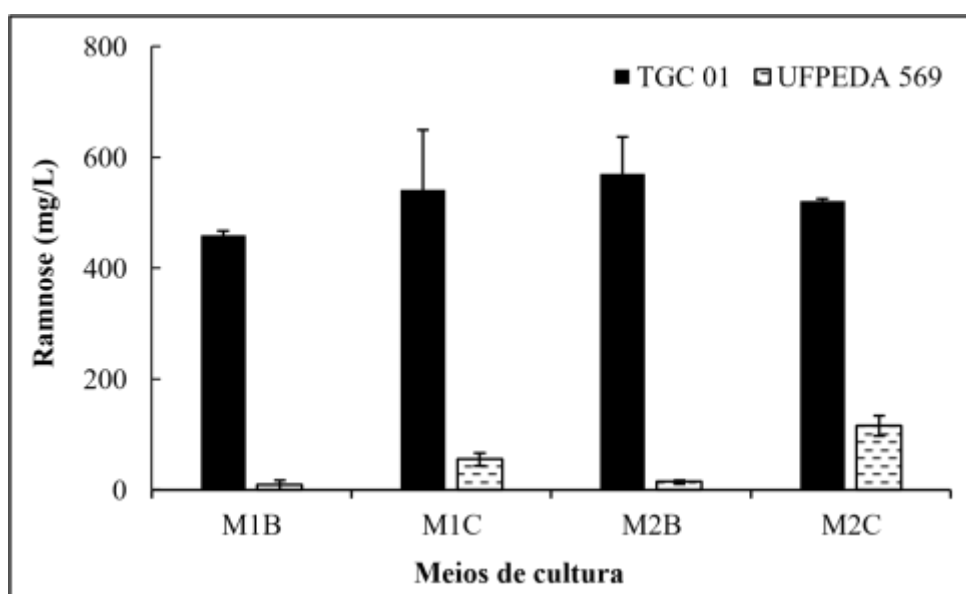


Figura 5. 1 Produção de ramnose por *P. aeruginosa* TGC 01 e *P. aeruginosa* UFPEDA 569, utilizando os meios quimicamente definidos e complexos

Os meios minerais, contendo glicerol comercial como fonte de carbono (M1C e M2C), favoreceram a produção de ramnolipídeo para a linhagem UFPEDA 569 em relação aos meios minerais contendo glicerol bruto como fonte de carbono. Em contrapartida, a linhagem TGC 01 foi capaz de utilizar de forma semelhante todos os meios minerais, independente do glicerol

ser comercial ou bruto, bem como da composição dos minerais. A concentração de ramnose foi em média, 523 mg/L.

Vários autores têm reportado menores concentrações de ramnose por *P. aeruginosa* utilizando glicerol, bruto ou comercial, como fonte de carbono, comparando com a concentração, em média (523 mg/L), observada quando a linhagem TGC 01 foi utilizada no presente trabalho. Kumar et al. (2012) descreveram a produção de 422 mg/L de ramnose, após 96 hora, por *P. aeruginosa* BS-161R, utilizando glicerol bruto. Prieto (2007) obteve 300 mg/L de ramnose à partir de glicerol comercial, também com 96 horas de cultivo por uma linhagem de *P. aeruginosa*. Moussa et al. (2014) reportaram a produção de 250 mg/L por *P. aeruginosa* TMN usando glicerol comercial como fonte de carbono, após 7 dias de cultivo.

A linhagem UFPEDA 569, aqui estudada, também foi alvo de pesquisa quanto a sua capacidade de produzir ramnolipídeo por Gouveia et al. (2003). Tais autores relataram a produção de 3,5 mg/L de ramnose para a linhagem, em cultivo com glicerol comercial, usando o meio mineral proposto por Santa Anna et al. (2002) ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0; KH_2PO_4 , 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2.). Em contrapartida, no presente estudo, UFPEDA 569 foi capaz de produzir 54,7 e 115,4 mg/L nos meios com glicerol comercial M1 e M2, respectivamente, inferindo que a composição desses meios minerais, especialmente a fonte de nitrogênio, provavelmente proporcionou um melhor desempenho para a linhagem do que a composição proposta por Santa Anna et al. (2002). Muitos estudos afirmam que o nitrato, presente nos meios M1C e M2C, é a melhor fonte de nitrogênio para a indução da produção de ramnose por *P. aeruginosa*, enquanto que o sulfato de amônia, utilizado por Santa Anna et al. (2002), não tem se mostrado uma boa fonte para a promover a síntese de ramnolipídeos (GUERRA-SANOS et al., 1984; ABDELMAWGOUD et al., 2011; MA et al., 2016). Por outro lado, Filho et al. (2009) encontraram 468 mg/L de ramnose, após 96 horas de cultivo com glicerol comercial, por *P. aeruginosa* UFPEDA 614.

Além da concentração de ramnose, outro fator que deve ser levado em consideração na escolha de uma linhagem que produz ramnolipídeo é a eficiência do biossurfactante, a qual pode ser mensurada pela tensão superficial e índice de emulsificação. As tensões superficiais dos caldos dos cultivos, livres de células, após 96 horas, bem como a redução da tensão em relação ao meio de cultura utilizado são apresentados nas figuras 5.2 e 5.3, respectivamente.

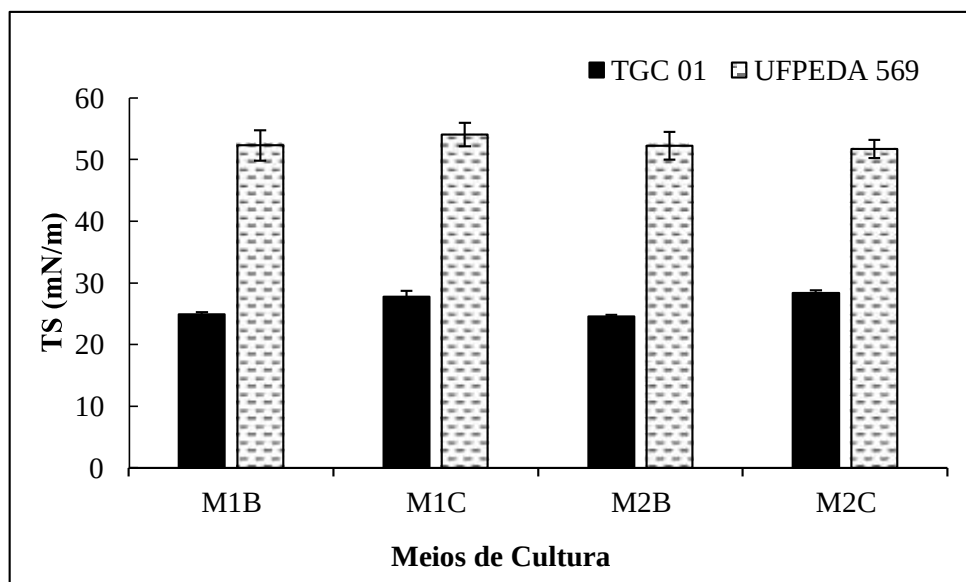


Figura 5. 2 Tensão superficial (TS) dos meios quimicamente definidos e complexos após 96 horas de cultivo, para *P. aeruginosa* TGC 01 e *P. aeruginosa* UFPEDA 569.

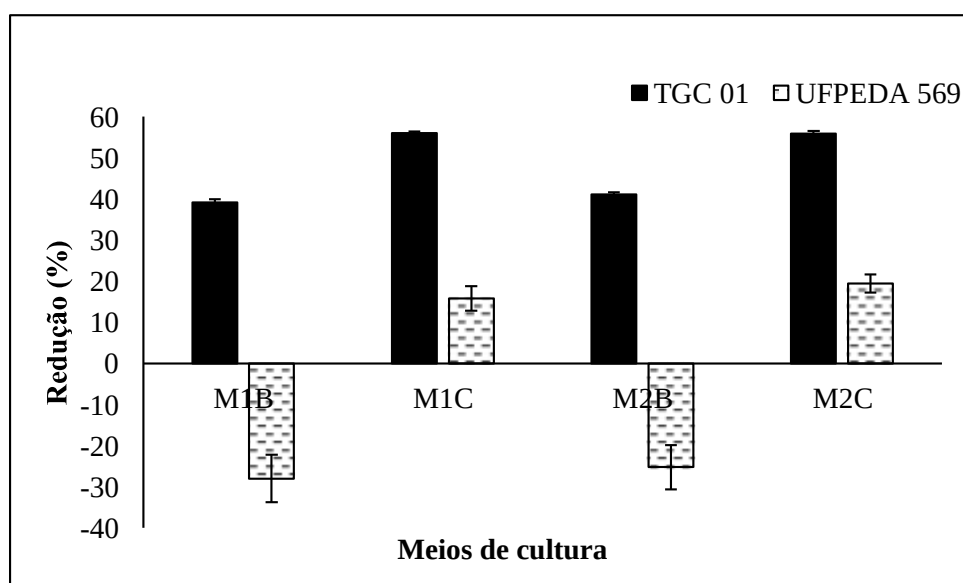


Figura 5. 3 . Redução da tensão superficial (TS) do meio de cultivo, promovida pelos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* TGC 01 e *P. aeruginosa* UFPEDA 569, utilizando os meios quimicamente definidos e complexos.

O ramnolipídeo produzido pela linhagem TGC 01 nos meios com glicerol bruto (M1B e M2B) apresentou uma tensão superficial média de 25 mN/m, enquanto que nos meios com glicerol comercial (M1C e M2C), a tensão superficial média foi 28 mN/m. Ainda em relação à linhagem TGC 01, a redução da tensão em relação ao controle foi cerca de 40 e 56 % para os meios com

glicerol bruto (M1 e M2) e comercial (M1 e M2), respectivamente. Por outro lado, para a linhagem UFPEDA 569 a tensão superficial média, para todos os meios (M1B, M2B, M1C e M2C), foi de 53 mN/m. Houve uma redução da tensão, em relação ao controle, de 15,7% e 19,4% para os meios M1 e M2 contendo glicerol comercial como fonte de carbono, respectivamente. Entretanto, para os meios com glicerol bruto, não houve redução da tensão, indicando que nesta condição, a linhagem não foi capaz de produzir ramnolipídeo em uma concentração suficiente para que houvesse atividade de superfície.

De acordo com Monteiro et al. (2007), os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* são capazes de diminuir a tensão superficial para 25 a 30 mN/m, como observado neste trabalho para TGC 01. Os resultados obtidos com esta linhagem são comparáveis aos apresentados por Silva *et al.* (2010), em que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 cultivada em meio contendo glicerol comercial apresentou uma tensão superficial de 27,6 mN/m. Sousa et al. (2014) também constataram que *P. aeruginosa* MSIC02 cultivada em meio com glicerol bruto produziu um biossurfactante que reduziu a tensão superficial para 29,2 mN/m. Em um trabalho realizado por Ma et al. (2016) um ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* DN1 reduziu a tensão para 25,88 mN/m.

O índice de emulsificação (E_{24}) é outra medida da eficiência do biossurfactante. Na determinação deste índice, utilizando os ramnolipídeos produzido pela linhagem TGC 01, houve formação de emulsão nos meios contendo glicerol bruto, cujo índice foi 58,2% para M1B e 55,1% para M2B. Não houve emulsificação do óleo quando foi utilizado glicerol comercial, independente do meio de cultura. As amostras dos cultivos com a linhagem UFPEDA 569 também não apresentaram emulsificação do óleo em nenhum dos quatro meios de cultura utilizados (Figura 5.4).

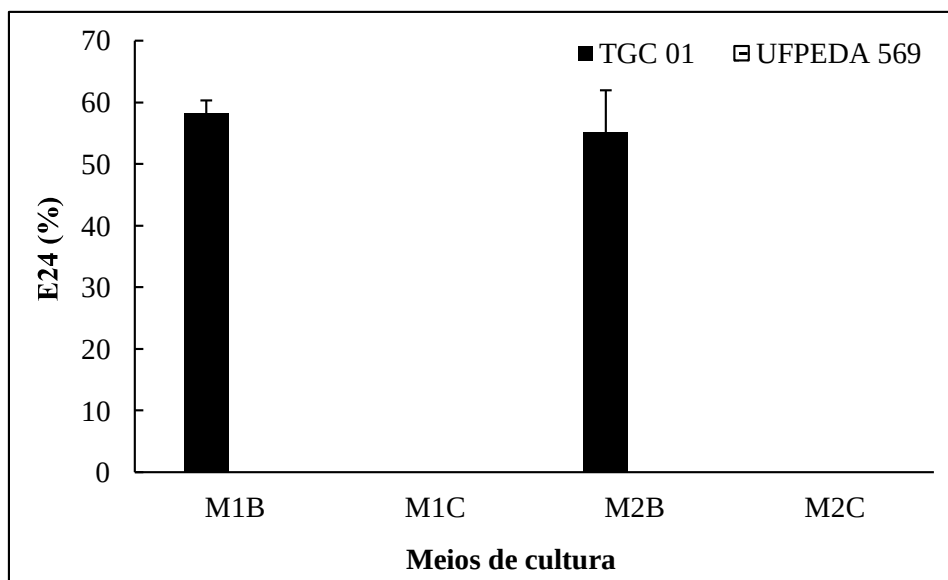


Figura 5. 4 Índice de emulsificação (E24) obtido pelos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* TGC 01, utilizando os meios complexos.

