
**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**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



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

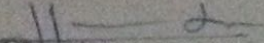
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: APROVEITAMENTO DE GLICEROL RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS POR TRÊS LINHAGENS DE *Pseudomonas aeruginosa*

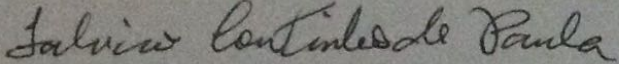
AUTORA: ANA MARIA SALAZAR BRYAM

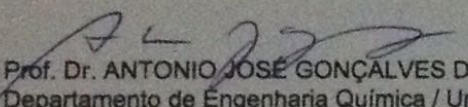
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

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 puderes 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 a 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, este 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 –Charquedda, 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 –Charquedda, 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 –Charquedda, 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 contém 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).

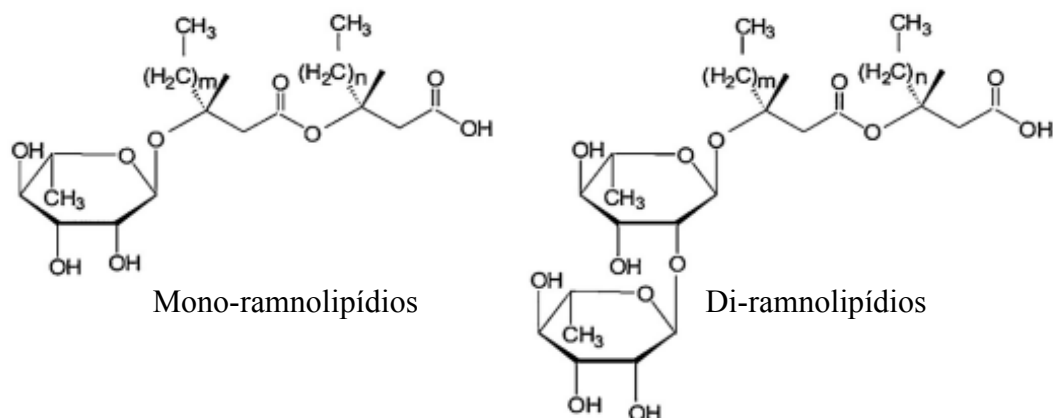
Dentre os principais tipos de biossurfactantes estão os lipopeptídios e lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e glicolipídios (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002). Os ramnolipídios são os mais importantes do grupo dos glicolipídios, devido às suas propriedades tenso-ativas; 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.

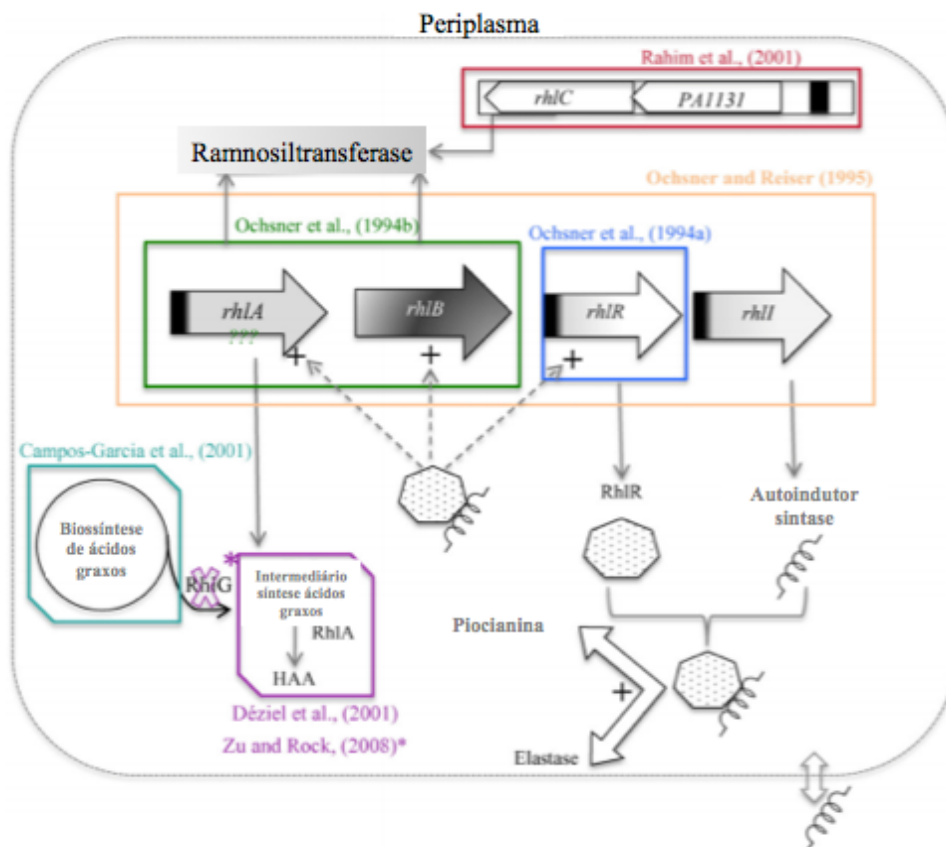
O QS é caracterizado pela produção de autoindutores que se acumulam ao aumentar a densidade populacional o que promove a interação celular e a ativação dos reguladores transcricionais (WILLIAMS, 2007). No sistema *rhl* de QS, o *rhlI* é responsável pela síntese do autoindutor, N-butanol-L-homoserina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

