

**EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PROTEOMA DE
Pseudomonas aeruginosa PA1 DURANTE A PRODUÇÃO DE
RAMNOLIPÍDEOS EM BIORREATOR ACOPLADO A
CONTACTORES DE MEMBRANA**

Graziela Jardim Pacheco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire
Jonas Enrique Perales Aguilar

**Rio de Janeiro
2013**

P116

Pacheco, Graziela Jardim.

Efeito do estresse oxidativo no proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 durante a produção de ramnolipídeos em biorreator acoplado a contactores de membrana / Graziela Jardim Pacheco. – Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2013.

125f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2013.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire e Jonas Enrique Perales Aguilar.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Ramnolipídeos. 3. Estresse oxidativo. 4. Proteômica. I. Freire, Denise Maria Guimarães. (Orient.). II. Aguilar, Jonas Enrique Perales. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

CDD: 572

**EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PROTEOMA DE *Pseudomonas aeruginosa*
PA1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM BIORREATOR
ACOPLADO A CONTACTORES DE MEMBRANA**

Graziela Jardim Pacheco

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Jonas Enrique Perales Aguilar

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Presidente, Prof^a Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc

Jonas Enrique Perales Aguilar, D.Sc

José Gregório Cabrera Gomez, D.Sc

Nadia Skorupa Parachin, D.Sc

Ana Gisele da Costa Neves Ferreira, D.Sc

Marcos Dias Pereira, D.Sc

Rio de Janeiro
2013

**Dedico este trabalho aos meus pais,
José Benacy e Valeria**

AGRADECIMENTOS

Dedico meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial, agradeço aos meus orientadores, Denise Freire e Jonas Perales, não apenas pelo suporte científico, mas também pela amizade e confiança em mim depositadas. Os ensinamentos obtidos de cada um de vocês se complementam e têm contribuído enormemente, não apenas em minha trajetória científica e acadêmica, mas também profissional.

A todos os colegas do LaBiM, sem qualquer exceção. Em poucos locais é possível encontrar um ambiente de trabalho tão agradável e de convivência tão harmoniosa. Sinto-me muito feliz por ter feito parte desta história. Em especial agradeço ao Fred, pela disponibilidade e presença constante, sobretudo nos primeiros experimentos realizados em fermentador e na análise dos resultados. Ao Antônio, pelo auxílio nas últimas análises referentes à fermentação, num momento em que eu não poderia mais estar no Fundão para realizá-las. Muito obrigada!

Ao Rodrigo que, mesmo distante fisicamente, sempre esteve muito presente e com contribuições de grande valia, para a realização e análise dos primeiros experimentos de proteômica. Pela parceria de grande sucesso durante a redação dos trabalhos científicos gerados neste período.

A todos os colegas do Laboratório de Toxinologia, os quais me proporcionaram muitos aprendizados. Especialmente agradeço à Surzinha, não apenas pela presença constante durante os experimentos, mas também pela amizade, companheirismo e carinho em todos os momentos. À Monique, pela amizade e também pelas contribuições de grande importância nas análises de imagens.

Agradeço também ao Richard e a Ana Gisele, pela disponibilidade para tirar dúvidas e dar sugestões, sempre com muito rigor e coerência, as quais são características marcantes também nos demais membros da equipe. Certamente, estes são conceitos que fortaleci neste grupo e levarei para minha vida profissional. Ao Henk e ao Pink, pelos experimentos de espectrometria de massas e auxílio na análise dos resultados.

Aos meus pais, José Benacy e Valeria, por todo o amor, carinho e incentivo dado ao longo de toda a minha vida. Sem o apoio de vocês, eu jamais teria chegado até aqui.

Ao meu irmão, Gustavo, por todo o carinho e companheirismo. Por tantas vezes me acompanhar durante as longas noites de análise de resultados e redação deste trabalho.

Ao meu esposo Fábio, pela presença constante em minha vida. Por todo o seu amor, companheirismo e por tantas vezes me acompanhar nos feriados e finais de semana até o Fundão, mesmo após semanas cansativas de trabalho.

Aos colegas de trabalho em Farmanguinhos/ Fiocruz. Em especial à Bárbara e ao Otavio, por compreenderem a importância da conclusão deste trabalho e a necessidade de minha ausência em vários momentos, principalmente nesta etapa final. Ao Wagner e Gisele, pelo apoio e incentivo dado, principalmente ao longo da redação desta tese.

A Deus, por me dar forças para superar as dificuldades e por ter colocado cada um de vocês no meu caminho.

À CAPES, CNPq e Petrobras, pelo suporte financeiro.

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao IQ/ UFRJ como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Efeito do estresse oxidativo no Proteoma de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 durante a produção de ramnolipídeos em biorreator acoplado a contactores de membrana

Graziela Jardim Pacheco

Novembro/ 2013

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Jonas Enrique Perales Aguilar

Em condições ambientais específicas, *Pseudomonas aeruginosa* produz biossurfactantes do tipo ramnolipídeo. Evidências sugerem que este biossurfactante está envolvido na proteção das células contra o estresse oxidativo. No entanto, os efeitos deste estresse sobre a produção de ramnolipídeos e outros fatores de virulência permanecem desconhecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de proteínas por *P. aeruginosa* PA1 durante a produção de ramnolipídeos em condições de estresse oxidativo em frascos agitados, mediante adição de peróxido de hidrogênio, e em biorreator operando com oxigenação constante e não dispersiva, iguais a 1, 4 e 6 mg O₂/L. Amostras celulares foram coletadas nas fases exponencial e estacionária de crescimento e as proteínas intracelulares analisadas e comparadas utilizando técnicas proteômicas. A focalização isoeletrica foi conduzida em fitas de anfolinas na faixa de pH de 4 a 7, seguida de separação por SDS-PAGE 12%. Após a análise por espectrometria de massas, foram identificadas proteínas diferencialmente expressas relacionadas com sistemas de secreção, mecanismos de adaptação e proteção ao estresse oxidativo, potencialmente relacionadas com a secreção de ramnolipídeos. A expressão diferencial destas proteínas foi mais intensa na condição igual a 4 mg O₂/L, a qual mostrou ser mais favorável à produção de ramnolipídeos. As atividades elastásica e proteásica demonstraram tendência de declínio ao longo do cultivo em todas as condições testadas, o que favorece o uso do meio contendo ramnolipídeos para aplicações ambientais. Os resultados apresentados sugerem que a concentração de oxigênio no meio de cultura pode ser um fator crucial para o estabelecimento de um bioprocessamento eficiente e viável economicamente, além de colaborar para o entendimento do metabolismo de síntese de ramnolipídeos, direcionando a escolha de alvos futuros de modificação genética, com vistas ao aumento da produção de ramnolipídeos por esta cepa.

Abstract of Thesis presented to IQ/ UFRJ as a partial fulfillment of requirements for the degree of Doctor in Biochemistry.

Effect of oxidative stress on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production in bioreactor oxygenated by a membrane contactor

Graziela Jardim Pacheco

November/ 2013

Research Supervisor: Denise Maria Guimarães Freire

Jonas Enrique Perales Aguilar

Under specific environmental conditions, *Pseudomonas aeruginosa* produces a biodegradable surfactant rhamnolipid. Evidences suggest that this biosurfactant is involved in protecting cells against oxidative stress; however, the effects of oxidative stress on this production and other virulence factors are still unclear. The aim of this work was evaluate the protein expression by *P. aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production in oxidative stress conditions. Firstly experiments were conducted in shake flasks and *P. aeruginosa* was treated with hydrogen peroxide. Afterwards the rhamnolipid production was taken in bioreactor operating with constant and non-dispersive oxygenation, equal to 1, 4 and 6 mg O₂/L. Cellular samples were taken at exponential and stationary growth phase and intracellular proteins extracted from the cellular pellet were analyzed and compared using proteomics techniques. The isoelectric focusing was conducted on strips in the pH range of 4 and 7, followed by separation by SDS-PAGE 12%. After preliminary analysis in mass spectrometer, there were identified differentially expressed proteins related to secretion systems, adaptation mechanisms and protection against oxidative stress, potentially related to the rhamnolipid secretion. The differential protein expression was more intense in experiments conducted with 4 mg O₂/L, wich demonstrated to be more appropriate to the bioprocess. Moreover, the reduced elastase and protease activities along the time in all conditions tested could facilitate the use of medium containing rhamnolipids in environmental applications. The results presented suggest that oxygen concentration in the culture medium may be a crucial factor in establishing an efficient and economically viable bioprocess. In addition, it can collaborate to the better understanding of rhamnolipid metabolism regulation and to the choice of future targets for genetic modification in order do increase the rhamnolipid production by this strain.

ABREVIATURAS

2DE – Eletroforese bidimensional

μ_x – Taxa específica de crescimento

Ahp – Alquil hidroperóxido redutase

BSA – Soroalbumina bovina

CHAPS – Propanosulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]

CMC – Concentração micelar crítica

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPS – Substratos poliméricos extracelulares

EROs – Espécies reativas de oxigênio

IPG – Gradiente de pH imobilizado

MALDI-TOF – *Matrix assisted laser desorption ionization – Time of Flight*

MDA – Malondialdeído

MEOR – *Microbial enhanced oil recovery*

OPRC – Convenção Internacional para preparo, resposta e cooperação em caso de poluição por óleo

OUR – *Oxygen Uptake Rate*

PBS – Tampão fosfato salino

pI – Ponto isoelétrico

PQS – *Pseudomonas quinolone signal*

QS – *Quorum sensing*

RML – Ramnolipídeos

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

SOUR – *Specific Oxygen Uptake Rate*

TCA – Ácido tricloroacético

TFA – Ácido trifluoroacético

Yp/s – Fator de rendimento de produto por substrato

Yp/x – Fator de rendimento de produto por biomassa

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.1 –	Relação de acidentes envolvendo derramamento de óleo e derivados nos últimos anos	15
Tabela 2.1 –	Aplicações industriais de surfactantes	20
Tabela 2.2 –	Exemplos de biossurfactantes, microrganismos produtores e suas respectivas CMC e tensão superficial	22
Tabela 2.3 –	Exemplos de produtos comercializados contendo biossurfactantes	26
Tabela 5.1 –	Identificação de proteínas com expressão alterada em <i>P. aeruginosa</i> tratada com peróxido	63
Tabela 5.2 –	Identificação de proteínas com expressão alterada em <i>P. aeruginosa</i> tratada com peróxido	65
Tabela 5.3 –	Efeito da variação na concentração de oxigênio dissolvido sobre a concentração de ramnolipídeos, produtividade, consumo de glicerol e rendimento de produto por substrato	75
Tabela 5.4 –	Identificação de proteínas com expressão alterada em <i>P. aeruginosa</i> cultivada em biorreator com concentração de oxigênio igual a 1, 4 ou 6 mg O ₂ /L (fase exponencial de crescimento – 20 h)	82
Tabela 5.5 –	Identificação de proteínas com expressão alterada em <i>P. aeruginosa</i> cultivada em biorreator com concentração de oxigênio igual a 1, 4 ou 6 mg O ₂ /L (fase estacionária de crescimento – 72 h)	91
Tabela 5.6 –	Identificação de proteínas com expressão alterada em <i>P. aeruginosa</i> cultivada em biorreator com concentração de oxigênio igual a 1, 4 ou 6 mg O ₂ /L (fase estacionária de crescimento – 120 h)	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 –	Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante	19
Figura 2.2 –	Estrutura química de ramnolipídeos	29
Figura 2.3 –	Via metabólica de biossíntese de ramnolipídeos	30
Figura 2.4 –	Esquema geral de fatores direta ou indiretamente envolvidos com a regulação gênica da produção de ramnolipídeos	32
Figura 2.5 –	Mecanismo geral de proteção bacteriana contra o estresse oxidativo	38
Figura 2.6 –	Esquema geral do ciclo de pesquisa em sistemas biotecnológicos	42
Figura 4.1 –	Fermentador inserido na capela de exaustão acoplado ao sistema de oxigenação utilizando o contactor de membranas	47
Figura 4.2 –	Fluxograma simplificado do sistema de oxigenação	48
Figura 5.1 –	Cinética da produção de ramnolipídeos em frascos agitados	57
Figura 5.2 –	Efeito do estresse oxidativo sobre os níveis de peroxidação lipídica em frascos agitados tratados e não-tratados com peróxido de hidrogênio	58
Figura 5.3 –	Perfil 2D-PAGE de extratos protéicos de <i>P. aeruginosa</i> PA1 tratada com peróxido de hidrogênio na fase estacionária de crescimento	60
Figura 5.4 –	Imagens representativas dos spots diferenciais, nas fases exponencial (A) e estacionária (B) de crescimento	61
Figura 5.5 –	Oxigênio dissolvido no meio ao longo das fermentações	69
Figura 5.6 –	Taxa de consumo de oxigênio bruta (OUR) ao longo de fermentações conduzidas com 1, 4 e 6 mg O ₂ /L	70
Figura 5.7 –	Taxa de consumo de oxigênio específica (SOUR) ao longo de fermentações para a produção de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i> conduzidas com 1, 4 e 6 mg O ₂ /L	71
Figura 5.8 –	Crescimento microbiano em função do tempo	72
Figura 5.9 –	Consumo da fonte de nitrogênio em função do tempo	72

Figura 5.10 – Consumo de glicerol função do tempo	74
Figura 5.11 – Produção de ramnolipídeos em função do tempo	74
Figura 5.12 – Perfil de peroxidação lipídica em fermentações conduzidas com 1, 4 e 6 mg O ₂ /L, nas fases exponencial (20 h) e estacionária (72 h e 120 h) de crescimento	76
Figura 5.13 – Perfil da atividade de elastases (A) e proteases alcalinas (B) por <i>P. aeruginosa</i> cultivada em diferentes condições de oxigenação em biorreator	77
Figura 5.14 – Perfis eletroforéticos representativos de amostras intracelulares extraídas na fase exponencial de crescimento, em diferentes condições de oxigenação em biorreator	80
Figura 5.15 – Diagrama de Venn representando a ocorrência de spots diferencialmente expressos comuns ou únicos às condições experimentais analisadas, na fase exponencial de crescimento (20 h)	85
Figura 5.16 – Perfis eletroforéticos representativos de amostras intracelulares extraídas no início da fase estacionária de crescimento (72 h), em diferentes condições de oxigenação em biorreator	89
Figura 5.17 – Perfis eletroforéticos representativos de amostras intracelulares extraídas num momento tardio da fase estacionária de crescimento (120 h), em diferentes condições de oxigenação em biorreator	97
Figura 5.18 – Diagrama de Venn representando a ocorrência de spots diferencialmente expressos comuns ou únicos às condições experimentais analisadas, na fase estacionária de crescimento (72 e 120 h)	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. SURFACTANTES	19
2.2. BIOSSURFACTANTES	21
2.2.1. Potenciais aplicações de biossurfactantes em diferentes setores industriais	23
2.2.2. Aspectos econômicos da produção de biossurfactantes	25
2.3. PSEUDOMONAS AERUGINOSA	27
2.3.1. Biossíntese de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i>	28
2.3.2. Regulação gênica da produção de ramnolipídeos	31
2.3.3. Fatores regulatórios relacionados a condições de estresse	34
2.3.4. Influência da oxigenação sobre a produção de ramnolipídeos	35
2.4. ESTRESSE OXIDATIVO	37
2.4.1. Mecanismos de resposta ao estresse oxidativo por <i>P. aeruginosa</i>	38
2.5. PROTEÔMICA	40
2.5.1. Aplicações biotecnológicas de técnicas proteômicas	40
2.5.2. Proteômica em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
3. OBJETIVOS	45
3.1. OBJETIVOS GERAIS	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	46
4.1.1. Manutenção do microrganismo, preparo do pré-inóculo e do inóculo	46
4.1.2. Fermentações conduzidas em frascos agitados	46
4.1.3. Fermentações conduzidas em biorreator	47
4.1.4. Esterilização	47
4.1.5. Controle da concentração de oxigênio em biorreator	48
4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	49
4.2.1. Determinação da concentração de células	49
4.2.2. Quantificação de glicerol	49
4.2.3. Quantificação de ramnolipídeos	49

4.2.4. Quantificação de nitrato	50
4.2.5. Determinação da atividade elastásica	50
4.2.6. Determinação da atividade de proteases alcalinas	51
4.2.7. Peroxidação lipídica	51
4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	52
4.3.1. Extração de proteínas intracelulares	52
4.3.2. Dosagem de proteínas	53
4.3.3. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA)	53
4.3.4. Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE)	53
4.3.5. Coloração por Coomassie Coloidal e Análise de Imagem dos Géis	54
4.3.6. Tripsinização em Gel de Poliacrilamida	55
4.3.7. Análise por Espectrometria de Massas	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM FRASCOS AGITADOS	57
5.1.1. Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio	58
5.1.2. Expressão de proteínas em resposta ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio	59
5.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM BIORREATOR ACOPLADO A CONTACTORES DE MEMBRANA	69
5.2.1. Peroxidação lipídica em decorrência de estresse oxidativo	75
5.2.2. Produção de elastase e proteases alcalinas em biorreator	76
5.2.3. Expressão de proteínas em resposta a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator	79
6. CONCLUSÕES	110
PUBLICAÇÕES	112
REFERÊNCIAS	113

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se observado a rápida expansão das indústrias químicas, com destaque à indústria do petróleo e suas atividades de prospecção, refino e distribuição. Esta intensa atividade industrial tem tornado comuns derramamentos acidentais de óleo (Quadro 1.1), os quais necessitam de tratamento imediato por meio de tecnologias ambientais eficientes. Ao mesmo tempo, autoridades reguladoras têm dado maior atenção aos problemas de caráter ambiental, seja por pressão da opinião pública mundial ou por segmentos da sociedade civil organizada.

Quadro 1.1 – Relação de acidentes envolvendo derramamento de óleo e derivados nos últimos anos

Ano	Fonte/ causa	Local	Volume Vazado estimado
2012	Exploração e Produção de Petróleo Campo Carioca Nordeste (Teste de longa duração - Pré-sal)	Brasil Bacia de Santos	26 m ³ de petróleo
2011	Exploração e Produção de Petróleo Plataforma da Chevron	Brasil Bacia de Campos – RJ Campo de Frade	365 m ³ de petróleo
2010	Plataforma Deepwater Horizon	EUA Golfo do México	779000 m ³ de óleo
2008	Transporte marítimo Embarcação empurradora NORSUL	Brasil Baía de S. Francisco (SC)	116 m ³ de diesel/lubrificante
2007	Navio cargueiro Napoli	Inglaterra	200000 m ³ de óleo
2007	Petroleiro Hebei Spirit	Coréia	11000 m ³ de óleo
2004	Rompimento de oleoduto Linha S. Sebastião-Cubatão	Brasil Guaecá – S. Sebastião (SP)	300 m ³ de petróleo
2003	Petroleiro Tasman Spirit	Paquistão	27000 m ³ de óleo
2002	Petroleiro Prestige	Espanha	64000 m ³ de óleo
2001	Exploração e Produção de Petróleo Plataforma P7	Brasil Bacia de Campos (RJ)	124000 m ³ de Petróleo

2001	Exploração e Produção de Petróleo Plataforma P36	Brasil Bacia de Campos (RJ)	1.200 m ³ diesel e 350 m ³ petróleo
2001	Rompimento de oleoduto	Brasil Córrego Caninana (MT)	4000 m ³ de óleo Diesel
2000	Refinaria do Paraná	Brasil Rios Barigui e Iguazu (PR)	4000 m ³ de óleo
2000	Rompimento de oleoduto Refinaria Duque de Caxias - Ilha d'Água	Brasil Baía da Guanabara (RJ)	1300 m ³ de Óleo MF 180
1999	Petroleiro Erika	França	20.000 m ³ de óleo
1997	Rompimento de Oleoduto Linha REDUC/ Ilha d'Água	Brasil Baía da Guanabara (RJ)	2800 m ³ de bunker MF 180

Desde a ocorrência do derramamento de óleo do navio Exxon Valdez, em 1989, agências federais e indústrias têm implementado iniciativas visando aumentar as ações preventivas e reativas quanto a eventuais acidentes. Em 1990, em resposta ao acidente ocorrido com o referido navio petroleiro, foi assinada em Londres a Convenção Internacional para preparo, resposta e cooperação em caso de poluição por óleo (OPRC 90) estabelecendo, internacionalmente, que as partes envolvidas se comprometem a tomar medidas adequadas para a resposta em caso de incidente por poluição por óleo. No Brasil, a OPRC 90 foi ratificada pela publicação do Decreto presidencial nº 2.870/ 98, assumindo o compromisso de estabelecer um sistema nacional capaz de responder pronta e efetivamente aos incidentes de poluição por óleo (BRASIL, 1998).

Embora esforços devam continuar direcionados no sentido de pressionar as indústrias para a redução deste tipo de incidente, o avanço da tecnologia tem apresentado diversas oportunidades de tratamento e recuperação em áreas impactadas com petróleo e derivados. Dentre as alternativas existentes está a utilização de compostos com atividade tensoativa, ou surfactantes, os quais são capazes de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, aumentando a degradação destes compostos. Além de apresentar aplicação nos setores de reparo ambiental, os surfactantes podem ser usados na recuperação melhorada do petróleo, solubilização de borras em tanques de armazenamento e em produtos das indústrias de química fina e farmacêutica (SINGH, A.; VAN HAMME; WARD, 2007).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada quimicamente, a partir de derivados do petróleo. Entretanto, sabe-se que muitos destes

compostos apresentam alta toxicidade e baixa biodegradabilidade, necessitando de tratamento adicional após sua aplicação (DESAI; BANAT, 1997). Dentro deste contexto, a produção de surfactantes de origem biológica surge com base na demanda de pesquisas que visem gerar produtos que atendam à manutenção das atividades relacionadas à indústria do petróleo e sua relação de responsabilidade com problemas de caráter ambiental. Além de apresentar alta biodegradabilidade, biossurfactantes podem ser produzidos *in situ*, a partir de substratos renováveis, o que torna promissora a sua utilização. Apesar disso, seu custo elevado de produção ainda é um fator que dificulta sua competição no mercado mundial, estando o desafio centrado em aumentar o rendimento produtivo (MUKHERJEE, S.; DAS; SEN, 2006).

Diversos são os microrganismos capazes de sintetizar biossurfactantes. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de produzir ramnolípídeo, um biossurfactante do grupo dos glicolípídeos que vem ganhando destaque nas pesquisas e aplicações industriais devido à sua elevada atividade surfactante e grande potencial na utilização em biorremediação. Este microrganismo, além de apresentar alta produtividade de ramnolípídeos, também permite o uso de substratos relativamente baratos, como carboidratos, óleos vegetais e rejeitos de indústrias alimentícias (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; ZHANG; MILLER, 1995).

Apesar das vantagens descritas, esta bactéria é um severo patógeno oportunista, produzindo uma série de fatores de virulência (LAMONT et al., 2002; RAHME et al., 1997) que podem limitar o uso do meio de cultivo não purificado contendo o ramnolípídeo em aplicações ambientais. Neste sentido, esforços devem ser direcionados ao aumento da produtividade e diminuição de custos do ramnolípídeo produzido por *P. aeruginosa*, além da redução na liberação de fatores de virulência no meio de cultivo.

Nos últimos doze anos o Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) vem desenvolvendo, em cooperação com a Petrobras, diversos projetos com o objetivo de aumentar a produção de ramnolípídeos utilizando a cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA1, isolada de poços de petróleo. Foram desenvolvidas estratégias metabólicas para aumento da produção de ramnolípídeo em detrimento da produção de outros fatores de virulência (SANTOS et al., 2002), estratégias de modo de condução do bioprocessamento (SANTA ANNA et al., 2002; SANTA ANNA et al., 2001) e desenho de novos reatores capazes de suplantarem o crítico problema operacional de formação de espuma (KRONEMBERGER et al., 2008).

Estudos realizados por Kronemberger et al. (2008) demonstraram que a produção de ramnolípídeos e o crescimento celular da cepa PA1 são, em certo grau, dependentes da oxigenação do meio. Além disso, outros autores sugerem que os ramnolípídeos participam ativamente da proteção contra o estresse oxidativo, atuando como dispersores das moléculas de

oxigênio e impedindo sua entrada em solução através da camada de espuma formada na superfície (KIM; SABRA; ZENG, 2003; SABRA; KIM; ZENG, 2002).

Recentemente, Reis e colaboradores (2010) apontaram, por meio de técnicas proteômicas, proteínas diferencialmente expressas quando *P. aeruginosa* encontrava-se na condição produtora de ramnolipídeo. Algumas destas proteínas foram identificadas como relacionadas com o estresse oxidativo, incluindo a enzima superóxido dismutase e uma desidrogenase de cadeia curta. Do mesmo modo, Sabra e colaboradores (2002) verificaram elevada secreção de proteínas por esta bactéria em condições de estresse oxidativo, incluindo fatores de virulência.

Dentro desta perspectiva, torna-se necessária a adoção de estratégias mais refinadas e de caráter molecular para alcançar um melhor entendimento da fisiologia e metabolismo microbiano e, conseqüentemente, aumentar a produtividade e diminuir os custos do processo produtivo. A estratégia adotada neste estudo foi, inicialmente, estudar as vias de resposta ao estresse oxidativo apresentadas por *P. aeruginosa* PA1 submetida a condições de estresse oxidativo, em frascos agitados, mediante a adição de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi investigado em que medida a concentração de oxigênio dissolvido no meio é capaz de influenciar positivamente a produção de ramnolipídeos, utilizando biorreatores acoplados a contactores de membranas. Verificou-se a influência destas diferentes condições de oxigenação sobre a expressão protéica de *P. aeruginosa*, a fim de identificar as relações entre as vias de resposta ao estresse oxidativo e as vias metabólicas e de regulação gênica relacionadas à produção desta molécula.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que tendem a se acumular na interface entre fases de diferentes graus de polaridade, tais como óleo/ água ou ar/ água. Nestas condições, surfactantes tendem a formar agregados supramoleculares microscopicamente ordenados, tais como micelas, bicamadas, vesículas, macro e micro emulsões (FIECHTER, 1992).

A eficácia de um surfactante costuma ser determinada por sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial dos sistemas. A tensão superficial, por definição, é a energia livre da superfície, por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície. Sendo assim, devido à presença de surfactantes, uma menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida (MULLIGAN, 2005).

As tensões superficial e interfacial estão correlacionadas com a concentração de surfactante até o momento em que a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada (Figura 2.1). A CMC é definida como a concentração mínima de surfactante necessária para atingir valores mais baixos de tensão superficial e interfacial. Com a adição de surfactantes acima da CMC ocorre a associação das moléculas, resultando na formação de micelas, sem afetar a tensão superficial. Desta maneira, mesmo adicionando surfactante acima da CMC, as tensões superficiais e interfaciais se mantêm constantes (DATYNER, 1983).

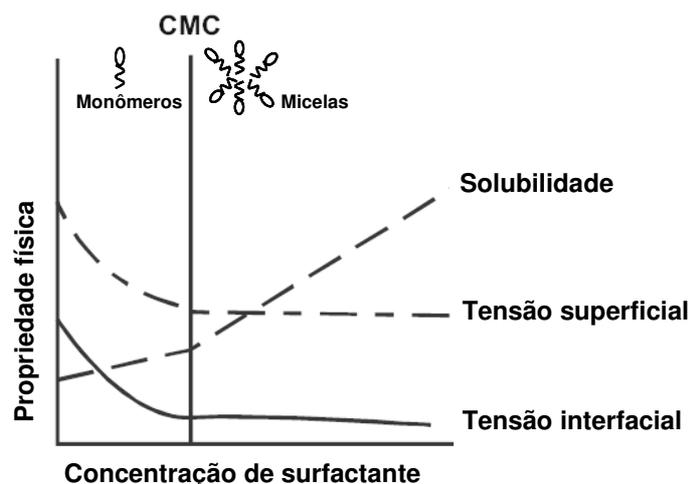


Figura 2.1 – Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante (adaptado de Mulligan (2005)).

Além de sua capacidade em reduzir a tensão superficial e interfacial dos sistemas, surfactantes apresentam ação antiespumante, aumentam a adsorção de moléculas, a detergência, a solubilidade, bem como a dispersão ou agregação de sólidos. Devido a estas propriedades, os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em áreas científicas, biotecnológicas, bem como diversos setores industriais, dentre eles a recuperação de petróleo, o tratamento de resíduos oleosos, a indústria cosmética, de alimentos e a mineração (FIECHTER, 1992). A Tabela 2.1 apresenta a diversidade de setores industriais onde se aplicam surfactantes.

Tabela 2.1 – Aplicações industriais de surfactantes (Adaptado de Singh et al. (2007))

Indústria	Aplicação	Função do surfactante
Petróleo	Limpeza de reservatórios de óleo; aumento da recuperação de petróleo	Reduzir a viscosidade e formar emulsões, facilitando a remoção de óleos pesados depositados em fundos de reservatórios; reduzir as forças capilares estimulando a liberação de óleo através dos poros da rocha.
Ambiental	Biorremediação; remediação de águas e solos	Emulsificação e remoção de hidrocarbonetos; remoção de metais; agente espumante; detergente; dispersante.
Alimentícia	Emulsificação; ingrediente funcional	Emulsionar, favorecendo a consistência e a textura; interação com lipídios, proteínas e carboidratos; agente protetor.
Agrícola	Biocontrole	Emulsionar pesticidas e herbicidas, facilitando a dispersão do composto ativo.
Cosmética	Produtos de higiene e beleza	Emulsificantes; umectantes; espumantes, solubilizantes; mediadores da ação enzimática.
Farmacêutica	Produtos terapêuticos	Inibir formação de coágulos; atividade antibacteriana e antifúngica; vacinas; imunomodulatórios.

Em 2007, a produção mundial de surfactantes foi estimada em torno de 10 milhões de toneladas por ano, sendo sua taxa de crescimento anual intimamente relacionada à demanda de detergente, já que este absorve cerca de 50% da produção deste setor (VAN BOGAERT et al., 2007).

Os surfactantes podem ser divididos em categorias que se baseiam no caráter iônico da sua porção hidrofílica (aniônico, catiônico, não-iônico e zwitteriônico). Surfactantes aniônicos e não-iônicos correspondem à maior parte da produção destas moléculas, incluindo tanto aqueles produzidos à base petroquímica, quanto à base oleoquímica. Os catiônicos e zwitteriônicos são menos produzidos por estarem limitados a um menor mercado consumidor (JAKOBI et al., 1994).

Grande ênfase tem sido dada para os impactos ambientais gerados pela utilização de surfactantes químicos devido à sua toxicidade e difícil degradação (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006). O rápido avanço da biotecnologia e o aumento da consciência ambiental entre os consumidores, combinado com o surgimento de legislações mais rigorosas têm levado a sérias considerações sobre a utilização de surfactantes biológicos como uma possível alternativa para os produtos de origem petroquímica atualmente utilizados (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

2.2. BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes são moléculas superficialmente ativas produzidas por células vivas, na maioria das vezes microrganismos, a partir de uma grande variedade de substratos que incluem açúcares, óleos e n-alcanos. Trata-se de um grupo bastante diverso, podendo ocorrer em uma grande variedade de estruturas químicas, como glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos e lipídeos neutros (MUKHERJEE, S. et al., 2006).

Embora a função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que exercem influência sobre a sobrevivência de microrganismos por estarem relacionados com a mobilidade e comunicação celular, o acesso a nutrientes, a competição célula-célula e a patogênese em plantas e animais. Podem ser usados ainda como fonte de carbono para a produção de energia, como mecanismo protetor contra a alta força iônica ou como subprodutos liberados em resposta a mudanças ambientais (VAN HAMME et al., 2006).

A Tabela 2.2 apresenta alguns exemplos de microrganismos produtores de biossurfactantes, o tipo de surfactante produzido, bem como a tensão superficial e o valor de sua CMC, as quais são consideradas os principais parâmetros para seleção de um biossurfactante para fins ambientais. Comparados com surfactantes químicos convencionais, é possível perceber que os biossurfactantes podem apresentar atividade tensoativa e CMC bem mais satisfatórias.

Tabela 2.2 – Exemplos de biossurfactantes, microrganismos produtores e suas respectivas CMC e tensão superficial (adaptado de BOGNOLO (1999))

Surfactante	Tensão Superficial (Mn/m)	CMC (mg/L)
Biossurfactantes (microrganismo)		
Trealoselipídeo (<i>Rhodococcus erythropolis</i>)	37	15
Ramnolipídeo (<i>P. aeruginosa</i>)	29	15
Soforoselipídeo (<i>Torulopsis bombicola</i>)	37	82
Surfactina (<i>Bacillus subtilis</i>)	27	11
Surfactantes Sintéticos Aniônicos		
Alquilato dodecilbenzeno (LABS)	47	590
SLS ou SDS	37	2023-2890
Span 60	n.d.*	80

*n.d.: Não determinado

Diferentes fatores têm sido reportados por influenciar a natureza química, a quantidade de biossurfactante produzido e suas propriedades físico-químicas. Dentre eles estão o microrganismo utilizado, as fontes de carbono e nitrogênio, as possíveis limitações nutricionais envolvidas no crescimento microbiano, além de fatores abióticos, como pH, temperatura, agitação e aeração. Deste modo, modelos para a produção de biossurfactantes por diferentes espécies de microrganismos devem ser otimizados caso a caso (AMÉZCUA-VEGA et al., 2007; MUKHERJEE, S. et al., 2006).

Por exemplo, Mukherjee e Das (2005) observaram que cepas de *B. subtilis* isoladas de diferentes habitats (alimento fermentado ou solo contaminado por petróleo) produziam isoformas de lipopeptídeos quantitativamente e qualitativamente distintas em diferentes condições de cultura em laboratório. Estes resultados reforçam que o tipo e quantidade de substrato hidrofóbico disponível no ambiente original da bactéria influenciam na produção de biossurfactantes e na preferência por consumo de um grupo específico de substrato em condições laboratoriais.

Santos e colaboradores (2002) observaram que a proporção de monoramnolipídeo (RL1) para diramnolipídeo (RL2) produzidos por *P. aeruginosa* está relacionada com a fonte de carbono utilizada no meio de cultura. Quando glicerol (substrato solúvel) e óleos vegetais (insolúveis) foram utilizados, a razão RL1 e RL2 foi de 0,2 e 1,2, respectivamente. Estas proporções distintas de tipos de ramnolipídeos podem representar uma importante mudança nas

características do biossurfactante produzido, afetando parâmetros como CMC e tensão interfacial, que por sua vez irão alterar a disponibilidade de substrato para a bactéria.

Além de seus papéis fisiológicos e natureza química, as propriedades exibidas por biossurfactantes são as principais razões para o aumento do interesse em sua exploração comercial. De acordo com as propriedades físico-químicas do biossurfactante produzido, tais como a formação de micelas e emulsões, redução da tensão superficial, aumento da solubilidade e da detergência, diferentes aplicações comerciais são potencialmente possíveis, as quais irão requerer diferentes graus de pureza, de acordo com a finalidade do produto final.

