

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS A PARTIR DE  
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

**INGRID YOSHIMURA**

**Rio Claro - SP**

**2022**



---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS A PARTIR DE  
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS**

**INGRID YOSHIMURA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Barros Lovaglio

Y65p

Yoshimura, Ingrid

Produção e caracterização de ramnolipídios a partir de substratos alternativos / Ingrid Yoshimura. -- Rio Claro, 2022

112 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Jonas Contiero

Coorientadora: Roberta Barros Lovaglio

1. Microbiologia industrial. 2. Biossurfactantes. 3. Subprodutos. 4. Purificação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

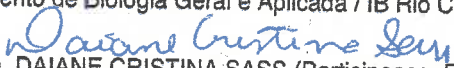
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção e caracterização de ramnolipídios produzidos a partir de substratos alternativos

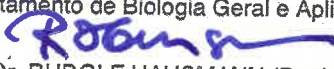
AUTORA: INGRID YOSHIMURA

ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

  
Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participação Presencial)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

  
Prof. Dr. RUDOLF HAUSMANN (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos / University of Hohenheim

Rio Claro, 14 de junho de 2022

Título alterado para: "Produção e caracterização de ramnolipídios a partir de substratos alternativos"

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, prof. Dr. Jonas Contiero. Sou grata por ter me recebido e ensinado com tanto entusiasmo. Grata por me mostrar o encantamento pela ciência, o interesse em ir além, a ter persistência nos objetivos e principalmente a ter empenho e paciência. Nunca deixou de acreditar em minha capacidade e nos resultados que obteríamos. Além de tudo, um grande exemplo de ser humano. Professor, sou extremamente grata pela convivência tão querida e por ter tido essa oportunidade.

Agradeço aos profissionais que fizeram parte da minha pesquisa: Profa. Dra. Roberta Barros Lovaglio, minha coorientadora, que me introduziu ao universo da microbiologia desde a iniciação científica e me ensinou a base necessária para que eu chegasse aqui. Aos professores Dra. Daiane Sass, Dra. Iolanda C. Silveira Duarte e Dr. Rudolf Haussman pelas participações no exame de qualificação e defesa da dissertação que aceitaram participar desses eventos com correções, auxílios e sugestões relevantes. E também agradeço à Profa. Daiane por ter me auxiliado com as análises em RMN e em diversas dúvidas frequentes. Ao Dr. Lucas Bragança, pela disponibilidade à distância em me auxiliar com os experimentos de complexação. E também, agradeço à Profa. Dra. Kelly Johana Dussan Medina, à Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, ao Prof. Dr. Alberto Camilo Alécio e ao Dr. Rodolfo Debone Piazza, que sanaram dúvidas, contribuíram para resolução de problemas e forneceram diferentes formas de amparo para essa pesquisa.

Em especial, agradeço imensamente aos profissionais Me. Adriano Uemura e Me. Renan Pirolla. Dri, obrigada por estar comigo em toda jornada do GC-MS, pesquisar, se dedicar aos problemas que surgiram durante as análises e solucionar tantos deles comigo. E Renan, por tudo que aprendi sobre o LC-MS, muito obrigada. Agradeço pelas muitas ligações de socorro atendidas, por ficar até as 23h para desenvolvimento do método comigo, por sanar tantas dúvidas de química! A presença de vocês foi primordial para que eu conseguisse utilizar esses equipamentos analíticos e o que aprendi foi extremamente importante.

Agradeço às agências de fomento pelas concessões das bolsas de mestrado e financiamento da pesquisa, ambos fundamentais para que essa pesquisa ocorresse. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001. E também com o apoio recebidos pelos processos 2020/06189-1 e 2017/22401-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial – Cinthia, Fernanda, Guilherme, Luciana, Matheus, Raphael e Vinícius (mesmo à distância). Obrigada pela parceria, pelos tantos cafezinhos da tarde (com bolo), pela experiência compartilhada e convivência. Em especial, aos queridos Lucas, Mateus, Ana Maria e Larissa. Lucas, agradeço por confiar em mim, por ter me auxiliado nas muitíssimas coletas da coluna, TLCs, algumas fermentações, mas principalmente e por ter assumido a responsabilidade e colaboração com meu projeto. Teteu, muitíssimo obrigada pela recepção nesse laboratório, companhia nos períodos solitários de pandemia. Sua paciência e boa vontade foram fundamentais nos meus primeiros meses de mestrado; Aninha, sua presença só me agregou nos meses que passamos juntas. Aprendi a ser uma pesquisadora melhor ao seu lado e sempre vou me inspirar em sua independência e dedicação. Obrigada pela empatia, paciência e amizade construída; E por último, à minha irmãzinha de laboratório (e vida!). Lari, obrigada por tudo! Pela convivência e confiança compartilhada. Por tantas reflexões, momentos de bobeira, risadas, por desabafar e ouvir meus desabafos. Por passar pelos dias tempestuosos ao meu lado e ser meu suporte. Sou muito grata e feliz pela nossa amizade e pelo tanto que aprendi com você!

Agradeço aos meus amigos que me deram apoio e me trouxeram leveza. Agradeço principalmente à Aline, Beverly, Leonardo, Stefani e Thayllon. Meninas e Leo, nosso grupinho foi meu porto seguro em muitos dias e a amizade de vocês vale ouro! E Thay, obrigada pelo apoio desde antes de eu sequer ter passado na prova de mestrado. Obrigada por acreditar em mim, pela compreensão e pelos auxílios em estatística – e em muitos outros momentos da vida. Vocês moram no meu coração.

Agradeço à minha psicóloga querida, Lorena Peixoto, pela escuta atenta, pela delicadeza e empatia. Por me trazer autoconhecimento e auxiliar no meu processo em ser uma melhor profissional.

Agradeço ao meu namorado, Pedro. Meu amor, obrigada por tanto nesse últimos meses! Pela companhia, pelos cuidados fornecidos e pela felicidade compartilhada. Obrigada por participar dessa pesquisa e aprender sobre quase todos os temas do meu estudo para discutir comigo. Obrigada pelo seu interesse, compreensão, dedicação e principalmente, pela paciência nos (muitos) dias difíceis.

Agradeço à minha família. Em especial, agradeço à minha vovó Anna, minha tia Vera e minhas primas Cláudia e Patrícia que sei que torcem por mim e me dão tanto carinho (mesmo à distância!). Muita sorte em ter mulheres como vocês como referência! E, aos grandes amores da minha vida, meus pais e meu irmão. Sou grata pela criação e educação que

recebi, grata por ter tido muito amor, por terem respeitado minhas escolhas e individualidade, por me darem liberdade, e sempre me incentivarem a melhorar. Fiz essa pesquisa por mim, mas só cheguei junto de vocês.

Por fim, agradeço imensamente a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização desse projeto.

*“Não é o crítico que importa, nem aquele que mostra como o homem forte tropeça, ou onde o realizador das proezas poderia ter feito melhor. Todo crédito pertence ao homem que está de fato na arena; cuja face está arruinada pelo suor, pela poeira e pelo sangue; aquele que luta com valentia; aquele que erra e tenta de novo; que conhece o grande entusiasmo, a grande devoção e se consome em uma causa justa; (...) e aquele que na pior das hipóteses, e falhar, ao menos falhará agindo excepcionalmente, de modo que seu lugar nunca seja junto àquelas almas frias e tímidas que não conhecem nem vitória nem derrota.”*

**Theodore Roosevelt**



## RESUMO

Biossurfactantes são substâncias sintetizadas por microrganismos e que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. Os ramnolipídios (RLs) são biossurfactantes da classe dos glicolipídios, que apresentam atividade de superfície elevada e maior rendimento de produção. Eles atuam em diferentes setores da indústria, mas não são amplamente utilizados devido ao seu alto custo de obtenção. Ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são constituídos por uma mistura de espécies homólogas, onde os mono-ramnolipídios e os di-ramnolipídios são predominantes. A razão entre esses homólogos resulta em diferentes propriedades e aplicabilidades para o composto, fato que pode ser influenciado pelas fontes de carbono utilizadas. Para aprofundar os estudos nesse âmbito, é interessante levar em consideração a contribuição individual de cada homólogo nas propriedades finais do ramnolipídio. Entretanto, tais análises são dependentes do desenvolvimento de metodologias de separação desses compostos. Dessa maneira, nessa pesquisa procurou-se estudar a produção de ramnolipídios a partir de dois substratos alternativos, o óleo da semente da goiaba e o d-limoneno, subprodutos provenientes da frutorrefinaria. Os objetivos foram obter maior rendimento desse metabólito, otimizar a produção através de planejamento experimental, caracterizar o RL produzido e desenvolver metodologias de separação das principais espécies homólogas. Os experimentos foram conduzidos em laboratório a partir de fermentações em frascos utilizando *P. aeruginosa* LBI 2A1. A caracterização do tensoativo ocorreu através de espectrometria de massas, testes de turbidez e tensão superficial e avaliação da atividade de emulsificação. A separação dos homólogos foi realizada através de cromatografia em coluna e complexos de inclusão. As fermentações realizadas com d-limoneno demonstraram baixa viabilidade para crescimento insipiente do microrganismo e baixa produção do metabólito. O óleo de semente de goiaba mostrou-se como uma fonte de carbono mais favorável para o crescimento microbiano e produção do biossurfactante, e por isso foi utilizado para realização de um delineamento central composto rotacional. As variáveis independentes foram: concentração da fonte de carbono e de nitrogênio. O delineamento mostrou que as variáveis nas formas quadráticas influenciaram na resposta, assim como a interação entre as mesmas ( $p < 0,05$ ). A variável mais significativa foi concentração de N. A análise de superfície de resposta indicou que as concentrações ótimas de C e N foram de 100 e 10 g/L, respectivamente e levaram à produção de 39,97 g/L de ramnolipídios, com predominância de mono-RL. A composição de espécies homólogas variou em relação à fonte de carbono utilizada e uma espécie homóloga de RL, de  $m/z$  555 (ainda não descrita na literatura) foi encontrada com a fonte óleo de semente de goiaba. Em relação aos testes de atividade de superfície, a concentração micelar crítica do RL diminuiu em soluções ácidas; a adição do propilenoglicol favoreceu a formação de agregados e o índice de emulsificação do RL foi favorecido por meios mais alcalinos. Por fim, na separação das espécies homólogas, os complexos de inclusão com a ciclodextrina mostram-se como uma metodologia potencial, mas ainda demonstraram a necessidade de um número maior de experimentos para sua confirmação. E, a separação em coluna cromatográfica possibilitou a eluição de mono-ramnolipídios com 99% de pureza.

**Palavras chave:** caracterização de homólogos, d-limoneno, óleo de semente de goiaba, *Pseudomonas aeruginosa*, purificação

## ABSTRACT

Biosurfactants are substances synthesized by microorganisms that have the ability to reduce surface and interfacial tension. Rhamnolipids (RLs) are biosurfactants of the glycolipid class, which have high surface activity and higher production yield. They operate in different sectors of the industry, but they are not widely used due to their high cost of obtaining. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* are composed of a mixture of homologous species, where mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids are predominant. The ratio between these homologs results in different properties and applicability for the compound, a fact that can be influenced by the carbon sources used. To deepen the studies in this area, it is interesting to consider the individual contribution of each homologue to the final properties of rhamnolipid. However, such analyzes are dependent on the development of methodologies for the separation of these compounds. Thus, this research sought to study the production of rhamnolipids from two alternative substrates, guava seed oil and d-limonene, by-products from the fructo-refinery. The aims were to obtain higher yields of this metabolite, optimize production through experimental planning, characterize the RL produced and develop methodologies for separating the main homologous species. The experiments were carried out in the laboratory using flask fermentations with *P. aeruginosa* LBI 2A1. The characterization of the surfactant occurred through mass spectrometry, turbidity and surface tension tests and evaluation of the emulsification activity. Separation of homologs was performed by column chromatography and inclusion complexes. Fermentations carried out with d-limonene showed low viability for incipient growth of the microorganism and low production of the metabolite. Guava seed oil proved to be a more favorable carbon source for microbial growth and biosurfactant production, and therefore it was used to perform a central composite rotational design. The independent variables were: carbon and nitrogen source concentration. The design showed that the variables in the quadratic forms influenced the response, as well as the interaction between them ( $p < 0.05$ ). The most significant variable was N concentration. The response surface analysis indicated that the optimal concentrations of C and N were 100 and 10 g/L, respectively, and led to the production of 39.97 g/L of rhamnolipids, predominantly of mono-RL. The composition of homologous species varied in relation to the carbon source used and a homologous species of RL, of m/z 555 (not yet described in the literature) was found with the source guava seed oil. Regarding the surface activity tests, the RL critical micellar concentration decreased in acidic solutions; the addition of propylene glycol favored the formation of aggregates and the RL emulsification index was favored by more alkaline media. Finally, in the separation of homologous species, the cyclodextrin inclusion complexes shows up as a potential methodology, but it still demonstrated the need for a greater number of experiments to confirm it. And, the chromatographic column separation allowed the elution of mono-rhamnolipids with 99% purity.

**Keywords:** d-limonene, guava seed oil, homologs characterization, *Pseudomonas aeruginosa*, purification.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Classificação dos surfactantes químicos e seus principais representantes. .... 18
- Figura 2** - Variação das propriedades físicas de solução em função da concentração de biosurfactante. .... 22
- Figura 3** - Estrutura das espécies homólogas de ramnolipídio. RL1 (duas moléculas de ramnose ligadas a duas moléculas de ácido graxo), RL2 (uma molécula de ramnose ligada a duas moléculas de ácido graxo), RL3 (duas moléculas de ramnose ligadas a uma molécula de ácido graxo) e RL4 (uma molécula de ramnose ligada a uma molécula de ácido graxo). .... 24
- Figura 4** - Estrutura do limoneno. .... 27
- Figura 5** - Perfil de crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meio com d-limoneno em diferentes concentrações. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação. .... 42
- Figura 6** - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em diferentes concentrações de d-limoneno nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h de fermentação. Os padrões de mono- (RL1) e di- (RL3) ramnolipídios foram utiliza... 43
- Figura 7** - Produção de mono- (RhaC10C10), di- (RhaRhaC10C10) e ramnolipídios total por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meios contendo diferentes concentrações de d-limoneno. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação. .... 45
- Figura 8** - Vias de bioconversão de limoneno por linhagens de *Pseudomonas*. .... 47
- Figura 9** - Crescimento microbiano (A) e produção de ramnolipídios (B) por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meios contendo diferentes concentrações de óleo de semente de goiaba. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação. .... 48
- Figura 10** - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em diferentes condições de fonte de carbono e nitrogênio. As amostras foram coletadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 h de fermentação. Os padrões de mono- (RL1) e di- (RL3) ramnolipídios foram utilizados para comparação dos spots. .... 50
- Figura 11** - Produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação. Os ensaios 9 – 12 estão representados pela média dos valores em E9. .... 51
- Figura 12** - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis [ ] fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em 96h de fermentação. .... 52

<b>Figura 13</b> - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de RL por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 em função das variáveis fonte de carbono e nitrogênio. ....	55
<b>Figura 14</b> - Perfil de crescimento e produção de metabólitos e consumo da fonte de carbono por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 referente aos ensaios 9-12 (variáveis codificadas = 0) do delineamento composto central rotacional. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas. ....	56
<b>Figura 15</b> - Consumo dos ácidos graxos oriundos do óleo residual de semente de goiaba por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação. ....	58
<b>Figura 16</b> - Análise de ramnolipídios por UPLC - MS realizado no modo SIR ( <i>Selected Ion Recording</i> ). (A) RL produzidos a partir de óleo de goiaba e (B) RL produzidos a partir de d-limoneno. ....	65
<b>Figura 17</b> - Fragmentação dos íons de ramnolipídios por ESI (-) MS/MS provenientes das amostras de RL por óleo de goiaba e d-limoneno. ....	66
<b>Figura 18</b> - Variação da tensão superficial das soluções contendo diferentes concentrações de ramnolipídios e valores de pH. ....	70
<b>Figura 19</b> - Efeito do pH e da adição de propilenoglicol (PG) (50,0 g/L) na turbidez das soluções de ramnolipídios (RL) (1,0 g/L). ....	73
<b>Figura 20</b> - Avaliação da atividade de emulsificação após 24 horas. A separação em linhas indica as fases hidrofílicas: água (controle), ramnolipídios, propilenoglicol e ramnolipídios + propilenoglicol, respectivamente. As colunas indicam os valores de pH ajustado. Em relação à fase hidrofóbica: (A) tubos contendo óleo de andiroba e (B) tubos contendo óleo de açaí. ....	76
<b>Figura 21</b> - Atividade de emulsificação (%) após 24 horas utilizando os óleos de andiroba e açaí. ....	77
<b>Figura 22</b> - Avaliação da estabilidade das emulsões nos tratamentos: soluções de RL e RL + PG utilizando os óleos de andiroba e açaí. Foram realizadas medições após 1, 2, 3, 10, 20 e 30 dias. ....	78
<b>Figura 23</b> - Delineamento o tamanho da emulsão da solução RL+PG em pH 6 e óleo de andiroba após 24 e 48 horas. ....	80
<b>Figura 24</b> - Análise da formação de complexos de inclusão por cromatografia em camada delgada. (A) amostras depositadas sem centrifugação. (B) amostras foram centrifugadas e depois depositadas. ....	88
<b>Figura 25</b> - Expansão do espectro da análise de RMN de <sup>1</sup> H da ciclodextrina em D <sub>2</sub> O. ....	90

<b>Figura 26</b> - Expansão do espectro da análise de RMN de $^1\text{H}$ da ciclodextrina com o RL realizada em $\text{D}_2\text{O}$ .....	90
<b>Figura 27</b> - Expansão do espectro da análise de RMN de $^1\text{H}$ do RL em $\text{D}_2\text{O}$ .....	91
<b>Figura 28</b> - Expansão do espectro da análise de RMN de $^1\text{H}$ do RL na presença da CD realizada em $\text{D}_2\text{O}$ .....	91
<b>Figura 29</b> - Expansão do espectro da análise de RMN de $^1\text{H}$ do mono-RL realizada em $\text{D}_2\text{O}$ . .....	92
<b>Figura 30</b> - Expansão do espectro da análise de RMN de $^1\text{H}$ do di-RL realizada em $\text{D}_2\text{O}$ .....	92
<b>Figura 31</b> - Estrutura química do di-ramnolipídio.....	93
<b>Figura 32</b> - Estrutura química da ciclodextrina. ....	93
<b>Figura 33</b> - Cromatografia em camada delgada das amostras 179, 185, 215, 248, 295, 323, 368, 405, 509, 420, 425, 429, 430 e 438 obtidas através da coluna de separação (A). Uma amostra do extrato de RL (E) também foi aplicado para comparação. ....	95
<b>Figura 34</b> - Cromatografia em camada delgada das amostras 415, 490, 565, 630, 700 e 750 obtidas através da coluna de separação (B). Uma amostra do extrato de RL (E) também foi aplicado para comparação. ....	96
<b>Figura 35</b> - Cromatografia em camada delgada de amostras coletadas na Coluna (B) contendo spots azuis que provavelmente indicam a presença de hidroxiácidos. ....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Importantes classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	20
<b>Tabela 2</b> - Composição da fração lipídica (%) do óleo da semente da goiaba, empregando-se n-hexano na extração. ....	26
<b>Tabela 3</b> - Concentração de óleos usados como fonte de carbono no bioprocessamento. ....	36
<b>Tabela 4</b> - Caracterização do óleo de limoneno proveniente da Citroflavor. ....	36
<b>Tabela 5</b> - Especificação dos níveis codificados e reais das variáveis fonte de carbono ( $X_1$ ) e fonte de nitrogênio ( $X_2$ ) utilizadas no planejamento DCCR 2 <sup>2</sup> empregado no cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 a 200 rpm, 37°C por 96 h. ....	38
<b>Tabela 6</b> - Matriz do planejamento DCCR 2 <sup>2</sup> contendo as condições de cultivo ( $X_1$ – fonte de carbono e $X_2$ – fonte de nitrogênio) em seus níveis codificados. ....	38
<b>Tabela 7</b> - Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença estatística para produção de mono-, di-RL e ramnolipídio total. Foram considerados significativos os parâmetros com valores de p menores do que 5 %. ....	46
<b>Tabela 8</b> - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1. Os meios foram compostos por óleo de semente de goiaba como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. As variáveis independentes estão representadas pelos níveis codificados e reais (entre parêntesis). As respostas correspondem a 96 h de fermentação. ....	50
<b>Tabela 9</b> - Ordenação crescente dos ensaios em relação à maior produção de ramnolipídios, demonstrando os níveis codificados e reais dos ensaios, a proporção carbono/nitrogênio em cada um deles e as respostas biomassa, ramnolipídios e fator de conversão produto/biomassa. ....	53
<b>Tabela 10</b> - Análise da variância (ANOVA) para a produção de RL por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR). ....	53
<b>Tabela 11</b> - Valores de produção de RL experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR. Valores referentes a produção de RL por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 em 96h de fermentação. ....	54
<b>Tabela 12</b> - Fator de conversão do produto em biomassa (g/g) e porcentagem de mono e di-ramnolipídios através do tempo de fermentação. ....	57
<b>Tabela 13</b> - Composição em ácidos graxos do óleo de semente de goiaba a partir de GC-MS. ....	58

<b>Tabela 14</b> - Ensaio avaliados nos testes de atividade de emulsificação indicando a fase hidrofílica e a fase hidrofóbica respectivamente das soluções. As soluções contendo água ultrapura e PG foram utilizadas como controle. ....	63
<b>Tabela 15</b> - Composição elementar das espécies homólogas encontradas no ramnolipídios produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando óleo de semente de goiaba como substrato. ....	64
<b>Tabela 16</b> - Composição das soluções utilizadas como fase na cromatografia em coluna para purificação de ramnolipídios, O tempo de coleta foi ~10 min para coluna (A) e ~15 min para coluna (B), contendo ajustes quando o fluxo demonstrava alterações. ....	85
<b>Tabela 17</b> - Seleção dos íons ( $m/z$ ) para realização do monitoramento de massas dentro do tempo de retenção esperado. ....	86
<b>Tabela 18</b> - Soluções preparadas para avaliação da formação de complexos de inclusão de ramnolipídios e ciclodextrina. ....	86
<b>Tabela 19</b> - Deslocamentos químicos nos espectros da ciclodextrina livre e na presença do RL. ....	90
<b>Tabela 20</b> - Caracterização por espectrometria de massas das amostras coletadas da coluna (A) de separação. Os íons verificados correspondem às espécies homólogas de ramnolipídios presentes do extrato. ....	97
<b>Tabela 21</b> - Caracterização por espectrometria de massas das amostras coletadas da coluna (B) de separação. Os íons verificados correspondem às espécies homólogas de ramnolipídios presentes do extrato. ....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Cromatografia gasosa
CMC	Concentração micelar crítica
CN	Caldo nutriente
D.O.	Densidade óptica
Di-RL	Di-ramnolipídio
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
LB	<i>Lisogenic Broth</i>
LC	<i>Liquid Cromatography</i>
LMI	Laboratório de Microbiologia Industrial
<i>m/z</i>	massa/carga
Mono-RL	Mono-ramnolipídio
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
OG	Óleo de semente de goiaba
OL	Óleo de laranja – limoneno
PG	Propilenoglicol
RL	Ramnolipídio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotação por minuto
SIR	<i>Single Ion Recording</i>
TLC	<i>Thin Layer Cromatography</i>
UPLC	<i>Ultra High Liquid Cromatography</i>
$Y_{P/X}$	Fator de conversão produto/biomassa



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
1.1	SURFACTANTES.....	18
1.2	BIOSURFACTANTES .....	19
1.2.1	Propriedades físico-químicas dos biosurfactantes.....	21
1.3	RAMNOLIPÍDIO.....	23
1.3.1	Produção de Ramnolipídios .....	24
1.3.1.1	Fonte de carbono e substratos alternativos .....	25
1.3.1.1.1	Óleo da semente da goiaba.....	26
1.3.1.1.2	Óleo da laranja – Limoneno.....	27
1.3.2	Processo de purificação de Ramnolipídios .....	27
1.3.3	Aplicações para o ramnolipídio .....	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1	GERAIS.....	31
2.2	ESPECÍFICOS.....	31
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I - FERMENTAÇÕES EM FRASCO: PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS A PARTIR DE ÓLEO DE SEMENTE DE GOIABA E D- LIMONENO .....</b>	<b>32</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	33
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.2.1	Produção de Ramnolipídios .....	35
3.2.1.1	Microrganismo .....	35
3.2.1.2	Meios de Cultura.....	35
3.2.1.2.1	Caldo Lisogênico (LB) .....	35
3.2.1.2.2	Meio Mineral com Tampão Fosfato (MMTF) .....	35
3.2.1.3	Origem das Fontes de Carbono.....	36
3.2.1.3.1	D-Limoneno .....	36
3.2.1.3.2	Óleo da semente da goiaba.....	36
3.2.1.4	Condições de Cultivo das Fermentações .....	37
3.2.1.4.1	Preparo do Inóculo .....	37
3.2.1.4.2	Fermentações .....	37
3.2.1.5	Planejamento experimental para seleção das melhores condições de cultivo para produção de RL .....	37

3.2.2	Métodos Analíticos .....	39
3.2.2.1	Processamento das Amostras .....	39
3.2.2.2	Determinação da Biomassa Microbiana .....	39
3.2.2.3	Determinação do Consumo da Fonte de Carbono .....	39
3.2.2.4	Extração dos Ramnolipídios .....	40
3.2.2.5	Determinação da Produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada.....	40
3.2.2.6	Determinação da Concentração de Ramnolipídios – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	41
3.2.3	Análise estatística.....	41
3.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Avaliação do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando d-limoneno como fonte de carbono. ....	42
3.3.2	Avaliação qualitativa da produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando d-limoneno como fonte de carbono .....	42
3.3.3	Avaliação quantitativa da produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando d-limoneno como fonte de carbono .....	44
3.3.4	Avaliação do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 e produção de ramnolipídios utilizando óleo de semente de goiaba como fonte de carbono .....	48
3.3.5	Planejamento Experimental para otimizar a produção de ramnolipídios utilizando óleo de semente de goiaba .....	49
3.3.6	Avaliação da produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 a partir das condições otimizadas geradas pela análise de superfície de resposta .....	55
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES HOMÓLOGAS E PROPRIEDADES DE SOLUÇÕES .....</b>	<b>59</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	60
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.2.1	Extração dos ramnolipídios.....	61
4.2.2	Determinação da composição dos homólogos por LC-MS .....	62
4.2.3	Tensão Superficial .....	62
4.2.4	Turbidez .....	62
4.2.5	Atividade de Emulsificação .....	63
4.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>

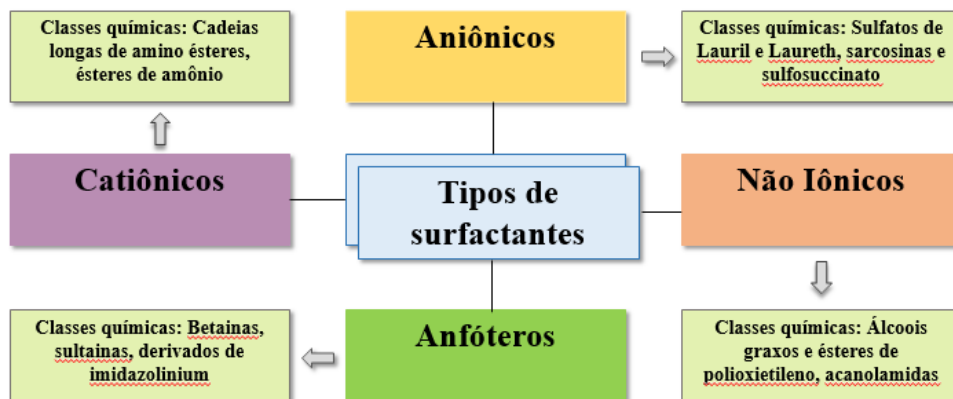
4.3.1	Caracterização das espécies homólogas de ramnolipídios por LC-MS.....	63
4.3.2	Avaliação da atividade de superfície de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba.....	70
4.3.3	Avaliação da formação de agregados em soluções de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba.....	73
4.3.4	Avaliação da atividade de emulsificação em soluções de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba.....	75
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III - PURIFICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS: SEPARAÇÃO DAS ESPÉCIES HOMÓLOGAS.....</b>	<b>81</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	82
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
5.2.1	Extração dos ramnolipídios.....	84
5.2.2	Separação das Espécies Homólogas dos Ramnolipídios .....	84
5.2.2.1	Cromatografia em Coluna.....	84
5.2.2.1.1	Determinação da composição dos homólogos por LC-MS .....	85
5.2.2.2	Complexos de Inclusão formados pela $\beta$ -Ciclodextrina .....	86
5.2.2.2.1	Análise dos deslocamentos químicos por RMN .....	87
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
5.3.1	Análise da Complexação Ramnolipídio - $\beta$ -Ciclodextrina por TLC .....	87
5.3.2	Análise da Complexação Ramnolipídio - $\beta$ -Ciclodextrina por RMN.....	89
5.3.3	Separação das espécies homólogas por cromatografia em coluna.....	94
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Surfactantes

Surfactantes, também denominados de tensoativos, são compostos que apresentam atividade de superfície devido à afinidade com meios polares e não polares. Sua propriedade é oriunda da composição química da molécula, que resulta de um grupo hidrofóbico e um hidrofílico. A presença de uma cabeça polar permite a interação com soluções aquosas e também permite a classificação dos surfactantes, os quais podem ser considerados aniônicos, catiônicos, não-iônico e anfotéricos (Figura 1) (DALTIM, 2011).

**Figura 1** - Classificação dos surfactantes químicos e seus principais representantes.



**Fonte:** Modificado de Gayathiri *et al.* (2022).

Os tensoativos aniônicos apresentam a região polar com carga negativa. É o grupo mais utilizado em termos de vendas e volume no mercado brasileiro e seus principais produtos são o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) e o lauril éter sulfato de sódio (LESS). Os tensoativos não-iônicos são aqueles em que a porção hidrofílica não apresenta carga e não estão associados com problemas em proteínas (PATEL *et al.*, 2022). É o segundo subsegmento mais utilizado e demonstra uma grande variedade de moléculas com alto poder de redução de tensão superficial e baixa irritabilidade à pele e olhos. Exemplos são os polietilenoglicóis alcoóis, alquilfenóis e aminas etoxiladas, os quais são utilizados em detergentes, produtos de limpeza, emolientes e umectantes para cosméticos. Os tensoativos catiônicos demonstram carga positiva na região polar e são representados pelos sais quaternários de amônio. São utilizados na limpeza industrial, amaciantes e detergentes. E por fim, os tensoativos anfóteros são aqueles que podem se comportar como aniônicos ou

catiônicos dependendo do pH da solução. São representados pelas betaínas e aplicados em xampus, sabões líquidos e detergentes para lavar louça (DALTIM, 2011; BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014).

As propriedades desses compostos resultam na aplicação dos mesmos em diferentes setores industriais, como em produtos de limpeza, cosméticos, agroquímicos, tintas, adesivos etc. No Brasil, o volume de surfactantes é distribuído principalmente nos setores de produtos de limpeza doméstica (61%), uso industrial e comercial (22%) e pelo setor de cosméticos e produtos de higiene pessoal (13%) (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014). Segundo Badmus *et al.* (2021), o tamanho do mercado global de surfactantes atualmente é de cerca de US\$ 42,1 bilhões, com projeção de US\$ 52,4 bilhões até 2025. Esse valor provavelmente é conservador levando em consideração o aumento global na produção e uso de desinfetantes para as mãos devido à pandemia de COVID-19.

A relevância dos surfactantes se mostra explícita, principalmente levando em consideração a ampla aplicabilidade, versatilidade e necessidade dos mesmos em processos industriais. Dessa maneira, é importante considerar as questões que também envolvem esses compostos. A maior parte dos surfactantes utilizados é oriunda da indústria petrolífera, que, além de ser dependente de uma fonte não renovável, esse fato acarreta em danos ambientais e riscos aos seres vivos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; GAVATHIRI *et al.*, 2022; PATEL; KHARAWALA, 2022). Os principais insumos utilizados são eteno, benzeno, parafinas lineares e olefinas lineares, que resultam na obtenção de alquilbenzeno linear (LAB), óxido de eteno, alcoóis e ácidos graxos (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014).

Esses produtos normalmente são descartados em estações de tratamento de esgotos ou águas superficiais e conseqüentemente, irão atingir diferentes compartimentos ambientais (solos, sedimentos, corpos hídricos), onde já foram encontradas diversas concentrações de tensoativos. Os problemas relacionados a esse descarte incluem bioacumulação em seres vivos, persistência, recalcitrância e toxicidade no meio ambiente, fatores que serão influenciados pela temperatura, pH e salinidade do local (YING, 2005; OLKOWSKA; RUMAN; POLKOWSKA 2014; BADMUS *et al.*, 2021).

## 1.2 Biosurfactantes

Os biosurfactantes são moléculas sintetizadas principalmente por microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Sua estrutura é formada por porções

hidrofílicas (podendo ser éster, grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato) e hidrofóbicas (hidrocarbonetos que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados). A distribuição dessas porções ocorre na interface de fases fluidas com diferentes graus de polaridade, dessa forma, essas moléculas possuem a capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). No âmbito fisiológico, essas propriedades conferem aos microrganismos benefícios como 1. o crescimento em substratos não solúveis em água através da solubilização e emulsificação de hidrocarbonetos, o que torna possível a assimilação, transporte e metabolização desses compostos pelos organismos (FRANCY *et al.*, 1991; KAPPELI; FIECHTER, 1977); 2. obtenção de aderência ou desprendimento em substratos, regulando-se as atividades de superfície celular (ROSENBERG; RON, 1999); 3. maior competitividade por espaço e nutrientes empregando o biossurfactante como antibiótico, o qual solubiliza os principais componentes de membrana de células microbianas (LIN, 1996). Já no âmbito industrial, os biossurfactantes são interessantes devido às propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes e dispersantes, podendo ser utilizados em diversos setores (KRONEMBERGER, 2007).