torna ativa. O Complexo RhIR- C₄HSL reconhece as caixas “Las”, ativa o operon *rhLAB* e desencadeia a transcrição de ramnosiltransferases (OCHSNER & REISER, 1995).

A proteína RhIB do operon *rhLAB*, é uma proteína catalítica que promove a união de dTDP-L-ramnose à cadeia de acil-ramnolípido (OCHSNER & REISER, 1995), enquanto da proteína RhIA ainda não se tem conhecimento de sua função específica, acredita-se que deva estar presente para a síntese do biossurfactante (Fig. 1.2) (LOVAGLIO *et al.*, 2015).

Nos estudos de Déziel *et al.* (2003) foi observado que os mutantes para *rhIA* não expressaram RhIA nem RhIB não havendo produção de ramnolípídios. Porém, houve produção de ácidos 3-hidroxicanoicos (HAA), pois foi evidenciado que *rhIA* está envolvido na produção de HAA, precursor dos ramnolípídios e substrato da RhIB. Estes estudos levaram à conclusão que RhIA é provavelmente uma transacilase e segundo Zhu & Rock (2008), o substrato preferencial desta enzima é β-hidroxiacil-ACP, desviando-o da biossíntese de ácidos graxos para produção de HAA (Fig. 1.2). Estes resultados refutaram o observado por Campos-Garcia *et al* (1998), que mostrou que o gene *rhIG* é responsável da síntese da porção lipídica dos ramnolípídios.

Figura 1.2. Recopilação histórica dos genes envolvidos na produção de ramnolípídios. (LOVAGLIO *et al.*, 2015)



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 conectados 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, respectivamente (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 (PIJAC *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 ramnolípídios 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).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Comparar a produção de ramnolipídios por três linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI, LBI, LBI 2A1) usando três tipos de glicerol bruto (glicerol limpo clarificado, glicerol limpo sem sal e glicerol bruto sem tratar) como fonte de carbono
- Avaliar diferentes aplicações para os ramnolipídios.

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito da concentração de glicerol bruto na produção de ramnolipídios
- Extrair e purificar os ramnolipídios produzidos
- Caracterizar os ramnolipídios produzidos quanto à sua composição e propriedades físico-químicas
- Utilizar os ramnolipídios como agentes estabilizantes na formação de nanopartículas.
- Avaliar a atividade inseticida destes metabólitos

3. CAPÍTULO I

FERMENTAÇÕES EM FRASCO - COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL BRUTO PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS

3.1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas com propriedades tenso-ativas que apresentam atividade emulsionante (MARCHANT & BANAT, 2012), a classificação destas moléculas depende da composição química que tiverem. O grupo de biossurfactantes mais amplamente estudado são os glicolipídios, dentro deste grande grupo estão os ramnolipídios, principalmente produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* (HENKEL *et al.*, 2012).

Pseudomonas aeruginosa têm sido um dos micro-organismos mais estudados na produção de ramnolipídios, pois o biossurfactante que ela produz apresenta propriedades de solução que permitem uma ampla gama de aplicações e o rendimento de produção é alto em relação ao tempo de cultivo (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011).

Além de produzirem os glicolipídios mais estudados, o metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* frente a produção destas moléculas e a fonte de carbono também tem sido estudada. As fontes carbono hidrofóbicas, como óleos vegetais e n-alcanos, são as que tem apresentado melhores resultados na produção de ramnolipídios (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011), e as fontes hidrofílicas como glicerol, glicose, manitol e etanol tem sido usadas para a produção destes biossurfactantes, porém o rendimento na produção não atinge o conseguido com fontes de carbono hidrofóbicas (NITSCHKE *et al.*, 2005).

O aumento na produção do biodiesel, no Brasil e no mundo, traz como consequência a o aumento do glicerol bruto, como resíduo industrial, cuja disposição é onerosa e o seu valor no mercado é baixo (SILVA *et al.*, 2009). Uma possível solução ao desafio de dispor o glicerol bruto é o aproveitamento deste subproduto como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biossurfactantes (KHANNA *et al.*, 2012).