2.2.1. Potenciais aplicações de biossurfactantes em diferentes setores industriais

Biossurfactantes podem potencialmente substituir surfactantes químicos em vários processos industriais, desde a indústria do petróleo à farmacêutica. Em processos industriais de recuperação e processamento de petróleo, estas moléculas podem ser aplicadas na remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, na recuperação melhorada do petróleo por microrganismos (MEOR), em processos de biorremediação e dispersão em derramamentos de óleos, entre outros. Esta aplicabilidade é possível graças à eficiência de biossurfactantes na redução da tensão interfacial do óleo e da água *in situ*, além da redução da viscosidade do óleo (SINGH, A. et al., 2007).

A aplicação de biossurfactantes ou microrganismos produtores têm sido extensivamente explorados na recuperação óleo de poços de produção de petróleo (MARCHANT; BANAT, 2012; SINGH, A. et al., 2007). A estratégia MEOR é algumas vezes implementada por meio da injeção direta de nutrientes com consórcios microbianos específicos, capazes de produzir substâncias que promovem a mobilização do óleo, dentre eles os biossurfactantes. A recuperação do óleo demonstrou ser aumentada de 30 a 200% com a injeção de biossurfactantes bacterianos (ex: *P. aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*) e nutrientes (SINGH, S. et al., 2008). No entanto, a aplicação de MEOR requer uma investigação minuciosa caso a caso, levando em conta as características do óleo a ser recuperado, as condições físico-químicas do solo e as características da formação da rocha.

Outra aplicação de biossurfactantes relacionada com a indústria do petróleo está na limpeza de reservatórios de óleo. Resíduos e frações de óleos pesados que se depositam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos por bombeamento convencional. A utilização de biossurfactantes tem sido estudada como uma alternativa, promovendo a redução da viscosidade de óleos pesados e a formação de

emulsões óleo/ água, facilitando a recuperação e transporte em oleodutos (BANAT et al., 2000). Estudos feitos por Banat e colaboradores (1991) indicaram que a utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo.

Biossurfactantes apresentam também importante papel no processo de biorremediação de solos impactados, principalmente emulsionando hidrocarbonetos, aumentando a solubilidade destes compostos hidrofóbicos e disponibilizando-os para a biodegradação realizada pela microbiota nativa (MARCHANT; BANAT, 2012). Podem também ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo, por meio de lavagem *ex situ*. Como exemplo, pode-se destacar o trabalho de Santa Anna e colaboradores (2007), ao investigar a utilização de ramnolipídeos na remoção de dois tipos de óleo de solos contaminados. Em solos contendo predominantemente hidrocarbonetos parafínicos ou aromáticos, o percentual de remoção de óleo atingiu 91 e 78%, respectivamente.

Na indústria de alimentos, biossurfactantes podem atuar como emulsificantes, antiadesivos e agentes antimicrobianos (SINGH, P.; CAMEOTRA, 2004). Dentro deste contexto, ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* são a classe mais promissora de biossurfactantes, uma vez que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos aprovou o uso de ramnolipídeos em produtos alimentícios, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE; COSTA, 2007).

Fabricantes de alimentos utilizam emulsificantes para reduzir a tensão superficial entre duas fases imiscíveis, permitindo sua mistura. Devido a suas propriedades funcionais, emulsificantes constituem um indispensável item em alimentos como produtos lácteos e aqueles com baixo teor de gordura, que demandam maiores estabilidade e vida de prateleira. Com o rápido crescimento do mercado de alimentos funcionais, os quais requerem ingredientes naturais ou orgânicos, uma oportunidade surge para novos emulsificantes de origem biológica (FREIRE et al., 2009). Por exemplo, biossurfactantes do tipo lipopeptídeo obtidos de *B. subtilis* são capazes de formar emulsões estáveis com óleo de soja e gordura de coco (NITSCHKE; PASTORE, 2006), bem como óleos de girassol, linhaça e oliva, sugerindo seu potencial como agente emulsificante em alimentos (COSTA et al., 2006). Além disso, estudos reportam que lipopeptídeos como a surfactina, produzidos por esta bactéria, também possuem propriedades microbianas, antifúngica, além de exibir atividades antitumorais, o que demonstra sua potencial utilização também na indústria farmacêutica (SINGH, P.; CAMEOTRA, 2004).

Na agricultura, biossurfactantes podem ser usados principalmente em formulações de pesticidas e herbicidas, aumentando o efeito de agentes de biocontrole. Os compostos ativos

destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Mecanismos de ação do biossurfactante, neste caso, incluem o auxílio da penetração do agente de controle ou de seu produto nas células ou tecidos de organismos alvo (SINGH, A. et al., 2007).

2.2.2. Aspectos econômicos da produção de biossurfactantes

Conforme dito anteriormente, a diversidade de funções fisiológicas desempenhadas por biossurfactantes se deve principalmente às suas diferentes propriedades físico-químicas, muitas das quais são responsáveis por tornar sua utilização industrial vantajosa, quando comparada com surfactantes químicos convencionais. Dentre estas características estão a sua baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, possibilidade de produção a partir de substratos renováveis, além de tolerância a condições extremas de temperatura, pH e força iônica (BOGNOLO, 1999; DESAI; BANAT, 1997).

Embora surfactantes biológicos apresentem as vantagens supracitadas, o fator limitante para sua ampla utilização e comercialização ainda reside na questão econômica de sua produção. Estima-se que o custo para a produção de um biossurfactante seja aproximadamente 3 a 10 vezes maior que aquele relacionado à produção de um surfactante químico (SANTOS et al., 2002). Por conta disso, para viabilizar economicamente a produção é necessário o aumento da produtividade e seleção de componentes para a utilização de meios de cultivo de baixo custo, visto que os gastos com matéria-prima para a fermentação constituem cerca de 10-30 % do custo total da produção (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Outro fator a ser considerado é o desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização de meios e condições de cultivo, além da implementação de processos de separação de baixo custo e que permitam a recuperação máxima do biossurfactante. Por fim, deve-se incluir também o desenvolvimento de cepas mutantes ou recombinantes superprodutoras de biossurfactantes, embora este tipo de estratégia ainda seja relativamente recente e, por conta disso, pouco desenvolvida quando comparada às demais (MUKHERJEE, S. et al., 2006).

O número de publicações relacionadas com a identificação, otimização do processo produtivo e melhor entendimento das vias metabólicas de produção de biossurfactantes tem aumentado nos últimos anos (MÜLLER et al., 2012). Muitos biossurfactantes e seus processos produtivos têm sido patenteados, mas apenas alguns deles estão sendo comercializados (KRONEMBERGER et al., 2008). Alguns exemplos de produtos disponíveis no mercado

contendo biossurfactantes em sua composição são apresentados na Tabela 2.3 (REIS et al., 2013).

Tabela 2.3 – Exemplos de produtos comercializados contendo biossurfactantes

Biossurfactante	Origem	Fornecedor	Aplicação
BioFuture	Ramnolípídeo bacteriano	BioFuture Ltd, Ireland	Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos
EC-601	Ramnolípídeo bacteriano	Ecochem Ltd, Canadá	Agente dispersivo de hidrocarbonetos insolúveis em água
EC-1800	Consórcio bacteriano	Ecochem Ltd, Canadá	Limpeza de derramamentos de óleo em terra, areia e cascalho
EC-2100W	Consórcio bacteriano	Ecochem Ltd, Canadá	Degrada compostos contendo hidrocarbonetos em estações de tratamento de água, lagoas, tanques de armazenamento, poços e outros ambientes aquosos
Produtos JBR	Ramnolípídeo microbiano com diferentes graus de pureza	Jeneil Biosurfactant Co., LTC, USA	Utilizado em diferentes indústrias, tais como alimentícia e agro-industriais
Petrosolv	Bacteriano (desconhecido)	Enzyme Technologies Inc, USA	Remoção, recuperação e processamento de óleo
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	Atividade antifúngica, antibacteriana e anti-tumoral

De acordo com dados recentes, publicados pela companhia de inteligência de mercado *Transparency Market Research* (<http://www.transparencymarketresearch.com>), o mercado global de biossurfactantes atingiu US\$ 1,7 bilhões em 2011 e espera-se que este valor aumente a uma taxa anual de 3,5%, podendo alcançar aproximadamente US\$ 2,2 bilhões em 2018. A região européia deverá manter sua posição de liderança em termos de volume e receita até 2018, desfrutando de 53% do mercado global de biossurfactantes, seguido da América do Norte.

O crescimento gradual do mercado mundial de biossurfactantes tem sido favorecido, conforme discutido, por sua possibilidade de aplicação em diferentes setores industriais, tais como a remoção de óleo de solos contaminados (SANTA ANNA et al., 2007), tratamento de efluentes (DAMASCENO; CAMMAROTA; FREIRE, 2012), antimicrobiano e condicionador de superfícies (DE ARAUJO et al., 2011; KORENBLUM et al., 2012). Além destes segmentos, os detergentes domésticos e o segmento de cuidados pessoais apresentam grande importância no mercado internacional e contribuirão, juntos, com mais de 56% do mercado global de biossurfactantes em 2018.

O volume de biossurfactantes no mercado global deve chegar a 476.512 toneladas até 2018, devido ao aumento da demanda de países da Ásia, África e América Latina, os quais são responsáveis pela absorção de 21% deste montante. Apesar disso, o Brasil ainda não possui nenhuma grande empresa neste negócio, o que impõe a necessidade de importação deste produto, tornando a aquisição ainda mais custosa para empresas consumidoras nacionais (REIS et al., 2013).

2.3. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

É extenso o número de microrganismos capazes de sintetizar moléculas com propriedades surfactantes, dentre os quais se destacam as bactérias do gênero *Pseudomonas*. Membros deste gênero pertencem à subclasse gama do grupo das Proteobactérias e são capazes de colonizar diversos ambientes, desempenhando importantes papéis nestes locais. Devido à sua grande capacidade de degradação e biotransformação de poluentes, estas bactérias apresentam potencial para diferentes aplicações biotecnológicas, particularmente em áreas de biorremediação e biocatálise (LOH; CAO, 2008).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem principalmente surfactantes do tipo ramnolípídeo, considerado atualmente o biossurfactante mais amplamente comercializado do mundo. Este glicolípídeo possui baixo valor de CMC e excelente redução da tensão superficial, tendo se mostrado eficiente na lavagem e biorremediação de solos impactados com compostos oleosos (SANTA ANNA et al., 2004; SANTA ANNA et al., 2007).

Dentro do gênero *Pseudomonas* se encontra a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa, encapsulada e móvel. Esta bactéria apresenta grande versatilidade ambiental, podendo ser encontrada em habitats terrestres, aquáticos e formando biofilmes em superfícies úmidas, como rochas e solos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Dentre os fatores que possibilitam sua grande versatilidade ambiental estão a produção de vários

fatores de virulência, incluindo ramnolipídeos e proteases extracelulares, como elastases e proteases alcalinas, exotoxina A, piocianina, alginato e lectina, os quais são altamente conservados no genoma (LAMONT et al., 2002).

A diversidade de fatores de virulência produzidos contribui para que *P. aeruginosa* seja considerada um importante patógeno oportunista, atualmente considerado o terceiro patógeno mais comum em infecções hospitalares. Está associado com doenças pulmonares crônicas e eventualmente fatais em pacientes com fibrose cística (BRENCIC et al., 2009).

Devido a sua grande importância como patógeno, complexidade genética e versatilidade ambiental, diversos estudos já foram realizados com essa bactéria. As anotações genômicas de *P. aeruginosa* PAO1, isolada de ambiente hospitalar e seqüenciada por Stover *et al.* (2000), bem como de outras bactérias deste gênero seqüenciadas posteriormente, como *P. aeruginosa* PA7, *P. putida* L48 e *P. fluorescens* PF-5 podem ser encontradas no site www.pseudomonas.com. Estas anotações genômicas tornam promissora a sua manipulação genética, o que a situa como um potencial microrganismo para aplicação biotecnológica (REIS, 2008).

Trata-se de um dos maiores genomas bacterianos já seqüenciados, com um número de proteínas de membrana externa considerado bastante grande quando comparado a outros genomas bacterianos. Estas proteínas estão relacionadas com o transporte de antibióticos, exportação de fatores de virulência extracelulares e com o ancoramento de estruturas que medeiam adesão e motilidade celular (STOVER et al., 2000). Informações obtidas a partir destes estudos permitem uma melhor compreensão das vias metabólicas e de resposta a estímulos ambientais existentes nestes organismos, tornando promissora sua manipulação genética e posterior aplicação para fins biotecnológicos.

2.3.1. Biossíntese de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*

Os ramnolipídeos, glicolipídeos formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico, são produzidos como metabólitos secundários por *P. aeruginosa* e sua produção coincide com a fase estacionária de crescimento (DÉZIEL et al., 1999; SANTA ANNA et al., 2001; VENKATA RAMANA; KARANTH, 1989).

Em cultura líquida, *P. aeruginosa* produz, principalmente, duas formas de ramnolipídeo: ramnosil- β -hidroxiacil- β -hidroxidecanoato (monoramnolipídeo) e ramnosil-ramnosil- β -hidroxiacil- β -hidroxidecanoato (diramnolipídeo). A Figura 2.2 ilustra a estrutura química destas moléculas (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005).

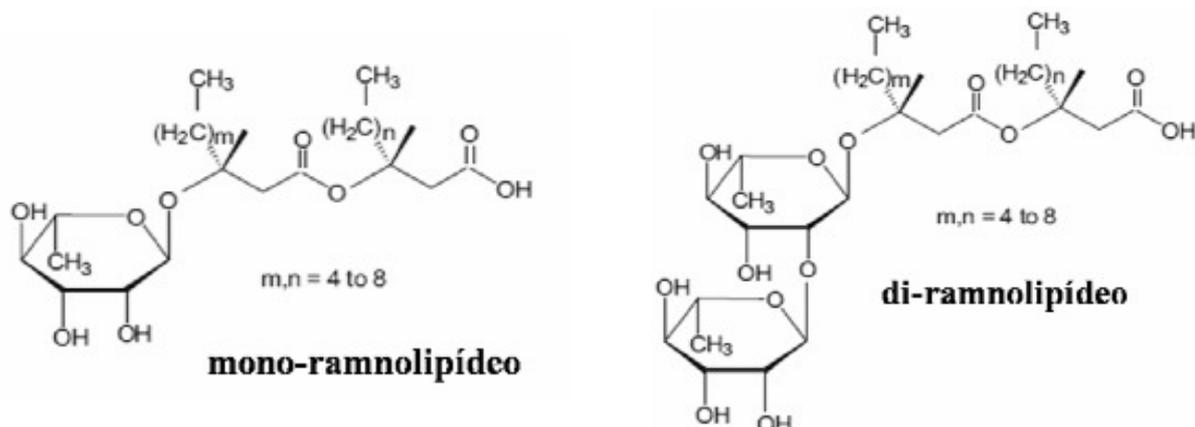


Figura 2.2 – Estrutura química de ramnolipídeos (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005)

A biossíntese da porção hidrofóbica (ácido graxo) do ramnolipídeo ocorre por meio de um desvio na síntese *de novo* de ácidos graxos. Embora Campos-Garcia *et al* (1998) tenham relatado a participação da enzima RhlG (β -cetoacil redutase) neste processo, por meio de um desvio de β -cetoacil-ACP para a biossíntese de ramnolipídeo, estudos recentes demonstram que RhlA é a única proteína necessária para converter duas moléculas de β -hidrociacil-ACP, desviadas do ciclo de biossíntese de ácidos graxos bacteriano (FASII), para a formação de uma molécula de β -Hidroxidecanoil- β -Hidroxidecanoato (HAA) (ZHU; ROCK, 2008). Por outro lado, a porção hidrofílica (açúcar) é formada a partir de deoxi-timina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-ramnose), que atua como doador de L-ramnose, assim como ocorre na biossíntese de todos os polímeros celulares que contêm esta molécula. Em *P. aeruginosa*, assim como em outras bactérias Gram-negativas, L-ramnose é um componente comum dos lipopolissacarídeos de membrana (LPS) (SADOVSKAYA et al., 1998).

Portanto, a biossíntese de ramnolipídeo ocorre através de um desvio na via metabólica da síntese *de novo* de ácidos graxos e a união entre a porção hidrofóbica (ácido graxo) e a hidrofílica (ramnose) por meio do complexo enzimático ramnosiltransferase I (RhlA/ RhlB). Este complexo é formado pelas enzimas RhlA e RhlB, codificada pelo operon *rhlAB*, onde esta última é a subunidade catalítica da reação de condensação, que gera moléculas de monoramnolipídeo (RL1) (OCHSNER; FIECHTER; REISER, 1994). Por intermédio do complexo enzimático ramnosiltransferase II (RhlC), codificado pelo gene *rhlC*, um segundo grupo ramnosil é adicionado para formar moléculas de diramnolipídeo (RL2) (RAHIM et al., 2001).

Estudos sugerem que além de atuar como um intermediário na síntese de ramnolipídeo, HAA também pode ser secretado e possui propriedades tenso-ativas (DÉZIEL et al., 2003; LÉPINE et al., 2002). A Figura 2.3 ilustra a via biossintética de produção de ramnolipídeos.

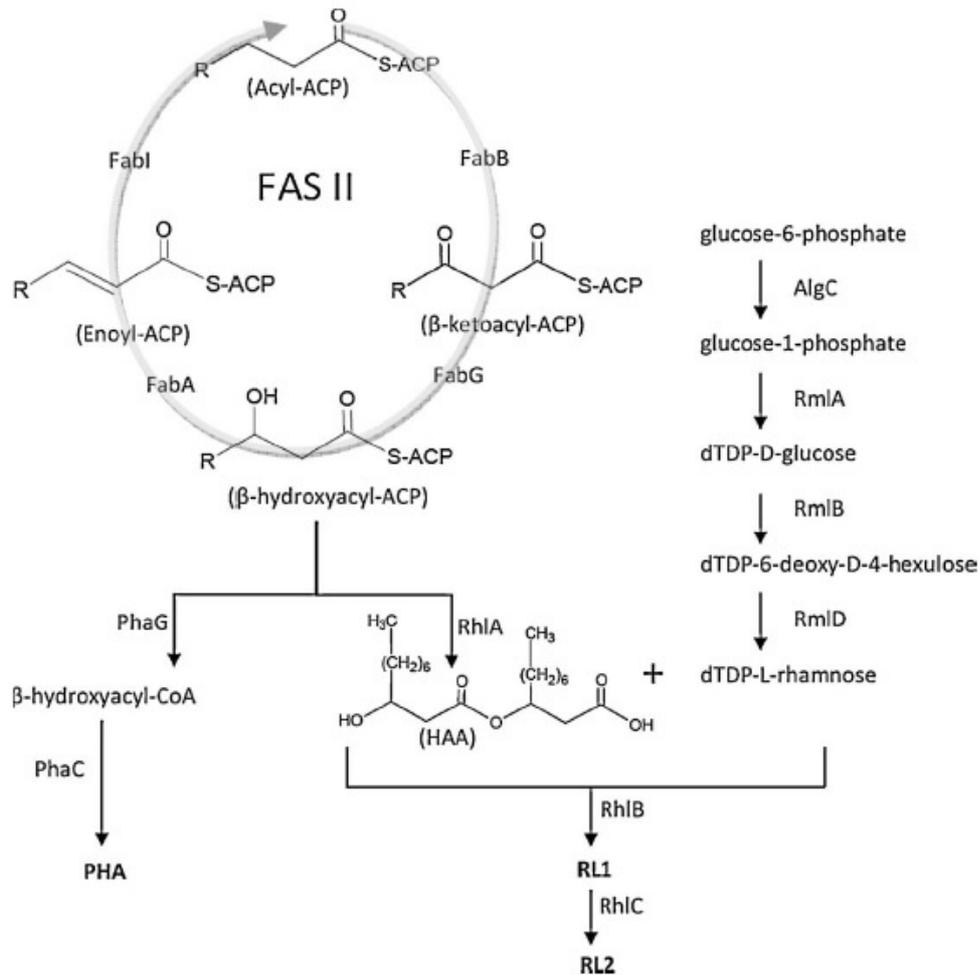


Figura 2.3 – Via metabólica de biossintese de ramnolipídeos (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011)

Apesar da maioria dos estudos relacionados aos ramnolipídeos, assim como aos demais fatores de virulência, serem direcionadas ao interesse clínico, alguns grupos vem se destacando em pesquisas voltadas ao entendimento da biossintese e regulação genética da produção de ramnolipídeo com fins biotecnológicos. No entanto, ainda há diversas lacunas a serem preenchidas, dentre outros motivos, devido à complexa relação entre a sua produção e as condições de cultivo, a grande complexidade de sua regulação gênica, a difícil superexpressão heteróloga e a relação direta entre sua produção e diversos outros fatores de virulência.

2.3.2. Regulação gênica da produção de ramnolipídeos

A produção de ramnolipídeos em *P. aeruginosa* é controlada por sistemas de regulação gênica, os quais respondem a uma ampla variedade de estímulos ambientais e fisiológicos, sendo capazes de combinar diferentes sinais para gerar respostas únicas e específicas. Alta relação carbono/ nitrogênio, exaustão da fonte de nitrogênio, condições de estresse e alta densidade celular são algumas das condições favoráveis à produção de ramnolipídeos (REIS et al., 2010).

Aparentemente, os alvos de regulação chave para a produção de ramnolipídeos em *P. aeruginosa* são os operons *rmlBDAC* e *rhlAB*, envolvidos na síntese da porção hidrofílica (ramnose) e hidrofóbica (ácido graxo) do ramnolipídeo, respectivamente. Ambos são regulados por diferentes fatores, comumente associados com o sistema *quorum sensing* (QS) (REIS et al., 2013).

O sistema QS é o processo de comunicação célula-célula bacteriano, caracterizado pela secreção e detecção de moléculas sinalizadoras autoindutoras dentro de uma população bacteriana. Isto permite que, ao atingir alta densidade populacional, a população bacteriana controle, coletivamente, a expressão gênica e sincronize as suas ações em resposta a estímulos ambientais. Várias funções biológicas de diferentes espécies bacterianas são reguladas por QS, tais como virulência formação de biofilme, bioluminescência e conjugação bacteriana (WILLIAMS; CÁMARA, 2009).

Existem dois sistemas QS convencionais em *P. aeruginosa*: *las* e *rhl*. Os autoindutores sintase LasI e RhlI produzem as homoserino lactonas 3OC12-HSL e C4-HSL, respectivamente, as quais complexam com seus reguladores transcricionais correspondentes, LasR e RhlR, para modular a transcrição de 5-10% do genoma de *P. aeruginosa* (DEKIMPE; DÉZIEL, 2009). Um terceiro sistema QS distinto é formado pelo fator transcricional PqsR (LOH; CAO, 2008), responsável pela ativação do cluster gênico *pqsABCDE* e *phnAB*, ambos requeridos para a produção de Pseudomonas quinolona sinal (PQS) e 4-hidroxi-2-alkil quinolonas (HAQs), respectivamente, os quais são reportados por influenciar a produção de fatores dependentes de QS, tais como elastase, piocianina, lectinas e ramnolipídeos (DÉZIEL et al., 2005).

Estudos demonstram que a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* está diretamente relacionada com o sistema QS por meio do regulador transcricional RhlR. Quando complexado com o autoindutor C4-HSL, RhlR atua como um ativador transcricional de *rhlAB* e *rmlBDAC*, ao passo que, na ausência do autoindutor, RhlR atua como um repressor transcricional (AGUIRRE-RAMÍREZ et al., 2012; MEDINA; JUÁREZ; VALDERRAMA et al., 2003). Além disso, em meios de cultivo contendo alta concentração de nutrientes, a

expressão de RhIR é regulada por intermédio de ativadores transcricionais, incluindo Vfr, RhIR, e o fator sigma σ^{54} (RpoN). Do mesmo modo, em baixas concentrações de fosfato ocorre o estímulo à transcrição de *rhIR* e genes regulados por RhIR, incluindo ramnolipídeos, mesmo em baixas concentrações de homoserino lactonas (JENSEN et al., 2006).

Nos últimos anos, muitos outros fatores relacionados com o sistema QS têm sido identificados e reportados por influenciar direta ou indiretamente sobre a produção de ramnolipídeos. Dentre eles estão RsaL, que atua como repressor do sistema Las; RpoS, envolvido na resposta a condições de estresse; o fator PtxR, que modula a produção de fatores de virulência ao reprimir a expressão de genes do sistema PQS; bem como AlgR, relacionado com a produção de alginato, a formação de biofilme e a repressão da produção de ramnolipídeos (REIS et al., 2011). A Figura 2.4 apresenta um esquema geral de fatores direta ou indiretamente envolvidos com a regulação gênica da produção de ramnolipídeos.

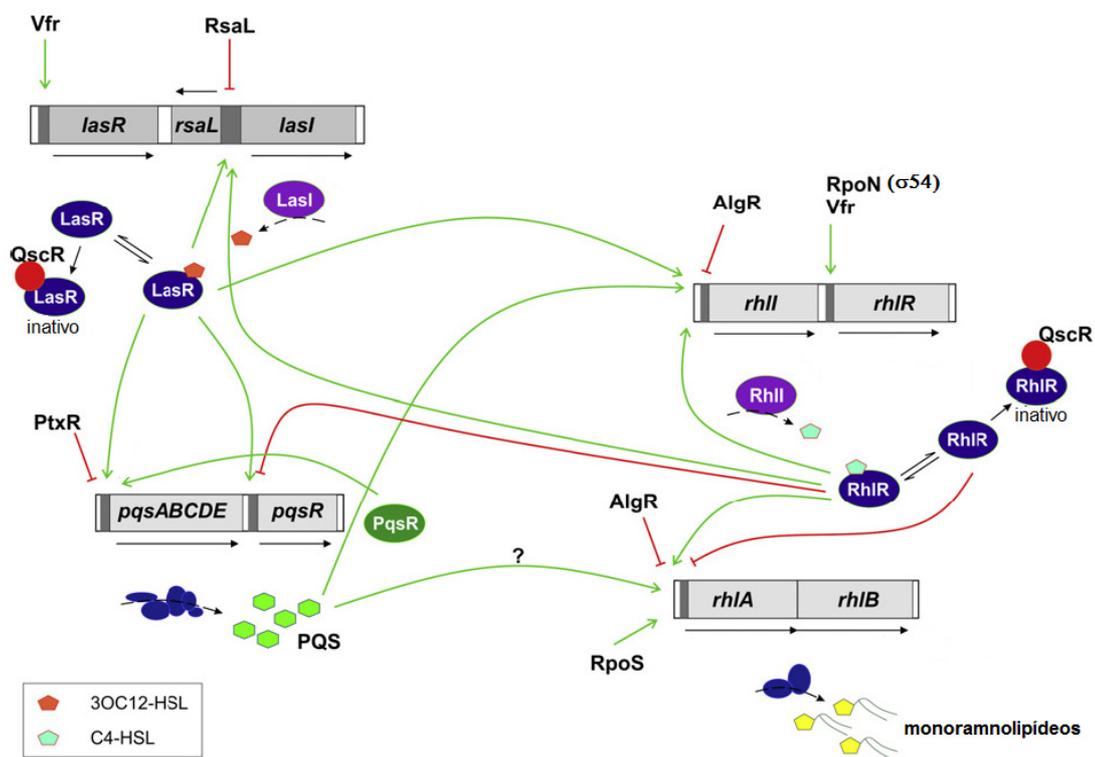


Figura 2.4 – Esquema geral de fatores direta ou indiretamente envolvidos com a regulação gênica da produção de ramnolipídeos. Linhas verdes indicam ativação transcricional/ traducional e as linhas vermelhas indicam repressão (Modificado de Reis e colaboradores (2011))

Ramnolipídeos costumam estar relacionados com o consumo de substratos de difícil acesso, tais como substratos hidrofóbicos, e sua produção muitas vezes está associada com mecanismos de resposta a ambientes deficientes em nutrientes. Durante a fase estacionária de

crescimento a escassez de nutrientes é mais frequentemente observada, o que justifica a produção de ramnolipídeos não associada ao crescimento bacteriano e predominante durante a fase estacionária (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1986; SANTA ANNA et al., 2002).

Estudos recentes têm demonstrado que a produção de ramnolipídeos é reprimida durante a fase exponencial e em condições de baixa densidade celular, ao passo que sua ativação ocorre em densidades celulares elevadas. Esta regulação está relacionada a diversos fatores que, direta ou indiretamente, controlam os níveis de expressão gênica durante ou após a transcrição (REIS et al., 2013).

O principal fator que contribui para a produção de ramnolipídeos durante a fase estacionária de crescimento parece ser o sistema *rhl*, o qual é ativado apenas em condições de alta densidade celular. Além do *rhl*, reguladores pós-transcricionais também garantem a produção de ramnolipídeos na fase estacionária de crescimento. Por exemplo, o regulador GidA demonstrou modular a expressão de RhlR e de outros genes dele dependentes em *P. aeruginosa*. Em mutantes para *gidA*, os níveis de mRNA que codificam para RhlR são similares àqueles observados em cepas selvagens, ao passo que os níveis de mRNA que codificam para RhlA são significativamente reduzidos, sugerindo que a produção de ramnolipídeos é controlada por meio da modulação pós transcricional de RhlR por GidA (GUPTA; GOBBLE; SCHUSTER, 2009).

Em relação aos fatores que inibem a produção de ramnolipídeo na fase exponencial, dois reguladores já foram identificados: QscR e DksA. QscR atua como repressor do operon *rhlAB* durante a fase exponencial (LEQUETTE et al., 2006), por formar heterodímeros inativos com LasR e RhlR, em baixas concentrações de acil homoserina lactonas (acil-HSL) – evento característico da fase exponencial de crescimento. Com o aumento da concentração de acil-HSL no meio, a qual ocorre à medida que a densidade celular aumenta no meio, complexos QscR-acil-HSL são formados e as interações LasR-3OC12-HSL e RhlR-C4-HSL ocorrem, como resultado da dissociação do heterodímero (LEDGHAM et al., 2003) (Figura 2.4). DksA, por sua vez, é um regulador transcricional que, quando superexpresso, reduz a expressão de *rhlAB* em *P. aeruginosa*. A síntese de DksA atinge o seu máximo durante a fase exponencial, sendo pós transcionalmente reprimida ao final da fase exponencial e durante a fase estacionária de crescimento (PERRON; COMTE; VAN DELDEN, 2005).

Além dos fatores relacionados com a fase de crescimento, um importante fator relacionado com o sistema QS que influencia a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* é o sinalizador intracelular PQS. PQS está envolvido em uma complexa rede de regulação, conectando os sistemas *las* e *rhl*. Enquanto PQS ativa o sistema *rhl* de maneira independente de

las (DIGGLE et al., 2003; MCKNIGHT; IGLEWSKI; PESCI, 2000), a síntese de PQS ocorre por meio do operon *pqsABCDE*, o qual é ativado por PqsR (Figura 2.4). PqsR é ativada pelo sistema *las* e reprimida pelo sistema *rhl*, evidenciando a complexidade desta rede de regulação por QS (WADE et al., 2005). Além disso, outras evidências relatadas na literatura associam o sistema PQS com a produção de ramnolipídeos. Por exemplo, a produção de PQS ocorre ao final da fase exponencial e atinge seu máximo ao final da fase estacionária (DIGGLE et al., 2003; MCKNIGHT et al., 2000), com um perfil semelhante à biossíntese de ramnolipídeos. Do mesmo modo, foi demonstrado que mutantes para *pqsR* e *pqsE* apresentaram redução na produção de ramnolipídeos, mesmo quando expostos aos mesmos níveis de C4-HSL presentes na cepa selvagem (MEDINA; JUÁREZ; VALDERRAMA et al., 2003), o que sugere a participação direta de PqsE, PqsR e/ ou PQS na síntese de ramnolipídeos.

2.3.3. Fatores regulatórios relacionados a condições de estresse

Condições ambientais associadas ao estresse têm demonstrado influenciar fortemente a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*. Situações como privação de nutrientes e exaustão da fonte de nitrogênio, por exemplo, ainda que de uma maneira independente do sistema QS, têm sido reportadas por contribuir para o aumento da produção de ramnolipídeos. Vários fatores regulatórios foram identificados nos últimos anos, os quais relacionam condições de estresse a padrões de regulação de genes específicos. Os mais relevantes são os fatores sigma da RNA polimerase RpoS (σ^S ou σ^{38}) e RpoN (σ^{54}).

O fator sigma de fase estacionária, RpoS, desempenha importante papel em resposta a diferentes condições de estresse em *P. aeruginosa*. Mutantes para *rpoS* demonstraram maior susceptibilidade à deficiência da fonte de carbono, choque térmico, alta osmolaridade, baixo pH e peróxido de hidrogênio (SUH et al., 1999). Além disso, estudos indicam que RpoS está envolvido com a produção de ramnolipídeos de duas diferentes maneiras, o que sugere a existência de uma relação entre a produção de ramnolipídeos, a privação de nutrientes e o mecanismo de adaptação a condições de estresse. Primeiramente, o operon *rhlAB* integra o regulon RpoS e tem sido demonstrado ser supra regulado e parcialmente dependente de RpoS (MEDINA; JUÁREZ; DÍAZ et al., 2003). Além disso, o operon *rmlBDAC* mostrou recentemente ser ativado por RpoS, o qual interage em uma região promotora diferente do RhIR-C4HSL (AGUIRRE-RAMÍREZ et al., 2012), demonstrando haver uma regulação relacionada ao estresse independente de QS. Somado a estas evidências, estudos demonstram que RpoS é necessário

para a motilidade por *swarming*; um fenótipo relacionado com HAA e ramnolipídeos (DÉZIEL et al., 2003).

O fator sigma RpoN (σ^{54}) é conhecido por estar envolvido com o metabolismo de nitrogênio em bactérias. Estudos reportam que a produção de ramnolipídeos está amplamente relacionada com a exaustão de nitrogênio em *P. aeruginosa*, e diferentes fontes deste nutriente podem atuar como inibidores (amônia, glutamina, asparagina e arginina) ou ativadores (nitrato, glutamato e aspartato) da produção (MULLIGAN; GIBBS, 1989; VENKATA RAMANA; KARANTH, 1989). Deste modo, a ativação da produção de ramnolipídeos em meios de cultivo contendo nitrato como fonte de nitrogênio pode ser interpretada como uma simulação de condições limitantes de nitrogênio. Isto porque a assimilação do nitrato (NO_3^-) envolve sua redução a íon nitrito (NO_2^-), seguido da conversão a amônio (NH_4^+), para então ser incorporado ao metabolismo da glutamina-glutamato (BARBER; STUCKEY, 2000). Além disso, a maior produtividade em ramnolipídeos observada em meios de cultivo contendo nitrato como fonte de carbono (SANTOS et al., 2002), pode estar relacionada com a regulação positiva da glutamina sintase por RpoN, em condições limitantes de nitrogênio (TOTTEN; CANO LARA; LORY, 1990). Sob estas condições limitantes de nitrogênio, *P. aeruginosa* parece melhorar a assimilação deste nutriente por meio de vias dependentes de ATP (por exemplo, glutamina sintase) e aumentar a absorção de nitrogênio por meio do aumento da biossíntese de ramnolipídeos, uma vez que os operons *rhlAB* e *rhlR* são controlados indireta e diretamente, respectivamente, por RpoN (MEDINA; JUÁREZ; DÍAZ et al., 2003).