Os índices de emulsificação do M1B e M2B para TGC 01, foram semelhantes aos relatados por Bhardwaj et al., 2015, que mostram emulsificação de 58,5% quando a produção de biossurfactante foi observada a partir de *Pseudomonas* indica MTCC 3714. Moussa et al. (2014) ao compararem a capacidade emulsificante do biotensioativo produzido por *P. aeruginosa* TMN cultivada em seis diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol, sucrose, hexano, ácido oleico e óleo de oliva) obtiveram como resultado que o glicerol, o ácido oleico e o óleo de oliva foram os substratos que permitiram a máxima atividade emulsificante, em torno de 50%.

O fato de os biossurfactantes diminuírem a tensão superficial, mas não apresentarem emulsificação, como os produzidos por TGC 01 nos meios com glicerol comercial, se dá porque a capacidade de uma molécula formar emulsão não está sempre associada a atividade da tensão superficial. Cooper e Goldenberg, (1987) afirmaram isso, quando mostraram em seu estudo um biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. IAF 343, que possuía significativa propriedade emulsificante, mas não apresentava atividade de tensão superficial. Além disso, de acordo Pornsunthorntawe et al. (2008) a capacidade emulsificante de um ramnolipídeo depende da fonte de carbono utilizada para sua produção, sendo assim, é possível afirmar que os ramnolipídeos produzidos pela linhagem TGC 01 a partir do glicerol comercial, não possuem capacidade emulsificante, e que possivelmente, são diferentes daqueles produzidos a partir do glicerol bruto.

O comportamento do pH também foi avaliado para as duas linhagens. O caldo livre de células da linhagem TGC 01 após 96 h, apresenta uma faixa de pH semelhante para todos os ensaios ($7,8 \pm 0,2$). Entretanto, para linhagem UFPEDA 569, o pH foi cerca de 5,5 para os ensaios com os meios M1B e M1C e 4,7 para os ensaios com os meios M2B e M2C. A variação do pH, em relação ao pH inicial 7, é apresentada na Figura 5.5. Os resultados mostram que houve um aumento de 0,5 do pH no cultivo com a linhagem TGC 01, quando foi utilizado o meio M2 com glicerol comercial, e nas demais condições o aumento foi de 0,9. Por outro lado, nos cultivos com a linhagem UFPEDA 569 houve diminuição do pH, sendo as maiores variações observadas com o meio M2 ($-2,2 \pm 0,13$), independente do glicerol ser o comercial ou o bruto.

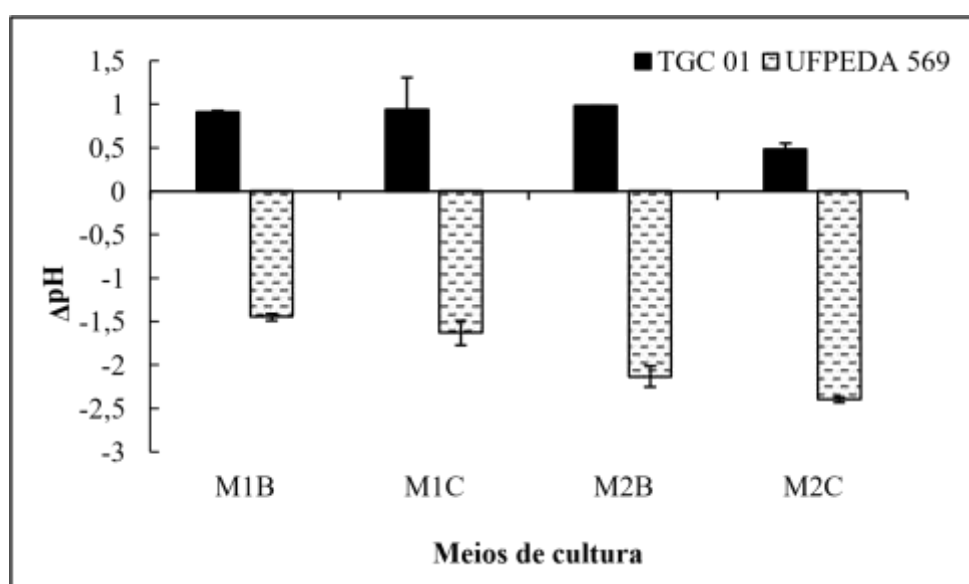


Figura 5. 5 Variação do pH, em relação ao pH inicial de 7, nas quatro condições de cultivo, para *P. aeruginosa* TGC 01 e *P. aeruginosa* UFPEDA 569.

O aumento do pH é relatado em cultivos com *Pseudomonas* para a produção de ramnolipídeos, como ocorreu com a linhagem TGC 01. Tal comportamento foi observado em cultivos da linhagem *P. aeruginosa* MSIC02, onde houve um aumento de 1,2 no pH após 96 horas de cultivo (SOUSA et al., 2014). Na produção de biossurfactante por *P. fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato, o pH atingiu valores de 7,0 e 8,5, a partir do pH inicial de 6,0. De acordo com os autores, o aumento do pH pode estar relacionado ao consumo da fonte de nitrogênio existente na milhocina (SILVA et al., 2010). Em cultivos da linhagem *P. aeruginosa* E03-40 em frascos agitados contendo meio com sais minerais na presença de nitrato

e glicerol, foram obtidos valores de pH entre 8,0 e 8,5 após 40 horas de cultivo, partindo de pH 7, sendo este aumento atribuído à denitrificação em condições microaeróbias (PINZONGAMEZ, 2009). No presente trabalho, o aumento do pH pode ser atribuído ao consumo da fonte de nitrogênio por TGC 01, visto que os cultivos foram realizados em condições aeróbias.

Alguns trabalhos sobre cultivos com *P. aeruginosa* para a produção de ramnolipídeos, apresentaram uma diminuição do pH no início e, em seguida um aumento. Silva et al. (2010) estudando a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* UCP 0992 observaram um decréscimo do pH de 6,8 para 6,0 nas primeiras 24 horas, e após 120 horas o pH atingiu valores em torno de 8,5. O mesmo comportamento foi observado por Robert et al. (1991), em que o pH diminuiu de 7,0 para 6,0, nas primeiras 20 horas e depois alcançou o valor de 9, com 44 horas de cultivo. Levando em consideração essas referências, é possível que para a linhagem UFPEDA 569 o tempo de cultivo de 96 horas não tenha sido suficiente para que o comportamento de redução e subsequente aumento do pH fosse observado, como aconteceu nos cultivos com as linhagens mencionadas acima.

Com relação ao crescimento das linhagens, a variação da biomassa para as quatro condições de cultivo é apresentada na Figura 5.6. A linhagem TGC 01 cresceu cerca de 3 g/L nos meios com glicerol bruto e 2 g/L nos meios com glicerol comercial. Neste caso, os meios mais favoráveis para o crescimento (M1B e M2B) também apresentaram menor valor de tensão superficial, além de serem os únicos que proporcionaram a formação de emulsão. Os meios com glicerol comercial permitiram um menor crescimento, no entanto, houve produção de ramnose e boa atividade de superfície (tensão superficial em 28mN/m). A linhagem UFPEDA 569 apresentou um crescimento em torno de 0,72 g/L ($\pm 0,04$) nos cultivos com os meios M1C, M2B e M2C, e 1,7 g/L no cultivo com o M1B. Tais resultados mostram que o meio M1 com glicerol bruto foi mais favorável para o crescimento dessa linhagem. Entretanto, este meio proporcionou a menor produção de ramnolipídeo, não havendo redução da tensão superficial nem formação de emulsão.

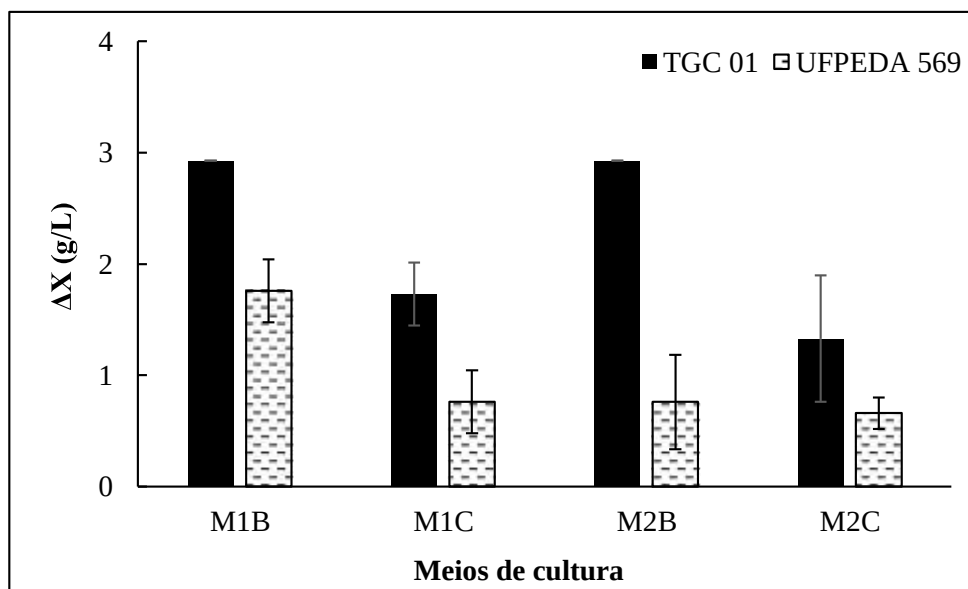


Figura 5. 6 Variação de biomassa nas quatro condições de cultivo para *P. aeruginosa* TGC 01 e *P. aeruginosa* UFPEDA 569.

Para os dois tipos de glicerol usados no presente trabalho, os resultados mostram que a linhagem TGC 01 foi capaz de consumir tanto o glicerol comercial quanto o bruto, independente do meio mineral utilizado (Figura 5.7). Isso é positivo, principalmente pelo fato desta linhagem ser capaz de utilizar o glicerol na sua forma bruta, fonte barata e renovável, para a produção de ramnolipídeos. Foram obtidos maiores consumos nos cultivos com M1B e M1C ($38,63 \pm 3,04$), entretanto, os M2B e M2C apesar de apresentarem menor consumo, proporcionaram produção de ramnose semelhante àquela obtida com M1B e M1C (Figura 5.1). Isso permitiu a seleção do meio mais barato, ou seja, com menor quantidade de nutrientes e com glicerol bruto (M2B) para a produção de ramnolipídeos pela linhagem TGC 01.

A linhagem UFPEDA 569 também consumiu glicerol nas quatro condições de cultivo, sendo os maiores consumos também obtidos para os meios M1B e M1C, cerca de 15 %. Para essa linhagem, o consumo de glicerol foi proporcional ao crescimento celular, mas como citado anteriormente a produção de ramnose foi baixa, quando comparada com aquela obtida pela linhagem TGC 01.