A produção de ramnolipídios usando glicerol como fonte de carbono varia entre 1g/L e 15,4g/L (ERAQUI *et al.*, 2016; RAHMAN *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2005), mas ainda para esse rendimento, o coeficiente de bioconversão é relativamente baixa, variando entre $Y_{P/S}=0,1-0,15$ (HENKEL *et al.*, 2012), existindo o desafio de otimizar o processo com o objetivo de aumentar a produção de ramnolipídios.

Apesar de ser uma fonte de carbono atrativa para realizar bioprocessos, o glicerol residual pode apresentar impurezas, as quais possivelmente interferem no metabolismo da

Pseudomonas afetando a produção de ramnolipídios. Foi reportado por Fu *et al.* (2015), que impurezas como íons como Na⁺ e alguns metais pesados podem afetar a expressão de genes relacionados à adaptação ao estresse osmótico.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito da variação da concentração de glicerol bruto tratado na produção de ramnolipídios, utilizando três linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI, LBI, LBI 2A1). Também comparou-se a produção utilizando um glicerol bruto tratado e um glicerol bruto não tratado.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Micro-organismos

Os micro-organismos avaliados são provenientes do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus Rio Claro, e do laboratório do Prof. Dr. Marcos Rogério Tótola da Universidade Federal de Viçosa (UFV) como descrito na Tabela 3.1. Todos os micro-organismos foram acondicionados em tubos criogênicos contendo glicerol 20% e armazenados em ultra-freezer à -80°C.

Tabela 3.1– Linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas no trabalho

Linhagem	Característica	Origem
<i>P. aeruginosa</i> LBI	Selvagem	LMI
<i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1	Mutante aleatório	LMI
<i>P. aeruginosa</i> PAOI	Selvagem	Prof. Tótola

3.2.2. Meios de cultura

3.2.2.1. Fontes de carbono utilizadas

As fontes de carbono utilizadas para realizar os cultivos em frasco, foram provenientes da Usina Candeias da Petrobrás – Candeias, BA e da indústria BIOCAPITAL –Charqueda, SP, são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Fontes de carbono utilizadas no projeto

Nome fonte de carbono	Origem	Classificação segundo a empresa
G1	Usina Candeias da Petrobrás –Candeias,BA	Glicerol Limpo Clarificado
G2	BIOCAPITAL –Charqueda, SP	Glicerol Purificado sem sal
G3	BIOCAPITAL –Charqueda, SP	Glicerol Bruto

3.2.2.2. Caldo Nutriente (CN) e Luria Bertani (LB)

A composição dos meios utilizados para o pré-inóculo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona - 10; extrato de levedura - 5,0 e NaCl - 10 (LB).

3.2.2.3. Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)

O meio MLCTF, utilizado para o preparo do inóculo das fermentações conduzidas em reator e frascos Erlenmeyer, é composto por (g/L): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,05; KCl - 0,1; $NaNO_3$ - 1,5; fonte de carbono; tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 e 1 ml/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado - 2,0; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,28; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,87; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ - 1,2; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 1,2; $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0,8.

3.2.2.4. Meio Mineral livre de cálcio (MLC)

Para a produção de ramnolipídios em frascos utilizou-se o seguinte meio (g/L): K_2HPO_4 - 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; KCl - 1,0; $NaNO_3$ - 15; fonte de carbono - 100 (para cultivo em frasco). O volume e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item anterior. A concentração de reagente utilizada, nos meios descritos acima, foi baseada no volume de solução aquosa, porém não considerando o volume de glicerol adicionado.

3.2.3. Condições de cultivo

3.2.3.1. Preparo do Inoculo

Primeiramente os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25% de volume de meio LB/CN e 100 mL da cultura estoque da linhagem a ser avaliada. A incubação foi realizada em mesa agitadora, durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida foram transferidos 5 ml do pré-inóculo para frascos de 500 ml com 20% de volume de meio MLCTP e incubado por 48 horas à 37°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação da fase aquosa resultando em uma D.O_{580nm} inicial de 0,1 (Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC)

3.2.3.2. Produção de Ramnolipídios

Os experimentos para produção de ramnolipídios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 30% de volume de meio MLC. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 120 horas. Foram retiradas amostras após 6 horas e

em seguida a cada 24 horas, o processamento foi realizado como descrito abaixo. Cada cultivo foi feito em triplicata.

3.2.4. Métodos Analíticos

3.2.4.1. Processamento das amostras

O volume de cada amostra foi 20 ml, a qual foi dividida em duas de 10 ml, uma para análise dos homólogos, por meio de espectrometria de massas, e a outra para avaliação de produção de ramnolipídios, produção de biomassa e consumo de glicerol, como explicado no próximo item. Cada amostra foi centrifugada à 10000 rpm, 4°C e 20 min para que ocorresse separação das 2 fases: células / fase aquosa.