Outro fator importante que pode correlacionar a produção de ramnolipídeos a condições de estresse, por QS, é o PQS. O sinalizador PQS está envolvido na resposta ao estresse em *P. aeruginosa* e tem sido reportada a sua relação com o estresse oxidativo, resistência à radiação UV e a agentes antimicrobianos (HÄUSSLER; BECKER, 2008). Estudos demonstram a atuação de ramnolipídeos na solubilização e assimilação de PQS, contribuindo para sua atividade como regulador transcricional (CALFEE et al., 2005), o que claramente indica uma interligação entre a síntese de ramnolipídeos e PQS.

2.3.4. Influência da oxigenação sobre a produção de ramnolipídeos

P. aeruginosa é uma bactéria aeróbia facultativa, cujo crescimento é dependente do suprimento de oxigênio ao meio de cultivo. Embora poucos trabalhos demonstrem a influência da oxigenação sobre a produção de ramnolipídeos por esta bactéria, alguns pesquisadores sugerem que estas moléculas participam da proteção contra o estresse oxidativo, atuando como

dispersores das moléculas de oxigênio e impedindo sua entrada em solução através da camada de espuma formada na superfície (KIM et al., 2003; SABRA et al., 2002). Além disso, em condições de estresse oxidativo é encontrada elevada secreção de proteínas por *P. aeruginosa*, incluindo diferentes fatores de virulência (SABRA et al., 2002).

Em concordância com estes autores, Wei *et al.* (2005) observaram o aumento na produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* J4 em condições de maior agitação e atribuíram este resultado à maior concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. Do mesmo modo, estudos recentes realizados em frascos agitados contendo diferentes volumes de meio demonstraram maior produtividade de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PA1 em frascos submetidos a condições de maior aeração superficial, o que está fortemente relacionado com o aumento no rendimento de produto por biomassa (Y_p/x) e substrato (Y_p/s). Neste trabalho não foram detectadas a presença de fatores de virulência como lipase, alginato e piocianina, embora a produção de proteases alcalinas e elastases, assim como a produção de ramnolipídeos, tenham sido maiores em condições de cultivo sob maior aeração superficial (PACHECO et al., 2012).

Apesar da maioria dos microrganismos conhecidos necessitarem de condições aeróbicas para a produção de biossurfactantes de modo eficiente, o uso da aeração submersa convencional pode levar à formação de espumas muito estáveis, causando sérios problemas operacionais. A elevada produção de espumas ainda é aumentada pela presença de proteínas extracelulares e pelas próprias células microbianas, resultando em grandes gastos para o controle das mesmas e muitas vezes inviabilizando o processo produtivo. Quebradores de espuma mecânicos não são muito eficientes e agentes anti-espumantes químicos podem alterar a qualidade do produto (alteração de propriedades tensoativas) e são potenciais poluentes do efluente final do fermentador (GRUBER et al., 1993).

Estudos recentes realizados por Kronemberger *et al.* (2008) levaram ao desenvolvimento de um sistema de oxigenação controlada em biorreatores acoplados a contactores de membrana, visando aumentar a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* PA1. Ficou demonstrado por meio deste trabalho que o crescimento celular e a produção de biossurfactantes por esta cepa são, em certo grau, dependentes da oxigenação do meio de cultivo. Além disso, o desenvolvimento deste sistema tornou possível controlar a oxigenação em biorreatores ao longo de todo o cultivo e realizar uma análise mais bem aprofundada acerca dos efeitos da oxigenação sobre o metabolismo da bactéria e sobre a produção de ramnolipídeos. Em outras palavras, este estudo abriu perspectivas para verificar em que medida a concentração de oxigênio dissolvido no meio leva ao aumento na produção de ramnolipídeos, bem como compreender os mecanismos de resposta do microrganismo à condição de estresse oxidativo por meio de sua expressão protéica.

O entendimento do metabolismo da produção de ramnolípídeo poderá ainda ser utilizado como base para a escolha de alvos futuros de modificação genética, visando aumentar a produção de ramnolípídeos por *P. aeruginosa* em detrimento de outros fatores de virulência.

2.4. ESTRESSE OXIDATIVO

Em microrganismos aeróbios, o processo respiratório leva a uma inevitável liberação de elétrons para enzimas redutoras de oxigênio, formando espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH^\cdot). Apesar de EROs serem produzidas como subproduto do metabolismo aeróbio normal, sua produção pode ser exacerbada pela exposição a certos ambientes e seu acúmulo pode resultar na carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, degradação de cofatores, bem como danos ao DNA (IMLAY, 2003; STORZ; IMLAY, 1999).

Células bacterianas rotineiramente expressam múltiplas enzimas dedicadas à detoxificação do H_2O_2 , bem como outras EROs. A onipresença de catalases, peroxidases e superóxido dismutases (SOD)/ redutases indicam a forte pressão seletiva exercida pelas EROs, mesmo para aqueles organismos que são normalmente encontrados em microaerofilia ou mesmo ambientes anaeróbios (IMLAY, 2008). A expressão destas enzimas e outras afins é normalmente regulada por fatores de transcrição específicos para resposta ao estresse oxidativo e os dois reguladores transcricionais mais bem caracterizados em bactérias são a OxyR de *Escherichia coli* e a PerR de *Bacillus subtilis*. Genes ortólogos de um (e, raramente, de ambos) destes reguladores transcricionais são encontrados na maioria das bactérias e medeiam a resposta adaptativa aos peróxidos (FAULKNER; HELMANN, 2011).

A Figura 2.5 apresenta o mecanismo geral bacteriano de proteção contra o estresse oxidativo, tomando como exemplo o estresse por H_2O_2 . Para detoxificar o H_2O_2 , muitas bactérias aumentam a expressão de peroxidases e catalases (representado por (A) na Figura 2.5). O H_2O_2 reage rapidamente com o ferro, gerando íons ferro oxidados e radicais hidroxil os quais podem, subsequentemente, causar danos ao DNA e oxidar proteínas (representado na Figura 2.5 por (B)) (FAULKNER; HELMANN, 2011).

Como proteção aos mecanismos tóxicos descritos acima, bactérias podem reduzir os níveis de ferro intracelular e sequestrar os íons ferro por meio da regulação positiva de Dps (evento (C) na Figura 2.5). Dps é uma proteína ligadora de DNA muito abundante na fase estacionária de crescimento, induzida por estresse oxidativo e nutricional. A proteína também

apresenta função ligadora de ferro, através de um mecanismo bastante semelhante àquele observado nas ferritinas (ZHAO et al., 2002).

Por fim, bactérias também podem aumentar os níveis intracelulares de Mn(II) e/ ou Zn (II), de tal modo que possam competitivamente inibir as reações danosas catalisadas por Fe(II) e H_2O_2 (eventos representados por (D) e (E) na Figura 2.5) (FAULKNER; HELMANN, 2011).

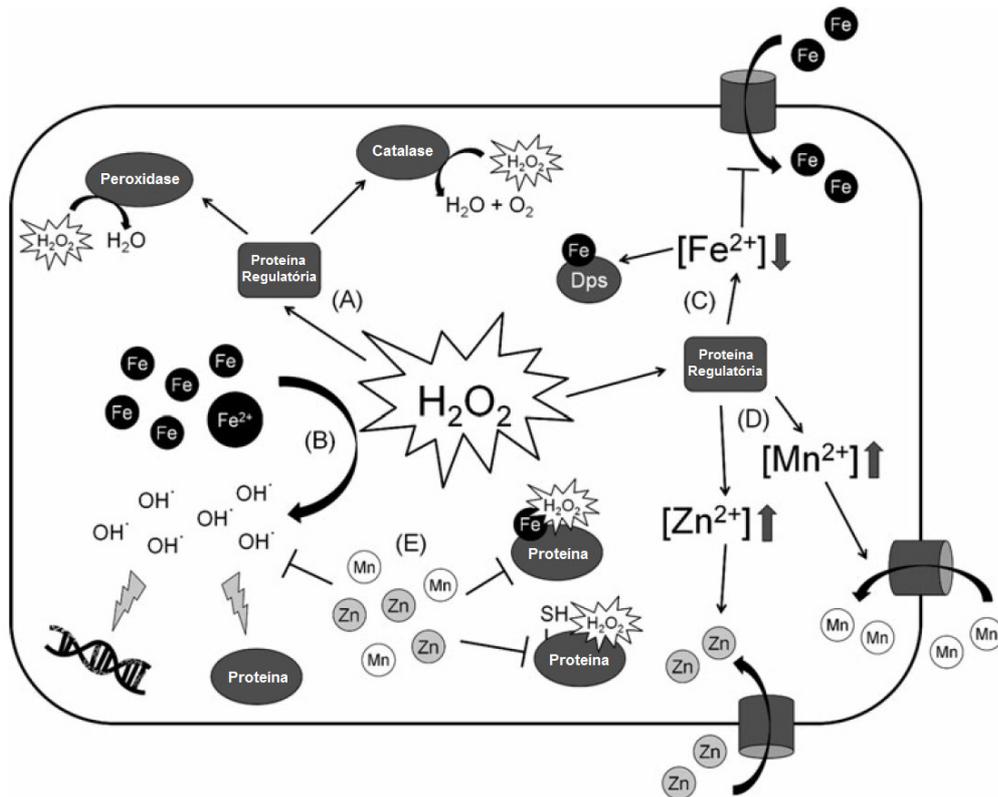


Figura 2.5 – Mecanismo geral de proteção bacteriana contra o estresse oxidativo (FAULKNER; HELMANN, 2011)

2.4.1. Mecanismos de resposta ao estresse oxidativo por *P. aeruginosa*

P. aeruginosa responde ao acúmulo de EROs tipicamente por meio da expressão de superóxido dismutases (SOD), catalases, peroxidases e estudos sugerem que ramnolipídeos também apresentam papel de proteção contra o estresse oxidativo (SABRA et al., 2002; VINCKX et al., 2010). Várias proteínas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo já foram identificadas, algumas delas induzidas por tratamento com oxidantes. Genes como *katB*, *ahpB*, e *ahpC*, por exemplo, que codificam para catalase e alquilhidroperóxido redutases, tiveram sua expressão estimulada pelo regulador transcricional OxyR em resposta ao estresse por diferentes oxidantes (OCHSNER et al., 2000). De um modo semelhante, mutantes para *oxyR*

foram incapazes de apresentar motilidade por *swarming* em placas com agar, provavelmente como consequência da ausência de produção de ramnolipídeos (VINCKX et al., 2010), demonstrando haver interseções entre as vias metabólicas de estímulo à produção de ramnolipídeos e as vias de resposta ao estresse oxidativo.

Além de OxyR, outras proteínas regulatórias relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo já foram identificadas, embora seus mecanismos de ação ainda não estejam completamente elucidados. Por exemplo, dados obtidos por Kobayashi e Tagawa (2004) sugerem que a proteína SoxR presente em *P. aeruginosa*, homóloga à existente em *E. coli*, desempenha várias funções reguladoras, além de seu papel protetor contra o estresse oxidativo. No entanto, apesar de a função protetora da SoxR de *E. coli* estar diretamente relacionada com a regulação da síntese de uma outra proteína, chamada SoxS, esta proteína não se encontra presente no genoma de *P. aeruginosa*. Isto sugere que a via utilizada de resposta ao estresse oxidativo por *P. aeruginosa* ocorre de forma distinta do modelo estabelecido para *E. coli*, a qual necessita ser mais bem investigada (PALMA et al., 2005).

Outro regulador da resposta ao estresse oxidativo presente em *P. aeruginosa* é RpoS, ou fator sigma S, o qual é característico da fase estacionária de crescimento (CHIANG; SCHELLHORN, 2012). Choi e colaboradores (2011), ao desenvolver estudos com diferentes cepas mutantes a fim de acompanhar a produção de ramnolipídeos e ácido poli-hidroxi-alcanóico (PHA) por *P. aeruginosa*, verificaram que a produção de ramnolipídeos reduziu para menos de 40% em mutantes *rpoS*, quando comparado com cepas selvagens mantidas em frutose como fonte de carbono. Este resultado demonstra que a diminuição da produção de ramnolipídeos pode ter sido afetada pela baixa expressão de RhlAB (MEDINA; JUÁREZ; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2003), o que indica uma relação genética entre a produção de ramnolipídeos e a adaptação ao estresse oxidativo.

No que diz respeito a estudos de secreção de proteínas de resposta ao estresse oxidativo, Fernandes (2010) não observou diferenças significativas na atividade de Mn-SOD e Fe-SOD em culturas de *P. aeruginosa* PA1 submetidas a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. No entanto, foi verificado que o nível de carbonilação de proteínas aumentava consideravelmente em células mantidas sobre o referido estresse. Este resultado demonstra que, nas concentrações utilizadas, o peróxido de hidrogênio foi capaz de causar alterações fisiológicas neste microrganismo por vias que ainda não foram completamente elucidadas (PACHECO et al., 2012).

2.5. PROTEÔMICA

Proteoma é o conjunto de proteínas expressas em um dado momento por uma célula, tecido ou organismo, em determinada condição fisiológica e/ ou ambiental. Pode ser visto como uma abordagem experimental para explicar as informações contidas nas seqüências genômicas em termos de estrutura, função e controle do processo biológico (PANDEY; MANN, 2000).

Os avanços nas técnicas de seqüenciamento genômico e química de proteínas em larga escala, nos anos 1980 e 90, possibilitaram a integração entre as informações contidas na estrutura e função de proteínas isoladas e os genes que as codificam. No entanto, em comparação com os ácidos nucléicos correspondentes, a complexidade experimental da proteômica pode chegar a algumas ordens de grandeza a mais, tendo em vista a possibilidade de *splicing* de RNA e processamento e modificação protéica pós-traducional. Deste modo, a análise proteômica é conceitualmente atrativa devido ao seu potencial em determinar propriedades dos sistemas biológicos que não estão aparentes na análise das sequências de DNA e mRNA isoladamente. Estas propriedades incluem a quantidade de proteína expressa, eventuais modificações e a associação com ligantes (GYGI et al., 1999).

A utilização de técnicas proteômicas tem sido observada em diferentes áreas científicas, algumas delas com aplicações potencialmente práticas imediatas, tais como o desenvolvimento de biomarcadores para doenças, descoberta de novos alvos terapêuticos (DHAMOON; KOHN; AZAD, 2007), bem como a identificação de proteínas que poderão ser futuros alvos para a indústria biotecnológica (HAN et al., 2010).

2.5.1. Aplicações biotecnológicas de técnicas proteômicas

O papel da biotecnologia tem se tornado cada vez mais relevante em diferentes setores industriais e a produção biotecnológica de produtos de pequeno volume e alto valor é justificada economicamente. No entanto, sua produção requer o desenvolvimento de processos de baixo custo e maior rendimento, o que inclui a utilização de estratégias de engenharia metabólica e a melhoria de microrganismos por meio de estratégias moleculares. Na maior parte das vezes, entretanto, tais tentativas se limitam à manipulação de apenas poucos genes que codificam enzimas e proteínas regulatórias utilizando as informações já disponíveis (LEE; LEE; KIM, 2005).

Recentes avanços em técnicas de alto rendimento experimental suportadas pela bioinformática (genômica¹, transcriptômica², proteômica³, metabolômica⁴) resultaram no rápido acúmulo de uma vasta gama de dados, proporcionando assim uma base para compreensão aprofundada dos processos biológicos (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003). Embora nossa capacidade de analisar estes dados de maneira integrada seja atualmente limitada, as informações obtidas pelas abordagens “ômicas”, juntamente com observações experimentais *in vivo* e previsões *in silico* de modelagem e simulação estão fornecendo soluções para decifrar as funções e características dos sistemas biológicos, conforme esquematizado na Figura 2.6. Estas simulações *in silico* elevariam a nossa capacidade de compreender e prever o comportamento de microrganismos sob diferentes perturbações como, por exemplo, modificações genéticas ou mudanças ambientais, em uma escala global. Além disso, as observações experimentais poderiam ser comparadas com as previsões obtidas computacionalmente para validar a hipótese de trabalho, de tal modo que modelos computacionais e delineamentos experimentais podem ser continuamente modificados, dentro do contexto do sistema metabólico, a fim de facilitar o desenvolvimento de cepas produtivas o suficiente para serem adequadas a aplicações industriais (LEE et al., 2005).

¹ Genômica: Área da ciência responsável pela caracterização da informação genética de um organismo.

² Transcriptômica: Área responsável pela caracterização dos mRNAs transcritos a partir do genoma de uma célula.

³ Proteômica: Área da Bioquímica que estuda o perfil de proteínas expressas por uma célula, tecido ou sistema biológico em um determinado momento.

⁴ Metabolômica: Estuda o conjunto de metabólitos presentes em uma célula, tecido ou sistema biológico em determinadas condições.

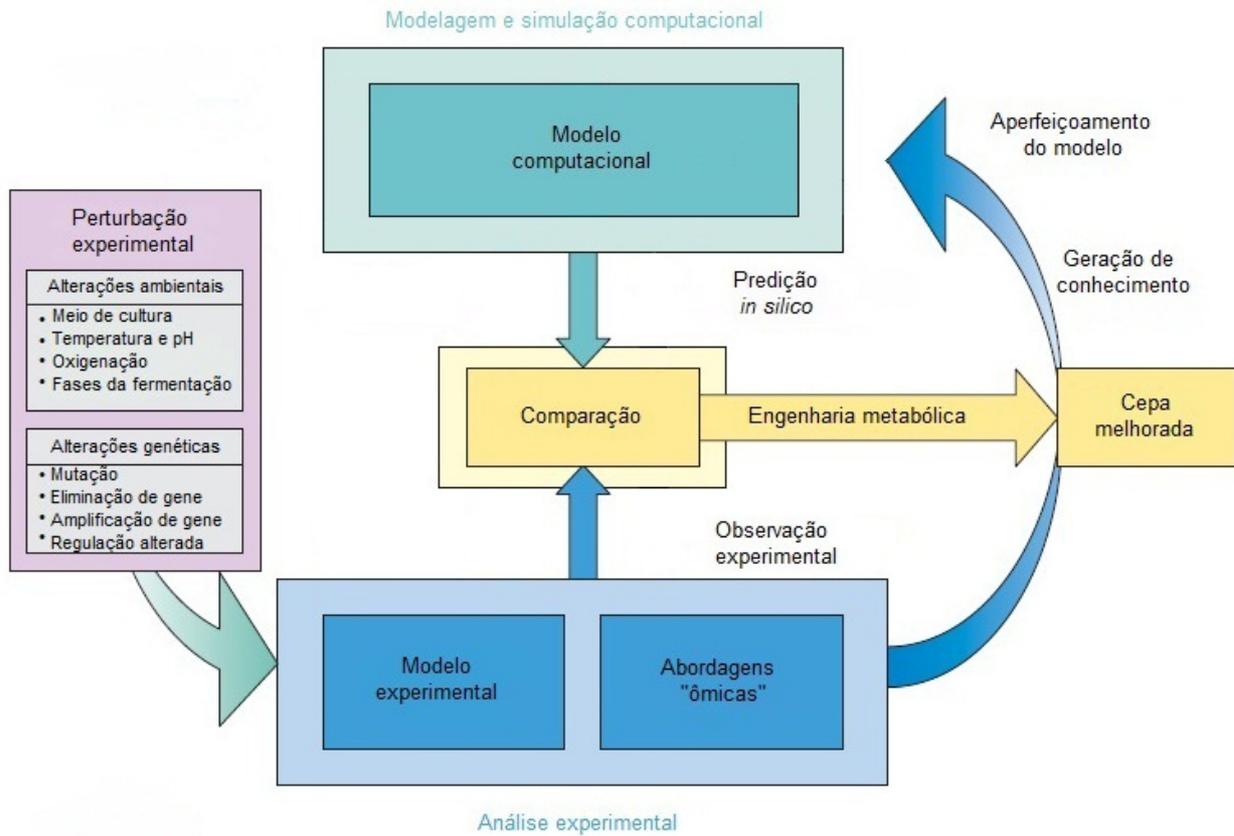


Figura 2.6 - Esquema geral do ciclo de pesquisa em sistemas biotecnológicos (Adaptado de Lee et al. (2005))

No que diz respeito às técnicas proteômicas, suas aplicações têm se mostrado presentes em uma grande variedade de pesquisas, tanto em microbiologia básica quanto aplicada. Em contraste com estudos de bioquímica convencionais, que se concentram em uma única proteína ou complexo macromolecular, estudos proteômicos têm uma abordagem mais abrangente e sistemática à investigação dos sistemas biológicos (HAN et al., 2010).

Os avanços em tecnologias proteômicas têm levado à criação de grandes bancos de dados, permitindo o acesso a informações valiosas que levam à melhor compreensão de dinâmicas metabólicas, redes de sinalização e regulação, e auxiliam na compreensão de alterações fisiológicas. Por permitir identificar alterações na síntese de proteínas, modificações pós-traducionais e interações protéicas, estudos proteômicos podem levar a uma maior compreensão dos fenômenos fisiológicos para uma condição específica. Além disso, podem ser usados para descobrir novos alvos (tipicamente genes ou proteínas) que levam ao aumento da produtividade de bioprocessos, utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Tais proteínas podem ser, inclusive, ainda mais importantes que as proteínas e genes já conhecidos e envolvidos na biossíntese de determinado produto (HAN et al., 2010).

O estudo proteômico mais comumente observado na literatura visando aplicações biotecnológicas é a proteômica diferencial de amostras celulares obtidas em duas ou mais condições experimentais, a fim de analisar as respostas a estresse ou estímulos ambientais. Estes estudos podem determinar proteínas específicas que são mais ou menos abundantes em resposta a vários estresses químicos e físicos, tais como calor (ROSEN; RON, 2002), agentes oxidativos (WOLF et al., 2008) e choque hiperosmótico (HÖPER; BERNHARDT; HECKER, 2006). Uma vez identificadas estas proteínas, os alvos comumente considerados mais promissores para estudos biotecnológicos de otimização têm sido os promotores, chaperonas, enzimas envolvidas em vias regulatórias e metabólicas, proteínas relacionadas com o aumento da solubilidade de moléculas de interesse biotecnológico e proteínas de membrana envolvidas na liberação extracelular destas moléculas (HAN et al., 2010).

2.5.2. Proteômica em *Pseudomonas aeruginosa*

Apesar de o gênero *Pseudomonas* ser extensivamente estudado devido à sua grande versatilidade ambiental, capacidade de decomposição e biodegradação de contaminantes, sua abordagem proteômica com fins biotecnológicos ainda é bastante restrita. Dentre os estudos já desenvolvidos, a maior parte tem sido voltada para a caracterização fisiológica da capacidade de degradação de compostos tóxicos, formação de biofilmes e flexibilidade metabólica, sobretudo pela espécie *Pseudomonas putida* (LOH; CAO, 2008).

No que diz respeito à abordagem proteômica em *P. aeruginosa*, os estudos realizados estão voltados predominantemente aos interesses clínicos, muitos deles visando o entendimento do sistema *quorum sensing* nesta bactéria (GUINA et al., 2003; HARE et al., 2011). Apesar disso, os resultados obtidos têm contribuído, indiretamente, para a compreensão da produção de ramnolipídeos sob o ponto de vista biotecnológico.

Proteínas relacionadas com a biossíntese de ramnolipídeos, por exemplo, já foram identificadas em análises proteômicas com objetivos clínicos, por meio de experimentos conduzidos em meios de cultivo com diferentes teores de magnésio. A proteína RhlB apresentou redução de expressão na presença deste íon que, sabidamente, induz a expressão de vários fatores de virulência por *P. aeruginosa* (GUINA et al., 2003). Este mesmo fenômeno já havia sido observado por outros pesquisadores em estudos anteriores (GUERRA-SANTOS et al., 1986; VENKATA RAMANA; KARANTH, 1989).

Em outro estudo, (DAMRON et al., 2012) utilizou técnicas proteômicas para analisar proteínas diferencialmente expressas em cepas de *P. aeruginosa* mutantes para o sensor quinase

KinB e o fator sigma RpoN. Apesar de estudos anteriores demonstrarem que *rhlAB* e *rhlI* são dependentes de RpoN, os autores demonstraram que duplos mutantes para RpoN e KinB tiveram a produção de ramnolipídeos aumentada, demonstrando haver uma relação entre KinB e RpoN na regulação do sistema QS.

Aparentemente, o único estudo proteômico diretamente relacionado ao entendimento da produção de ramnolipídeos do ponto de vista tecnológico foi realizado por Reis e colaboradores (2010). Neste trabalho, foram identificadas 21 proteínas diferencialmente expressas por *P. aeruginosa* PA1, durante a produção de ramnolipídeos, em condições de cultivo com fontes de carbono e nitrogênio distintas. As proteínas identificadas estão envolvidas com mecanismos de secreção, *quorum sensing*, resposta a estresse oxidativo e metabolismo.

Neste contexto, o presente trabalho se constitui em um fim inovador e promissor, visto que a análise proteômica possibilita o acesso a um grande e variado número de proteínas ao mesmo tempo. Trata-se do primeiro trabalho a utilizar técnicas proteômicas para identificar proteínas envolvidas com o estresse oxidativo em *P. aeruginosa*, em biorreator operando com oxigenação não dispersiva, visando à maior produção de ramnolipídeos e redução de fatores de virulência.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de proteínas por *P. aeruginosa* PA1 durante a produção de biossurfactantes em condições de estresse oxidativo em frascos agitados e em biorreator acoplado a contactores de membrana.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão protéica de *P. aeruginosa* PA1 submetida a condições de estresse oxidativo em frascos agitados, mediante a adição de peróxido de hidrogênio;

Acompanhar a cinética da produção de ramnolipídeos em biorreatores acoplados a contactores de membrana utilizando diferentes concentrações de oxigênio dissolvido;

Avaliar a expressão protéica e produção de fatores de virulência por *P. aeruginosa* PA1 submetida a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator;

Propor mecanismos e investigar a relação entre o estresse oxidativo e a produção de biossurfactantes por esta cepa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

4.1.1. Manutenção do microrganismo, preparo do pré-inóculo e do inóculo

P. aeruginosa PA1, obtida da coleção de microrganismos do Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES – PETROBRAS) (SANTA ANNA et al., 2001), foi preservada em criotubos contendo glicerol 10% v/v a -80°C. O conteúdo do criotubo foi transferido para frascos de 1000 mL com 300 mL de meio contendo (g/L): NaNO₃ 1,0; KH₂PO₄ 3,0; K₂HPO₄ 7,0; MgSO₄.7H₂O 0,2 ; extrato de levedura 5,0; peptona 5,0 e glicerol 30,0. Após 40 horas de cultivo, o meio contendo as células foi estocado em criotubos na relação glicerol/meio fermentado de 1:3 para servir como pré-inóculo padrão em todas as fermentações (SANTOS et al., 2002).

O conteúdo do criotubo foi inoculado em 300 mL de meio com a composição anteriormente apresentada. Os frascos foram incubados a 30°C, 170 rpm por 40 h. Ao final desse período, as células de cada frasco foram recuperadas por centrifugação (5000 g por 20 min) e utilizadas como inóculo nos experimentos conduzidos em frascos agitados. Para os experimentos conduzidos em biorreator, uma alíquota de 45 mL do meio de cultivo contendo células foi utilizada como inóculo, representando aproximadamente 1,5% do volume útil do biorreator, sendo eliminada a etapa de centrifugação.

4.1.2. Fermentações conduzidas em frascos agitados

Foram conduzidas fermentações em frascos agitados de 1000 mL contendo 300 mL de meio, incubados em agitadores rotatórios a 30°C e 170 rpm. O meio de cultura utilizado apresentava a seguinte composição (g/L): glicerol 30,0; NaNO₃ 1,4; K₂HPO₄ 7,0; KH₂PO₄ 3,0 e MgSO₄.7H₂O 0,2, resultando em uma relação carbono/nitrogênio igual a 60 mol/ mol (SANTOS et al., 2002).

A exposição de *P. aeruginosa* PA1 ao estresse oxidativo, em frascos agitados, foi realizada por meio de tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM por 1 h a 30°C, 170 rpm e amostras de células foram coletadas nas fases exponencial (10 h) e estacionária de crescimento (36 h) para serem submetidas à análise proteômica.

4.1.3. Fermentações conduzidas em biorreator

As fermentações foram realizadas em um biorreator BioFlo IIc (Batch/Continuous Fermentor; New Brunswick Scientific; USA) com capacidade nominal de 5,0 L e volume útil médio de 3,0 L (Figura 4.1). A temperatura foi mantida em 30 °C e a agitação em 150 rpm. A oxigenação foi conduzida de forma não dispersiva através de um contactor gás/líquido, com o auxílio de um cilindro de oxigênio puro (KRONEMBERGER et al., 2008). As condições de oxigenação utilizadas foram de 1, 4 e 6 mg O₂/L e o meio de cultura utilizado nas fermentações conduzidas em biorreator apresentava a mesma composição descrita para os experimentos realizados em frascos agitados. No entanto, a fim de acelerar a taxa de crescimento foi feita a adição de 2 g/L de extrato de levedura ao meio de cultivo do biorreator.



Figura 4.1 - Fermentador inserido na capela de exaustão acoplado ao sistema de oxigenação utilizando o contactor de membranas

4.1.4. Esterilização

O fermentador e os frascos contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min antes de cada produção. O sistema de oxigenação foi esterilizado com a circulação de uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 h. Depois deste procedimento, foi circulada água destilada estéril pelo sistema para a eliminação de vestígios de cloro, para então os microrganismos serem inoculados (KRONEMBERGER et al., 2008).

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1. Determinação da concentração de células

A concentração celular das suspensões de *P. aeruginosa* PA1 foi determinada através da absorvância de luz a 600 nm. O valor de absorvância foi convertido no valor de concentração (g/L) por meio de uma curva de calibração, de onde se obteve o fator de conversão de absorvância em concentração igual a 0,39 g/L (KRONEMBERGER et al., 2008).

4.2.2. Quantificação de glicerol

O teor de glicerol foi avaliado pelo método enzimático-colorimétrico para a determinação de triglicerídeos GPO (Triglicerídeo GPO – Liquid Stable; Laborlab). O método consiste na fosforilação de glicerol a glicerol-3-fosfato em presença de glicerol quinase e ATP. O glicerol-3-fosfato é então oxidado pela glicerol-3-fosfato oxidase, liberando peróxido de hidrogênio que, na presença de aminoantipirina, p-clorofenol e peroxidase, dá origem a um composto de cor cereja. A intensidade dessa coloração pode ser determinada pela medida de absorvância a 505 nm e é proporcional à concentração de glicerol, podendo assim ser comparada a um padrão.

4.2.3. Quantificação de ramnolipídeos

A quantificação de ramnolipídeo foi realizada de forma indireta, pela concentração de ramnose (um subproduto da hidrólise ácida dos ramnolipídeos). Foi utilizada uma adaptação do método descrito por Pham e colaboradores (2004), onde a etapa de extração dos ramnolipídeos foi suprimida, sendo o ensaio realizado diretamente a partir do meio fermentado livre de células, já que o biossurfactante é um produto extracelular. Para a determinação da concentração de ramnose presente na amostra, o valor de absorvância obtido foi comparado com o valor obtido na dosagem de uma solução padrão de ramnose. Foi utilizado fator de 2,23 (100,0 g de ramnolipídeos/44,89 g de ramnose) para a conversão de concentração de ramnose em concentração total de ramnolipídeos (KRONEMBERGER et al., 2008).

4.2.4. Quantificação de nitrato

A concentração do nitrato foi determinada através da reação colorimétrica desse íon com sulfato de brucina. Dois mililitros de solução de sulfato de brucina a 0,6 g/L em ácido sulfúrico 80% foram adicionados em 0,5 mL de amostra sem células. A reação foi conduzida a 100 °C por 15 minutos, sendo então paralisada por resfriamento em banho de gelo. Os valores de absorvância foram lidos para um comprimento de onda de 410 nm e convertidos para valores em mg/L com o uso de uma curva de calibração (ACS Committee on Analytical Reagents, 2006).

4.2.5. Determinação da atividade elastásica

Para a dosagem de elastases nas amostras livre de células foi utilizado um teste baseado na degradação de uma elastina ligada ao Vermelho do Congo. A degradação deste substrato libera no meio este corante, permitindo a avaliação da atividade (BRAGA; MESSIAS; VENCOVSKY, 1994). O substrato foi preparado a partir de uma suspensão de elastina-Vermelho do Congo (1 mg/ mL) em tampão Tris/ HCl 0,05 M, pH 8. Para o ensaio, 125 µL do sobrenadante da fermentação foi adicionado a 1 mL da suspensão, a mistura foi incubada a 37°C por 24 h e depois centrifugada a 5000 g/ 10 min. Foi medida a absorvância do sobrenadante a 495 nm. Como controle foi utilizado o sobrenadante fervido por 10 min, e como branco foi utilizado tampão. A atividade foi determinada pela equação:

$$A = [(\Delta Abs_a - \Delta abs_{ctrl}) / V_a \times \Delta t] \times 1000$$

Onde: A = atividade (U/L);

Abs_a = absorvância da amostra;

Abs_{ctrl} = absorvância do controle da reação;

Δt = tempo de reação (min);

V_a = volume de amostra (mL).

A unidade de atividade elastásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de uma unidade na absorvância entre a amostra e seu branco, por minuto, nas condições do ensaio (PACHECO et al., 2012).

4.2.6. Determinação da atividade de proteases alcalinas

A atividade proteolítica nas amostras livre de células foi medida através da hidrólise de azocaseína pelo meio de cultura livre de células (CHARNEY; TOMARELLI, 1947). Para o ensaio, 0,5 mL do sobrenadante da fermentação foram adicionados a 0,5 mL de uma solução de azocaseína 0,05 g/mL em tampão Tris/HCl (0,05 M, pH 9). A mistura foi mantida em banho a 37°C e três alíquotas de 0,5 mL do meio reacional foram retiradas em 5, 10 e 15 min. A reação foi interrompida pela adição de TCA 10% gelado e a mistura foi centrifugada a 5000 g/ 15min. Para dosagem, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,5 mL de KOH 5 N e a leitura da absorvância foi feita a 428 nm. Para preparação do branco, adicionou-se ao sobrenadante da fermentação, o TCA e depois a solução de azocaseína. A atividade foi determinada pela equação:

$$A = (\Delta Abs_a / V_a \times \Delta t) \times 1000$$

Onde: A = atividade (U/L);

Abs_a = absorvância da amostra;

Δt = tempo de reação (min);

V_a = volume de amostra (mL)

A unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de uma unidade na absorvância entre a amostra e seu branco, por minuto, nas condições do ensaio (PACHECO et al., 2012).