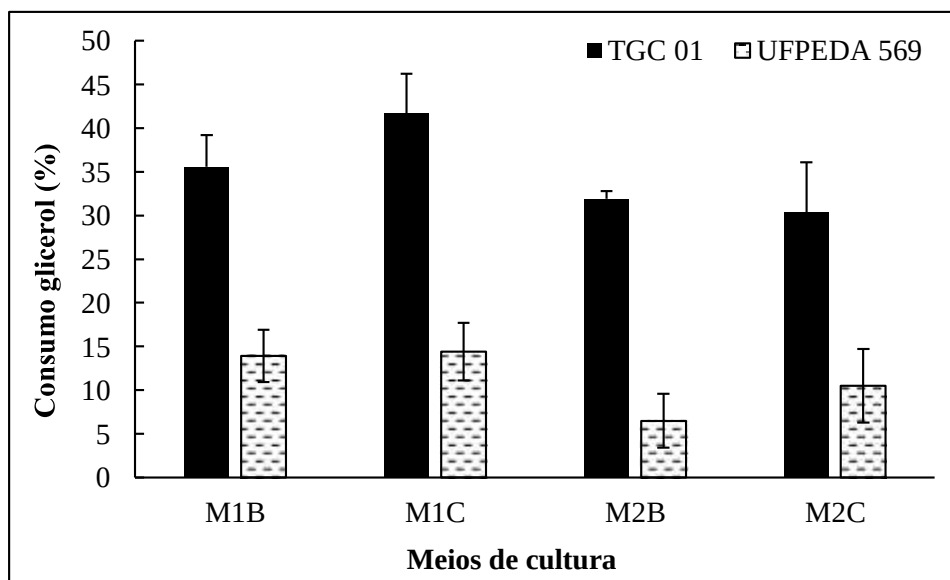


Figura 5. 7 Consumo do glicerol nas quatro condições de cultivo para *P. aeruginosa* TGC 01 e *P. aeruginosa* UFPEDA 569

O glicerol tem se mostrado uma fonte de carbono eficiente na produção de biossurfactantes e é possível encontrar na literatura vários trabalhos que têm buscado entender a influência desse substrato na produção dessas biomoléculas, a fim de encontrar as condições ótimas para o aumento da produtividade (SOUSA et al., 2008; SILVA et al., 2011; RIKALOVIC et al., 2012; MOUSSA et al., 2014; SOUSA et al., 2014).

5.2 Influência da razão C/N e da agitação na produção de ramnolipídeos pela linhagem TGC 01

Após a comparação entre as duas linhagens de *P. aeruginosa*, UFPEDA 569 e TGC 01, constatou-se que a linhagem que obteve uma maior concentração de ramnose, e consequentemente uma maior produção de ramnolipídeo, com capacidade de formar emulsões estáveis e de reduzir a tensão superficial foi a TGC 01. Sendo assim, esta foi a bactéria selecionada como produtora de ramnolipídeo a ser utilizada neste trabalho, a partir do meio mineral 2 tendo como fonte de carbono o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel.

Nesta etapa, foram realizados cultivos com o intuito de investigar como os fatores, razão

C/N e agitação, influenciariam no processo de produção de ramnolipídeos pela linhagem TGC 01. Para isso foi aplicado um planejamento fatorial 2^2 , cujos níveis estão descritos na Tabela 4.3. Os resultados mostraram que quando a agitação variou de 100 para 150 rpm, houve aumento na produção de ramnose, e este foi mais acentuado para a razão C/N 24. Da mesma forma, quando a razão C/N variou de 12 para 24, também houve aumento da produção, mas apenas quando foi utilizado 150 rpm (Figura 5.8).

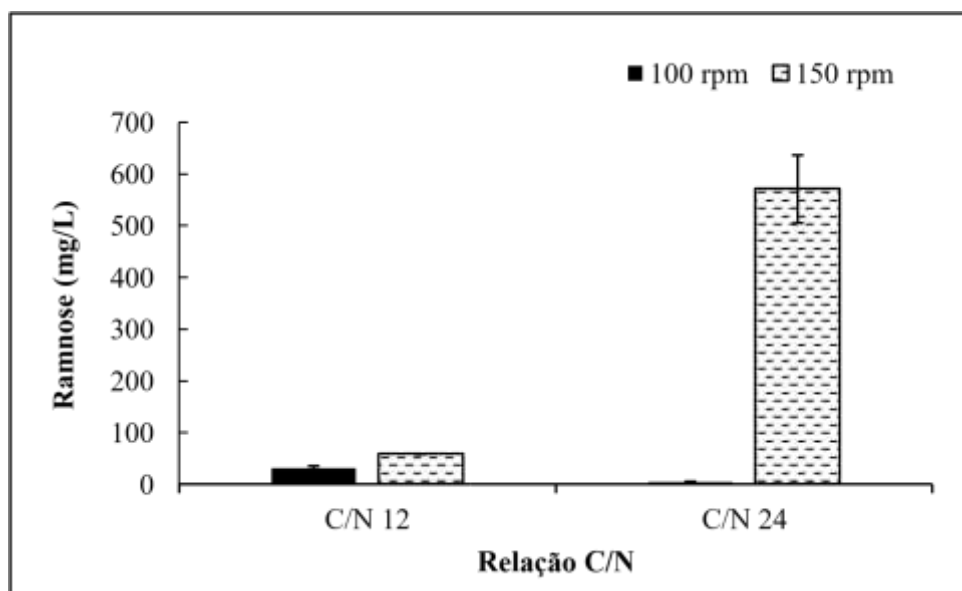


Figura 5. 8 Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação na produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* TGC-01.

É sabido que níveis reduzidos de nitrogênio no meio podem favorecer o metabolismo celular em direção à produção de metabólitos (ABDEL-MAWGOUD et al. 2011). Geralmente, o acúmulo de lipídeo intracelular é favorecido quando há limitação de algum nutriente no meio de cultivo, e a limitação mais comumente utilizada é a limitação de nitrogênio (SOUSA, 2008). Dessa maneira, a menor quantidade de nitrato de sódio na relação C/N 24, provavelmente direcionou o metabolismo celular para uma maior produção de ramnolipídeos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Guerra-Santos et al. (1984, 1986) para *P. aeruginosa* DSM 2569, onde as relações C/N entre 16 e 18 levaram a maior produtividade de ramnolipídeos, enquanto que não foi observada produção em relações C/N inferiores a 11. Santa Anna et al. (2002) obtiveram uma concentração de 690 mg/L de ramnose usando uma

relação C/N 20 e Prieto (2007) ao estudar várias relações C/N obteve uma produção de 940 mg/L de ramnose quando a relação foi de 22.

Moussa et al. (2014) afirmam que a velocidade de agitação afeta a eficiência de transferência de massa e de oxigênio no meio e é considerada crucial para a formação de biossurfactante e crescimento celular por bactérias aeróbicas como *P. aeruginosa*. Estes mesmos autores, ao analisarem os efeitos da agitação na produção de ramnolipídeos, verificaram que o aumento da agitação de 100 para 200 rpm dobrou a produção, de 940 mg/L para 1800 mg/L, e aumentou o crescimento celular em 0,16 g/L.

Na Figura 5.9 é apresentado como a agitação e a razão C/N afetaram o crescimento da linhagem TGC 01. Com a variação da razão C/N de 12 para 24, houve diminuição do crescimento, sendo este efeito mais acentuado para 100 rpm. Isso pode ser explicado pelo fato de que quando há um excesso de fonte de nitrogênio, como ocorreu no cultivo com razão C/N 12, o consumo do substrato é direcionado para a produção de material celular (BHARALI et al., 2011; ONWOSI, et al., 2012; ZHU et al., 2012). Por outro lado, houve aumento do crescimento quando a agitação variou de 100 para 150 rpm, para ambas as razões C/N, sendo o maior aumento para a condição C/N 24.

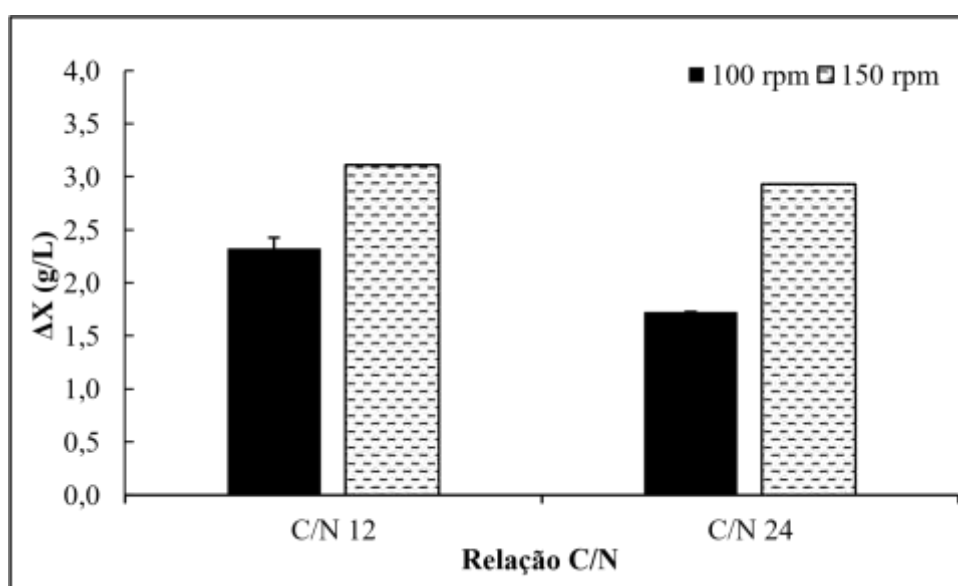


Figura 5. 9 Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação na variação da biomassa de *P. aeruginosa* TGC-01.

A variação do pH é apresentada na *Figura 5.10*, onde é visto que apenas quando foi utilizada a razão C/N 24 e 150 rpm houve aumento do pH, sendo também esta a condição que apresentou maior produção de ramnolipídeos. Como citado anteriormente (Tópico 5.1), o aumento do pH está relacionado ao consumo da fonte de nitrogênio, indicando que nas outras condições onde houve diminuição do pH (C/N 12, 100 e 150 rpm, e C/N 24, 100 rpm), esse consumo não foi favorecido. Além disso, resultados encontrados por Sousa et al. (2014) mostraram que cultivos com maior concentração de glicerol (C/N 21) apresentaram pH final maior do que aqueles cuja concentração de glicerol foi menor (C/N 12).

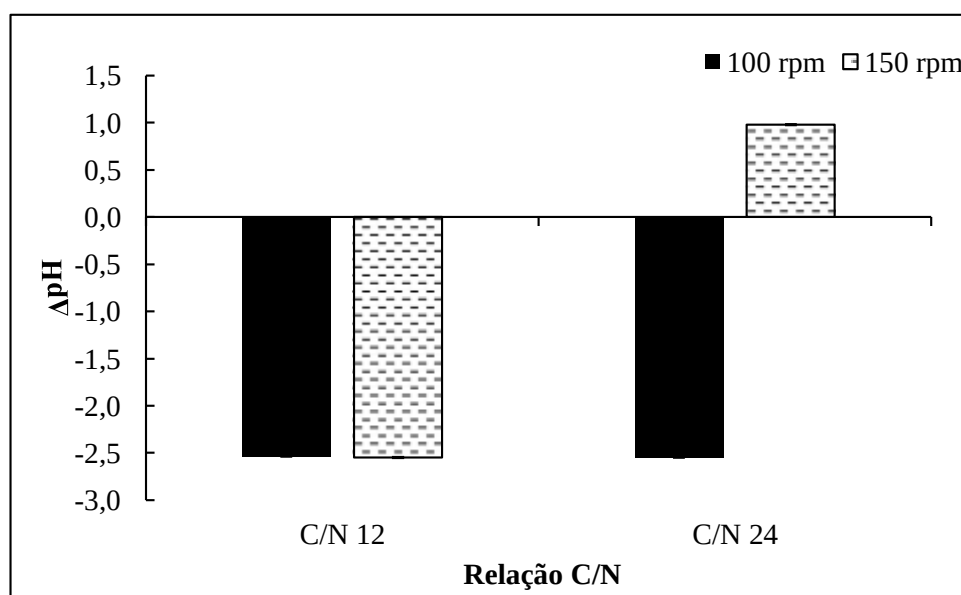


Figura 5. 10 . Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação na variação do pH do meio de cultivo de *P. aeruginosa* TGC-01

A Figura 5.11 apresenta o consumo do glicerol para cada ensaio. O maior consumo foi de 33,7% para 100 rpm C/N 12. A maior parte do glicerol que foi consumido em todos os ensaios foi convertido em biomassa (Tabela 5.1).