3.2.5. Avaliação da produção de Ramnolipídios

3.2.5.1. Extração de ramnolipídios

À uma alíquota de 2 ml da fase aquosa adicionou-se 20 µl de H₃PO₄ 85% (v/v) 1:100 e centrifugou-se à 10000 rpm, 4°C e 10 min. Das duas fases obtidas, a fase superior foi separada e o procedimento de extração foi repetido com a fase inferior.

3.2.5.2. Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura: clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2). Foram aplicados 10 µl de extratos obtidos a partir do caldo livre de células em diferentes tempos de cultivo, além dos padrões de ramnolipídios adquiridos da Jeneil Biosurfactant Company. Utilizou-se agente revelador, composto por 2 ml de anisaldeído em 100 ml de ácido acético acrescido de 2 ml de ácido sulfúrico.

3.2.5.3. Quantificação de Ramnolipídios – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.2.5.3.1. Derivatização

Para a análise em HPLC as amostras contendo ramnolipídios foram derivatizadas a fim de serem detectadas via detector de UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com Schenk *et al.* (1995). Os extratos de ramnolipídios contendo acetato de etila foram previamente evaporados em microtubos. Aos microtubos adicionou-se 360 µl de acetonitrila e 40 µl da solução 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40 mM e Trietilamina 20 mM, ambos diluídos em acetonitrila. A derivatização foi realizada em banho seco durante 1,5 horas à 1400 rpm e 60 °C.

3.2.5.3.2. Análises por HPLC

As análises foram feitas em um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV, de acordo com o descrito por Müller *et al.* (2010). Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono e di-ramnolipídio (concentrações de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 g/L). Para as análises utilizou-se uma coluna de fase reversa (Shim-pack VP-ODS, Shimadzu – 150 mm X 0,46 mm, 5 µm sílica gel) à 30°C. As fases móveis foram Solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, diluídas em água ultra-pura.

Para que houvesse separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 a 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 ml/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram $25,2 \pm 0,1$ min para Rha-Rha-C₁₀C₁₀e $26,1 \pm 0,1$ min para Rha-C₁₀C₁₀.

3.2.6. Determinação da biomassa microbiana

A avaliação do crescimento microbiano foi realizada pelo método gravimétrico, onde o *pellet* de células foi ressuspensão em NaCl 0,85% (v/v) (no mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 4000 rpm, 4°C e 30 min. Em seguida o *pellet* foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantido em estufa à 100 °C até atingir peso constante.

3.2.7. Determinação da fonte de carbono

O consumo do glicerol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito por McGinley e Mott., (2008) com pequenas modificações. Para as análises utilizou-se a coluna Rezex ROA (300 17 x 7,8 mm) da Phenomenex60°C; o volume de amostra injetado e o fluxo foram 20 µl e 0,5 ml/ min, respectivamente. Ácido sulfúrico 5 mM foi usado como fase móvel. O tempo de retenção foi $18 \pm 0,1$ min.

3.2.8. Análise estatística

Para comparar a produção de ramnolipídios, biomassa e consumo de fonte de carbono em cada uma das fermentações realizadas, foi analisada a normalidade dos dados com a prova Shapiro wilk ($\alpha= 0,05$). Aplicou-se uma prova paramétrica (ANOVA), $\alpha= 0,05$ para avaliar se existem diferenças entre as médias de consumo de fonte de carbono, biomassa e produção de ramnolipídio. Por fim, para comparar entre quais tratamentos existiam diferenças, foi aplicada o test de Tukey-Kramer (key-Kr). Para tanto utilizou-se o *software* R (versão 3.2.0).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos com as fermentações conduzidas em frascos com as três linhagens de *P. aeruginosa* (LBI, LBI 2A1 e PAOI), avaliando:

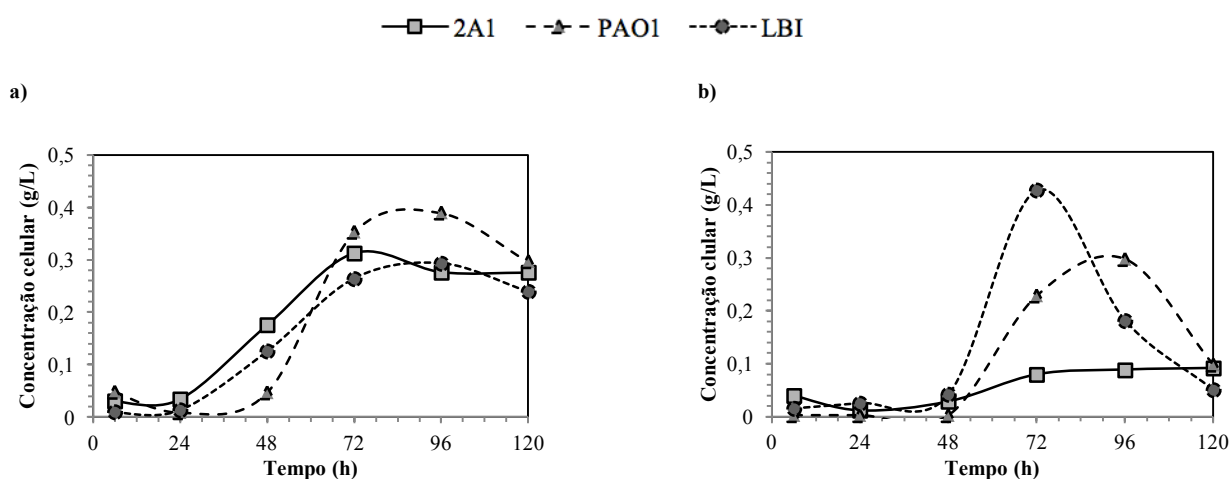
1. Glicerol residual como fonte carbono proveniente de duas indústrias diferentes,
2. Efeito da concentração de glicerol e,
3. Diferenças entre-glicerol bruto tratado e bruto para a produção de ramnolipídios.

3.3.1. Comparação das fermentações utilizando glicerol residual proveniente de duas diferentes indústrias (Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA e BIOCAPITAL –Charqueada, SP)

Foram utilizadas três linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*: duas selvagens, *Pseudomonas aeruginosa* PAOI e *Pseudomonas aeruginosa* LBI; e a mutante *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, para comparar o crescimento (Fig. 3.1 a-b), produção de ramnolipídios (Fig. 3.2 a-b) e o consumo de fonte de carbono (Fig. 3.3 a-b), utilizando glicerol residual proveniente de duas indústrias de biodiesel: Glicerol da Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA (G1) e Glicerol da BIOCAPITAL –Charqueada, SP (G2).

Quando utilizado G1, houve uma fase exponencial do crescimento nas primeiras 24h, seguida de uma pequena estabilização do crescimento entre as 48 e 72h e a partir desse ponto, houve um aumento considerável na concentração celular. No caso da *Pseudomonas aeruginosa* PAOI foi atingida a fase estacionária após 72h de fermentação. A biomassa produzida variou entre $2,90 \pm 0,02$ e $3,80 \pm 0,02$ g/L de células (Fig. 3.1a).

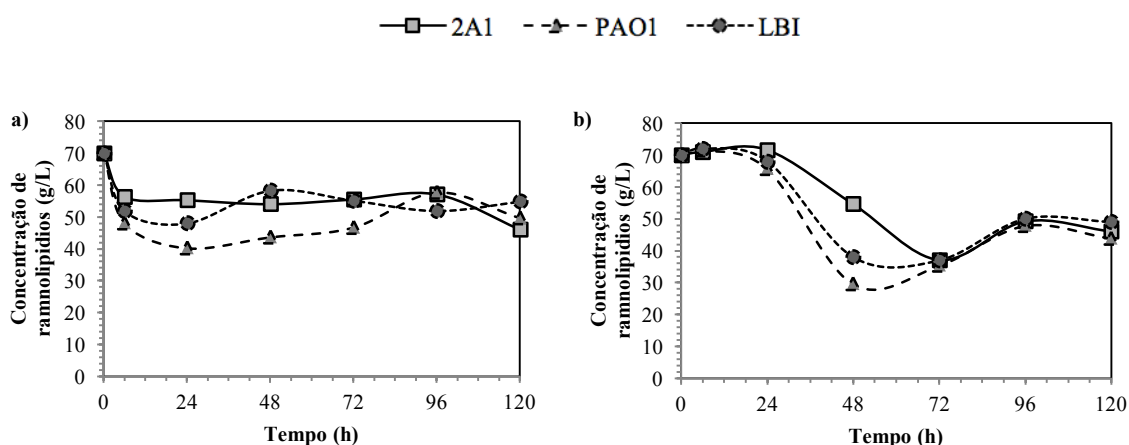
Figura 3.1. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando Glicerol da Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA (G1) e Glicerol da BIOCAPITAL –Charqueada, SP (G2). **a)** Crescimento celular em G1; **b)** Crescimento celular em G2.



No caso das fermentações conduzidas utilizando G2, todas as linhagens apresentaram um crescimento mais rápido até as primeiras 48h, a partir desse ponto entraram na fase estacionária, mas depois de 96h a concentração de células aumentou consideravelmente. Com esta fonte de carbono foram obtidas entre $3,40 \pm 0,01$ e $3,80 \pm 0,02$ g/L de células (Fig. 3.1b). Foi evidenciado que os perfis de crescimento das três linhagens, utilizando tanto G1 quanto G2 foram semelhantes.

