

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/05/2018.

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

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO PARA
PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS POR LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa***

ANA MARÍA SALAZAR BRYAM

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

**Rio Claro, SP.
2016**



ANA MARÍA SALAZAR BRYAM

**APROVEITAMENTO DE GLICEROL RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO PARA
PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS POR LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Prof. Dra. Roberta Barros Lovaglio

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

Rio Claro

2016

576 Salazar-Bryam, Ana María
S161a Aproveitamento de glicerol residual como fonte de
carbono para produção de ramnolipídios por linhagens de
Pseudomonas aeruginosa / Ana Maria Salazar-Bryam. - Rio
Claro, 2016
89 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Coorientadora: Roberta Barros Lovaglio

1. Microorganismos. 2. Biossurfactantes. 3. Biodiesel. 4.
Propriedades de solução. 5. Emulsões. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

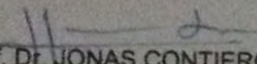
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: APROVEITAMENTO DE GLICEROL RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS POR TRÊS LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa*

AUTORA: ANA MARIA SALAZAR BRYAM

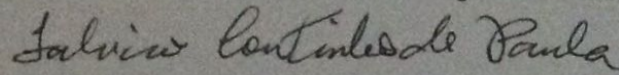
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

CO-ORIENTADORA: ROBERTA BARROS LOVAGLIO

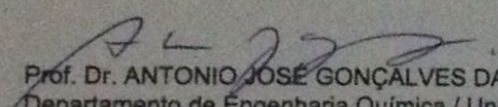
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. FABRICIO COUTINHO DE PAULA

Pós-Doutorando do Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ GONÇALVES DA CRUZ

Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos

Rio Claro, 25 de maio de 2016

**Este trabalho é dedicado aos meus pais:
obrigada mãe e pai pelo apoio
incondicional e exemplo de vida.**

***“-¡Qué gran libro se podría escribir con
lo que se sabe!
- Otro mucho mayor se escribiría con lo
que no se sabe”***

(VERNE, 1874)

AGRADECIMENTOS

“Onde não pudeses amar, não te demores” – Frida Kahlo.

No Brasil, o país que me acolheu, com certeza amei: as pessoas, a cultura, o país. Por isso, preciso agradecer imensamente por ter chegado aqui, por ter conhecido quanto conheci e por ter aprendido quanto aprendi.

Quero agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, pela confiança depositada, desde o primeiro momento, para desenvolver este trabalho. Pelo suporte que tem me proporcionado e pelos ensinamentos brindados.

À minha co-orientadora, Profa. Dr. Roberta Barros Lovaglio, quem desde o começo foi um apoio incondicional. Obrigada pelos conselhos, conversas, correções e pela ajuda brindada em cada momento.

Quero agradecer à agência de fomento CAPES pela concessão da bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Claudio Von Zuben, pela ajuda no desenvolvimento dos testes com mosquitos. Ao grupo de Eletroquímica de Araraquara, em especial à Dra. Bianca Ferreira da Silva, pela ajuda com as análises no HPLC-MS/MS. Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, tanto estudantes como professores e funcionários, obrigada pela ajuda proporcionada em todo momento.

Aos integrantes do LMI, obrigada pela acolhida, os momentos compartilhados e o aprendizado. Especialmente a Grazi, Cinthia e Vini, vocês foram um grande apoio em todos os momentos de *não* desespero.

À minha família Rio Clarence, Yali, Caro, Swanny, Diego E, Diego R, Blanca e os Rubenes, Amilcar, Irene, Fabian, Federico, Jose E. Especialmente a Yadira, Paola, Make e Aleja, pelo apoio incondicional em cada momento.

Ao Jorge, pela cumplicidade e pelo caminhar, por me acompanhar no fim dessa jornada. Obrigada pelos risos e sorrisos que sempre nos acompanham!

Ao Felipe Caetano, por ser irmão e companheiro de muitas jornadas, o nosso aprendizado ainda continua. Obrigada pelas vivências.

Ao Juan David, por ser um grande apoio durante o mestrado, por acreditar em mim mesmo quando, sem ter chegado em Rio Claro, eu não acreditei.

Às duas pessoas que sempre estão me ensinando, meu exemplo de vida e o meu orgulho: Meus pais. Obrigada por tudo o que me ajudam a construir todos os dias e por me apoiar em cada decisão. Obrigada por compartilhar às minhas conquistas, alegrias, preocupações dessa caminhada.

Emfim, a todos aqueles que contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

Visando à otimização da produção de ramnolipídios, o uso de glicerol cru como fonte de carbono surge como uma estratégia tanto para o reduzir custo de produção como para aproveitar este resíduo da indústria do biodiesel. O gênero *Pseudomonas* tem sido um dos mais estudados no campo da produção de ramnolipídios, pois as moléculas produzidas por estes micro-organismos apresentam uma elevada atividade de superfície e o rendimento de produção é alto em relação a outros tensoativos. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI, LBI e LBI 2A1) usando glicerol bruto da indústria do biodiesel como fonte de carbono. Para isto comparou-se a produção de ramnolipídio utilizando três tipos diferentes de glicerol bruto. A influência de uma concentração menor (50g/L) foi avaliada utilizando as linhagens *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, sendo que diferentes concentrações também foram avaliadas para a linhagem *P. aeruginosa* LBI. Também se comparou a síntese de ramnolipídio utilizando glicerol bruto tratado e glicerol bruto na concentração que favoreceu a maior produção por parte de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Além disso, a caracterização dos homólogos produzidos por *P. aeruginosa* LBI 2A1, a aplicação destes biossurfactantes na síntese de nanopartículas de prata e o controle de vetores de doenças tropicais foram analisados. O glicerol bruto é um substrato que pode ser utilizado como fonte de carbono para produção de ramnolipídios e sua concentração influencia no metabolismo das linhagens de *P. aeruginosa* estudadas. A linhagem que mostrou maior potencial de produção de ramnolipídios foi *P. aeruginosa* LBI 2A1, alcançando uma concentração de 2,55 g/L em 72 h com 50 g/L de glicerol bruto tratado, provavelmente devido à mutação randômica realizada em um trabalho anterior. De acordo com os resultados obtidos, fica evidente que o excesso de sais e outros metabólitos interferentes têm uma influência negativa no metabolismo de *P. aeruginosa* LBI, pois a síntese de ramnolipídio foi superior utilizando glicerol bruto tratado como fonte de carbono (1,3 g/L de ramnolipídios) em comparação com o glicerol bruto (0,003 g/L de ramnolipídios). As propriedades físico-químicas do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI 2A1, se veem afetadas por mudanças de pH e adição de álcool n-propil, a composição dos homólogos é influenciada pela fonte de carbono utilizada. Os ramnolipídios favorecem a síntese de nanopartículas de prata e definem a forma destas. Finalmente, estes biotensoativos, apresentam atividade larvicida, repelente e inseticida e em emulsão com óleos essenciais têm uma ação sinérgica que pode ser aplicada em formulações novas para o controle de vetores de doenças tropicais.

Palavras chave: Ramnolipídios, Glicerol, Biodiesel, *Pseudomonas aeruginosa*, propriedades de solução, emulsões.