Essas moléculas são classificadas de acordo com a composição química e origem microbiana. As principais classes de biossurfactantes incluem os ácidos graxos e fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos, lipopeptídios, lipoproteína e glicolipídios (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002), os quais podem ser visualizados na Tabela 1. Os glicolipídios são uma das classes mais estudadas, constituídos por carboidratos combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos de cadeia longa. Os glicolipídios mais conhecidos são ramnolipídios, compostos por uma ou duas moléculas do açúcar ramnose e por uma ou duas porções lipídicas (DESAI; BANAT, 1997; JARVIS; JOHNSON, 1949).

As principais vantagens dos surfactantes biológicos em relação aos surfactantes químicos são a sua alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, maior grau de especificidade, presença de estruturas singulares, alta seletividade e atividade específica a temperaturas, pH e salinidade extremas (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; COSTA, 2009; LOVAGLIO, 2011; GAYATHIRI *et al.* 2022).

**Tabela 1** - Importantes classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Classe	Biossurfactante	Microrganismo produtor
Glicolipídios	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
	Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>

**Fonte:** Modificado de Desai; Banat (1997).

### 1.2.1 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes

Em soluções, os biossurfactantes apresentam o potencial de reduzir as tensões superficiais e interfaciais. Esses compostos são utilizados como conciliadores de fases imiscíveis através da formação de emulsões, espumas, suspensões, microemulsões, propiciando a umectação, etc. (DALTIM, 2011). Devido às suas porções hidrofílicas e hidrofóbicas, o tensoativo se dispõe na interface formando uma monocamada, o que resulta no enfraquecimento das pontes de hidrogênio e torna a atração entre as moléculas de água menor. Em uma superfície (água-ar), as moléculas se comportam de forma em que a parte apolar é voltada para o ar, enquanto a parte polar se mantém em contato com a água. Já em uma interface entre solução aquosa e não aquosa, há a formação de micelas, as quais são estruturas globulares resultantes da organização de um grande número de moléculas e que permitem a dissolução de componentes não solúveis em um meio (SCHRAMM; STASIUK; MARANGONI, 2003; SANTOS, 2014).

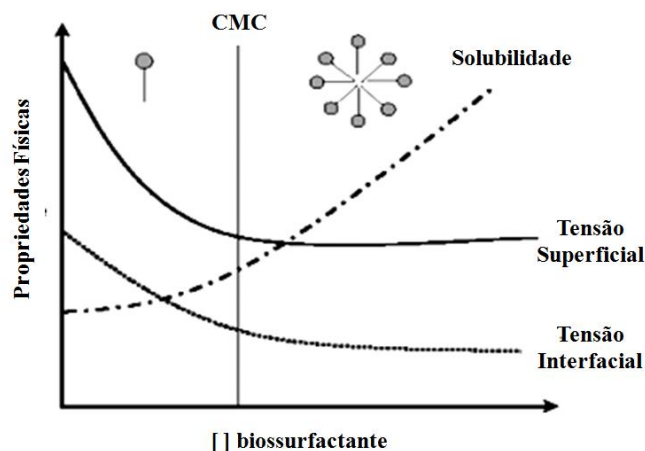
Este fenômeno provém da inserção de um composto não solúvel na parte interna da micela, enquanto essa apresenta solubilidade compatível com o meio. As micelas podem ser classificadas como de fase normal ou reversa, dependendo da ordenação estrutural resultante da polaridade do solvente em questão. Em uma micela de fase normal, a parte interna da esfera é composta pelas caudas do surfactante (parcela hidrofóbica) envolvendo o componente imiscível. Dessa maneira, é visto que as cadeias alquílicas se voltam ao interior evitando um contato energeticamente desfavorável com a água enquanto as porções polares cumprem a tendência de se manterem em contato com meio aquoso. Já em micelas reversas, o

oposto é encontrado e as parcelas hidrofílicas que se dispõem para o interior (SCHRAMM; STASIUK; MARANGONI, 2003; SANTOS, 2014).

Sendo assim, é visto que compostos hidrofóbicos podem ser solubilizados em soluções aquosas (e vice-versa) através da formação dessas esferas. Quando há uma grande quantidade de micelas em suspensão, denomina-se que houve a formação de uma emulsão. Nesse cenário, quanto mais hidrofílico o grupo que compõe a cabeça do surfactante, maior a sua capacidade de emulsionar material hidrofóbico (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). A capacidade de emulsificação e a estabilidade da emulsão são parâmetros utilizados para medir a eficiência dos biotensoativos (BENINCASA, 2001).

Outro critério a ser considerado é a concentração micelar crítica (CMC), cuja definição é dada pela concentração mais baixa de tensoativo em que se tem o início da formação dos agregados. Essa informação é bastante relevante, pois determina a quantidade necessária do produto para modificar as propriedades físico-químicas de uma solução e atingir o objetivo desejado. Esses agregados são microestruturas são altamente organizadas, como as micelas já citadas anteriormente, vesículas e bicamadas, os quais são provenientes de forças hidrofóbicas, van der Waals e ligações de hidrogênio (interações químicas fracas). A CMC poderá ser determinada a partir de propriedades como medição de tensão superficial, condutividade elétrica e viscosidade (RAZA *et al.*, 2010; SANTOS, 2014; RODRIGUES, 2015). A relação entre as propriedades físicas (solubilidade, tensão superficial, tensão interfacial, formação de micelas e CMC) de soluções podem ser visualizadas na Figura 2.

**Figura 2** - Variação das propriedades físicas de solução em função da concentração de biossurfactante.



Fonte: Modificado de Monteiro (2007).



De uma forma geral, a CMC de um biossurfactante é inferior à de um surfactante químico. Dessa maneira, para redução máxima da tensão superficial, menor quantidade de surfactante biológico é necessária (DESAI; BANAT, 1997), o que justifica os estudos de desenvolvimento desse produto. Pesquisas com ramnolipídios relatam sua capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m e valor de CMC entre 5 e 200 mg/L (ABALOS *et al.*, 2001).

A união e relação de todas essas propriedades somadas ao fato dos biossurfactantes apresentarem estabilidade diante de alterações de pH, temperatura e combinação com aditivos resulta em uma interessante viabilidade de aplicação nos mais variados setores industriais (LOVAGLIO *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2014). Sua finalidade inclui atividade emulsificante, detergente, estabilizante de espuma.

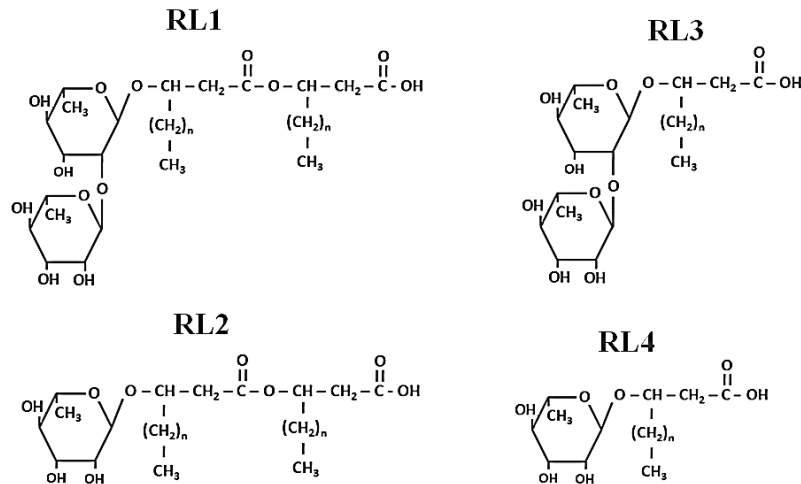
### 1.3 Ramnolipídio

O ramnolipídio é um biossurfactante pertencente à classe dos glicolipídios e sintetizado principalmente pela bactéria *P. aeruginosa*, mas outros microrganismos também são utilizados, como *Acinetobacter sp.* e *Enterobacter sp.* (ROONEY *et al.*, 2009).

Esse composto apresenta atividade de superfície elevada e maior rendimento de produção em relação a outros tensoativos. Sua estrutura é formada por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a ácidos 3-hidroxicanoicos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011; JARVIS; JOHNSON, 1949; Ekambaram Gayathiri *et al.*, 2022). O ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* é caracterizado pela mistura de homólogos de RL1 (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), RL2 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), RL3 (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>) e RL4 (RhaC<sub>10</sub>) (LANG e WAGNER, 1987).

O desenvolvimento de métodos analíticos modernos e sensíveis como a espectrometria de massas, tem permitido a descoberta de uma ampla diversidade de estruturas de homólogos dos ramnolipídios, aproximadamente 60 congêneres foram descritos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Os principais homólogos são os mono-ramnolipídios (principal congêneres RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e os di-ramnolipídios (principal congêneres Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), representados na Figura 3.

**Figura 3** - Estrutura das espécies homólogas de ramnolipídio. RL1 (duas moléculas de ramnose ligadas a duas moléculas de ácido graxo), RL2 (uma molécula de ramnose ligada a duas moléculas de ácido graxo), RL3 (duas moléculas de ramnose ligadas a uma molécula de ácido graxo) e RL4 (uma molécula de ramnose ligada a uma molécula de ácido graxo).



Fonte: Modificado de Lovaglio (2022).

As propriedades do ramnolipídio podem variar de acordo com a razão e distribuição desses homólogos, os quais são determinados por diversos fatores, como a linhagem do microrganismo e composição e condições do meio de cultivo (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIETCHER, 1984). Em relação à fonte de carbono, Zhao, Han e Zhang (2020) relataram que a razão dos homólogos de ramnolipídios variou de acordo com a fonte de carbono. A glicose como substrato resultou em 8 homólogos de mono- e 6 homólogos de di-ramnolipídios. Por outro lado, o tensoativo derivado do óleo de soja apresentou 9 mono- e 8 di-ramnolipídios. Ambos os casos utilizaram o mesmo microrganismo. Essa variação na composição dos homólogos tem influência nas propriedades físico-químicas dos ramnolipídios podendo acarretar em atributos variados no estágio de aplicação do biossurfactante. Zhao *et al.* (2013) demonstraram que o di-ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* M14808 exibiu efeitos significativos contra a proliferação de células de câncer de mama humano MCF-7. O mesmo efeito não foi observado pelo mono-ramnolipídio. Isso demonstra que as propriedades desse surfactante estão relacionadas com os atributos e características dos seus homólogos.

### 1.3.1 Produção de Ramnolipídios

Qualquer processo biotecnológico industrial genérico pode ser dividido nas seguintes etapas: *upstream* e *downstream process*. O *upstream process*, também chamado de etapa inicial tem a finalidade de colocar o sistema nas condições ideais para se atingir o objetivo desejado. Essas condições incluem: escolha da linhagem (pode necessitar de modificação genética, isolamento e seleção de cepa); preparo do inóculo; preparo do meio (escolha da fonte de carbono, nitrogênio, elementos traços; esterilização), além das condições adequadas para o cultivo (temperatura, agitação, pH, etc.) (LINDSKOG, 2018).

E, como há uma grande diversidade de fatores que influenciam a produção de um produto biotecnológico, existem ferramentas que podem auxiliar o processo de decisão. Essas ferramentas estão dentro do planejamento de experimentos, que visa otimização de processos, minimizando custos e tempo, além de maximizar o rendimento, produtividade e qualidade dos produtos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

#### **1.3.1.1 Fonte de carbono e substratos alternativos**

Os microrganismos necessitam de nutrientes para seu crescimento, cuja quantidade necessária de cada composto irá variar de acordo com a espécie. Entretanto, de maneira geral, o meio de cultivo no laboratório deve conter fontes de nitrogênio, energia e carbono, além de também poder ser necessário o acréscimo de sais e vitaminas (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

A fonte de carbono é um fator importante tanto para o crescimento microbiano, quanto para a produção de metabólitos, sendo cerca de 50% da massa seca de uma célula bacteriana composta por carbono (MADIGAN *et al.*, 2016). Esse nutriente pode ser um carboidrato, hidrocarboneto, óleos, gorduras, entre outros. Mas, para produção dos biossurfactantes, é interessante que seja um substrato de baixo custo, principalmente matérias-primas que são consideradas resíduos, o que auxiliaria a solucionar problemas ambientais, além de diminuir os custos de produção (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; LOVAGLIO, 2011; MOHANTY *et al.*, 2021; VARJANI *et al.*, 2021).

Diversas pesquisas já foram feitas sobre a produção do ramnolipídio utilizando tanto fontes de carbono hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Entretanto, a fonte hidrofóbica se mostrou como um melhor substrato para produção desses metabólitos (HENKEL *et al.*, 2012). Dentro desse contexto, muitos experimentos foram realizados com óleo de soja, girassol e milho, além de óleos de fritura e borra de óleos (LOVAGLIO, 2011), mas há poucos estudos com os chamados óleos essenciais.

Um desses estudos foi realizado por Costa *et al.* (2006), utilizando óleos nativos do Brasil como substrato para produção de ramnolipídio. Os óleos de Buriti, Cupuaçu, Maracujá, Andiroba, Castanha-do-Pará e Babaçu foram aplicados como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* LBI. A melhor produção obtida foi a partir do óleo da Castanha do Pará, onde se obteve 9,9 g/L de metabólito. Outro exemplo da utilização de fontes alternativas foi o uso do óleo da semente da manga para produção de ramnolipídio trazendo ainda uma possibilidade de aplicação de um resíduo agroindustrial (REDDY *et al.*, 2016).

#### 1.3.1.1.1 Óleo da semente da goiaba

A produção da goiabeira (*Psidium guajava* L.) ocorre em função de seu fruto, o qual é apreciado mundialmente (WATLINGTON, 2006). No território nacional, a comercialização se expande devido ao clima e solos favoráveis, trazendo rentabilidade e desenvolvimento para produção agrícola (OKAMOTO, 2010). No ano de 2018, o Brasil produziu 1.897.904 toneladas de goiaba, manga e mangostim, situando-se na quinta posição de maior produtor do mundo nessa categoria (FAO, 2020).

A goiaba, além de ser consumida *in natura*, também possui grande importância para as indústrias alimentícias, onde cumpre o papel de matéria prima para sucos, geleias, caldas, xaropes, doces, frutas em calda, etc. Todavia, dentro desse cenário do processamento do fruto, há também o descarte do material considerado resíduo, como as cascas e sementes da fruta. A porção que não é aproveitada é denominada co-produto, e acarreta, além do desperdício, problemas relacionados ao descarte e à poluição ambiental (KOBORI; JORGE, 2005). Anualmente, é estimado que aproximadamente de 202 toneladas de goiaba são processadas para fornecer polpa de fruta congelada e, cerca de 12 toneladas de resíduos são geradas e descartadas (UCHÔA-THOMAZ *et al.*, 2014).

A semente da goiaba representa de 6 a 12% do peso do fruto e demonstra um rendimento de 10 a 16% em óleo, o qual pode variar de acordo com o processamento e cultura (NICANOR *et al.*, 2001; NICANOR *et al.*, 2006). Esse óleo extraído das sementes da goiaba é uma fonte potencial de óleo para o consumo humano e como matéria prima para indústria. A composição desse óleo está expresso na Tabela 2 (SILVEIRA *et al.*, 2014).

**Tabela 2** - Composição da fração lipídica (%) do óleo da semente da goiaba, empregando-se n-hexano na extração.

Ácidos Graxos	%
---------------	---

Σ Saturados	63,87
Σ Monoinsaturados (MUFA)	16,56
Σ Poli-insaturados (PUFA)	19,66
Σ Insaturados	36,22

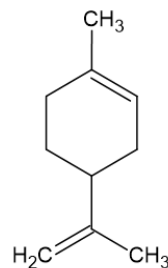
Fonte: modificado de Silveira *et al.*, 2014.

### 1.3.1.1.2 Óleo da laranja – Limoneno

A laranja também é utilizada como insumo de produtos industrializados, principalmente para geração de sucos. Em 2018, o Brasil foi o maior produtor mundial de laranja, comercializando mais de 16 mil toneladas (FAO, 2020). Uma grande porção é destinada à indústria, onde as laranjas são utilizadas para produção do suco. Os resíduos desse processo são as cascas e bagaços, os quais podem ser submetidos à prensagem para extração do óleo prensado a frio (BERGER; KRINGS; ZORN, 2002).

O óleo extraído é composto por linalol, mirceno e d-limoneno, sendo o último responsável por 80-95% da composição. A produção de d-limoneno (4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno) proveniente da fruta corresponde a apenas 0,27%, comparado com 53% de suco (BERGER; KRINGS; ZORN, 2002). Entretanto, após o aumento do consumo de suco, as laranjas destinadas à indústria passaram de menos de 1% para 80%, gerando uma quantidade muito maior de resíduos e, conseqüentemente, do d-limoneno. Isso foi responsável pelo barateamento desse óleo, o que interessou químicos e biólogos. Além disso, houve também a percepção de que compostos medicinais e de aroma apresentavam a mesma estrutura de carbono do d-limoneno (Figura 4), demonstrando um destino industrial promissor a esse rejeito (DUETZ *et al.*, 2003).

**Figura 4** - Estrutura do limoneno.



Fonte: Elaborada pela autora.

## 1.3.2 Processo de purificação de Ramnolipídios

Produtos biotecnológicos, assim como o biossurfactante ramnolipídio, requerem processos para sua produção e purificação. A etapa de “*downstream*” geralmente envolvem lise e/ou separação das células, isolamento do produto em sua forma bruta, concentração e beneficiamento (JUNGBAUER, 2013).

Para a purificação dos ramnolipídios, diversos processos são realizados, como filtração, precipitação, extração por solvente, adsorção e cromatografia. O método mais comum e utilizado é a adição de ácido para ajuste do pH e precipitação do composto, seguido pela centrifugação. Dessa forma, já é possível obter o biossurfactante em sua forma purificada. Mas, para melhor entendimento das suas propriedades, é interessante prolongar os estudos para fase de separação, obtendo assim não apenas o ramnolipídio purificado, mas também os homólogos presentes nesse composto (ZHOU *et al.*, 2019).

As técnicas de separação do mono- e di- ramnolipídios são importantes para analisar componentes de uma mistura e para purificação de compostos. As formas mais comuns estão divididas em extração, cromatografia e destilação. A extração está baseada na distinção de solubilidade entre dois ou mais sistemas solventes; a cromatografia utiliza a diferença de afinidade entre uma fase estacionária e uma fase móvel; e a destilação se baseia nos princípios de pressão de vapor. Esses métodos apresentam divergências em relação a limitações de uso, custo e escalabilidade, fatores que devem ser levados em consideração no momento de escolha de um método (HADEMENOS *et al.*, 2016).

A cromatografia em coluna pode ser utilizada na separação dos homólogos de ramnolipídio (ZHOU *et al.*, 2019). Essa metodologia é utilizada para purificação de substâncias orgânicas ou para isolar um composto de interesse. Para isso, uma mistura é eluída através de uma coluna preenchida, geralmente, com sílica. A separação é realizada pela diferença de polaridade entre os componentes, sendo que o composto mais polar apresentará maior afinidade com a sílica. A cromatografia em coluna pode obter substâncias com alto grau de pureza (HADEMENOS *et al.*, 2016).

Outra possibilidade de obter uma separação é através da ciclodextrina (CD), um oligossacarídeo cíclico formado por unidades de glucopiranosose. A variação do número de monômeros de glicose presentes define as principais estruturas de CDs, as quais são  $\alpha$ -CDs,  $\beta$ -CDs e  $\gamma$ -CDs, formadas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente. Esses monômeros são unidos por ligações  $\alpha$ -1,4 e formam uma estrutura tronco-cônica, o que permite a formação de complexos de inclusão (EASTBURN; TAO, 1994).

Os complexos de inclusão ocorrem a partir do aprisionamento de uma molécula dentro da cavidade da molécula de CDs. Isso ocorre devido às características hidrofóbicas na parte

interna e hidrofílicas na porção externa. A diferença de polaridade faz com que essa propriedade da ciclodextrina seja usada como um método de separação por cromatografia (DEL VALLE, 2004), tendo potencial de separar as espécies homólogas de ramnolipídio.

### 1.3.3 Aplicações para o ramnolipídio

Os biossurfactantes podem ser amplamente utilizados devido ao fato de ser um composto anfifílico e pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos ou líquido e sólido, como explicitado anteriormente. A seguir, há estudos que exemplificam a aplicação desse biossurfactante em diversos setores.

O ramnolipídio pode ser aplicado dentro da indústria de cosméticos para processos de emulsificação, substituindo os surfactantes químicos como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (LOVAGLIO *et al.*, 2011). Eles já demonstram ser compatíveis com a pele humana e apresentam potencial para serem utilizados em repelentes de insetos, produtos contra acne, solução para lente de contato, produtos anticaspa, desodorantes, produtos para cuidado de unhas e pasta de dentes (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; SILVA *et al.*, 2015).

Além disso, os ramnolipídios também exibiram efeitos proliferativos nos queratinócitos da epiderme. Um soro contendo o tensoativo estimulou a proliferação de queratinócitos neonatais ao mesmo tempo que inibiu a proliferação de células fibroblásticas. Para aplicações práticas, essa propriedade seria benéfica e necessária no desenvolvimento de cremes de cicatrização de feridas, pois a inibição da diferenciação de células fibroblásticas ajuda a evitar atrasos na cicatrização de feridas, enquanto a proliferação de queratinócitos auxilia na reepitelização de feridas (STIPCEVIC; PILJAC; PILJAC, 2006).

Em indústrias alimentícias, esses compostos podem ser aplicados no controle de biofilmes. O ramnolipídio demonstrou eficiência na diminuição da adesão e formação de biofilmes em superfícies de contato com alimentos (ARAUJO *et al.*, 2016). E também podem apresentar mudanças estruturais em lipopeptídeos, que são eficazes na prevenção da formação de biofilme de *Candida albicans* em superfícies (JOVANOVIC *et al.*, 2019).

O ramnolipídio pode ser empregado na recuperação melhorada de óleo por microrganismos. De acordo com Câmara *et al.* (2019), o biossurfactante reduziu a tensão superficial da água de 72 para 35,26 mN/m na concentração micelar crítica de 127 mg/L e taxa de emulsificação de 69% para o petróleo bruto. Além disso, pôde recuperar o óleo, mesmo 2 meses após sua produção, demonstrando que sua biodegradabilidade não é uma

desvantagem. A utilização do ramnolípido em concentrações adequadas também pode promover a degradação anaeróbica de hidrocarbonetos de petróleo (SONG *et al.*, 2019).

Dentro setor farmacêutico, o di-ramnolípido pode ser usado em tratamentos contra cicatrizes na pele, pois apresentou ação anti-fibrótica, reduzindo significativamente o índice de elevação da cicatriz (SHEN *et al.*, 2016). De acordo com Magalhães e Nitschke (2012), o ramnolípido demonstra atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e efeito sinérgico quando combinado com o antimicrobiano nisina. Também foi verificado o potencial uso de biossurfactantes como RLs no combate e tratamento da Covid-19 (ÇELIK *et al.*, 2020).

Outros estudos indicaram que o ramnolípido é benéfico no sistema de entrega lipossômica, podendo ser utilizado em alimentos funcionais, suplementos alimentares e preparação de produtos farmacêuticos. O biossurfactante foi capaz de aumentar a esfericidade, reduzir o tamanho e diminuir a dispersividade de lipossomas em comparação com os lipossomas puros (CHENG *et al.*, 2019).

Dentro da área agrícola, o ramnolípido é indicado para controle de fitopatógenos em estufas, apresentando inclusive um modo de ação duplo, agindo como antimicrobiano e ainda estimulando as respostas de defesa das plantas (VATSA *et al.*, 2010; CROUZET *et al.*, 2020).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

- Estudo da produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 a partir de óleo de semente de goiaba (OG) e óleo da casca da laranja (d-limoneno) (OL) como fontes de carbono.
- Caracterização físico-química dos ramnolipídios.
- Estudo da separação dos homólogos através do desenvolvimento de métodos de separação;

### 2.2 Específicos

- Comparar a produção de ramnolipídios a partir de diferentes concentrações de OG (óleo de semente de goiaba) e OL (óleo limoneno) como fonte de carbono;
- Avaliar a melhor fonte de carbono e otimizar a produção a partir de um planejamento experimental encontrando as condições otimizadas de fonte de carbono e nitrogênio;
- Extrair e purificar os ramnolipídios oriundos da melhor fonte de carbono;
- Caracterizar os ramnolipídios por espectrometria de massas;
- Avaliar a tensão superficial, turbidez e atividade de emulsificação dos ramnolipídios produzidos
- Purificar os homólogos mono- e di- ramnolipídios a partir de cromatografia em coluna
- Purificar os homólogos mono- e di- ramnolipídios através de complexos de inclusão formados pela ciclodextrina;

### **3 CAPÍTULO I**

## **FERMENTAÇÕES EM FRASCO: PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS A PARTIR DE ÓLEO DE SEMENTE DE GOIABA E D-LIMONENO**

### 3.1 INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos utilizados como substituintes dos surfactantes químicos comuns. Estes são sintetizados através de microrganismos, como as bactérias, e possuem vantagens como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, maior grau de especificidade, presença de estruturas singulares, alta seletividade e estabilidade diante de situações extremas de temperatura e salinidade (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; COSTA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; LOVAGLIO, 2011; HENKEL *et al.*, 2012; GAVATHIRI *et al.*, 2022; PATEL; KHARAWALA, 2022).

Os biossurfactantes podem ser amplamente utilizados pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. Essas propriedades são resultantes da conformação químico-estrutural anfifílica do composto, o qual apresenta uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, podendo se unir a porções aquosas e porções não aquosas (MARCHANT; BANAT, 2012). De uma forma geral, esses compostos são mais eficientes, e sua concentração micelar crítica (CMC) é inferior a de um surfactante químico. Dessa maneira, para diminuição da tensão superficial, menor quantidade de surfactante é necessária (DESAI; BANAT, 1997), o que justifica os estudos de desenvolvimento desse produto.

Além disso, sua ampla aplicabilidade é outro fator bastante relevante, podendo ser utilizado em diversas aplicações industriais devido às propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes, dispersantes e antimicrobianas (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; KRONEMBERGER, 2007; PHAM *et al.*, 2019). Exemplos práticos incluem situações de derramamento de petróleo e contaminação por metais, onde o biossurfactante pode auxiliar no processo de biorremediação, fragmentação e dispersão dos contaminantes (ARAÚJO, 2018; MULLIGAN, 2005). Dessa forma, podem ser utilizados em diversas aplicações industriais como na indústria farmacêutica, de cosméticos, petrolífera e na agricultura, agindo em processos de solubilização, emulsificação, entre outros (BANAT *et al.*, 2000; CERESA *et al.*, 2021).

Os ramnolipídios são exemplos de biossurfactantes pertencente ao grupo dos glicolipídios. São produzidos principalmente por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Sua estrutura é formada por uma ou duas ramnosas e por ácidos graxos, resultando nas duas porções: a primeira hidrofílica e a segunda hidrofóbica (MARCHANT; BANAT, 2012). Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* são compostos por uma mistura de homólogos, onde os mono-ramnolipídios (principal congênere RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e os di-ramnolipídios (principal congênere Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) são predominantes (LANG e WAGNER,

1987).

Essa substância apresenta destaque no grupo em que ocupa devido à suas vantagens, como atividade de superfície elevada e maior rendimento de produção (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011), porém, não apenas os ramnolipídios, mas os biossurfactantes em geral apresentam um elevado custo que dificulta sua expansão no mercado e afeta a competição com os surfactantes comuns (SANTOS, 2015).

Para que bioprodutos sejam aplicados na indústria, é necessário que sejam produzidos em larga escala e a um custo que seja compatível com aqueles de origem sintética. Mukherjee, Das e Sen (2006) mencionam que a economia na síntese de produtos biotecnológicos é governada por três fatores: 1. Custos de matéria-prima, que inclui o uso de equipamentos e substratos mais baratos; 2. Métodos de produção e recuperação, os quais estão relacionados ao desenvolvimento de bioprocessos eficientes incluindo a otimização das condições de cultivo e de processos de recuperação econômicos e eficazes e 3. Rendimento dos microrganismos produtores, que compreende o desenvolvimento e seleção de cepas mutantes superprodutivas.

Ao analisar esses fatores, a primeira estratégia alega que o substrato deve ser uma matéria prima barata ou um resíduo, pois as matérias primas correspondem em até 30% do valor total do biossurfactante (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; LOPES *et al.*, 2021). Dessa forma, a utilização de um resíduo e/ou subproduto como fonte de carbono é bastante vantajosa, já que diminui o impacto ambiental de materiais que podem ser considerados nocivos à natureza simultaneamente em que agrega valor a produtos que seriam descartados. Extrato de caju (NAGY, 2018), casca de beterraba (SANTOS, 2015), óleo de fritura (COSTA; NITSCHKE; CONTIERO, 2007), glicerol residual de biodiesel (SALAZAR-BRYAM; LOVAGLIO; CONTIERO, 2017), são exemplos de fontes de carbono já utilizadas com essa finalidade. Além disso, além da redução de custo com matéria-prima, a avaliação de fontes de carbono ainda não estudadas demonstra a possibilidade de aumentar os rendimentos de produção.

A segunda estratégia abrange o aprimoramento do bioprocessos, cuja finalidade é encontrar as condições ideais do cultivo do microrganismo visando a obtenção do maior rendimento do produto biotecnológico. Fatores como concentração de nitrogênio, ferro, agitação, temperatura, pH afetam diretamente o crescimento microbiano e a produção de metabólitos (DESAI; BANAT, 1997; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; VIEIRA; FERNANDES, 2012). De forma tradicional, a seleção desses parâmetros é feita variando cada fator individualmente a fim de selecionar os pontos ótimos. Entretanto, atualmente há a

estratégia de otimização estatística baseada na metodologia de superfície de resposta (RSM, *Response Surface Methodology*) que consegue avaliar a interação entre fatores e diminuir a quantidade de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Dessa maneira, o objetivo desse capítulo foi avaliar a produção de ramnolipídios a partir de dois substratos alternativos, o óleo da semente da goiaba e o óleo da casca da laranja (d-limoneno), oriundos da frutorrefinaria. Em seguida, otimizar as condições de cultivo utilizando o substrato que demonstrou-se mais viável para síntese visando uma maior produção do biossurfactante.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Produção de Ramnolipídios**

#### **3.2.1.1 Microrganismo**

O microrganismo avaliado foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (mutante-randômico) proveniente do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) – UNESP – Rio Claro. O microrganismo está acondicionado em tubos criogênicos em caldo lisogênico com glicerol 20 % e armazenado em ultra freezer à -80°C.

#### **3.2.1.2 Meios de Cultura**

##### **3.2.1.2.1 Caldo Lisogênico (LB)**

A composição do meio utilizado para o pré-cultivo dos microrganismos em (g/L): triptona – 10; extrato de levedura – 5,0; NaCl – 10 (MÜLLER *et al.*, 2010).

##### **3.2.1.2.2 Meio Mineral com Tampão Fosfato (MMTF)**

Este meio foi utilizado para o preparo do inóculo e condução das fermentações em frascos Erlenmeyer. Sua composição consiste em (g/L): MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O - 0,5; KCl – 1; NaNO<sub>3</sub> - 15; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,3; fonte de carbono (Tabela 3) e 1 mL/L da solução de elementos traços. A solução traço é composta por (g/L): Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 2H<sub>2</sub>O – 2,0; FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O – 0,28; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

– 1,4;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 1,2;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 1,2;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,8. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8 - 7 com solução de NaOH e HCl, ambas a 1M (MÜLLER *et al.*, 2010; 2011).

**Tabela 3** - Concentração de óleos usados como fonte de carbono no bioprocesso.

Óleos estudados	Concentração no meio de fermentação (g/L)
Óleo de semente de goiaba (O.G)	80, 100 e 120
D-limoneno (O.L)	20, 40, 60, 80, 100 e 120

\*Foi preparado um inóculo para cada tratamento, o qual continha metade da concentração de óleo utilizada no meio de fermentação.

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Para o planejamento experimental, as fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ) e carbono (óleo de semente de goiaba) foram modificadas a fim de obter a otimização da produção de ramnolipídios.

### 3.2.1.3 Origem das Fontes de Carbono

#### 3.2.1.3.1 D-Limoneno

O óleo da casca da laranja (d-limoneno) foi cedido pela Citroflavor - Indústria e Comércio de Óleos Essenciais Eireli, situada em Catanduva, SP. A caracterização do produto pode ser visualizada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Caracterização do óleo de limoneno proveniente da Citroflavor.

	Aspecto	Líquido límpido
Características Organolépticas	Cor	Amarelo a castanho claro
	Odor	Característico
	Aldeído em decanal (%)	1,45
Características Físico-Químicas	Densidade (20°C) ± 0,005	0,846
	Índice de Refração (20°C)	1,472
	D-Limoneno (% GLC)	95,05

**Fonte:** Dados obtidos através do fornecedor.

#### 3.2.1.3.2 Óleo da semente da goiaba

As sementes de goiaba (20 kg) foram gentilmente cedidas pela Indústria Predilecta Alimentos, situada em São Lourenço do Turvo, Matão, SP. A extração de óleo foi conduzida

na Indústria AGTTEC Beneficiamento de café e Manutenção de Equipamentos para Laboratórios LTDA utilizando uma prensa de extração a frio multiproduto, marca Aggtec, modelo PF-AG2, com capacidade para 20 kg/hora, alimentado por um motor de 2CV.