A síntese de biosurfactante ocorreu entre 24 e 72 horas e no caso de *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, a produção ocorreu até 96h de fermentação empregando G1 (Fig. 3.2a). Nas condições utilizadas nestes experimentos, *Pseudomonas aeruginosa* PAOI foi a linhagem que mostrou maior produção ($0,39 \pm 0,02$ g/L) comparada com *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 e *Pseudomonas aeruginosa* LBI que atingiram $0,31 \pm 0,02$ e $0,293 \pm 0,004$ g/L, respectivamente.

Figura 3.2. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando Glicerol da Usina Candeias da Petrobrás –Candeias, BA (G1) e Glicerol da BIOCAPITAL –Charqueda, SP (G2). **a)** Concentração de ramnolipídio em G1 como fonte de carbono; **b)** Concentração de ramnolipídio em G2 como fonte de carbono.

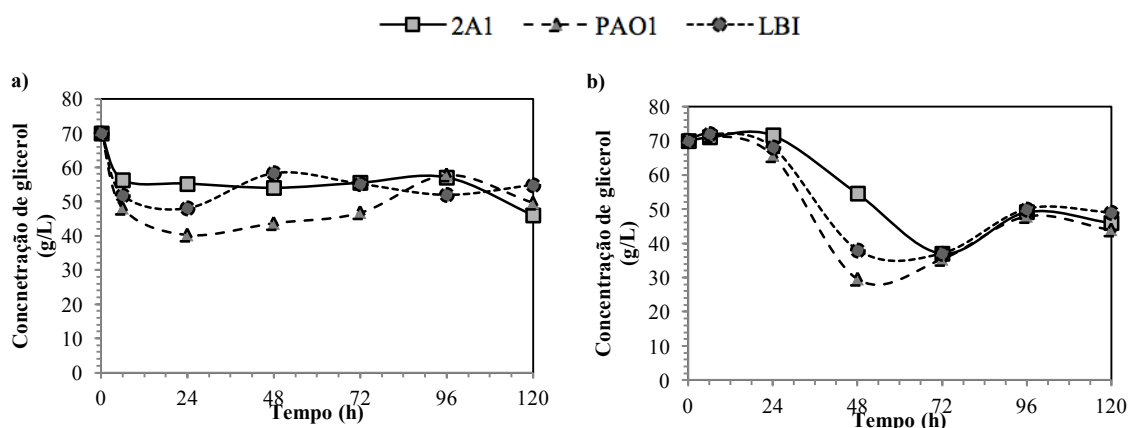


No caso das fermentações conduzidas com G2 como fonte de carbono (Fig. 3.2b), obteve-se uma maior concentração de ramnolipídio com *Pseudomonas aeruginosa* LBI ($0,43 \pm 0,01$ g/L) seguida por *Pseudomonas aeruginosa* PAOI ($0,30 \pm 0,01$ g/L) e finalmente, *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 foi a que apresentou a menor produção de ramnolipídio ($0,1 \pm 0,009$ g/L). Ao comparar os valores de concentração de biomassa e concentração de ramnolipídios das três linhagens (PAOI, LBI 2A1 e LBI) usando G1 e G2, observou-se que existem diferenças significativas na produção de biomassa e ramnolipídios (p -value<0,05).

Observa-se que houve uma produção mais rápida de ramnolipídios, usando tanto G1 quanto G2, entre as 48 e 72h. Ocorrendo depois um decréscimo considerável na concentração dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, o que poderia estar relacionado com o aumento da biomassa destas linhagens nas

ultimas horas da fermentação, evidenciando um possível consumo do ramnolipídio produzido. Ashby *et al.* (2011) descreveram que depois de 72h de fermentação *Pseudomonas oleovorans* começou a utilizar o poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) como fonte de carbono, mesmo quando havia glicerol disponível.

Figura 3.3. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* 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.



Há descrições das características do glicerol residual da indústria de biodiesel (FU *et al.*, 2015), onde relatam que dentre as principais impurezas desta fonte de carbono encontra-se o metanol, ácidos graxos, sais de Na^+ e K^+ e alguns íons de metais pesados que podem ser tóxicos em altas concentrações. Os resultados obtidos da análise de consumo de glicerol empregando G1 como fonte de carbono (Fig. 3.3 a-b) indicam que este substrato possivelmente apresentava resquícios de ácidos graxos provenientes da produção do biodiesel, pois o consumo deste glicerol (G1) após 120h foi baixo (20-30%), em comparação com o consumo registrado nas fermentações conduzidas com G2 (50%), no entanto não existem diferenças significativas entre os tratamentos ($p\text{-value} > 0,05$), indicando que os dois tipos de glicerol residual poderiam ser utilizados como fonte de carbono, pois apresentam um consumo máximo de 45-60%, em ambos casos.