4.2.7. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, com base na concentração de malondialdeído (MDA) decorrente da peroxidação lipídica. Foram recolhidas 50 mg de células do meio fermentado, nas fases exponencial e estacionária de crescimento. As células foram centrifugadas, lavadas com água destilada e ressuspensas em 500 μL de TCA 10%. Foram adicionadas 1,5g de pérolas de vidro e as células foram rompidas intercalando 15 ciclos de agitação em vórtex (25 s) e repouso em gelo, seguido de 30 ciclos intercalando sonicação (225 W; 25 s) e incubação em gelo. O rompimento celular foi confirmado por visualização ao microscópio com aumento de 100 vezes. O extrato foi recolhido em tubos e as pérolas de vidro lavadas com TCA 10%, sendo recolhidos no mesmo eppendorf. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm, o sobrenadante coletado e utilizado para as

análises. O ensaio foi realizado com a mistura contendo o extrato celular, água, EDTA 0,1 M e ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05 M. Como branco foi utilizada água. A mistura foi incubada a 100°C por 15 min, os tubos resfriados e a absorvância medida a 532 nm. As dosagens foram feitas em triplicata e os resultados expressos em pmol de MDA (produto da peroxidação lipídica) por mg de célula (modificado de Steels et al.(1994)).

4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

As condições utilizadas para a análise proteômica de amostras protéicas intracelulares foram baseadas na padronização realizada anteriormente por nosso grupo (REIS et al., 2010), as quais seguem descritas a seguir.

4.3.1. Extração de proteínas intracelulares

Para a análise proteômica de géis 2DE com faixa de pH 4-7, 40 mg de células provenientes das fases exponencial e estacionária de crescimento foram centrifugadas a 6000 g por 15 min, lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e mantidas a -80°C para posterior análise. Para os experimentos realizados em frascos agitados, as amostras foram retiradas após 10h e 36h de fermentação, que correspondem à fase exponencial e estacionária, respectivamente. Para os experimentos realizados em biorreator, as amostras foram coletadas após 20 h (fase exponencial), 72 h e 120 h (fase estacionária). A faixa de pH 4-7 foi utilizada por ter sido identificada por Reis e colaboradores (2010) como aquela onde se encontra uma maior abundância de spots.

Para cada amostra foram utilizados 4 mL de tampão de extração, contendo uréia 8 M, tiouréia 1 M, CHAPS 4% m/v, triton X-100 0,5% v/v, IPG 1% v/v e DTT 60 mM (REIS et al., 2010). As amostras foram transferidas para criotubos de 5 mL e submetidas a métodos físicos de extração: 5 ciclos alternando em sonicador e gelo (10 s, 225 W), seguido de 15 ciclos alternando nitrogênio líquido, por 30 s, e banho a 37°C, por 2 min. Após estes procedimentos as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 min, e os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80 °C para posterior análise (REIS et al., 2010).

4.3.2. Dosagem de proteínas

As concentrações protéicas das amostras foram determinadas utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. Neste processo ocorreu a ligação específica de íons cobre às proteínas do extrato e o cobre não ligado foi medido através de um agente colorimétrico por leitura em espectrofotômetro a 480 nm. A concentração foi estimada ao comparar os valores lidos com a curva padrão de soroalbumina bovina (BSA). A absorvância lida no espectrofotômetro foi, portanto, inversamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

4.3.3. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA)

Após a extração de proteínas, as amostras contendo 750 µg de proteínas foram precipitadas com TCA 10 % m/v. Para cada 1 mL de amostra, foram adicionados 278 µL de TCA 50% m/v, 139 µL de Triton X-100 1% v/v e as misturas foram incubadas no gelo por 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 min. Por fim, os sedimentados foram lavados duas vezes com 500 µL de acetona gelada e secados ao ar livre (STONE et al., 1989).

4.3.4. Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE)

As amostras previamente precipitadas foram solubilizadas por 15 h em 350 µL de solução contendo uréia 8 M, CHAPS 2% m/v, tris 10 mM, DTT 60 mM, IPG 1% e azul de bromofenol 0,002%, para posteriormente serem submetidas à eletroforese bidimensional (2D-PAGE) (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004). Esta técnica tem por fim a separação de proteínas que diferem entre si quanto ao ponto isoelétrico e/ ou peso molecular.

As amostras solubilizadas foram submetidas à focalização isoelétrica (primeira dimensão) utilizando fitas de focalização IPG de 18 cm, com intervalo linear de pH entre 4 e 7. As fitas de IPG foram reidratadas a 20°C por 12 h, a 30 volts, na solução de reidratação contendo a amostra. As condições elétricas da primeira dimensão no sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) foram: 200 volts por 1h, 500 volts por 1 h, 1.000 volts por 1 h, 1.000-8.000 volts em 0,5 h e 8.000 volts por 65.000 vhr. Após a focalização isoelétrica, as fitas foram incubadas por 15 min, com agitação, em 10 mL de solução de equilíbrio (tris-HCl 1,5 M pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30%

v/v, SDS 2% m/v e azul de bromofenol 0,002% m/v) contendo, sucessiva e alternativamente, 100 mg de DTT e 400 mg de iodoacetamida.

A segunda dimensão foi feita em gel de poliacrilamida 12% com SDS (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema *Ettan DaltSix* (GE Helthcare). As fitas foram posicionadas sobre o gel de poliacrilamida e o sistema foi selado com agarose. No reservatório inferior da cuba, foi utilizado tampão de eletrodo tris-glicina 1,5 M, pH 8,8, acrescido de 0,4% m/v de SDS; no reservatório superior foi usado este mesmo tampão de eletrodo 2 vezes concentrado. As condições elétricas utilizadas foram 2,5 W/gel por 30 min e 100 W constantes até o final da corrida.

4.3.5. Coloração por Coomassie Coloidal e Análise de Imagem dos Géis

Os géis foram fixados em etanol 30% v/v e ácido fosfórico 2% v/v em água, por 3 vezes durante 30 min, sob agitação. Após a fixação, os géis foram lavados com ácido fosfórico 2% v/v em água, por 3 vezes, durante 20 min. Em seguida, foram incubados por 30 min em uma solução contendo ácido fosfórico 2% v/v, etanol 18% v/v, sulfato de amônio 15% m/v em água. Após este tempo, foram adicionados a cada gel 1% v/v de uma solução contendo 20 g/L de azul de Coomassie G-250. Os géis permaneceram nesta solução por 72 h, sob agitação moderada, e a solução corante foi retirada, sendo adicionado aos géis ácido acético 1 % v/v em água. Para cada gel foram utilizados 500 mL de cada solução (RABILLOUD; CHARMONT, 2000).

As imagens escaneadas dos géis foram comparadas pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). As diferenças no volume absoluto entre os spots equivalentes dos grupos experimentais foram avaliadas quanto à significância estatística. Para as amostras submetidas ao estresse oxidativo pela adição de H₂O₂ em frascos agitados, a análise estatística foi realizada a partir de três replicatas biológicas para cada condição. Nos experimentos conduzidos em biorreator, foram utilizadas na análise estatística cinco replicatas biológicas de amostras coletadas nas fases exponencial (20 h) e estacionária (72 h) de crescimento, e três replicatas biológicas das amostras coletadas após 120 h de fermentação. Spots significativamente diferentes entre as condições experimentais (p-valor < 0,01, teste ANOVA) foram retirados e tripsinizados conforme descrito a seguir.

4.3.6. Tripsinização em Gel de Poliacrilamida

As cadeias polipeptídicas reveladas como spots diferencialmente expressos nos géis de eletroforese bidimensional foram tripsinizados utilizando o sistema *MultiScreen vacuum manifold* (Millipore), em uma capela de fluxo laminar, seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. Os spots foram cortados, os pedaços de gel colocados na placa de *ZipPlate* com 96 poços e incubados com: 1) solução de bicarbonato de amônio 25 mM /acetonitrila 5% v/v, por 30 min, e duas vezes com solução de bicarbonato de amônio 25 mM /acetonitrila 50% v/v, por 30 min (descoloração); 2) acetonitrila 100% v/v, por 10 min (desidratação); 3) tampão de digestão bicarbonato de amônio 25 mM, contendo 10 µL de tripsina (100 ng). A placa foi incubada em banho a 37°C por 16-20 horas (digestão). Após estas incubações, a resina C18 presente no fundo de cada poço da placa foi ativada pela adição de 10 µL de acetonitrila 100% v/v, por 15 min a 37°C. Os poços foram então lavados três vezes com ácido fórmico 1% v/v e os peptídeos extraídos dos pedaços de gel pela incubação com ácido fórmico 1% v/v em metanol 60% v/v, por duas vezes. As soluções dos peptídeos extraídos foram concentradas no *SpeedVac*, ressuspensas em 3 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e armazenadas no freezer a -20°C para posterior análise por espectrometria de massas (REIS, 2008).

4.3.7. Análise por Espectrometria de Massas

As análises dos peptídeos obtidos por meio de digestão trípica foram realizadas através do espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF. Para amostras provenientes de fase exponencial em frascos agitados, foi utilizado o modelo ABI 4700. Para as demais amostras foi utilizado o modelo AB 5800, ambos da Applied Biosystems. Um volume de 0,3 µL de cada amostra foi aplicado individualmente na placa de MALDI⁵, seguido da aplicação de 0,3 µL de ácido α-ciano-4-hidroxinâmico (10 mg/mL em acetonitrila 50% v/v / ácido trifluoroacético 0,3% v/v) e secagem à temperatura ambiente. Para as amostras analisadas no espectrômetro modelo ABI 4700, os espectros MS⁶ foram adquiridos no modo positivo com reflectron, utilizando-se 1.250 pulsos de laser por spot. Os oito íons-precursosos mais abundantes foram selecionados

⁵ MALDI: ionização/dessorção de matriz assistida por laser, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*.

⁶ Espectros MS: se refere aos espectros obtidos através do espectrômetro de massas (do inglês *Mass Spectrometry*).

para fragmentação e posterior análise por MS/MS⁷. Para as demais análises, realizadas no modelo AB 5800, os espectros MS1 e MS2 foram adquiridos utilizando 2040 e 2000 pulsos de laser por espectro, respectivamente. Os dez íons-precusores mais abundantes foram selecionados para fragmentação e análise por MS/MS. As massas dos fragmentos das amostras geradas foram submetidas à pesquisa contra o banco de dados não-redundante para bactérias do NCBI (National Center for Biotechnology Information), com o auxílio do programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Inglaterra). Os parâmetros usados na busca foram: duas clivagens de tripsina perdidas e as seguintes modificações variáveis: carbomimetilação de cisteína, oxidação de metionina, fosforilação de treonina, serina ou tirosina e pyro-Glu no N-terminal. Para as amostras analisadas no modelo ABI 4700, os parâmetros utilizados incluem também $\pm 0,8$ Da de erro no modo MS e $\pm 0,6$ Da de erro no modo MS/MS, enquanto para as amostras analisadas no modelo AB 5800 foram utilizados os parâmetros $\pm 0,8$ Da de erro no modo MS e $\pm 0,3$ Da de erro no modo MS/MS. Os resultados da pesquisa de amostras oriundas de frascos agitados foram submetidas ao software *Scaffold 3* (Proteome Software) para compilação, normalização, comparação da contagem dos espectros e atribuir probabilidade. As identificações de proteínas foram realizadas considerando a probabilidade de peptídeos superior a 95%, número de peptídeos identificados superior ou igual a dois e identificação feita em espécies filogeneticamente próximas a *P. aeruginosa*. Resultados da pesquisa de amostras oriundas de biorreator tiveram os dados gerados pela buca no programa MASCOT confirmados manualmente. Os critérios utilizados para identificação da proteína foram o *score* do peptídeo superior a 50, número de peptídeos identificados superior ou igual a três e identificação feita em espécies filogeneticamente próximas a *P. aeruginosa*.

⁷ MS/MS: se refere aos espectros obtidos após clivagem de peptídeos específicos no espectrômetro de massas. Esses peptídeos foram analisados (modo MS), selecionados para fragmentação e nova análise (modo MS/MS).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM FRASCOS AGITADOS

A fermentação em frascos agitados é a forma mais comumente utilizada para a caracterização de parâmetros cinéticos, e o processo de transferência de oxigênio no frasco pode depender fortemente do volume de líquido nele presente (MAIER; LOSEN; BÜCHS, 2004). Recentemente, Fernandes (2010) investigou o efeito da aeração superficial sobre o crescimento celular e a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PA1 em frascos agitados, utilizando diferentes volumes de meio de cultura. Ficou demonstrado neste trabalho que a produtividade volumétrica de ramnolipídeos foi aproximadamente 4 vezes maior em frascos com menor volume de meio de cultura (150 mL e 300 mL de meio, em frascos de 1 L), quando comparados a frascos com maior volume de meio (700 mL) (PACHECO et al., 2012). Estes resultados demonstraram que a aeração superficial é determinante para a produção de ramnolipídeos, o que está de acordo com os resultados obtidos por Kronemberger *et al.* (2008), em experimentos realizados em biorreator, bem como por outros grupos de pesquisa, que sugerem a participação de ramnolipídeos na defesa contra o estresse oxidativo (SABRA et al., 2002).

A Figura 5.1 apresenta a cinética de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PA1 em frascos Erlenmeyer com capacidade de 1 L e volume útil de 300 mL. Nestas condições, é possível observar que a produção de ramnolipídeos é não associada ao crescimento bacteriano e ocorre predominantemente na fase estacionária de crescimento. Sua concentração atingiu 6,7 g/L ao final do cultivo, sendo a produtividade volumétrica igual a $56,7 \pm 9,3$ mg/L.h.

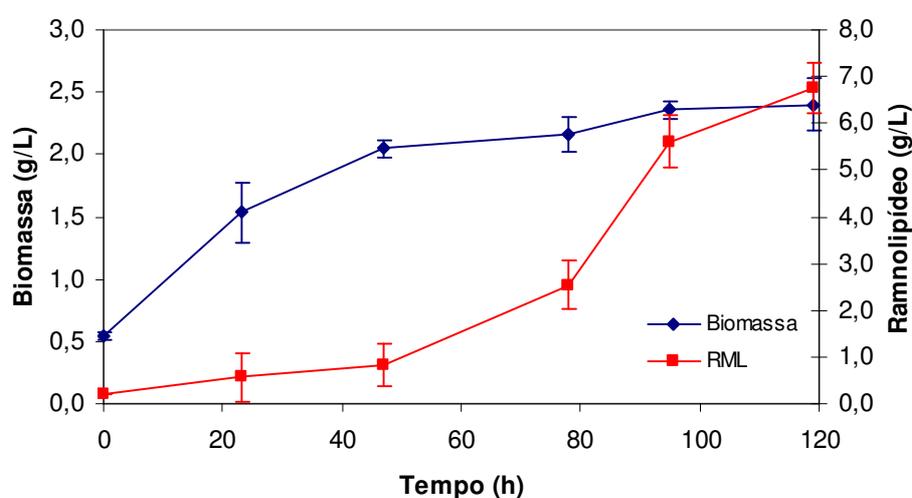


Figura 5.1 – Cinética da produção de ramnolipídeos (RML) em frascos agitados

5.1.1. Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio

A fim de investigar as vias de resposta ao estresse oxidativo apresentadas por *P. aeruginosa* PA1, estudos preliminares foram realizados expondo esta cepa ao peróxido de hidrogênio após 10 h e 36 h de cultivo (fase exponencial e estacionária de crescimento, respectivamente). A Figura 5.2 apresenta o efeito do estresse oxidativo causado pela adição de peróxido de hidrogênio 10 mM, por 1 hora, sobre a peroxidação de lipídeos celulares.

Notam-se níveis de peroxidação lipídica significativamente superiores em frascos tratados com peróxido, quando comparados àqueles não submetidos a tais condições. Este resultado demonstra que a concentração utilizada ocasiona danos decorrentes do estresse oxidativo, ainda que seus efeitos se manifestem de forma branda sobre os lipídeos celulares. Em contrapartida, Fernandes (2010) observou que a carbonilação de proteínas foi aproximadamente 3 vezes mais intensa em frascos tratados com peróxido de hidrogênio, quando comparada aos frascos controle. A viabilidade celular não sofreu alterações significativas, demonstrando que *P. aeruginosa* é capaz de suportar grandes diferenças na oxigenação do meio (PACHECO et al., 2012).

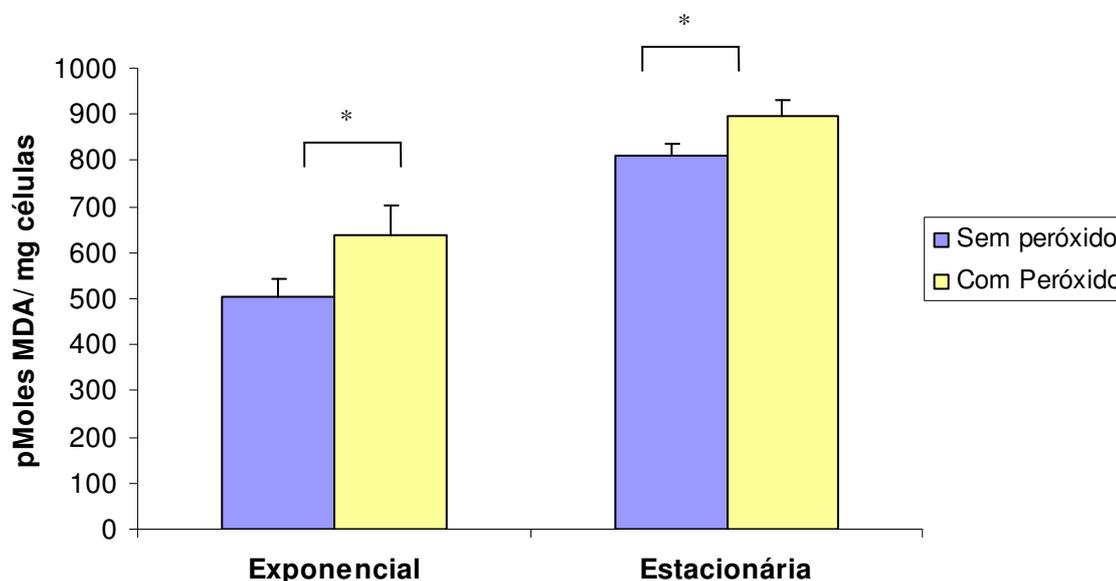


Figura 5.2 - Efeito do estresse oxidativo sobre os níveis de peroxidação lipídica em frascos agitados tratados e não-tratados com peróxido de hidrogênio (* p-valor < 0,05, *t de Student*)

Diversos estudos ressaltam que *P. aeruginosa* é altamente resistente a oxidantes, como o peróxido de hidrogênio e o Paraquat, principalmente devido ao grande número de proteínas de defesa antioxidantes, incluindo SOD, catalases, a proteína de resistência a hidroperóxidos Ohr e

as alquil hidroperóxidos redutases (Ahp) (BROWN et al., 1995; HASSETT; SCHWEIZER; OHMAN, 1995; HEO et al., 2010; OCHSNER et al., 2000). Embora Sabra e colaboradores (2002) tenham sugerido a participação de ramnolipídeos na defesa contra o estresse oxidativo, a relação existente entre a sua produção e as vias já conhecidas de resposta ao estresse permanece desconhecida. Deste modo, estudos que viabilizem o melhor entendimento das vias metabólicas de produção de ramnolipídeo e de resposta ao estresse se tornam necessárias, por meio de técnicas mais refinadas e de caráter molecular, como a proteômica.

5.1.2. Expressão de proteínas em resposta ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio

As amostras de proteínas intracelulares provenientes das fases exponencial e estacionária de crescimento, tratadas ou não com peróxido de hidrogênio, foram analisadas por 2D-PAGE a fim de reconhecer, de forma mais aprofundada, as alterações fisiológicas resultantes da exposição ao estresse oxidativo e sua possível relação com a produção de ramnolipídeos.

As amostras foram solubilizadas e separadas utilizando géis 2DE, no intervalo de pH de 4 a 7, utilizando fitas de focalização de 18 cm. A referida faixa de pH foi identificada por Reis (2008) como aquela onde se concentra a maior parte das proteínas identificadas por esta metodologia.

A Figura 5.3 apresenta um perfil eletroforético bidimensional representativo das condições experimentais testadas, a partir de amostras extraídas independentemente (três replicatas de cada condição), bem como alguns dos spots diferencialmente expressos identificados.

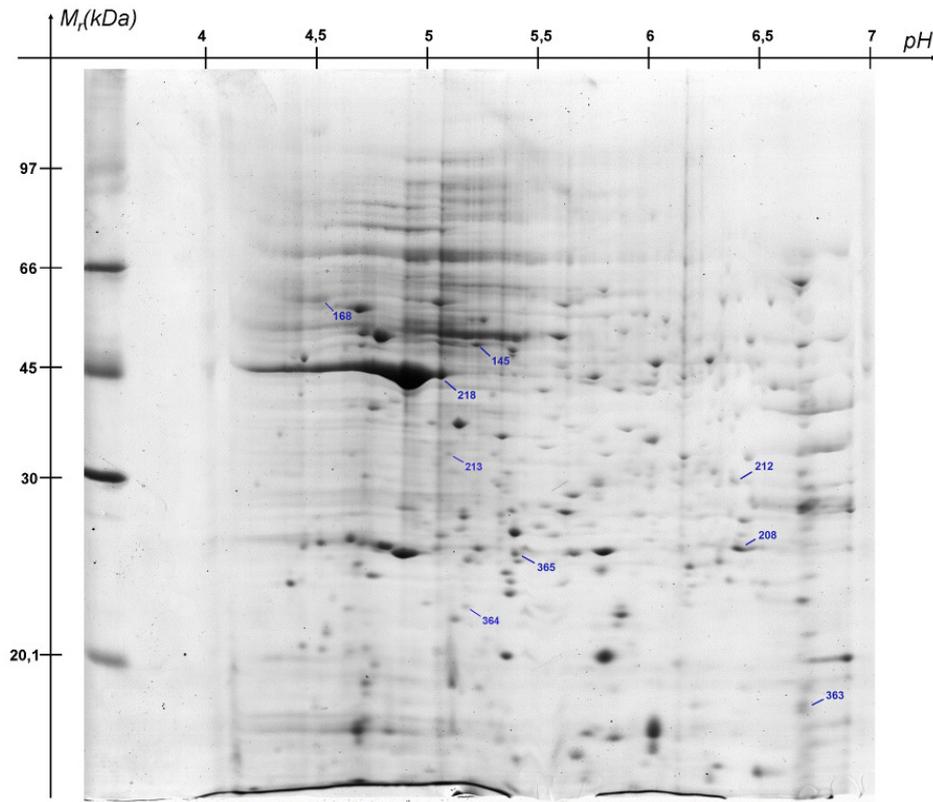


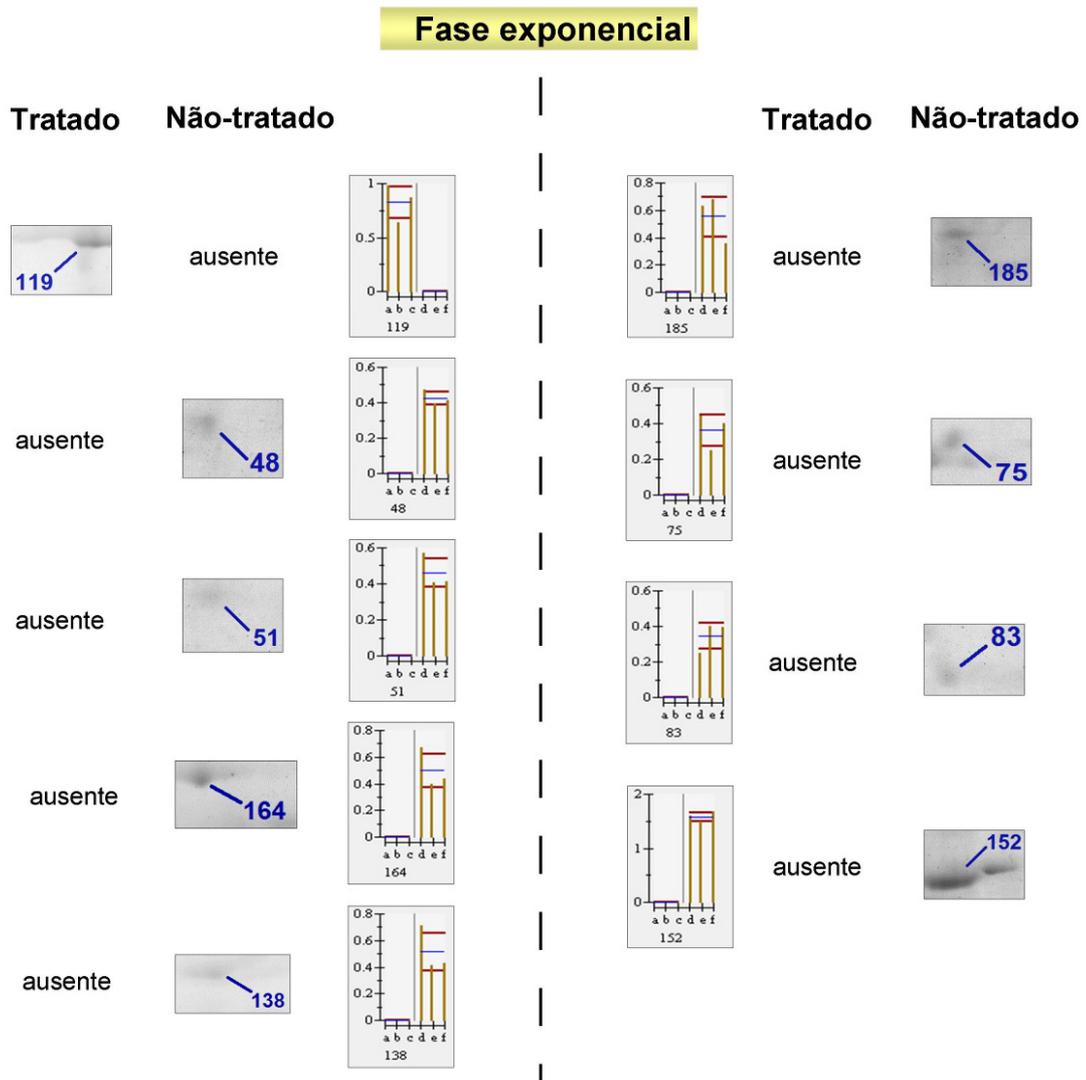
Figura 5.3 – Perfil 2D-PAGE de extratos protéicos de *P. aeruginosa* PA1 (700 μ g) tratada com peróxido de hidrogênio na fase estacionária de crescimento, com os spots diferenciais assinalados.

Os géis foram analisados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0*, onde foram detectados os spots presentes nos géis (parâmetros: saliência 50, smooth 7 e área mínima 100) e realizada a análise estatística. Para esta análise, foram escolhidos 11 spots característicos, amplamente distribuídos e presentes em todos os géis, a fim de serem utilizados como pontos de referência. Estes pontos de referência orientam a sobreposição das imagens por meio do programa, que foi utilizado para relacionar os spots correspondentes entre os diferentes géis. Para a realização da análise, os spots correspondentes foram comparados com base na média de volume absoluto do referido spot (intensidade de *pixels* x área) em três diferentes géis de um mesmo grupo, quando comparado ao grupo controle. A análise estatística utilizada foi o teste ANOVA e a média de volume absoluto de cada spot nos três géis de cada condição foi considerada significativamente diferente quando o p-valor foi menor que 0,01.

Foi possível identificar 40 spots diferenciais ou exclusivamente identificados entre as condições tratada e não-tratada, considerando-se as análises feitas nas fases exponencial e estacionária de crescimento. Destes, 18 proteínas foram detectadas, sendo 9 delas encontradas na

fase exponencial e 9 na fase estacionária de crescimento. Na Figura 5.4 estão ilustrados estes spots em detalhe e os histogramas de grupo relativos aos mesmos. As proteínas, separadas de acordo com a fase de crescimento na qual foram identificadas e a classe funcional a que pertencem, estão representadas nas Tabelas 5.1 e 5.2.

(A)



(B)

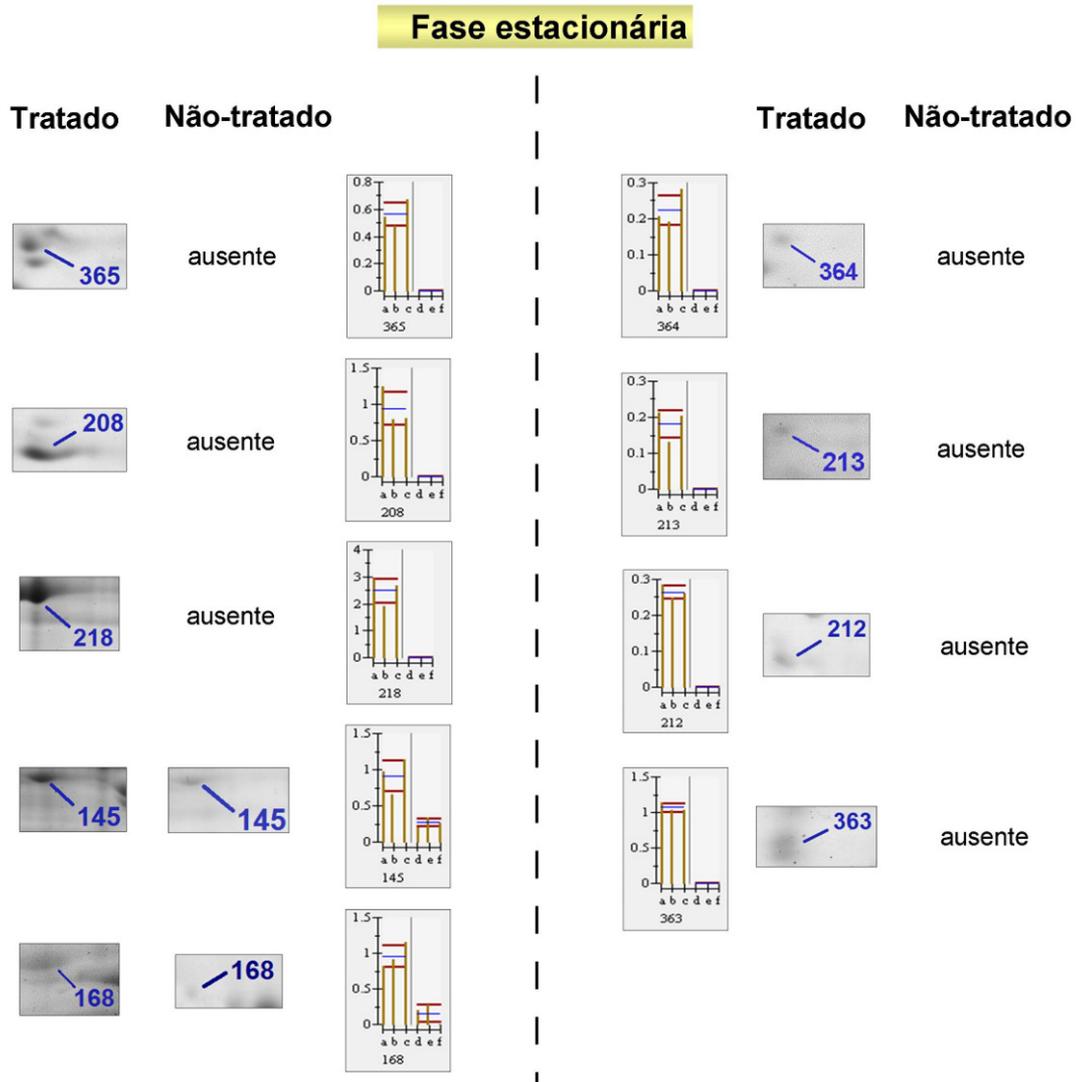


Figura 5.4 – Imagens representativas dos spots diferencialmente expressos ou exclusivamente identificados, nas fases exponencial (A) e estacionária (B) de crescimento. Os *spots* identificados estão assinalados com seu respectivo número. O eixo y nos histogramas indica a abundância relativa das manchas nos seguintes géis: a – c, tratado com peróxido de hidrogênio; d – f, não tratado com peróxido. As barras laranja verticais correspondem ao volume absoluto do spot em cada gel; as linhas verticais separam os grupos analisados; as linhas azuis horizontais mostram as médias dos volumes absolutos e as vermelhas indicam o desvio padrão. Os histogramas foram gerados pelo programa de análise de imagens de géis *Image Master 2D Platinum*.

Tabela 5.1 – Identificação de proteínas com expressão alterada em *P. aeruginosa* tratada com peróxido. Extratos protéicos foram obtidos após 10 h de cultivo (fase exponencial de crescimento). As classes funcionais foram atribuídas de acordo com Stover *et al.* (2000) e os números dos *spots* se referem àqueles mostrados na Figura 5.4.

Fase de crescimento	Classe funcional	Número do <i>spot</i>	Proteína	Número de peptídeos	Cobertura da sequência (%)	pI predito/ experimental	MM predito/ experimental	Expressão sob estresse oxidativo ¹
Exponencial	Biossíntese de aminoácidos e metabolismo	48	Glutamato N-acetiltransferase	2	8	5,39/ 6,85	41,76/ 24	Não identificado
	Modificações pós-traducionais, enovelamento de proteínas, chaperonas	185	Chaperonina GroEL	2	6	5,04/ 4,97	57/ 26,72	Não identificado
		51	Subunidade proteolítica da protease Clp dependente de ATP	2	16	5,45/ 5,82	22,14/ 24,25	Não identificado
	Metabolismo energético	164	F ₀ F ₁ ATP sintase subunidade beta	6	23	4,98/ 5,16	49,47/ 52,11	Não identificado
	Transporte de pequenas moléculas	138	Transportador ABC da proteína de ligação ao substrato	4	21	6,34/ 6,14	49,47/ 52,11	Não identificado
	Proteínas hipotéticas	119	Proteína hipotética PSPA7_4504	2	7	9,26/ 6,94	37,8/ 20,73	Exclusiva
75		Proteína hipotética PA1733	4	19	5,33/ 5,56	26,47/ 27,25	Não identificado	

Biossíntese de nucleotídeos e metabolismo	83	Adenilato kinase	2	12	5,98/ 6,59	23,1/ 28,85	Não identificado
Tradução, modificação pós-traducional, degradação	152	Fator de alongamento Tu	4	13	5,23/ 5,47	43,35/ 48,48	Não identificado

¹Nível de expressão da proteína em células tratadas com peróxido em relação às não-tratadas.

Tabela 5.2 – Identificação de proteínas com expressão alterada em *P. aeruginosa* tratada com peróxido. Extratos protéicos foram obtidos após 36 h de cultivo (fase estacionária de crescimento). As classes funcionais foram atribuídas de acordo com Stover *et al.* (2000) e os números dos *spots* se referem àqueles mostrados na Figura 5.4.