#### **3.2.1.4 Condições de Cultivo das Fermentações**

##### **3.2.1.4.1 Preparo do Inóculo**

Primeiramente os microrganismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de caldo lisogênico e 100 µL da cultura estoque de *P. aeruginosa* LBI 2A1. A incubação foi realizada em mesa agitadora tipo “shaker” Multitron Standard Infors HT, durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida, 2,5 mL do caldo foram transferidos para o inóculo contendo meio mineral e metade da concentração da fonte de carbono usada no meio de fermentação. O cultivo ocorreu em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio sob as mesmas condições citadas anteriormente. Foram realizadas leituras de absorvância ( $\lambda= 580$  nm) através de espectrofotômetro Bel Spectro SP-2000. Estas medidas foram utilizadas para inoculação dos meios de fermentação resultando em uma densidade óptica inicial de 0,1.

##### **3.2.1.4.2 Fermentações**

As fermentações também foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio mineral. Nesses cultivos foram analisados o crescimento e a produção de ramnolipídios, através da retirada de amostras a cada 24 horas. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e em mesa agitadora tipo “shaker” a 200 rpm, 37°C por 96 horas. A solução de elementos traços foi adicionada nos tempos 0, 20, 40 e 70 h, segundo Müller *et al.* (2010; 2011).

Para a fermentação contendo as condições otimizadas, após a retirada de amostras também avaliou-se o consumo da fonte de carbono através de método gravimétrico e análise da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa.

##### **3.2.1.5 Planejamento experimental para seleção das melhores condições de cultivo para produção de RL**

Foi realizado um planejamento experimental a fim de selecionar as melhores condições para maximizar a produção de ramnolipídios com a fonte de carbono que demonstrou a maior viabilidade. A primeira etapa de fermentações deu o embasamento para estabelecer o melhor intervalo a ser utilizado no Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta. As condições do meio de cultivo e microrganismo foram as mesmas citadas anteriormente, com exceção das concentrações de carbono e nitrogênio do meio mineral.

As variáveis independentes foram  $X_1$ : fonte de carbono (óleo de semente de goiaba) e  $X_2$ : fonte de nitrogênio (nitrato de sódio). Foi realizado um DCCR  $2^2$  com quatro pontos axiais e quatro repetições do ponto central, totalizando 12 ensaios. A Tabela 5 apresenta os valores estudados e a Tabela 6 o delineamento com as condições realizadas.

**Tabela 5** - Especificação dos níveis codificados e reais das variáveis fonte de carbono ( $X_1$ ) e fonte de nitrogênio ( $X_2$ ) utilizadas no planejamento DCCR  $2^2$  empregado no cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2A1 a 200 rpm, 37°C por 96 h.

Níveis Codificados	Valores reais das variáveis em estudo (g/L)	
	Fonte de carbono ( $X_1$ )	Fonte de nitrogênio ( $X_2$ )
-1,414	29,3	2,93
-1	50	5
0	100	10
1	150	15
1,414	170,7	17,07

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

**Tabela 6** - Matriz do planejamento DCCR  $2^2$  contendo as condições de cultivo ( $X_1$  – fonte de carbono e  $X_2$  – fonte de nitrogênio) em seus níveis codificados.

Ensaios	$X_1$	$X_2$
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1,414	0
6	+1,414	0
7	0	-1,414
8	0	+1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

A resposta “produção de RL” foi modelada pela equação polinomial de segunda ordem:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_2x_2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \dots \beta_{kk}x_k + \beta_{kk}x_k^2$$



Onde:  $y$  é a resposta predita;  $\beta_0$  é o termo de intercepto;  $\beta_1, \beta_2$  são os efeitos lineares;  $\beta_{11}, \beta_{22}$  são os efeitos quadráticos;  $\beta_{12}$  são os efeitos de interação;  $x_1, x_2$  são as variáveis independentes e  $k$  é o número de variáveis independentes.

### **3.2.2 Métodos Analíticos**

#### **3.2.2.1 Processamento das Amostras**

Para analisar a produção do biossurfactante e quantificação da biomassa, foram retiradas amostras contendo o volume de 10 mL, onde foi adicionado o mesmo volume de n-hexano lentamente. As amostras foram processadas em centrífuga Hitachi CR22G a 10 g, 10°C por 10 min para separação em 3 fases: células/ fase aquosa/ fase orgânica. A porção hidrofílica e o pellet foram destinados a quantificação de ramnolipídios e biomassa, respectivamente. A fase orgânica contendo hexano foi destinada a quantificação do óleo residual, parâmetro que só foi avaliado na fermentação contendo as condições otimizadas.

#### **3.2.2.2 Determinação da Biomassa Microbiana**

A avaliação do crescimento microbiano foi realizada através do método gravimétrico, onde o pellet de células foi ressuspensão em NaCl 0,85% (v/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado a 10.000 rpm, 10°C e 10 min. Em seguida, o pellet foi dissolvido em menor volume de água destilada e mantido em estufa de secagem Retilinea FANEM (mod. 315/4) a 100°C até atingir peso constante (MÜLLER *et al.*, 2010; 2011).

#### **3.2.2.3 Determinação do Consumo da Fonte de Carbono**

O óleo residual foi quantificado após a retirada da fase orgânica para determinação gravimétrica. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente dentro de capela de exaustão até a completa evaporação do solvente e então, pesadas.

Essas alíquotas foram submetidas a reação de transesterificação (Método Oficial da AOAC 969.33, 1969), a partir de 100 mg de óleo residual e 4 mL de NaOH 0,5 M em MeOH. A solução ocorreu em sistema de refluxo e foi mantida por aproximadamente 10 min. Em seguida, adicionou-se 5 mL de BF<sub>3</sub> 10% em MeOH através do condensador e o sistema foi

mantido sob ebulição por mais 2 min. Por fim, foi acrescentado heptano (2 mL) também através do condensador mantido sob ebulição durante 1 min. O sistema foi retirado do refluxo com a interrupção do aquecimento e retirada do condensador. Em seguida, adicionou-se de 15 mL de solução saturada de NaCl e agitou-se vigorosamente por 15 s. A solução foi transferida para tubo de ensaio para separação gravimétrica da fase orgânica, a qual foi retirada, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e analisada em GC-MS.

A análise da composição do óleo residual foi realizada em cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP 2010 *Ultra* com impacto de elétrons (EI). A coluna de sílica fundida RTX-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) foi utilizada, a temperatura do forno foi de 120°C mantida por 1 min, com incremento de 20°C/min até 170°C, 3°C/min até 210°C e 20°C/min até 250°C, e então, mantida constante por 10 min. A temperatura do injetor foi de 250°C, a injeção foi realizada em modo split (1:10 e 1:100) com volume de injeção de 1 µL e o gás de arraste foi hélio com fluxo de 1 mL/min. A faixa de massas analisadas pelo espectrômetro de massas foi de 41 a 350, iniciando-se em 2,5 min até o final da corrida (28,8 min). E, para a identificação dos ácidos graxos, foi realizada a comparação dos tempos de retenção dos picos dos cromatogramas das amostras com padrões puros de ésteres metílicos de ácidos graxos (*37-Component FAME Mix*, Sulpelco®). Estes padrões também foram utilizados para realização de uma curva de calibração contendo três pontos para quantificação dos ácidos.

#### **3.2.2.4 Extração dos Ramnolipídios**

A porção hidrofílica foi acrescida de ácido fosfórico 85% 1:100 (v/v) e acetato de etila 1:1,25 (v/v), que possibilitaram a precipitação e extração do tensoativo. As amostras foram centrifugadas por 10 min, 10.000 rpm a 10°C. A extração com acetato de etila foi realizada novamente (MÜLLER *et al.*, 2010; 2011).

#### **3.2.2.5 Determinação da Produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada**

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de Sílica Gel 60 e como fase móvel foi utilizada a seguinte mistura: clorofórmio/ metanol/ ácido acético 65:15:2 (v/v/v) (WITTGENS *et al.*, 2016). O agente revelador foi composto por ácido acético/ anisaldeído/ ácido sulfúrico 50:1:1 (v/v/v). Foram aplicados 15µL de extratos obtidos a partir

do caldo livre de células em diferentes tempos de fermentação, além dos padrões de ramnolipídios obtidos pela Jeneil Biosurfactant Company. As placas foram mantidas em estufa de secagem a 100 °C até a revelação dos spots.

### **3.2.2.6 Determinação da Concentração de Ramnolipídios – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Os padrões e as alíquotas de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com o que foi descrito por Schenk, Schuphan e Schmidt (1995) a fim de serem determinados via detector UV. Para isso, as amostras contendo ramnolipídios em acetato de etila foram evaporadas. Em seguida, adicionou-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura composta por brometo de 4-bromofenacil 135 mM / Trietilamina 67,5 mM (v/v) 1:1. A derivatização foi feita por 1,5 h a 60°C e 1200 rpm, em um banho seco com agitação AG-100 Agimaxx.

As análises de quantificação foram feitas com um equipamento HPLC Shimadzu acoplado a um detector UV SPD 20-A, de acordo com o descrito por Müller *et al.* (2010). Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio – 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 g/L. Para fase estacionária, utilizou-se a coluna de fase reversa NST 18 100 – C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm) a 30°C. As fases móveis foram Solução A – água ultrapura/ metanol (v/v) 95:5 e Solução B – metanol/ água ultrapura (v/v) 95:5. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/ min durante 35 min e os tempos de retenção foram 22,4 ± 0,1 min para RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> e 23,3 ± 0,1 min para RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>.

### **3.2.3 Análise estatística**

Para avaliar se houve diferença entre o crescimento microbiano e ramnolipídios produzidos na fermentação com d-limoneno, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com auxílio do software R. Para o planejamento do delineamento central composto rotacional e análise dos resultados com óleo de goiaba foi utilizado o software Statistica.

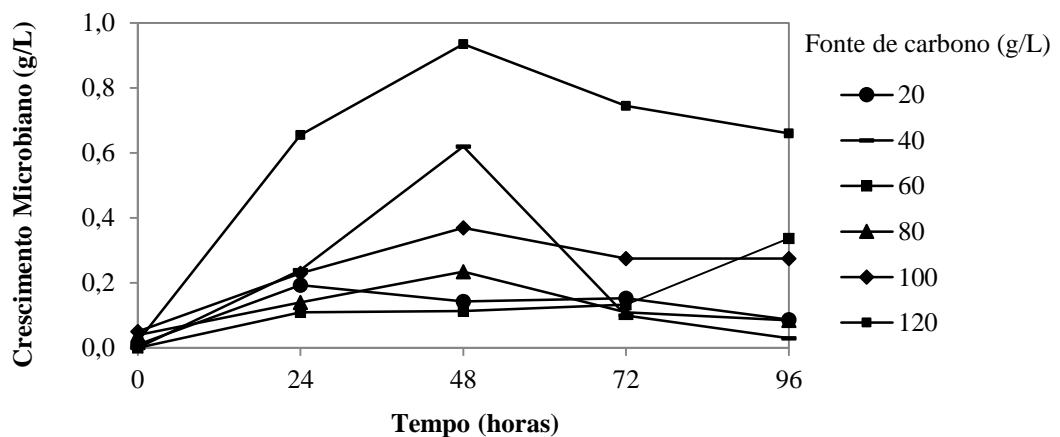
### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Avaliação do crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando d-limoneno como fonte de carbono.

O crescimento microbiano de *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meio contendo d-limoneno nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 g/L está indicado na Figura 5. Observa-se que na maior parte dos ensaios, o maior crescimento do microrganismo ocorreu em 48 h de fermentação. Nesse período, o meio contendo a concentração de 120 g/L de limoneno permitiu o desenvolvimento da maior biomassa ( $0,935 \pm 0,02$  g/L de massa seca). Entretanto, através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi observado que não houve diferença estatística no crescimento microbiano entre os meios ( $\chi^2 = 53,547$ ;  $g.l. = 46$ ;  $p = 0,2072$ ).

Em um primeiro momento, as concentrações da fonte de carbono testadas eram as mesmas dos experimentos realizados com óleo de semente de goiaba (80, 100 e 120 g/L). Entretanto, devido ao baixo crescimento do microrganismo nessas condições, optou-se pelos experimentos com 20, 40 e 60 g/L de OL em virtude da hipótese do monoterpene em excesso poder inibir o desenvolvimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1.

**Figura 5** - Perfil de crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meio com d-limoneno em diferentes concentrações. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação.

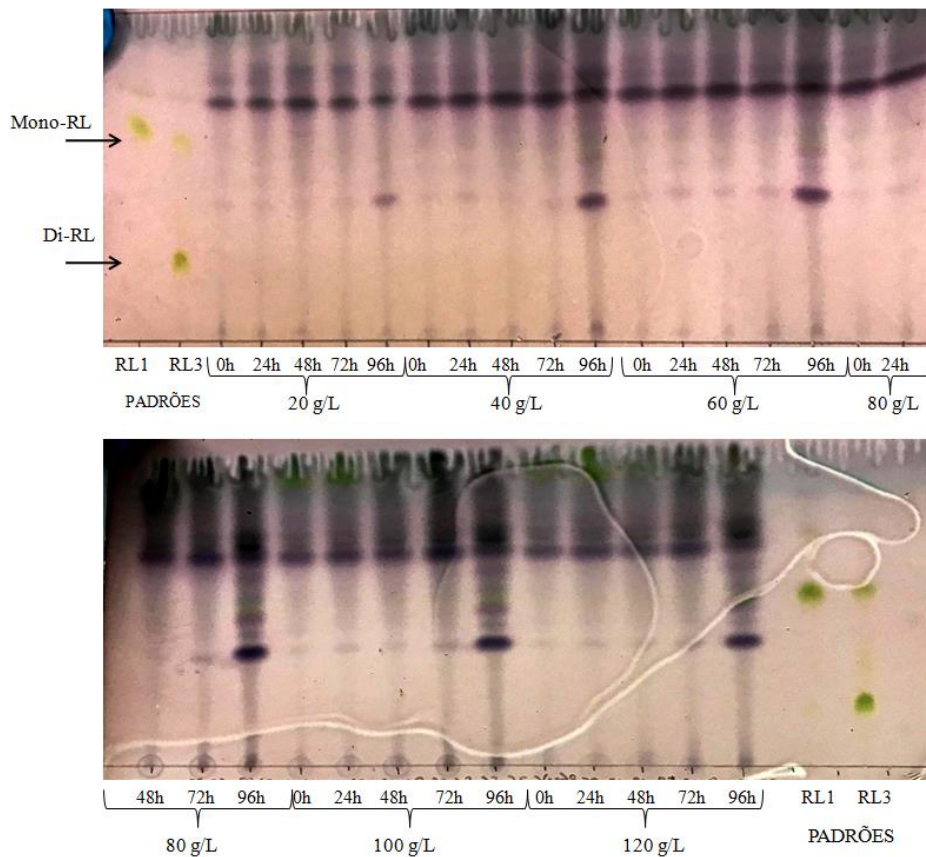


Fonte: Elaborada pela própria autora.

#### 3.3.2 Avaliação qualitativa da produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando d-limoneno como fonte de carbono

A produção de ramnolipídios foi verificada primeiramente por cromatografia em camada delgada (TLC – *Thin layer chromatography*) (Figura 6), onde foram utilizados os padrões de mono- e di- RL para comparação. A síntese desse metabólito não foi verificada em altas concentrações, pois não houve a formação de spots bem definidos que apresentassem o mesmo fator de retenção (*R<sub>f</sub>*) dos padrões aplicados. Por outro lado, foram encontrados spots que podem indicar a presença de formação de outros compostos, como ácidos graxos, sendo um spot bastante pronunciado após 96 h de fermentação em todas as concentrações de d-limoneno.

**Figura 6** - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em diferentes concentrações de d-limoneno nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h de fermentação. Os padrões de mono- (RL1) e di- (RL3) ramnolipídios foram utiliza



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Na literatura, já foi reportado o acúmulo de metabólitos produzidos por microrganismos onde utilizou-se d-limoneno como única fonte de carbono e energia. Os autores demonstraram o acúmulo de dihidrocarvona, carvona, carveol, limoneno-1,2-*cis*-diol, 1-hidroxi-2oxo-limoneno, limoneno-1,2-*trans*-diol, limoneno-6,9-*trans*-diol, ácido perílico,

ácido  $\beta$ -isopropenil pimérico, ácido 2-hidroxi-8-p-menten-7-óico e ácido 6,9-dihidroxi perílico. Essas substâncias foram identificadas no cultivo utilizando uma linhagem de *Pseudomonas*. Os compostos foram fracionados a partir de diferentes solventes e valores de pH e identificados com auxílio de cromatografia em camada delgada e ressonância magnética nuclear (DHAVALIKAR; BHATTACHARYA, 1966). Além desses, já foram reportados outros metabólitos produzidos a partir do cultivo de diferentes microrganismos em meio contendo d-limoneno. São exemplos: aldeído perílico, produzido por *Bacillus stearothermophilus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium* sp.; limoneno-1,2 epóxido hidrolase produzido por *Diplodia gossypina*, *Corynespora cassicola* e *Rhodococcus erythropolis* e limoneno-8,9 epóxido, produzido a partir de *Xanthobacter* sp (DUETZ *et al.*, 2003).

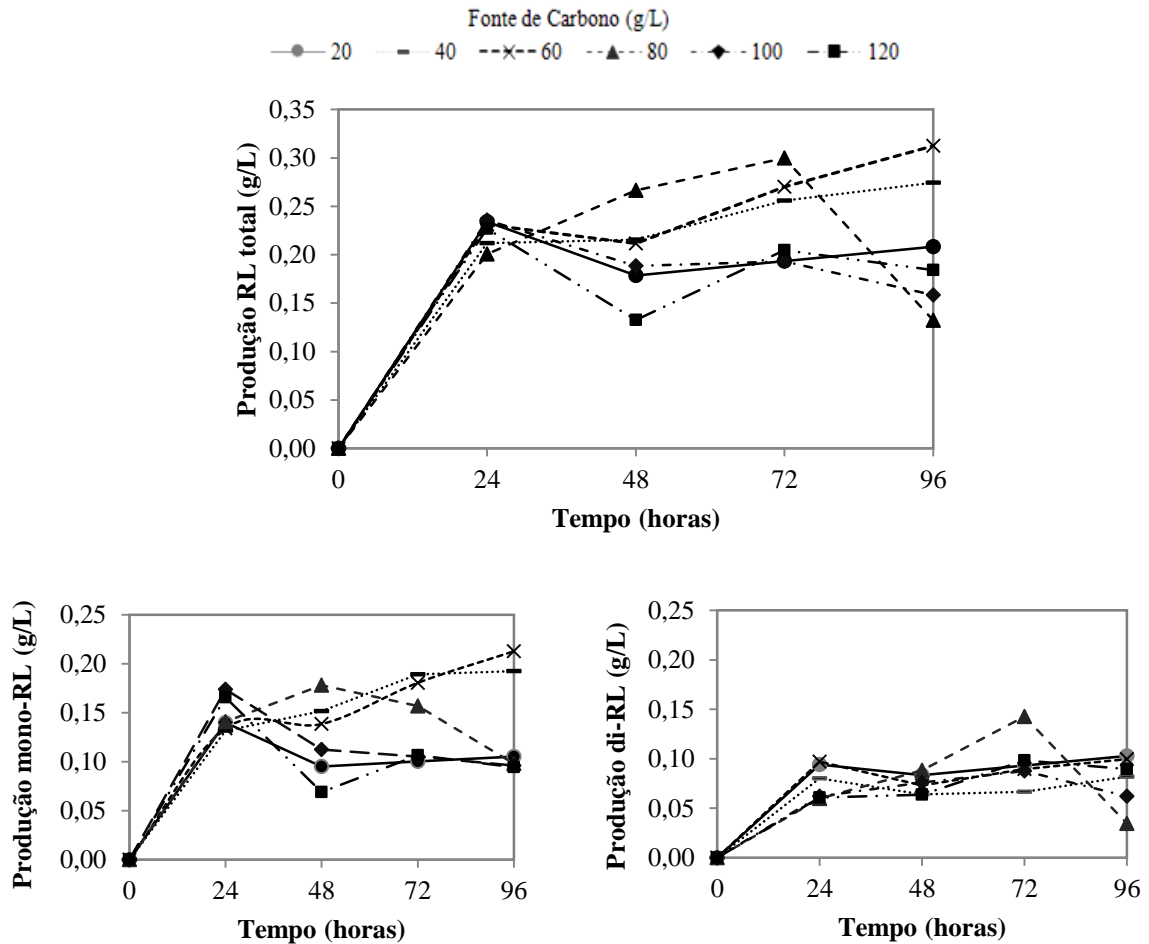
Fica evidente a diversidade de derivados do d-limoneno resultantes de biotransformações microbianas. Como sua estrutura química é bastante similar a vários monoterpenos oxigenados com fragrância agradável, o d-limoneno pode ser utilizado como precursor na síntese desses compostos que apresentam aplicação na indústria (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). Além disso, segundo Crowell (1999), alguns desses derivados já demonstraram atividade biológica *in vivo* contra alguns tipos de tumores. Esses monoterpenos apresentaram ação de quimioprevenção e quimioterapia contra câncer através de múltiplos mecanismos.

Em função disso, fracionar, identificar e quantificar esses metabólitos pode ser bastante interessante. Esse aprofundamento não ocorreria em conformidade com os objetivos dessa pesquisa, mas pode trazer um novo direcionamento para o uso de *P. aeruginosa* LBI 2A1 e d-limoneno como fonte de carbono. Tais resultados podem ser melhor elucidados através de espectrômetro de massas e ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

### **3.3.3 Avaliação quantitativa da produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando d-limoneno como fonte de carbono**

Em um segundo momento, as concentrações do biossurfactante produzido foram quantificadas através de HPLC. A produção de mono-, di- RL e RL total usando d-limoneno está expressa na Figura 7. Em resumo, a produção foi baixa para as diferentes concentrações. As sínteses mais elevadas foram encontradas após 72 e 96 h de fermentação, variando de acordo com a concentração de substrato no meio. O maior valor foi obtido no meio de cultivo contendo 60 g/L de d-limoneno, após 96 h, com uma produção de  $0,312 \pm 0,005$  g/L de RL total.

**Figura 7** - Produção de mono- (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), di- (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e ramnolipídios total por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meios contendo diferentes concentrações de d-limoneno. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

O perfil de produção das espécies homólogas não se manteve similar nas diferentes concentrações de substrato. Observa-se em todos os ensaios que a produção de mono- foi superior à de di- RL. O meio contendo 60 g/L de d-limoneno apresentou a maior porcentagem de mono-RL. Foram reportados 62,2 % (m/m) desse homólogo em 24 h de fermentação (0,23 g/L) e acima de 70% (m/m) nos seguintes tempos (48, 72 e 96 h), respectivamente: 0,21; 0,27; 0,31 g/L.

O uso de d-limoneno como fonte de carbono não propiciou resultados satisfatórios para produção do biossurfactante e as diferentes concentrações do substrato utilizadas não apresentaram diferença significativa. A hipótese foi confirmada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Tabela 7).

**Tabela 7** - Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença estatística para produção de mono-, di-RL e ramnolipídio total. Foram considerados significativos os parâmetros com valores de p menores do que 5 %.

<b>Resposta avaliada</b>	<b><math>x^2</math></b>	<b><i>g.l.</i></b>	<b><i>p</i></b>
Mono-RL (RhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub> )	46,36	41	0,2607
Di-RL (RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub> )	29,25	28	0,3999
RL total	44,77	51	0,7178

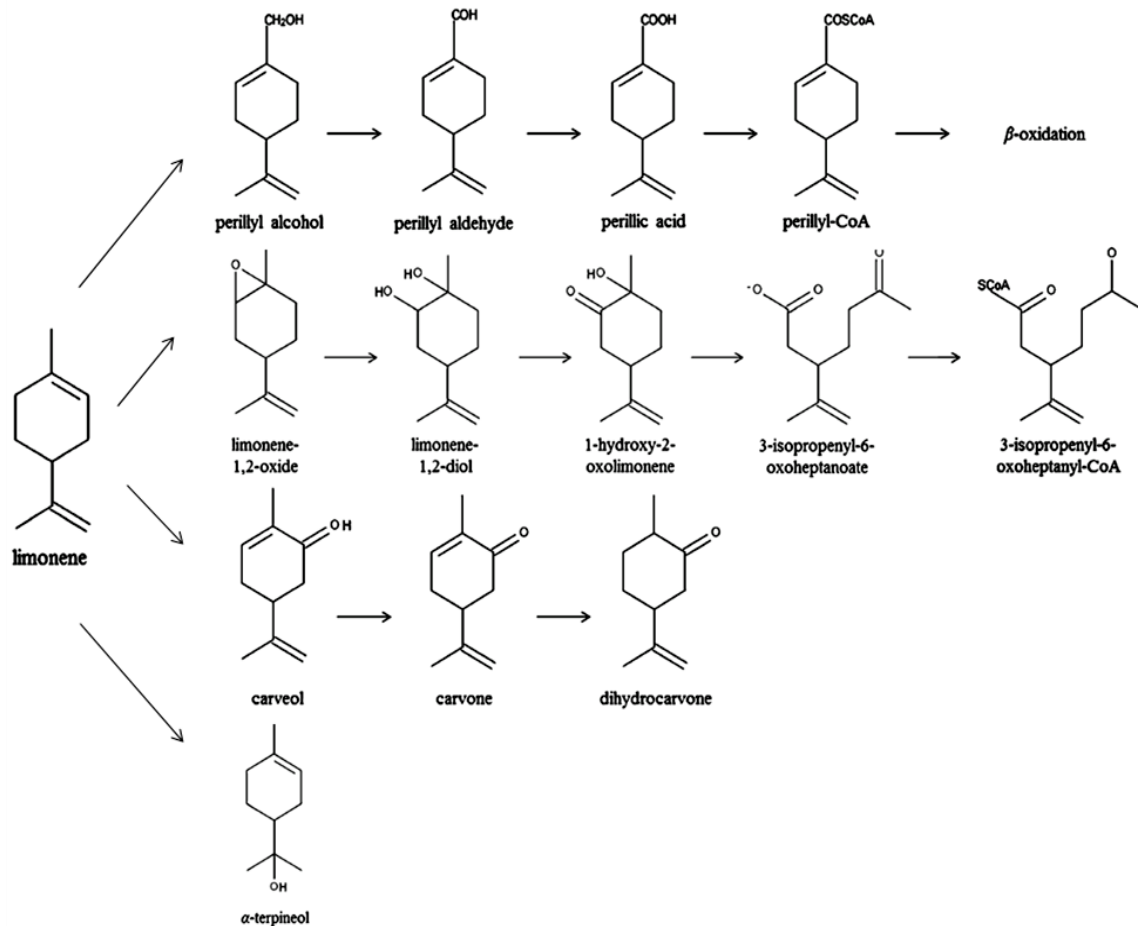
**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Isso demonstra que a fonte de carbono escolhida é pouco viável para o crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1, assim como para produção do metabólito de interesse. A linhagem escolhida habitualmente demonstra alta produção de biomassa e rendimento em fontes de carbono hidrofóbicas, entretanto, o d-limoneno mostra-se como um óleo essencial, monoterpenoide, com ausência de ácidos graxos. Além disso, a baixa viabilidade para esses fins pode estar relacionada a alta volatilidade e toxicidade do substrato, além do fato do mesmo apresentar atividade antimicrobiana (CHATTERJEE; BHATTACHARYYA, 2001; DUETZ *et al.*, 2003). Dessa maneira, suas propriedades químicas podem explicar os resultados de crescimento obtidos.

Ainda assim, os testes realizados com d-limoneno demonstraram que *P. aeruginosa* LBI 2A1 é capaz produzir ramnolipídios em baixas concentrações e expressa maior produção da espécie homóloga RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>. Para entender como esse substrato é metabolizado pelo microrganismo e transformado em biossurfactante, é preciso avaliar as possíveis rotas metabólicas relacionadas ao seu consumo. Segundo Dhavalikar e Bhattacharya (1966), é provável que a biotransformação do limoneno ocorra a partir da inserção de uma hidroxila no carbono 7 (hidroxilação), que resultará na formação do álcool perílico. Em seguida, a oxidação na função álcool formará o ácido perílico e por fim, o composto passa por processo de hidratação e segue por um caminho análogo a  $\beta$ -oxidação. Além dessa via, as outras possíveis rotas de bioconversão do limoneno estão ilustradas na Figura 8.



**Figura 8** - Vias de bioconversão de limoneno por linhagens de *Pseudomonas*.



Fonte: Modificado de Molina, Pimentel e Pastore (2013).

Sendo assim, é possível presumir a rota de transformação desse terpeno em ramnolipídios seguindo a via da  $\beta$ -oxidação. A biossíntese dos glicolipídios pode ocorrer a partir de quatro formas diferentes, mas no caso da síntese por bactérias do gênero *Pseudomonas*, a transformação ocorre por duas rotas independentes, onde uma será responsável pela produção da porção hidrofílica e outra, da porção hidrofóbica (SYLDATK; WAGNER, 1987). Alguns autores sugerem que tanto a  $\beta$ -oxidação quanto a síntese *de novo* são responsáveis pela origem de precursores lipídicos (ZHANG; JU *et al.*, 2012). E, segundo Abdel-Mawgoud, Lepine e Deziel (2014), a  $\beta$ -oxidação se mostra como fonte predominante do ácido 3-hidroxialcanóico (AHA), composto que dará origem ao mono- e di- RL, respectivamente.

Diante disso, visto que é possível produzir ramnolipídios além da possibilidade de outros metabólitos de interesse industrial, o uso do d-limoneno apresenta relevância. Uma evolução adaptativa frente a essa fonte de carbono pode se mostrar como uma alternativa interessante. Esse tipo de estratégia ocorre através de aumentos graduais de concentração do

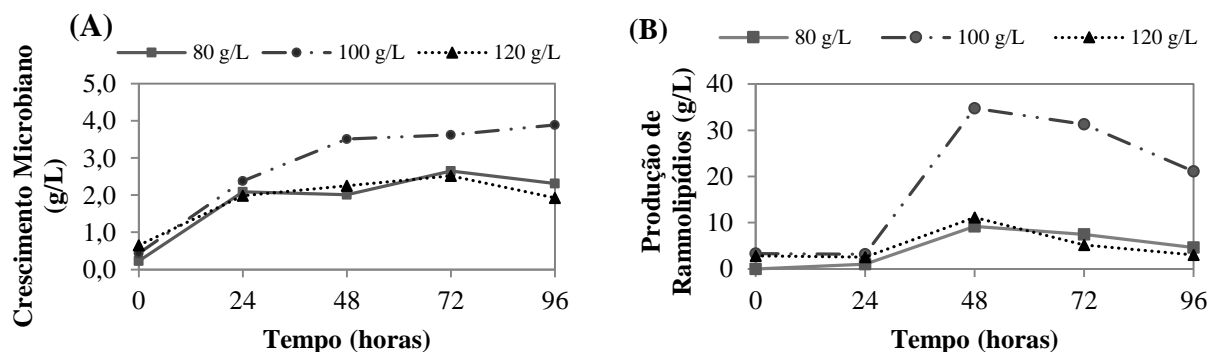
substrato, seleção e replicação das células sobreviventes em função da seleção natural. Isso pode resultar na obtenção de células adaptadas às condições de cultivo, o que permitiria uma maior produção de biomassa. E então, pode propiciar a realização de experimentos com a finalidade de produção desses metabólitos.

### 3.3.4 Avaliação do crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 e produção de ramnolipídios utilizando óleo de semente de goiaba como fonte de carbono

O perfil de crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 nos meios com óleo de semente de goiaba nas concentrações de 80, 100 e 120 g/L, assim como a produção de ramnolipídios, pode ser visualizado na Figura 9. A fonte de carbono utilizada demonstrou viabilidade para o cultivo do microrganismo, resultando em valores superiores de biomassa em comparação com o d-limoneno. O valor máximo de crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 ocorreu em tempos diferentes, dependendo da concentração de óleo empregada.

Aparentemente, o óleo de goiaba na concentração de 100 g/L mostrou-se melhor para produção de biomassa, sendo que o máximo crescimento do microrganismo ocorreu em 96 h de fermentação ( $3,89 \pm 1,12$  g/L de massa seca). Por outro lado, os meios contendo 80 e 120 g/L de fonte de carbono promoveram melhores resultados de crescimento em 72 h ( $3,02 \pm 0,40$  e  $2,52 \pm 0,19$  g/L de massa seca, respectivamente).

**Figura 9** - Crescimento microbiano (A) e produção de ramnolipídios (B) por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em meios contendo diferentes concentrações de óleo de semente de goiaba. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37 °C durante 96 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Em relação à produção do biossurfactante, as maiores concentrações ocorreram em 48 h de fermentação em todos os ensaios (Figura 9B). A maior concentração de biossurfactante foi obtida no meio contendo 100 g/L de óleo de goiaba ( $34,73 \pm 5,15$  g/L de RL). De maneira

geral, o perfil de produção foi bastante similar para os meios contendo 80 e 120 g/L, os quais atingiram em 48 h os valores de  $9,18 \pm 3,35$  e  $11,15 \pm 2,87$  g/L de RL, respectivamente.

As características da fonte de carbono podem explicar as respostas obtidas, pois o óleo de semente de goiaba é composto majoritariamente pelos ácidos linoleico C<sub>18:2</sub> (72 – 77 %) e oleico C<sub>18:1</sub> (8 – 11 %). Como citado anteriormente, a linhagem escolhida é bastante adaptada às fontes hidrofóbicas. Essa cepa mutante foi selecionada por Lovaglio (2011) e apresentou maior produção de ramnolipídios em óleo de girassol, cuja composição apresenta predominância de ácidos graxos insaturados.