Provavelmente o G1 e G2 foram submetidos a diferentes tratamentos após a obtenção, já que os resíduos de cada indústria podem ser diferentes e, assim, ter uma influência diferente no metabolismo dos micro-organismos utilizados neste estudo. No entanto, é possível afirmar que a concentração utilizada de glicerol não foi um fator limitante ao crescimento dos micro-organismos, no entanto pode ter sido um fator limitante para a produção de ramnolipídios.

Esta hipótese é baseada nos resultados descritos por Fu *et al.* (2015), onde relatam que se o glicerol residual apresenta concentrações elevadas de Na⁺, o micro-organismo estará sob estresse osmótico, o que afeta o metabolismo do micro-organismo. Segundo estudos realizados por Bazire *et al.* (2005), é descrito que altas concentrações de Na⁺ podem influenciar a expressão de genes relacionados ao metabolismo dos ramnolipídios, afetando a expressão do gene *rhlI*, como consequência há redução na produção de C4-HSL (N-acilbutiril-homoserina lactona), que é a molécula de sinalização celular que se une ao regulador RhlR para executar a ativação transcricional dos genes envolvidos na produção de ramnolipídios. O estresse osmótico também pode afetar a expressão de *rhlAB* (BAZIRE *et al.* 2005). Bazire *et al.* (2005) relataram também que o fosfato pode ser limitante para a produção de HSL (homoserinas lactonas), que são moléculas que ajudam a desencadear o processo de expressão gênica de maquinaria do quórum-sensing.

Analisando os valores das relações biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$), calculado para as três linhagens cultivadas nas diferentes fontes de carbono (Tabela 3.3), fica evidente que tanto *Pseudomonas aeruginosa* LBI quanto *Pseudomonas aeruginosa* PAOI foram mais eficientes utilizando G1 como fonte de carbono, para produção de biomassa e de ramnolipídio.

Tabela 3.3 - Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI, LBI 2A1 e PAOI, utilizando G1 e G2 em termos de Relação (g/g) biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$).

Linhagem	$Y_{x/s}$		$Y_{p/s}$		$Y_{p/x}$	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	0,495	0,110	0,076	0,001	0,154	0,013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAOI	0,866	0,095	0,015	0,003	0,143	0,037
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	0,2	0,129	0,024	0,002	0,122	0,016

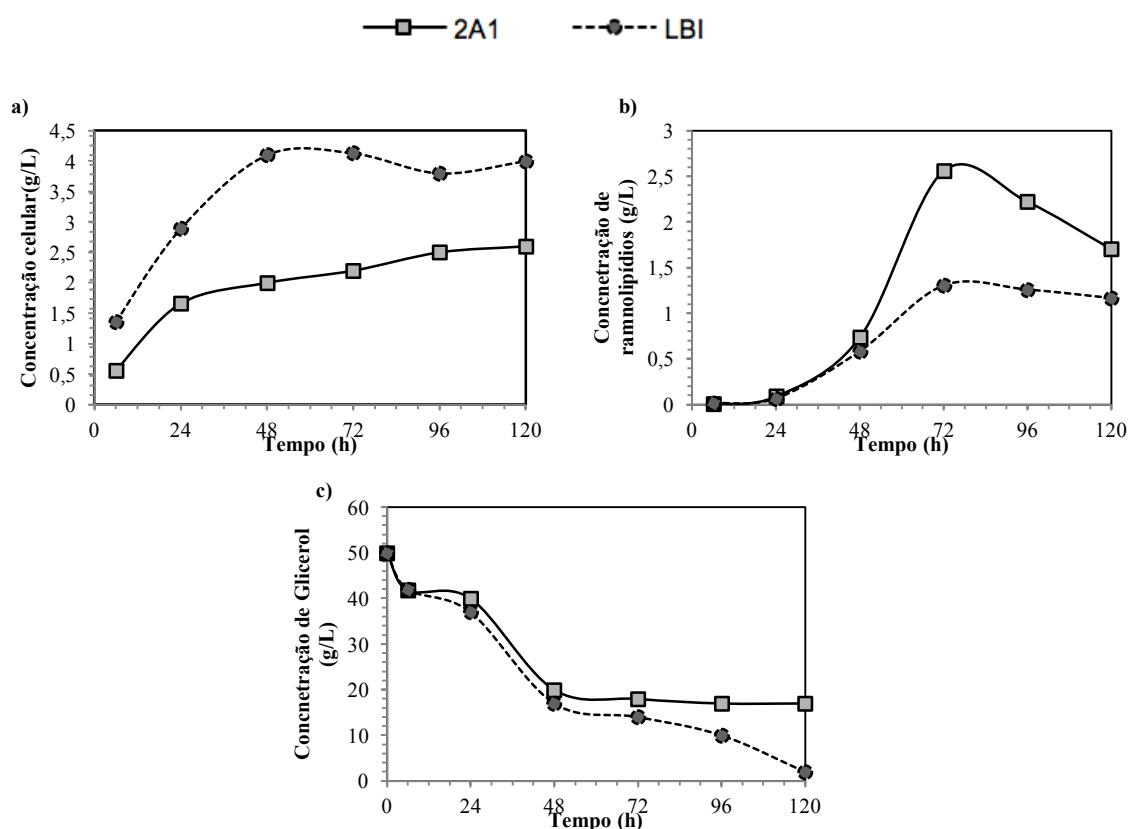
3.3.2. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI e *P. aeruginosa* LBI 2A1 com 50g/L de glicerol