Fase de crescimento	Classe funcional	Número do <i>spot</i>	Proteína	Número de peptídeos	Cobertura da sequência (%)	pI predito/ experimental	MM predito/ experimental	Expressão sob estresse oxidativo ¹
Estacionária	Adaptação, Proteção	365	Peroxidase	2	12	5,45/ 5,82	21,82/ 25,13	Exclusiva
		208	alquil hidroperóxido redutase subunidade C	3	21	5,89/ 6,53	20,5/ 25,28	Exclusiva
	Proteínas de membrana, transporte de pequenas moléculas	218	Precursor da porina principal e porina estrutural de membrana externa OprF	4	16	4,98/ 4,83	37,64/ 43,58	Exclusiva
		145	OprE3	2	5	5,54/ 5,23	46,83/ 46,57	Aumentada
		168	Produto do gene IcmP	5	13	4,68/ 4,51	47,23/ 54,4	Aumentada
	Chaperonas e proteínas de choque térmico	364	Produto do gene LolA	2	12	5,72/ 5,16	23,07/ 22,26	Exclusiva
	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídeos	213	Quinase lipídica	2	10	4,97/ 5,07	31,5/ 32,47	Exclusiva
	Metabolismo de lipídeos; catabolismo	212	Enoil-CoA hidratase	4	18	6,02/ 6,6	30/ 31,35	Exclusiva

Tradução, modificação pós- traducional, degradação	363	Precursor da ecotina	2	13	6,75/ 6,77	17,31/17,83	Exclusiva
---	-----	----------------------	---	----	------------	-------------	-----------

¹Nível de expressão da proteína em células tratadas com peróxido em relação às não-tratadas.

Os resultados obtidos demonstraram que a exposição de *P. aeruginosa* PA1 ao peróxido de hidrogênio, nas condições de estudo, leva a uma condição de estresse oxidativo que resulta na expressão diferencial de proteínas intracelulares. É interessante notar que células tratadas com peróxido na fase exponencial de crescimento não expressaram a maior parte das proteínas diferencialmente expressas, as quais incluem proteínas relacionadas com a síntese de aminoácidos, enovelamento de proteínas e biossíntese de nucleotídeos (Figura 5.4 A e Tabela 5.1). No entanto, células em fase estacionária de crescimento apresentaram proteínas com expressão aumentada ou exclusivamente identificadas na condição tratada com peróxido de hidrogênio. Foram encontradas, por exemplo, proteínas de membrana e relacionadas com mecanismos de proteção e adaptação, potencialmente relacionados com a secreção de ramnolipídeos (Figura 5.4 B e Tabela 5.2). Esta observação é coerente com a cinética de crescimento e produção de ramnolipídeos, uma vez que sua produção é não-associada ao crescimento bacteriano, ocorrendo predominantemente na fase estacionária de crescimento (Figura 5.1).

Células tratadas com peróxido na fase estacionária de crescimento apresentaram expressão aumentada de proteínas com função protetora, tais como peroxidase, alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC) e ecotina, assim como as proteínas de membrana IcmP, OprE3 e o precursor da porina principal e porina estrutural de membrana externa OprF. Peroxidase é uma enzima que utiliza peróxidos (por exemplo, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos) como substratos e está envolvida na defesa contra o estresse oxidativo. Portanto, a sua maior abundância nas células tratadas com peróxido pode ser devido à sua atividade protetora. Ecotina é uma protease periplásmica que inibe várias serino proteases, tendo sido reportada como protetora de *P. aeruginosa* contra a elastase de neutrófilos (EN) durante o processo de infecção (EGGERS et al., 2004), o qual também se caracteriza por ser um ambiente rico em EROs.

A proteína AhpC, por sua vez, é um membro bem caracterizado da família das peroxirredoxinas (HALL; KARPLUS; POOLE, 2009). Em *P. aeruginosa*, a expressão do gene *ahpC* é ativada pelo regulador transcricional OxyR em resposta ao peróxido (OCHSNER et al., 2000). Além disso, OxyR também regula a mobilidade celular e a produção de ramnolipídeos por um mecanismo ainda desconhecido (VINCKX et al., 2010). Portanto, é possível que AhpC e a produção de ramnolipídeos estejam correlacionadas através da co-regulação por OxyR sob estresse oxidativo.

A expressão de proteínas de membrana externa é conhecida por ser aumentada sob condições de estresse em *P. aeruginosa* (BAYSSE et al., 2005; NAKAJIMA; HOSHIKAWA;

NAKAE, 1998). Em concordância com estes autores, as proteínas de membrana externa identificadas neste trabalho – o produto do gene IcmP, OprE3 e o precursor da porina principal e porina estrutural de membrana externa OprF – foram mais abundantes ou presentes exclusivamente em células tratadas com peróxido na fase estacionária de crescimento.

IcmP é uma metaloprotease localizada na membrana externa de *P. aeruginosa*, a qual difere de outras proteases como elastase, alcalino proteases e LasA quanto à especificidade de seu sítio de clivagem e suas propriedades (FRICKE et al., 1999). Embora Fricke e colaboradores (1999) tenham relatado que sua expressão ocorre no início da fase logarítmica, em paralelo com o crescimento bacteriano, neste trabalho a expressão diferencial de IcmP foi detectada apenas durante a fase estacionária de crescimento celular.

A porina OprE3, a qual tem sido nomeada OprQ (OKAMOTO et al., 1999), pertence à subfamília OprD (TAMBER; OCHS; HANCOCK, 2006). Embora pouco se conheça sobre a função de OprQ (ou OprE3), estudos sugerem que ela pode estar envolvida na virulência em *P. aeruginosa* (ARHIN; BOUCHER, 2010). Além disso, OprQ foi encontrado superexpressa em condições de estresse causado por limitação de ferro e magnésio (ARHIN; BOUCHER, 2010).

OprF é uma proteína que regula a sua permeabilidade da membrana de acordo com as condições de crescimento e já foi reportada por estar envolvida na adaptação ambiental (JAOUEN et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que OprF está envolvida na liberação de fatores de virulência por *P. aeruginosa*, possivelmente através da modulação do sistema *quorum sensing* (FITO-BONCOMPTE et al., 2011). Além disso, mutantes para OprF apresentaram níveis reduzidos de RNAm que codifica para as enzimas RhlA e RhlB, responsáveis pela biossíntese de ramnolipídeos, resultando em uma forte redução na sua produção por estes mutantes (BOUFFARTIGUES et al., 2011). A produção de ramnolipídeos ocorre no final da fase exponencial e ao longo da fase estacionária de crescimento; portanto, nossos resultados sugerem que o aumento na expressão das proteínas de membrana externa OprF e OprE3 na fase estacionária está relacionada ao aumento na secreção de fatores de proteção, os quais incluem ramnolipídeos e seus co-reguladores transcricionais.

Os resultados apresentados nesta etapa inicial do trabalho reforçam a possibilidade de participação de ramnolipídeos na proteção contra o estresse oxidativo e sugerem que a concentração de oxigênio no meio de cultivo pode ser um fator importante para o estabelecimento de um processo de produção de ramnolipídeos eficiente e viável economicamente. Em razão disto, experimentos posteriores foram realizados em biorreatores operando em condições de oxigenação controladas e constantes, a fim de investigar em que medida a concentração de oxigênio dissolvido no meio é capaz de influenciar positivamente a

produção de ramnolipídeos, bem como sua influência sobre a expressão protéica por *P. aeruginosa*.

5.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM BIORREATOR ACOPLADO A CONTACTORES DE MEMBRANA

Com o sistema de controle da concentração de oxigênio dissolvido implantado por Kronemberger *et al.* (2008), foi possível comprovar que o oxigênio é extremamente importante para o crescimento celular e para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PA1 em biorreator. O controle automatizado da concentração de oxigênio dissolvido solucionou o problema de sua grande variação ao longo de uma fermentação e ainda possibilitou a obtenção dos valores de consumo de oxigênio pelas bactérias.

Os experimentos desenvolvidos nesta etapa do trabalho consistiram em avaliar a cinética da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PA1 em biorreatores acoplados a contactores de membrana, quando submetidas a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. A Figura 5.5 apresenta o perfil de oxigenação nas fermentações conduzidas com 1, 4 e 6 mg O₂/L. Estes valores correspondem a, respectivamente, 14%, 57% e 86% da concentração de saturação de oxigênio que, nas condições definidas para as fermentações, era igual a 7 mg O₂/L (KRONEMBERGER *et al.*, 2008).

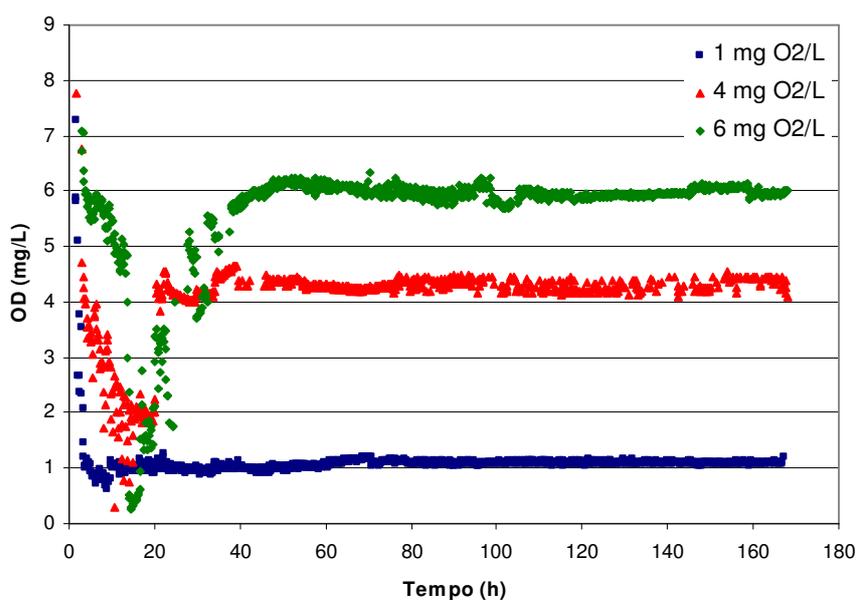


Figura 5.5 – Oxigênio dissolvido no meio (mg/L) ao longo das fermentações

Como todo o oxigênio foi fornecido ao meio de cultivo por um sistema não dispersivo, não houve borbulhamento e a perda deste nutriente para o ambiente foi considerada desprezível. Deste modo, foi possível afirmar que a quantidade de gás fornecida era exatamente igual à quantidade consumida pelas bactérias, o que possibilitou a análise das taxas global de consumo de oxigênio (OUR – *Oxygen Uptake Rate*), e específica (SOUR – *Specific Oxygen Uptake Rate*), apresentadas nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente. A taxa específica foi obtida pela divisão da taxa bruta pela concentração de células durante a fermentação. Os valores da concentração celular com intervalo de tempo compatível com os valores de consumo foram obtidos pela interpolação dos pontos coletados.

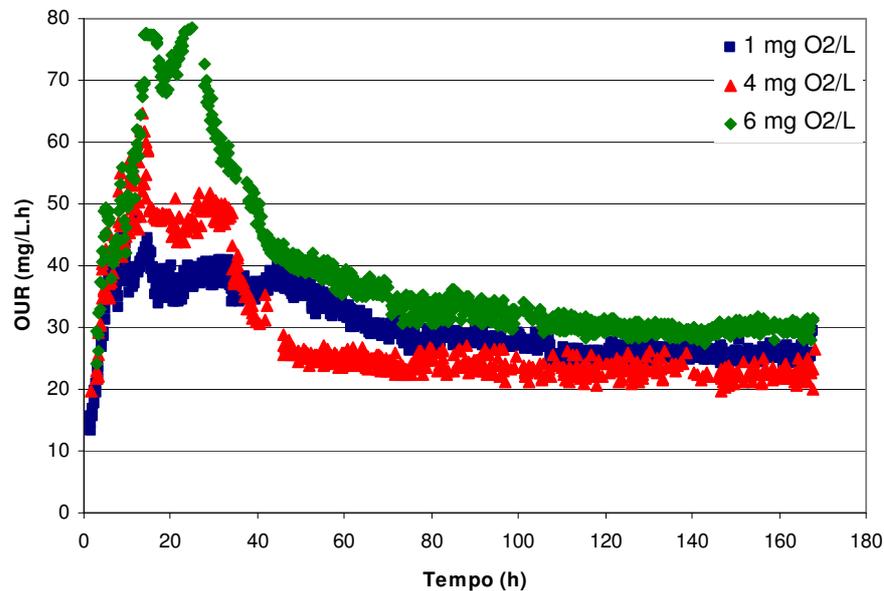


Figura 5.6 – Taxa de consumo de oxigênio bruta (OUR), expressa em miligrama de oxigênio por litro por hora, ao longo de fermentações conduzidas com 1, 4 e 6 mg O₂/L.

É possível perceber pela da Figura 5.5 que nas primeiras 40 horas de fermentação há uma maior dificuldade na manutenção do oxigênio dissolvido no meio nas concentrações desejadas, em especial nas fermentações conduzidas com 4 e 6 mg O₂/L. Estas horas iniciais coincidem com a fase exponencial de crescimento microbiano (Figura 5.8), de tal modo que a dificuldade na manutenção de concentrações constantes de oxigênio dissolvido está relacionada com o maior consumo deste nutriente durante este período de crescimento celular, conforme pode ser visto na Figura 5.6.

O consumo de oxigênio bruto atingiu os valores máximos de aproximadamente 45, 65 e 80 mg/L.h nas fermentações conduzidas com 1, 4 e 6 mg O₂/L, respectivamente, nos períodos

entre 15 e 30 horas de fermentação, sendo observada uma tendência à estabilização deste consumo em valores compreendidos entre 20 e 35 mg/L.h a partir de 40 horas de fermentação; momento no qual as células se encontram em fase estacionária de crescimento bacteriano (Figura 5.6). O mesmo comportamento é observado para a taxa específica de consumo de oxigênio (SOUR), onde se observa claramente a variação no consumo de oxigênio ao longo das fases do metabolismo celular. O consumo específico de oxigênio atinge os valores máximos de 150, 160 e 190 mg/g.h logo no início das fermentações mantidas com 1, 4 e 6 mg O₂/L, respectivamente. Depois, esse valor cai gradativamente até a estabilização em uma taxa compreendida entre 5 e 20 mg/g.h, o que confirma que essa variação não está somente relacionada à mudança nos valores de concentração celular, mas também à atividade metabólica das células nos diferentes estágios do crescimento (Figura 5.7).

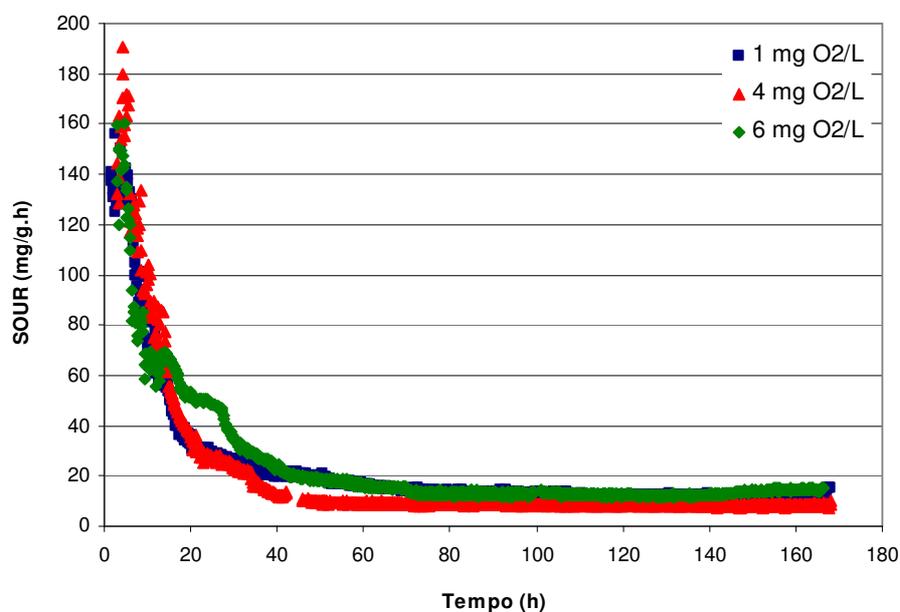


Figura 5.7 – Taxa de consumo de oxigênio específica (SOUR), expressa em miligrama de oxigênio por grama de células por hora, ao longo de fermentações para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* conduzidas com 1, 4 e 6 mg O₂/L.

O perfil apresentado neste trabalho é semelhante àquele obtido nos estudos preliminares realizados por Kronemberger (2007), embora maiores taxas de consumo de oxigênio tenham sido observadas. Utilizando um inóculo maior ao início da fermentação, em um meio sem a adição de extrato de levedura, este autor obteve taxa específica de consumo de oxigênio máxima de aproximadamente 90 mg/g.h na fase exponencial de crescimento.

As Figuras 5.8 e 5.9 apresentam, respectivamente, o crescimento microbiano e o consumo da fonte de nitrogênio por esta cepa nas concentrações de oxigênio dissolvido testadas. Em todas as fermentações foi observada alta taxa de consumo da fonte de nitrogênio logo no início do cultivo. O elevado consumo de nitrato coincide com a fase exponencial de crescimento microbiano, onde este nutriente é transportado e consumido rapidamente, permitindo o aumento da biomassa no meio de cultura.

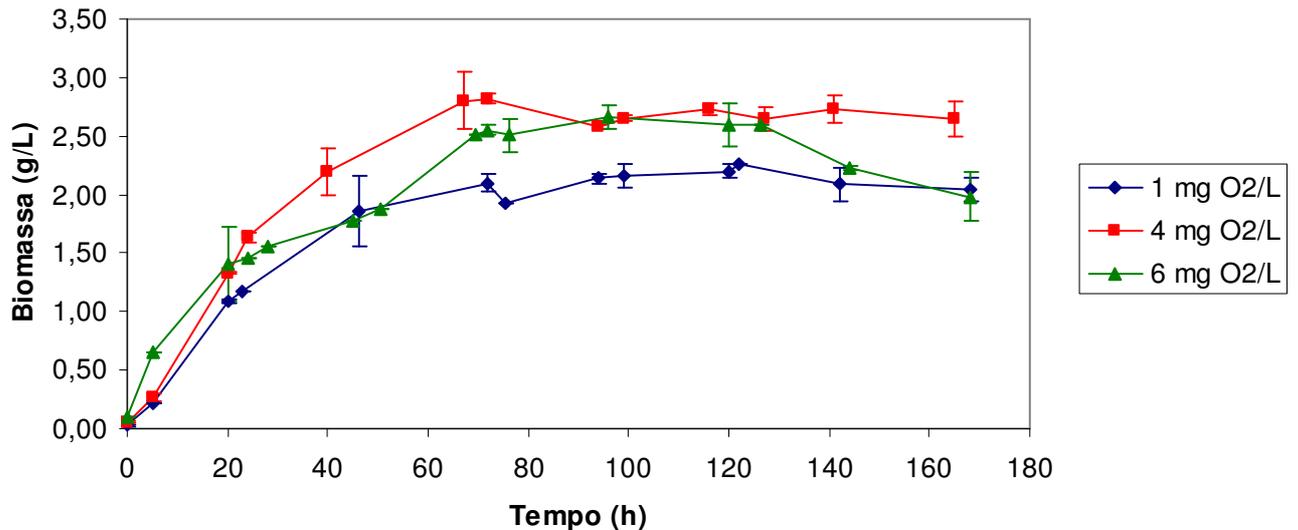


Figura 5.8 – Crescimento microbiano em função do tempo nas fermentações conduzidas com concentrações de oxigênio dissolvido iguais a 1, 4 e 6 mg O₂/L

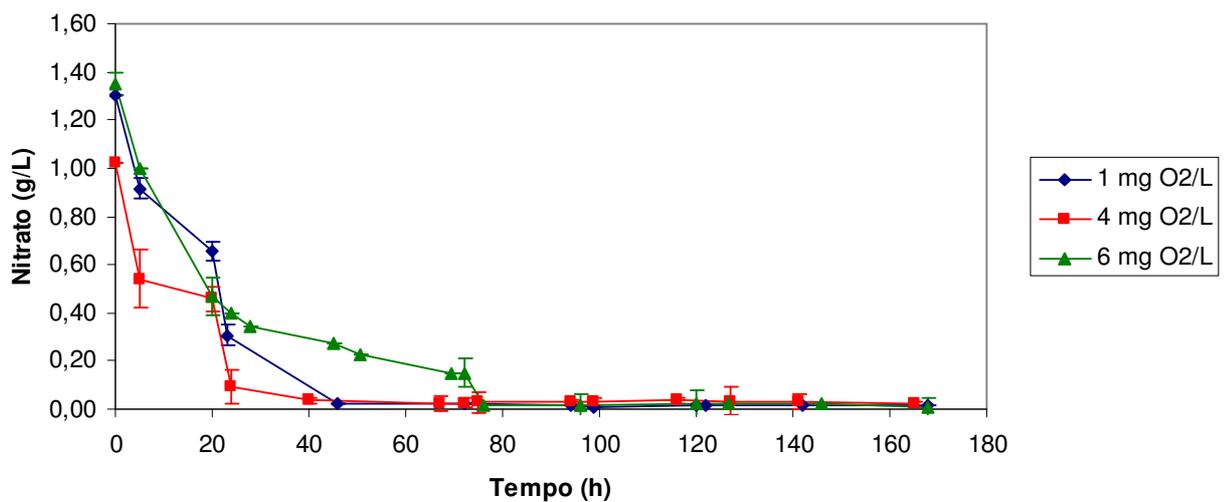


Figura 5.9 – Consumo da fonte de nitrogênio em função do tempo nas fermentações conduzidas com concentrações de oxigênio dissolvido iguais a 1, 4 e 6 mg O₂/L

Apesar de a taxa específica de crescimento microbiano (μ_x) ter sido semelhante durante a fase exponencial de células mantidas em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (0,06, 0,06 e 0,05 h^{-1} , nas fermentações contendo 1, 4 e 6 mg O_2/L , respectivamente), é possível observar que, a partir de 120 h de cultivo, começa a haver um declínio na biomassa em fermentações conduzidas com 6 mg O_2/L . Após 168 h, esta redução chegou a aproximadamente 24% (estatisticamente significativo; p-valor < 0,05, *t de Student*).

Possivelmente, a condição de maior oxigenação representou uma situação de estresse oxidativo, que acarretou a redução da biomassa a partir de 120 h. Sabra e colaboradores (2002), em concordância com estes resultados, relataram que altas concentrações de oxigênio no meio de cultura parecem exercer uma condição de estresse em *P. aeruginosa*, levando à redução do crescimento. No que diz respeito ao μ_x de bactérias do gênero *Pseudomonas* submetidas a condições de estresse, dados disponíveis na literatura não seguem um perfil padrão. Alagappan e Cowan (2004), por exemplo, reportaram a elevação da taxa específica de crescimento de *P. putida* em benzeno e tolueno com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido. Em contrapartida, Sabra *et al.* (2002) demonstraram que *P. aeruginosa* PAO1 apresenta μ_x maiores em condições de menor oxigenação, durante as primeiras horas de fermentação, onde a fase lag se apresenta bastante diminuída.

As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam, respectivamente, o consumo de glicerol e a produção de ramnolipídeos ao longo das fermentações. É possível notar que o consumo de glicerol é menor nas fermentações conduzidas com 1 mg O_2/L , quando comparado às demais condições testadas. Apesar disso, a concentração final de ramnolipídeos foi semelhante em fermentações realizadas com 1 e 6 mg O_2/L . Concentrações maiores de ramnolipídeos foram observadas em experimentos conduzidos com 4 mg O_2/L , o que pode estar relacionado com o estresse oxidativo a que as células foram submetidas nesta condição experimental. Estudos realizados por Sabra *et al.* (2002) demonstram que bactérias da espécie *P. aeruginosa* exibem uma série de respostas fisiológicas consideráveis ao estresse oxidativo durante crescimento em um biorreator com controle da concentração de oxigênio dissolvido, como o aumento na secreção de proteínas e produção de diferentes fatores de virulência. Apesar destes autores não terem avaliado a influência da oxigenação sobre a produção de ramnolipídeos, por se tratar de um fator de virulência, é possível que sua produção também seja regulada por vias de resposta ao estresse oxidativo ainda não elucidadas.

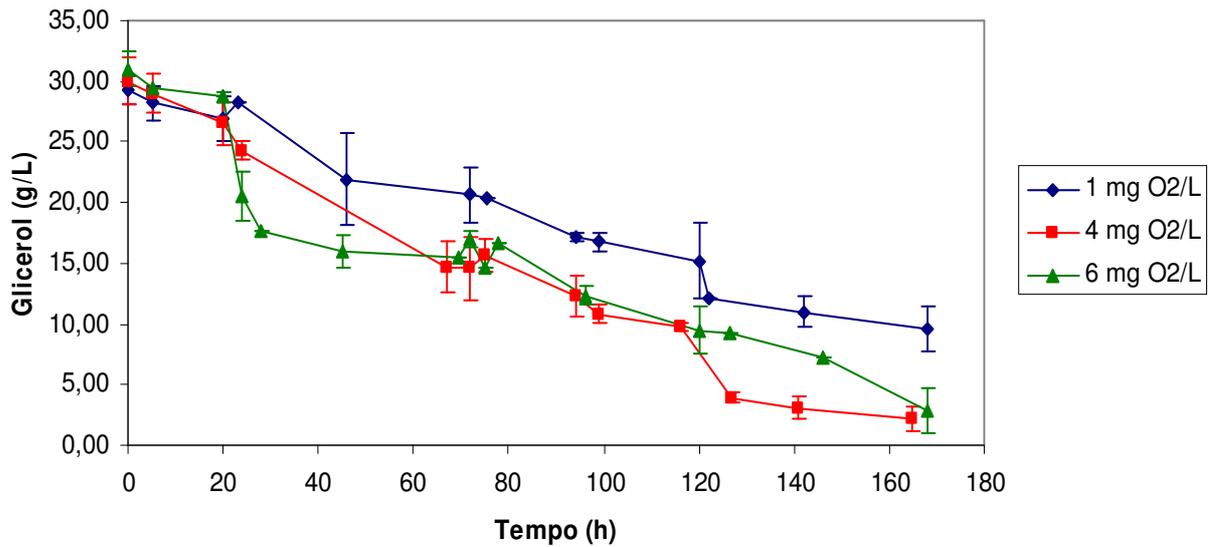


Figura 5.10 – Consumo de glicerol função do tempo nas fermentações conduzidas com concentrações de oxigênio dissolvido iguais a 1, 4 e 6 mg O₂/L

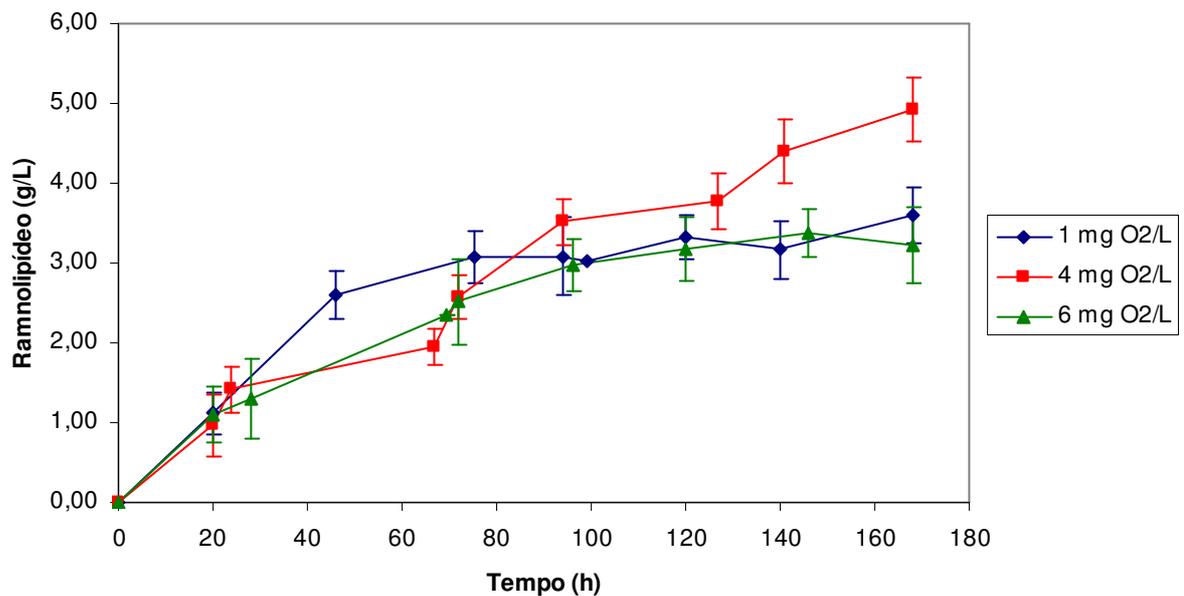


Figura 5.11 – Produção de ramnolipídeos em função do tempo nas fermentações conduzidas com concentrações de oxigênio dissolvido iguais a 1, 4 e 6 mg O₂/L

A Tabela 5.3 apresenta os principais parâmetros do processo nas diferentes condições testadas, incluindo a concentração máxima de produto, a produtividade do processo, o consumo de glicerol, bem como o fator de rendimento de produto por substrato ($Y_{p/s}$).

Tabela 5.3 – Efeito da variação na concentração de oxigênio dissolvido sobre a concentração de ramnolipídeos, produtividade, consumo de glicerol e rendimento de produto por substrato

Concentração de O ₂ (mg/L)	Concentração máxima de produto (g/L)	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de Glicerol (mg/L.h)	Y _{P/S}
1,0	3,60 ± 0,35	21,43 ± 0,77	117,44 ± 3,08	0,18 ± 0,03
4,0	4,93 ± 0,41	29,34 ± 0,83	165,48 ± 5,59	0,17 ± 0,05
6,0	3,22 ± 0,48	19,17 ± 0,07	167,80 ± 12,69	0,11 ± 0,03

Os resultados apresentados na Tabela 5.3 demonstram que a concentração máxima de produto e a produtividade tendem a aumentar em função da concentração de oxigênio até atingir a condição experimental intermediária testada (4 mg O₂/L). Experimentos conduzidos com 6 mg O₂/L, no entanto, apresentaram um declínio na concentração máxima de produto, produtividade e no fator de rendimento de produto por substrato, apesar do consumo de glicerol ter se mantido tão alto quanto nas fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L. Sendo o glicerol uma conhecida fonte de carbono utilizada por diferentes espécies de microrganismos (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009), seu alto consumo nos experimentos conduzidos com 6 mg O₂/L pode estar relacionado com a geração de energia, a qual será utilizada em outras rotas metabólicas que não estão direcionadas para a produção de ramnolipídeos, possivelmente por se tratar de uma condição de estresse metabólico.

5.2.1. Peroxidação lipídica em decorrência de estresse oxidativo

A peroxidação lipídica é o processo por meio do qual as EROs atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada destas espécies nas estruturas intracelulares (CATALÁ, 2009). Na Figura 5.12 estão representados os efeitos da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo sobre a peroxidação lipídica, em biorreatores operando com oxigenação não dispersiva, na fase exponencial (20 h) e estacionária (72 e 120 h) de crescimento.

Não foram observadas, na fase exponencial de crescimento, diferenças nos valores de peroxidação lipídica para as condições de oxigenação analisadas. Estes resultados podem estar relacionados com o alto consumo de oxigênio pelas células na fase exponencial, dificultando a manutenção da taxa de oxigênio dissolvido no meio de forma constante (Figura 5.5). Na fase estacionária de crescimento, no entanto, valores mais elevados de peroxidação lipídica foram

obtidos em células oriundas de fermentações submetidas a concentrações de oxigênio mais altas (4 e 6 mg O₂/L).

Tanto células provenientes do início da fase estacionária (72 h) quanto aquelas recolhidas num momento mais tardio (120 h) apresentaram um perfil bastante semelhante, sem diferenças significativas na peroxidação lipídica de células mantidas a 4 ou 6 mg O₂/L. No entanto, é possível perceber um aumento estatisticamente significativo de aproximadamente 24% nos valores de peroxidação lipídica nestas condições de maior oxigenação, quando comparadas com células mantidas a 1 mg O₂/L. Este resultado demonstra que o aumento na taxa de oxigenação de 1 para 4 ou 6 mg O₂/L leva a respostas fisiológicas diferenciadas, decorrentes do estresse oxidativo.

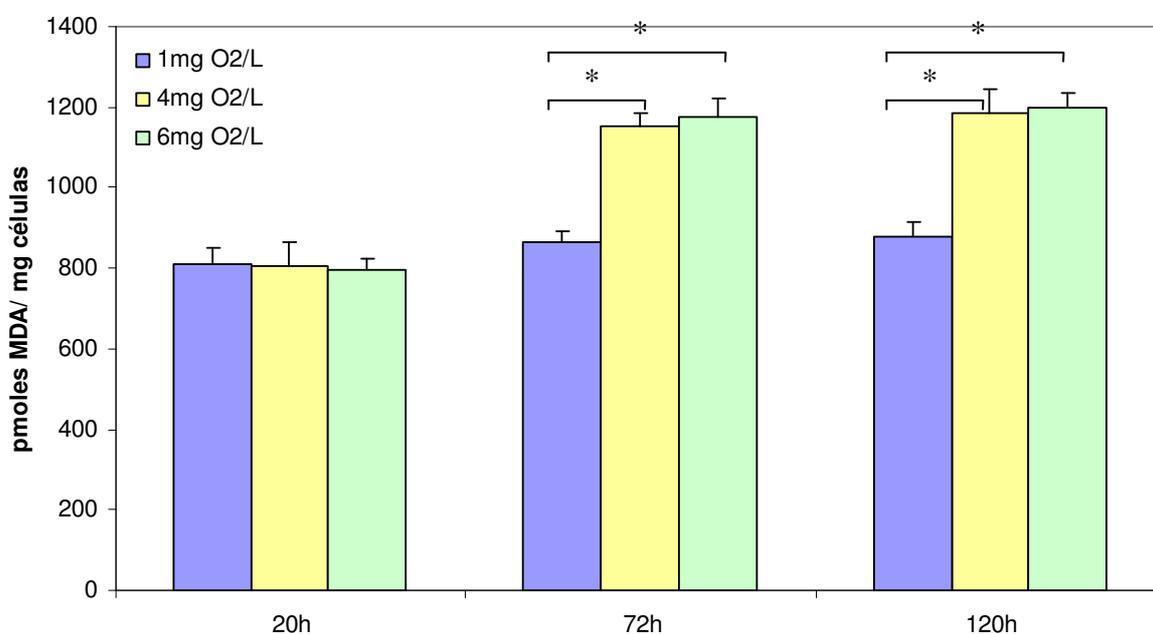


Figura 5.12 – Perfil de peroxidação lipídica em fermentações conduzidas com 1, 4 e 6 mg O₂/L, nas fases exponencial (20 h) e estacionária (72 h e 120 h) de crescimento. (* p-valor < 0,05, *t de Student*)

5.2.2. Produção de elastase e proteases alcalinas em biorreator

Estudos realizados por Fernandes (2010) levaram à observação de que *P. aeruginosa* PA1, quando cultivada em meio otimizado para a produção de ramnolipídeos e submetida a diferentes taxas de aeração superficial em frascos agitados, não produziu fatores de virulência como lipase, pirocianina e alginato. Esta observação sugere que esta cepa é menos virulenta que

aquelas encontradas em ambientes hospitalares, o que favorece sua aplicação em biorremediação. Apesar disso, foi detectada a presença de proteases alcalinas e elastases no sobrenadante celular, as quais foram encontradas em maiores concentrações nas condições de maior aeração superficial, apresentando um perfil bem semelhante ao observado para a produção de ramnolipídeos (PACHECO et al., 2012). Por esta razão, o presente estudo incluiu, além da produção de ramnolipídeos, a avaliação do perfil de produção de elastases e proteases alcalinas em biorreatores, operando com diferentes condições de oxigenação.