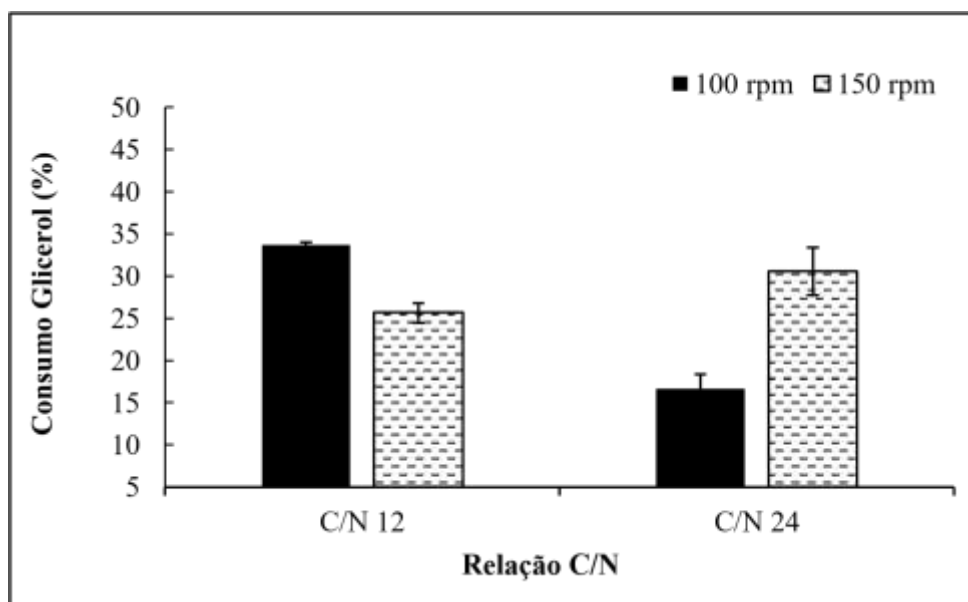


Figura 5. 11 Efeito da relação carbono-nitrogênio e da agitação no consumo do glicerol do meio de cultivo de *P. aeruginosa* TGC-01

Tabela 5. 1 Produtividades dos cultivos com *P. aeruginosa* TGC 01 realizados em diferentes níveis dos fatores do planejamento fatorial 2².

Glicerol NaNO ₃ (g/L)	Relação C/N	Agitação rpm	P _P (mg/L.h)	P _X (mg/L.h)
40	8	12	0,33	24
40	4	24	0,05	18
40	8	12	0,61	32
40	4	24	5,95	31

A produtividade em biossurfactante (P_P) sofreu uma diminuição de 9,8 vezes quando a relação C/N variou de 12 para 24 na agitação de 100 rpm, enquanto que essa mesma variação na agitação de 150 rpm acarretou num aumento da produtividade em 9,8 vezes (Tabela 5.1). Com o aumento da agitação de 100 para 150 a uma razão C/N de 12 a produtividade dobrou, enquanto que na razão C/N de 24 o aumento foi de 119 vezes.

Para a produtividade em biomassa (P_X) a variação da relação C/N de 12 para 24 ocasionou um aumento de 1,33 com agitação de 100 rpm e uma diminuição de 1,03 vezes a 150 rpm. A variação da agitação de 100 para 150 provocou um aumento de 1,33 e 1,72 vezes para relação C/N de 12 e 24, respectivamente.

A partir dos resultados do planejamento fatorial 2², foi proposto um modelo linear para a produção de ramnolipídeo (ramnose), através do software Statistica 7.0 (Equação 5.1).

$$Y = 166,5 + 242,5x_1 + 297x_2 + 269,5x_1x_2 \quad (5.1)$$

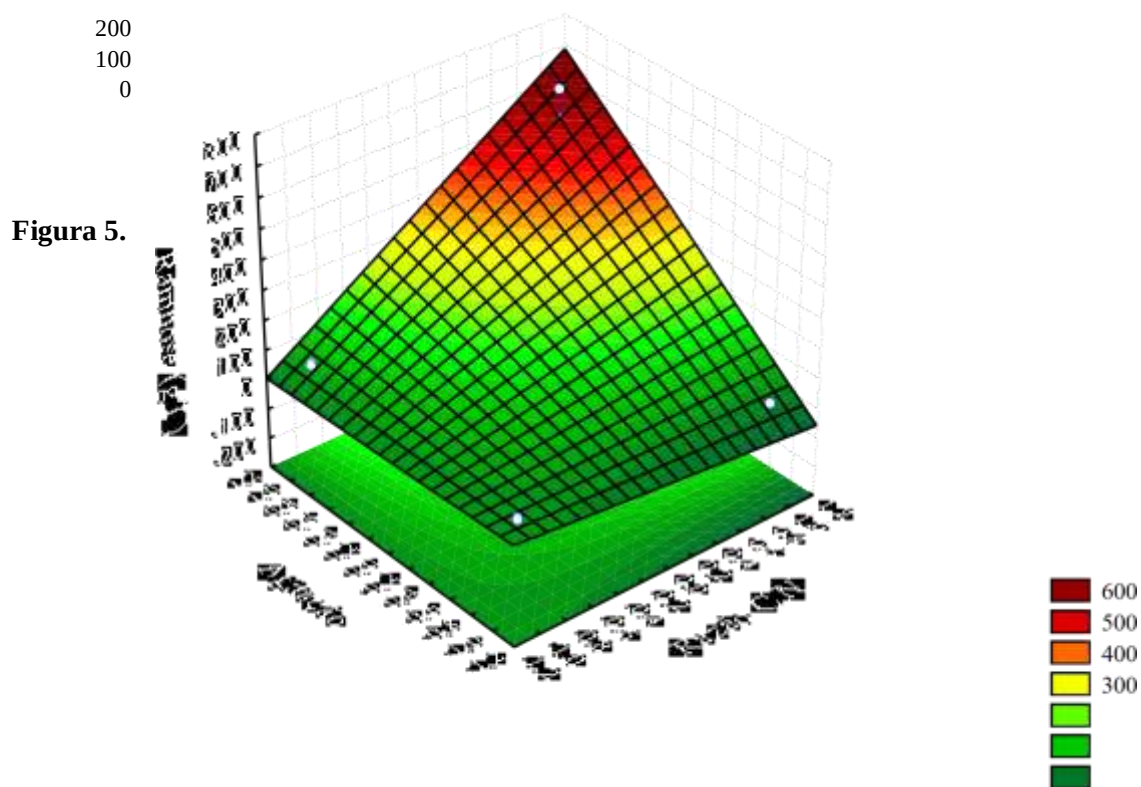
Onde:

“x1” corresponde a relação carbono-nitrogênio, “x2” a agitação e “x1x2” ao efeito de interação entre os dois fatores. Todos os efeitos foram significativos.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para avaliar a qualidade do ajuste do modelo (Tabela 5.2.). Os valores de resíduo e falta de ajuste apresentam-se baixos, e o coeficiente de determinação, R², foi 0,98998, indicando que o modelo está bem ajustado. A razão entre a média quadrática devido à regressão e a média quadrática devido ao resíduo foi maior 31,4 vezes do que o valor tabelado F ($\alpha = 0,05$), confirmando a adequabilidade do modelo (NETO, 2010).

Tabela 5. 2 Análise de variância (ANOVA) do modelo linear.

Varição	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	439291,0	3	146430,3
Resíduo	4445,0	4	1111,25
Falta de Ajuste	3333,5	0	
Erro Puro	1111,5	4	277,9



Na Figura 5.12 é apresentada a superfície de resposta para os ensaios do planejamento fatorial. Há um aumento na produção de ramnose quando a relação C/N varia de 12 (-1) para 24 (+1) na agitação de 150 rpm (+1), mostrando que para uma maior produção de ramnose é necessário um maior nível de agitação (maior aeração) e uma maior relação C/N nos cultivos.

5.3 Estudo cinético da produção do biossurfactante

Nessa etapa do trabalho foram realizados cultivos com inóculos de 5 e de 10% (V/V). Com o intuito de proporcionar uma maior aeração, visto que tal fator favorece a produção de ramnose como mostrou o resultado do planejamento fatorial realizado anteriormente (Figura 5.12), o volume de meio de cultura no frasco foi diminuído (50 mL em Erlenmeyers de 500 mL). As concentrações de biomassa, glicerol e ramnose, bem como o perfil do pH e da tensão superficial, durante 120 horas de cultivo, são apresentados nas Figuras 5.13 e 5.14.

A diferença no tamanho do inóculo (5 ou 10 % V/V) não gerou uma grande alteração na concentração e comportamento dos parâmetros citados acima (biomassa, glicerol, ramnose, pH e tensão superficial). Por outro lado, quando comparou-se os cultivos da cinética com os cultivos para o melhoramento da produção (Tópico 5.2) em que o volume de meio usado foi de 100 mL em Erlenmeyers de 500 mL, resultando numa menor aeração, uma diferença foi observada na biomassa, consumo do glicerol, e concentração de ramnose.

As concentrações de biomassa obtidas em ambos inóculos foram cerca de duas vezes maior (Figura 5.13) do que aquela obtida com inóculo de 5% (V/V) usando 100 mL de meio de cultura em Erlenmeyers de 500 mL (Figura 5.10). O aumento da aeração devido à redução do volume do meio, nos cultivos da cinética, promoveu o aumento do crescimento de *P. aeruginosa* TGC 01. Outro fator que favoreceu o crescimento da linhagem foi o consumo do glicerol, que aumentou cerca de 50% comparado ao cultivo com menor aeração. O pH apresentou um aumento nas primeiras 24 horas e durante o restante do cultivo manteve-se estável (Figura 5.13).

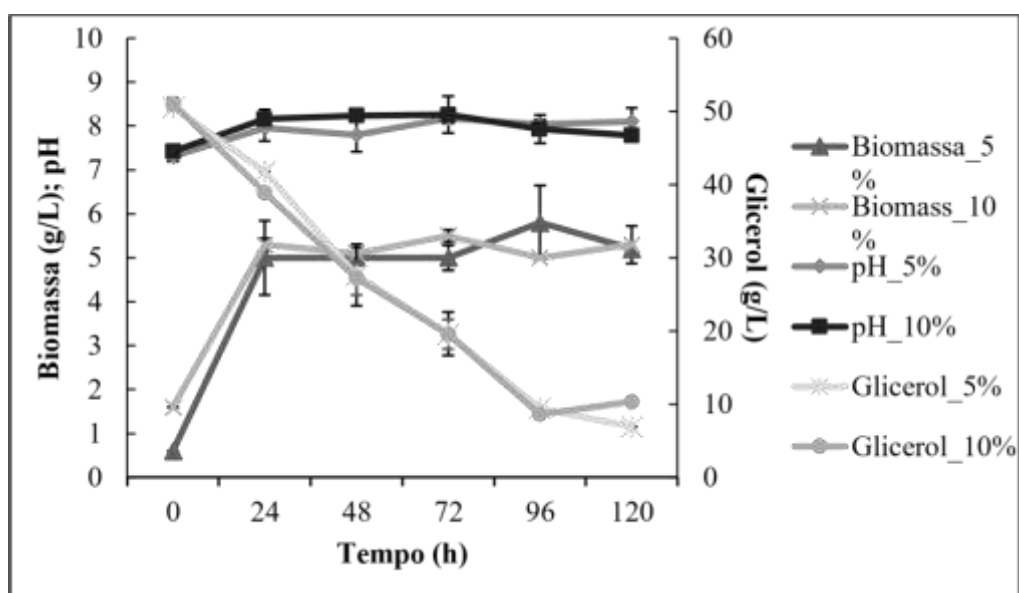


Figura 5. 13 . Biomassa, concentração de glicerol e pH durante o cultivo com *P. aeruginosa* TGC 01 usando meio mineral 2 suplementado com glicerol bruto e nitrato de sódio.

A concentração final de ramnose foi em média 1000 mg/L, e em relação ao meio com aeração menor (Tópico 5.2) houve um aumento de 75,5 %. A tensão superficial (TS) diminuiu para

valores inferiores a 30 mN/m devido a presença do biossurfactante após 48 horas de cultivo (Figura 5.14).

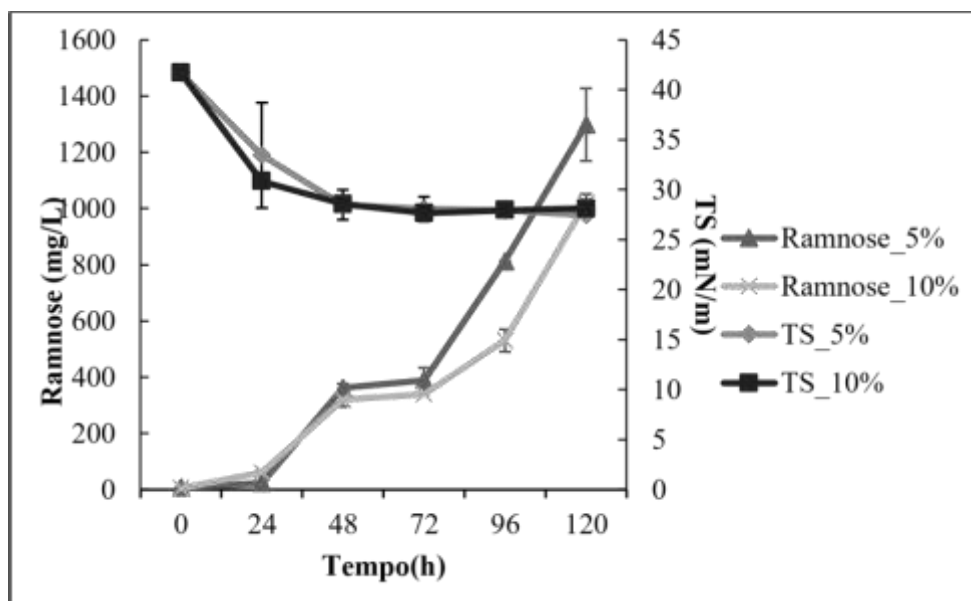


Figura 5. 14 Concentração de ramnose e tensão superficial (TS) durante o cultivo com *P.*

aeruginosa TGC 01 usando meio mineral 2 suplementado com glicerol bruto e nitrato de sódio.