ABSTRACT

Aiming at optimization of rhamnolipid production, the use of crude glycerol as a carbon source emerges as a strategy both for reducing production costs and make use of this residue of the biodiesel industry. The genera *Pseudomonas* is one of the most studied on the field of rhamnolipids production, because the molecules produced by these kind of microorganisms have a higher superficial activity and the production yield is higher when compared with other tenso-actives. Therefore, the principal aim of this study was to compare the rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* strains (PAOI, LBI and LBI 2A1) using crude glycerol from biodiesel industry as a carbon source. Was compared the rhamnolipids synthesis using three different types of crude glycerol (70 g/L). The influence of a lower concentration (50 g/L) was tested using the strains *P. aeruginosa* LBI and *P. aeruginosa* LBI 2A1, whereas different concentrations of crude glycerol were evaluated for the *P. aeruginosa* LBI strain. It was also compared the rhamnolipids synthesis using a treated crude glycerol and a raw crude glycerol, using the concentration that favored the higher production by *P. aeruginosa* LBI. In addition, were characterized the homologs produced by *P. aeruginosa* LBI 2A1, the biotechnological application of these biosurfactants for silver nanoparticles synthesis and control of vectors of tropical diseases, were tested. Residual glycerol is a substrate that can be used as a carbon source for rhamnolipid production, and its concentration influences the metabolism of the *P. aeruginosa* strains used. *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 was the strain that showed a higher potential for rhamnolipids production (2,55 g/L) using 50 g/L of crude treated glycerol, probably due to the randomic mutation which has been performed in a previous study. According to the results obtained in this work, it becomes evident that the excess of salts and other interfering metabolites have a negative influence on *P. aeruginosa* LBI metabolism for rhamnolipids production, as was obtained a lower production using raw crude glycerol (0,003 g/L of rhamnolipids) than using treated glycerol (1,33 g/L). The physicochemical properties of the biosurfactant produced by *P. aeruginosa* LBI 2A1 are affected by alterations on the pH and the addition of n-propyl alcohol, the composition of the homologs can be influenced by the carbon source used. Rhamnolipids favor silver nanoparticles synthesis, acting as stabilizing agents and define their shapes and size. Finally, these tenso-actives, have larvicidal, mosquitocidal and repellent activities, and when mixed with clove oil they present a synergistic action which can be used in new formulations for the control of vectors of tropical diseases.

Key words: Rhamnolipids, Glycerol, Biodiesel, *Pseudomonas aeruginosa*, Solution properties, Emulsions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura geral dos ramnolipídios. Modificado de ABDEL-MAWGOUD <i>et al.</i> , 2010.....	13
Figura 1.2. Recopilação histórica dos genes envolvidos na produção de ramnolipídios. (LOVAGLIO <i>et al.</i> , 2015).....	15
Figura 1.3. Visão geral das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de ramnolipídios tendo como precursores fontes hidrofílicas como glicerol e glicose e hidrofóbicas como óleo vegetal (LOVAGLIO <i>et al.</i> , 2015).	17
Figura 3.1. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando Glicerol da Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA (G1) e Glicerol da BIOCAPITAL –Charquedá, SP (G2). a) Crescimento celular em G1; b) Crescimento celular em G2.....	29
Figura 3.2. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando Glicerol da Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA (G1) e Glicerol da BIOCAPITAL –Charquedá, SP (G2). a) Produção de ramnolipídio em G1; b) Produção de ramnolipídio em G2.....	30
Figura 3.3. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando Glicerol da Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA (G1) e Glicerol da BIOCAPITAL –Charquedá, SP (G2). a) Consumo da fonte de carbono em G1; b) Consumo da fonte de carbono em G2.....	31
Figura 3.4. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI e <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando 50g/L de G2. a) Crescimento celular; b) Produção de ramnolipídio; c) Consumo da fonte de carbono.....	33
Figura 3.5. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando diferentes concentrações de glicerol. a) Crescimento celular; b) Produção de ramnolipídio; c) Consumo da fonte de carbono.	35
Figura 3.6. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI utilizando Glicerol Purificado Sem Sal (G2) e Glicerol Bruto (G3). a) Crescimento celular; b) Produção de ramnolipídio; c) Consumo da fonte de carbono.	38
Figura 4.1 Curva tensão superficial (mN/m) versus concentração de ramnolipídios (mg/L).....	44
Figura 4.2 Medição da turbidez (A_{600nm}) de diferentes concentrações de ramnolipídios (1 – 1000 mg/L).....	45
Figura 4.3 Micrografias de agregados formados em diferentes concentrações de ramnolipídios. a) 100mg/L; b) 1000 mg/L.	45
Figura 4.4 Influência do pH na variação da turbidez e da tensão superficial.....	46
Figura 4.5. Efeito da concentração de álcool n-propil na tensão superficial (mN/m) de soluções de ramnolipídios.....	47
Figura 4.6 Atividade de Emulsificação (E_{24}) de uma solução de ramnolipídios (1000 mg/L) com respeito á variação de pH e adição de álcool n-propil. a) Óleo mineral; b) Óleo de cravo; c) Óleo de citronela.....	52
Figura 4.7 Variação da turbidez com diferentes concentrações de álcool n-propil em função da concentração de ramnolipídios.....	49
Figura 4.8 Micrografias de agregados formados em diferentes concentrações de ramnolipídios e n-propil, sem ajuste de pH a) 100 mg/L de ramnolipídios – 10% n-propil (pH $5,17 \pm 0,02$); b) 1000 mg/L de ramnolipídios – 10% n-propil (pH $7,35 \pm 0,01$); c) 100 mg/L de ramnolipídios – 70% n-propil (pH $6,95 \pm 0,01$); d) 1000 mg/L de ramnolipídios – 70% n-propil (pH $7,01 \pm 0,01$).....	50
Figura 4.9 Efeito da variação de pH na turbidez das soluções de ramnolipídios (1000 mg/L) com diferentes concentrações de álcool n-propil (10% -70%).	51
Figura 4.10 Comparação da Tensão superficial antes e depois do processo de auto-clavado de uma solução de ramnolipídio extraído (1000 mg/L) e do caldo livre de células com ramnolipídio presente (2500 mg/L) ...	53
Figura 4.11 – ESI (-) – MS/MS dos íons a) 475, b) 503; c) 531; d) 621; e) 649; f) 677.....	56
Figura 5.1 Micrografia das a) micelas reversas contendo as nanopartículas b) nanopartículas extraídas com etanol e resuspendidas em água.	60
Figura 5.2 Análises de EDS a) micelas reversas contendo as nanopartículas b) nanopartículas extraídas com etanol e resuspendidas em água.	61
Figura 5.3 Frequência (%) do tamanho das nanopartículas (nm).....	62
Figura 6.1 Microscopia ótica de adultos de mosquito após o bio-ensaio de contato direto.	69
Figura 6.2 – Porcentagem de mosquitos pousados no camundongo que fizeram hematofagia utilizando ramnolipídios e óleo de cravo. a) <i>Aedes aegypti</i> ; b) <i>Culex quinquefasciatus</i>	71
Figura 6.3 – Porcentagem de mosquitos pousados no camundongo que fizeram hematofagia utilizando emulsões ramnolipídio: óleo de cravo. LI: Limite inferior; LS: Limite superior; LC ₅₀ : Concentração letal 50. a) <i>Aedes aegypti</i> ; b) <i>Culex quinquefasciatus</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.2 – Fontes de carbono utilizadas no projeto.....	25
Tabela 3.3 - Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando G1 e G2 em termos de Relação (g/g) biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$). ..	32
Tabela 3.4. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI e <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1, utilizando 50g/L de G2 em termos de Rendimento (Y). Relação (g/g) biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$)	34
Tabela 3.5 - Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando diferentes concentrações de G2, em termos de Rendimento (Y). Relação (g/g) biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$).....	37
Tabela 3.6 - Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando G2 e G3, em termos de Rendimento (Y). Relação (g/g) biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$).....	38
Tabela 4.1 - Variação pH soluções de ramnolipídios com respeito à concentração de n-propil	48
Tabela 4.2 – Composição elementar e abundância relativa dos homólogos de ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 determinado por ESI (-) - MS	54
Tabela 6.1 – Descrição dos insetos utilizados para os bioensaios	65
Tabela 6.2 – Toxicidade do ramnolipídio e óleo de cravo para larvas de mosquito utilizando o bio-ensaio de contato direto.....	67
Tabela 6.3 – Toxicidade da emulsão ramnolipídio-óleo para larvas de mosquito utilizando o bio-ensaio de contato direto após 24 h (% de mortalidade).....	68
Tabela 6.5 – Toxicidade do ramnolipídio e óleo de cravo para mosquitos adultos utilizando o bio-ensaio de contato direto.....	69
Tabela 6.6 – Toxicidade da emulsão ramnolipídio-óleo para mosquitos adultos utilizando o bio-ensaio de contato direto após 24 h (% de mortalidade).....	70