A Figura 5.13 apresenta o perfil da atividade de elastases (A) e proteases alcalinas (B), nas fermentações mantidas a 1, 4 e 6 mg O₂/L.

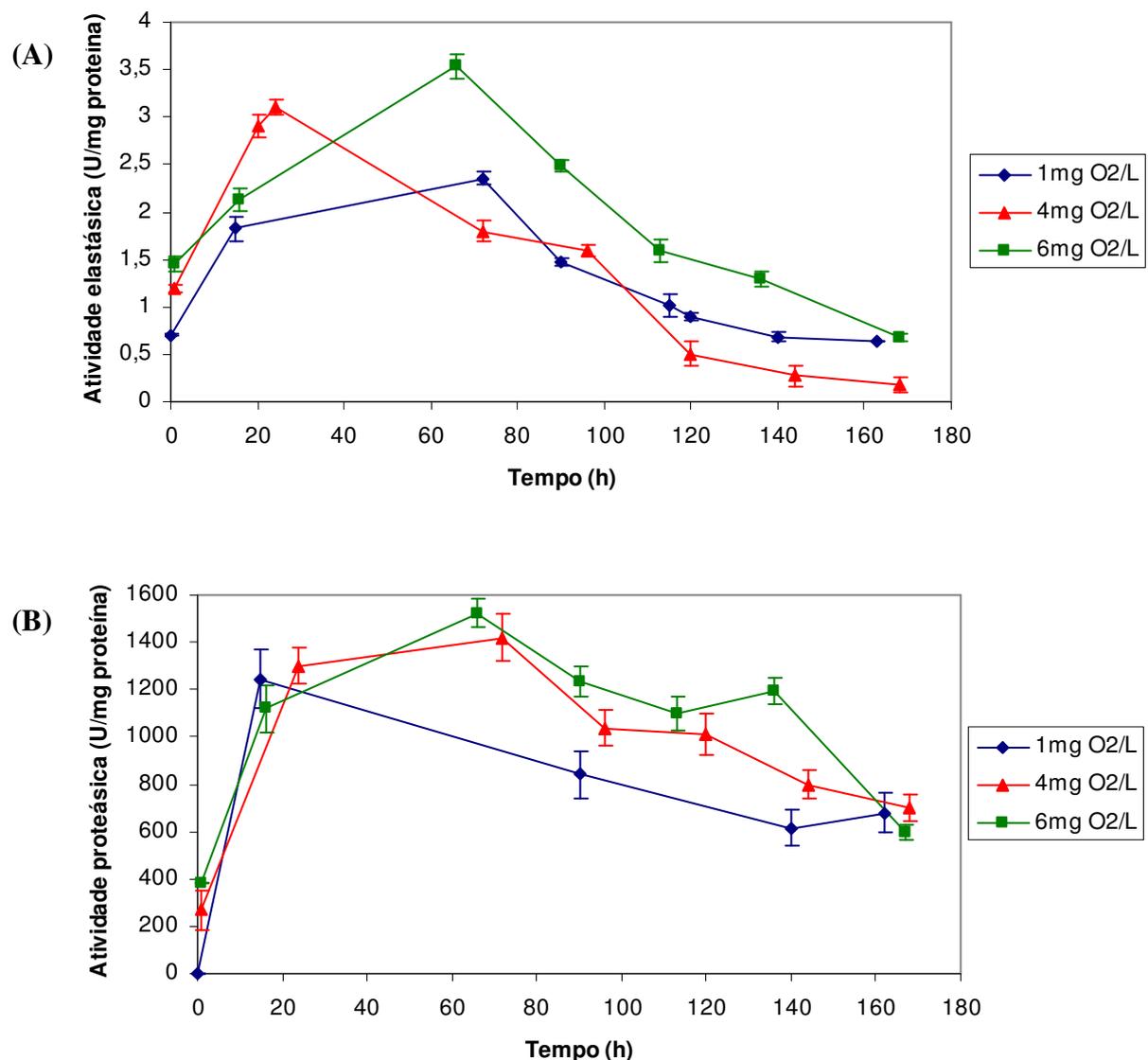


Figura 5.13 – Perfil da atividade de elastases (A) e proteases alcalinas (B) por *P. aeruginosa* cultivada em diferentes condições de oxigenação em biorreator. As atividades se encontram normalizadas em função da concentração de proteínas totais secretadas.

Observa-se na Figura 5.13 que a secreção de elastases tende a antecipar em células mantidas a 4 mg O₂/L, quando comparada às demais condições. Apesar disso, nas horas subsequentes a atividade elastásica reduz consideravelmente, atingindo valores semelhantes aos obtidos nas demais condições experimentais. Sobrenadantes de amostras mantidas a 1 mg O₂/L apresentam atividade elastásica mais baixa ao longo de todo o cultivo, quando comparados àqueles oriundos de fermentações a 6 mg O₂/L, sendo observado o mesmo perfil para a atividade proteásica. Em todas as condições experimentais testadas, apesar de ocorrer o aumento das atividades elastásica e proteásica nas primeiras horas de fermentação, é possível perceber uma clara tendência de declínio em ambas as atividades ao longo do cultivo, o que favorece a utilização desta cepa para fins biotecnológicos e ambientais. Em fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L, condição na qual se obteve resultados mais satisfatórios no que se refere à produção de ramnolipídeos, a atividade elastásica alcançou valores muito próximos a zero após 168 h de cultivo. Por outro lado, reduções bastante semelhantes foram obtidas para a atividade proteásica nas condições experimentais testadas.

Diversos estudos demonstram que a expressão genética de elastases, proteases alcalinas e ramnolipídeos são reguladas por *quorum sensing* (QS) de uma forma semelhante (DÉZIEL et al., 2005; GAMBELLO; KAYE; IGLEWSKI, 1993; PEARSON; PESCI; IGLEWSKI, 1997). Apesar disso, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a concentração de ramnolipídeos e as atividades elastásica e proteásica apresentam perfis distintos ao longo do processo fermentativo (Figuras 5.11 e 5.13).

Sabra e colaboradores (2002), ao avaliar o comportamento de *P. aeruginosa* em condições microaeróbias e aeróbias, observaram que apenas condições de menor oxigenação (1% de saturação do ar) levavam à liberação de elastases pelas células. Condições equivalentes a 5, 10 e 50% de saturação do ar não apresentaram atividade elastásica significativa. Apesar de o tempo de fermentação acompanhado por estes autores ter sido de apenas 14 horas, foi relatado também que limitações muito grandes na oxigenação do meio parecem reduzir a liberação de elastases e outros fatores de virulência na cepa estudada. Estes resultados, junto com aqueles obtidos no presente estudo, demonstram que apesar da regulação por QS ser semelhante para elastases, proteases e ramnolipídeos, as respostas celulares ao estresse oxidativo parecem exercer importante relação sobre os mecanismos de controle da expressão gênica por QS, as quais necessitam ser mais bem investigadas.

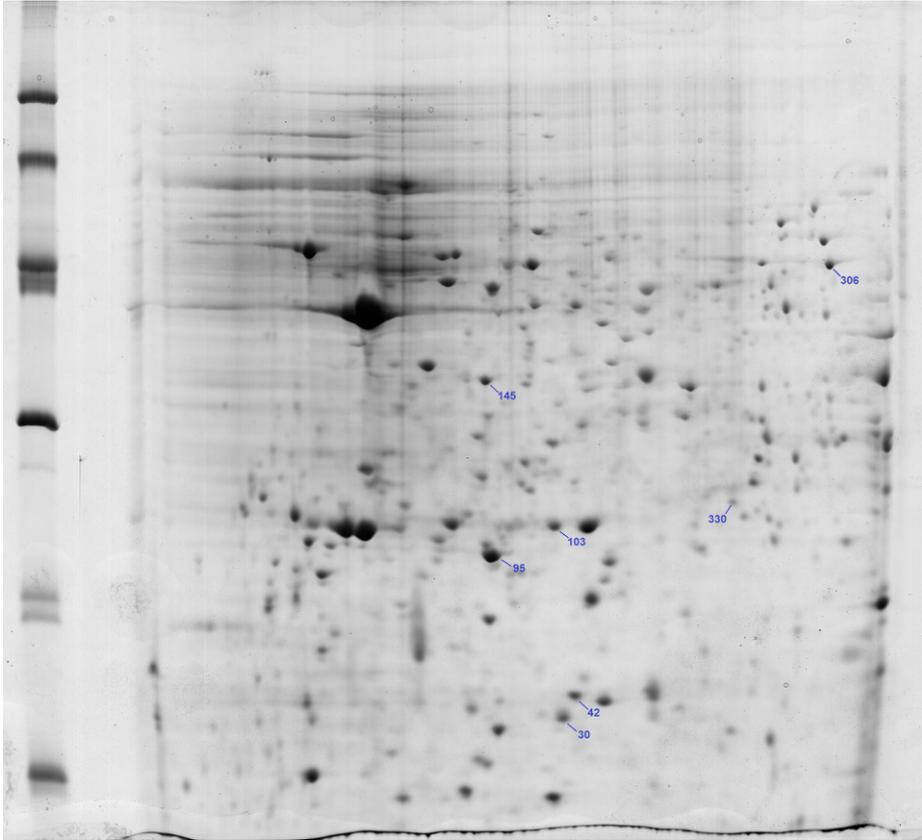
5.2.3. Expressão de proteínas em resposta a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator

As amostras de fermentações conduzidas com 1 mg O₂/L, 4 mg O₂/L e 6 mg O₂/L, provenientes das fases exponencial (20 h) e estacionária de crescimento (72 e 120 h), foram analisadas por 2DE-PAGE utilizando fitas de focalização isoeletrica de 18 cm, com faixa de pH de 4 a 7.

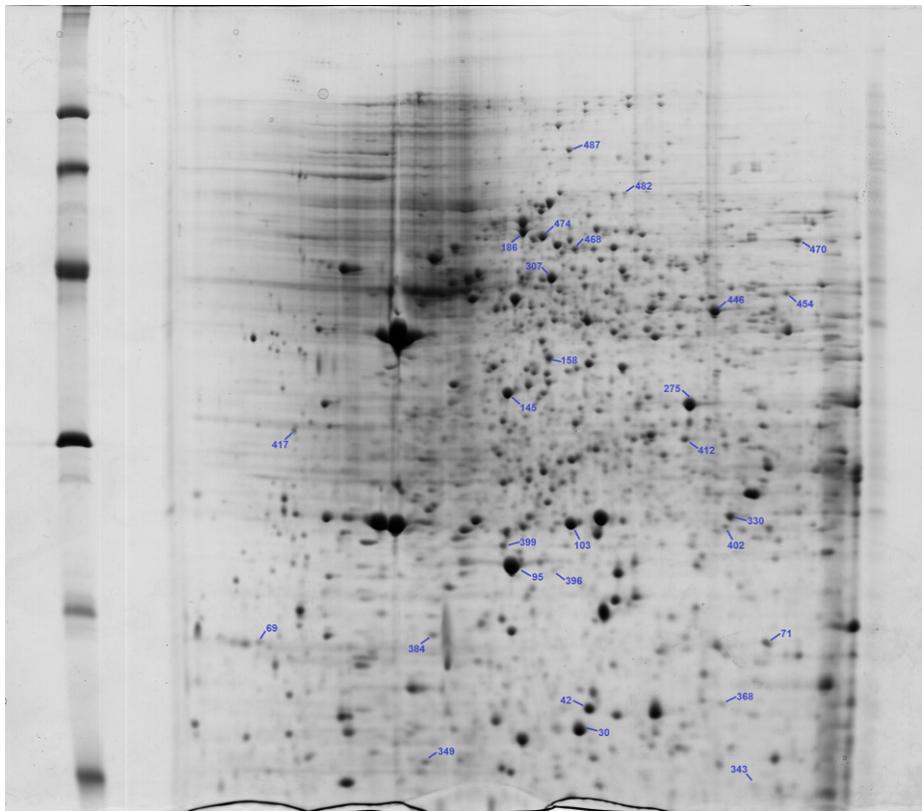
A análise estatística dos géis foi realizada de forma similar àquela dos experimentos conduzidos em frascos agitados na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio. Os parâmetros para detecção dos spots presentes nos géis, através do programa *Image Master 2D Platinum* foram: saliência 80, smooth 6 e área mínima 100. Para esta análise, 3 spots foram escolhidos como pontos de referência (*landmarks*) para orientar a sobreposição das imagens através do programa. Os spots correspondentes foram comparados com base na média de volume absoluto do referido spot (intensidade de *pixels* x área) em cinco diferentes géis de um mesmo grupo, para as amostras extraídas após 20 e 72 h de fermentação. Para as amostras extraídas após 120 h de fermentação a análise foi realizada utilizando três diferentes géis para cada condição de oxigenação. A análise estatística utilizada foi o teste ANOVA e a média de volume absoluto de cada spot nos grupos experimentais analisados foi considerada significativamente diferente quando o p-valor foi menor que 0,01.

A Figura 5.14 apresenta perfis eletroforéticos representativos de cada condição testada, na fase exponencial de crescimento (20 h), e na Tabela 5.4 estão presentes os spots diferencialmente expressos identificados por espectrometria de massas.

(A)



(B)



(C)

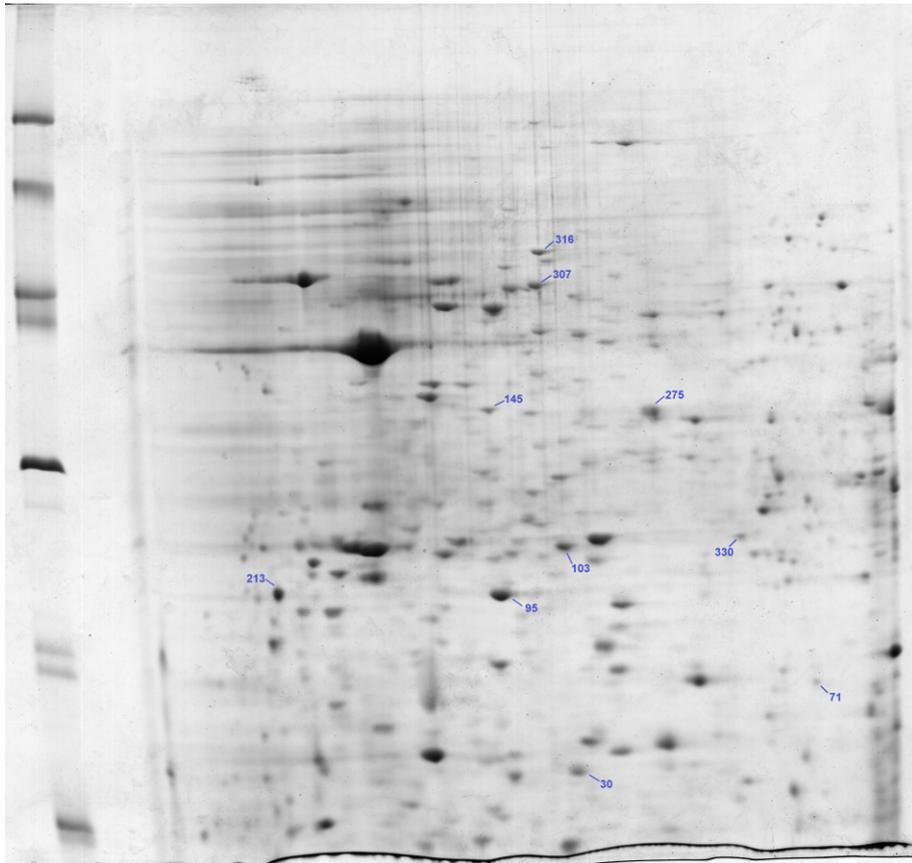


Figura 5.14 – Perfis eletroforéticos representativos de amostras intracelulares extraídas na fase exponencial de crescimento (20 horas), em diferentes condições de oxigenação em biorreator:

(A) 1 mg O₂/L, (B) 4 mg O₂/L e (C) 6 mg O₂/L

Tabela 5.4 – Identificação de proteínas com expressão alterada em *P. aeruginosa* cultivada em biorreator com concentração de oxigênio igual a 1, 4 ou 6 mg O₂/L. Extratos protéicos foram obtidos após 20 h de cultivo (fase exponencial de crescimento). As classes funcionais foram atribuídas de acordo com Stover *et al.* (2000) e os números dos *spots* se referem àqueles mostrados na Figura 5.14.

Classe funcional	N° do <i>spot</i>	Proteína	Número de peptídeos	Cobertura da sequência (%)	pI predito/ experimental	MM predito/ experimental	Volume absoluto do spot*		
							1mg O ₂ / L	4mg O ₂ / L	6mg O ₂ / L
Adaptação, proteção	95	Superóxido dismutase	5	36	5,27/ 5,44	21,34/ 22,30	4,418 ± 2,701	16,196 ± 0,615	6,379 ± 1,503
	402	Peroxirredoxina	3	23	5,73/ 6,37	20,69/ 24,03	NI	0,420 ± 0,134	NI
	103	Peroxidase	3	22	5,37/ 5,69	21,81/ 24,83	1,143 ± 0,828	7,070 ± 0,172	1,553 ± 0,773
	69	Proteína quimiotática ligadora de purina	3	25	4,33/ 4,37	17,52/ 19,01	-	0,620 ± 0,170	NI
Biossíntese de aminoácidos e metabolismo	468	Seril-tRNA sintetase	7	23	5,39/ 5,71	47,20/ 50,05	NI	0,923 ± 0,088	NI
Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	343	Subunidade regulatória da acetolactato sintase 3	3	29	5,93/ 6,47	17,77/ 14,28	NI	0,441 ± 0,106	NI
	399	Polinucleotídeo fosforilase	4	6	5,07/ 5,39	75,41/ 23,08/	NI	0,804 ± 0,179	NI
Catabolismo de compostos carbônicos	412	3-hidroxi isobutirato desidrogenase	5	22	5,87/ 6,19	30,47/ 30,43	NI	0,936 ± 0,318	NI

Enzimas putativas	470	Serino protease MucD	3	10	7,04/ 6,64	50,29/ 51,37	NI	1,08 ± 0,09	NI
Fatores secretados	275	Elastase LasB	7	21	6,28/ 6,13	53,65/ 33,15	-	6,22 ± 0,89	1,79 ± 0,69
Metabolismo energético	158	Oxidoredutase	9	40	5,36/ 5,60	36,45/ 37,05	-	1,387 ± 0,345	NI
	446	Subunidade beta da succinil-CoA sintetase	8	26	6,57/ 6,31	41,90/ 41,81	NI	4,892 ± 0,267	NI
	474	Subunidade alfa da FOF1ATP sintase	6	14	5,33/ 5,57	55,36/ 52,02	NI	2,485 ± 0,223	NI
	275	Subunidade alfa da succinil-CoA sintetase	3	14	6,00/ 6,13	30,29/ 33,15	-	6,22 ± 0,89	1,79 ± 0,69
	384	Subunidade E da NADH desidrogenase	3	25	5,01/ 5,12	18,08/ 19,30	NI	0,525 ± 0,04	NI
Motilidade e conexão	487	Proteína de montagem das fímbrias	7	14	6,40/ 5,68	79,07/ 74,25	NI	0,694 ± 0,024	NI
Parede celular/ LPS/ cápsula	30	Domínio LysM/ Proteína da superfamília BON	4	42	5,45/ 5,72	15,45/ 15,85	1,043 ± 0,643	4,780 ± 0,874	1,224 ± 0,708
Proteínas de membrana, transporte e secreção de moléculas	316	Proteína de efluxo da membrana externa	10	31	5,62/ 5,62	53,02/ 52,19	-	NI	1,37 ± 0,19
	306	Precursor da porina de membrana externa OprE induzido anaerobicamente	7	19	8,67/ 6,76	49,64/ 45,58	1,498 ± 0,554	NI	-
	454	Porina	5	13	6,56/ 6,60	46,68/ 43,74	NI	0,687 ± 0,065	NI
	417	Proteína de membrana externa	3	9	4,95/ 4,52	48,20/ 31,31	NI	1,068 ± 0,335	NI

Proteínas hipotéticas	71	Proteína hipotética HMPREF1030_04260	6	53	6,12/ 6,53	17,34/ 19,30	-	1,09 ± 0,26	0,27 ± 0,04
	213	Proteína hipotética PA39016_001160005	5	34	4,77/ 4,59	20,72/ 22,76	-	NI	1,99 ± 0,45
	349	Proteína hipotética PA1203	3	33	5,12/ 5,08	14,67/ 14,89	NI	0,66 ± 0,12	NI
	307	Proteína hipotética PA4858	6	22	5,73/ 5,61	46,22/ 45,67	-	3,794 ± 0,7	1,859 ± 0,148
	482	Proteína hipotética PA1494	4	8	5,71/ 5,90	60,61/ 60,39	NI	0,254 ± 0,025	NI
	396	Proteína hipotética PA14_19210	3	20	5,33/ 5,61	19,56/ 21,88	NI	0,313 ± 0,063	NI
Tradução, modificações pós-traducionais, enovelamento de proteínas, chaperonas	186	Chaperona molecular GroEL	5	13	5,04/ 5,48	57,05/ 52,72	0,184 ± 0,319	4,259 ± 1,066	NI
	368	Proteína de choque térmico IbpA	3	24	5,80/ 6,34	16,57/ 16,90	NI	0,493 ± 0,105	NI
	145	Fator de alongamento Ts	8	33	5,22/ 5,42	30,63/ 34,00	0,842 ± 0,993	4,309 ± 0,725	0,712 ± 0,210
	42	Proteína 50S ribossomal L9	5	44	5,47/ 5,77	15,52/ 16,79	0,98 ± 0,464	3,257 ± 0,529	-
	330	Proteína de alternância tiol:disulfeto DsbA	4	25	5,98/ 6,38	23,36/ 25,02	0,390 ± 0,090	1,855 ± 0,191	0,539 ± 0,078

*NI: Não identificado

Foi possível identificar 32 proteínas, as quais estão presentes em 31 spots diferencialmente expressos entre as condições de oxigenação testadas. Dentre estes spots, 22 se encontram diferencialmente expressos tanto entre as condições de oxigenação 1 x 4 mg O₂/L, quanto entre as condições 4 x 6 mg O₂/L. Outros 2 spots foram considerados diferencialmente expressos apenas entre as condições 1 x 4 mg O₂/L, e 7 spots foram diferenciais apenas entre as condições 4 x 6 mg O₂/L.

É interessante notar que, diferente dos resultados obtidos em frascos agitados, onde a maior parte das proteínas identificadas na fase exponencial eram exclusivas de células não submetidas a estresse oxidativo por peróxido, a maior parte dos spots identificados na fase exponencial em biorreator (18 spots) estava presente exclusivamente na condição de oxigenação igual a 4 mg O₂/L; condição esta que se apresentou mais favorável à produção de ramnolipídeos. Outros 5 spots são compartilhados com os três grupos experimentais, 2 spots são comuns às amostras de fermentações conduzidas com 1 e 4 mg O₂/L, e 3 spots são comuns às condições experimentais equivalentes a 4 e 6 mg O₂/L (Figura 5.15).

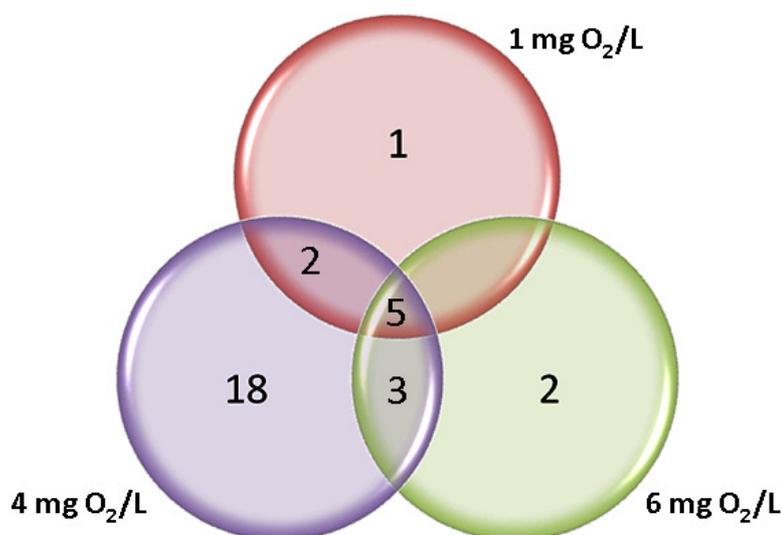


Figura 5.15 – Diagrama de Venn representando a ocorrência de spots diferencialmente expressos, comuns ou únicos às condições experimentais analisadas (1, 4 e 6 mg O₂/L), na fase exponencial de crescimento (20 h)

Os resultados obtidos demonstram que a manutenção de *P. aeruginosa* em diferentes condições de oxigenação em biorreator leva a uma expressão diferencial de proteínas ao longo da fase exponencial de crescimento. Foram identificadas, conforme exposto na Tabela 5.4, proteínas diferencialmente expressas distribuídas entre 12 classes funcionais, as quais incluem

mecanismos de adaptação e proteção, transporte e secreção de moléculas, proteínas de membrana e fatores secretados. Algumas destas proteínas apresentam relação direta com os mecanismos celulares de proteção em resposta ao estresse oxidativo como, por exemplo, superóxido dismutase, peroxirredoxina, peroxidase e a proteína quimiotática ligadora de purina.

Superóxido dismutases (SOD) são enzimas que catalisam a dismutação de dois radicais superóxidos, formados a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron durante a respiração aeróbia, em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (HASSETT et al., 1995). As SOD são consideradas de grande importância na proteção contra danos causados pelo oxigênio, e o aumento da tolerância ao estresse oxidativo está relacionado à ativação desta enzima (SCOTT; MESHNICK; EATON, 1987). Do mesmo modo, peroxirredoxinas e outras peroxidases são enzimas que possuem peróxidos como substrato e atuam na resposta ao estresse oxidativo causado pelo acúmulo das ROS.

A proteína quimiotática ligadora de purina, também chamada CheW, está inserida em um *cluster* gênico Che 1 (*cheYZABW*), o qual está envolvido com respostas quimiotáticas a aminoácidos e fosfato. Estudos demonstram que além desta função amplamente relatada na literatura, o *cluster* gênico Che 1 é necessário para o mecanismo de aerotaxia, caracterizado pelo movimento bacteriano de aproximação ou afastamento do oxigênio, de acordo com a concentração ideal para o metabolismo microbiano (HONG et al., 2004).

Conforme apresentado na Figura 5.6, durante a fase exponencial de crescimento de *P. aeruginosa* PA1 a OUR se apresenta gradativamente maior em fermentações conduzidas com maior concentração de oxigênio dissolvido, ou seja, fermentações conduzidas com 6 mg O₂/L apresentaram maior taxa global de consumo de oxigênio ao longo da fase exponencial de crescimento, seguida daquelas conduzidas com 4 mg O₂/L e 1 mg O₂/L. Apesar disso, a expressão de proteínas intracelulares relacionadas com a proteção ao estresse oxidativo se mostrou mais intensa ou exclusivamente identificada em fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L. Este resultado demonstra que os mecanismos de resposta ao estresse oxidativo por *P. aeruginosa* não são proporcionais ao consumo bruto de oxigênio por esta cepa ao longo de toda a faixa estudada, sugerindo haver outros fatores determinantes para o desencadeamento dos mecanismos de resposta ao estresse, os quais ainda não foram elucidados.

Um outro mecanismo homeostático universal que permite a sobrevivência de células a uma grande variedade de estresses ambientais é a resposta de choque térmico, a qual evoluiu para evitar o mal enovelamento e a agregação de proteínas (FUJITA; AMEMURA; ARAMAKI, 1998). Amostras obtidas durante a fase exponencial em biorreatores operando com 4 mg O₂/L tiveram a expressão aumentada ou exclusiva de proteínas de choque térmico e envolvidas no

enovelamento de proteínas, as quais podem contribuir para a adaptação das células a esta condição de estresse. Por exemplo, a chaperona molecular GroEL está envolvida no enovelamento e montagem de diferentes polipeptídeos, assim como no transporte de algumas proteínas secretadas através das membranas (FUJITA et al., 1998). A proteína de choque térmico IbpA, identificada exclusivamente na condição igual a 4 mg O₂/L, se liga a proteínas desnaturadas e parcialmente enoveladas e as mantém em um estado de re-enovelamento, protegendo-as da agregação (KRAJEWSKI; NAGEL; NARBERHAUS, 2013). Além disso, IbpA está envolvida no re-enovelamento de agregados protéicos quando células são submetidas a estresse térmico (RATAJCZAK; ZIETKIEWICZ; LIBEREK, 2009) e oxidativo (MATUSZEWSKA et al., 2008).

A enzima DsbA, por sua vez, é requerida para a expressão de vários fatores de virulência, tais como elastase, exotoxina A, lipase e fosfatases alcalinas (HA; WANG; JIN, 2003). Portanto, sua superexpressão em amostras submetidas a 4 mg O₂/L pode estar diretamente relacionada com o aumento na expressão e secreção antecipada de elastases observada durante esta fase do cultivo nas referidas condições, quando comparada com as demais (Figura 5.13 e Tabela 5.4).

Além de proteínas expressas em resposta ao estresse oxidativo, diferentes proteínas de membrana, parede celular, secreção de moléculas e transporte foram identificadas. A proteína de montagem das fímbrias, uma porina, uma proteína de membrana externa, bem como uma proteína da superfamília BON com domínio LysM foram superexpressas ou identificadas exclusivamente na condição de oxigenação igual a 4 mg O₂/L. Já o precursor da porina de membrana externa OprE induzido anaerobicamente e a proteína de efluxo da membrana externa estavam presentes majoritariamente nas amostras provenientes de fermentações conduzidas com 1 e 6 mg O₂/L, respectivamente, o que evidencia o início da adaptação celular para a secreção e transporte de moléculas de forma diferenciada logo na fase exponencial de crescimento.

P. aeruginosa é conhecida por sua capacidade de se adaptar a diferentes condições de estresse ambiental, o que se deve aos mecanismos de defesa apresentados por esta bactéria (MACDONALD; KUEHNA, 2013). Este sistema de defesa inclui a secreção de diferentes moléculas, as quais são secretadas por vias que utilizam proteínas de membrana diferenciadas.

Durante a fase exponencial de crescimento, duas proteínas relacionadas com a virulência de *P. aeruginosa* foram identificadas superexpressas em amostras oriundas de fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L: a serino protease MucD e a elastase LasB. MucD é relatada como um regulador negativo da produção de alginato e um regulador positivo de estresse por choque térmico. Estudos demonstram que a inativação do gene *mucD* e a mutação de sua unidade proteolítica resultam na superprodução de alginato (BOUCHER et al., 1996; DAMRON; YU,

2011). Deste modo, a superexpressão de MucD em fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L sugere que esta proteína também pode atuar como um regulador positivo de estresse oxidativo em *P. aeruginosa*, tal qual observado em estudos realizados com outras espécies, como *Salmonella typhimurium* (GUTSCHE; REMMINGHORST; REHM, 2006). Além disso, a superexpressão de um regulador negativo para a produção de alginato é interessante sob o ponto de vista tecnológico, uma vez que este exopolissacarídeo está relacionado com a formação de biofilme e a virulência em *P. aeruginosa* (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

A elastase, enzima codificada pelo gene *lasB*, é uma metaloprotease neutra que requer zinco para sua ação enzimática e cálcio para sua estabilidade. Apresenta a capacidade de degradar elastina, componente principal do tecido pulmonar e fundamental para sua elasticidade (BLEVES et al., 2010; OLSON; OHMAN, 1992). Assim como ramnolipídeos, a elastase é um fator de virulência cuja produção é regulada pelos sistemas QS *las* e *rhl*. Sua expressão intracelular aumentada na condição igual a 4 mg O₂/L, durante a fase exponencial de crescimento, está de acordo com o perfil de elastase secretada pelas células, cuja atividade apresenta valores máximos nesta condição experimental, em aproximadamente 24 horas de cultivo (Figura 5.13).

Três proteínas envolvidas com a biossíntese de aminoácidos, cofatores e carreadores foram identificadas, identificadas exclusivamente em amostras oriundas de fermentações realizadas com 4 mg O₂/L: a proteína seril t-RNA sintetase, a subunidade regulatória da acetolactato sintase 3, e a polinucleotídeo fosforilase. Esta expressão diferencial pode estar relacionada com a adaptação das células, ao longo da fase exponencial, para a intensa secreção de proteínas observada principalmente na fase estacionária de crescimento, em fermentações conduzidas nesta condição experimental. A proteína acetolactato sintase 3, em especial, também foi identificada nos estudos realizados por Reis e colaboradores (2010), mais intensamente expressa em condições produtoras de ramnolipídeos. Deste modo, a presença desta proteína exclusivamente expressa em fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L reforça a interpretação de que esta seria uma condição mais favorável à produção de ramnolipídeos.

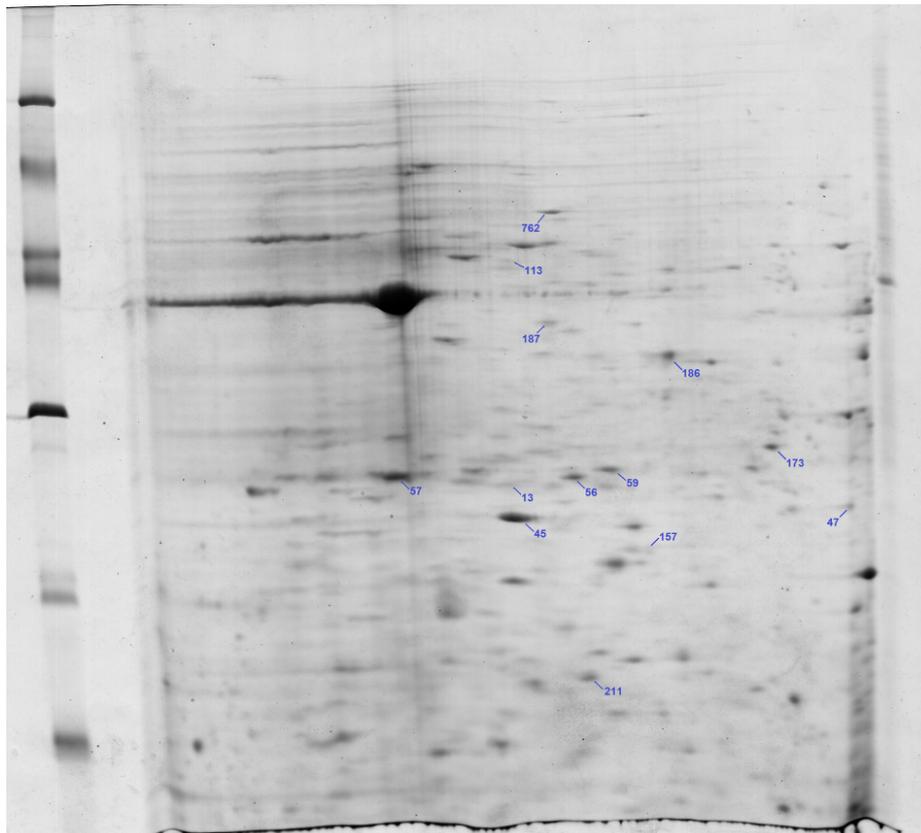
Proteínas relacionadas com o catabolismo de compostos carbônicos e metabolismo energético, tais como 3-hidroxiisobutirato desidrogenase, as subunidades alfa e beta da succinil-CoA sintetase e a subunidade E da NADH desidrogenase também foram identificadas neste trabalho. No caso da succinil-CoA sintetase, a superprodução de suas subunidades pode ser uma forma de compensar a perda de grupamentos Fe-S, devido aos danos causados pelo estresse oxidativo, conforme demonstrado no caso de *P. fluorescens* exposta a alumínio (LEMIRE; MAILLOUX et al., 2010). É interessante notar que ambas as proteínas se encontravam

superexpressas na condição igual a 4 mg O₂/L, o que demonstra que não apenas as rotas metabólicas de utilização da energia gerada, conforme discutido anteriormente, mas também as vias utilizadas para geração de energia podem ser distintas nas diferentes condições experimentais testadas.