Wei et al., (2005) reportaram um crescimento de cerca de 80% na produção de ramnolípídeo por *P. aeruginosa* J4 com o aumento da aeração pela variação da agitação de 50 para 200 rpm. Kumar et al. (2012) também alcançaram a maior produção de ramnose (3,3 g/L) com a maior taxa de agitação empregada (200 rpm). No estudo cinético realizado por esses autores, a tensão superficial atingiu seu valor mínimo (28 mN/m) após 72 horas de cultivo. Da mesma forma, Eragi et al., (2016) ao aumentarem a taxa de agitação de 100 para 180 rpm, obtiveram um acréscimo de 47% na produção de ramnose por *P. aeruginosa* WAE, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono e NaNO_3 como fonte de nitrogênio. Em contrapartida, TGC 01, utilizada neste trabalho, foi capaz de produzir uma concentração de biossurfactante suficiente para reduzir o máximo a tensão superficial ($27,8 \text{ mN/m} \pm 0,4$) em 48 horas de cultivo.

No que diz respeito a produtividade em biomassa (P_X) e em biossurfactante (P_P), as concentrações foram cerca de 44 mg/L.h e 10 mg/L.h, respectivamente, independente do inóculo (5 ou 10%). Por outro lado, a produtividade obtida com baixa aeração (Tabela 5.1) foi por volta de 30 mg/L.h (P_X) e 6 mg/L.h (P_P) usando o mesmo meio de cultura. A produtividade

em biomassa bacteriana e do biossurfactante, usando uma aeração maior foi 46 e 56 % mais alta, respectivamente, do que a obtida no tópico 5.2.

Moussa et al. (2014) encontraram menor P_X e P_P , usando glicerol comercial e NH_4NO_3 nos cultivos com *P. aeruginosa* TMN: 8,0 mg/L.h (P_X) e 1.5 mg/L.h (P_P). Os mesmos autores encontraram também menor produtividade quando glicose e $NaNO_3$ foram usados: 26,8 mg/L.h (P_X) e 2,0 mg/L.h (P_P). Moussa et al. (2014) não usaram glicerol e $NaNO_3$, mas glicose e $NaNO_3$ ou glicerol e NH_4NO_3 . Entretanto, Sousa et al. (2014) obtiveram 10 mg/L.h (P_X) e 31,9 mg/L.h (P_P) em cultivos com *P. aeruginosa* MSIC02 usando glicerol bruto e $NaNO_3$, como neste trabalho. A produtividade em biomassa foi quatro vezes menor do que a obtida por *P. aeruginosa* TGC 01, entretanto, a produtividade em produto (32 mg/L.h) foi três vezes maior do que a produtividade obtida neste trabalho.

5.4 Extração e Caracterização do Biossurfactante

Após a extração com clorofórmio:metanol, foi possível recuperar 0,561 g de ramnolípídeo bruto, que dissolvido em 50 mL de água destilada, resultou numa solução de concentração final de 11,22 g/L. Essa solução foi usada na determinação da concentração micelar crítica (CMC), no teste da estabilidade do biossurfactante, e na hidrólise enzimática.

A concentração micelar crítica (CMC) é um parâmetro que pode ser usado como indicador da qualidade do biossurfactante. O valor da CMC do biossurfactante bruto produzido por *P. aeruginosa* TGC 01 foi cerca de 100 mg/L (Figura 5.15). Essa concentração reduziu a tensão superficial de 72 para 27 mN/m. Kaya et al. (2014) afirmam que a CMC do biossurfactante produzido pelas espécies de *Pseudomonas* geralmente varia entre 50 e 200 mg/L, apoiando o resultado obtido neste trabalho. CMC semelhante (130 mg/L) também foi encontrado com o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* PA1, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono (PEREIRA et al., 2013).

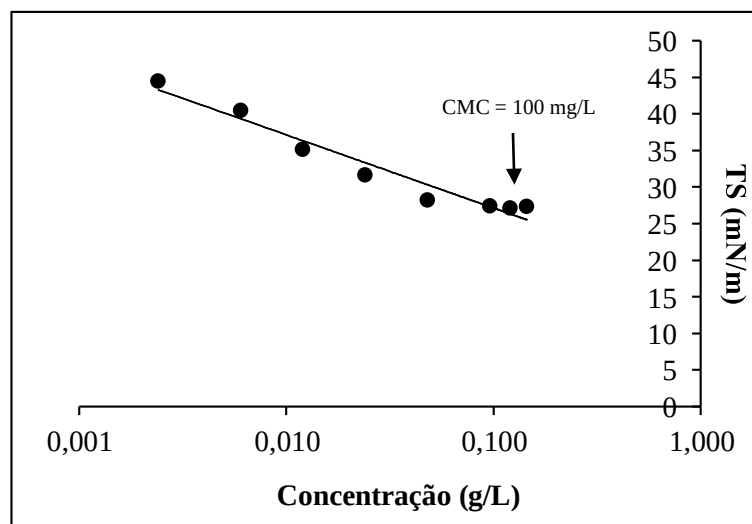


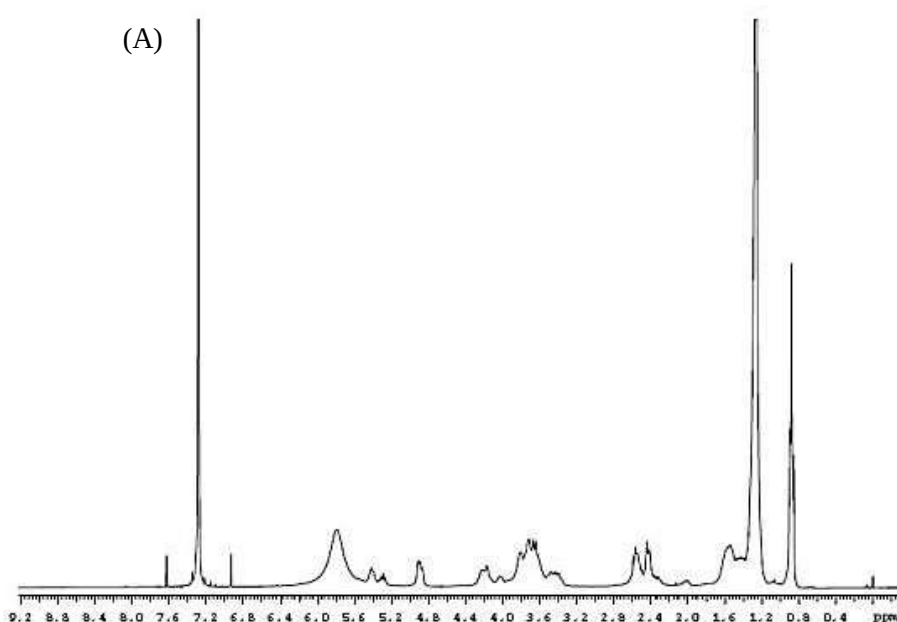
Figura 5. 15 Tensão superficial como uma função logarítmica da concentração de ramnolipídeo. O valor de tensão superficial de referência foi 50 mN/m.

A estabilidade do ramnolipídeo bruto de *P. aeruginosa* TGC 01 foi avaliada através da medida do índice de emulsificação (E_{24}), após submeter o tensoativo às condições da hidrólise enzimática, pH 4,8 a 50°C durante 4 horas. O índice de emulsificação foi estável ($64,5 \pm 4,5\%$) antes e depois da simulação sob as condições da hidrólise, mostrando que o ramnolipídeo pode ser adicionado na hidrólise da biomassa sem sofrer alterações nas suas propriedades, que porventura viessem prejudicar sua possível potencialização do processo.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica eficiente para a elucidação estrutural de biossurfactantes. Para o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* TGC 01, o espectro ^1H RMN mostra sinais entre δ 6.5 ppm e 0.5 ppm (Figura 5.16a), elucidando que não há grupo aromáticos na estrutura. Há um largo sinal centrado em 5,79 ppm, que foi atribuído a grupos hidroxila. Entre δ 5.6 e 4.8 ppm, é possível observar três multipletos que são atribuídos a grupos insaturados (olefinas) e carbinóis. Existe outro grupo de sinais atribuídos a grupos carbinóis que estão entre δ 4.4 e 3.2 ppm (Figure 5.16b). Finalmente, entre δ 2.8 e 0.5 ppm, existem dois conjuntos de sinais atribuídos a cadeias alquílicas. Isto sugere que o biossurfactante é constituído por um polissacarídeo de alquila.

O espectro 2D RMN ajuda a confirmar as atribuições feitas. O espectro ^1H - ^1H COSY mostra que os sinais centrados em δ 5.41 e 5.29 ppm têm acoplamento escalar com o sinal δ 2.56 ppm, portanto, a cadeia alquílica é insaturada. As correlações COSY mostram que os sinais em δ 4.22 e 4.02 ppm com o sinal em δ 2.41 ppm indicam que existem sobreposições entre os

sinais atribuídos à cadeia alquílica e o grupo polissacarídico. Os espectros HMQC e HMBC mostram as correlações heteronucleares. Nesses espectros são observados grupos carbonila (δ_C 190 – 170 ppm), núcleos de carbono insaturados (δ_C 135 – 125 ppm), grupos carbinol (δ_C 75 – 55 ppm) e cadeias alquílicas (δ_C 50 – 10 ppm). Novamente, há a indicação que a instauração está entre as cadeias alquílicas devido a correlação HMBC entre os sinais centrados em δ_C 133 e 130 ppm com o sinal centrado em δ_H 3.61. Por outro lado, os sinais atribuídos para o núcleo de hidrogênio ligado a átomos de carbono insaturados apresentam uma correlação HMBC com grupos carbonil/carbonila.



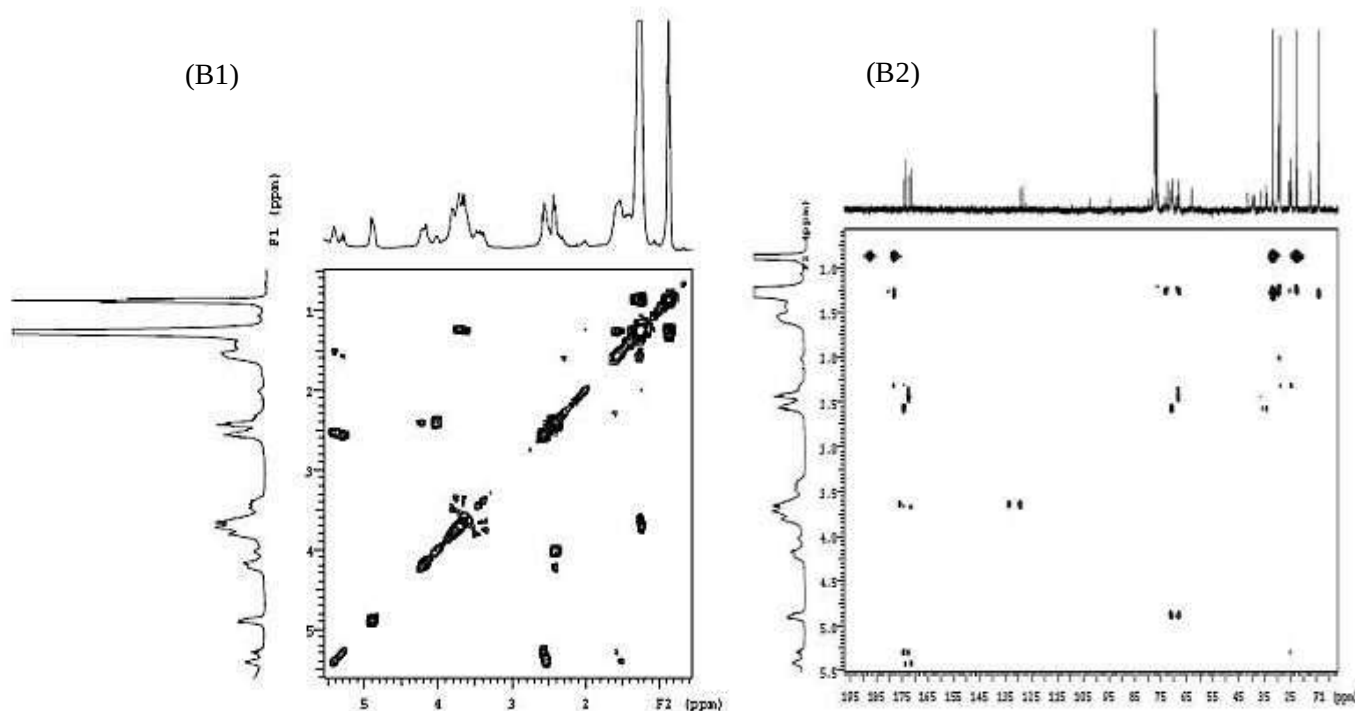


Figura 5. 16 Espectros do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* TGC 01 cultivada em meio mineral suplementado com glicerol bruto e nitrato de sódio. (A) Espectro 1H RMN (CDCl₃, 300 MHz). (B1) espectro 1H-1H COSY RMN (CDCl₃, 300 MHz) e (B2) espectro 1H-13C H.