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. Biossurfactantes	12
1.2. Ramnolipídios.....	12
1.3. Função fisiológica e biossíntese dos ramnolipídios em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.4. Produção de ramnolipídios a partir de resíduos industriais.....	17
1.5. Aplicações dos ramnolipídios.....	19
1.5.1. Indústria Petrolífera	19
1.5.2. Biorremediação e biodegradação de poluentes.....	19
1.5.3. Indústria farmacêutica, cosmética e biomedicina	20
1.5.4. Agroindústria e Controle biológico	21
1.5.5. Indústria de alimentos e outras indústrias.....	21
1.5.6. Nanotecnologia	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Gerais	23
2.2. Específicos.....	23
3. CAPÍTULO I.....	24
FERMENTAÇÕES EM FRASCO - COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	
3.1. INTRODUÇÃO.....	24
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.2.1. Micro-organismos.....	25
3.2.2. Meios de cultura.....	25
3.2.3. Condições de cultivo.....	26
3.2.4. Métodos Analíticos	27
3.2.5. Avaliação da produção de Ramnolipídios	27
3.2.6. Determinação da biomassa microbiana	28
3.2.7. Determinação do consumo da fonte de carbono	28
3.2.8. Análise estatística.....	28
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.3.1. Comparação das fermentações utilizando glicerol bruto proveniente de duas diferentes indústrias (Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA e BIOCAPITAL – Charqueada, SP).....	29
3.3.2. Comparação das fermentações com <i>P. aeruginosa</i> LBI e <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 com 50g/L de glicerol	32
3.3.3. Produção de ramnolipídio por <i>P. aeruginosa</i> LBI com diferentes concentrações de glicerol.....	34
3.3.4. Comparação da produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> LBI com dois tipos de glicerol bruto: glicerol purificado sem sal (G2) e glicerol bruto (G3).	37

4. CAPÍTULO II	40
PROPRIEDADES DE SOLUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS A PARTIR DE GLICEROL BRUTO	
4.1. INTRODUÇÃO.....	40
4.2. MATERIAL E METODOS	41
4.2.1. Extração de Ramnolipídios.....	41
4.2.2. Análise da estabilidade do biossurfactante e propriedades de solução	41
4.2.3. Atividade de emulsificação (E ₂₄).....	42
4.2.4. Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios por Espectrometria de Massas	42
4.2.5. Métodos Analíticos	43
4.2.6. Análise estatística.....	43
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.3.1. Análise da estabilidade do biossurfactante e propriedades de solução	43
4.3.2. Caracterização dos homólogos de ramnolipídios produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	53
5. CAPÍTULO III.....	57
RAMNOLIPÍDIOS COMO AGENTES ESTABILIZANTES NA FORMAÇÃO DE NANOPARTICULAS DE PRATA	
5.1. INTRODUÇÃO.....	57
5.2. MATERIAL E METODOS	58
5.2.1. Extração de Ramnolipídios.....	58
5.2.2. Síntese de Nanopartículas.....	58
5.2.3. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução	59
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6. CAPÍTULO IV	63
CONTROLE DE VETORES TRANSMISORES DE DOENÇAS TROPICAIS: RAMNOLIPÍDIOS E OLEOS ESSENCIAIS	
6.1. INTRODUÇÃO.....	63
6.2. MATERIAL E METODOS	64
6.2.1. Extração de Ramnolipídios.....	64
6.2.2. Coleção e manutenção dos insetos.....	64
6.2.3. Óleo essencial	65
6.2.4. Bio-ensaios da ação larvicida.....	65
6.2.5. Bio-ensaios da ação inseticida	66
6.2.6. Bio-ensaios da ação repelente.....	66
6.2.7. Análise estatística.....	66
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.3.1. Bio-ensaios da ação larvicida.....	67
6.3.2. Bio-ensaios da ação inseticida	68
6.3.3. Bio-ensaios da ação repelente.....	70
7. CONCLUSÕES.....	73
8. REFERENCIAS.....	74

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Biossurfactantes

Os biossurfactantes são um grupo de compostos produzidos por uma grande variedade de micro-organismos. São moléculas anfipáticas com propriedades tenso-ativas, cujas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas permitem a interação das interfaces entre uma parte aquosa e outra não-aquosa numa solução ou sistema complexo (MARCHANT & BANAT, 2012).

Estas moléculas atuam como emulsionantes ou como redutoras da tensão superficial em interfaces com diferentes graus de polaridade (MARCHANT & BANAT, 2012). Normalmente, a parte hidrofóbica dos biossurfactantes contem uma cadeia longa de ácidos graxos, hidróxi-ácidos ou α -alquilo- β -hidróxi-ácidos, enquanto que a parte hidrofílica podem ser carboidratos, ácidos carboxílicos, amino ácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos ou álcoois (PORNUNTHORNTAWEE *et al*, 2010).

Um aspeto importante dos biossurfactantes é a CMC (concentração crítica micelar), que é a concentração onde se inicia a formação de micelas, que tem sido reportada entre 5-200 mg/L e a massa molar pode variar entre 500-1500 Da (PORNUNTHORNTAWEE *et al*, 2010). Devido à grande variedade estrutural, estas moléculas podem ser usadas em diferentes ramos da indústria.

Tem sido relatado que os surfactantes biologicamente produzidos geram menos impacto ambiental do que os de origem química, pois são biodegradáveis e apresentam menor toxicidade. Além disso, os biossurfactantes apresentam, excelentes propriedades físico-químicas, como a efetividade numa ampla variação de pH e temperatura (HENKEL *et al.*, 2012; LOVAGLIO *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2014; OLVEIRA *et al.*, 2008).

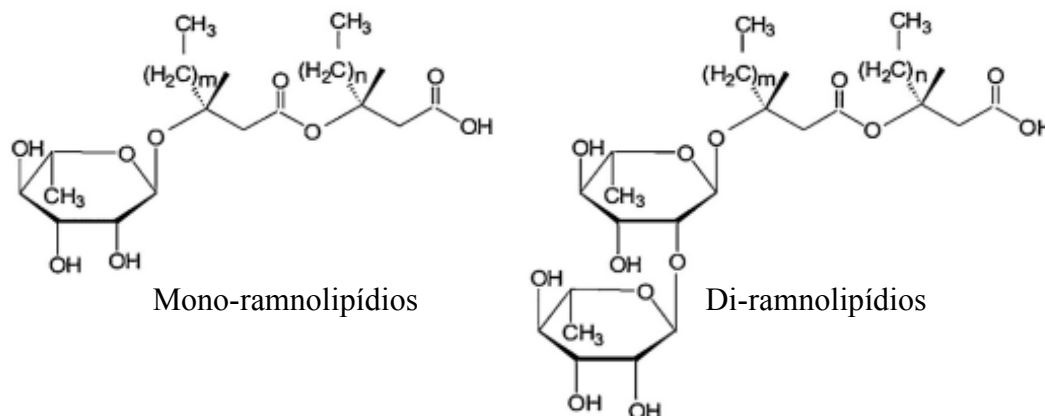
Dentre os principais tipos de biossurfactantes estão os lipopeptídios e lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e glicolipídios (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002). Os ramnolipídios são os mais importantes do grupo dos glicolipídios, devido às suas propriedades tenso-ativas; este grupo de biossurfactantes é produzido principalmente por bactérias do género *Pseudomonas* (HENKEL *et al.*, 2012).