De um modo similar à análise proteômica realizada em amostras provenientes da fase exponencial de crescimento, proteínas intracelulares de cada condição experimental testada foram extraídas no início da fase estacionária (72 h) e num momento mais tardio (120 h). As amostras foram submetidas a uma 2DE-PAGE e as imagens dos géis foram analisadas comparativamente a fim de identificar as proteínas diferencialmente expressas.

As Figuras 5.16 e 5.17 apresentam os perfis eletroforéticos representativos de cada condição experimental testada após 72 e 120 horas de cultivo, respectivamente, onde podem ser observados os spots diferencialmente expressos identificados por espectrometria de massas. Nas Tabelas 5.5 e 5.6 estão apresentados os referidos spots e as proteínas neles presentes, respectivamente, no início da fase estacionária (72 h) e num momento mais tardio (120 h).

(A)



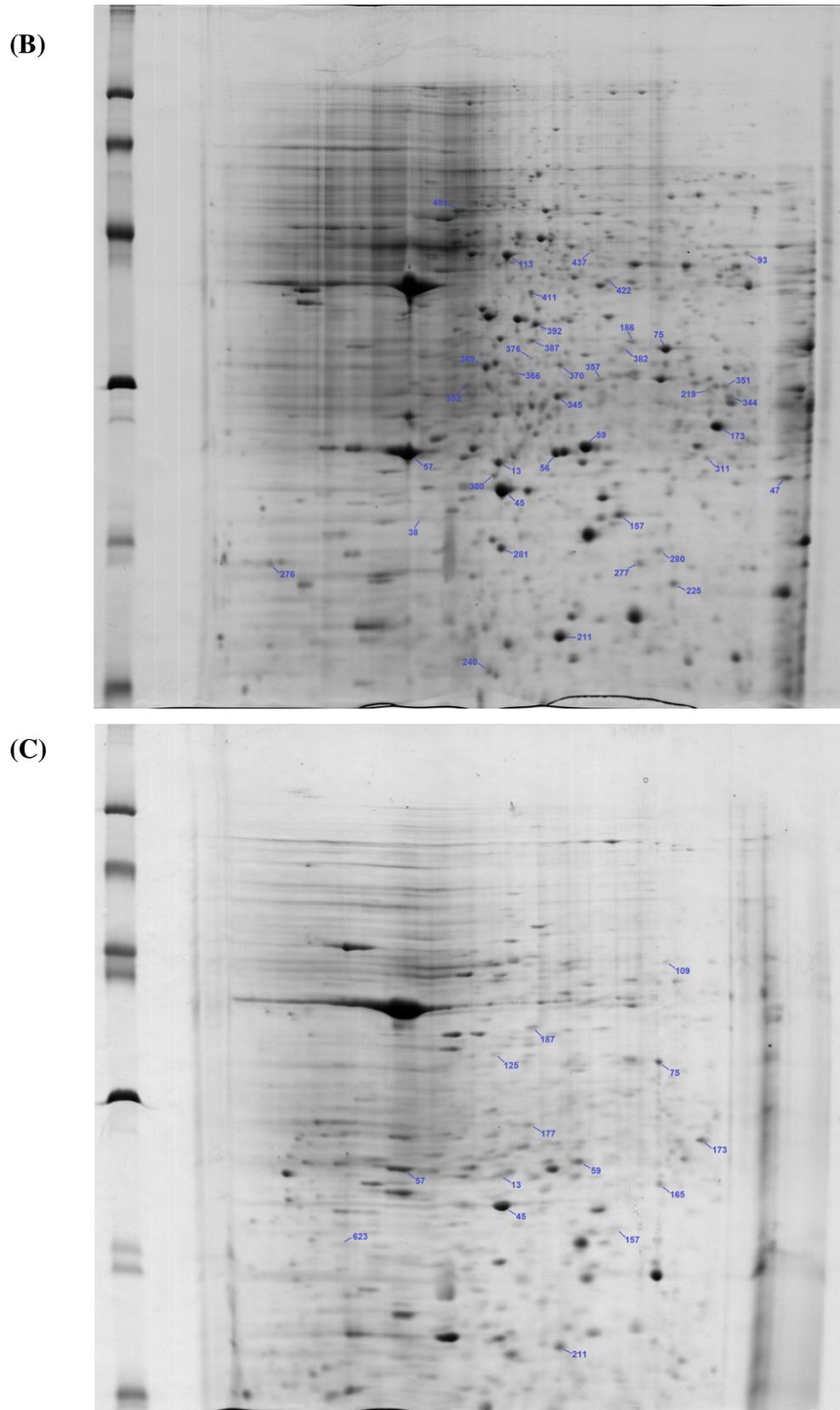


Figura 5.16 – Perfis eletroforéticos representativos de amostras intracelulares extraídas no início da fase estacionária de crescimento (72 horas), em diferentes condições de oxigenação em biorreator: (A) 1 mg O₂/L, (B) 4 mg O₂/L e (C) 6 mg O₂/L

Tabela 5.5 – Identificação de proteínas com expressão alterada em *P. aeruginosa* cultivada em biorreator com concentração de oxigênio igual a 1, 4 ou 6 mg O₂/L. Extratos protéicos foram obtidos após 72 h de cultivo (início da fase estacionária de crescimento). As classes funcionais foram atribuídas de acordo com Stover *et al.* (2000) e os números dos *spots* se referem àqueles mostrados na Figura 5.16.

Classe funcional	Número do <i>spot</i>	Proteína	Número de peptídeos	Cobertura da sequência (%)	pI predito/ experimental	MM predito/ experimental	Volume absoluto do spot*		
							1mg O ₂ / L	4mg O ₂ / L	6mg O ₂ / L
Adaptação, proteção	281	Tiol peroxidase	6	34	5,16/ 5,46	17,22/ 19,71	NI	1,437 ± 0,180	NI
	173	Alquil hidroperóxido redutase	8	53	5,89/ 6,49	20,53/ 26,67	0,831 ± 0,272	4,216 ± 0,950	0,777 ± 0,080
	277		4		5,89/ 6,13	20,53/ 19,0	NI	0,684 ± 0,080	NI
	45	Superóxido dismutase	7	47	5,27/ 5,47	21,34/ 22,63	4,50 ± 1,59	11,29 ± 1,44	5,145 ± 1,652
	56	Peroxidase	3	22	5,37/ 5,73	21,81/ 25,11	1,179 ± 0,279	3,022 ± 0,197	-
Biossíntese de aminoácidos e metabolismo	369	Ornitina carbamoiltransferase	5	17	6,13/ 5,38	38,08/ 31,65	NI	1,190 ± 0,380	NI
	38	1-(5-fosforibosil)-5-[(5-fosforibosilamino) metilideneamino] imidazol-4-carboxamido isomerase	3	13	4,95/ 5,07	25,92/ 20,53	-	0,561 ± 0,132	NI

Catabolismo de compostos carbônicos	437	Rubredoxina redutase	4	19	5,50/ 5,88	40,59/ 44,0	NI	0,195 ± 0,062	NI
	357	3-hidroxiisobutirato desidrogenase	4	17	5,87/ 5,91	30,47/ 30,77	NI	0,494 ± 0,122	NI
	219	Isocitrato desidrogenase	5	12	5,10/ 6,45	45,55/ 29,82	NI	0,445 ± 0,101	-
Fatores secretados	186	Elastase LasB	9	22	6,28/ 6,10	53,57/ 33,75	1,335 ± 0,064	0,553 ± 0,137	-
	157	Proteína secretada Hcp	3	25	5,49/ 6,03	19,08/ 21,20	0,369 ± 0,320	1,522 ± 0,275	0,661 ± 0,142
Metabolismo de fosfolídeos e ácidos graxos	177	Desidrogenase de cadeia curta	5	31	5,26/ 5,62	27,37/ 27,61	-	NI	0,439 ± 0,129
Metabolismo de lipídeos; catabolismo	351	Enoil-CoA hidratase	6	25	6,02/ 6,52	29,88/ 30,25	NI	0,503 ± 0,107	NI
Metabolismo energético	75	Subunidade alfa da succinil-CoA sintetase	5	24	6,00/ 6,26	30,29/ 32,95	-	2,809 ± 0,434	0,645 ± 0,131
	382	Subunidade beta da succinil-CoA sintetase	3	9	6,57/ 6,02	41,90/ 33,40	NI	0,615 ± 0,164	NI
	451	Bifuncional aconitato hidratase 2/2-metilisocitrato desidratase	5	8	5,22/ 5,24	93,57/ 51,12	NI	1,528 ± 0,142	NI

	157	Fosfoenolpiruvato sintase	3	7	5,02/ 6,03	85,76/ 21,20	0,554 ± 0,025	1,522 ± 0,275	0,661 ± 0,142
Metabolismo intermediário central	370	UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase	3	13	5,74/ 5,73	31,11/ 32,14	NI	0,548 ± 0,100	NI
Modificações pós-traducionais, enovelamento de proteínas, chaperonas	13	Chaperona molecular GroEL	3	8	5,04/ 5,45	57,05/ 24,46	0,728 ± 0,149	2,035 ± 0,192	0,764 ± 0,134
Parede celular/ LPS/ cápsula	211	Domínio LysM/ Proteína da superfamília BON	6	57	5,45/ 5,74	15,45/ 15,96	0,914 ± 0,475	3,360 ± 0,588	0,789 ± 0,304
Proteínas de membrana, transporte e secreção de moléculas	762	Proteína de efluxo da membrana externa	9	32	5,62/ 5,68	53,02/ 51,15	0,900 ± 0,111	NI	-
	109	Precursor da porina de membrana externa OprE anaerobicamente induzido	5	13	8,67/ 6,31	49,64/ 43,48	-	NI	0,242 ± 0,042
	280	OprF	4	13	4,89/ 6,23	34,52/ 19,61	NI	0,637 ± 0,088	NI
	93	Porina	6	16	6,56/ 6,61	46,68/ 43,70	-	0,190 ± 0,062	NI

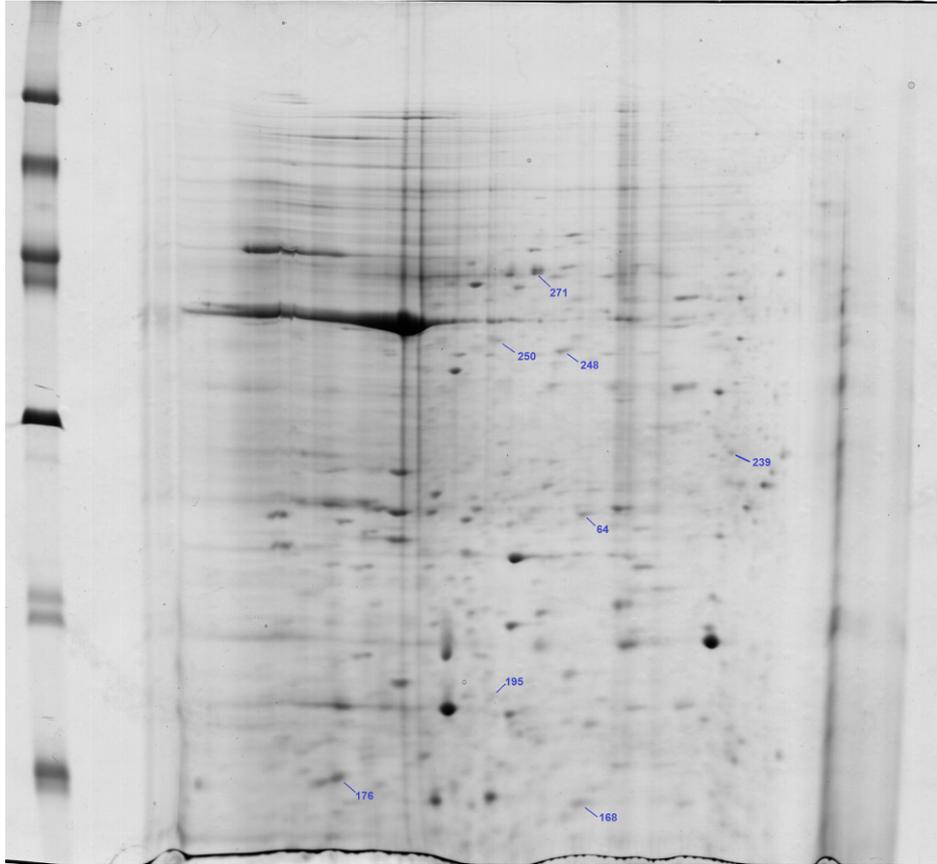
Proteínas hipotéticas	113	Proteína hipotética PA39016_001160004	4	41	4,82/ 5,49	20,42/ 43,17	0,161 ± 0,164	2,934 ± 0,903	-
	57		5		4,82/ 5,0	20,42/ 25,06	6,067 ± 3,484	24,605 ± 5,605	5,122 ± 1,111
	165	Proteína hipotética PA1677	6	43	6,05/ 6,27	21,02/ 23,51	-	NI	0,514 ± 0,170
	240	Proteína hipotética PA5339	4	47	5,10/ 5,42	13,60/ 14,82	NI	0,799 ± 0,288	NI
	311	Proteína hipotética PA14_56370	3	16	5,65/ 6,45	21,04/ 24,87	NI	0,302 ± 0,106	NI
	57	Proteína hipotética PA39016_001160005	4	27	4,77/ 5,0	20,72/ 25,06	6,066 ± 3,484	24,605 ± 5,605	5,122 ± 1,111
	47	Proteína hipotética PA1579	5	28	7,71/ 6,82	22,10/ 23,38	0,342 ± 0,298	1,461± 0,161	NI
	187	Proteína hipotética PA3250	5	17	5,92/ 5,65	38,26/ 36,42	0,574 ± 0,145	NI	0,486 ± 0,124
	352	Proteína hipotética PA4858	3	9	5,73/ 5,29	46,22/ 30,17	NI	0,569 ± 0,095	NI
	623	Proteína hipotética PA3309	3	27	5,50/ 4,76	16,49/ 20,27	-	NI	0,507 ± 0,122
	366	Proteína hipotética PA4352	5	23	5,92/ 5,51	30,95/ 31,25	NI	0,774 ± 0,249	NI
	344	Proteína hipotética PA0943	4	20	7,77/ 6,54	27,17/ 29,41	NI	0,572 ± 0,156	NI

	422	Proteína hipotética PA0084	3	7	5,19/ 5,95	55,74/ 40,44	NI	0,452 ± 0,019	NI
Reguladores transcricionais	157	Proteína regulatória bifuncional pirimidina PyrR/ uracil fosforibosil transferase	5	37	5,56/ 6,03	18,66/ 21,20	0,369 ± 0,320	1,522 ± 0,275	0,661 ± 0,142
	186	Regulador negativo para a biossíntese de alginato MucB	4	21	5,81/ 6,09	34,55/ 33,75	1,336 ± 0,064	0,553 ± 0,137	-
Resposta ao estresse; mecanismos de transdução de sinal	59	Proteína de resistência ao telurito TerZ	7	49	5,35/ 5,86	21,20/ 25,46	1,199 ± 0,488	6,207 ± 1,431	0,861 ± 0,270
Secreção de proteínas	276	Preproteína translocase subunidade SecB	4	35	4,46/ 4,35	18,13/ 18,96	NI	0,626 ± 0,158	NI
Tradução, modificações pós-traducionais, degradação	125	Fator de alongamento Ts	5	20	5,22/ 5,45	30,63/ 33,22	-	NI	0,579 ± 0,150
Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	300	Polinucleotídeo fosforilase	4	6	5,07/ 5,42	75,41/ 23,75	NI	0,789 ± 0,081	NI
Transporte de aminoácidos e metabolismo	113	Cadeia ramificada do transportador de aminoácidos ABC	6	22	5,60/ 5,49	39,74/ 43,17	0,161 ± 0,164	2,934 ± 0,903	-

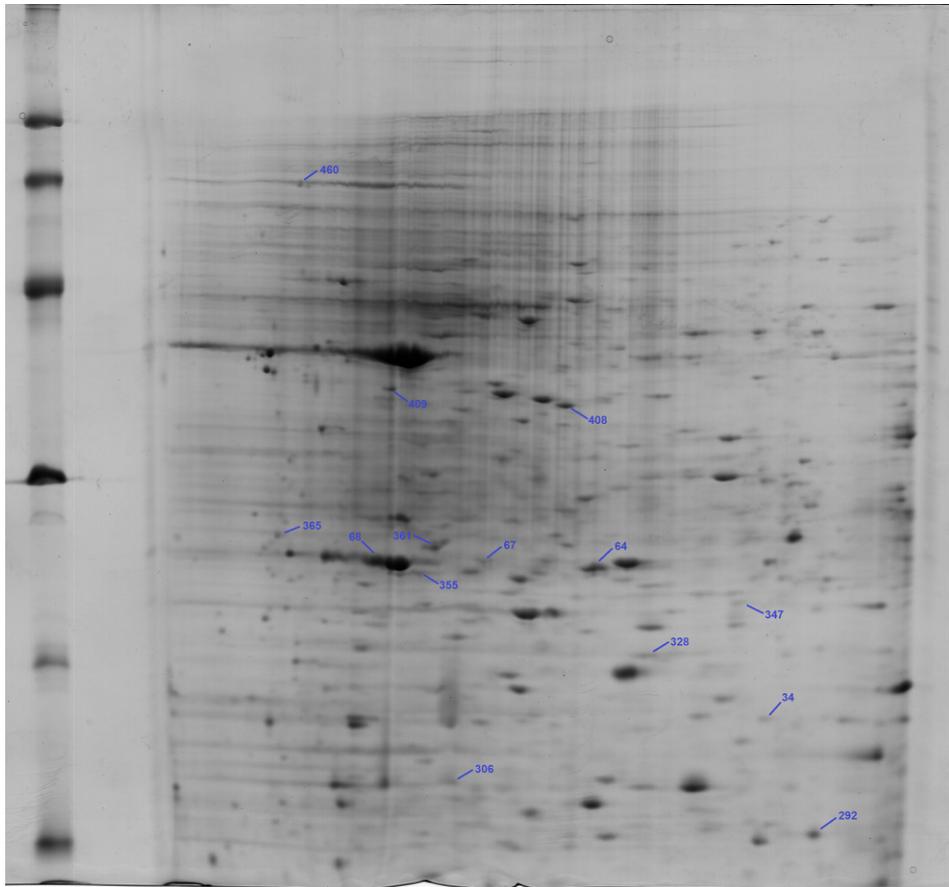
	411	Transportador de poliamina	5	19	5,51/ 5,59	40,04/ 39,14	NI	0,459 ± 0,139	NI
Transporte de pequenas moléculas	225	Proteína reguladora da captação de ferro	3	29	5,62/ 6,30	15,22/ 18,07	NI	0,777 ± 0,056	-
	345	Proteína de ligação à arginina/ornitina AotJ	6	31	6,43/ 5,72	27,99/ 29,50	NI	1,433 ± 0,215	NI
	392	Transportador ABC da proteína de ligação ao substrato	6	23	6,34/ 5,61	39,74/ 35,79	NI	1,633 ± 0,525	NI
	387	3-mercaptopiruvato sulfurotransferase	4	25	5,35/ 5,60	30,58/ 34,20	NI	0,601 ± 0,147	NI
	376		3		5,35/ 5,59	30,58/ 32,62	NI	0,330 ± 0,070	NI

*NI: Não identificado

(A)



(B)



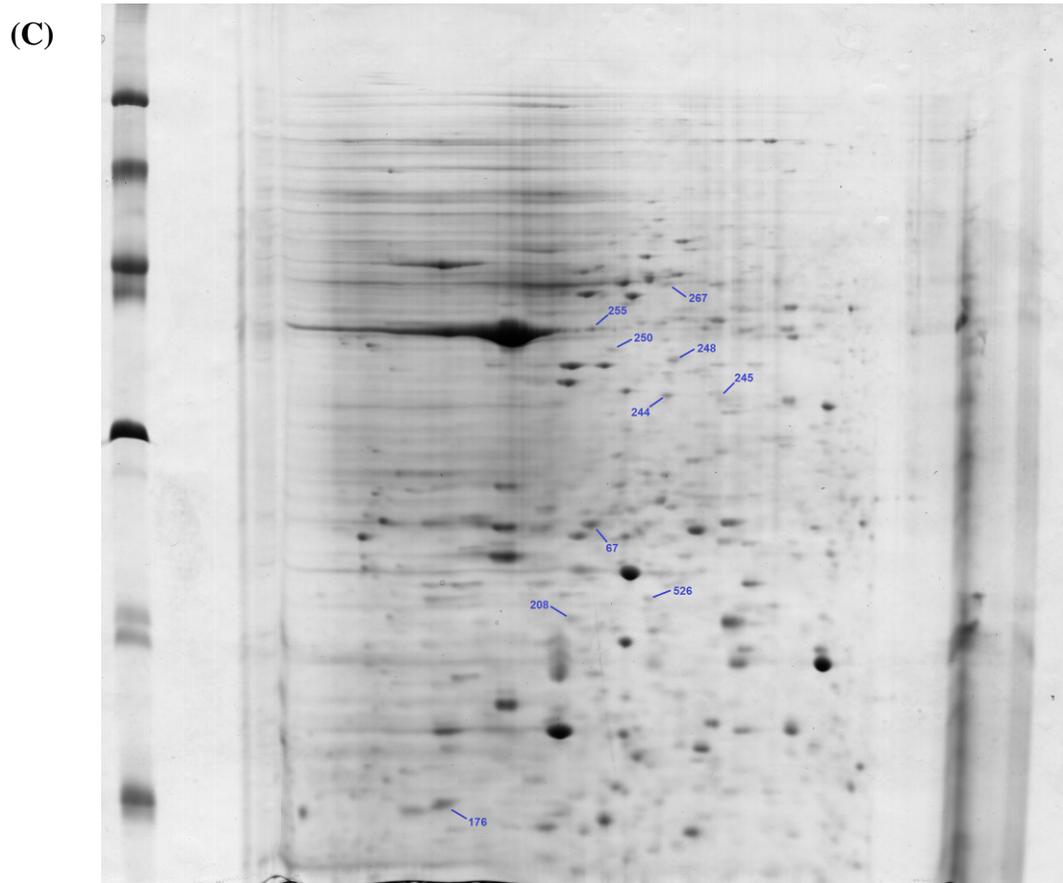


Figura 5.17 – Perfis eletroforéticos representativos de amostras intracelulares extraídas num momento tardio da fase estacionária de crescimento (120 horas), em diferentes condições de oxigenação em biorreator: (A) 1 mg O₂/L, (B) 4 mg O₂/L e (C) 6 mg O₂/L

Tabela 5.6 – Identificação de proteínas com expressão alterada em *P. aeruginosa* cultivada em biorreator com concentração de oxigênio igual a 1, 4 ou 6 mg O₂/L. Extratos protéicos foram obtidos após 120 h de cultivo (momento tardio da fase estacionária de crescimento). As classes funcionais foram atribuídas de acordo com Stover *et al.* (2000) e os números dos *spots* se referem àqueles mostrados na Figura 5.17.

Classe funcional	Número do <i>spot</i>	Proteína	Número de peptídeos	Cobertura da sequência (%)	pI predito/ experimental	MM predito/ Experimental	Volume absoluto do spot*		
							1mg O ₂ / L	4mg O ₂ / L	6mg O ₂ / L
Adaptação, proteção	64	Peroxidase	3	22	5,37/ 5,75	21,81/ 24,87	0,479 ± 0,417	2,850 ± 0,706	-
	292	Proteína osmoticamente induzível OsmC	4	35	6,10/ 6,59	14,63/ 15,22	NI	0,938 ± 0,346	NI
	34	Alquil hidroperóxido redutase	2	15	5,89/ 6,40	20,53/ 18,63	-	0,369 ± 0,089	NI
Biossíntese de aminoácidos e metabolismo	64	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase	4	14	5,98/ 6,59	53,63/ 15,22	0,479 ± 0,417	2,850 ± 0,706	-
Chaperonas e proteínas de choque térmico	365	Proteína de choque térmico GrpE	2	16	4,49/ 4,54	20,69/ 26,72	NI	0,541 ± 0,137	NI
Desconhecida	306	Lipídeo A 3-O-deacilase	3	20	5,87/ 5,20	18,40/ 16,56	NI	0,88 ± 0,164	NI
Enzimas putativas	67	Hidrolase	4	22	5,03/ 5,32	22,46/ 25,16	-	0,488 ± 0,158	1,200 ± 0,137
Fatores secretados	245	Elastase LasB	6	12	6,28/ 5,83	53,65/ 33,06	-	NI	0,809 ± 0,291

	460	Esterase	4	8	4,68/ 4,60	69,57/ 65,65	NI	0,708 ± 0,018	NI
Metabolismo de fosfolípídeos e ácidos graxos	355	Subunidade transportadora de biotina da acetil Co-A carboxilase	3	26	4,97/ 5,08	16,44/ 24,70	NI	1,094 ± 0,301	NI
Metabolismo energético	361	Subunidade alfa da FOF1 ATP sintase	3	8	5,33/ 5,12	55,36/ 26,09	NI	1,115 ± 0,081	NI
	347	Subunidade delta da FOF1 ATP sintase	3	20	5,78/ 6,30	19,25/ 23,48	NI	0,393 ± 0,053	NI
Motilidade e conexão	176	Subunidade estrutural do pili tipo IV	3	25	5,36/ 4,80	18,07/ 14,29	1,809 ± 0,259	NI	1,876 ± 0,020
Proteínas de membrana, transporte e secreção de moléculas	255	Porina	5	21	4,98/ 5,31	37,62/ 38,73	0,388 ± 0,347	NI	0,531 ± 0,126
	267	Proteína de membrana externa	4	14	5,74/ 5,63	45,55/ 43,64	-	NI	0,425 ± 0,142
Proteínas hipotéticas	526	Proteína hipotética PA3302	4	37	5,24/ 5,57	16,89/ 21,20	-	NI	0,291 ± 0,068
	195	Proteína hipotética PA4352	3	13	5,92/ 5,41	30,95/ 16,84	0,632 ± 0,096	NI	-
	208	Proteína hipotética PA1730	3	7	5,30/ 5,28	52,58/ 20,17	-	NI	0,596 ± 0,118
	271	Proteína hipotética PA4858	3	9	5,73/ 5,56	46,22/ 44,62	1,160 ± 0,212	NI	-

	248	Proteína hipotética PA3250	3	10	5,92/ 5,65	38,26/ 36,37	0,524 ± 0,038	NI	0,529 ± 0,016
	409	Proteína hipotética PA14_52020	3	20	5,00/4,97	36,68/ 36,38	NI	0,858 ± 0,181	NI
Replicação do DNA, recombinação, modificação e reparo	328	Proteína de ligação a fita simples de DNA	3	21	5,46/ 5,96	18,55/ 21,02	NI	0,832 ± 0,276	NI
Resposta ao estresse; mecanismos de transdução de sinal	68	Proteína C de resistência a agentes químicos	4	25	4,77/ 4,92	20,70/ 25,14	-	4,145 ± 1,04	NI
		Proteína de resistência ao telurito TerE	3	19	4,82/ 4,92	20,41/ 25,14			
Tradução, modificações pós-traducionais, degradação	239	Endopeptidase IV	3	12	6,45/ 6,32	48,18/ 28,48	0,287 ± 0,054	NI	0,173 ± 0,030
Transporte de aminoácidos e metabolismo	168	Proteína reguladora de nitrogênio P-II 2	4	39	5,41/ 5,77	12,28/ 13,77	0,604 ± 0,171	NI	-
Transporte de pequenas moléculas	244	3-mercaptopiruvato sulfurotransferase	5	25	5,35/ 5,63	30,58/ 33,14	-	NI	0,662 ± 0,226
	408	Proteína de ligação ao substrato componente do transportador ABC	5	20	6,34/ 5,63	39,74/ 35,40	NI	1,553 ± 0,559	NI

*NI: Não identificado

Durante o início da fase estacionária de crescimento, após 72 horas de cultivo, foram identificadas 48 proteínas, as quais estavam presentes em 46 spots diferencialmente expressos entre as condições de oxigenação testadas. As proteínas identificadas foram distribuídas em 19 diferentes classes funcionais, incluindo mecanismos de adaptação e resposta ao estresse, chaperonas, proteínas de membrana e envolvidas em mecanismos de transporte (Tabela 5.5). Em 120 horas de cultivo, por sua vez, foram identificadas 28 proteínas, distribuídas em 26 spots diferencialmente expressos entre as condições testadas. Dentre as classes funcionais nas quais estão agrupadas as referidas proteínas, encontramos aquelas envolvidas com mecanismos de resposta ao estresse, transporte de moléculas e metabolismo.

Na Figura 5.18 estão representados os diagramas de Venn, que indicam a ocorrência de spots diferencialmente expressos, comuns ou únicos às condições experimentais analisadas, em dois momentos distintos, ao longo da fase estacionária de crescimento. Neles podem ser observados perfis de distribuição de spots bastante semelhantes àquele apresentado para as amostras extraídas após 20 horas de cultivo, na fase exponencial de crescimento. Tanto após 72 quanto 120 horas de cultivo a maior parte dos spots diferencialmente expressos estava presente exclusivamente na condição de oxigenação igual a 4 mg O₂/L.

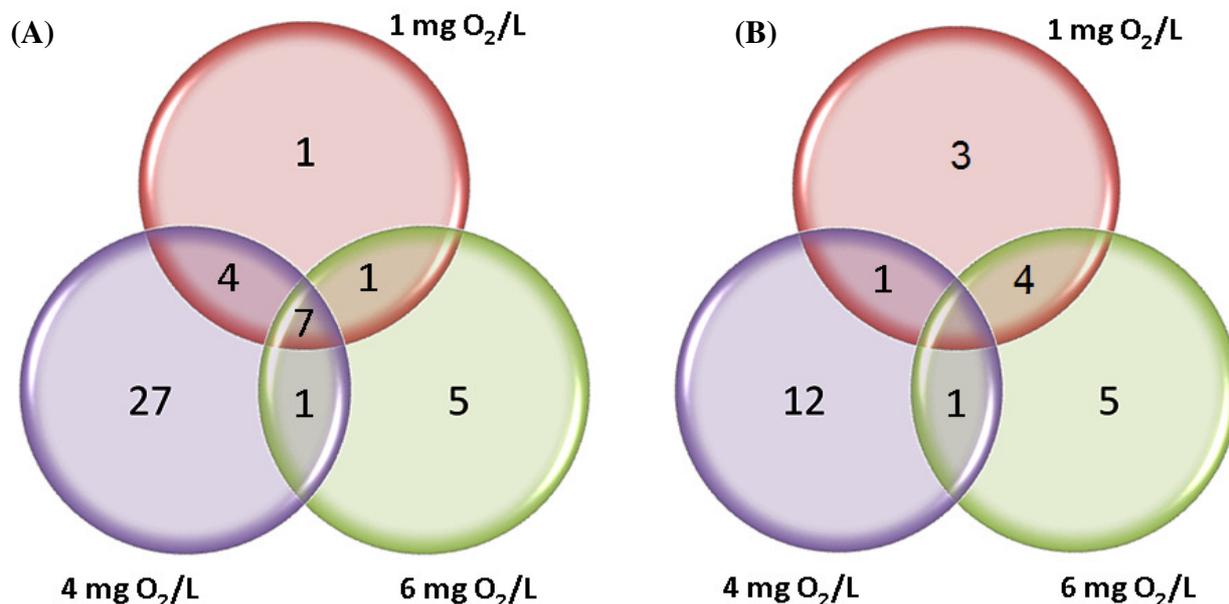


Figura 5.18 – Diagrama de Venn representando a ocorrência de spots diferencialmente expressos, comuns ou únicos às condições experimentais analisadas (1, 4 e 6 mg O₂/L), na fase estacionária de crescimento, após 72 (A) e 120 (B) horas de cultivo

É interessante notar que a expressão de proteínas de adaptação e resposta ao estresse na fase estacionária mantém um perfil muito semelhante ao apresentado na fase exponencial de crescimento. Além da superóxido dismutase e da peroxidase, também presentes em amostras provenientes da fase exponencial, foram identificadas após 72 horas de cultivo as proteínas tiol peroxidase e alquil hidroperóxido redutase (Ahp) (Tabela 5.5). Do mesmo modo, em amostras extraídas com 120 horas de cultivo também foram identificadas as proteínas peroxidase e Ahp, além da proteína osmoticamente induzível OsmC; todas superexpressas ou exclusivamente identificadas em células mantidas a 4 mg O₂/L (Tabela 5.6).

A identificação de uma Ahp em amostras retiradas após 72 e 120 horas de cultivo coincide com momentos de produção mais intensa de ramnolipídeos (Figura 5.11) e vai ao encontro de resultados obtidos na primeira etapa deste estudo, em frascos agitados. Conforme dito anteriormente, a síntese e Ahp é regulada pelo regulador transcricional OxyR em resposta ao estresse oxidativo, o qual também regula a mobilidade celular e a produção de ramnolipídeos por um mecanismo ainda desconhecido (OCHSNER et al., 2000; VINCKX et al., 2010). Deste modo, este resultado fornece mais uma evidência da possível relação existente entre Ahp e a produção de ramnolipídeos por meio da co-regulação por OxyR, sob condições de estresse oxidativo.