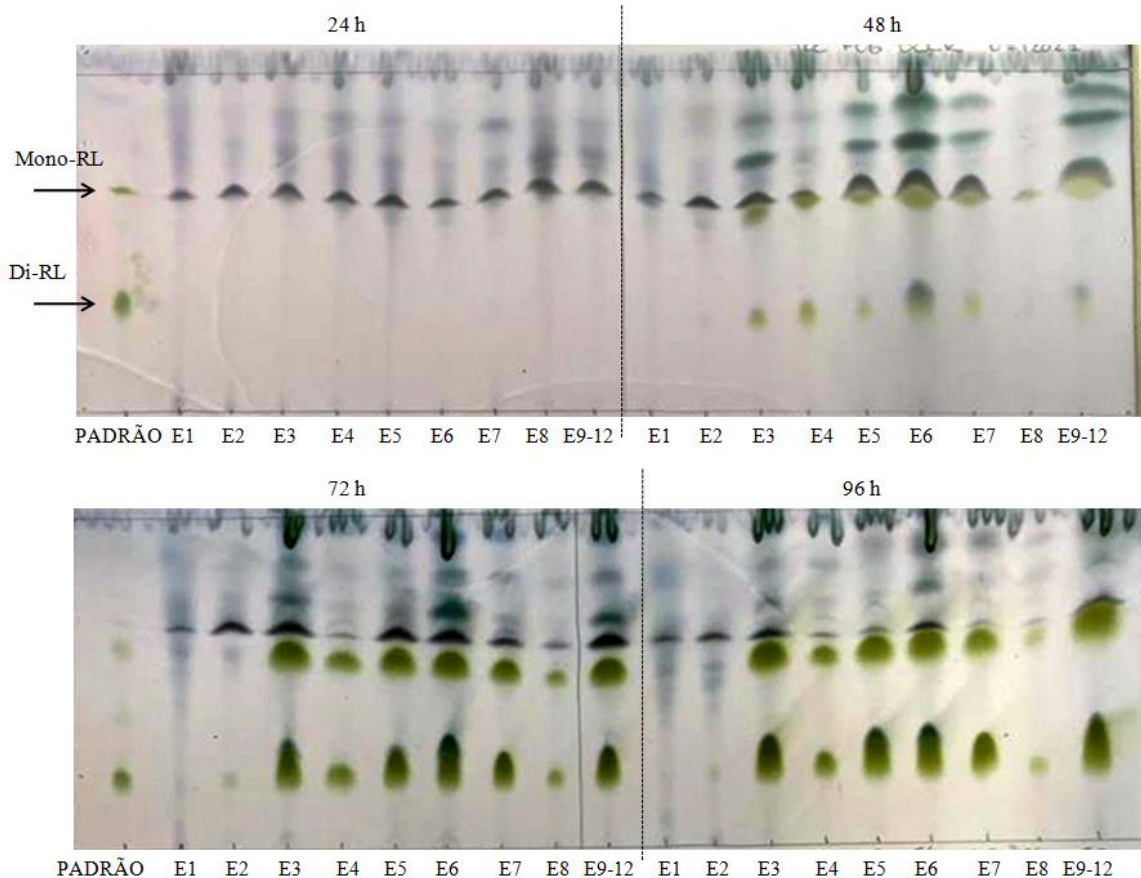
Aparentemente, os ácidos graxos que constituem os óleos parecem influenciar a produção do RL. Costa *et al.* (2006) estudaram diferentes óleos vegetais nativos para síntese de ramnolipídios utilizando *P. aeruginosa* LBI (linhagem selvagem) e obtiveram uma produção de 9,2 g/L RL utilizando óleo de maracujá. Segundo Malacrida e Jorge (2012), esse óleo também é composto pelos ácidos linoleico (73 %) e oleico (13 %).

Em função do óleo de semente de goiaba ter se mostrado como a fonte de carbono mais promissora para crescimento microbiano e produção de ramnolipídios, optou-se por ela para realizar a otimização da produção do composto de interesse. A concentração de 100 g/L de substrato foi escolhida como ponto central do planejamento experimental.

### **3.3.5 Planejamento Experimental para otimizar a produção de ramnolipídios utilizando óleo de semente de goiaba**

A quantificação da produção de ramnolipídios foi observada inicialmente de forma qualitativa, a partir de cromatografia em camada delgada (Figura 10), onde notou-se a aparição de spots bem definidos com mesmo tempo de retenção dos padrões de mono- e di-RL. A partir destes, foi escolhido um volume de amostra para quantificação em HPLC, que resultou nos dados estudados a seguir.

**Figura 10** - Cromatografia em camada delgada indicando a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em diferentes condições de fonte de carbono e nitrogênio. As amostras foram coletadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 h de fermentação. Os padrões de mono- (RL1) e di- (RL3) ramnolipídios foram utilizados para comparação dos spots.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios realizados a partir do delineamento composto central rotacional com variação de concentração de fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) e fonte de carbono (óleo de semente de goiaba) estão demonstrados na Tabela 8, assim como os resultados obtidos para produção de RL. Os resultados são referentes à produção de RL para 96 horas de fermentação, tempo no qual a produção foi máxima para a maioria dos ensaios realizados (Figura 11). Nesse tempo, a produção do biossurfactante variou de 11,04 a 42,15 g/L (ensaios 1 e 11, respectivamente). Com isso, percebe-se que a variação de concentração de carbono e nitrogênio influenciou na produção do metabólito.

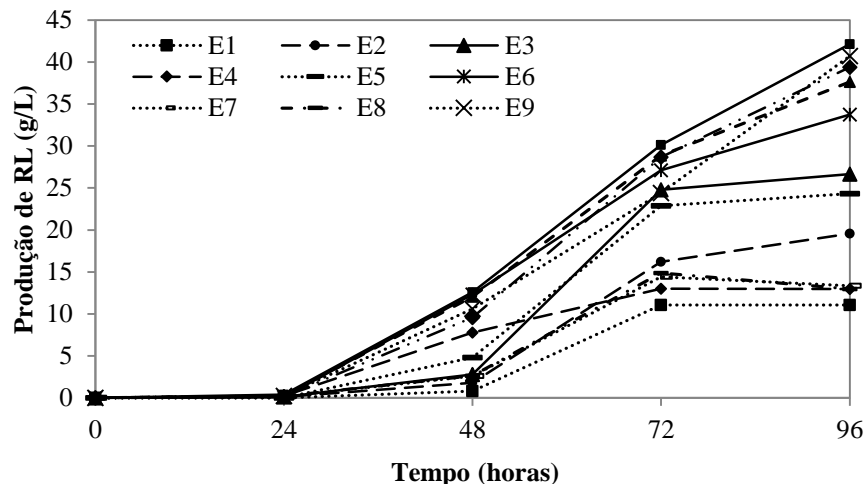
**Tabela 8** - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de *P. aeruginosa* LBI 2A1. Os meios foram compostos por óleo de semente de goiaba como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. As variáveis independentes estão representadas pelos níveis codificados e reais (entre parêntesis). As respostas correspondem a 96 h de fermentação.

Ensaios	Variáveis	Resposta
---------	-----------	----------

	$X_1$	$X_2$	$Y$
	Fonte de carbono (g/L)	Fonte de nitrogênio (g/L)	Produção de RL (g/L)
1	-1 (50,0)	-1 (5,00)	11,05
2	-1 (50,0)	+1 (15,00)	26,66
3	+1 (150,0)	-1 (5,00)	19,55
4	+1 (150,0)	+1 (15,00)	12,98
5	- 1,41 (29,3)	0 (10,00)	24,33
6	+ 1,41 (170,7)	0 (10,00)	33,73
7	0 (100,0)	- 1,41 (2,93)	13,33
8	0 (100,0)	+ 1,41 (17,07)	12,97
9	0 (100,0)	0 (10,00)	40,71
10	0 (100,0)	0 (10,00)	37,64
11	0 (100,0)	0 (10,00)	42,15
12	0 (100,0)	0 (10,00)	39,38

Fonte: Elaborada pela própria autora.

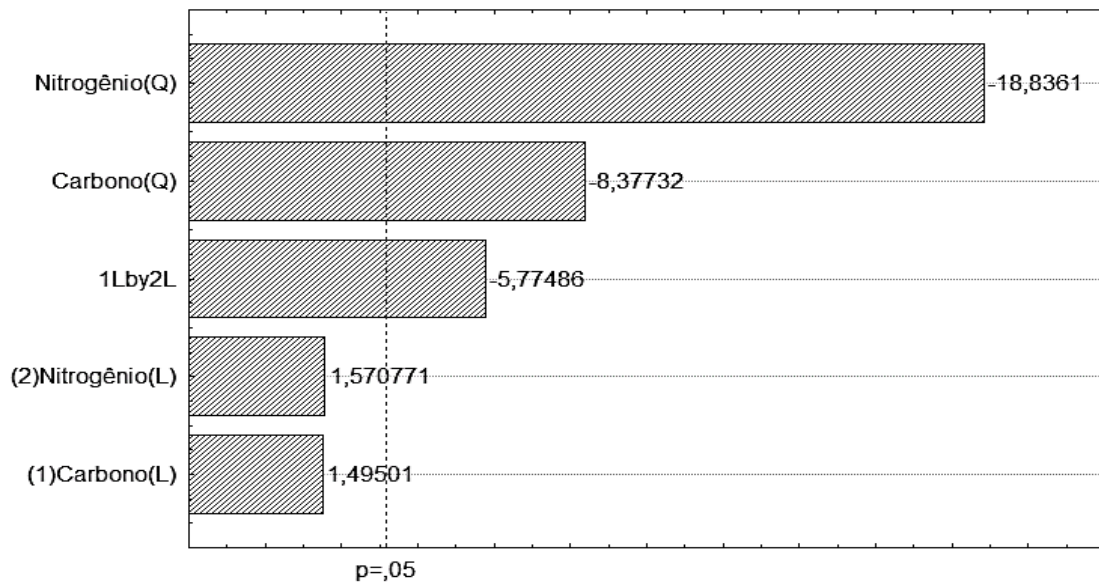
**Figura 11** - Produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação. Os ensaios 9 – 12 estão representados pela média dos valores em E9.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre a produção de RL são apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 12). Foram considerados significativos os parâmetros com valores de  $p$  menores do que 5 %. Assim, os efeitos quadráticos das variáveis fonte de nitrogênio e carbono foram significativos ( $p < 0,05$ ), bem como a interação entre elas. Observa-se com isso que a concentração de nitrogênio foi o fator com maior influência na produção de RL, seguido pela concentração de carbono e por último, a interação entre as duas variáveis.

**Figura 12** - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis [ ] fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em 96h de fermentação.



\* Termos lineares estão associados à letra L e termos quadráticos à letra Q.

\*Os valores são considerados absolutos.

\*1Lby2L indica a interação entre os fatores.

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

O resultado desses efeitos pode ser melhor visualizado na Tabela 9, cuja ordenação crescente dos ensaios foi realizada de acordo com os valores de produção de ramnolipídios. Os ensaios 9 – 12 demonstraram a melhor produção de 39,97 g/L de RL e proporção C/N 10. Entretanto, os ensaios 1 e 4 também resultam na mesma proporção C/N 10, mas exibiram as produções de RL mais baixas (11,05 e 12,98 g/L de RL, respectivamente). Esses ensaios apresentam as concentrações de carbono e nitrogênio nos níveis codificados -1 ou +1 simultaneamente, o que demonstra que essas variáveis em níveis muito baixos ou muito altos, mesmo que em equilíbrio, resultam na formação mais baixa do produto. Logo, a interação entre as duas variáveis não foi o fator mais importante para otimizar a resposta e o rendimento.

Para Raza *et al.* (2007) e Wu *et al.* (2007), proporções altas de C/N são benéficas à produção de RL. Nos estudos de Guerra-Santos, Kapelli, Fietcher (1984), foi observado que a limitação de nitrato resultou na mudança do metabolismo microbiano, redução da concentração de biomassa e aumento da produção do metabólito. Da mesma maneira, para Ramana e Karanth (1989), a produção de RL foi aumentada conforme houve o esgotamento do nitrogênio. Por outro lado, nos experimentos realizados em reator por Lovaglio (2011), a produtividade máxima de RL ocorreu concomitantemente ao excesso de nitrogênio.

Isso sugere que a relação C/N não constitui-se de um padrão a ser seguido e não deve ser levada como um fator singular ou prioritário para otimizar a produção de ramnolipídios.

As circunstâncias demonstradas nesse delineamento experimental sugerem que manter a concentração de nitrogênio dentro de uma faixa otimizada é mais importante do que o fator C/N em si.

**Tabela 9** - Ordenação crescente dos ensaios em relação à maior produção de ramnolipídios, demonstrando os níveis codificados e reais dos ensaios, a proporção carbono/nitrogênio em cada um deles e as respostas biomassa, ramnolipídios e fator de conversão produto/biomassa.

	Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais		Proporção C/N	Biomassa (g/L)	RL (g/L)	Fator de conversão produto/biomassa (g/g)
		C	N	C(g/L)	N(g/L)				
1	E9-12	0	0	100	10	10	4,88	39,97	8,16
2	E6	+1,41	0	170,7	10	17,1	4,75	33,73	7,10
3	E2	-1	+1	50	15	3,3	4,83	26,66	5,52
4	E5	-1,41	0	29,3	10	3	4,54	24,33	5,36
5	E3	+1	-1	150	5	30	5,15	19,55	3,80
6	E7	0	-1,41	100	2,93	33,9	5,06	13,33	2,63
7	E8	0	+1,41	100	17,7	5,9	4,8	12,98	2,70
8	E4	+1	+1	150	15	10	3,39	12,97	3,83
9	E1	-1	-1	50	5	10	2,09	11,05	5,29

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Pela análise de variância (ANOVA) é possível confirmar os dados do Diagrama de Pareto e também pode-se observar que o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para a produção de RL foi de 0,944, o que indica que os experimentos se ajustam em 94,4 % ao modelo proposto (Tabela 10).

**Tabela 10** - Análise da variância (ANOVA) para a produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

Variáveis	ANOVA				
	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	P
(1)Carbono (L)	8,239	1	8,239	2,2351	0,231785
Carbono (Q)	258,699	1	258,699	70,1796	<b>0,003567</b>
(2)Nitrogênio(L)	9,095	1	9,095	2,4673	0,214267
Nitrogênio(Q)	1307,878	1	1307,878	354,7991	<b>0,000327</b>
1L by 2L	122,933	1	122,933	33,3490	<b>0,010324</b>
Falta de Ajuste	78,904	3	26,301	7,1350	0,070406
Erro puro	11,059	3	3,686		
Soma Quadrática Total	1619,716	11			

\* Termos lineares estão associados à letra L e termos quadráticos à letra Q.

\* Valores em negrito são considerados estatisticamente significativos ao nível de 95% confiança ( $p < 0,05$ ).

\*1Lby2L indica a interação entre os fatores.

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

A partir da resposta produção de RL ( $y$ ) foi possível modelar uma equação em função das variáveis independentes codificadas  $X_1$  – fonte de carbono (g/L);  $X_2$  – fonte de nitrogênio (g/L).

$$y = 39,97 - 26,36(X_1)^2 - 14,29 (X_2)^2 - 5,54 (X_1)(X_2)$$

A Tabela 11 apresenta os valores experimentais e previstos pelo modelo para a produção de RL, assim como os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do DCCR. Observa-se que os desvios foram baixos para todos os ensaios, o que demonstra que o modelo se ajusta bem às condições analisadas.

**Tabela 11** - Valores de produção de RL experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR. Valores referentes a produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em 96h de fermentação.

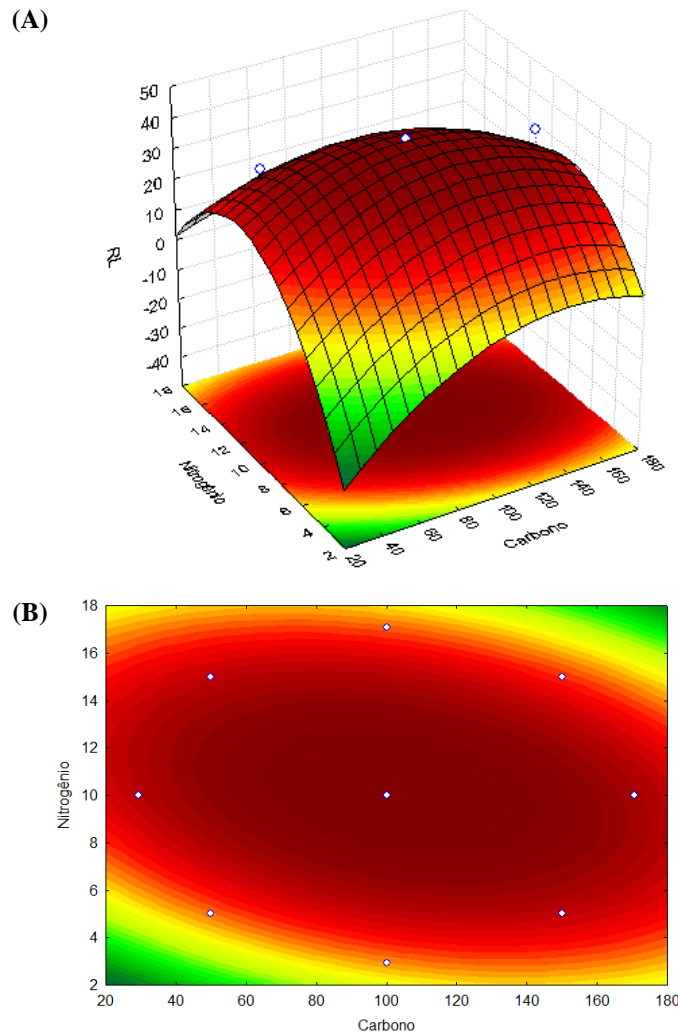
Ensaio	Prod. RL experimental (g/L)	Prod. RL previsto (g/L)	Desvio	Desvio Relativo (%)
1	11,05	11,70	-0,647	-5,86%
2	26,66	24,92	1,733	6,50%
3	19,55	24,81	-5,264	-26,93%
4	12,98	15,86	-2,884	-22,23%
5	24,33	25,82	-1,499	-6,16%
6	33,73	28,69	5,030	14,92%
7	13,33	9,88	3,449	25,88%
8	12,97	12,89	0,083	0,64%
9	40,71	39,98	0,750	1,84%
10	37,64	39,98	-2,325	-6,18%
11	42,15	39,98	2,175	5,16%
12	39,38	39,98	-0,600	-1,52%

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Os gráficos de superfície de resposta (Figura 13A) e curva de contorno (Figura 13B) gerados pelo modelo são capazes de demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma. A finalidade foi identificar as melhores condições de cultivo para obtenção das produções máximas de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1. Com isso, verificou-se que faixa de concentração otimizada para fonte de carbono é de 75 a 135 g/L e para fonte de nitrogênio de 8,0 a 12,0 g/L.



**Figura 13** - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a produção de RL por *P. aeruginosa* LBI 2A1 em função das variáveis fonte de carbono e nitrogênio.



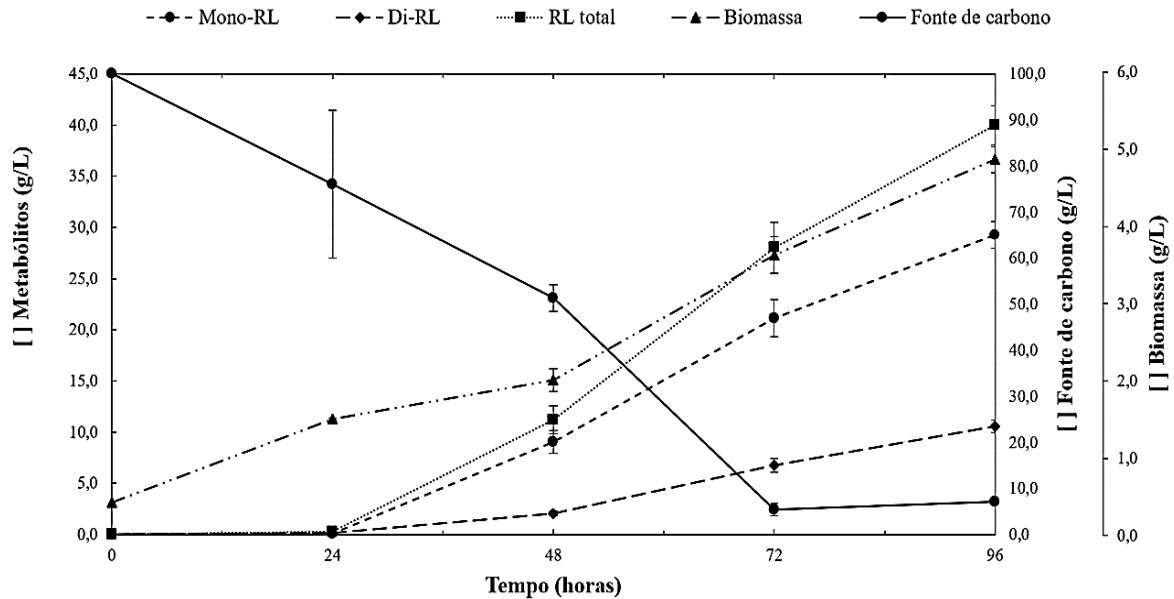
**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Os gráficos evidenciam que o aumento excessivo dessas variáveis não resultou no aumento da produção do metabólito, fazendo com que as concentrações escolhidas para o ponto central (variáveis codificadas = 0) resultassem na região otimizada. E diante disso, os ensaios 9 a 12 foram melhor analisados.

### 3.3.6 Avaliação da produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1 a partir das condições otimizadas geradas pela análise de superfície de resposta

O crescimento microbiano, o consumo da fonte de carbono, a produção dos homólogos mono- ( $\text{RhaC}_{10}\text{C}_{10}$ ) e di- ( $\text{RhaRhaC}_{10}\text{C}_{10}$ ) ramnolipídios e RL total estão representados na Figura 14.

**Figura 14** - Perfil de crescimento e produção de metabólitos e consumo da fonte de carbono por *P. aeruginosa* LBI 2A1 referente aos ensaios 9-12 (variáveis codificadas = 0) do delineamento composto central rotacional. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

As condições de cultivo permitiram o crescimento microbiano durante todo processo fermentativo, cuja biomassa máxima foi de  $4,88 \pm 0,43$  g/L em 96 h. A quantidade de fonte de carbono e nitrogênio foram suficientes para manutenção da bactéria em fase exponencial. A produção de ramnolipídios mostrou-se neste caso parcialmente associada ao crescimento, uma vez que o microrganismo cresce e após 24 horas começa a produção de ramnolipídios.

Esse fenômeno demonstra discordância com Radzuan *et al.* (2021), que observaram um produto associado ao crescimento no emprego de *P. aeruginosa* PAO1 crescendo em PFAD (destilado de ácidos graxos de palma) e FAME (éster metílico de ácidos graxos) como fontes de carbono. Os ramnolipídios são tipicamente produzidos na fase estacionária da fermentação quando a fonte de carbono ainda está disponível. Sodagari1 e Ju (2020) mostram perfis de produção de ramnolipídios com diferentes concentrações de nitrogênio e observaram que para as maiores, a produção de ramnolipídios está parcialmente associada ao crescimento e para as menores, associada ao crescimento.

Provavelmente, a concentração de ramnolipídios em 48 h ( $11,12 \pm 1,37$  g/L) auxiliou o microrganismo a acessar a fonte de carbono e permitiu um melhor crescimento. Isso pode

explicar a maior inclinação da linha de biomassa de 48 a 96 h (inclinação 24 h = 0,51; inclinação 48 e 72 h = 1,63 e 1,24, respectivamente) e também a maior queda no consumo de óleo no mesmo período. De acordo com Francy *et al.* (1991) e Kappeli, Fiechter (1977), biologicamente, uma das razões para os microrganismos produzirem biossurfactantes está relacionada ao acesso a substratos não solúveis em água através da solubilização e emulsificação de hidrocarbonetos. A produção do surfactante provavelmente facilitou a assimilação, transporte e metabolização do óleo pelas bactérias, o que justifica a correlação entre a síntese de RL e o crescimento microbiano.

Além do mais, observa-se que entre 48 e 96 horas há diminuição do percentual de mono-ramnolipídio e aumento do percentual de di-ramnolipídio (Tabela 12). Isso sugere que a segunda ramnosiltransferase, codificada por rhlC e que após as primeiras 24 horas tem sido regulada por rhlAB, inicia sua ação novamente (DÉZIEL *et al.*, 2003). Mas esse fenômeno ocorre sem afetar a produção de mono-ramnolipídios, mostrando que no caso dessa fonte de carbono há uma preferência pela produção desse congêneres, fator que pode estar associado a composição em ácidos graxos.

A produção de mono-RL foi bastante superior, totalizando 80,98 e 75,44 % do valor total do biossurfactante em 48 e 72 h, respectivamente. Segundo İközler *et al.* (2017) e Wu *et al.* (2019), o fato do mono-RL apresentar apenas uma ramnose modifica a disposição da camada que se dispõe na interface óleo/ água e resulta em uma atividade de superfície elevada em comparação ao di-RL. Provavelmente, essas propriedades tornam o mono-RL mais benéfico ao microrganismo.

**Tabela 12** - Fator de conversão do produto em biomassa (g/g) e porcentagem de mono e di- ramnolipídios através do tempo de fermentação.

Tempo (h)	Fator de conversão produto/ biomassa (g/g)	Mono-RL (%)	Di-RL (%)
0	0,00	0,00	0,00
24	0,17	42,84	56,8
48	5,55	80,98	18,6
72	7,69	75,44	24,2
96	8,19	73,14	26,5

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Por fim, o fator de conversão produto/biomassa (também na Tabela 12) mostrou-se crescente durante todo experimento e apresentou o valor máximo de 8,19 g/g em 96 h. Esses resultados são satisfatórios e sugerem que o aumento no tempo de realização da fermentação pode acarretar em rendimentos ainda maiores.

A composição em ácidos graxos do óleo de semente de goiaba também foi analisado (Tabela 13), assim como as amostras de óleo residual do bioprocesso (Figura 15).

**Tabela 13** - Composição em ácidos graxos do óleo de semente de goiaba a partir de GC-MS.

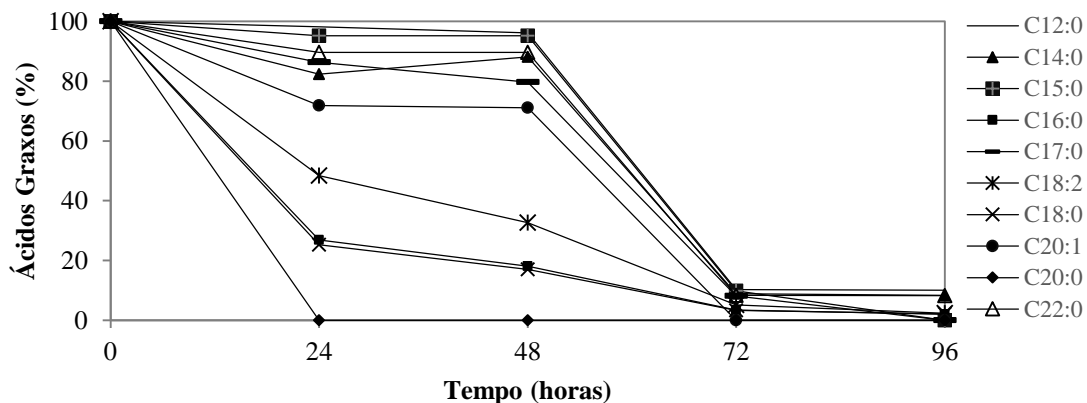
Simbologia	Ácido graxo (nome usual)	Fórmula Molecular	Concentração (%)
C12:0	Láurico	$C_{12}H_{24}O_2$	0,0000061
C14:0	Mirístico	$C_{14}H_{28}O_2$	0,0000034
C15:0	Pentadecanóico	$C_{15}H_{30}O_2$	0,0000027
C16:0	Palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	6,26
C17:0	Margárico	$C_{17}H_{34}O_2$	0,0000038
C18:2	Linoleico*	$C_{18}H_{32}O_2$	80,53
C18:0	Esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	11,73
C20:1	Eicosenóico	$C_{20}H_{38}O_2$	0,0000053
C20:0	Araquídico	$C_{20}H_{40}O_2$	1,49
C22:0	Behênico	$C_{22}H_{44}O_2$	0,0000071

\* O ácido insaturado C18 foi representado majoritariamente pelo ácido linoleico, mas contém isômeros.

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Com o gráfico abaixo mostrando o consumo, pode-se observar que o ácido graxo C20:0 foi consumido rapidamente em 24 horas, seguido do consumo de C18:0, C16:0 com cinética semelhante, sendo 70% nas primeiras 24 horas. Outro ácido graxo que apresenta consumo de 50% nas primeiras 24 horas é o C18:2. Os ácidos graxos de maior cadeia foram mais consumidos inicialmente apresentando a preferência pelo microrganismo, sendo  $C20:0 > C18:0 > C16:0 > C18:2$ .

**Figura 15** - Consumo dos ácidos graxos oriundos do óleo residual de semente de goiaba por *P. aeruginosa* LBI 2A1. O cultivo ocorreu a 200 rpm, 37°C durante 96 horas de fermentação.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

## **4 CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES HOMÓLOGAS E PROPRIEDADES DE SOLUÇÕES**

## 4.1 INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos produzidos a partir de microrganismos e que apresentam atividade tensoativa. Assim como os surfactantes químicos, em soluções, os biossurfactantes apresentam o potencial de reduzir as tensões superficiais e interfaciais, sendo utilizados como conciliadores de fases imiscíveis, através da formação de emulsões, suspensões, microemulsões, estabilizante de espumas e propiciando a umectação (DALVIN, 2011). Dessa maneira podem ser aplicados em diversos setores, como nas indústrias farmacêutica e biomédica (FRACCHIA *et al.*, 2012; BJERK *et al.*, 2021), no setor de cosméticos (ADU *et al.*, 2020) e na agricultura (SHARMA *et al.*, 2022).

Em comparação com os químicos, os biossurfactantes apresentam vantagens como menor toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de fontes renováveis e biocompatibilidade (DESAI; BANAT, 1997; SHARMA *et al.*, 2022). Além de que, de uma forma geral, apresentam uma concentração micelar crítica inferior. Em função disso, para diminuição da tensão superficial, menor quantidade de surfactante é necessária (DESAI; BANAT, 1997). A união e relação de todas essas propriedades somadas ao fato dos biossurfactantes apresentarem estabilidade diante de alterações de pH, temperatura e combinação com aditivos resulta em uma interessante viabilidade de aplicação industrial (LOVAGLIO *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2021).

O ramnolipídio é um exemplo de biossurfactante pertencente à classe dos glicolipídios e sintetizado principalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ROONEY *et al.*, 2009). Esse composto apresenta atividade de superfície elevada e maior rendimento de produção em relação a outros tensoativos. Pesquisas com ramnolipídios relatam sua capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m e valor de CMC entre 5 e 200 mg/L (ABALOS *et al.*, 2001).

Sua estrutura é formada por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a ácidos 3-hidroxicarboxílicos (JARVIS; JOHNSON, 1949; ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011). O ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* é caracterizado pela mistura de espécies homólogas, onde a quantidade de moléculas de ramnose e da cadeia de ácidos graxos pode variar (LANG e WAGNER, 1987). Dessa maneira, os homólogos podem ser enquadrados dentro dos grupos de mono-ramno-mono-lipídios, mono-ramno-di-lipídios, di-ramno-mono-lipídios e di-ramno-di-lipídios (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011).

A razão entre os homólogos acarreta em diferentes propriedades para o composto, por exemplo, a predominância de di-ramnolipídios implica num composto mais hidrofílico. A

mistura de homólogos presentes, assim como a proporção encontrada desses compostos, pode variar de acordo com o microrganismo utilizado, além das fontes de carbono presentes (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIETCHER, 1984; COSTA, 2010), acarretando em ramnolipídios que diferem em relação às suas funções e aplicabilidades.

Dessa forma, quando utilizam-se fontes de carbono ainda não testadas, assim como novas condições de cultivo, torna-se fundamental a caracterização dos ramnolipídios produzidos. Além disso, nesses casos, há ainda a possibilidade de encontrar espécies homólogas ainda não descritas na literatura. Essa última etapa da produção de um bioproduto mostra-se como um fechamento, onde o bioproduto em questão é estudado e resulta em um possível direcionamento de aplicação futura.

Os processos de *downstream* que incluem a separação das diferentes espécies homólogas ainda não são eficientes e viáveis economicamente. Mesmo quando é possível detectar a composição exata da mistura de ramnolipídios, a caracterização é feita levando em consideração a mistura total do surfactante extraído (İKIZLER *et al.*, 2017). Em função disso, o capítulo II teve como objetivo caracterizar os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando óleo de semente de goiaba e limoneno como fontes de carbono. A caracterização foi realizada através de testes de tensão superficial, turbidez, atividade de emulsificação e espectrometria de massas para o RL produzido com OG e através de espectrometria de massas para o RL produzido com OL.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Extração dos ramnolipídios**

Os ramnolipídios produzidos foram extraídos de acordo com o item 3.2.2.4 e em seguida, evaporados a 40°C em evaporador rotativo Fisatom mod. 802 e bomba a vácuo. Esse biosurfactante foi utilizado para determinação dos homólogos, testes de caracterização e coluna de separação (capítulo III). O tensoativo proveniente do óleo de semente de goiaba (com as condições estabelecidas a partir da metodologia de superfície de resposta oriunda do capítulo I) foi utilizado.

#### 4.2.2 Determinação da composição dos homólogos por LC-MS

As amostras de ramnolipídios foram ressuspensas em acetonitrila, diluídas em água ultrapura/ acetonitrila (v/v) (7:3) em uma concentração final de 500 ppm e filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . As análises foram realizadas através de LC-MS acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xevo TQD Triple Quadrupole e ionização por eletrospray em modo negativo (ESI-MS). O aparelho foi equipado com a coluna de fase reversa Acquity UPLC Beh-C18 (1,7 $\mu\text{m}$ , 2,1 x 500 mm; Waters Corp.).