1.2. Ramnolipídios

Estruturalmente, os ramnolipídios, são constituídos por uma ou duas moléculas de α -L-ramnose unidas por um ou dois β -hidróxi ácidos (SOBERÓN-CHAVEZ & MAIER, 2011). De acordo com o número de moléculas de ramnose pode ser um mono ou di-ramnolipídio (Fig. 1.1) (MARCHANT & BANAT, 2012), as espécies mais abundantes de ramnolipídios são α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-Rha-

C10-C10), α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoato (Rha-Rha-C10), junto com os homólogos dos mono-ramnolipídios RhaC10-C10 e Rha-C10 (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010).

Figura 1.1. Estrutura geral dos ramnolipídios. Modificado de ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010



Existem métodos analíticos para a caracterização da estrutura dos ramnolipídios, como a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAF) e a Cromatografia líquida/Espectrofotometria de massas (CL/EM) equipada com um detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD), que são técnicas eficientes na determinação de mais de 30 homólogos de ramnolipídios, que diferem na composição da cadeia de ácidos graxos e nas frações de ramnose (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2010).

Segundo Soberón-Chávez *et al.* (2005), os ramnolipídios possuem diferentes funções fisiológicas em relação aos micro-organismos produtores. Eles podem auxiliar na captação de moléculas hidrofóbicas, conferir vantagem adaptativa em relação a outros micro-organismos em ambientes naturais, devido a sua atividade antimicrobiana, além de facilitar a aderência em superfícies hidrofóbicas durante a formação de bio-filmes.

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa*, são os biossurfactantes mais estudados, pois apresentam uma atividade de superfície elevada e o rendimento de produção é alto em relação ao tempo de cultivo (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011). No entanto, existem outras espécies do gênero *Pseudomonas* que têm sido reportadas como produtoras de ramnolipídios dentre as quais se encontram *Pseudomonas putida*, *P. chloraphis*, *P. fluorescens* (TORIBIO *et al.*, 2010).

Outro gênero que tem várias representantes produtoras de ramnolipídios é Burkholderia, como *B. thailandensis*, *B. plantarii*, *B. pseudomallei* e *B. mallei*. No entanto este gênero tem sido mais estudado em relação á produção de ramnolipídios com vistas ao

processo de infecção e não pelo interesse biotecnológico (TORIBIO *et al.*, 2010). Também foi relatado que algumas bactérias de outros gêneros como *Pseudoxanthomonas sp.* PNK-04, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter hormaechei*, *Pantoea stewartii* e *E. absuriae* são espécies pouco comuns produtoras de ramnolipídios, e têm a particularidade de terem sido isoladas de lugares com derramamento de petróleo (TORIBIO *et al.*, 2010).

1.3. Função fisiológica e biossíntese dos ramnolipídios em *Pseudomonas aeruginosa*

Não há estudos conclusivos sobre a função fisiológica específica dos ramnolipídios no metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa*. Devido as propriedades emulsionantes e de natureza anfipática, atribui-se a função de promoção da captação de substratos pouco solúveis como os hidrocarbonetos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Na revisão da literatura feita por Chrzanowski *et al.* (2012) é relatado que os ramnolipídios ajudam a incrementar o contato da célula com a superfície, aumentando a eficiência de degradação do substrato.

Ao serem liberados ao espaço extracelular, os ramnolipídios ajudam a controlar a hidrofobicidade da célula para a fixação ou desprendimento da célula em diferentes substratos, assim como o aumento e a modulação da motilidade da bactéria (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010; BRINKMAN *et al.*, 2001; DÉZIEL *et al.*, 2003). Foi relatado por Caiazza *et al.* (2005), que o deslocamento das bactérias da espécie *P. aeruginosa* esta modulado pelos ramnolipídios produzidos pela célula, quando mutante para o gene *rhlB* e *rhlC* apresenta *tendrils* - um sistema de movimentação coordenada que é capaz de perceber e responder a outros grupos de células- reduzidos e com padrões irregulares.

Além de estarem relacionados à captação de fonte de carbono hidrofóbicas e motilidade de *Pseudomonas aeruginosa*, os ramnolipídios têm sido reportados como auxiliares na formação de biofilmes e no *Quorum Sensing* (QS) destas bactérias (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Estes dois processos são afetados pela modulação da motilidade, a produção de ramnolipídios e de lecitinas (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). A produção de ramnolipídios está ligada ao controle da translocação da célula e ao aumento do contato celular com a superfície e com outras células, o que é controlado pelo sistema *rhl* (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). Como relatado por Pamp & Tolker-Nielsen (2007), os ramnolipídios estão envolvidos na formação de microcolônias e na formação de estruturas tridimensionais que permitem a formação dos biofilmes.

O QS é caracterizado pela produção de autoindutores que se acumulam ao aumentar a densidade populacional o que promove a interação celular e a ativação dos reguladores transcricionais (WILLIAMS, 2007). No sistema *rhl* de QS, o *rhlI* é responsável pela síntese do autoindutor, N-butanol-L-homoserina lactona (C₄HSL) que se une à proteína RhlR e a

Lovaglio (2011) reportou que os mutantes para *rhlG* apresentaram uma redução na produção de ramnolipídios utilizando óleo de girassol como fonte de carbono, o que deixa uma questão sobre o envolvimento deste gene na biossíntese da parte hidrofóbica do biossurfactante.

Após o primeiro modelo genético descrito para a produção de ramnolipídios, foi reportado o gene *rhlC* que codifica para a proteína RhlC cuja função é a transferência de L-ramnose para cadeias de polímeros (RAHIM *et al.*, 2001). Este gene, localizado em um operon diferente ao de *rhlAB*. Porém os dois operons estão conectado e requerem o fator σ^{54} , que codifica para a ramnosiltransferase envolvida na produção dos di-ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 1.2). Os mutantes para este gene, só tem a capacidade de produzir ramnolipídios com uma molécula de ramnose (RAHIM *et al.*, 2001).

A biossíntese de ramnolipídios envolve tanto a síntese da porção hidrofóbica quanto da hidrofílica da molécula. Segundo Syldatk & Wagner (1987) existem quatro possibilidades para a biossíntese do biossurfactante ocorrer:

1. A síntese de *novo* do carboidrato e do lipídeo
2. Síntese de *novo* da porção do carboidrato e síntese da porção lipídica partindo do substrato
3. Síntese de *novo* da porção lipídica e síntese da porção do carboidrato partindo do substrato
4. Síntese do carboidrato e do lipídeo por vias independentes partindo do substrato utilizado

A síntese de *novo* da porção lipídica ocorre pela via de síntese de ácidos graxos tipo II (FAS II) (Fig. 1.3), *Pseudomonas aeruginosa* tem a mesma maquinaria enzimática que *E. coli* para realizar este processo (HOANG & SCHWEIZER, 1999). Quando não ocorre a síntese de novo, o processo para metabolizar o substrato e fazer a conversão em lipídeos é a β -oxidação, que está relacionada a substratos hidrofóbicos e depende do número de carbonos do substrato (Fig. 1.3) (HORI *et al.*, 2011).

Enquanto na formação da porção hidrofílica, o precursor, dTDP-L-ramnose pode vir da via de Entner-Doudoroff (partindo de um substrato hidrofílico) ou da gliconeogênese (síntese de *novo*) (Fig 1.3).