Portanto, o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* TGC 01 é constituído por dois grupos: uma porção polissacarídica e uma porção alquílica insaturada, estrutura característica dos glicolipídeos. Todos os biossurfactante são anfipáticos, constituídos por um grupo polar (hidrofílico) e um grupo apolar (hidrofóbico). O grupo hidrofílico consiste de mono-, oligo-, ou polissacarídeos, peptídeos ou proteínas, e o grupo hidrofóbico usualmente contém ácidos graxos ou álcoois graxos saturados e insaturados (LANG, 2002; Campos et al., 2013; Silva et al, 2014). De acordo com os espectros de RMN, o biossurfactante de *P. aeruginosa* TGC 01 é um ramnolipídeo, visto que é composto por carboidratos em combinação com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos de cadeia longa.

5.5 Efeito da adição do ramnolípídeo produzido pela linhagem TGC 01 na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos

A concentração micelar crítica (CMC) foi usada como base para determinar a concentração dos tensoativos adicionados nas hidrólises enzimáticas. Portanto, 100 mg/L do biossurfactante ou dos surfactantes químicos, (Tween-80 e Triton-X), foram utilizados nos ensaios. A Figura 5.17 mostra que houve liberação de glicose em todas as condições do delineamento fatorial 3^2 (Tabela 4.2), independente do tensoativo adicionado, entretanto, a maior concentração de glicose foi obtida com papel de escritório descartado (PED) (ensaio 1, 2 e 3), seguido por cavaco de eucalipto (CE) (ensaio 7, 8 e 9) e jornal (JO) (ensaio 4, 5 e 6).

O baixo teor de lignina (3 % m/m) e o alto teor de celulose (57 % m/m) presentes no PED provavelmente foram os fatores responsáveis pela maior concentração de glicose liberada, em relação ao JO (47 % m/m de celulose; 18 % m/m de lignina total). Por outro lado, o baixo teor de lignina existente no PED, é o fator que explica uma maior concentração de glicose em relação ao CE (62 % m/m de celulose; 32 % m/m de lignina total). Apesar de conter um teor de lignina maior, a hidrólise do CE proporcionou maior concentração de glicose do que a hidrólise do JO. Isto provavelmente aconteceu devido ao menor teor de hemicelulose no CE (4% m/m) em relação ao JO (18% m/m), bem como ao maior teor de celulose. A remoção de hemicelulose aumenta a dimensão média dos poros do substrato e aumenta assim a acessibilidade das enzimas e a probabilidade de a celulose ser hidrolisada (CHANDRA et al., 2007).

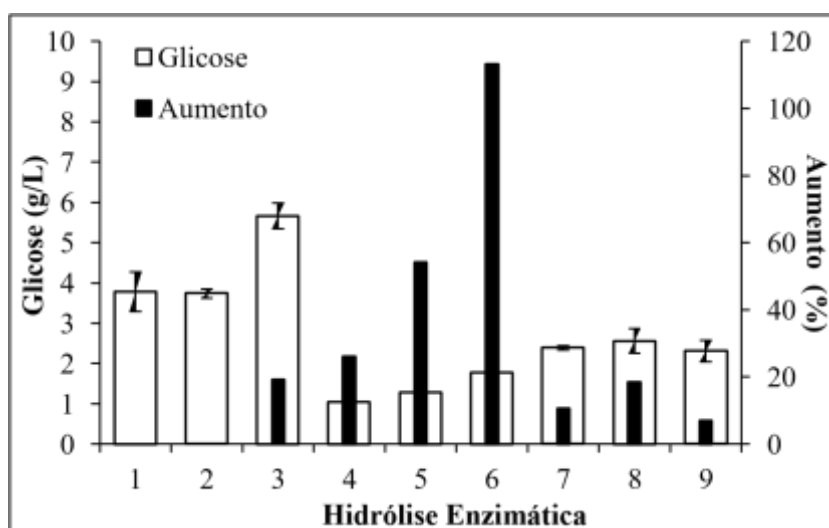


Figura 5. 17 Liberação de glicose após 4 horas de hidrólise enzimática nas condições do planejamento fatorial 3^2 e seu aumento em relação ao controle (sem adição de tensoativo).

A adição do biossurfactante resultou num aumento da concentração de glicose na hidrólise enzimática do PED e do JO, comparado ao controle (ensaios 3 e 6). Em contrapartida, o CE exibiu maior concentração de glicose quando Triton-X foi adicionado (ensaio 8). Não houve aumento na concentração de glicose quando os surfactantes químicos foram usados na hidrólise do PED (ensaios 1 e 2), entretanto, Triton-X produziu melhores resultados do que o Tween 80 na hidrólise do JO (ensaios 4 e 5 respectivamente). O biossurfactante foi o tensoativo que apresentou menor aumento na concentração de glicose quando o CE foi usado.

É importante salientar que apesar de a maior concentração de glicose ser observada na hidrólise do PED com a adição do biossurfactante (ensaio 3), a maior razão entre as concentrações de glicose, com e sem do tensoativo, foi observada na hidrólise JO com adição do biossurfactante (ensaio 6). Desta maneira, mesmo com uma liberação de glicose menor do que a liberada pelo PED, a hidrólise do JO com biossurfactante mostrou-se mais eficiente, pois liberou mais glicose em relação ao controle, do que o PED na mesma condição.

Um modelo quadrático para o planejamento fatorial 3^2 , com duplicata em todos os ensaios, foi obtido (Equação 2). As duas variáveis escolhidas foram designadas como X_1 (tipo de biomassa) e X_2 (tipo de tensoativo). O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9911, indicando que o modelo é adequado.

$$\hat{y} = 1.27 + 0.03X_1 + 0.28X_1^2 + 0.21X_2 - 0.05X_2^2 - 0.12X_1X_2 + 0.08X_1X_2^2 + 0.17X_1^2X_2 - 0.02X_1^2X_2^2 \quad (5.2)$$

Onde:

$\hat{y}_1$ é a razão entre a glicose liberada na hidrólise enzimática com e sem adição dos agentes tensoativos.

A análise de variância indicou que o modelo foi significativo, uma vez que a maior variação, descrita pela regressão, melhorou o ajuste. Todavia, não houve falta de ajuste (Tabela 5.3). A razão entre a média quadrática devido a regressão e a média quadrática devido ao resíduo foi maior do que o valor tabelado do teste F ($\alpha = 0.05$), confirmando a significância estatística do modelo quadrático.

Tabela 5. 3 Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático.

Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	2.3277	8	0.2910
Resíduo	0.2263	10	0.0226
Falta de ajuste	0.0000	1	0.0000
Erro puro	0.2263	9	0.0252

A superfície de resposta para a razão entre as concentrações de glicose liberadas na hidrólises enzimáticas de acordo com as condições da Tabela 4.2 e a concentrações de glicose liberadas nas hidrólises enzimáticas dos respectivos controles (para cada biomassa) é apresentado na Figura 5.18.

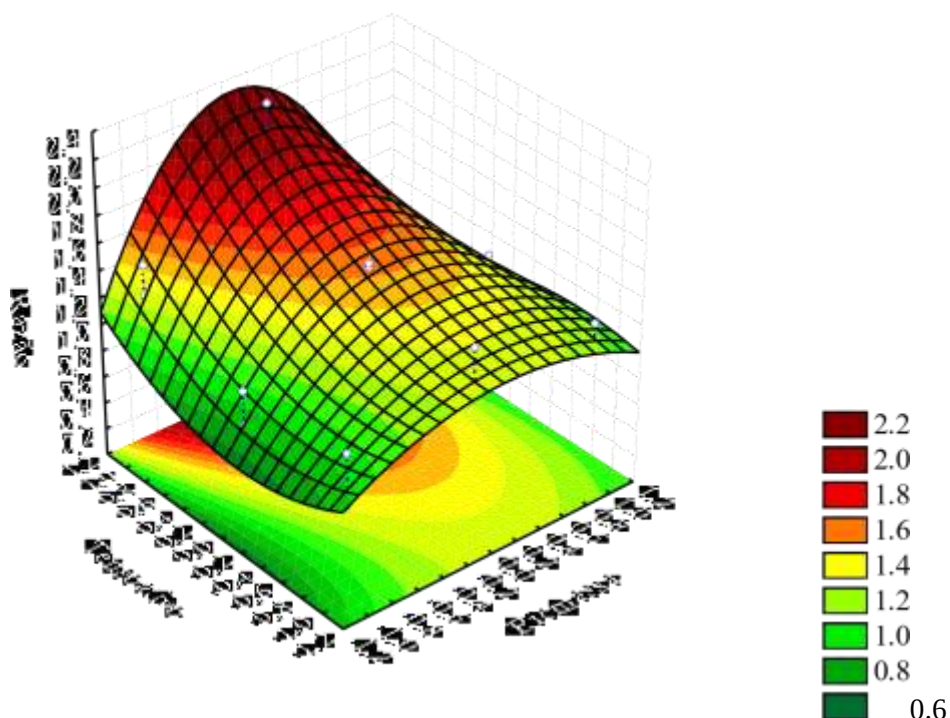


Figura 5. 18 Superfície de resposta para a razão entre a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática com e sem a presença dos tensoativos nos ensaios do planejamento fatorial 3^2 .

Há um aumento na taxa da hidrólise quando a biomassa varia de PED (-1) para JO (0), independente do tensoativo, entretanto, o maior aumento foi observado na presença do biossurfactante (+1). Por outro lado, quando a variação é de JO (0) para CE (+1), há uma diminuição na taxa, sendo muito maior para Tween-80 (-1). Em relação aos tensoativos, há um aumento na taxa quando o fator muda de Tween-80 (-1) para Triton-X (0), independente da biomassa. Esse aumento foi maior quando JO (0) foi usado. A taxa também aumenta quando muda-se de Triton-X (0) para biossurfactante (+1) e o aumento foi novamente maior para JO.

A adsorção do Tween-80, Triton-X ou biossurfactante preveniu ligações improdutivas das enzimas à lignina quando JO e CE foram usados, uma vez que essas biomassas contêm 18 e 32% m/m de lignina, respectivamente. Para o CE os surfactantes químicos foram mais adsorvidos à lignina presente, aumentando a taxa da hidrólise, enquanto que, quando JO foi usado, o maior aumento foi observado para o biossurfactante. Os tensoativos interagem hidrofobicamente com a lignina na superfície da lignocelulose, liberando dessa maneira as enzimas não especificamente ligadas. (ERICKSSON et al., 2002). Esse importante mecanismo também foi responsável pelo efeito estimulatório da adição de ramnolípídeo na hidrólise enzimática de palha de arroz (ZHANG et al., 2009).

Outro importante mecanismo responsável pelo efeito estimulatório é a proteção das celulasas da degradação e inativação quando o material lignocelulósico com baixa concentração de lignina foi usado (WANG et al., 2011). Esse mecanismo provavelmente foi responsável pelo aumento na taxa da hidrólise enzimática do PED, levando em consideração que esse material contém somente 3% m/m de lignina.

Os resultados mostram que é possível tornar o processo de hidrólise enzimática mais viável economicamente, visto que foi possível aumentar a taxa de conversão da celulose sem aumentar a concentração de enzimas, e sim, pela adição de tensoativos especialmente do biossurfactante, que potencializou a hidrólise do JO e do PED mais do que os surfactantes químicos. Além disso, no caso do JO não foi necessário o uso de pré-tratamento para deslignificação, economizando ainda mais no processo.