Nas análises em LC utilizaram-se fases móveis compostas por ácido fórmico-água 0,1% (A) e ácido fórmico-acetonitrila 0,1% (B). O gradiente foi de 0/20, 20/95, 35/95, 36/20 (min/ %B), fluxo de 0,4 mL/ min, volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , tempo de corrida 32 min, (CHENG *et al*, 2017). A faixa de massas analisada foi de 200 a 800  $m/z$ . Para os experimentos de MS/MS o gás utilizado foi argônio e a energia de colisão variou de 5 a 25 eV.

#### 4.2.3 Tensão Superficial

As medidas de tensão superficial das soluções de ramnolipídios foram realizadas a temperatura ambiente, segundo o método do anel de De Nöuy utilizando-se um tensiômetro Krüss K6. As medidas foram realizadas utilizando 15 mL de solução e em duplicata. As soluções foram preparadas em água ultrapura e com ajuste do pH. As seguintes concentrações foram testadas: 1,0; 10; 30; 50; 100, 250, 500 e 1000 mg/L. A influência do pH foi avaliada com os valores variando de 3 – 9  $\pm$  0,1. Para ajuste do pH utilizou-se HCl (0,1 M) e NaOH (0,1 M). A homogeneização das amostras foi feita em agitador de amostras Norte Científica mod. NA 3600 tipo vórtex.

#### 4.2.4 Turbidez

As medidas de turbidez das soluções de ramnolipídios foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu) a 600 nm, a temperatura ambiente. As leituras foram feitas em triplicata. As soluções foram preparadas em água ultrapura na concentração de 1,0 mg/mL. A influência do pH foi avaliada com os valores variando de 4 – 8  $\pm$  0,1. E também foi avaliada a influência do álcool propilenoglicol (50,0 g/L) como aditivo. Para ajuste do pH utilizou-se HCl (0,1 M) e NaOH (0,1 M). A homogeneização das amostras foi feita em agitador de amostras.



#### 4.2.5 Atividade de Emulsificação

A atividade de emulsificação foi avaliada em tubos de ensaio contendo as mesmas dimensões. As soluções foram preparadas contendo duas fases, uma hidrofílica (2 mL) e outra hidrofóbica (2 mL). Os tubos foram agitados vigorosamente por 2 min e mantidos em repouso durante 30 dias. As medições da altura total da mistura e da altura da emulsão foram realizadas após 24, 48 e 72 h e depois de 5, 10, 20 e 30 dias. O experimento foi realizado em triplicata e a composição das soluções está descrita na tabela 14. A fase hidrofílica, quando composta por ramnolipídios e propilenoglicol, foi preparada na concentração de 1,0 e 50,0 g/L, respectivamente. A fase hidrofóbica foi composta por óleos utilizados na indústria de cosméticos. Em todos os ensaios foi realizado o ajuste de pH com os valores variando de  $4 - 8 \pm 0,1$ .

**Tabela 14** - Ensaios avaliados nos testes de atividade de emulsificação indicando a fase hidrofílica e a fase hidrofóbica respectivamente das soluções. As soluções contendo água ultrapura e PG foram utilizadas como controle.

<b>Composição dos ensaios</b>
Água ultrapura + óleo de açaí
Ramnolipídio + óleo de açaí
Propilenoglicol + óleo de açaí
RL + PG + óleo de açaí
Água ultrapura + óleo de andiroba
Ramnolipídio + óleo de andiroba
Propilenoglicol + óleo de andiroba
RL + PG + óleo de andiroba

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

A atividade de emulsificação foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde: AE = altura da emulsão e AT = altura total da mistura. Essas mensurações foram realizadas a partir de fotografias e com o auxílio do software ImageJ.

$$E = \frac{AE}{AT} \times 100$$

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Caracterização das espécies homólogas de ramnolipídios por espectrometria de massas

As análises por LC-MS forneceram a composição das espécies homólogas produzidas por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando o d-limoneno e o óleo de semente de goiaba como substrato. Os íons encontrados demonstraram  $m/z$  **475,4** (RhaC<sub>8</sub>C<sub>10</sub>/ RhaC<sub>10</sub>C<sub>8</sub>); **503,4** (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>); **529,2** (RhaC<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub>/ RhaC<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>); **531,9** (RhaC<sub>12</sub>C<sub>10</sub>); **555,6** (RhaC<sub>10</sub>C<sub>14:2</sub>), **621,4** (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>8</sub>/ RhaRhaC<sub>8</sub>C<sub>10</sub>); **649,1** (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>); **675,6** (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>/ RhaRhaC<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub>) e **677,6** (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>12</sub>/ RhaRhaC<sub>12</sub>C<sub>10</sub>) (Tabela 15). Sendo assim, a amostra referente ao bioprocesso onde utilizou-se óleo de semente de goiaba resultou em 9 espécies homólogas, onde cinco espécies correspondem a mono- e quatro espécies a di- RL. E na amostra referente ao bioprocesso onde utilizou-se d-limoneno, foram encontradas sete espécies homólogas, sendo três mono- e quatro di-RL.

**Tabela 15** - Composição elementar das espécies homólogas encontradas no ramnolipídios produzido por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando óleo de semente de goiaba como substrato.

Nº	Composição Elementar	Estrutura Molecular	[M-H] <sup>-</sup>	Tempo de retenção [min]	Energia de colisão [eV]	Abundância Relativa (%)	
			$m/z$			O. L.	O. G.
<i>Mono-ramnolipídios</i>							
I	C <sub>24</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	RhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	475,4	10,12	15	6,07	11,84
II	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	RhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	503,4	12,09	15	90,91	100,00
III	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	RhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	529,2	13,27	15	19,25	43,44
IV	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	RhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	531,9	14,29	15	N.D.	48,63
V	C <sub>30</sub> H <sub>51</sub> O <sub>9</sub>	RhaC <sub>10</sub> C <sub>14:2</sub>	555,6	14,13	15	N.D.	9,30
<i>Di-ramnolipídios</i>							
VI	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>8</sub> ; RhaRhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	621,4	9,22; 9,33	20	6,19	7,59
VII	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	649,1	11,12	25	100	28,37
VIII	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	675	12,28	20	6,80	9,41
IX	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	RhaRhaC <sub>12</sub> C <sub>10</sub> ; RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	677,6	13,13	25	17,39	57,24

\* N.D. = íon não detectado na amostra

\* A designação C<sub>x.n</sub> significa uma cadeia de ácido graxo com comprimento de cadeia de x e com n ligações insaturadas (-2n H).

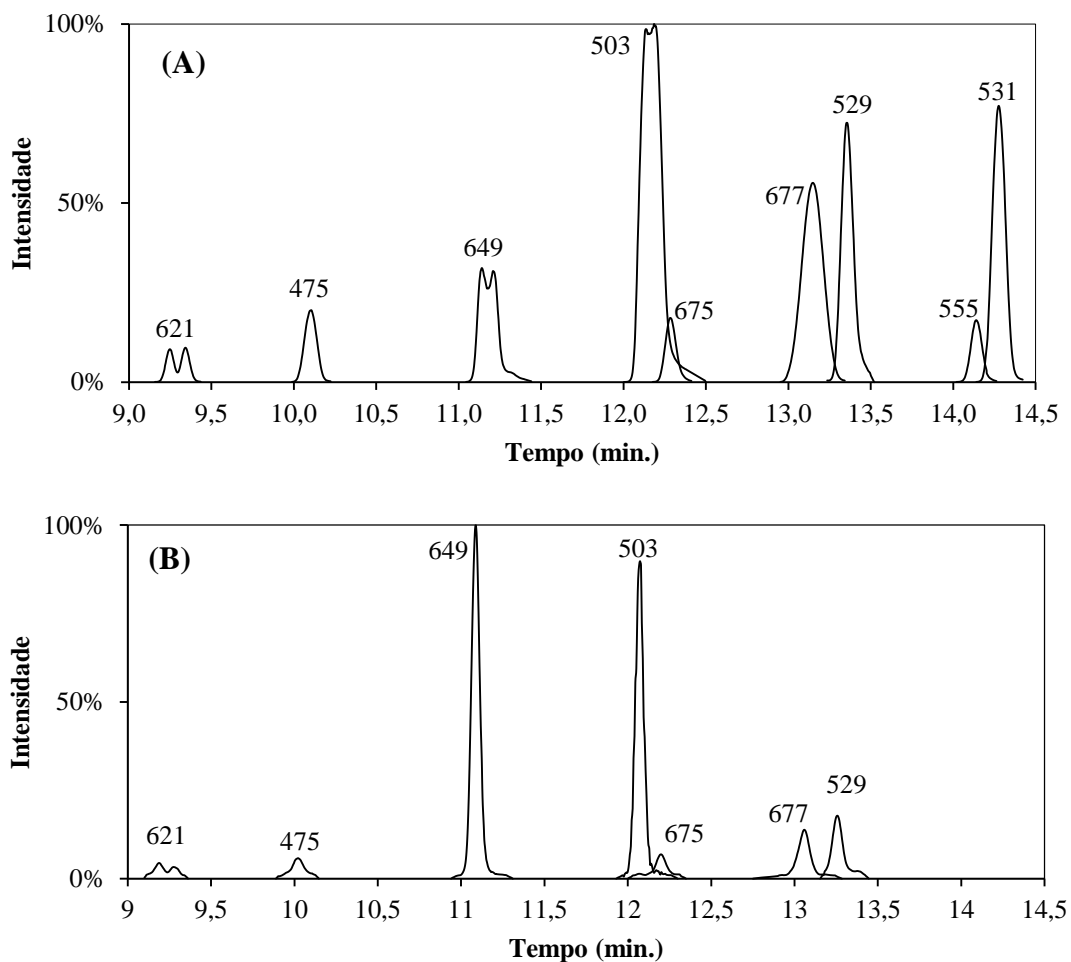
\* A energia de colisão é referente aos experimentos de ESI-MS/MS e o tempo de retenção é referente aos tempos encontrados na varredura realizada no modo SIR (*Selected Ion Recording*).

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

A análise foi realizada no modo SIR (*Selected Ion Recording*) (Figura 16) para verificação mais precisa dos íons e os valores das áreas encontrados foram utilizados para o cálculo da abundância relativa (%), utilizando o íon mais abundante como 100%. A partir dessa comparação, foi verificada diferença na proporção dos homólogos de acordo com a fonte de carbono utilizada, também indicados na Tabela 15.

Para o RL de OL, houve uma concentração similar dos íons 503,4 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e 649,1 (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) seguido por outra semelhança no percentual dos íons 529,2 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub>) e 677,6 (RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>12</sub> / RhaRhaC<sub>12</sub>C<sub>10</sub>). E também, observou-se que o microrganismo produziu ramnolipídios em uma proporção mono/di de 0,89. Já para o RL de OG, foi demonstrada uma maior produção de mono-RL, na proporção mono/di de 2,07 e uma maior propensão a produção de RLs com uma das cadeias de  $\beta$ -hidroxiácidos contendo 12 carbonos e ausência de insaturação.

**Figura 16** - Análise de ramnolipídios por UPLC - MS realizado no modo SIR (*Selected Ion Recording*). (A) RL produzidos a partir de óleo de goiaba e (B) RL produzidos a partir de d-limoneno.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Foi relatado por Nitschke *et al.* (2011) ao utilizar borra de óleo de soja como fonte de carbono, 10 homólogos de ramnolipídios foram produzidos por *P. aeruginosa* LBI. Já, Lovaglio *et al.* (2014) relataram a produção de 9 homólogos de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1, utilizando óleo de girassol, óleo de mamona e borra de óleo de milho. A

variação na proporção de homólogos produzidos depende da cepa, do meio de cultura utilizado, das condições de cultivo e do tempo de cultivo (MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999). Esta variação na composição dos homólogos influencia as propriedades físico-químicas dos ramnolipídios (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIECHTER, 1984).

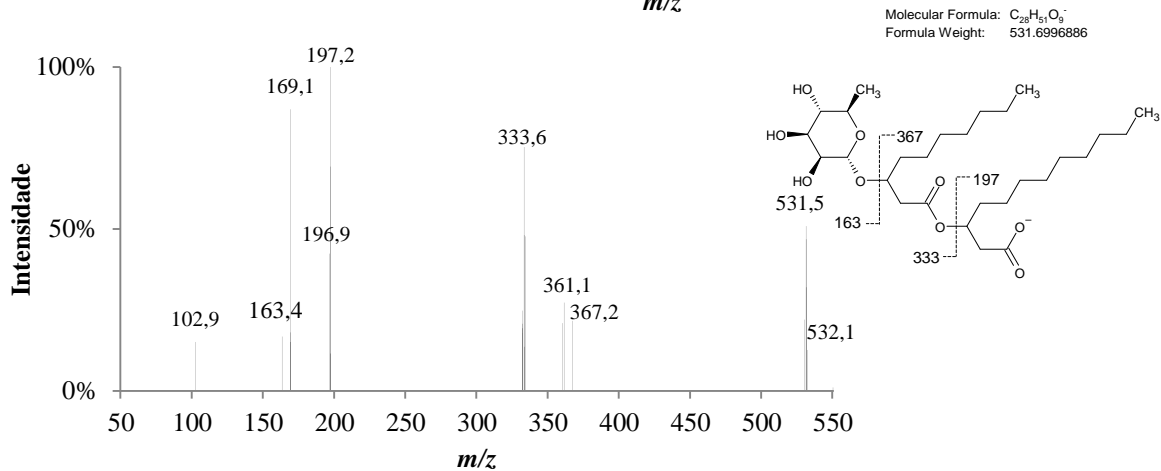
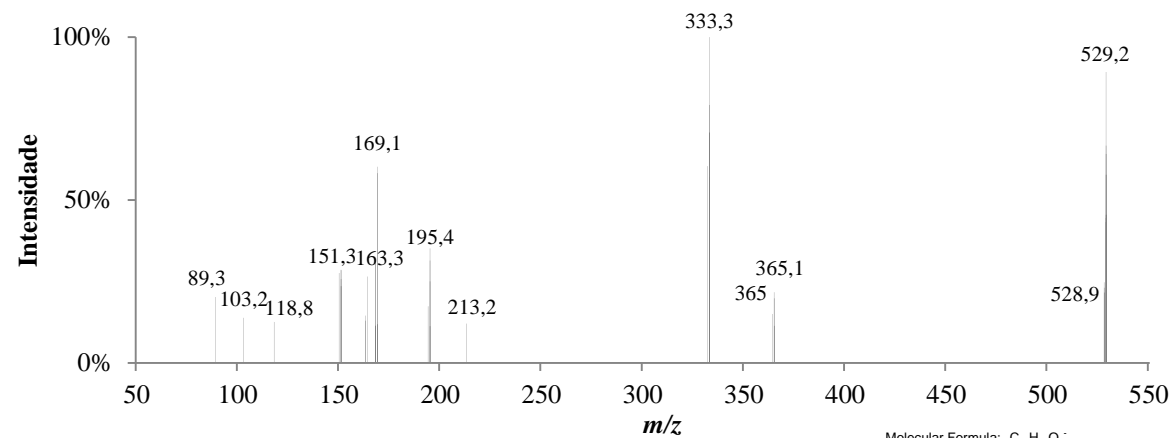
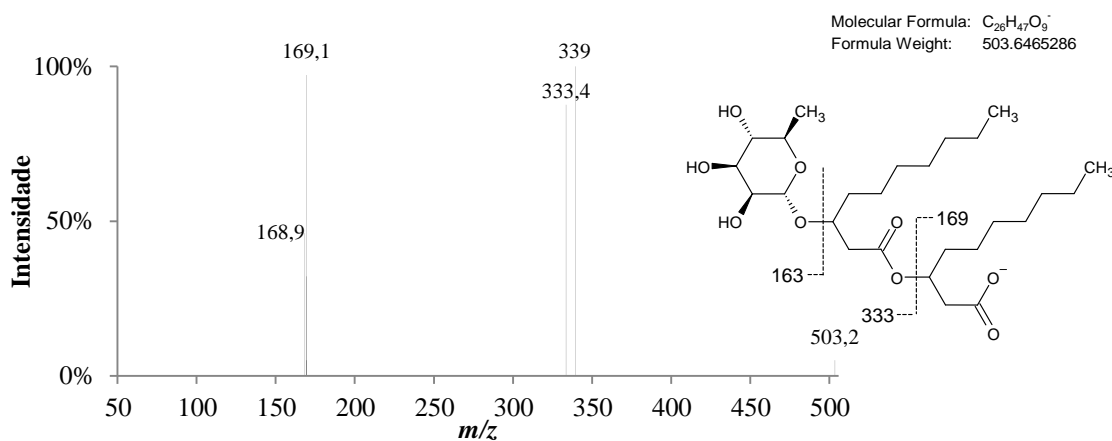
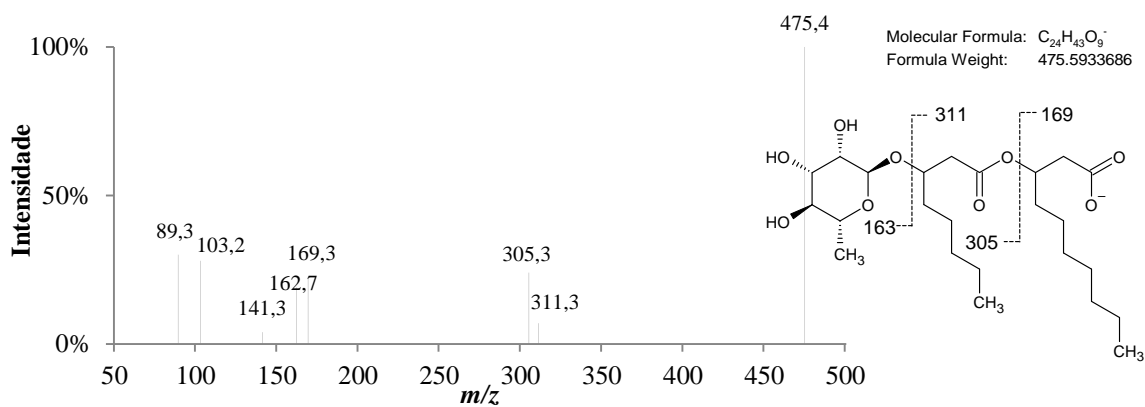
Com o uso da fonte de carbono óleo de semente de goiaba, surge um homólogo com massa molar de 555,6 (RhaC<sub>10</sub>C<sub>14:2</sub>), que nunca apareceu para as demais fontes de carbono utilizadas por *P. aeruginosa* LBI 2A1, concordando com MATA-SANDOVAL *et al.* (1999). Salazar-Bryam (2016) utilizando glicerol como fonte de carbono para *P. aeruginosa* LBI 2A1, observou também que os congêneres foram mantidos em relação às demais fontes de carbono utilizadas.

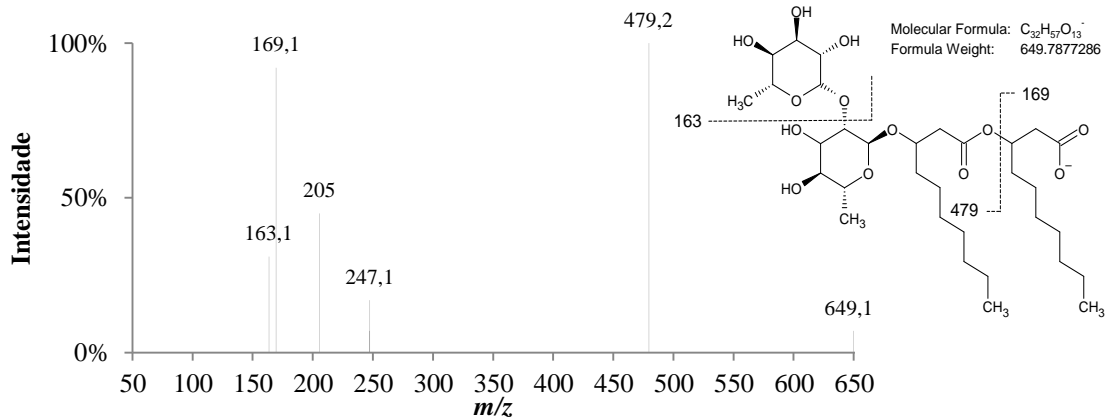
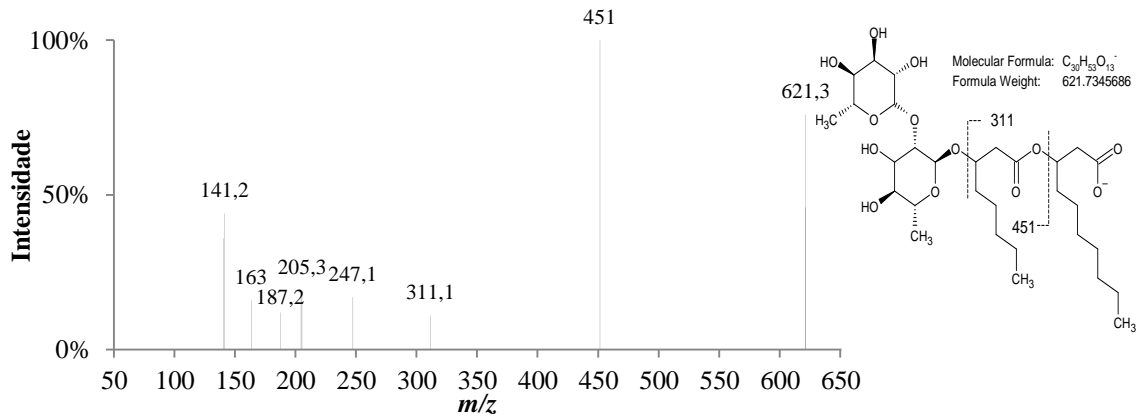
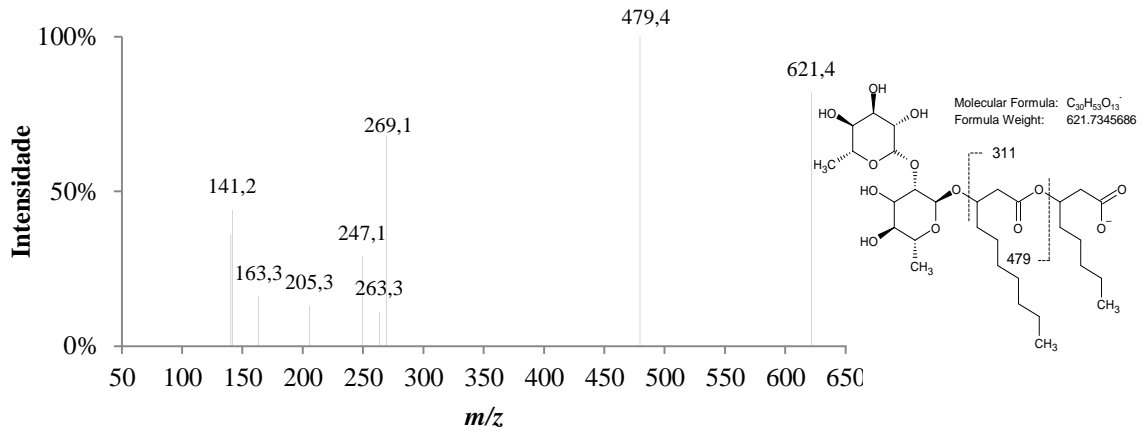
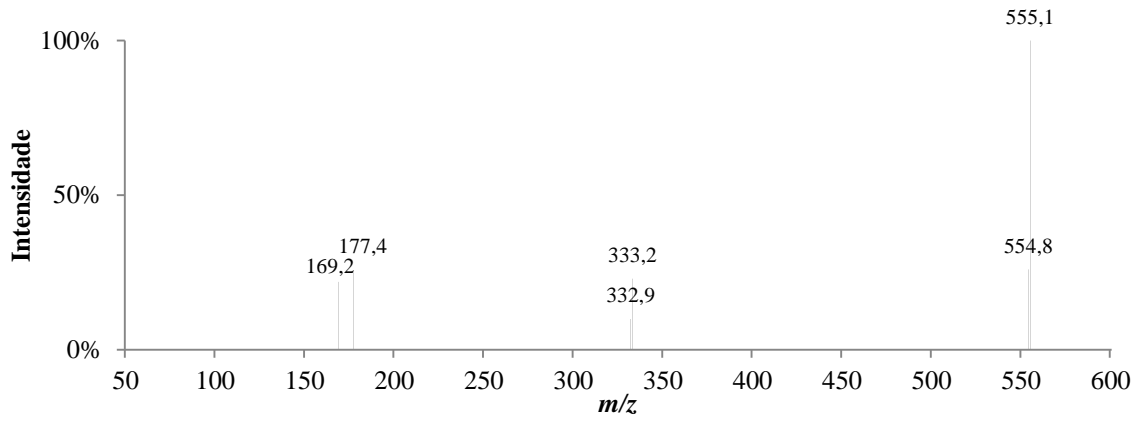
Mais de 58 espécies homólogas já foram descritas na literatura, sendo que essas podem ser enquadradas dentro dos grupos de mono-ramno-mono-lipídios, mono-ramno-di-lipídios, di-ramno-mono-lipídios e di-ramno-di-lipídios. A variação das estruturas dentro desses grupos está geralmente relacionada à quantidade de carbonos (comprimentos variando de C<sub>8</sub> – C<sub>16</sub>) e à presença e quantidade de insaturações na cadeia alifática de β-hidroxiácidos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011).

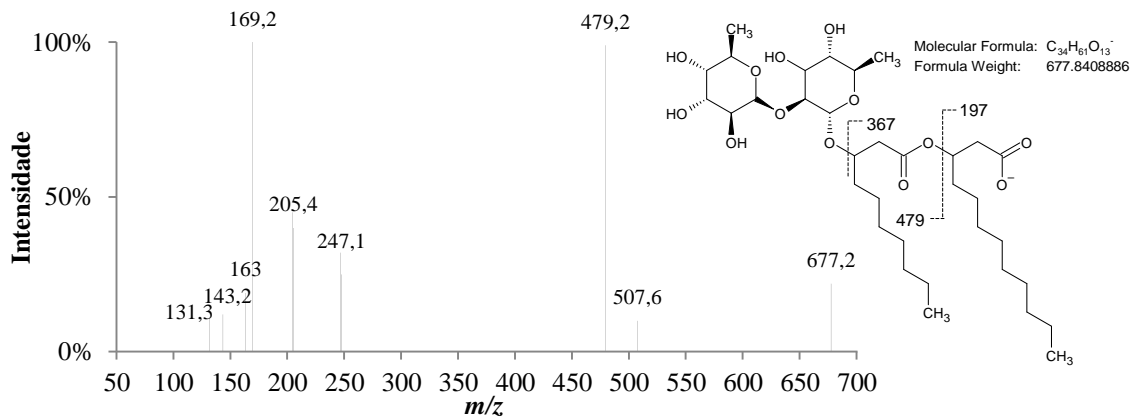
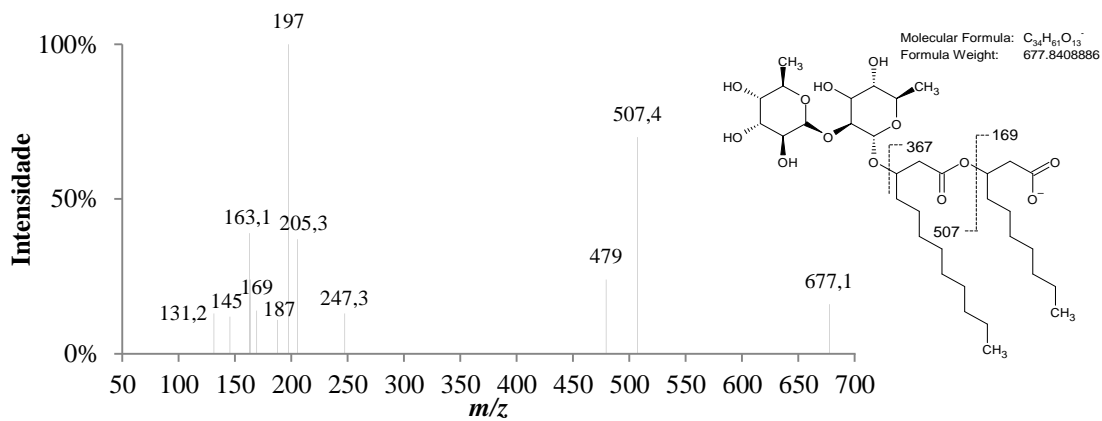
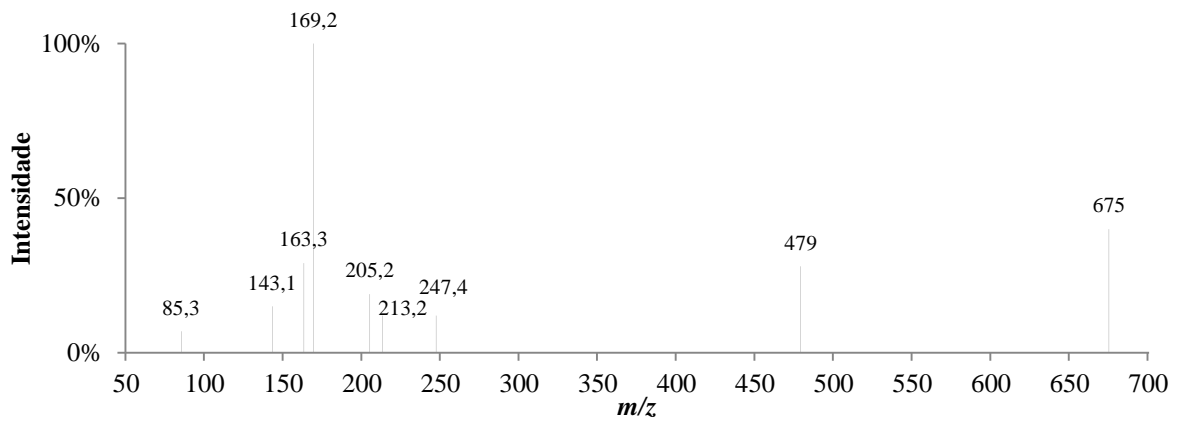
Em casos de espécies isômeras de RLs que contêm duas porções de ácidos graxos com comprimentos diferentes, há uma maior predominância do isômero que contém a cadeia mais curta ligada à porção hidrofílica. Essa ocorrência é pelo menos duas vezes mais abundante e é ainda maior quando uma das porções de ácidos graxos apresenta insaturações, onde a preferência é que a menor cadeia saturada esteja adjacente à ramnose (Déziel *et al.*, 1999, 2000). Essa tendência foi observada nas espécies homólogas de mono-ramnolipídios, nos íons 475,4; 529,2; 531,9 e 555,1. Essas moléculas apresentam cadeias alifáticas de tamanhos diferentes e os espectros de fragmentação indicaram as cadeias menores ligadas à ramnose,

Os fragmentos gerados por ESI-MS/MS podem ser observados nos espectros (Figura 17) e a estrutura que foi fragmentada está indicada através de sua fórmula estrutural. Esse tipo de análise confirma que o íon indicado representa o homólogo em questão a partir das quebras das ligações que ocorrem.

**Figura 17** - Fragmentação dos íons de ramnolipídios por ESI (-) MS/MS provenientes das amostras de RL por óleo de goiaba e d-limoneno.







\* Os íons 529, 555 e 575 não estão representados pelas formas estruturais, pois a fragmentação por ESI-MS não indica a localização da insaturação na cadeia carbônica.

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

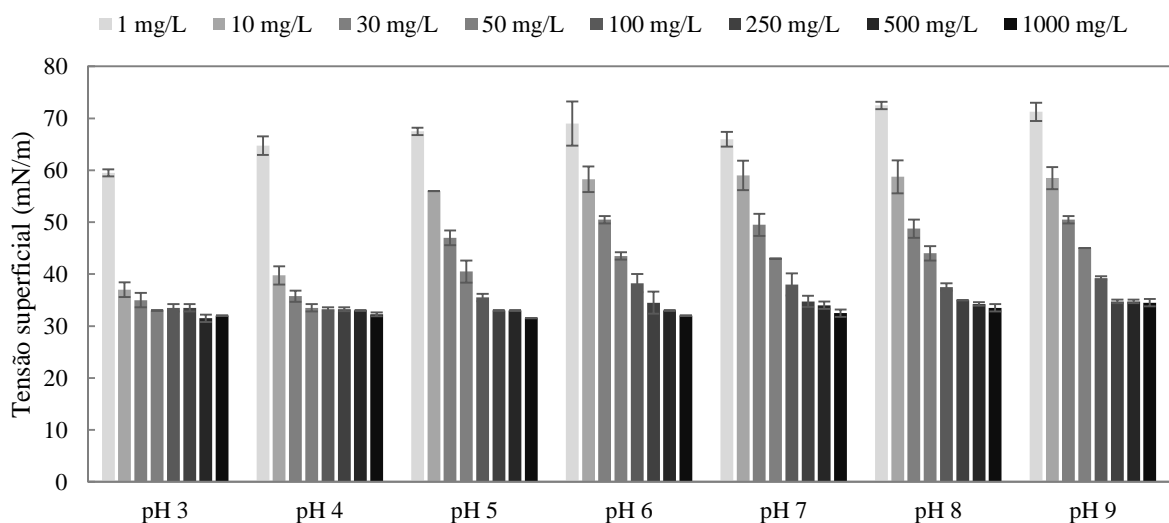
As moléculas dos ramnolipídios seguem um padrão estrutural. No caso dos di-RL, a sua composição é dada por dois ácidos  $\beta$ -hidroxidecanóicos ligados através de uma ligação glicosídica a duas frações ramnose. As duas porções de  $\beta$ -hidroxiácidos são ligadas entre si por meio de uma ligação de éster, enquanto a porção do dissacarídeo apresenta uma ligação  $\alpha$ -1,2-glicosídica, responsável pela união das ramnosas (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011).