A enzima RhlA catalisa a síntese dos dímeros de ácidos graxos e HAA, transformando as moléculas de β -hidroxiacil-ACP em HAA. RhlB e RhlC catalisam a transferência de L-ramnose a HAA ou para os mono-ramnolipídios já existentes, respetivamente (Fig. 1.3).

Vários tipos de fontes de carbono para produção de ramnolipídios, tanto solúveis como insolúveis em água têm sido utilizadas. No entanto, as fontes de carbono hidrofóbicas, como óleos vegetais, têm sido mais efetivas na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*.

A produção de biodiesel está em ascensão, pois é um combustível biodegradável, renovável e com baixa toxicidade. Anualmente, são produzidos 11,2 milhões de toneladas de biodiesel por ano na Europa. Em 2010, nos Estados Unidos, a produção foi de 6,96 milhões de toneladas de biodiesel, já na Ásia e América Latina produz-se aproximadamente 130.000 toneladas por ano e espera-se que este mercado continue crescendo (KHANNA *et al.*, 2012).

No Brasil, a adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo (B2), é obrigatória desde 2008 e esta porcentagem aumentou para 5% (B5) em 2013, gerando grande quantidade de glicerol devido ao aumento da produção do biocombustível. Na União Europeia, companhias de produção de biodiesel enfrentam problemas em relação ao excesso de glicerol produzido, já que, sua disposição é dispendiosa economicamente e o seu valor de mercado é baixo. Uma solução a este entrave é a utilização do glicerol como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biossurfactantes (SILVA *et al.*, 2009).

Como descreve Meher *et al.* (2006), o biodiesel resulta da transesterificação dos triglicerídeos com um álcool monovalente (por exemplo, metanol ou etanol) em ésteres de ácido graxos. O glicerol como resíduo industrial, é um produto secundário da reação; com a produção de 10kg de biodiesel é obtido cerca de 1 kg de glicerol (AMARAL *et al.*, 2009).

Estequiométricamente, o glicerol corresponde à 10% da produção. No entanto, no processo da produção do bio-etanol a glicerina crua, tem um grau de pureza de 55-90%, o restante são produtos secundários, como triglicerídeos e metanol não convertido, entre outros contaminantes (AMARAL *et al.*, 2009).

O aproveitamento efetivo e econômico do glicerol que resulta da indústria do biodiesel é um enorme desafio. Devido à sua condição de resíduo industrial, o glicerol apresenta muitos contaminantes, os quais impedem seu emprego na indústria química ou farmacêutica (AMARAL *et al.*, 2009; KHANNA *et al.*, 2012).

A síntese de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando glicerol foi descrita por Zhang *et al.* (2005) que obtiveram 15,4 g/L do tensoativo, já Rahman *et al.* (2002), relatam uma produção de 1,77 g/L, enquanto Silva *et al.* (2010) alcançaram 3,5 g/L de ramnolipídios, esses resultados confirmam o potencial da utilização do glicerol como fonte carbono para a produção de biossurfactante.

No entanto, como a produção de ramnolipídios a partir dessa fonte de carbono, varia entre 1,0 e 8,5 g/L e a o coeficiente de bioconversão é relativamente baixa ($Y_{P/S}=0,1-0,15$)

quando comparada com a de outros substratos (HENKEL *et al.*, 2012), ainda existe o desafio de otimizar o processo com o intuito de aumentar a produção de ramnolipídios.

1.5. Aplicações dos ramnolipídios

As aplicações industriais e biotecnológicas dos ramnolipídios são bastante diversas. Por exemplo, têm sido usados para a síntese e estabilização de nanopartículas, preparação de emulsões, como agente anti-aglomerante e dispersante. Além disso, os ramnolipídios, têm propriedades detergentes e são também, uma fonte de ramnose (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011).

Os campos de utilização dos biossurfactantes incluem a agricultura, indústria farmacêutica, petrolífera, de alimentos e bebidas, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e têxtil (FIECHTER, 1992).

1.5.1. Indústria Petrolífera

São imensamente aplicados na indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo também fazem parte dessa gama de aplicações.

1.5.2. Biorremediação e biodegradação de poluentes

O biossurfactante pode ser adicionado ao local onde há contaminação por petróleo e derivados ou ainda o micro-organismo produtor inoculado na área impactada. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de metabolizar querosene, óleo diesel e petróleo bruto como única fonte de carbono. A mais alta concentração de ramnolipídio, 9,9 g/L, foi alcançada com 30% de óleo *Diesel* (PIRÔLLO *et al.*, 2008).

Vários estudos têm avaliado a influência dos ramnolipídios na biodegradação de n-hidrocarbonetos, tanto alifáticos quanto aromáticos. Igualmente já foi relatada a degradação de hexadecano, octadecano, n-parafinas e penantereno por parte de *Pseudomonas aeruginosa* em presença de ramnolipídios (SHREVE *et al.*, 1995; ZHANG & MILLER, 1994; ZHANG & MILLER, 1995).

Além da remoção de hidrocarbonetos, os ramnolipídios são efetivos também na remoção de metais ou mistura de ambos de locais contaminados (MULLIGAN, 2005). De acordo com Wei *et al.*, (2005) os biossurfactantes podem atuar na recuperação de adsorventes de óleos usados, dessa maneira este material pode ser reutilizado na recuperação de óleo ou em outras aplicações, como a engenharia civil.

De acordo com Wang & Mulligan, (2009), biossurfactantes podem ser úteis na remoção de arsênico de rejeitos da mineração. Outra aplicação é a remoção de cromo (VI) da água e do solo (Ara & Mulligan, 2008). Esses autores relataram que houve retirada de 100%

deste metal da água quando se estabeleceu condições físico-químicas ótimas, como: pH 6,0; solução com 2% de ramnolipídios e temperatura de 25°C.

Um estudo realizado por Qiuzhuo *et al.*, (2008) comprovou a eficiência dos ramnolipídios na decomposição de palha de arroz, aumentando em 22,3% a produção de açúcares redutores quando se adicionou biossurfactante purificado ao meio de sacarificação hidrolítica. Foi avaliado também o efeito da inoculação de *P. aeruginosa* para produção *in situ* do tensoativo, e a quantidade de açúcares redutores produzidos foi 12,2% maior quando comparado ao controle (sem adição da bactéria), lembrando que este segundo método omite a etapa de purificação, reduzindo os custos do processo.

1.5.3. Indústria farmacêutica, cosmética e biomedicina

Os biotensoativos possuem propriedade antiadesiva, que impede a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções hospitalares sem a utilização de drogas sintéticas (SINGH & CAMEOTRA, 2004). Os ramnolipídios podem atuar ainda como antimicrobianos, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral (ABALOS *et al.*, 2001).

Thanomsub *et al.* (2007), relataram a inibição do crescimento de células cancerígenas humanas pelos homólogos de ramnolipídios, Rha₂C₁₀C₁₀ e Rha₂C₁₀C₁₂, produzidos por *P. aeruginosa* B189. Ainda dentro das aplicações na indústria farmacêutica há relatos de que a incorporação de 0,1% de di-ramnolipídios em pomadas aumentou a eficiência do tratamento de úlceras de pacientes decúbitos (PILJAC *et al.*, 2008).

As formulações como repelentes, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes precisam de substâncias emulsionantes que apresentem uma alta atividade superficial, daí surge o uso de ramnolipídios neste tipo de produtos (LOURITH & KANLAYAVATTANAKUL, 2009; MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; PIJAC & PIJAC, 1995).

O controle de vetores transmissores de doenças é uma área que tem ganho força nos últimos anos, Da Silva *et al.*, (2015b) avaliaram a ação larvicida, inseticida e repelente dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando concentrações do biossurfactante entre 800 – 1000 mg/L, as larvas morreram depois de 18h e 100% dos adultos morreram quando foi utilizada a solução de 1000 mg/L.