6 CONCLUSÕES

P. aeruginosa TGC 01 foi mais eficiente que *P. aeruginosa* UFPEDA 569 na produção de biossurfactante, e é capaz de produzir utilizando os quatro meios de cultura avaliados neste trabalho. Dessa maneira, é possível empregar o meio mais barato, com glicerol bruto e menor quantidade de minerais, para ser utilizado em cultivos subsequentes.

Maior razão C/N (24) e maior agitação (150 rpm) favorecem a biossíntese do biotensoativo pela linhagem TGC 01 e, conseqüentemente, o aumento da aeração pela diminuição do volume do meio de cultura, aumentou em 75,5% a produção de ramnolipídeos, além do crescimento e consumo do glicerol bruto. A diferença no volume do inóculo de 5 ou 10% não interfere no crescimento, consumo do substrato e produção do biossurfactante por TGC 01.

O biossurfactante manteve-se estável após ser submetido às condições da hidrólise enzimática, e apresenta potencial para aplicação na hidrólise do JO (113% de aumento na liberação de glicose) contendo 18% de lignina total, e do PED (19% de aumento na liberação de glicose) com a adição de uma pequena concentração (100 mg/L).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HAUSMAN, R.; LE'PINE, F.; M€ULLER, M. M.; DE'ZIEL, E. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation and Bioengineering of Production. **Biosurfactants. Microbiology Monographs**, v.20, 2011.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. A Stereospecific Pathway Diverts β Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. **Chemistry and Biology**, v. 21, p. 156-164, 2014.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1323-1336, 2010.
- 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.
- ABYANEH, A. S.; FAZAELIPOORE, M. H. Evaluation of rhamnolipid (RL) as a biosurfactant for the removal of chromium from aqueous solutions by precipitate flotation. **Journal of Environmental Management**. v. 165, p.184-187, 2016.
- ADNAN, N. A. A.; SUHAIMI, S. N.; ABD-AZIZ, S.; HASSAN, M. A.; PHANG, A. Y. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. **Renewable Energy**. v.66, p.625-633, 2014.
- AMANI, H.; MULLER, M. M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Production of Microbial Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for Ex situ Enhanced Recovery. **Appl. Biochem Biotechnol**, v. 170, p. 1080, 2013.
- AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. E. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1510-1525, 2008.
- ANP, Brasil. <www.anp.gov.br/?dw=8739>. Acesso em 7 de julho de 2016.
- ARA, I.; MULLIGAN, C.N. Conversion of Cr (VI) in water and soil using rhamnolipid. 61. St Canadian Geotechnical Conference, **Edmonton**, p. 20-24, 2008.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim Nova**. v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- ARAUJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; SILVA MARQUITA, R. L.; SANTIAGO, V. M.; SOUZA, M. P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Antiadhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, 171-178, 2016.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.
- BANAT, P.I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. *Biofutur* 198, Mars 2000.

BAÑOS, S.; PÉREZ-REDONDO, R.; KOEKMAN, B.; LIRAS, P. Glycerol utilization gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, p. 2991-2995, 2009.

BARBER, W. P.; STUCKEY, D. C.; **Water Resour**, v.10, p. 2413, 2000.

BARRETO, M. D. C. S. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 17, p. 221-227, 2011.

BEHRENS1, B.; ENGELEN, J.; TISO, T.; BLANK, L. M.; HAYEN. H. Characterization of rhamnolipids by liquid chromatography/mass spectrometry after solid-phase extraction. **Anal Bioanal Chem**, v. 408, p. 2505–2514, 2016.

BERGSTRÖM, S; THEORELL H; DAVIDE, H. On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*. Pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. **Arkiv Chem Mineral Geol**, v. 23, p. 1–12, 1946.

BEZERRA, M. S.; HOLNADA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de Biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, v.1, p. 14, 2012.

BHARALI, P.; KONWAR, B. K.; **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 164, p.1444, 2011.

BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Utilization of Oil Industry Residues for the Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas indica*. **J Surfact Deterg**. v.18, p. 887–893, 2015.

BRACELPA. Dados do setor. **Bracelpa**, 2014. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf> >. Acesso em: 11 de julho de 2016.

BRAMHACHARI, P. V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. Biocatalysis and **Agricultural Biotechnology**. v. 5, p. 38–47, 2016.

BRASIL, MMA. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/destaques/item/9411res%C3%ADduos-de-pl%C3%A1stico,papel,-papel%C3%A3o,-papel-metalizado,-vidro-e-metal>>. Acesso em: 11 de janeiro de 2017.

BRASIL, MME. Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis. Ministério de Minas e Energia, Secretaria de Petróleo. **Gás Natural e Combustíveis Renováveis, Departamento de Combustíveis Renováveis**. v. 48, 2012.

BRUMMER, V.; JURENA, T.; HLAVACEK, V.; OMELKOVA, J.; BEBAR, J.; GABRIEL, P.; STEHLIK, P. Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper – Source of raw material for production of liquid biofuels. **Bioresource Technology**, v.131, p. 357–364, 2013.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I.;M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**. v. 29, p. 1097-1108, 2013.

CAO, S.; AITA, G. M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 131, p. 357-364, 2013.

CASTANHEIRA, E. G.; GRISOLI, R.; FREIRE, F.; PECORA, V.; COELHO, T. S. CHEN, S.; LU, W.; WEI, Y.; CHEN, W.; CHANG, J.; **Biotechnol. Prog.**, v. 23, p. 661, 2007.

CECCATO, H.; D. Produção e aplicação de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* lbi 2a1. Trabalho de conclusão de curso. apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio Claro (SP), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2013.

CHANDRA, R.P.; BURA, R.; MABEE, BERLIM, A.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Substrate pretreatment the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** v.108, p. 67-93, 2007.

CHYZANOWSKI, Ł. ŁAWNICZAK, Ł.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World J. Microbiol. Biotech.** v.28, p.401-419, 2012.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by two stage of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy.** v. 40, p. 7433-7438, 2015.

CHU, K. H.; FENG, X. Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. **Process Safety and Environmental Protection.** v.91, p.123–130, 2013.

CLARKE, K. G.; BALLOT, F.; REID, S. J. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 2179-2184, 2010.

COOPER, D. G.; GOLDEBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology** 53.2, p.224-229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, R, M.; HADDAD, M.N.; CONTIERO, E. J. Process. **Biochem.** v.21, p. 1593, 2005.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações.** Ed. 1. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. p.IX, 2012.

DAMIÃO, A. O. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com rhamnolipídeos. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia. 2012 Salvador.

DAVID G. COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and environmental microbiology.** v. 53, p. 224-229, 1987.

DECESARO, A.; RIGON, M. R. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quim. Nova**, v. 36, p. 947-954, 2013.

DEEPIKA, K. V.; KALAM, S.; SRIDHAR, P. R.; PODILE, A. R.;

DEMAIN, A.L. Biosolutions to the energy problem. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36, p.319–332, 2009.

DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. Disponível em: <https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_autopecas.pdf>. Acesso em 16 de dezembro de 2016.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61 47, 1997.

DILLS, S. S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M. R.; SAIER, M. H. J. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiological Reviews**, 44: 385-418, 1980.

DUBEY, A. K.; GUPTA, P. K.; GARG, N.; NAITHANI, S. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipites*. **Carbohydrate Polymers**. v.88, p.825– 829, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

ERAQI, W. A.; YASSIN, A. S.; ALI, A. E.; AMIN, M. A. Utilization of Crude Glycerol as a Substrate for the Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology Research International**. v. 2016, p. 1-9, 2016.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J., TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 353–364, 2002.

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

FENG, Y.; JIANG, J.; ZHU, L.; YUE, L.; ZHANG, J.; HAN, S. Effects of tea saponin on glucan conversion and bonding behaviour of cellulolytic enzymes during enzymatic hydrolysis of corncob residue with high lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p.161, 2013.

FERRAZ, A. L.; Aplicação da Biotecnologia na Indústria de Papel e Celulose. **Biotecnologia Industrial**. Vol 3. 2001.

FERREIRA, F. G. D. Bioconversão do glicerol A 1, 3-propanodiol para aplicação na obtenção do Poli (Tereftalato de Trimetileno). Tese de doutorado, 2013.

FILHO, A. P. S.; Rhamnolipídeos Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: Estudos de Produção e de Variação da Composição de Homólogos. **Dissertação de Mestrado**. 2009.

FOELKEL, C. Utilização da Biomassa do Eucalipto para Produção de Calor, Vapor e Eletricidade. Eucaluptos online book & newsletter. v. 1. 2016.

FRAGALA, M.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, A.; GUGLIELMINO, S. P. P. Integrated microbial process for bioconversion of crude glycerol from biodiesel into biosurfactants and PHAs. **Chemical Engineering Transactions**.v.38, p.187-192, 2014.

GALKIN, N. B.; ABEDALABAS, M.; PACHOMOVA, E.Y.; FILIPOVA, T. O. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* signal quinolone on the rhamnolipids and rhamnosyltransferase 2 activity. **European Scientific Journal**, v.3, p.223-228, 2014.

GAMBARATO, B. C.; MORAES, S. E. S.; GOMES, N. C.; DANTAS, B. S.; CARMO, A. L. Hidrólise ácida de jornal para a produção de açúcares fermentescíveis e energia. **Cadernos UniFOA**. p. 25-32, 2015.

GIRARDI, V. Emprego do glicerol como fonte de carbono na produção fermentativa de 2,3butanodiol por *Enterobacter aerogenes* atcc 13048. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pósgraduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, CAXIAS DO SUL, 2014

GLICK, R.; GILMOUR, C.; TREMBLAY, J.; SATANOWER, S. AVIDAN, O.; DÉZIEL, E.; GREENBERG, E. P.; POOLE, K.; BANIN, E. Increase in rhamnolipid synthesis under ironlimiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.192, p. 2973-2980, 2010.

GONÇALVES, L. R. B. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.57 n.2, p. 295-301, 2014.

GOUVEIA, E. R., LIMA, D. P. A., DUARTE, M. S., LIMA, G. S., ARAÚJO, J. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes–Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 30, p. 39-45, 2003.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A.; FREITAS, V.; AZEVEDO, Z.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 144–150, 2016.

GUERRA-SANTOS, L. H.; K€APPELI, O.; FIECHTER A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 443–448, 1986.

GUERRA-SANTOS, L.; K€APPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source **Appl Environ Microbiol**, v.48, p. 301–305, 1984.

HASSAN, M.; ESSAM, T.; YASSIN, A. S.; SALAMA, AISHA. Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 82, p. 573–579, 2016.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHÖFER, F.;

BRENNERWEISS, G.; FRANZREB, M.; BERENSMEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal Bioanal Chem.** v. 391, p. 1579–1590, 2008.

HONNA, Cristiane Yuri. Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos. **Dissertação** (Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013.

HOU, J.; ZHANG, S.; QIU, Z.; HAN, H.; ZHANG, Q. Stimulatory effect and adsorption behavior of rhamnolipids on lignocelluloses degradation system. **Bioresource Technology.** v. 224, p. 465–472, 2017.

HU, C.; BAI, X.; WANG, Y.; JIN, WEI., ZHANG, X.; HU, S. Inkjet Printing of Nanoporous Gold Electrode Arrays on Cellulose Membranes for High-Sensitive Paper-Like Electrochemical Oxygen Sensors Using Ionic Liquid Electrolytes. **Anal. Chem.** v. 84, p. 3745–3750, 2012.

IKALOVIĆ, Milena G; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, Gordana; VRVIĆ, Miroslav M; KARADŽIĆ, Ivanka. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* sanai. **J. Serb. Chem. Soc.** v.77, p. 27–42, 2012.

INÈS, M.; DHOuha, G. Glycolipid Biosurfactants; Main Properties and Potential Applications in Agriculture and Food Industry. **Enzyme et Bioconversion**, 2016.

ITO, T.; NAKASJHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J Biosci Bioeng.** v. 100, p. 260-265, 2005.

JAMAL, A.; QURESHI, M. Z.; ALI, N.; ALI, M. I.; HAMEED, A. Enhanced production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* JQ927360 using response surface methodology. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, p. 1044, 2014.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v.2, p. 13-25, 2010.

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

KAUR, G.; SRIVASTAVA, A. K.; CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 106-118, 2012.

KAYA, T.; ASLIM, B.; KARIPTAŞ, E., 2014. Production of biosurfactant by *Pseudomonas* spp. isolated from industrial waste in Turkey. **Turk J Biol.** v.38, p. 307-317, 2014.