Dessa maneira, as quebras das ligações das moléculas irão ocorrer de maneira similar. Uma ruptura comum ocorre na ligação éster da cadeia alifática, que resultou nos fragmentos RhaRhaC<sub>10</sub> ( $m/z = 479$ ) e C<sub>10</sub> ( $m/z = 169$ ) na estrutura do RhaRhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> ( $m/z = 649$ ), mas que também pode ser verificada nas demais figuras. Outras fragmentações que também podem ocorrer são: 1. a quebra da ligação glicosídica que divide a porção de ramnose da fração de lipídica e 2. a fragmentação de uma molécula de ramnose no caso de di-ramnolipídios. O primeiro caso pode ser visualizado na fragmentação do íon 475,4, onde a ruptura na ligação (-O-) resultou na perda do Rha ( $m/z = 163$ ) e gerou o C<sub>8</sub>C<sub>10</sub> ( $m/z = 311$ ). E o segundo caso pode ser verificado na fragmentação do íon 649,1 onde a fragmentação das ramnosas resultou na formação do íon Rha ( $m/z = 163$ ).

#### 4.3.2 Avaliação da atividade de superfície de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba

As tensões superficiais (TS) das soluções em diferentes concentrações de ramnolipídios e em diferentes valores de pH pode ser observada na Figura 18. A partir do gráfico verificou-se que a concentração de 250 mg/L do biossurfactante acarretou a redução da TS da água de 72 mN/m para valores abaixo de 35 mN/m em todos os pHs.

**Figura 18** - Variação da tensão superficial das soluções contendo diferentes concentrações de ramnolipídios e valores de pH.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

De forma generalizada para todos os pHs, pode-se indicar a concentração micelar crítica (CMC) da mistura de ramnolipídios produzido por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando



óleo de semente de goiaba como sendo de ~250 mg/L. Entretanto, observando o decréscimo da TS em relação aos valores de pH, fica explícito que a CMC não é a mesma em todos os tratamentos. As soluções ácidas (pH 3 e 4) indicaram um decréscimo expressivo de ~38% quando houve a mudança de concentração de 1 para 10 mg/L de RL. Após essa alteração significativa, notou-se uma tendência à estabilização da TS, com valores de decréscimo inferiores a 10%.

Já nas soluções neutras à alcalinas (pH 5 – 9), o primeiro decréscimo foi de 11 – 19%. Esses percentuais de decréscimo foram mantidos à medida que houve o aumento da concentração do RL até 250 mg/L. Após esse ponto, a redução foi abaixo de 10%. Isso sugere que para os pHs 3 e 4, a CMC é de ~10 mg/L, mas para valores de pHs 5 – 9, a CMC é ~250 mg/L, 25 vezes maior do que em condições ácidas.

A CMC é um parâmetro que indica a concentração em que começa a haver a formação de micelas em uma solução. De maneira geral, o momento em que as moléculas de surfactante saturam a interface líquido-ar resulta na agregação do restante das moléculas na forma de agregados. Segundo Rosen (2004), a determinação do valor da CMC pode ocorrer através da quebra da condutividade elétrica, *light scattering*, espectroscopia de fluorescência e por tensão superficial. Nesse último caso, a CMC é dada no ponto em que a adição de surfactante na solução não traz mudanças significativas à TS. Essa informação é bastante relevante, pois determina a quantidade necessária do produto para modificar as propriedades físico-químicas de uma solução e atingir o objetivo desejado. Por causa disso, a redução da tensão superficial ou interfacial é uma das propriedades mais comumente medidas de surfactantes em soluções.

A estrutura dos surfactantes é denominada anfipática, com uma porção considerada hidrofóbica e outra hidrofílica. A ligação fraca na estrutura dos ramnolipídios estimula a formação de micelas, sendo assim, essas moléculas se dispõem na superfície quando dissolvidos em solução aquosa, fenômeno que provém da diferença de polaridade entre a água e a cadeia de hidrocarbonetos presente, a qual ocasiona a quebra das ligações de hidrogênio. Em consequência, a água tende a expulsar as moléculas de surfactante para o exterior, diminuindo o contato com a porção menos polar. O deslocamento das moléculas de surfactante ocorre de modo que a porção hidrofóbica é direcionada ao ar, enquanto a porção hidrofílica é direcionada ao interior da solução. Essa disposição é chamada de monocamada, e é esse fenômeno responsável pela alteração da TS de uma solução (ROSEN, 2004). Entretanto, como visto no gráfico acima, a variação do pH da solução pode influenciar a tendência a esse fenômeno.

O ramnolipídio é considerado um surfactante aniônico devido à presença do íon carboxilato na ponta da cadeia de ácidos graxos e seu pKa é em torno de 5,5 (LEBRÓN-PALER *et al.*, 2006). Quando esse composto é dissolvido em uma solução ácida (pH 3 e 4), contendo prótons (H<sup>+</sup>) livres, a tendência é que ocorra a protonação desse íon, resultando em um ácido carboxílico. Essa alteração faz com que o RL comporte-se como um surfactante não iônico. Já em soluções com pH acima de 6,5, o RL mantém seu comportamento aniônico. E, nesse caso, o íon carboxilato tende a fazer ligações de hidrogênios com a água, apresentando maior afinidade com esse solvente, o que diminui o caráter anfipático da molécula. Dessa forma, comparando as situações, a hidrofobicidade do RL em solução neutra e alcalina pode ser considerada menor, o que reduz a “repulsão” dessas moléculas para superfície.

Em comparação com outros estudos, Li *et al.* (2019) relataram ramnolipídios produzidos a partir de glicerol e óleo de soja que apresentaram CMC de 50 e 65 mg/L, respectivamente. Já para Lovaglio *et al.* (2014) a CMC para ramnolipídios produzidos a partir de óleo de girassol é em torno de 100 mg/L. Essa diferença provavelmente está relacionada com a composição de homólogos presentes na mistura (IBRAHIM *et al.*, 2021), fator que é facilmente alterado pelas condições de cultivo.

A estrutura dos ramnolipídios é formada por uma ligação altamente flexível entre a ramnose e a cadeia alifática e a configuração dessas moléculas na formação da monocamada irá afetar a tensão superficial dos sistemas. De maneira geral, mono-ramnolipídios apresentam maior atividade de superfície, reduzindo a tensão superficial de maneira mais eficiente. Esse comportamento está relacionado com a sua maior hidrofobicidade que auxilia sua adsorção à superfície, além de seu menor peso molecular que resulta em um empacotamento mais denso na interface quando em comparação à di-ramnolipídios. Dessa forma, é importante ressaltar que a presença de uma ou duas ramnoses, assim como o tamanho das cadeias carbônicas e a proporção de cada espécie homóloga na mistura irão influenciar a atividade superficial e interfacial (GUDIÑA *et al.*, 2015; İKIZLER *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2019).

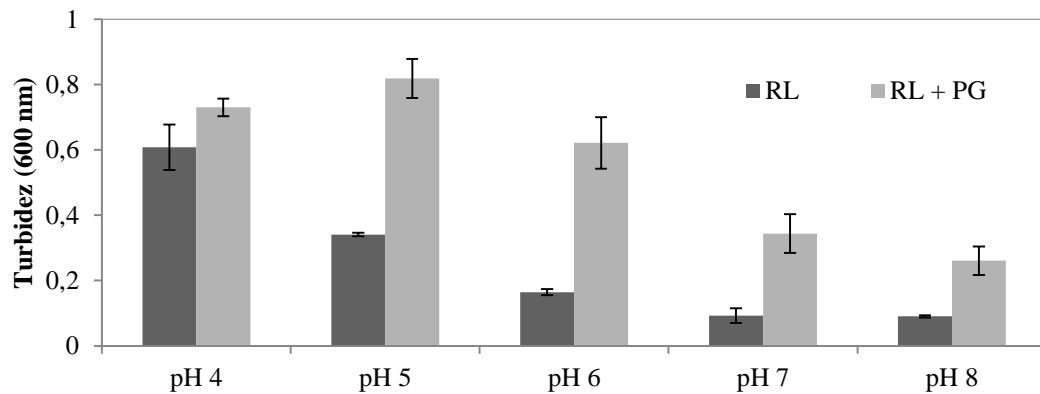
No caso do estudo realizado, deve-se observar que o óleo de semente de goiaba propicia uma maior produção de mono- em relação a di- RL. Visto que os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1 com OG foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores abaixo de 35 mN/m com CMC oportuna, testaram-se outras propriedades desse biosurfactante. Agora, foi considerada a possível aplicação do ramnolipídio na indústria de cosméticos. Vários estudos *in vitro* demonstraram que ramnolipídios, soforolipídios, MELs e surfactina são compatíveis com a pele humana (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; VECINO *et al.*, 2017; SEN *et al.*, 2020).

Além disso, sua emulsificação, formação de espuma, umectação e funções solubilizantes, que são dependentes de sua estrutura química, os tornam desejáveis para uso como ingredientes em cremes, loções, pós, xampus e outros produtos cosméticos essenciais aplicado na pele (GHARAEI-FATHABAD, 2011). Em função disso, foram avaliadas a formação de agregados e a atividade de emulsificação do RL em valores de pH factíveis nesse segmento industrial, assim como na presença de um aditivo comumente utilizado, o propilenoglicol a 5%.

#### 4.3.3 Avaliação da formação de agregados em soluções de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba

A formação indireta de agregados pode ser visualizada na Figura 19 a seguir. As soluções mais ácidas demonstraram maior influência sobre as medidas de turbidez na ausência do propilenoglicol. E na presença desse álcool, a formação de agregados foi maior em todos os pHs ocorrendo preferencialmente em pH 5 e 6.

**Figura 19** - Efeito do pH e da adição de propilenoglicol (PG) (50,0 g/L) na turbidez das soluções de ramnolipídios (RL) (1,0 g/L).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

As moléculas de ramnolipídios apresentam maior repulsão eletrostática em meio ácido, condição que favorece a formação dos agregados (ZHONG *et al.*, 2015). Segundo Ishigami *et al.* (1993), em soluções com pH próximos de 5 e 6, as moléculas de ramnolipídios encontram-se na forma de monômeros protonados e desprotonados (zwitterions). Esse fenômeno ocorre em função do valor de pKa do RL e resulta em uma menor repulsão eletrostática favorecendo a formação dos agregados de ramnolipídios. Já o aumento dos ânions hidróxidos resultam na dissociação do grupo carboxila, o que traz uma maior densidade de carga superficial agregada e reduz o potencial zeta (ZHONG *et al.*, 2015).

Compostos anfifílicos, principalmente aqueles que apresentam carga, apresentam a solubilidade dependente da ionização, cujo grau varia com o pH do meio. E a partir de um valor, a solubilização aumenta de forma acentuada. Esse pH é designado como pH micelar crítico (JONES; CHAPMAN, 1995).

A auto agregação dos surfactantes para formar estruturas organizadas é um resultado do “efeito hidrofóbico”. O contato das porções hidrofóbicas com a água é energeticamente desfavorável, o que ocasiona a tendência dessas se aproximarem e agregarem. Inicialmente, a dispersão dos monômeros de surfactante em solução trazem uma diminuição da entropia do sistema através da distorção do padrão normal das ligações de hidrogênio. Já a formação dos agregados ameniza essa ocorrência. A transição de monômero para agregado pode ser vista a partir a mudança quase instantânea de propriedades físico-químicas, como tensão superficial, solubilização de compostos hidrofóbicos, condutividade, pressão osmótica e dispersão de luz (JONES; CHAPMAN, 1995; MOUTINHO *et al.*, 2004).

O termo micela será então usado para definir uma agregação coloidal que é formada de forma espontânea em solução aquosa e a partir de certa concentração. Mas, a organização das moléculas pode resultar em diversos tipos de agregados, como vesícula unilamelar, vesícula multilamelar, bicamada planar, micela esférica, micela em disco, microemulsão óleo/água ou água/óleo e micela reversa (MOUTINHO *et al.*, 2004). Fatores que podem influenciar a mudança dos agrupamentos são repulsão eletrostática entre os grupos polares, grau de hidratação e concentração da substância (HELENIUS; SIMONS, 1975).

Dessa forma, não apenas a disposição à agregação é influenciada pelo pH, mas também o modo de organização (ISHIGAMI *et al.*, 1993; ZHONG *et al.*, 2015). No caso das soluções de RL, a tendência é que as moléculas se organizem em lamelas > vesículas grandes > vesículas pequenas > micelas, conforme ocorre a diminuição dos íons hidrogênio. Por exemplo, já foi retratado que a partir de pH 6,8 há maior concentração de micelas do que outras formas de agrupamento (CHAMPION *et al.*, 1995). A mudança na forma de agregação provavelmente está associada com a solubilização do surfactante. Como dito anteriormente, em soluções alcalinas o RL tende a adquirir um comportamento aniônico o que facilita a sua solubilização em função dos grupos carboxílicos estarem carregados negativamente e dissociados. Sendo assim, deduz-se que a diminuição dos íons hidrogênio modifica a forma de estruturação das lamelas aumentando a solubilização do RL no solvente. Em seguida, as moléculas tendem a se organizar através das vesículas e assim conseqüentemente, com estruturas cada vez menores conforme há maior densidade de carga do tensoativo.

No caso das soluções contendo propilenoglicol (PG), a turbidez foi maior em todos os pHs em comparação com as soluções sem o aditivo, mas principalmente em pH 5 - 8. Duas hipóteses podem explicar esse resultado. A primeira é que houve uma maior formação no número de agregados em todas as condições. A segunda, é que o tipo de agregado formado foi diferente do que nas soluções sem aditivos, o que resultou em uma solução mais turva. E infere-se que diante dessas condições – na presença de PG e  $\text{pH} \geq 5$  – as moléculas estão desprotonadas e, portanto, mais suscetíveis à reagir com aditivos.

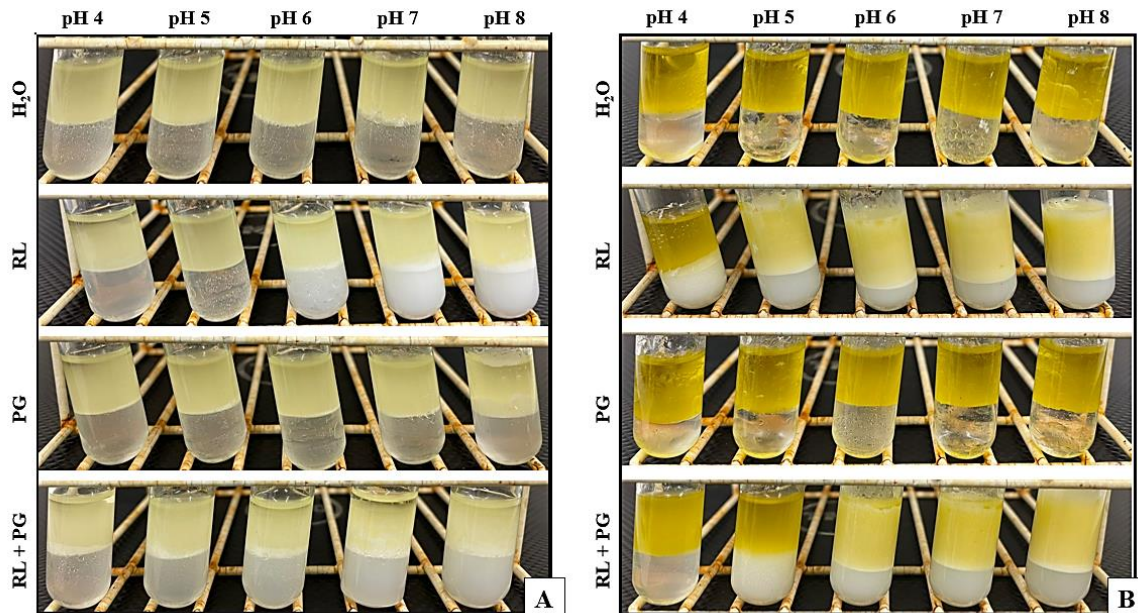
Lebrón-Paler *et al.* (2006) demonstraram que soluções de RL mais turvas estão relacionadas com presença de agregados maiores. Para Lovaglio *et al.* (2014), a adição de quantidades crescentes de etanol ocasionou aumento nas medidas de turbidez em soluções contendo ramnolipídios, a partir do favorecimento na agregação dos monômeros de RL através do número e tamanho das estruturas. E, segundo Pornsunthorntaweewee *et al.* (2009), o encapsulamento de um corante hidrofóbico fomentou a possibilidade de que o etanol pode agir como um co-surfactante e interagir com as moléculas de RL através de ligação de hidrogênio. Nesse caso, o fenômeno ocasiona a formação de estruturas organizadas compostas por ramnolipídio-etanol.

A confirmação dessas hipóteses pode ocorrer por estudos de imagem, onde é possível verificar o tamanho das estruturas formadas e a quantidade de cada tipo. Mas há probabilidade de que as duas possibilidades estejam ocorrendo de forma simultânea, principalmente nos valores de pH 5 – 8, onde há menor presença de íons hidrogênio livre. Com isso, acredita-se que a presença do propilenoglicol favoreceu a formação dos agregados.

#### **4.3.4 Avaliação da atividade de emulsificação em soluções de ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba**

A atividade de emulsificação dos ramnolipídios também foram estudadas nos mesmos valores de pH e na presença e ausência do propilenoglicol. Dois óleos utilizados na indústria de cosméticos foram estudados, o óleo de andiroba e de açaí. Os resultados de atividade de emulsificação após 24 horas estão expressos na Figura 20.

**Figura 20** - Avaliação da atividade de emulsificação após 24 horas. A separação em linhas indica as fases hidrofílicas: água (controle), ramnolipídios, propilenoglicol e ramnolipídios + propilenoglicol, respectivamente. As colunas indicam os valores de pH ajustado. Em relação à fase hidrofóbica: (A) tubos contendo óleo de andiroba e (B) tubos contendo óleo de açaí.



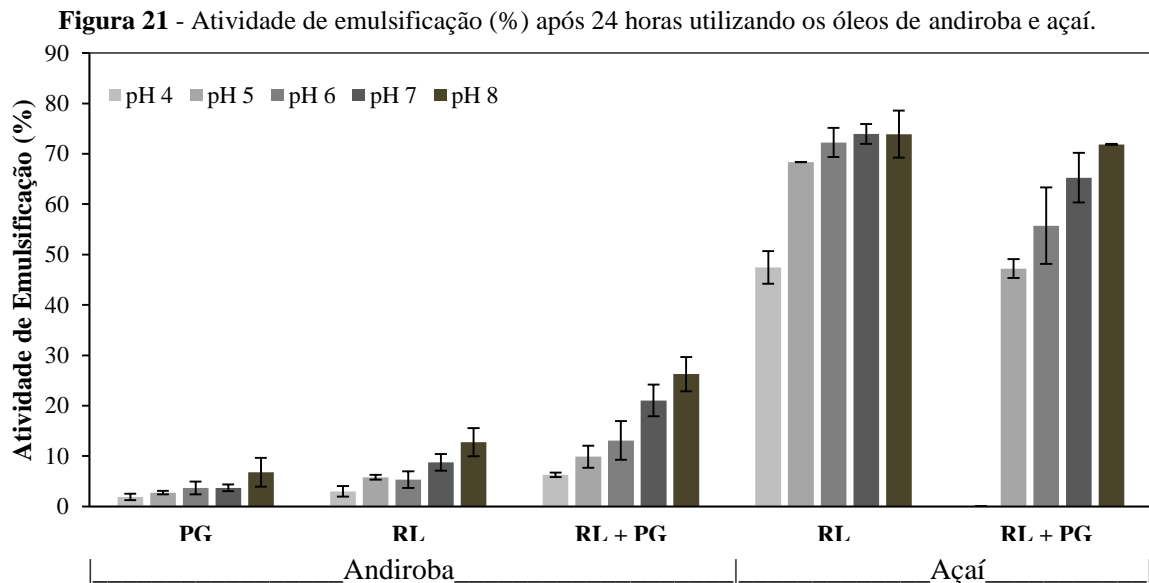
**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Visualmente, notou-se que as variáveis pH, tipo de óleo e tratamento utilizado influenciaram nos resultados de emulsificação. Os tubos “controle” contendo apenas água não apresentaram formação de emulsão, assim como aqueles contendo propilenoglicol com óleo de açaí. Em função disso, esses tratamentos foram excluídos da avaliação de % de emulsificação após 24 horas (% E24) representada na Figura 21. É necessário ressaltar que houve dificuldade na medição das emulsões em função de vários tubos demonstrarem um gradiente de fases, cujas delimitações mostravam-se inconclusivas. Além disso, em diversos cenários foi visto a presença de emulsões simultâneas, do tipo óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). Esse fenômeno pode ter ocorrido em função do ramnolipídio ser formado por uma mistura de homólogos, o que faz com que essas espécies apresentem diferentes equilíbrios hidrofílico-lipofílico (EHL).

Esses fatores dificultaram a obtenção de respostas mais precisas e, os critérios utilizados para definição da emulsão foram: no tubos contendo óleo de andiroba, considerou-se emulsão a fase esbranquiçada entre as porções hidrofílica e hidrofóbica. Já nos tubos contendo óleo de açaí, como a emulsão A/O foi bem mais notável - presente na porção superior, toda fase viscosa acima foi considerada. Nesses casos, foi nítida a emulsificação do

óleo, mas houve exceção nas soluções de RL pH 4 e RL+PG pH 5, onde foi considerado que a emulsão estava localizada na fase inferior, provavelmente do tipo O/A.

Segundo Bancroft (1913), uma forma generalizada de descobrir a fase contínua da emulsão será aquela que o surfactante é preferencialmente solúvel. Dessa maneira, visto que a solubilidade do ramnolipídio em água aumenta conforme a solução torna-se mais alcalina, em pH 4 – 5 sua hidrofobicidade é maior. Assim, essa suposição pode explicar a formação de emulsão O/A nos testes com óleo de açaí na presença de RL em pH 4 e RL+PG em pH 5.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Os ramnolipídios produzidos a partir de óleo de semente de goiaba apresentaram atividade de emulsificação notável com óleo de açaí, atingindo até 74 % em pH 7 e 8. Já o emprego desse surfactante em óleo de andiroba não demonstrou uma atividade considerável. O comportamento foi similar nas duas fontes hidrofóbicas, onde o aumento do pH beneficiou a formação da emulsão, mas o maior valor atingido foi de 12,8.

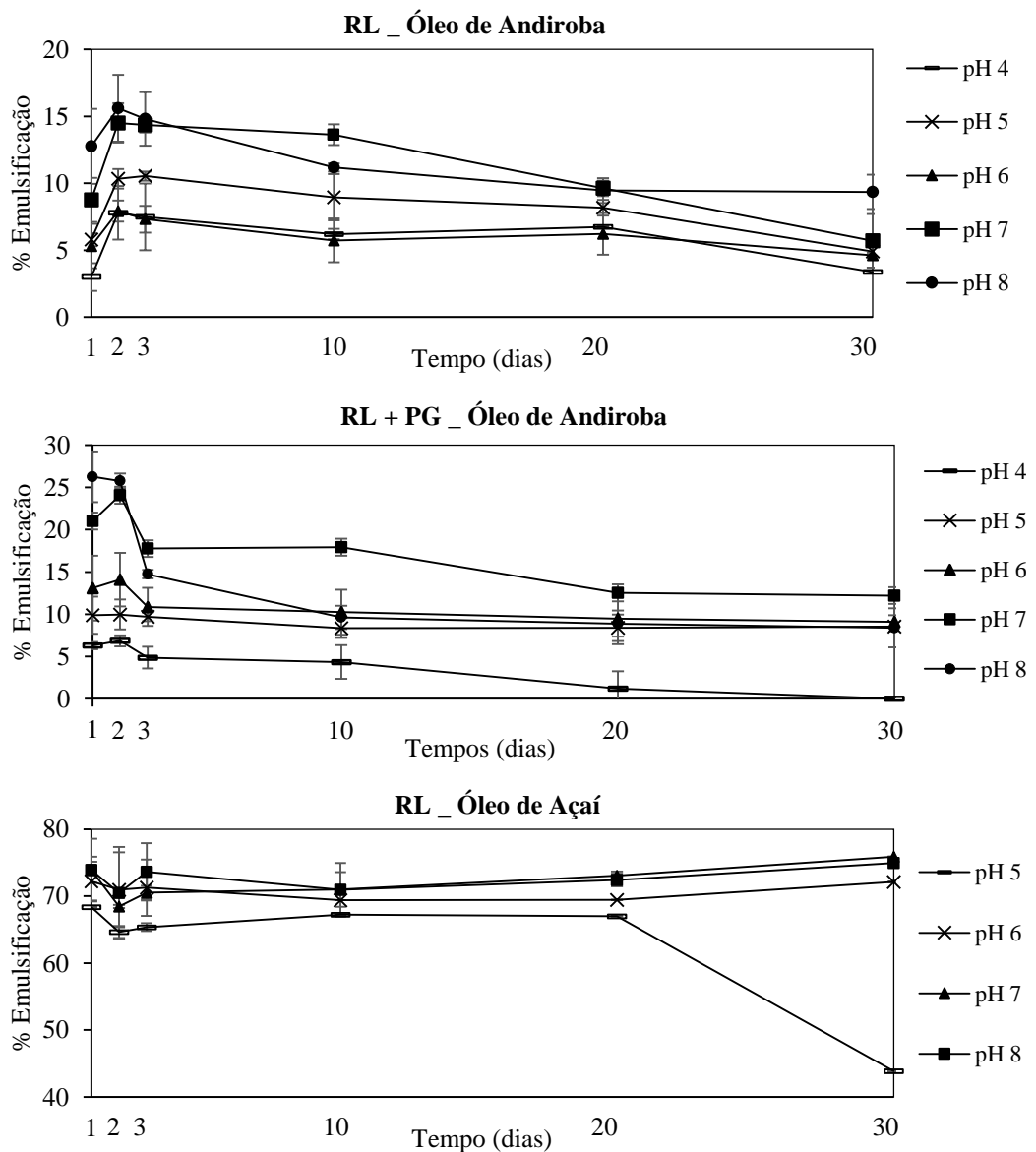
A adição do álcool se mostrou benéfica em óleo de andiroba, onde mesmo sozinho, este apresentou atividade de superfície. E junto ao ramnolipídio, o aditivo demonstrou melhores resultados atingindo 26,3 % em pH 8. Mas o mesmo não foi notado em óleo de açaí, onde o propilenoglicol sozinho não propiciou nenhuma emulsão e, em conjunto com RL, reduziu os valores de %E24.

Como dito anteriormente, a variação de pH está relacionada com a forma de agregação das moléculas e pode explicar uma maior atividade de emulsificação. Em soluções alcalinas

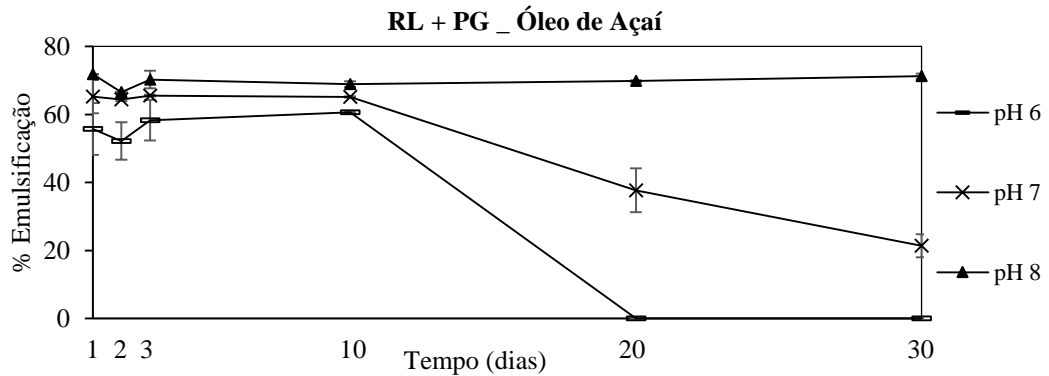
há maior tendência dos ramnolipídios formarem micelas. Provavelmente, a presença de estruturas agregadas menores colaborou para uma maior homogeneização da água em óleo.

Além da % de emulsificação, também é fundamental avaliar a constância dessas fases. Dito isso, os tubos de RL e RL+PG foram mantidos em repouso durante 30 dias para avaliação da estabilidade (Figura 22). Nessa análise, só foram consideradas emulsões aquelas presentes na parte superior à fase aquosa, provavelmente do tipo A/O.

**Figura 22** - Avaliação da estabilidade das emulsões nos tratamentos: soluções de RL e RL + PG utilizando os óleos de andiroba e açai. Foram realizadas medições após 1, 2, 3, 10, 20 e 30 dias.







**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

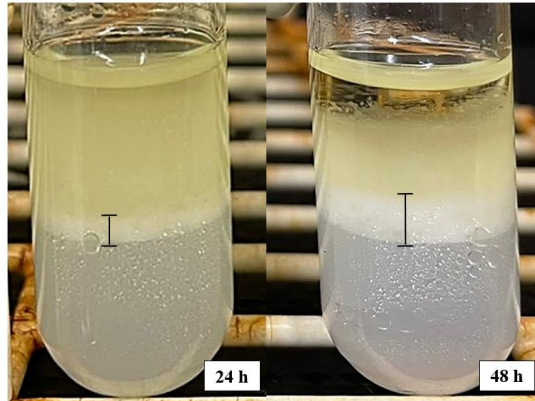
Comparando os tratamentos empregados, observa-se que a adição de propilenoglicol nas soluções de ramnolipídios não favoreceu a estabilidade das emulsões. De maneira geral, as maiores emulsões formadas (que ocorreram em pH mais elevado) também demonstraram uma melhor estabilidade no decorrer do tempo. Esses fenômenos estão de acordo com os resultados e discussão referente aos testes de turbidez, onde a adição de PG acarretou na formação de agregados maiores e estes, provavelmente se mostraram menos estáveis.

Os tubos com óleo de andiroba demonstraram decréscimos pouco significativos, que ocorreram principalmente do segundo ao décimo dia. Ambos os tratamentos (RL e RL+PG) apresentaram mais instabilidade quando acidificados, em pH 4. Por outro lado, os tubos com o óleo de açaí apresentaram resultados mais definidos, onde os decréscimos foram acentuados quando presentes. Essas alterações foram observadas nas soluções de RL em pH 5 e em RL+PG em pH 6 e 7. As emulsões formadas em RL (pH 6, 7 e 8) foram consideradas estáveis, assim como a emulsão em RL+PG (pH 8) o que indica a possibilidade desse biossurfactante - oriundo de óleo de semente de goiaba – ser aplicado em produtos cosméticos contendo óleo de açaí.

Por fim, é preciso destacar que houve oscilação nas medições principalmente nos primeiros dias. Para formação das emulsões é necessário que haja o fornecimento de algum tipo de energia mecânica para produção de gotas suficientemente pequenas. Em função do fenômeno não ocorrer de maneira espontânea, essas fases não são termodinamicamente estáveis, o que demonstra a necessidade de um surfactante adsorvido à interface para criação de uma estabilidade cinética. Quando essa manutenção é pouco eficiente, há a desestabilização da emulsão, que pode ocorrer em função de diversos processos. São exemplos os fenômenos de cremação, agregação, coalescência e inversão de fases. (CLINT, 1992). Esse fenômeno pode explicar a sedimentação da emulsão em alguns tubos. Como já descrito, em diversos tubos houve um gradiente de fases que dificultou a delimitação da

emulsão. Após determinado tempo, alguns tratamentos demonstraram sedimentação da fase superior, colaborando com o aumento da fase intermediária (Figura 23).

**Figura 23** - Delineamento o tamanho da emulsão da solução RL+PG em pH 6 e óleo de andiroba após 24 e 48 horas.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Mas, esses resultados poderiam ser melhor explorados através do uso do equipamento potencial zeta, pois o mesmo corroboraria para melhor delineamento das emulsões obtidas nos diferentes óleos. O estudo realizado por Yang *et al.* (2022) mostra o comportamento da emulsão obtida através do uso da proteína da clara do ovo (PCO) com RL através de analisador. O resultado obtido indicou que as propriedades físico-químicas como tamanho da partícula, potencial zeta e microestruturas da mistura PCO + RL sofrem variações. Dessa maneira, a emulsão obtida apresentou diferentes propriedades, as quais foram analisadas por microestrutura, reologia, ressonância magnética nuclear, etc.

**5 CAPÍTULO III**

**PURIFICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS: SEPARAÇÃO DAS ESPÉCIES  
HOMÓLOGAS**

## 5.1 INTRODUÇÃO

Com as atuais mudanças climáticas e o aumento da população mundial, é urgente a necessidade de descobrir produtos naturais criativos, eficientes e econômicos para o benefício da humanidade. Os biossurfactantes são compostos produzidos por vários microrganismos e que possuem propriedades distintas em comparação a tensoativos sintéticos, incluindo condições de produção suaves, multifuncionalidade, maior biodegradabilidade, e menor toxicidade para células vivas que promovem a síntese de compostos ativos (GAYATHIRI *et al.*, 2022). Com a crescente demanda por biossurfactantes, pesquisadores estão procurando resíduos de baixo custo para usá-los como substratos, o que reduzirá os custos de fabricação, fornecendo serviços de gerenciamento de resíduos como um benefício adicional. O uso de substratos de baixo custo reduzirá significativamente o custo de produção de biossurfactantes (MOHANTY *et al.*, 2021).