Wang *et al.* (2005) verificaram que a mistura de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* tem efeito potencial algicida, inibindo o crescimento de *Heterosigma akashiwo* e quando em altas concentrações apresentam forte atividade lítica.

1.5.4. Agroindústria e Controle biológico

Na agroindústria, os ramnolipídios atuam na proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinérea*, através da inibição da germinação de esporos e crescimento do micélio fungico (VARNIER *et al.*, 2009). Soluções contendo 0,01% de ramnolipídios estimularam o sistema imune de plantas contra fungos patogênicos (NITSCHKE *et al.*, 2011).

Os ramnolipídios também apresentaram a habilidade de controlar patógenos zoospóricos como *Phytophthora cryptogea* e *Pythium spp.*, em concentrações entre 5 e 30 mg/L afetaram a motilidade dos patógenos e causaram a lise da população.

Da Silva *et al.* (2015a) estudaram a influencia dos ramnolipídios na germinação e desenvolvimento de sementes de alface, milho, soja e girassol. As sementes alface apresentaram aumento de 75% na taxa de germinação. Para as sementes de milho a concentração que estimulou o desenvolvimento das sementes foi 0,25 g/L.

1.5.5. Indústria de alimentos e outras indústrias

Na revisão da literatura feita por Nitschke *et al.* (2011) descrevem aplicações de ramnolipídios em diferentes áreas da indústria alimentícia, onde podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor, na conservação de produtos da panificação, e ainda em conjunto com nisina e natamicina inibem o crescimento microbiano em leite de soja, molhos de salada e queijo cottage. Além disso, os autores descrevem o retardo na formação de biofilme em superfícies tratadas com ramnolipídios.

Os ramnolipídios servem como uma fonte de L-ramnose, que é utilizada na indústria de alimentos para ressaltar o sabor do alimento. Este açúcar é um açúcar difícil de se conseguir na natureza, no entanto os ramnolipídios hidrolisados são uma boa fonte do aditivo (VAN HAESSENDONCK & VANZEVEREN, 2004). Além de funcionarem como aditivos, os ramnolipídios permitem acondicionar superfícies para evitar colonização bacteriana e contaminação cruzada em processos de produção de alimentos, além disso têm sido utilizados como inibidores de corrosão em superfícies (101)

Recentemente foi descrito por Zhang e Ju (2011) a utilização de ramnolipídios para separação de β -glicosidase de uma mistura de enzimas através do fracionamento de espuma. Os ramnolipídios foram utilizados devido a sua propriedade espumante e pela presença de di-ramnose em alguns homólogos, a qual atua como um substrato análogo para a β -glicosidase.

1.5.6. Nanotecnologia

O interesse na síntese biológica de nanopartículas tem aumentado devido à sua excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade. Os ramnolipídios estão sendo empregados na formação e estabilização de nanopartículas de óxido de níquel, zircônia e prata (MULLIGAN, 2009; PALANISAMY; RAICHUR, 2009; KUMAR *et al.*, 2010). As

nanopartículas de ramnolipídios e prata exibiram atividade antibiótica contra bactérias Gram positivos/ negativos e leveduras como *Candida albicans*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (KUMAR *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÕES

- O glicerol residual é um substrato que pode ser utilizado como fonte de carbono para produção de ramnolipídios e a concentração em que é utilizado influencia no metabolismo das três linhagens de *P. aeruginosa* estudadas.
- A linhagem que apresentou uma melhor produção foi *P. aeruginosa* LBI 2A1 quando utilizados 50g/L de glicerol bruto, provavelmente por ser uma linhagem mutante apresenta adaptações metabólicas que potencializam a produção, entretanto é importante observar a concentração de glicerol utilizada, já que em altas concentrações a síntese foi menor, em relação às outras linhagens.
- É evidente que o glicerol bruto tratado é melhor substrato do que o glicerol bruto, pois neste ultimo, é provável, que existam concentrações de impurezas ainda demasiado altas que inibem o metabolismo de *P. aeruginosa* LBI.
- O ajuste de pH afeta as propriedades de agregação das moléculas de ramnolipídios, dependendo do pH utilizado a estrutura obtida varia.
- A adição de n-propil nas soluções de ramnolipídios afeta a agregação destas moléculas; baixas concentrações de n-propil funcionam como co-surfactante, mas altas concentrações funcionam como solventes das estruturas formadas pelos ramnolipídios.
- A estabilidade do ramnolipídio manteve-se apesar de ser submetido a altas temperaturas (121 °C), o que indica que este biosurfactante pode ter aplicabilidade em processos que requerem este tipo de condições.
- O tipo de fonte de carbono pode influenciar na composição dos homólogos.
- A formação de micelas reversas favoreceu a síntese de nanopartículas de prata, o tamanho dos agregados determinou o tamanho das nanopartículas que tiveram um tamanho uniforme.
- Visando aplicabilidade, os ramnolipídios estudados apresentam ação larvicida, repelente e inseticida contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.
- O uso de ramnolipídios em emulsão com óleo essencial de cravo tem uma ação sinérgica entre as soluções aumentando a possibilidade de controle de vectores transmissores de doenças tropicais.

8. REFERENCIAS

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

ABBOT, W. S. **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** J. Econ. Entomol., v. 18, p. 265-267, 1925.

ABDEL-MAWGOUD, M. A.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M. M.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. Biosurfactants.** Ed: Gloria Soberón-Chávez, Microbiology Monographs, Springer: Berlin, p. 13-44, 2011.

ABDEL-MAWGOUD, M. A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids. Diversity of structures, microbial origins and roles.** Applied Environmental Microbiology. v. 86, p. 1323-1326, 2010.

ABDEL-MAWGOUD, M. A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. **A Stereospecific Pathway Diverts β -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants.** Chemistry & Biology, v. 21, p. 156 -164, 2014

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. **Glycerol valorization: New biotechnological routes.** Food and bioproducts processing, v. 87, p. 179-186, 2009

ARA, I.; MULLIGAN, C. N. **Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid.** 61. St Canadian Geotechnical Conference, Edmonton, Sept. 20-24, 2008. <http://spectrum.library.concordia.ca/975553/1/MR34614.pdf>

ASHBY, R.; SOLAIMAN, D.; STRAHAN, G. **Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 88, p. 949-959, 2011.

BAZIRE, A.; DHEILLY, A.; DIAB, F.; MORIN, D.; JEBBAR, M.; HARAS, D.; DUFOUR, A. **Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*.** FEMS Microbiology Letters, v. 253, p. 125–131, 2005.

BRINKMAN, F.S.L.; MACFARLANE, E.L.A.; WARRENER, P.; HANCOCK, R.E.W. **Evolutionary Relationships among Virulence-Associated Histidine Kinases.** Infect. Immun., v. 69, p. 5207-5211, 2001.

CAIAZZA, N.C.; SHANKS, R.M.Q.; O'TOOLE, G.A. **Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*.** Journal of Bacteriology, v. 187, p. 7351 – 5361, 2005.

CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A.D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓNCHÁVEZ, G. **The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes NADPHdependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis.** J. Bacteriol., v. 180, p. 4442–4451, 1998.

CAPEK, I. **Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 110, p. 49–74, 2004.

CARVALHO, C. & CABRAL, J. **Reverse micelles as reaction media for lipases.** Biochimie., v. 82, p. 1063–1085, 2000.

CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R.M. **Electron Microscopy of rhamnolipids (biosurfactant) morphology: effect of pH, cadmium and octadecane.** J. Colloid Interface Sci., v. 170, p. 569-574, 1995.