Amostras mantidas a 4 mg O₂/L e extraídas após 120 horas de cultivo apresentaram também a identificação exclusiva da proteína osmoticamente induzível OsmC. Trata-se de uma proteína com expressão induzida por estresse, predominante na fase estacionária de crescimento e reportada por estar direta ou indiretamente envolvida na defesa contra o estresse oxidativo (ATICHARTPONGKUL et al., 2001). Em *E. coli*, a expressão de OsmC é ativada por meio do fator sigma de fase estacionária RpoS (YIM; BREMS; VILLAREJO, 1994), o qual também está presente em *P. aeruginosa* atuando na resposta a diferentes condições de estresse (SUH et al., 1999) e, possivelmente, relacionado com a ativação da produção de ramnolipídeos. Isto porque os operons *rhlAB* e *rmlBDAC*, diretamente envolvidos com a síntese de ramnolipídeos, têm sido demonstrado serem supra regulados ou ativados por RpoS (AGUIRRE-RAMÍREZ et al., 2012; MEDINA; JUÁREZ; DÍAZ et al., 2003), o que sugere uma possível co-regulação de OsmC e dos operons *rhlAB* e *rmlBDAC* por RpoS. Além disso, OsmC foi recentemente identificado, por meio de estudos proteômicos, com expressão reduzida em cepas de *P. aeruginosa* mutantes para OxyR (VINCKX et al., 2011), sugerindo que além de regular a expressão de Ahp e a produção de ramnolipídeos, conforme dito anteriormente, OxyR também atua na regulação da expressão de OsmC.

Existe uma íntima relação entre o metabolismo do ferro e o estresse oxidativo. Isto porque o ferro, além de ser um elemento indispensável para a sobrevivência das células, participando como cofator de muitas enzimas metabólicas, também promove a formação de radicais hidroxil, através das reações de Fenton, os quais causam danos aos componentes celulares. Assim, células procarióticas e eucarióticas contam com sistemas de regulação que asseguram a absorção de ferro suficiente para satisfazer suas necessidades fisiológicas e, ao mesmo tempo, minimizam sua toxicidade (ZHENG et al., 1999).

Em células procarióticas, o fator de transcrição denominado regulador da captação de ferro (Fur) regula negativamente a captação de ferro do ambiente (BRAUN, 1997). Em *E. coli*, por exemplo, sabe-se que Fur é controlado positivamente por OxyR (ZHENG et al., 2001). Embora existam poucos estudos referentes à expressão de Fur em resposta ao estresse oxidativo em *P. aeruginosa*, a relação entre sistemas de captação de ferro e mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo já foram evidenciadas (VINCKX; MATTHIJS; CORNELIS, 2008).

No presente estudo a proteína reguladora da captação de ferro Fur foi identificada em amostras extraídas após 72 horas, em fermentações mantidas a 4 mg O₂/L. Esta identificação sugere que um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo utilizados por *P. aeruginosa* inclui a ativação de Fur mediante regulação positiva por OxyR.

Além de proteínas envolvidas com mecanismos de adaptação, duas proteínas de resistência ao telurito foram identificadas: TerZ e TerE, superexpressas em amostras extraídas de fermentações mantidas a 4 mg O₂/L em 72 e 120 horas de cultivo, respectivamente. Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja bem descrito e não se saiba se estas proteínas desempenham outros papéis além da resistência a compostos contendo telúrio, a manutenção de vários conjuntos independentes de genes que conferem resistência ao telurito em diferentes microrganismos indica que eles podem desempenhar importante papel na sobrevivência destas espécies (TAYLOR, 1999). Além disso, estudos realizados em *E. coli* sugerem que a enzima superóxido dismutase, bem como enzimas redutoras de grupamento tiol (glucationa redutase e tiorredoxina redutase) e seus metabólitos (tiorredoxina, glutarredoxina e glucationa, por exemplo) estão envolvidas na resistência ao telurito (TURNER; WEINER; TAYLOR, 1995). Portanto, é possível que a superexpressão de proteínas envolvidas com o estresse oxidativo nesta etapa do estudo, tais como a tiol peroxidase e a superóxido dismutase, estejam relacionadas com mecanismos de ativação da expressão de proteínas de resistência ao telurito, embora ainda não se saiba o papel desempenhado por estas proteínas em bactérias cultivadas na ausência de compostos contendo telúrio.

Células oriundas da fase estacionária de crescimento também apresentaram a expressão diferencial de chaperonas e proteínas de choque térmico, tais como a chaperona molecular GroEL, identificada após 72 horas de cultivo, a proteína de choque térmico GrpE e uma proteína de resistência a agentes químicos, identificadas em 120 horas de cultivo. GroEL é uma proteína conhecida por desempenhar importante papel na montagem, transporte e secreção de vários produtos extracelulares, sob condições de estresse (FUJITA et al., 1998). Portanto, a superexpressão desta proteína em fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L pode ser justificada como um mecanismo de adaptação celular à exposição ao estresse oxidativo. GrpE, por sua vez, têm sido descrita por atuar no sistema regulatório central da resposta ao choque térmico. Além disso, estudos realizados por Dubern e colaboradores (2005) demonstraram que GrpE está envolvida na regulação positiva da produção de putisolvina, um biosurfactante do tipo lipopeptídeo produzido por *P. putida*. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários para conhecer as vias de ativação da produção de biosurfactantes por GrpE, a superexpressão desta proteína em *P. aeruginosa* mantida a 4 mg O₂/L, condição considerada mais favorável à produção de ramnolipídeos, torna interessante uma análise mais aprofundada acerca do eventual papel desta proteína sobre a regulação positiva da produção de ramnolipídeos.

Diferente das vias metabólicas diretamente envolvidas com a produção de ramnolipídeos, pouco se tem descrito a respeito da forma como estas moléculas são transportadas para o meio extracelular. Estudos realizados por Wilhelm e colaboradores (2007) sugeriram que este transporte pode ser mediado pela proteína EstA, uma esterase que se autotransporta para a face extracelular da membrana externa e permanece ligada covalentemente a esta membrana. Os autores demonstraram que a deficiência nesta proteína resulta na ausência de ramnolipídeo, entre outros fatores de virulência, no meio extracelular. Do mesmo modo, a superexpressão de EstA acarreta um aumento significativo na secreção de ramnolipídeos, o que os levou a propor que EstA possivelmente atua como translocador deste surfactante para fora da célula. Em concordância com estes resultados, amostras retiradas após 120 horas apresentaram uma esterase exclusivamente identificada em fermentações mantidas a 4 mg O₂/L, o que também está de acordo com dados anteriormente apresentados neste estudo, demonstrando que esta seria a condição mais favorável para a produção e secreção de ramnolipídeos. Somada a esta discussão, foi identificado em amostras extraídas na fase estacionária de crescimento um regulador negativo para a biossíntese de alginato MucB, superexpresso em amostras mantidas a 1 mg O₂/L, mas também presente em amostras extraídas de fermentações com 4 mg O₂/L (Tabela 5.5).

Estudos realizados com diferentes hidrolases demonstram que a esterase EstA, bem como a elastase LasB podem influenciar, direta ou indiretamente, na composição e propriedades físico-

químicas de substratos poliméricos extracelulares (EPS) (TIELEN et al., 2010). Dentre os constituintes de EPS estão proteínas, alginato, expopolissacarídeos e DNA extracelular, os quais podem estar envolvidos em processos de formação e manutenção de biofilmes (RYDER; BYRD; WOZNIAK, 2007). Tielen e colaboradores (2010) demonstraram que a superexpressão de *estA* e *lasB* leva não apenas ao aumento na concentração extracelular de ramnolipídeos, com o aumento nos níveis de monoramnolipídeos, mas também eleva a quantidade de carboidratos e reduz a concentração de alginato secretado, resultando no aumento da hidrofobicidade e viscosidade de EPS. Deste modo, a presença do regulador negativo MucB para a biossíntese de alginato em amostras extraídas da fase estacionária de crescimento está de acordo com estes estudos e representa um resultado interessante no que diz respeito à aplicação dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* em biorremediação. Isto porque, sendo o alginato um fator de virulência, sua ausência no meio extracelular é desejável do ponto de vista biotecnológico.

A expressão diferencial de elastases na fase estacionária de crescimento também vai ao encontro dos estudos realizados por Tielen e colaboradores (2010), conforme anteriormente relatado. Além disso, a elastase é um fator de virulência cuja produção é regulada pelos sistemas QS *las* e *rhl*, assim como ocorre para a produção de ramnolipídeos (REIS et al., 2011), o que justifica sua presença em condições produtoras de ramnolipídeos. É interessante notar também que após 120 horas de cultivo não foi identificada a expressão intracelular de elastases em fermentações conduzidas com 4 mg O₂/L, o que está de acordo com o perfil de secreção de elastases apresentado na Figura 5.13, caracterizado por apresentar atividades bem próximas a zero a partir de 120 horas de cultivo.

Apesar de a via metabólica de secreção de ramnolipídeos ainda ser pouco conhecida, as proteínas identificadas no presente trabalho envolvidas no processo de transporte de moléculas podem ser de especial interesse. Amostras extraídas na fase estacionária de crescimento, momento no qual a produção de ramnolipídeos ocorre com maior intensidade, tiveram a expressão diferencial de várias proteínas de membrana, transporte e secreção de moléculas. Dentre elas estão porinas, proteínas de membrana externa, o precursor da porina de membrana OprE, a proteína OprF, bem como uma proteína da superfamília BON com domínio LysM, a qual também foi identificada em amostras extraídas na fase exponencial de crescimento, superexpressa na condição de oxigenação igual a 4 mg O₂/L. A expressão diferencial de cada uma destas proteínas, majoritariamente presentes em condições distintas de oxigenação, evidencia a influência exercida pela oferta de oxigênio no meio sobre o metabolismo e secreção de diferentes moléculas por *P. aeruginosa*.

Dentre as proteínas de membrana identificadas na fase estacionária de crescimento destaca-se a presença da proteína OprF, a qual já havia sido identificada na fase estacionária de crescimento em experimentos conduzidos em frascos agitados, submetidos a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. Conforme dito anteriormente, OprF é uma proteína que regula sua permeabilidade de acordo com as condições de crescimento, tendo sido reportada por estar envolvida na liberação de fatores de virulência por *P. aeruginosa* (FITO-BONCOMPTE et al., 2011; JAOUEN et al., 2004). Além disso, estudos demonstram que mutantes para OprF apresentam produção reduzida de ramnolipídeos, devido a níveis mais baixos de expressão do RNAm que codifica para as enzimas RhlA e RhlB (BOUFFARTIGUES et al., 2011). Deste modo, os resultados obtidos nesta etapa do estudo confirmam aqueles apresentados em frascos agitados e sugerem que a identificação exclusiva de OprF na fase estacionária, em células mantidas a 4 mg O₂/L, está relacionada com a secreção de ramnolipídeos e seus co-reguladores transcricionais.

Diversas proteínas envolvidas com transporte e secreção de moléculas foram identificadas na fase estacionária de crescimento, incluindo a proteína de ligação à arginina/ornitina AotJ e a subunidade SecB da preproteína translocase, presentes em amostras extraídas após 72h de cultivo. Outros exemplos incluem a proteína 3-mercaptopiruvato sulfotransferase e o transportador ABC da proteína de ligação ao substrato, presentes tanto em 72 quanto em 120 horas de cultivo.

Transportadores ABC pertencem à superfamília de proteínas periplásmicas de ligação ao substrato. Estas proteínas atuam na captação de nutrientes no periplasma e no transporte destes substratos para o citoplasma, por meio de um mecanismo dependente de ATP. Para muitos destes transportadores ABC, o substrato específico de ligação permanece desconhecido ou apenas previsto, com base na homologia de sequências com sistemas existentes em outras bactérias (IMPERI et al., 2009). De um modo semelhante, a proteína de ligação à arginina/ornitina AotJ é codificada por um gene inserido no operon *aot*, o qual está envolvido no transporte destes aminoácidos. Em condições aeróbias, a arginina pode ser utilizada por *P. aeruginosa* como única fonte de carbono, energia, e nitrogênio, (NISHIJYO et al., 1998), o que sugere a utilização diferencial de substratos por esta bactéria em condições distintas de oxigenação.

A subunidade SecB da preproteína translocase faz parte do sistema de secreção Sec (general secretory pathway), ou via secretora geral, a qual atua na exportação de proteínas através da membrana plasmática. SecB, uma proteína chaperona dependente de ATP, atua no reconhecimento de pré-proteínas, que ainda não estão na conformação final, para sua posterior

associação com a proteína SecA, uma ATPase que impulsiona a exportação da cadeia polipeptídica através da membrana interna (MA et al., 2003). Portanto, a identificação exclusiva de SecB em amostras extraídas após 72 horas, mantidas a 4 mg O₂/L, sugere a utilização de um sistema de secreção de proteínas diferente das demais condições analisadas, por meio de sistemas de secreção dos tipos II e V, os quais são Sec-dependentes.

Amostras extraídas no início da fase estacionária, após 72 horas de cultivo, também apresentaram a superexpressão da proteína Hcp em amostras retiradas de fermentações mantidas a 4 mg O₂/L. Hcp é uma pequena proteína constituinte do recentemente descoberto sistema de secreção do tipo IV e, embora sua função ainda não seja claramente definida, proteínas relacionadas com este sistema de secreção apresentam, possivelmente, a função de mediar a exportação celular de fatores de virulência (MOUGOUS et al., 2006).

Foram identificadas como diferencialmente expressas na fase estacionária de crescimento diversas proteínas envolvidas no catabolismo de compostos orgânicos, metabolismo de aminoácidos, fosfolipídeos, metabolismo intermediário central e energético. Alguns exemplos são a ornitina carbamoiltransferase, as subunidades alfa e beta da succinil-CoA sintetase, isocitrato desidrogenase, bem como a proteína fosfoenolpiruvato sintase, todas expressas em amostras obtidas após 72 horas de cultivo. Após 120 horas foram identificadas a proteína reguladora de nitrogênio P-II 2, metilmalonato semialdeído desidrogenase, a subunidade transportadora de biotina da acetil-CoA carboxilase, bem como as subunidades alfa e delta da F₀F₁ ATP sintase. A maior parte destas proteínas se encontrava superexpressa ou exclusivamente identificada em células mantidas a 4 mg O₂/L, o que demonstra a intensa atividade metabólica destas células nesta condição experimental, sobretudo ao longo da fase estacionária de crescimento.

A enzima fosfoenolpiruvato sintase, em especial, foi reportada recentemente como superexpressa em *P. fluorescens* submetida a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, tendo como consequência o aumento dos níveis de piruvato na célula. Este aumento, segundo os autores, poderia ser explorado no desenvolvimento de tecnologias destinadas à síntese de surfactantes, aditivos alimentares e farmacêuticos (BIGNUCOLO et al., 2013). De um modo semelhante, a proteína isocitrato desidrogenase também se mostrou superexpressa em *P. fluorescens* submetida a condições de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, o que está de acordo com os dados obtidos neste trabalho (LEMIRE; MILANDU et al., 2010).

Por fim, amostras oriundas da fase estacionária de crescimento também apresentaram expressão diferencial de proteínas relacionadas com motilidade, tradução, modificações

tradicionais e degradação, entre as quais se destacam a subunidade estrutural do pili tipo IV e a endopeptidase IV, ambas expressas em amostras extraídas após 120 horas de cultivo.

A pili apresenta papel fundamental na motilidade por *twitching*, por se anexar à superfície e posteriormente retrair, puxando a célula para mais perto do local de fixação. Ademais, trabalhos reportam que a proteína pili tipo IV, assim como ramnolipídeos, atua como facilitadora da motilidade por *swarming* (CAIAZZA; SHANKS; O'TOOLE, 2005), caracterizado por um movimento multicelular das bactérias através de uma superfície. Sua identificação em amostras extraídas após 120 horas de cultivo pode estar relacionada com a baixa concentração de nitrogênio no meio de cultura. Isto porque em condições de excesso de nitrogênio o *operon* pilin (*pilABCD*), responsável pela transcrição da pili tipo IV, tem seus níveis de transcrição reduzidos, prevenindo o *swarming* por *P. aeruginosa*. Ao contrário, condições limitantes de nitrogênio favorecem a transcrição da pili, por meio de um mecanismo regulado pelo fator sigma RpoN, o qual regula também o metabolismo de nitrogênio (KOHLENER et al., 2000).

A endopeptidase IV é uma protease reportada em *P. aeruginosa* PAO1, uma cepa hospitalar, por degradar surfactantes pulmonares em pacientes com fibrose cística, sendo considerado um fator de virulência da bactéria (MALLOY et al., 2005). Deste modo, a presença desta proteína após 120 horas de cultivo, em células mantidas a 1 e 6 mg O₂/L, pode ser parcialmente responsável pela concentração reduzida de ramnolipídeos presentes nestas condições experimentais, quando comparada àquela mantida a 4 mg O₂/L. No entanto, estudos mais aprofundados referentes à validação experimental do envolvimento desta proteína em processos de degradação de ramnolipídeos se tornam necessários, a fim de confirmar esta possível relação.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a concentração de oxigênio no meio de cultura pode ser um fator crucial para o estabelecimento de um bioprocessamento eficiente e viável economicamente. Além disso, os dados apresentados corroboram com estudos prévios, que sugerem o envolvimento de ramnolipídeos na proteção contra o estresse oxidativo (SABRA et al., 2002).

Resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho demonstraram que a exposição de *P. aeruginosa* ao peróxido de hidrogênio, em frascos agitados, resulta em uma condição de estresse oxidativo, caracterizado pela expressão diferencial de proteínas intracelulares. Foram identificadas 18 proteínas diferencialmente expressas entre as condições tratada e não-tratada com peróxido, as quais estão potencialmente envolvidas nas vias de produção e secreção de ramnolipídeos, bem como de resposta ao estresse oxidativo.

Experimentos conduzidos em biorreator operando em condições controladas e constantes de oxigenação permitiram investigar em que medida a concentração de oxigênio dissolvido no meio é capaz de influenciar positivamente a produção de ramnolipídeos, assim como a expressão protéica em *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos sugerem que a condição de oxigenação igual a 4 mg O₂/L demonstra ser mais favorável ao bioprocessamento, tanto no que diz respeito à produtividade quanto à expressão de proteínas potencialmente relacionadas com as vias metabólicas e fisiológicas de produção de ramnolipídeos.

A reduzida concentração de elastases e proteases alcalinas ao final do processo de cultivo favorecem o uso do meio contendo ramnolipídeos para aplicações ambientais. No entanto, a expressão diferencial de proteínas ao longo deste trabalho demonstra que a produção de ramnolipídeos, elastases e proteases são aparentemente reguladas de um modo semelhante, o que torna necessário o desenvolvimento de estratégias moleculares que maximizem a produção de ramnolipídeos em detrimento de outros fatores de virulência. Esta estratégia é especialmente importante para permitir a aplicação ambiental deste produto removendo a etapa de purificação, a qual frequentemente atua como um fator limitante para o desenvolvimento de um bioprocessamento viável economicamente (BANAT et al., 2010).

A superexpressão de proteínas identificadas em condições de estresse oxidativo, incluindo aquelas relacionadas com sistemas de secreção e mecanismos de adaptação, potencialmente relacionadas com a produção de ramnolipídeos, poderá contribuir para futuros

estudos com vistas ao conhecimento da importância fisiológica destas proteínas, dentro do contexto da produção de ramnolipídeos.

PUBLICAÇÕES

Artigos científicos:

PACHECO, G. J.; REIS, R. S.; FERNANDES, A. C. L. B.; ROCHA, S. L. G.; PEREIRA, M. D.; PERALES, J.; FREIRE, D. M. G. (2012). Rhamnolipid production: effect of oxidative stress on virulence factors and proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 95, p. 1519-1529.

PEREIRA, A. G.; PACHECO, G. J.; TAVARES, L. F.; NEVES, B. C.; KRONEMBERGER, F. A.; REIS, R. S.; FREIRE, D. M. G. (2013). Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. *Process Biochemistry*, v.48 (9), p. 1271-1278.

Capítulo de livro:

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. (2013). Biosurfactants: Production and Applications, *Biodegradation - Life of Science*, Dr. Rolando Chamy (Ed.), ISBN: 978-953-51-1154-2, InTech, DOI: 10.5772/56144. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biosurfactants-production-and-applications>

REFERÊNCIAS

- ACS Committee on Analytical Reagents. Colorimetry and Turbidimetry. Reagent Chemicals: Specifications and Procedures.** American Chemical Society.: Oxford University Press: 32-41 p. 2006.
- AGUIRRE-RAMÍREZ, M. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor sigma S. **Microbiology**, v. 158, n. 4, p. 908-916, 2012.
- ALAGAPPAN, G.; COWAN, R. M. Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene. **Chemosphere**, v. 54, n. 8, p. 1255-65, Feb 2004.
- AMÉZCUA-VEGA, C. et al. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 237-240, 2007.
- ARHIN, A.; BOUCHER, C. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. **Microbiology**, v. 156, n. 5, p. 1415-23, May 2010.
- ATICHARTPONGKUL, S. et al. Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. **Microbiology**, v. 147, n. 7, p. 1775-1782, 2001.
- BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, May 2000.
- BANAT, I. M. et al. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 80-88, 1991. ISSN 0959-3993.
- BARBER, W. P.; STUCKEY, D. C. Nitrogen removal in a modified anaerobic baffled reactor (ABR): 1, denitrification. **Water Research**, v. 34, n. 9, p. 2413-2422, 2000.
- BAYSSE, C. et al. Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2529-42, Aug 2005.
- BIGNUCOLO, A. et al. Hydrogen peroxide stress provokes a metabolic reprogramming in *Pseudomonas fluorescens*: Enhanced production of pyruvate. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 309-315, 2013.
- BLEVES, S. et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 534-543, 2010.

- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1-2, p. 41-52, 1999.
- BOUCHER, J. C. et al. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 2, p. 511-523, 1996.
- BOUFFARTIGUES, E. et al. The Major Outer Membrane Protein Oprf is Required for Rhamnolipid Production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 2, n. 118, p. 1-5, 2011.
- BRAGA, G. U. L.; MESSIAS, C. L.; VENCOVSKY, R. Estimates of genetic parameters related to protease production by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 1, p. 6-12, 1994.
- BRASIL. Decreto nº 2.870, de 10 de Dezembro de 1998. Promulga a Convenção Internacional sobre Preparo, Resposta e Cooperação em Caso de Poluição por Óleo, assinada em Londres, em 30 de novembro de 1990: Diário Oficial da União. 238: 2 p. 1998.
- BRAUN, V. Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 8, p. 779-786, 1997.
- BRENCIC, A. et al. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. **Molecular Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 434-45, Aug 2009.
- BROWN, S. M. et al. Cloning and characterization of the katB gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: Purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6536-6544, 1995.
- CAIAZZA, N. C.; SHANKS, R. M. Q.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7351-7361, 2005.
- CALFEE, M. W. et al. Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 878-882, 2005.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520-9, Nov 1998.
- CAMPOS-GARCIA, J. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4442-51, Sep 1998.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 157, n. 1, p. 1-11, Jan 2009.

- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501-5, Dec 1947.
- CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 161-169, 2012.
- CHOI, M. H. et al. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Comparative ¹³C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 30-42, 2011.
- COSTA, S. G. V. A. O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 21 1999.
- DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.
- DAMASCENO, F. R. C.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 241-246, 2012.
- DAMRON, F. H. et al. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* regulon controlled by the sensor kinase KinB and sigma factor RpoN. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 6, p. 1317-1330, 2012.
- DAMRON, F. H.; YU, H. D. *Pseudomonas aeruginosa* MucD regulates the alginate pathway through activation of MucA degradation via MucP proteolytic activity. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 1, p. 286-291, 2011.
- DATYNER, A. Surfactants in textile processing. **Surfactants science series**, v. 14, 1983.
- DE ARAUJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 481-488, 2011.
- DEKIMPE, V.; DÉZIEL, E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: The transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. **Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 712-723, 2009.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- DÉZIEL, E. et al. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 998-1014, Feb 2005.

_____. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1440, n. 2-3, p. 244-52, Sep 22 1999.

_____. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2005-2013, 2003.

DHAMOON, A. S.; KOHN, E. C.; AZAD, N. S. The ongoing evolution of proteomics in malignancy. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 17-18, p. 700-708, 2007.

DIGGLE, S. P. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 29-43, 2003.

DUBERN, J. F. et al. The heat shock genes dnaK, dnaJ, and grpE are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 5967-5976, 2005.

EGGERS, C. T. et al. The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase. **Biochemical Journal**, v. 379, n. 1, p. 107-18, Apr 1 2004.

FAULKNER, M. J.; HELMANN, J. D. Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 1, p. 175-189, 2011.

FERNANDES, A. C. L. B. **Estudo de fatores de virulência e de estresse oxidativo na produção de biosurfactante do tipo rhamnolípido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1**. 2010. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química/ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 208-17, Jun 1992.

FITO-BONCOMPTE, L. et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1176-86, Mar 2011.

FREIRE, D. M. G. et al. Biosurfactants as Emerging Additives in Food Processing. In: (Ed.). **Innovation in Food Engineering**: CRC Press, 2009. p.685-705. (Contemporary Food Engineering).

FRICKE, B. et al. Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1454, n. 3, p. 236-250, 1999.

FUJITA, M.; AMEMURA, A.; ARAMAKI, H. Transcription of the groESL operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 237-242, 1998.

GAMBELLO, M. J.; KAYE, S.; IGLEWSKI, B. H. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1180-1184, 1993.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-85, Dec 2004.

GRUBER, T. et al. Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis. In: KOSARIC, N. (Ed.). **Biosurfactants, production, properties, applications**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.157-173.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 443-448, 1986.

GUINA, T. et al. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 7, p. 742-51, Jul 2003.

GUPTA, R.; GOBBLE, T. R.; SCHUSTER, M. GidA posttranscriptionally regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 18, p. 5785-5792, 2009.

GUTSCHE, J.; REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Biochemical analysis of alginate biosynthesis protein AlgX from *Pseudomonas aeruginosa*: purification of an AlgX-MucD (AlgY) protein complex. **Biochimie**, v. 88, n. 3-4, p. 245-251, 2006.

GYGI, S. P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.

HA, U. H.; WANG, Y.; JIN, S. DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1590-1595, 2003.

HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. **Febs Journal**, v. 276, n. 9, p. 2469-77, May 2009.

HAN, M. J. et al. Biotechnological applications of microbial proteomes. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 4, p. 341-9, Feb 15 2010.

HARE, N. J. et al. Proteomics of the oxidative stress response induced by hydrogen peroxide and paraquat reveals a novel AhpC-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3056-69, Aug 2011.

HASSETT, D. J.; SCHWEIZER, H. P.; OHMAN, D. E. *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6330-6337, 1995.

HÄUSSLER, S.; BECKER, T. The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, 2008.

HEO, Y. J. et al. The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 381-390, 2010.

HONG, C. S. et al. Chemotaxis proteins and transducers for aerotaxis in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, n. 2, p. 247-252, 2004.

HÖPER, D.; BERNHARDT, J.; HECKER, M. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1550-62, Mar 2006.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 395-418, 2003.

_____. **Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide.** Annual Review of Biochemistry. 77: 755-776 p. 2008.

IMPERI, F. et al. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1901-1915, 2009.

JAKOBI, G. et al. Detergents. In: (Ed.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Starch and Other Polysaccharides to Surfactants.** Weinheim, Germany: Wiley, v.A25, 1994.

JAOUEN, T. et al. Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6665-9, Nov 2004.

JENSEN, V. et al. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8601-8606, 2006.

KIM, E. J.; SABRA, W.; ZENG, A. P. Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2627-34, Sep 2003.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78-91, 2006.

KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S. Activation of SoxR-dependent transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biochemistry**, v. 136, n. 5, p. 607-615, 2004.

KOHLER, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 5990-5996, 2000.

KORENBLUM, E. et al. Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

KRAJEWSKI, S. S.; NAGEL, M.; NARBERHAUS, F. Short ROSE-Like RNA Thermometers Control *IbpA* Synthesis in *Pseudomonas* Species. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

KRONEMBERGER, F. D. A. **Produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas.** 2007. Tese (Doutorado). Coordenação dos Programas de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

KRONEMBERGER, F. D. A. et al. Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, n. 1-3, p. 33-45, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LAMONT, I. L. et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 7072-7077, 2002.

LEDGHAM, F. et al. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: Interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 199-210, 2003.

LEE, S. Y.; LEE, D. Y.; KIM, T. Y. Systems biotechnology for strain improvement. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 349-58, Jul 2005.

LEMIRE, J. et al. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1384-1390, 2010.

_____. Histidine is a source of the antioxidant, alpha-ketoglutarate, in *Pseudomonas fluorescens* challenged by oxidative stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 2, p. 170-177, 2010.

LÉPINE, F. et al. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, n. 1, p. 41-46, 2002.

LEQUETTE, Y. et al. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3365-3370, 2006.

LOH, K. C.; CAO, B. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*-A review of proteomics studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 1, p. 1-12, 2008.

MA, Q. et al. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1611, n. 1-2, p. 223-233, 2003.

MACDONALD, I. A.; KUEHNA, M. J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 13, p. 2971-2981, 2013.

MAIER, U.; LOSEN, M.; BÜCHS, J. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 3, p. 155-167, 2004.

MALLOY, J. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 288, n. 2, p. L409-L418, 2005. ISSN 1040-0605.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012.

MATUSZEWSKA, E. et al. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1739-1747, 2008.

MCKNIGHT, S. L.; IGLEWSKI, B. H.; PESCI, E. C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2702-2708, 2000.

MEDINA, G. et al. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. **Microbiology**, v. 149, n. 11, p. 3073-3081, 2003.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 1, p. 377-380, 2003.

MEDINA, G. et al. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhIR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 20, p. 5976-5983, 2003.

MOUGOUS, J. D. et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, v. 312, n. 5779, p. 1526-1530, 2006.

MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 479-489, 2005.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-15, Nov 2006.

MÜLLER, M. M. et al. Rhamnolipids-Next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 366-380, 2012.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

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

NAKAJIMA, A.; HOSHIKAWA, M.; NAKAE, T. Antibiotic stress induces a large amount of outer membrane protein in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, n. 2, p. 261-5, Aug 15 1998.

- NISHIJYO, T. et al. Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 21, p. 5559-5566, 1998.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 621-630, 2011.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.
- OCHSNER, U. A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19787-95, Aug 5 1994.
- OCHSNER, U. A. et al. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 16, p. 4533-4544, 2000.
- OKAMOTO, K. et al. Molecular cloning and characterization of the oprQ gene coding for outer membrane protein OprE3 of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Immunology**, v. 43, n. 3, p. 297-301, 1999.
- OLSON, J. C.; OHMAN, D. E. Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 12, p. 4140-4147, 1992.
- PACHECO, G. J. et al. Rhamnolipid production: effect of oxidative stress on virulence factors and proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 1519-1529, 2012.
- PALMA, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2958-2966, 2005.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-46, Jun 15 2000.
- PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, v. 33 Suppl, p. 311-23, Mar 2003.
- PEARSON, J. P.; PESCI, E. C.; IGLEWSKI, B. H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 18, p. 5756-67, Sep 1997.

- PERRON, K.; COMTE, R.; VAN DELDEN, C. DksA represses ribosomal gene transcription in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with RNA polymerase on ribosomal promoters. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1087-1102, 2005.
- PHAM, T. H.; WEBB, J. S.; REHM, B. H. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3405-13, Oct 2004.
- RABILLOUD, T.; CHARMONT, S. Detection of Proteins on Two-Dimensional Electrophoresis Gels. In: RABILLOUD, T. (Ed.). **Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods** Springer Verlag, 2000. p.109-110.
- RAHIM, R. et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 708-18, May 2001.
- RAHME, L. G. et al. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 24, p. 13245-50, 1997. ISSN 0027-8424.
- RATAJCZAK, E.; ZIETKIEWICZ, S.; LIBEREK, K. Distinct Activities of *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB Promote Efficient Protein Disaggregation. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 1, p. 178-189, 2009.
- REIS, R. S. **Estudo proteômico de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 durante a produção de rhamnolípido**. 2008. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química/ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- REIS, R. S. et al. Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1504-1510, 2010.
- _____. Biosurfactants: Production and Applications. In: CHAMY, R. (Ed.). **Biodegradation - Life of Science**: InTech, 2013. p.31-61. ISBN 978-953-51-1154-2.
- _____. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - A review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6377-6384, 2011.
- ROSEN, R.; RON, E. Z. Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 21, n. 4, p. 244-65, Jul-Aug 2002.
- RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNIAK, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 644-648, 2007.
- SABRA, W.; KIM, E. J.; ZENG, A. P. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. **Microbiology**, v. 148, n. 10, p. 3195-3202, 2002.
- SADOVSKAYA, I. et al. Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from

Pseudomonas aeruginosa serotype O5. **European Journal of Biochemistry**, v. 255, n. 3, p. 673-84, Aug 1 1998.

SANTA ANNA, L. M. M. et al. Biosurfactante e uso do mesmo em remediação de solos impactados por óleo. **Patente PI**, p. 0405952-2, 2004.

_____. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

_____. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 91-93, p. 459-467, 2001.

_____. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy oil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 7, p. 687-691, 2007.

SANTOS, A. S. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 98-100, p. 1025-1035, 2002.

SCOTT, M. D.; MESHNICK, S. R.; EATON, J. W. Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 8, p. 3640-3645, 1987.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

SINGH, S. et al. Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 437-444, 2008.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718-725, 2005.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 569-576, 1994.

STONE, K. L. et al. Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In: MATSUDAIRA, P. T. (Ed.). **A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing**: Academic Press 1989. p.31-34.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 2, p. 188-194, 1999. ISSN 1369-5274.

- STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959-964, 2000.
- SUH, S. J. et al. Effect of rpoS mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 13, p. 3890-3897, 1999.
- TAMBER, S.; OCHS, M. M.; HANCOCK, R. E. W. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 45-54, 2006.
- TAYLOR, D. E. Bacterial tellurite resistance. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 111-115, 1999.
- TIELEN, P. et al. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 2239-2252, 2010.
- TOTTEN, P. A.; CANO LARA, J.; LORY, S. The rpoN gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 389-396, 1990.
- TURNER, R. J.; WEINER, J. H.; TAYLOR, D. E. The tellurite-resistance determinants tehAtehB and klaAklaBtelB have different biochemical requirements. **Microbiology**, v. 141, n. 12, p. 3133-3140, 1995.
- VAN BOGAERT, I. N. A. et al. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23-34, 2007.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.
- VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 249-257, 1989.
- VINCKX, T.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P. Loss of the oxidative stress regulator OxyR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 impairs growth under iron-limited conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 288, n. 2, p. 258-265, 2008.
- VINCKX, T. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: Protective role of pyocyanin. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 678-686, 2010.
- _____. A proteome analysis of the response of a *Pseudomonas aeruginosa* OxyR mutant to iron limitation. **BioMetals**, v. 24, n. 3, p. 523-532, 2011.
- WADE, D. S. et al. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4372-4380, 2005.

- WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 146-154, 2005.
- WILHELM, S. et al. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 18, p. 6695-6703, 2007.
- WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 182-191, 2009.
- WOLF, C. et al. Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: Diverse responses to different oxidants. **Proteomics**, v. 8, n. 15, p. 3139-3153, 2008.
- YIM, H. H.; BREMS, R. L.; VILLAREJO, M. Molecular characterization of the promoter of *osmY*, an *rpoS*-dependent gene. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 100-107, 1994.
- ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2247-2251, 1995.
- ZHAO, G. et al. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 31, p. 27689-27696, 2002.
- ZHENG, M. et al. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 15, p. 4639-4643, 1999.
- _____. Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 15, p. 4571-4579, 2001.
- ZHU, K.; ROCK, C. O. RhIA converts b-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3147-3154, 2008.