Os ramnolipídios são uma classe de biossurfactante bastante estudada, pertencente ao grupo dos glicolipídios. Esse composto é sintetizado principalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e apresenta atividade de superfície elevada e maior rendimento de produção em relação a outros tensoativos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2011). Sua estrutura é formada por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a ácidos 3-hidroxicanoíco

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* são compostos por uma mistura de homólogos, onde os mono-ramnolipídios (principal congênere RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e os di-ramnolipídios (principal congênere Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) são predominantes (LANG e WAGNER, 1987). A razão entre os homólogos acarreta em diferentes propriedades para o composto, por exemplo, a predominância do di-ramnolipídio implica num composto mais hidrofílico. A proporção da mistura dessas estruturas pode variar de acordo com o microrganismo utilizado, além das fontes de carbono presentes (COSTA, 2010; GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIETCHER, 1984), acarretando em ramnolipídios que diferem quanto as suas funções e aplicabilidades. Dessa forma, para aprofundar os estudos nesse âmbito, é relevante considerar a contribuição individual de cada espécie homóloga (COSTA, 2010). Mas, para que haja tais análises, há a necessidade do desenvolvimento de metodologias de separação de compostos.

Os produtos biotecnológicos comercializados e aplicados industrialmente dependem de metodologias de purificação apropriadas. Esse tipo de procedimento é responsável por grande parte dos custos finais dos produtos e pode-se dizer que o mesmo se aplica aos biossurfactantes (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). De maneira geral, os bioprocessos são

divididos em etapas de *upstream* e *downstream process*, onde ocorrem a preparação do substrato e biotransformação e recuperação do produto, respectivamente.

O processo de *downstream* costuma ser o mais custoso e envolve a recuperação, caracterização, purificação e armazenamento do bioproduto. Dependendo da complexidade do composto, diversas metodologias são aplicadas para alcançar o nível de pureza desejado. Mas, geralmente envolvem lise e/ou separação das células, isolamento do produto em sua forma bruta, concentração e beneficiamento (JUNGBAUER, 2013). No caso da purificação dos ramnolipídios, faz-se a retirada das células através de centrifugação, em seguida a extração do metabólito a partir da mudança do pH do meio isento de células, para precipitação do tensoativo, seguida da adição de um solvente orgânico, agitação e centrifugação. A fase do sobrenadante é então retirada e evaporada até completa evaporação do solvente, resultando em um produto viscoso de coloração mel (SHAH *et al.*, 2016).

De maneira geral, esse composto é utilizado para testes de atividade de emulsificação, tensão superficial e outras caracterizações. Entretanto, análises em espectrometria de massas indicam a presença de diversas estruturas, o que caracteriza a diversidade de homólogos presente. Para que haja a separação dessas espécies, pode-se empregar cromatografia em coluna, como proposto por Zhou *et al.* (2019), onde promoveram a separação de mono- e di-ramnolipídios através de uma coluna composta por sílica e utilizando clorofórmio e metanol para eluição dos compostos. Mas, como ponto negativo, observa-se a necessidade do uso de solventes de elevada toxicidade.

Outra possibilidade de forma de purificação é através de complexos de inclusão que ocorrem a partir de um aprisionamento dentro da cavidade de uma molécula. Esse tipo de fenômeno ocorre com ciclodextrinas, um oligossacarídeo que apresenta uma estrutura tronco-cônica, permitindo a formação desses complexos. Esse encapsulamento ocorre devido às características hidrofóbicas na parte interna e hidrofílicas na porção externa, fazendo com que essa propriedade da ciclodextrina seja usada como um método de separação por cromatografia (DEL VALLE, 2004), tendo potencial de separar as espécies homólogas de ramnolipídio.

Observa-se que a etapa de purificação de ramnolipídios ainda demonstra deficiência de estudos, mas existem possibilidades de aprimoramento e aplicações de técnicas já existentes para tal finalidade. Dessa maneira, esse capítulo visou estudar e desenvolver duas metodologias para a separação dos principais homólogos dos ramnolipídios. Os processos avaliados foram: 1. cromatografia em coluna utilizando outro sistema de solventes e 2. formação de complexos de inclusão formados por ciclodextrinas. Esse tipo de estudo se mostra fundamental para análises posteriores, como os estudos individuais desses homólogos

que busquem aprimorar aplicações nobres desse bioproduto, aumentando o seu alto valor agregado.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Extração dos ramnolipídios**

Os ramnolipídios produzidos foram extraídos de acordo com o item 3.2.2.4 e em seguida, evaporados a 40°C em evaporador rotativo Fisatom mod. 802 e bomba a vácuo. Esse biosurfactante foi utilizado para separação e determinação dos homólogos e para os testes de caracterização (capítulo II). O tensoativo proveniente do óleo de semente de goiaba (com as condições estabelecidas a partir da metodologia de superfície de resposta oriunda do capítulo I) foi utilizado.

### **5.2.2 Separação das Espécies Homólogas dos Ramnolipídios**

#### **5.2.2.1 Cromatografia em Coluna**

A cromatografia em coluna foi um dos métodos utilizados para separação do mono- e di- ramnolipídio. A coluna foi preenchida/empacotada com Sílica gel 60 (0,040 – 0,063 mm) e n-hexano e posteriormente, adicionou-se cuidadosamente a amostra de ramnolipídio levemente diluída em acetato de etila, de forma que a mesma se distribuisse uniformemente. Foram utilizadas 7 soluções (Tabela 16) em sequência em um fluxo de aproximadamente 1 mL/min. As frações eluídas foram colhidas utilizando coletor de frações GE Akta mod. Frac-920 e tubos de ensaio à medida que as soluções foram acrescidas à coluna.

As amostras coletadas foram concentradas em evaporador rotativo e em seguida em estufa a vácuo (40°C). Os produtos resultantes contendo mono- e di-ramnolipídios apresentaram-se como um líquido viscoso com coloração de mel e foram mantidos a temperatura ambiente. O resultado da separação foi visualizado por cromatografia em camada delgada (TLC) utilizando clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2) (v/v/v) como fase móvel. Essas análises forneceram o embasamento para mudança da solução utilizada como fase móvel.

A separação por cromatografia em coluna foi realizada duas vezes com o intuito de melhorar os resultados obtidos.

**Tabela 16** - Composição das soluções utilizadas como fase na cromatografia em coluna para purificação de ramnolipídios, O tempo de coleta foi ~10 min para coluna (A) e ~15 min para coluna (B), contendo ajustes quando o fluxo demonstrava alterações.

Solução	Composição (v/v/v)			Volume utilizado (mL)	
	Hexano	Acetato de Etila	Ac. Acético	Coluna (A)	Coluna (B)
1	100	0	0	100	350
2	90	10	0	150	1100
3	80	20	0	300	2800
4	70	30	0	200	400
5	60	40	0	100	800
6	60	40	1	2400	5900
7	40	60	1	200	0
8	10	90	1	600	0

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

### 5.2.2.1.1 Determinação da composição dos homólogos por LC-MS

As amostras que demonstraram diferenças notáveis na placa de TLC foram escolhidas para serem analisadas por espectrometria de massas. Como citado anteriormente, as amostras de ramnolipídios foram ressuspensas em acetonitrila, diluídas em água ultrapura/acetonitrila (v/v) (7:3) em uma concentração final de 500 ppm e filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . As análises foram realizadas através de LC-MS acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xevo TQD Triple Quadrupole e ionização por eletrospray em modo negativo (ESI-MS). O aparelho foi equipado com a coluna de fase reversa Acquity UPLC Beh-C18 (1,7 $\mu\text{m}$ , 2,1 x 500 mm; Waters Corp.).

Nas análises em LC utilizaram-se fases móveis compostas por ácido fórmico-água 0,1% (A) e ácido fórmico-acetonitrila 0,1% (B). O gradiente foi de 0/20, 20/95, 35/95, 36/20 (min/%B), fluxo de 0,4 mL/min, volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , tempo de corrida 32 min, (CHENG *et al.*, 2017). A corrida foi realizada no modo *Single Ion Recording* (SIR) para verificação dos íons de  $m/z$  indicados na Tabela 17. A escolha desses íons foi baseada na caracterização do RL, cuja análise foi realizada no capítulo II.

**Tabela 17** - Seleção dos íons ( $m/z$ ) para realização do monitoramento de massas dentro do tempo de retenção esperado.

[M-H] <sup>+</sup> $m/z$	Tempo de retenção [min]
475	10,12
503	12,09
529	13,27
531	14,29
555	14,13
621	9,22; 9,33
649	11,12
675	12,28
677	13,13

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

### 5.2.2.2 Complexos de Inclusão formados pela $\beta$ -Ciclodextrina

A formação do complexo de inclusão da ciclodextrina (CD) com ramnolipídios foi realizada segundo Rajewski e Stella (1996). O método consiste na solubilização da CD em água e posterior adição de um composto ativo (RL) em excesso. A solução foi mantida a 30° C e 180 rpm em mesa agitadora tipo “shaker” durante 12 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas e analisadas por TLC, cuja metodologia para realização e visualização foi a mesma citada anteriormente.

As soluções preparadas estão indicadas na tabela 18. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Uma segunda avaliação de ensaios ocorreu com as mesmas condições, mas as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e então analisadas por TLC.

**Tabela 18** - Soluções preparadas para avaliação da formação de complexos de inclusão de ramnolipídios e ciclodextrina.

Ensaio	Composição	pH
1	CD	Sem ajuste
2	RL	Sem ajuste
3	RL/CD 1:1	3,7
4	RL/CD 1:2	3,7
5	RL/CD 1:10	3,7
6	RL/CD 1:1	5,7
7	RL/CD 1:2	5,7
8	RL/CD 1:10	5,7
9	RL/CD 1:1	7,7
10	RL/CD 1:2	7,7
11	RL/CD 1:10	7,7

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.



#### **5.2.2.2.1 Análise dos deslocamentos químicos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros unidimensionais (1D) – RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos usando espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. Para a análise, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}$ .

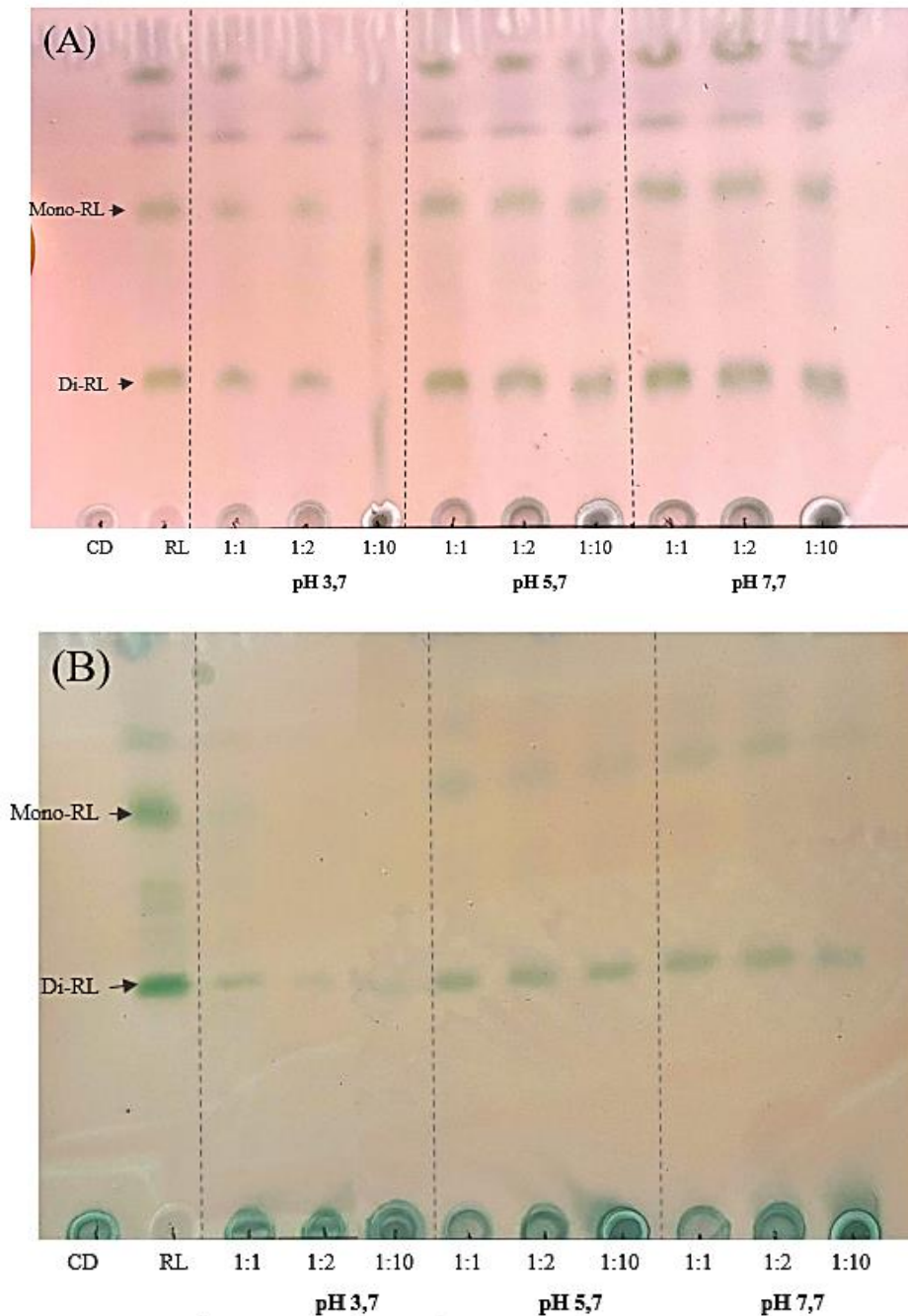
### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.3.1 Análise da Complexação Ramnolipídio - $\beta$ -Ciclodextrina por TLC**

As soluções contendo ramnolipídios e  $\beta$ -Ciclodextrina em diferentes pHs foram analisadas por TLC, assim como os compostos separados para comparação dos spots. Os resultados podem ser vistos na Figura 24. Como citado anteriormente, o primeiro ensaio foi feito sem a centrifugação das amostras (Figura 24A), e o segundo ensaio, com a centrifugação (Figura 24B).

A comparação dos spots de CD e RL com as demais soluções foi realizada para observação da aparição de um novo spot (que poderia indicar a formação do complexo RL-CD) e/ ou para análise da diminuição do tamanho e intensidade spots de ramnolipídios. Esse fato indicaria que o tensoativo teria sido complexado pela CD e a quantidade de RL livre na solução seria menor.

**Figura 24** - Análise da formação de complexos de inclusão por cromatografia em camada delgada. (A) amostras depositadas sem centrifugação. (B) amostras foram centrifugadas e depois depositadas.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Observando as placas, percebeu-se que no primeiro ensaio, onde as amostras não foram centrifugadas, aparentemente não houve complexação do biossurfactante pela  $\beta$ -CD, com exceção das soluções em pH 3,7. Esses tubos demonstraram spots levemente menos intensos em relação ao controle e às demais soluções. Já quando comparados com o ensaio onde as amostras foram centrifugadas, houve uma diminuição expressiva na intensidade dos spots de ramnolipídios. Nessa placa, percebeu-se que os spots de mono-RL demonstraram

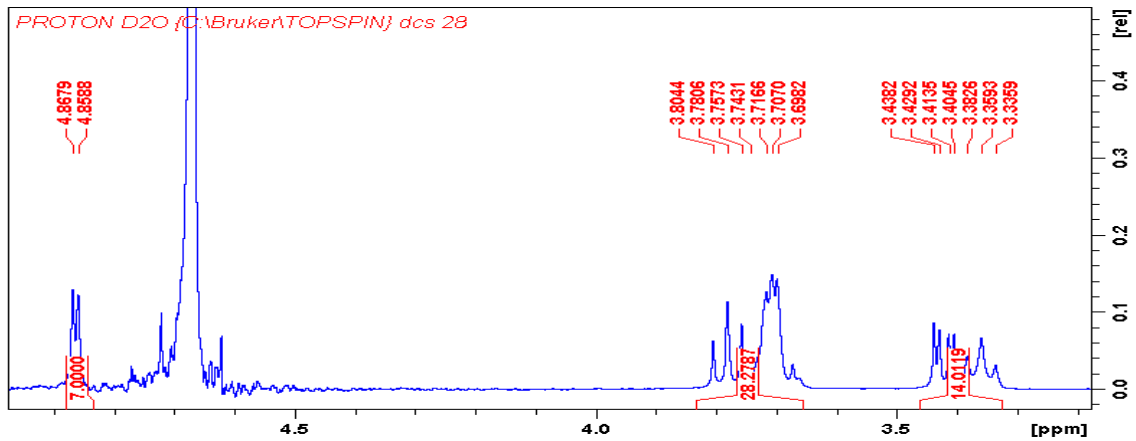
decréscimos de intensidade mais significativos, mas essa diminuição também foi notada com os spots de di-RL. O aumento da concentração de CD não parece ter influenciado a complexação em pH 5,7 e 7,7. E, aparentemente, a tendência à complexação foi maior em pH 3,7 e com mono-RL.

A centrifugação influenciou bastante os resultados obtidos e, uma questão que deve ser considerada é a baixa solubilidade do biossurfactante em meio aquoso ácido. Dessa maneira, a etapa de centrifugação ocasionaria a sedimentação dessas moléculas, as quais não seriam identificadas na TLC. Principalmente, deve-se considerar que mono-RL são menos solúveis do que os homólogos que apresentam duas ramnosos, e por isso, a centrifugação pode ter sedimentado esses compostos com mais facilidade e por isso foram menos notados nas placas.

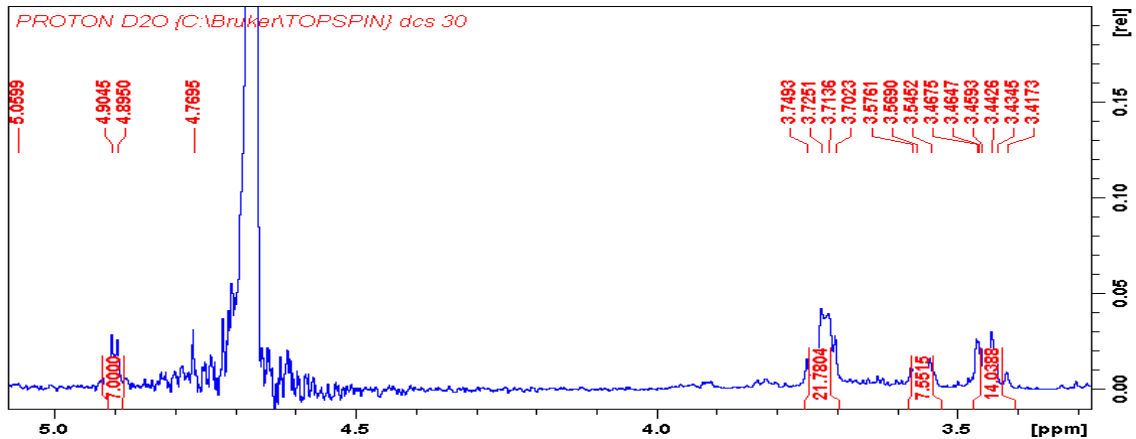
Entretanto, caso a centrifugação fosse a única variável responsável pela diminuição dos spots, o aumento da concentração da CD não influenciaria nos resultados. E, em pH 3,7, pôde-se notar uma diferença em relação à proporção RL-CD. Dessa maneira, como a TLC não foi considerada o melhor método para avaliação da formação dos complexos de inclusão, decidiu-se por analisar a ligação desse ramnolipídios e ciclodextrina por ressonância magnética nuclear.

### **5.3.2 Análise da Complexação Ramnolipídio - $\beta$ -Ciclodextrina por RMN**

A fim de explorar a complexação da ciclodextrina com os ramnolipídios, foram realizadas análises de RMN de  $^1\text{H}$  do biossurfactante e ciclodextrina livres e da amostra contendo os dois compostos. As Figuras 25 e 26 apresentam uma expansão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da CD livre e da CD com o biossurfactante, respectivamente. E a Tabela 19 apresenta os dados de RMN de  $^1\text{H}$  da CD nos dois espectros apresentados nas Figuras 25 e 26.

**Figura 25** - Expansão do espectro da análise de RMN de  $^1\text{H}$  da ciclodextrina em  $\text{D}_2\text{O}$ 

Fonte: Elaborada pela própria autora.

**Figura 26** - Expansão do espectro da análise de RMN de  $^1\text{H}$  da ciclodextrina com o RL realizada em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Fonte: Elaborada pela própria autora.

**Tabela 19** - Deslocamentos químicos nos espectros da ciclodextrina livre e na presença do RL.

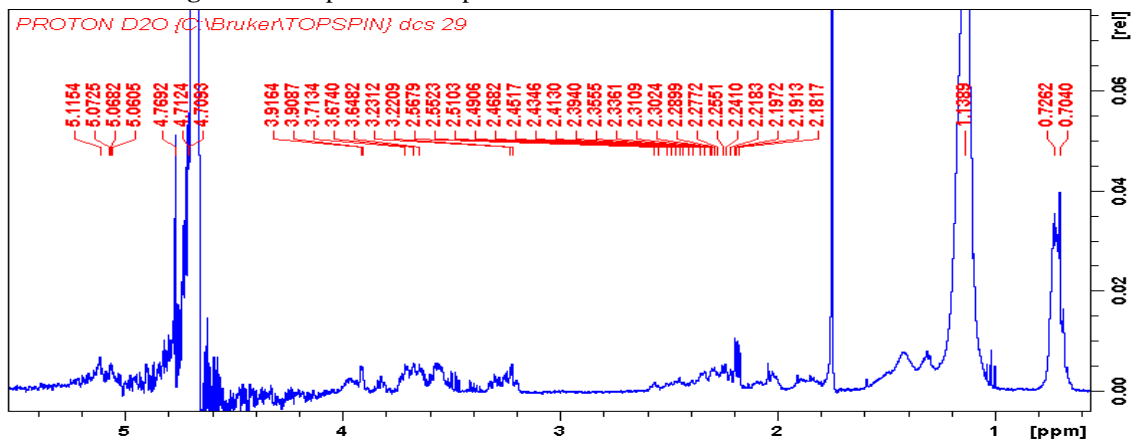
H	CD Livre	CD + RL	Varição do deslocamento
	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$	$\Delta\delta(\text{ppm})$
1°	4,86	4,90	0,04
2°	3,42	3,44	0,02
3°	3,78	3,72	0,06
4°	3,36	3,44	0,08
5°	3,69-3,71	3,55	0,14
6°	3,69-3,71	3,71	0,00

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Os espectros das Figuras 25 e 26, assim como a Tabela 19, indicam que os hidrogênios da CD sofreram deslocamento químico quando em contato com o RL, com exceção do H6. Essa alteração ocorreu principalmente em H3, H4 e H5, mostrando que há interação entre essas duas moléculas e, possivelmente, estes átomos estão participando da formação do complexo de inclusão.

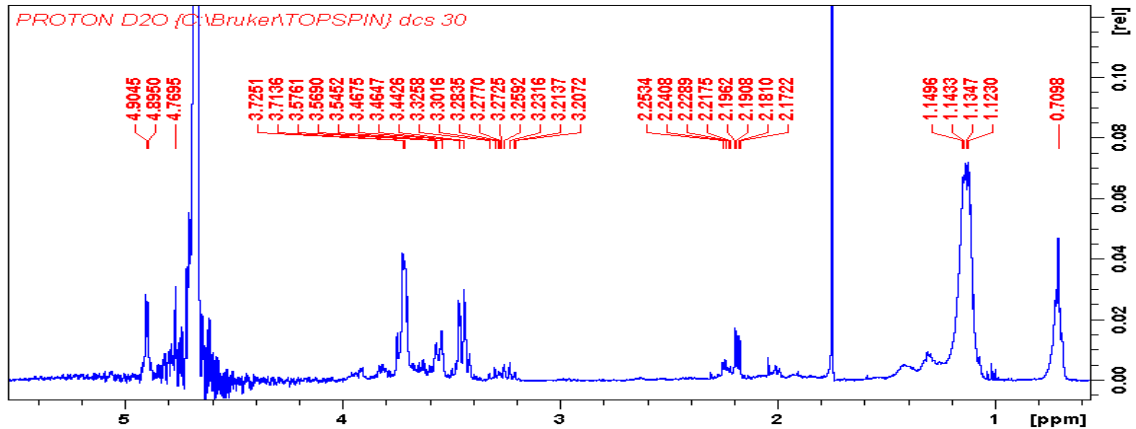
As Figuras 27 e 28 representam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do RL livre e na presença da CD, respectivamente. A análise e comparação desses espectros possibilitou a verificação da mudança de deslocamento nos sinais em 2,3 - 2,5 ppm e 5,1 - 5,0 ppm. Nestas regiões foi possível observar sinais no espectro do RL livre, entretanto, na presença da ciclodextrina, estes sinais mostraram-se ausentes. Possivelmente, esses átomos estão participando da formação do complexo com a CD.

**Figura 27** - Expansão do espectro da análise de RMN de  $^1\text{H}$  do RL em  $\text{D}_2\text{O}$ .



Fonte: Elaborada pela própria autora.

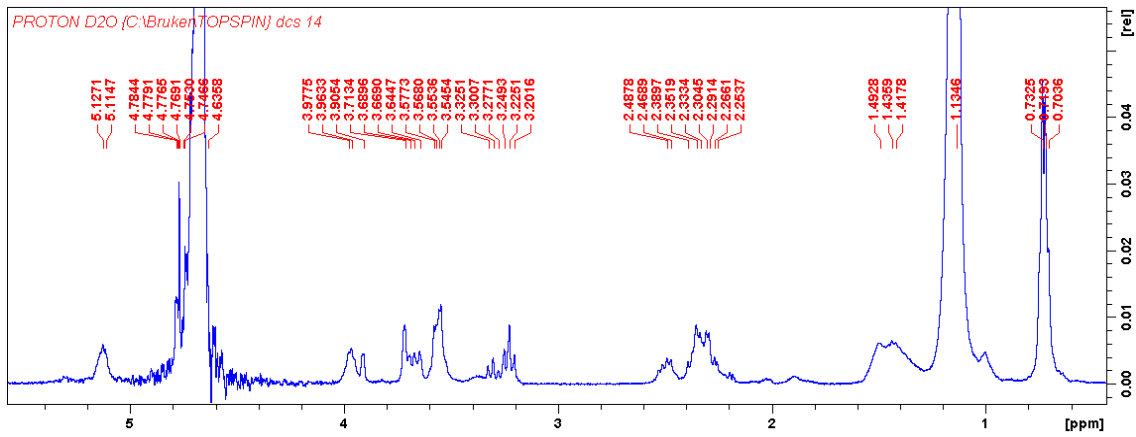
**Figura 28** - Expansão do espectro da análise de RMN de  $^1\text{H}$  do RL na presença da CD realizada em  $\text{D}_2\text{O}$ .



Fonte: Elaborada pela própria autora.

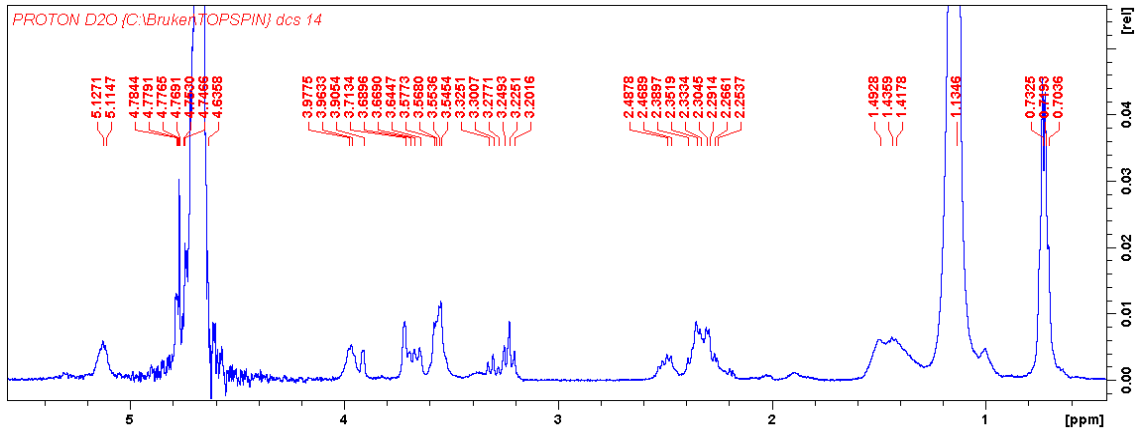
A fim de analisar e confirmar quais seriam os hidrogênios nas regiões de 2,3 - 2,5 ppm e 5,1 - 5,0 ppm, foi realizado espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos padrões mono- e di- RL livres, demonstrados nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

**Figura 29** - Expansão do espectro da análise de RMN de  $^1\text{H}$  do mono-RL realizada em  $\text{D}_2\text{O}$ .



Fonte: Elaborada pela própria autora.

**Figura 30** - Expansão do espectro da análise de RMN de  $^1\text{H}$  do di-RL realizada em  $\text{D}_2\text{O}$ .



Fonte: Elaborada pela própria autora.

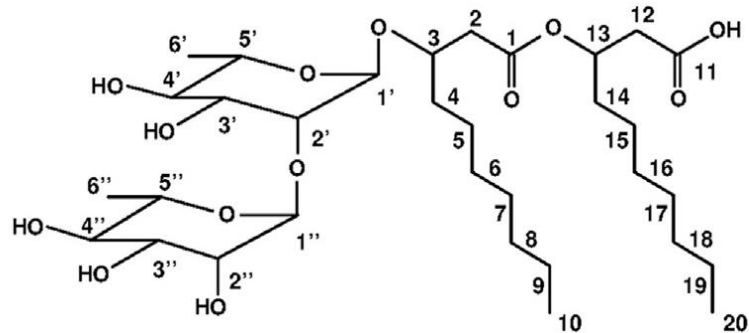
A comparação das figuras indica que espectros do mono- e di- RL são muito semelhantes. Ambos os espectros apresentam sinais de hidrogênios nas regiões de 2,3 - 2,5 ppm e 5,1 - 5,0 ppm, que, de acordo com Nicolò *et al.* (2017), são referentes aos hidrogênios na posição 2 e 12 e posição 13, respectivamente, indicados pela Figura 31.

A observação da estrutura química do padrão de di-RL, possibilitou verificar que os hidrogênios H2, H12 e H13 estão próximos de sistemas carbonílicos. Provavelmente, esses átomos estão interagindo por ligação de hidrogênio com as hidroxilas nas posições H3, H4 e H5 da CD (Figura 32), os quais demonstraram diferença de deslocamento químico na presença do RL.

A molécula de ciclodextrina, cuja conformação estrutural é tronco-cônica, apresenta os hidrogênios H1, H2 e H4 direcionados à porção exterior e os hidrogênios H3, H5 e H6 à porção interior. Dessa forma, provavelmente a inclusão está ocorrendo devido à considerável

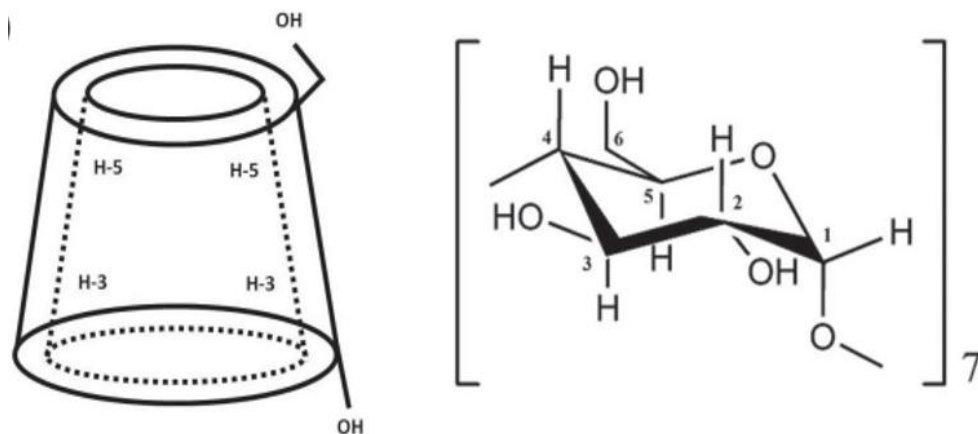
mudança no deslocamento de H5 da CD. Mas, a parte externa da molécula também interage com o RL, já que H1, H2 e H4 também sofrem alterações de deslocamento.

**Figura 31** - Estrutura química do di-ramnolipídio.



Fonte: modificado de Nicolò *et al.* (2017).

**Figura 32** - Estrutura química da ciclodextrina.



Fonte: Guedes *et al.* (2020).

Dessa maneira, as análises em RMN indicaram que há interação entre as moléculas de ramnolipídios e ciclodextrina, muito provavelmente por inclusão. Entretanto, não é possível diferenciar se há preferência de inclusão por uma das espécies homólogas com as análises realizadas. Como pôde ser notado que a interação ocorre pela cadeia carbônica no biossurfactante, a quantidade de açúcar no RL pode não influenciar na complexação por diferença de polaridade, mas talvez o tamanho molecular possa ocasionar uma preferência.

Foi verificado que houve interação do RL com os hidrogênios da internos e externos da CD. Com isso, há a possibilidade das moléculas de mono-ramnolipídios, que são menores, estarem interagindo por inclusão com a CD (na porção interna). Já os di-ramnolipídios, podem estar interagindo com a porção externa. Mas, para melhor entendimento desses

fenômenos, estudos futuros serão realizados com a CD na presença de cada padrão de ramnolipídio individualmente para comparação se há diferença nos hidrogênios da CD que sofrem deslocamentos químicos na presença de mono- e na presença de di- ramnolipídios.