CHRZANOWSKI Ł, ŁAWNICZAK Ł, CZACZYK K. **Why do microorganisms produce rhamnolipids?** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 28, p. 401-419, 2012.

COHEN, R.; EXEROWA, D. **Surface forces and properties of foam films from rhamnolipid biosurfactants.** Adv. Colloid Interface Sci., v.134–135, p. 24–34, 2007.

Da SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; TOZZI, H. H.; TAKAKI, M.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids: A New Application in Seeds Development.** Journal of Medical and Biological Science Research, v. 1, p. 100-106, 2015a.

Da SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*?** Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 1-5, 2015b.

DAGBERT, C.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M. **Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*.** Electrochimica Acta., v. 51, p. 5221 – 5227, 2006.

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

DÉZIEL, E.; LEPINI, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. ***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.** Microbiol., v. 149, p. 2005 – 2013, 2003.

DIAS, C.; MORAES, D. **Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review.** Parasitology Research, v. 113, p. 565-592, 2014.

FARIAS, C.B.B.; SILVA, F.A.; RUFINO, D.R.; LUNA, M.J.; SOUZA, G.J.E.; SARUBBO, A.L. **Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 17, p. 122–125, 2014.

FIECHTER, A. **Biosurfactants: moving towards industrial application.** Trends in Biotechnol., v.10, p. 208-217, 1992.

FU, J.; SHARMA, P.; SPICER, V.; KROKHIN, O.; ZHANG, X.; FRISTENSKY, B.; WILKINS, J. A.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. **Effects of impurities in biodiesel-derived glycerol on growth and expression of heavy metal ion homesostasis genes and gene products in *Pseudomonas putida* LS46.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, p.5583-5592, 2015.

GANESH, K.; MAMIDYALA, K.; DAS, B.; SRIDHARM B.; DEVI, S.; KARUNA, M. **Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R.** J. Microbiol. Biotechnol., v. 20, p. 1061–1068, 2010.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A. ***Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source.** Appl. Environ. Microbiol., v. 48, p. 302–305, 1984.

HABA, E.; ABALOS, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, A. **Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Surfactants Deterg., v. 6, p. 155–161 2003.

HAN, F.; HE, X.; HUANG, J.; LI, Z.; WANG, Y.; FU, H. **Surface Properties and Aggregates in the Mixed Systems of Bolaamphiphiles and TheirOppositely Charged Conventional Surfactants.** J. Phys. Chem. B., v. 108, p. 5256-5262, 2004.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A.; JANA, T. **Biogenic synthesis, characterization, toxicity and photocatalysis of zinc sulphide nanoparticles using rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BS01 as capping and stabilizing agent.** J. Chem. Technol. Biotechnol., v. 88, p. 1039–1048, 2013.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; HAUSMANN, R. **Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production.** Process Biochemistry, v. 47, p. 1207-1219, 2012.

HOANG T.T; SCHWEIZER H.P. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserina lactone synthesis.** J. Bacteriol., v. 181, p. 5489-5497, 1999.

HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. **Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids.** Biochem Eng J., v. 53, p. 196–202, 2011.

HOTEZ, P.; FUJIWARA, R. **Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card.** Microbes and Infection, v. 16, p. 601-606, 2014.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; ISHII, F.; CHOI Y. K. **Colloidal chemil effect of polar head moieties of a rhamnolipid type biosurfactant.** Langmuir, v. 9, p. 1634 – 1636, 1993.

KALYANASUNDARAM, M.; DAS, P. K. **Larvicial and synergistic activity of plant extracts for mosquito control.** Indian J Med Res., v.82, p. 19-23, 1985.

KHANNA, S.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, S. **Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 32, n° 3, p. 235-262, 2012.

KIM, H.; KUO, T.M.; HOU, C.T. **Production of 10,12-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid, an intermediate in the conversion of ricinoleic acid to 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadecenoic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v. 24, p. 167–172, 2000.

KIM, S.; KIM, Y.; LEE, S; KIM, J.; YUN, M; KIM, I. **Insecticidal activity of rhamnolipids isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against Green Peach Aphid (*Myzus persicae*).** J. Agric. Food Chem., v. 59, p. 934-938, 2011.

KIRAN, S.; SELVIN, J.; MANILAL, A.; SUJITH, S. **Biosurfactants as green stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles.** Critical Reviews in Biotechnology, p. 1–11, 2011.

KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. **Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications.** Current Opinion in Colloid & Interface Science., v. 14, p. 315–328, 2009.

KUMAR, C. G; MAMIDYALA, S.K.; DAS, B.; SRIDHAR B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. **Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids Isolated from Pseudomonas aeruginosa BS-161R.** J. Microbiol. Biotechnol., v. 20, p. 1061– 68, 2010.

LANG, S. & WULLBRANDT, D. **Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 51, p. 22–32, 1999.

LENG, P.; ZHANG, Z.; ZHAO, M. **Applications and development trends in biopesticides.** African Journal of Biotechnology, v. 10, p. 19864–19873, 2011.

LIANG, Y.S.; YUAN, X.Z.; ZENG, G.M.; ZHONG, H.; LI, H.; Wang, W.W. **Effects of surfactants on enzyme-containing reversed micellar system.** Sci China Chem, v. 5, p. 715–723, 2011.

LOURITH, N. & KANLAYAVATTANAKUL, M. **Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids.** International Journal of Cosmetic Science, v. 31, p. 255–261, 2009.

LOVAGLIO, R. B. **Produção de ramnolipídios por mutantes de Pseudomonas aeruginosa LBI.** Tese (Doutorado em Ciencias Biologicas, Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociencias, Universidade Estadual Paulista –UNESP. Rio Claro, 2011

LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI Jr, M.; CONTIERO, J. **Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 85, p. 301–305, 2011.

LOVAGLIO, R.; SILVA, V.; CAPELINI, T.; EBERLIN, M.; HAUSMANN, R.; HENKEL, M.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids Production by a Pseudomonas aeruginosa LBI Mutant: Solutions and Homologs Characterization.** Tenside Surf. Det., v. 51, p. 397-405, 2014.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination.** Biotechnology advances., v. 33; p. 1715-1726, 2015.

LUPI, E.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. **The efficacy of repellents against Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes spp. e A literature review.** Travel Medicine and Infectious Disease, v. 11, p. 374-411, 2013.

MACFARLANE, E.L.A.; KWASNICKA, A.; HANCOCK, R.E.W. **Role of Pseudomonas aeruginosa PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides.** Microbiol., v. 146, p. 2543–2554, 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. ARA, I.; MULLIGAN, C. N. **Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 58, p. 428-434, 2002.

MAIER, R.M. & SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications.** Appl Microbiol Biotechnol. v. 54, p. 625-33, 2000.

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

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. **HPLC method for the characterization of rhamnolipids mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil.** J. Chromatogr. A, v. 864, p. 211-220, 1999.

MATA-SANDOVAL, J.; KARNS, J.; TORRENTS, A. **Effect of nutritional and environmental conditions on the productions and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2.** Microbiol. Res. 155, p.249-256, 2001.

McGRAW, E. & O'NEILL, S. **Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem.** Nature Reviews Microbiology, v. 11, p. 181-193, 2013.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review.** Renew Sustain Energy Rev, v. 10, p. 248–268, 2006.

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

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

MULLIGAN, C. N. **Recent advances in the environmental applications of biosurfactants.** Curr. Op. Coll. Interf. Sci., v. 14, p. 372 – 378, 2009.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. **Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules.** Biotechnology Progress, v. 21, p. 1595 – 1600, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. **Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste.** Appl. Biochem. Biotechnol., v. 160, p. 2066-2074, 2010.