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

KUMAR, C. G.; MAMIDYALA, S. K.; SUJITHA, P.; KUMAR, C. G.; MULUKA, H.; AKKENAPALLY, S. Evaluation of Critical Nutritional Parameters and Their Significance in the Production of Rhamnolipid Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R.

Biotechnol. Prog. v. 28, p. 1507-1516, 2012.

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

LIMA, D. A.; LUNA, R. L. N.; MARTÍN, C.; GOUVEIA, E. R. Cellulose chemistry and technology comparison of bioethanol production from acid hydrolyzates of waste office paper using *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum*. **Cellulose Chem. Technol**, v. 49 p. 463-469, 2015.

LIU, J. WU, G; YANG, S; MU, B. Structural characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain FIN2 isolated from oil reservoir water. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 30:1473–1484, 2014.

LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R., NAJAFABADI, A. R.; ADELZADEH, M. R.; NOGHABI, K. A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Coll. Surf. B. Biointer**, v. 69, p. 183, 2009.

MA, Kuang-Yi; SUN, Meng-Yan; DONG, Wen; HE, Chun-Qiu; CHEN, Fu-Lin; MA, YanLing. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 6, p.144–151, 2016.

MANO, M. C. R. Estudo da recuperação, concentração e purificação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UNICAMP. 2008.

MARTIN-SAMPEDRO, R.; REVILLA, E.; VILLAR, R. C.; EUGENIO, M. E. Enhancement of enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*: Steam explosion versus steam treatment. **Bioresource Technology**. v.167, p.186–191, 2014.

MCINTOSH, S.; ZHANG, Z.; PALMER, J.; WONG, H.; DOHERTY, W. O .S.; VANCOV, T. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. **Biofuels, Bioprod. Bioref.** v. 10, p. 346–358, 2016.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA. M. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel**. v. 133, p. 232-240, 2014.

MONTEIRO, S. A. Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

MOTA, H. G.; GOUVEIA, E. R. Improvement in Enzymatic Hydrolysis of Waste Office Paper with Chemical Pretreatment and Enzyme Loading Reduced. **Waste Biomass Valor**, v. 6, 2016.

- MOUSSA, A. A; M. S. MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of Di-Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN T. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 867 – 880, 2014.
- MUKHERJEE, A. K; DAS, K. Microbial Surfactantes and their potencial applications: an overview. **Biosurfactants**. Springer New York, p.54-64, 2010.
- MÜLLER, Markus Michael; HAUSMANN, Rudolf. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91, p. 251–264, 2011.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183–198, 2005.
- MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v.12, p. 199-209, 1989.
- MULLIGAN, C.N.; WANG, S. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. **Eng. Geol.**, v. 85, p. 75-81, 2006.
- MURKHEJEE, A. K.; DAS, K. Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview. **Biosurfactants**. v. 672, p. 54-64, 2010.
- NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A.; YAMADA, Y. Correlation between autoinducers and rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 86, p. 608-610, 1998.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed, 2014.
- NICOLÒ, M.S.; FRANCO, D.; CAMARDA, V.; GULLACE, R.; RIZZO, G. M.; FRAGALÀ, M.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, A. F.; GUGLIELMINO, S, P. P. Integrated Microbial Process for Bioconversion of Crude Glycerol from Biodiesel into Biosurfactants and PHAs. **Chemical engineering transactions**, v. 38, 2014.
- NIKEL, P. I.; KIM, J.; LORENZO, V. Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*. v. 16, p. 239-254. 2014.
- NIKEL, P. I.; KIM, J.; LORENZO, V. Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 239–254, 2014.
- NIKEL, Pablo I.; MARTÍNEZ-GARCÍA, Esteban; DE LORENZO, Víctor. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 368-379, 2014.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends Food Sci. Technol**, v. 18, p. 252, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Proc. Biochem**, v. 46, p. 621-630, 2011.

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

NOVAIS, A. S.; FILHO, J. F. R.; AMARAL, E. M. F.; FARIA, A. M. Novo sorvente de hidrofobicidade reduzida para extração em fase sólida: preparação e caracterização. **Quim. Nova**, V. 38, p. 274-279, 2015.

OCHSNER, U. A.; HEMBACH, T.; FIECHTER, A. Production of rhamnolipid biosurfactants. **Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids**, p.89-118, 1995.

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

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quim. Nova**, v. 33, p.15491558, 2010.

OLIVEIRA, A. C. S. M. Recuperação e Purificação de Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-GVIIA utilizando Melaço de Cana como substrato. **Tese de Doutorado**, 2010.

OLVERA, Clarita, GOLDBERG, Joanna B.; SANCHEZ, Rosalba; SOBERON-CHAVEZ Glória. (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. **FEMS Microbiol Lett**, v.179, p. 85–90, 1999.

ONWOSI, C. O.; ODIBO, F. J. C.; **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 28, p. 937, 2012.

PATEL, R. M; DESAI, A. J; LETT. **Appl. Microbiol.** 25, 1977. 91.

PHAM, T. H.; WEBB, J. S.; REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology-Sgm**, v.150, p. 3405–3413, 2004.

PINTO, M. H. Produção de biosurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rio grande – RS. 2008

PINZON-GAMEZ, N. M.; **Tese de Doutorado**, University of Akron, Estados Unidos, 2009.

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

PRABU, R.; KUILA, A.; RAVISANKAR, R.; RAO, P. V C.; CHOUDARY, N. V.; VELANKAR, H. R. Microbial rhamnolipid production in wheat straw hydrolysate supplemented with basic salts. **RSC Adv.** v. 5, p. 51642–51649, 2015.

PRIETO, L. M. Produção, Caracterização Parcial e Aplicação Ambiental de Rhamnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* Isolada de Resíduos de Pescado. **Dissertação de Mestrado**. 2007.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.27, p.475–493, 2013.

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

RAHIM, R.; BURROWS, L. L.; MONTEIRO, M. A.; PERRY, M. B.; LAM, J. S. Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v.146 (Pt 11), p. 2803–2814, 2000.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using LowCost Raw Materials. **Biotechnol. Prog.** v.18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAT, N.; ABDULLAH, A. Z.; MOHAMED, A. R. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p. 987–1000, 2010.

RASHEDI, H.; JAMSHIDI, E.; MAZAHARI A. M.; BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **Summer**, v. 2, p. 121-127, 2005.

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.

REIS, R. S.; PEREIRA, A.G.; NEVES, B. C.; FREIRE, D. M. G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* a review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6377–6384, 2011.

RIKALOVIĆ¹, M. G.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ², G.; VRVIĆ, M. M.; KARADŽIĆ³, I. J. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. **J. Serb. Chem. Soc**, v. 77, p. 27–42, 2012.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2008.

ROBERT, M 1991.

ROBERTSON, B. D.; FROSCHE, M.; VAN P., J. P. The identification of cryptic rhamnose biosynthesis genes in *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to lipopolysaccharide biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 22, p. 6915-6920, 1994.

ROCHA, J. M. T. S.; ALENCAR, B. R. A.; MOTA, H. G.; GOUVEIA, E. R. Enzymatic hydrolysis of waste office paper for ethanol Production by *Spathaspora passalidarum*. **Cellulose Chem. Technol**, v. 50, p. 243-246, 2016.

ROSA, C. F. C. Avaliação da Composição do Meio de Produção de Rhamnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa*. **Dissertação de Mestrado**, 2008.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, p. 34–38, 2014.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO L. A, RODRIGUES, L. R. M, TEIXEIRA, J. A. C, CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids Surf** v. 84, p. 1–5, 2011.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.17, p. 34–38, 2014.

SANCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M.J.; MARQUES, A.; TERUEL, J.A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **J. Colloid Interface Sci.** v.307, p.246– 253, 2007.

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

SANTANA-FILHO, A. P.; CAMILIOS-NETO, D.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Evaluation of the Structural Composition and Surface Properties of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in Different Cultivation Periods. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 175, p. 988–995, 2015.

SANTOS, A. S.; JR, N. P.; FREIRE, D. M. G. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **PeerJ**. v.4, p. 2078, 2016.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.;FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potential of sugarcane straw for ethanol production. **Quím. Nova**. v.35, p. 1004-1010, 2012.

SARIN, S., SARIN, C. Production, isolation and application biosurfactant/bioemulsifier by oil contaminated soil isolated *Enterobacter cloacae* LK5. **Naresuan University Journal**. v. 16, p. 113 – 125, 2008.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D. Application of a Biosurfactant Produced in Low-cost Substrates in the Removal of Hydrophobic Contaminants. **Chemical engineering transactions**, v. 43, 2015.

SCHMITT, E.; BURA, R.; GUSTAFSON, R.; COOPER, J.; VAJZOVIC, A. Converting lignocellulosic solid waste into ethanol for the State of Washington: An investigation of treatment technologies and environmental impacts. **Bioresource Technology**. v.104, p.400–409, 2012.

SCHWEIZER, H. P.; PO, C. Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the glpR repressor gene. **Journal of bacteriology**, v. 178, p. 5215-5221, 1996.

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

SILVA, R.C.F.S.; ALMEIDA, D.G.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **Int J Mol Sci**. v.15, p. 12523-12542, , 2014.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Utilização de glicerol como substrato para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. **Dissertação de mestrado**, 2011.

SILVA, T. A. L.; LUNA, J. M.; FILHO, M. A. M.; TAMBOURGI, E. B.; CAMPOS TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, p. 19-26, 2010.

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

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718725, 2005.

SOUSA, J. R. Produção de biossurfactantes a partir da glicerina obtida da produção de biodiesel. **Dissertação de mestrado**, 2008.

SOUSA, J. R.; CORREIA, A.; ALMEIDA, J. G. L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O. D. L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**. v.46, p.1831–1839, 2011.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Quim. Nova**. v.37, p.431-441, 2014.

SOUZA, L, A. “Lignina na composição do papel”; Brasil Escola. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/quimica/lignina-na-composicao-papel.htm>>. Acesso em 11 de julho de 2016.

SOUZA, M. O. A.; SILVA, J. C.; EVAGELISTA, W. V. Aplicação de acabamentos superficiais em madeira de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake visando ao uso na indústria moveleira. **Scientia Forestalis**. v. 39, p. 403-409, 2011.

SUBHEDAR, P. B.; BABU, N. R.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 22, p. 326–332, 2015.

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

TU, M; SADDLER, J. N. Potential Enzyme Cost Reduction with the Addition of Surfactant during the Hydrolysis of Pretreated Softwood. **Appl Biochem Biotechnol**. v.161:274–287, 2010.

WANG, H. Y.; FAN, B. Q.; LI, C. H.; LIU, S.; LI, M. Effects of rhamnolipid on the cellulase and xylanase in hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**. v.102, p. 6515– 6521, 2011.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S., Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical waste water. **Biochem. Eng. J**, v. 27, p. 146, 2005.

YU, Q.; ZHUANG, X.; WANG, Q.; QI, W.; TAN, X.; YUAN, Z. Hydrolysis of sweet sorghum bagasse and eucalyptus wood chips with liquid hot water. **Bioresource Technology**. v.116, p. 220–225, 2012.

ZHANG, Q.; HE, G.; WANG, J.; CAI, W.; XU, Y. Mechanisms of the stimulatory effects of rhamnolipid biosurfactant on rice straw hydrolysis. **Applied Energy**. v.86, p.233–237, 2009.

ZHANG, Y.; LI, Q.; SU, J.; LIN, Y.; HUANG, Z.; LU, Y.; SUN, G.; YANG, M.; HUANG, A.; HU, H.; ZHU, Y. A green and efficient technology for the degradation of cellulosic materials: Structure changes and enhanced enzymatic hydrolysis of natural cellulose pretreated by synergistic interaction of mechanical activation and metal salt. **Bioresource Technology**. v. 177, p. 176-181, 2015.

ZHAO, J.; WU, Y.; ALFRED, A. T.; XIN, X.; YANG, S. Chemical structures and biological activities of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* M14808. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 177-182, 2013.

ZHAO, J.; WU, Y.; ALFRED, A. T.; XIN, X.; YANG, S. Chemical structures and biological activities of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* M14808. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.5, p.177-182, 2013.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; QI, F.; ZHAO, X.; LIU, D. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**. v.182, p.136–143, 2015.

ZHU, K.; ROCK, C.; R. RhIA Converts β -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Intermediates in Fatty Acid Synthesis to the β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoate Component of

Rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** v. 190, p. 3147-3154, 2008.

ZHU, L.; YANG, X.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L.; LU, W.; **Bioresour. Technol.**, v.117, p. 208, 2012.

ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solidstate fermentation. **Journal Environmental Manage**, v. 127, p. 96-102, 2013.