### 5.3.3 Separação das espécies homólogas por cromatografia em coluna

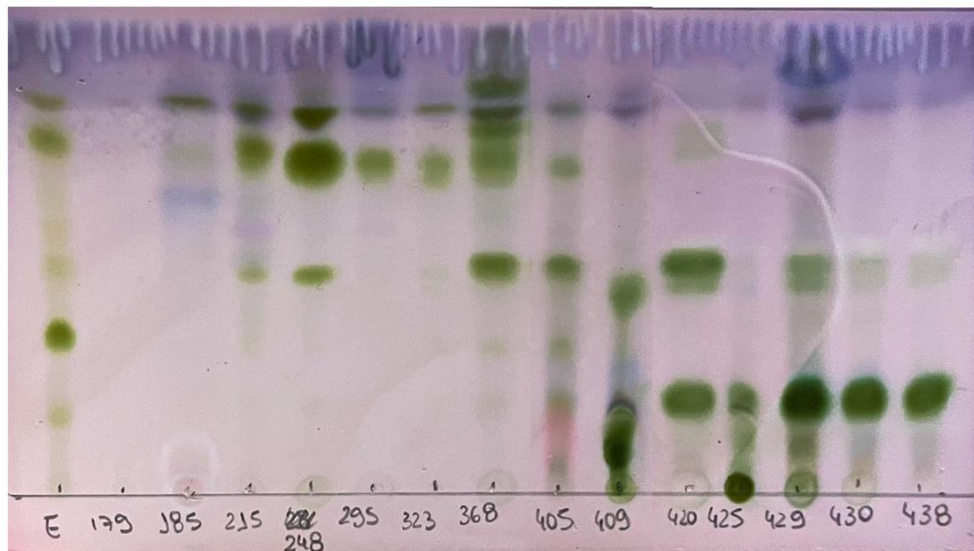
As amostras obtidas foram visualizadas em placas de TLC durante o procedimento. As frações que demonstraram diferenças aparentes foram reproduzidas em uma nova placa (Figura 33) para comparação da eluição do ramnolipídio através da coluna. A primeira amostra depositada denominada “E” é referente ao extrato de mistura de RL depositado na coluna para separação. As amostras seguintes estão enumeradas de acordo com a ordenação de eluição.

As primeiras aparições mais evidentes na placa de TLC ocorreram a partir do tubo 185, onde foi possível verificar a presença de dois spots de coloração verde. O spot mais claro demonstrou fator de retenção ( $R_f$ ) similar ao do mono-RL (íon 503). O padrão de resultado manteve-se similar até o tubo 215, onde um novo spot apareceu com  $R_f$  entre mono- e di- RL, íons 503 e 649, respectivamente. O mesmo revelou-se por mais 80 tubos e em seguida, foi esgotado. Esse fato resultou na possível consideração de que a coluna poderia ser capaz de separar as espécies homólogas de ramnolipídios para além de apenas os íons 503 e 649.

Os tubos 295 - ~360 apresentaram predominância de spots similares aos anteriores, mas uma mudança visual ocorreu no tubo 368, onde um maior número de spots foi notado. Foi observado que o spot entre os dois principais homólogos voltou a aparecer, assim como houve um início de coloração em altura próxima ao íon 649. Nas próximas amostras, notou-se que a revelação dos spots na parte superior mostraram-se mais suaves. E a partir da amostra 420, foi visto a revelação de spot com  $R_f$  inferior ao íon 649.



**Figura 33** - Cromatografia em camada delgada das amostras 179, 185, 215, 248, 295, 323, 368, 405, 509, 420, 425, 429, 430 e 438 obtidas através da coluna de separação (A). Uma amostra do extrato de RL (E) também foi aplicado para comparação.

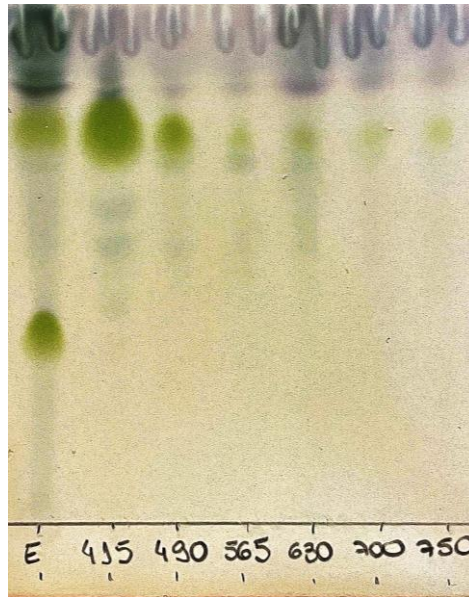


**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

A análise do experimento resultou na consideração de que havia sido possível separar as espécies homólogas de ramnolipídios, mas não com tamanha precisão. Ainda assim, existiam alguns questionamentos, como: 1. A coluna foi capaz de separar mono- e di-ramnolipídios ou os íons 503 e 649 foram purificados? 2. Há a possibilidade de identificação dos homólogos a partir de TLC? 3. O tamanho e intensidade dos spots demonstrara algum indício quantitativo? 4. Todos os spots eram referentes à ramnolipídios?

Dessa maneira, como ficaram questionamentos em relação à eficiência da separação por cromatografia em coluna, decidiu-se realizar o experimento novamente. Dessa vez, uma nova amostra de RL foi utilizada, oriunda de uma nova fermentação. Os processos de empacotamento da coluna e preparo do ensaio foram repetidos com maior aptidão e as amostras foram coletadas até o tubo 750. Entretanto, esse experimento sofreu uma interrupção devido à falta de tempo. As soluções preparadas para fase móvel foram prolongadas por tempo maior com o objetivo de obter uma melhor purificação. Dessa maneira, o número de coletas foi muito maior e não foi possível finalizar a eluição a tempo. Os resultados obtidos até o momento estão representados na Figura 34.

**Figura 34** - Cromatografia em camada delgada das amostras 415, 490, 565, 630, 700 e 750 obtidas através da coluna de separação (B). Uma amostra do extrato de RL (E) também foi aplicado para comparação.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Essas amostras foram escolhidas porque anteriormente à elas, pouco havia sido notado nas placas de TLC. Alguns spots de coloração azul/ roxa na porção superior da placa foram observados, mas optou-se pela priorização das amostras contendo spots de coloração verde (que indicariam a presença das espécies homólogas). Visualmente, percebe-se a presença principal do spot de coloração verde com mesmo *R<sub>f</sub>* do mono-RL (íon 503), cujo diâmetro/intensidade diminuem conforme as coletas. Mas, esse decréscimo se estendeu por mais de 300 coletas. A fase móvel utilizada nessas amostras foi hexano, acetato de etila e ácido acético 60:40:1 (v/v/v), assim como no experimento anterior, validando que mono-ramnolipídios são eluídos com essa proporção de solventes. A mudança da fase móvel para uma concentração maior de acetato de etila (solvente mais polar) não ocorreu porque o critério utilizado era de que os spots de mono-RL deveriam desaparecer primeiramente.

Para melhor entendimento do processo de separação através das duas colunas cromatográficas, decidiu-se analisar as amostras que demonstraram as principais diferenças visuais por espectrometria de massas. Os resultados da primeira coluna estão indicados na Tabela 20 e os resultados da segunda coluna (não finalizada) estão indicados na Tabela 21.

**Tabela 20** - Caracterização por espectrometria de massas das amostras coletadas da coluna (A) de separação. Os íons verificados correspondem às espécies homólogas de ramnolipídios presentes do extrato.

	Coluna (A)	Estrutura Molecular	Extrato (E)	N° do tubo de coleta								
				185	215	295	368	405	409	425	429	438
% do íon na amostra	475	RhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	2,26	5,54	0,23	6,09	1,37	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00
	503	RhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	57,52	81,57	24,67	82,44	72,73	59,89	62,39	74,07	72,34	67,51
	529	RhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	0,44	2,59	12,08	3,05	3,86	0,00	0,00	0,00	3,14	0,00
	531	RhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	15,21	6,81	62,15	6,98	14,88	18,63	16,90	17,33	14,73	18,59
	621	RhaRhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	1,26	0,00	0,00	0,00	0,25	6,92	0,00	0,00	0,00	0,00
	649	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	10,67	1,78	0,46	0,70	3,74	6,92	10,49	5,04	4,80	6,15
	675	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	0,77	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	677	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	11,86	1,70	0,42	0,75	2,97	7,64	10,22	3,56	3,66	7,75
<b>Mono-RL (%)</b>			75,43	96,52	99,12	98,56	92,85	78,51	79,29	91,40	91,54	86,10
<b>Di-RL (%)</b>			24,57	3,48	0,88	1,44	7,15	21,49	20,71	8,60	8,46	13,90

Fonte: Elaborada pela própria autora.

A tabela referente à Coluna (A) demonstra uma mistura de homólogos em diversas amostras. Percebe-se que há predominância de mono-RL, principalmente do íon 503, mas algumas amostras apresentaram quantidades significativas de di-RL, como a 409. Essa coleta demonstrou uma porcentagem de mono/ di quase similar à do extrato, o que indica que não houve separação dos compostos.

Ao contrário do que o esperava-se pela placa de TLC, as últimas amostras não demonstraram baixas porcentagens de mono-RL. Apesar do íon 503 quase não ser notado na TLC, a análise em LC-MS indicou 65-75% desse homólogo. O que pode explicar esse fato é que a presença de duas ramnosos facilita a visualização do ramnolipídio na placa, ocasionando uma concepção errônea da eluição dos compostos. Com isso, facilita-se a visualização de di-RL, o que não indica uma maior concentração desse homólogo.

Em algumas amostras, como a 215, pode-se dizer que houve a predominância de algum íon que não estava em abundância no extrato, mas não pode-se dizer que houve a separação das espécies homólogas. A espectrometria de massas confirmou os resultados da placa de TLC que continha variedade de spots simultâneos. Provavelmente a condução do experimento apresentou erros como mal empacotamento da coluna, reduzindo a eficiência de separação dos compostos. Mas ao analisar a Tabela 21 e a os resultados de caracterização do RL do capítulo 3, observa-se que a porcentagem de eluição dos congêneres da coluna corroboram a abundância relativa obtida na tabela T.

Porém, a repetição do experimento (coluna B) forneceu resultados mais otimistas. Da mesma forma que a placa de TLC indicou um único spot exclusivo, a análise em LC-MS

confirmou essa presunção. Em todas as amostras analisadas, houve a predominância de mono-RL, em uma concentração de 99%. Esse fato mostra que a separação foi bastante eficaz, pois os padrões comerciais não atingem esse grau de pureza. Além disso, foi possível observar que a primeira amostra (415) apresentou os íons 529, 531 e 555 em maiores porcentagens do que o encontrado no extrato, o que indica que houve uma prevalência de eluição dessas espécies homólogas no início. Concentrações ínfimas de di-RL também foram encontrados através dos íons 649 e 677, os quais estão presentes em concentrações superiores a 10% no extrato.

**Tabela 21** - Caracterização por espectrometria de massas das amostras coletadas da coluna (B) de separação. Os íons verificados correspondem às espécies homólogas de ramnolipídios presentes do extrato.

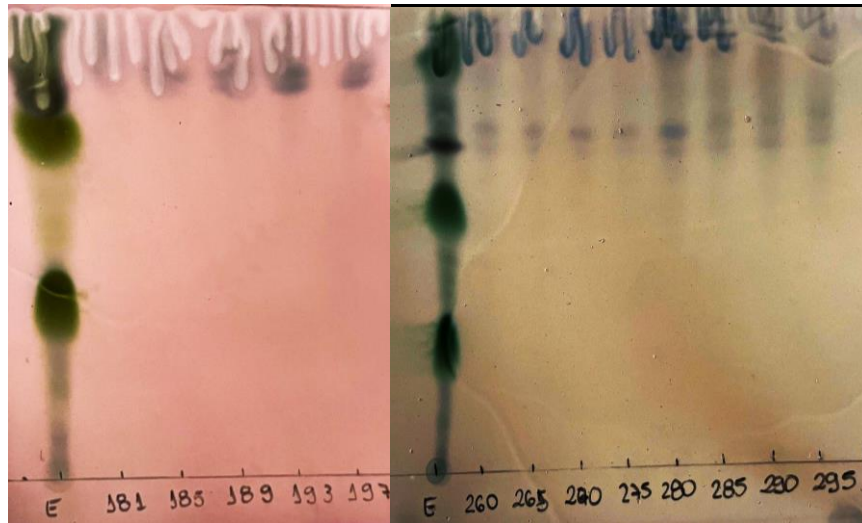
	Coluna (B)	Estrutura Molecular	Extrato	Nº tubo de coleta					
				415	490	565	630	700	750
% do íon na amostra	475	RhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	2,13	0,07	5,05	3,43	1,80	1,36	0,95
	503	RhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	40,78	42,03	74,36	79,99	83,49	84,55	83,89
	529	RhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	10,97	25,25	7,77	5,98	5,32	5,08	5,39
	531	RhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	14,01	28,52	12,14	9,98	8,77	8,63	9,11
	555	RhaC <sub>10</sub> C <sub>14:2</sub>	0,89	4,06	0,55	0,38	0,25	0,22	0,29
	621	RhaRhaC <sub>8</sub> C <sub>10</sub>	6,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	649	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>10</sub>	10,22	0,04	0,08	0,13	0,21	0,17	0,24
	675	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>	1,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	677	RhaRhaC <sub>10</sub> C <sub>12</sub>	13,17	0,03	0,05	0,10	0,18	0,00	0,14
		<b>Mono-RL (%)</b>		68,78	99,93	99,87	99,76	99,61	99,83
	<b>Di-RL (%)</b>		31,22	0,07	0,13	0,24	0,39	0,17	0,38

**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Esse resultado indica que a repetição da coluna resultou em uma melhor separação, onde foi possível obter amostras contendo 99% de mono-RL. Com isso, espera-se que a continuidade do experimento resulte na obtenção de amostras com a mesma pureza de di-ramnolipídios também. Além disso, pode-se afirmar que é possível utilizar hexano, acetato de etila e ácido acético nas proporções descritas para purificação de mono-RL.

Entretanto, ainda é necessário encontrar uma melhor solução para a necessidade de grande quantidade de fase móvel. Uma possibilidade é evitar o gradiente de soluções até a proporção hexano/acetato 60:40, mas para isso, deve-se observar se a suspensão dessa etapa não irá influenciar no resultado final. Em amostras de ramnolipídios costuma-se encontrar ácidos graxos precursores da produção do biossurfactante e é esperado que a utilização de fases móveis menos polares (maior porcentagem de hexano) cumpram o papel de eluir essas impurezas, o que justifica a aparição de spots azuis nas amostras iniciais (Figura 35).

**Figura 35** - Cromatografia em camada delgada de amostras coletadas na Coluna (B) contendo spots azuis que provavelmente indicam a presença de hidroxiácidos.



**Fonte:** Elaborada pela própria autora.

Sendo assim, uma outra possibilidade após conhecer todo o processo de purificação seria reutilizar a mistura de solvente através de destilação, evitando dessa maneira o gasto excessivo de solventes. Além disso, o acoplamento de bomba à vácuo pode acelerar a eluição. Mas, para isso, primeiramente é necessário avaliar todo processo incluindo os fatores como viabilidade do processo e grau de pureza em relação à outros compostos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O óleo de semente de goiaba forneceu a melhor produção de RL em relação ao d-limoneno e por isso foi selecionado para realização do planejamento experimental delineamento composto central rotacional;

- O delineamento experimental mostrou que as variáveis carbono e nitrogênio nas formas quadráticas, assim como a relação C/N influenciam na produção do biossurfactante, mas a concentração de nitrogênio foi o fator mais significativo;

- As concentrações de fonte de carbono e nitrogênio otimizadas foram 100 e 10 g/L, respectivamente, e levaram à produção de 39,97 g/L de ramnolipídios, com predominância de mono-RL;

- A composição de espécies homólogas de RL variou em relação à fonte de carbono utilizada e uma espécie homóloga de RL, com  $m/z$  555 (ainda não descrita na literatura) foi encontrada com a fonte óleo de semente de goiaba

- A CMC de soluções de RL diminui à medida que o valor de pH se torna menor. A adição de PG favorece a formação de agregados;

- O índice de emulsificação do RL é favorecido em meios mais alcalinos e o RL foi capaz de emulsionar óleo de açaí e manter a estabilidade da emulsão com pH ajustado;

- As análises em RMN demonstraram que há interação entre ramnolipídios e ciclodextrina, muito provavelmente por pontes de hidrogênio formando os complexos de inclusão, mas os experimento não foram suficientes para indicar se há preferência por uma das espécies homólogas;

- O uso da fase móvel contendo hexano, acetato de etila e ácido acético possibilitou a eluição de mono-ramnolipídios com 99% de pureza em coluna de separação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS, A. *et al.* Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. **Langmuir**, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 1367-1371, fev. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la0011735>.
- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LEPINE, F.; DEZIEL E. A Stereospecific Pathway Diverts b-Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. **Chemistry & Biology**. v. 21, p. 156–164, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.010>.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biothechnol.**, v. 86, p. 1323-36, 2011. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>.
- ADU, S. A. *et al.* Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 1099-1120, nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12111099>.
- ARAÚJO, J. S. **Produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA usando glicose como substrato e aplicações.** Fev. 2018. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFRN, Natal – RN, 2018.
- ARAUJO, L. V. *et al.* Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, [s.l.], v. 63, p.171-178, maio, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015>.
- BADMUS, S. O. *et al.* Environmental risks and toxicity of surfactants: overview of analysis, assessment, and remediation techniques. **Environmental Science and Pollution Research**. [s.l.] v. 28. P. 62085-62104, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16483-w>
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 1-12, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00101-6](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)00101-6).
- BANAT, I. M. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 2, p. 427-444, abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. And Biotechnol.** Oxford, v.53, p. 495-508, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>.
- BANCROFT, W. D. The Theory of Emulsification, V. **The Journal Of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 501-519, 1 jun. 1913. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/j150141a002>.

BENINCASA, M. **Obtenção de Biotensoativos a partir de resíduos da Indústria de Óleos Vegetais**. 2001. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

BERGER, R.; KRINGS, U.; ZORN, H. Biotechnological flavor generation. **Food Flavour Technology**, Sheffield, p. 60-104, 2002. Taylor A. J.

BJERK, T. R. *et al.* Biosurfactants: properties and applications in drug delivery, biotechnology and ecotoxicology. **Bioengineering**, [s.l.], v. 8, n. 8, p. 115-133, 13 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering8080115>.

CÂMARA, J. M. D. A. *et al.* Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR). **Journal of Petroleum Exploration And Production Technology**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.2333-2341, 25 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13202-019-0633-x>.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.520-529, 27 nov. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051329>.

ÇELIK, P. A. *et al.* Biosurfactants Potential Role in Combating COVID-19 and Similar Future Microbial Threats. **Applied Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 334, 31 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/app11010334>.

CERESA, C. *et al.* Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 466, 30 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13040466>.

CHAMPION, J. T. *et al.* Electron Microscopy of Rhamnolipid (Biosurfactant) Morphology: effects of ph, cadmium, and octadecane. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 170, n. 2, p. 569-574, mar. 1995. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1995.1136>.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 55, n. 5, p. 541-546, 1 maio 2001. Springer Science and Business Media LLC.

CHENG, T. *et al.* A novel rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. **AMB Express**, [s.l.], v.7, n. 120, p. 1-14, jun, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0418-x>.

CLINT, J. H. **Surfactant aggregation**. New York: Blackie & Son Ltd, 1992. 283 p.

COSTA, S. G. V. A. O. *et al.* Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 483-488, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.002>.

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: rhamnolipídios e polihidroxicanoatos (PHAs)**. 2010. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de



Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

COSTA, S. G. V. A.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 34-38, mar. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612008000100007>.

CROUZET, J. *et al.* Biosurfactants in Plant Protection Against Diseases: rhamnolipids and lipopeptides case study. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [s.l.], v. 8, p. 1-11, 8 set. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.01014>.

CROWELL, P. L. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 129, n. 3, p. 775-778, 1 mar. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/129.3.775s>.

DALTIN, D. Introdução e primeiros conceitos. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011. Cap. 1, p. 1-44.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 39, n. 9, p.1033-1046, maio, 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00258-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00258-9).

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.] v. 61, n. 01, p.47-64, mar. 1997.

DÉZIEL E. *et al.* Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochim Biophys Acta**, [s.l.] 1440:244–252. 1999.

DÉZIEL, E. *et al.* RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (haas), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, [s.l.], v. 149, n. 8, p. 2005-2013, 1 ago. 2003. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26154-0>.

DUETZ, W. A. *et al.* Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 61, n. 4, p.269-277, 15 mar. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1221-y>.

EASTBURN, S. D., TAO, B. Y. Applications of modified cyclodextrins. **Biotechnol Adv**. 1994; 12:325–39.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Area: all countries. Production Items: Mangoes, mangosteens, guavas and Lemons and limes. Year: 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: março de 2020.

FARAHAT, Mohamed. Enhancement of  $\beta$ -Cyclodextrin Production and Fabrication of Edible Antimicrobial Films Incorporated with Clove Essential Oil/ $\beta$ -cyclodextrin Inclusion Complex. **Microbiology And Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.12-23, 28 mar.

2020. Korean Society for Microbiology and Biotechnology.  
<http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1909.09016>.

FRACCHIA, L. *et al.* Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. **Biomedical Science, Engineering And Technology**, [s.l.], p. 325-369, 20 jan. 2012. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/23821>.

FRANCY, D. S. *et al.* Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal Of Industrial Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 237-246, jun. 1991.

FUKUDA, I. M. *et al.* Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 54, n. , p. 1-54, 8 nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>.

GAYATHIRI, E. *et al.* Biosurfactants: potential and eco-friendly material for sustainable agriculture and environmental safety: a review. **Agronomy**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 662, 9 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy12030662>.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in Pharmaceutical Industry (A Mini-Review). **American Journal of Drug Discovery and Development**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 58-69, 15 dez. 2010. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/ajdd.2011.58.69>.

GUDIÑA, E. J. *et al.* Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 177, p. 87-93, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.069>.

GUEDES, L. *et al.* Imiquimod/ $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex: experimental and theoretical studies. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p. 1732-1746, 2020. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200060>.

GUERRA-SANTOS L., KÄPPELI O., FIECHTER A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl Environ Microbiol**, [s.l.], v. 48, p. 301–305. 1984

GUERRA-SANTOS, L *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 2, p. 301-305, ago. 1984. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.48.2.301-305.1984>.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Biomembranes*, [s.l.], v. 415, n. 1, p. 29-79, mar. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157\(75\)90016-7](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157(75)90016-7).

HENKEL, M. *et al.* Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipids production. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 47, p. 1207-1219, 2012.

IBRAHIM, S. *et al.* Bio-cleaning Efficiency of Rhamnolipids Produced from Native *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Agro-industrial By-products for Liquid Detergent

Formulation. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 193, n. 8, p. 2616-2633, 7 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-021-03555-3>.

İKIZLER, B. *et al.* Surface adsorption and spontaneous aggregation of rhamnolipid mixtures in aqueous solutions. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 519, p. 125-136, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.056>.

ISHIGAMI, Y. *et al.* Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfactant. **Langmuir**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 1634-1636, jul. 1993. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la00031a006>.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 71, n. 12, p.4124-4126, dez. 1949. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01180a073>.

JONES, M. N.; CHAPMAN, D. **Micelles, Monolayers, and Biomembranes**. New York; Chichester: Wiley, 1994.

JOVANOVIC, M. *et al.* Rhamnolipid inspired lipopeptides effective in preventing adhesion and biofilm formation of *Candida albicans*. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 87, p.209-217, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.023>.

JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 8, p.479-492, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.011>.

KAPPELI, O; FIECHTER, A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 131, n. 3, p. 917-921, 1977. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.131.3.917-921.1977>.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos Óleos de Algumas Sementes de Frutas como Aproveitamento de Resíduos Industriais. **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 29, n. 5, p.1008-1014, set. 2005.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. 2007. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987.

LI, Z. *et al.* High-Yield Di-Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its Potential Application in MEOR. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 7, p. 1433, 11 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24071433>.

LIN, S. C. Review Biosurfactants: recent advances. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 66, n. 2, p. 109-120, jun. 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4660\(199606\)66:23.0.co;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-4660(199606)66:23.0.co;2-2).

LINDSKOG, E. K. The Upstream Process: principal modes of operation. **Biopharmaceutical Processing**, [s.l.], p. 625-635, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100623-8.00031-1>.

LOPES, P. R. M. *et al.* Production of Rhamnolipids from Soybean Soapstock: Characterization and Comparison with Synthetics Surfactants. **Waste and Biomass Valorization**, [s.l.], v. 12, p. 2013–2023, jan. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01159-2>.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal Of Cosmetic Science**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 255-261, ago. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00493.x>.

LOVAGLIO, R. B. *et al.* Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.301-305, jul. 2011. Elsevier BV.

LOVAGLIO, R. B. *et al.* Rhamnolipids Production by a *Pseudomonas aeruginosa* LBI Mutant: Solutions and Homologs Characterization. **Tenside Surf. Det.**, [s.l.] v, 51, p. 397-405, 2014.

LOVAGLIO, R. B. **Produção de Rhamnolipídios por Mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2011. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 965p.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.138-142, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.009>.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An Update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, [s.l.], 58, 428-434, 2002.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis f. flavicarpa*): physical and chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 127-134, fev. 2012. FapUNIFESP (SciELO).

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? **Biothechnology letters**, [s.l.] v. 34, p. 1597-1605, 2012.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 382-387, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200027>.

MATA-SANDOVAL, J. C. *et al.* High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 864, n. 2, p. 211-220, dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00979-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00979-6).

MOHANTY, S. S. *et al.* A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 1-13, 26 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>.

MOLINA, G.; PIMENTEL, M. R.; PASTORE, G. M. *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 97, n. 5, p. 1851-1864, 29 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4701-8>

MONTEIRO, S. A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. 2007. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MOUTINHO, C. *et al.* Moléculas anfifílicas - lípidos - e formação de agregados supramoleculares: micelas e lipossomas. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde 1**, Porto, p. 21-46. 2004. ISSN: 1646-0480.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol**, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MÜLLER, M. M. *et al.* Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 89, n. 3, p. 585-592, 2 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2901-z>.

MÜLLER, M. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 1, p. 167-174, 9 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2513-7>.

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

NAGY, G. M. **Produção de Biosurfactante de baixo custo a partir de Resíduos Agroindustriais**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NICANOR, A. B. *et al.* Guava seed protein isolate: Function and nutritional characterization. **J. Food Biochem.**, [s.l.], v. 25, p. 77-90, 2001.

NICANOR, A. B. *et al.* Guava seed storage protein: Fractionation and characterization. **LWT-Food Sci. and Technol.**, [s.l.], v. 39, n. 8, p. 902-910, 2006.

NICOLÒ, M. S. *et al.* Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 39, p. 36-41, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.013>.

NITSCHKE, M. *et al.* Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 3, p. 621-630, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.012>.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V. Biosurfactants in food industry. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.252-259, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 772-776, set. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000500013>.

OKAMOTO, M. K. H. **Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel.** 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, F. J. S. *et al.* Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 44, p. 383-9, 2008.

OLKOWSKA E., RUMAN M., POLKOWSKA Z. Occurrence of surface active agents in the environment. **J Anal Methods Chem**, [s.l.] p. 1– 15. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/769708>

PATEL, S.; KHARAWALA, K. Biosurfactants and Their Biodegradability: a review and examination. **International Journal Of Engineering And Advanced Technology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 4-11, 28 fev. 2022. Blue Eyes Intelligence Engineering and Sciences Engineering and Sciences Publication - BEIESP. <http://dx.doi.org/10.35940/ijeat.b3319.0211322>.

PERFUMO, A. *et al.* Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. **Handbook Of Hydrocarbon And Lipid Microbiology**, [s.l.], p. 1501-1512, 2010. Springer Berlin Heidelberg. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_103](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_103).

PHAM, J. V. *et al.* A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 1-2, 20 jun. 2019. Frontiers Media SA.

PORNSUNTHORNTAWEE, O. *et al.* Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 6-15, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.006>.

QIUZHUO, Z.; WEIMIN, C.; JUAN, W. Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing. **J. Environ. Sci.**, [s.l.], v. 20, p. 975-980, 2008.

RADZUAN, M. N. *et al.* Bioreactor Rhamnolipid Production Using Palm Oil Agricultural Refinery By-Products. **Processes**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. 2037, 14 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pr9112037>.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 85, n. 11, p. 1142-1169, nov. 1996. American Geophysical Union (AGU). <http://dx.doi.org/10.1021/js960075u>.

RAMANA, K. V.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 249-257, 24 abr. 2007.

RAZA, Z. A. *et al.* Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 32, n. 6, p. 811-816, 13 fev. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0216-x>.

REDDY, K. S. *et al.* Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. **BioresourceTechnology**, [s.l.], v. 221, p.291-299, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.041>.

RODRIGUES, L. R. Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 449, p. 304-316, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.022>.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processo: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 618 p.

ROONEY, A. P. *et al.* Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. **FEMS Microbiol. Lett.**, [s.l.], v. 295, p. 82–87. 2009.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 154-162, mar. 1999.

SALAZAR-BRYAM, A. M. **Aproveitamento de glicerol residual como fonte de carbono para produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa***. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2016.

SALAZAR-BRYAM, A. M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: upstream aspects. **Heliyon**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 337-339, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00337>.

SANTOS, B. F. **Estudo da produção de biosurfactante, usando resíduos agroindustriais, com desenvolvimento de modelos estatísticos e sensor virtual por modelagem neural.** Jul. 2015. 146 p. Tese (Doutorado em Sistemas de Processos Químicos e Informática) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2015.

SANTOS, M. S. **Teoria de Micelização: Propriedades de Soluções de Surfactantes via Minimização da Energia Livre de Gibbs.** 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SCHARAMM, L. L.; STASIUK, E. L.; MARANGONI, G. D. Surfactants and their applications. **Annual Reports Prog. Chem., Sect. C**, [s.l.], v. 99, p. 3-48, ago. 2003. DOI: 10.1039/b208499f.

SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High Performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Chromatogr.**, [s.l.], v. 693, p. 7-13, 1995.

SEN, S. *et al.* Sophorolipid Biosurfactant Can Control Cutaneous Dermatophytosis Caused by Trichophyton mentagrophytes. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 11, p. 1-15, 12 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00329>.

SHAH, M. U. H. *et al.* A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Procedia Engineering**, [s.l.], v. 148, p. 494-500, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.538>.

SHARMA, P. *et al.* Microbial biosurfactants: an eco-friendly perspective for soil health management and environmental remediation. **New And Future Developments In Microbial Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], p. 277-298, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-85579-2.00006-x>.

SHEN, C. *et al.* Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, 30 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep37553>.

SILVA, S. N. R. L. *et al.* Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 79, n. 1, p. 174-183, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>.

SILVA, V. L. *et al.* Rhamnolipids: solution against *aedes aegypti*? **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p. 1-5, fev. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00088>.

SILVEIRA, M. L. R. *et al.* Estudo Comparativo do Perfil de Ácidos Graxos Presentes no Óleo Extraído das Sementes de Goiaba (*Psidium guajava* L.). **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, [s.l.], p.1-2, fev. 2015. Editora Edgard Blücher.

SODAGARI, M. *et al.* Addressing the critical challenge for rhamnolipid production: discontinued synthesis in extended stationary phase. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 91, p. 83-89, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.036>.



- SONG, B. *et al.* Effect of rhamnolipids on enhanced anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons in nitrate and sulfate sediments. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 678, p.438-447, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.383>.
- STIPCEVIC, T.; PILJAC, A.; PILJAC, G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. **Burns**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 24-34, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2005.07.004>.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants: In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 89-120, 1987.
- UCHÔA-THOMAZ, A. M. A. *et al.* Chemical composition, fatty acid profile and bioactive compounds of guava seeds (*Psidium guajava* L.). **Food Science And Technology**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 485-492, 9 set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.6339>.
- VARJANI, S. *et al.* Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: status and perspectives. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 319, p. 124213, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124213>.
- VATSA, P. *et al.* Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 12, p.5095-5108, 9 dez. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms11125095>.
- VECINO, X. *et al.* Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 37, n. 7, p. 911-923, 12 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2016.1269053>.
- VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Geral**. Inhumas - Go: Instituto Federal de Goiás, 2012. 100 p. Disponível em: <[https://efivest.com.br/wp-content/uploads/2019/03/microbiologia\\_geral.pdf](https://efivest.com.br/wp-content/uploads/2019/03/microbiologia_geral.pdf)>. Acesso em: março de 2020.
- WATLINGTON, F. Goiaba no Mundo. **O Agrônomo**, Campinas, p. 22-27, 1006. Disponível em: <[http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/agronomico/pdf/v58\\_Goiaba\\_no\\_mundo.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/agronomico/pdf/v58_Goiaba_no_mundo.pdf)>. Acesso em: março de 2020.
- WITTEGENS, A. *et al.* Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 101, n. 7, p. 2865-2878, 17 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8041-3>.
- WU, L. M. *et al.* Comparative studies on the surface/interface properties and aggregation behavior of mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 181, p. 593-601, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.012>.
- YANG, Y. *et al.* Composite emulsifying behavior of egg white protein and rhamnolipid: properties of the constructed high internal phase emulsions. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 123, p. 106913, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106913>.

YING, G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environmental International**, [s.l.], v. 32, p. 417–431, jul. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>.

ZHANG, Q.; JU, L. K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of  $\beta$ -glucosidase from cellulase enzyme mixture. **Enzyme Microbial Technol.**, [s.l.], v. 48, p. 175–80, 2012.

ZHAO, F.; HAN, S.; ZHANG, Y. Comparative studies on the structural composition, surface/interface activity and application potential of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* using hydrophobic or hydrophilic substrates. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 295, jan. 2020. Elsevier BV.

ZHAO, J. *et al.* Chemical structures and biological activities of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* M14808. **Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research**, Nanjing, v. 5, p.177-182, jan. 2013.

ZHONG, H. *et al.* Aggregation of low-concentration dirhamnolipid biosurfactant in electrolyte solution. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 5, n. 108, p. 88578-88582, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5ra16817a>.