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

OLIVEIRA, F. J. S.; VAZQUEZ, L.; de CAMPOS, N. P.; FRANCA, F. P. **Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain.** Process Biochemistry, v. 44, p. 383–9, 2008.

PACHECO, A. & REBELO, M. **A simple R-based function to estimate lethal concentrations.** Marine Environmental Research, v. 91, p. 41-44, 2013.

PALANISAMY, P. & RAICHUR, A.M. **Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique.** Mater Sci Eng. C Biomim. Supramol. Syst., v. 29, p. 199-204, 2009.

PAMP, S. J. & TOLKER-NIELSEN, T. **Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*.** Journal of Bacteriology, v. 189, P. 2531–2539, 2007.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. **Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses.** Lett Appl Microbiol, v. 25, p. 91-94, 1997.

PEARSON, J.; VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. **Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals.** Bacteriology, v. 181, p.1203-1210, 1999.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. **Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon3degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO231.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v.72, p.132-138, 2006.

PFLÜGER, H. J. & STEVENSON, P. A. **Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods.** Arthropod Struct Dev, v. 34 p. 379–396, 2005.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. **Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0,1% dirhamnolipid ointment.** J. Cutan. Med. Surg., v. 12, p. 142-146, 2008.

PILJAC, G & PILJAC, V. **Pharmaceutical preparation based on Rhamnolipid.** US Patent. Patent #: 5,455,232., 1995.

PIRÔLLO, M.P.S; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. **Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site.** Journal of Applied Microbiology, v. 105, n. 5, p. 1484 – 1490, 2008.

PLAZA, G. A.; CHOJNIAK, J.; BANAT, I. M. **Biosurfactant mediated biosynthesis of selected metallic nanoparticles.** Internatil Journal of Molecular Science, v. 15, p. 13720 – 13737, 2014

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIR, R. **Rhamnolipid Biosurfactants: Production and their potential in environmental biotechnology.** CHAPTER 16: BIOSURFACTANTS. ED: RAMKRISNA SEN, LANDES BIO SCIENCE & SPRINGER SCIENCE: BANGKOK, TAILÂNDIA, p. 211-221, 2010.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S.; RAO, H.; VIJJAPU, S. **Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonasfluorescens* (VCRC B426).** Acta Tropica., 2015.

OCHSNER, U.A.; REISER, J.; FIECHTER, A., WITHOLT, B. **Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts.** Appl Environ Microbiol., v. 61, p. 3503-3506, 1995.

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

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

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; McCLEAN, S. **Rhamnolipid biosurfactants production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials.** Biotechnonology Progress, v. 18, p.1277-1281, 2002.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P. JAZIRI, M. **The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms.** BioMed Research International., v. 2015, p. 1 -15, 2015.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. **Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World.** Annu. Rev. Entomol., v. 57, p.405–424, 2012.

SAIKIA, J.P.; BHARALI, P.; KONWAR, B.K. **Possible protection of silver nanoparticles against salt by using rhamnolipid.** Colloids Surf. B Biointerfaces, v.104, p. 330–332, 2013.

SANTA-ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOSM A. S.; PERERIRA Jr. N.; FREIRE, D. M. G. **Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 19, p. 159-166, 2002.

SHREVE, G. S.; INGUVA, S.; GUNNAM, S. **Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*.** Mol Mar Biol Biotechnol., v. 4, v. 331-7, 1995.

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

SILVA, S.; FARIAS, C.; RUFINO, R.; LUNA, J.; SARUBBO, L. **Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, v. 79, p. 174-183, 2010.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. **Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences.** *Trends in Biotechnol. Amsterdam*, v. 22, nº 3, 142-146, 2004

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LEPIE, F.; DÉZIEL, E. **Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 68, p. 718-25, 2005.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. **Biosurfactants: A general Overview.** *Biosurfactants.* Ed. Gloria Soberón-Chávez, *Microbiology Monographs*, Springer: Berlin: p. 1-8, 2011.

SOUZA, J.; CORREIA, J.; MELO, V.; GONÇALVES, L.; CRUZ, A. **Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSC1022 utilizando glicerol como fonte de carbono.** *Quim. Nova*, v. 37, p. 431-441, 2014.

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, 1987, p. 89-120.

SUN, Y. P.; JOHNSON, E. R. **Analysis of joint action of insecticides against house flies.** *J. Econ Entomol.*, v. 53, p. 887-892, 1960.

THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. **Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by**

***Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste.** Biores. Technol., v. 98, p. 1149-1153, 2007.

TORIBIO, J.; ESCALANTE, A.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. **Rhamnolipids Productions in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*.** European Journal of Science Technology, v. 112, p. 1082-1087, 2010.

VAN HAESSENDONCK, I. P. H. & VANZEVEREN, E. C. A. **Rhamnolipids in bakery products.** International application patent(PCT) W. O. 2004/040984, 2004.

VARNIER, A.L.; Sanchez, L.; Vatsa, P.; Boudesocque, L.; Garcia-Brugger, A.; Rabenoelina, F.; Sorokin, A.; Renault, J. H.; Kauffmann, S.; Pugin, A.; Clement, C.; Baillieul, F.; Dorey, S. **Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine.** Plant Cell Environ., v. 32, p. 178-193, 2009.

VERNE, J. **La isla misteriosa.** Bogotá: Panamericana Editorial, 2005. 326 p.

VERHOEF, S.; GAO, N.; RUIJSSENAARS, H.J.; DE WINDE, J. H. **Crude glycerol as feedstock for the sustainable production of p-hydroxybenzoate by *Pseudomonas putida* S12.** New Biotechnol., v, 31, p. 114–119, 2014

VILLENEUVE, M.; IKEDA, N.; MOTOMURA, K.; ARTONO, M. **Miscibility of Butanol and Cationic Surfactant in the Adsorbed Film and Micelle.** J. Colloid and Interface Sci., v. 208, p. 388-398, 1998.

WADEKAR, S. D.; PATIL, S. V.; KALE, S. B.; LALI, A. M.; BHOWMICK, D. N.; PRATAP, A. **Study of Glycerol Residue as a Carbon Source for Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145).** Tenside Surf. Det., v. 48, p. 16 – 22, 2011.

WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. **Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** Harmful Algae, v. 4, p. 433-443, 2005.

WANG, S.; MULLIGAN, C. N. **Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant.** Appl. Geochem., v. 24, p. 935-938, 2009.

WEI, Q.F.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. **Oil removal from used sorbents using a biosurfactant.** Biores. Technol., v. 96, p. 331-334, 2005.

WEI, Y. H.; CHENG, C. L.; CHIEN, C. C.; WAN, H. M. **Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16.** Process Biochemistry, v. 43, p. 769-744, 2008.

WILLIAMS, P. **Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world.** Microbiol., v.153, p.3923–3938, 2007.

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

XIE, Y.; LI, Y.; YE, R. (2005) **Effect of Alcohols on the Phase Behavior of Microemulsions Formed by a Biosurfactant—Rhamnolipid,** Journal of Dispersion Science and Technology, v. 26, p. 455-461, 2005.

ZHANG, G.; WU, Y.; QUIAN, X.; MENG, Q. **Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids.** J Zhejiang Univ Sci B. v. 6, p. 725–730, 2005.

ZHANG, Q. & JU, L.K. **Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of b-glucosidase from cellulase enzyme mixture.** Enzyme Microbial Technol., v. 48, p. 175–80, 2011.

ZHANG, Y., & MILLER, R. M. **Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane.** Applied and Environmental Microbiology, v. 60, p. 2101–2106, 1994.

ZHANG, Y., & MILLER, R. M. **Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes.** Applied and Environmental Microbiology, v. 61, p. 2247–2251, 1995.

ZHU, K.; ROCK, C.O. **RhlA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Bacteriol., v. 190, p. 3147–3154, 2008.