Baseados nos resultados apresentados por Lovaglio (2011), onde observou-se a evidência de que a *P. aeruginosa* LBI 2A1 tem maior produção de ramnolipídio em comparação com a selvagem. Foram realizadas fermentações com 50g/L de G2 com a linhagem selvagem *P. aeruginosa* LBI e a sua mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1.

A seguir serão apresentados os resultados das fermentações conduzidas com *P. aeruginosa* LBI e *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando 50g/L de glicerol [G2] (Figura 3.4). O micro-organismo que apresentou um crescimento celular maior, após 120h, foi *P. aeruginosa*

LBI com $4,00 \pm 0,03 \text{g/L}$, este micro-organismo teve um crescimento celular mais rápido entre primeiras às 6 e 48h da fermentação, e depois deste tempo entrou na fase estacionária de crescimento. No caso de *P. aeruginosa* LBI 2A1, houve uma fase de aceleração no crescimento mais curta do que da selvagem (*P. aeruginosa* LBI) e o crescimento desacelerou após 24 horas, entretanto houve incrementos na concentração celular até atingir $2,60 \pm 0,01 \text{g/L}$ após 120h de fermentação. Estes resultados concordam com o descrito por Lovaglio (2011), que afirma que a mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 não apresenta a mesma capacidade de consumo de glicerol quanto a linhagem selvagem.

Figura 3.4. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI e *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando 50g/L de G2. a) Crescimento celular; b) Produção de ramnolipídio; c) Consumo da fonte de carbono.



A produção de ramnolipídios foi melhor com *P. aeruginosa* LBI 2A1, alcançando $2,55 \pm 0,02 \text{g/L}$ do produto. Com a linhagem mutante *P. aeruginosa* LBI 2A1 houve um aumento do 192% na produção, quando comparado com *P. aeruginosa* LBI, que produziu $1,3 \pm 0,3 \text{g/L}$ de ramnolipídios. A bactéria selvagem consumiu 96% da fonte de carbono após 120 horas de cultivo, já a mutante após 72 horas havia consumido 66% do glicerol utilizado. Após esse tempo, a concentração de G2 estabilizou-se e a concentração do biossurfactante diminuiu, o

que pode indicar uma preferência do micro-organismo em utilizar o ramnolipídio como fonte de carbono.

Existe uma possível associação na produção de biossurfactante e a resistência a antibióticos que a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 apresenta. Lovaglio (2011) relata que, pela pressão de seleção à que foi submetida *P. aeruginosa* LBI 2A1 é provável que o micro-organismo tenha desenvolvido uma estratégia metabólica para aumentar a produção de ramnolipídios que pode estar correlacionada com a capacidade desta bactéria de resistir determinadas concentrações de antibióticos. Segundo Pearson *et al.* (1999), as bombas de efluxo e os mecanismos de difusão estão envolvidos no transporte de N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona (3OC12-HSL), que é uma das moléculas auto-indutoras da comunicação celular que ativam processos de síntese de fatores de virulência como os ramnolipídios.

Além do descrito anteriormente, *P. aeruginosa* apresenta um sistema de dois componentes que regula a permeabilidade reduzida da membrana, *phoP-phoQ* (MacFARLANE *et al.*, 2000). Este mecanismo, sob baixas concentrações de Mg^{2+} é super-expressado e promove o aumento da resistência à antimicrobianos (MacFARLANE *et al.*, 2000). Porém, *phoQ* está associado também ao sistema de natação de *P. aeruginosa*, que tem que produzir agentes tensoativos para reduzir a tensão superficial facilitando assim o movimento das células (BRINKMAN *et al.*, 2001; DÉZIEL *et al.*, 2003; LOVAGLIO, 2011). Os fatores de conversão de biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$) são apresentados na Tabela 3.4. Observa-se que todos os rendimentos de conversão de *P. aeruginosa* LBI 2A1 foram maiores dos que os de *P. aeruginosa* LBI.

Tabela 3.4. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI e *P. aeruginosa* 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 ($Y_{p/s}$)

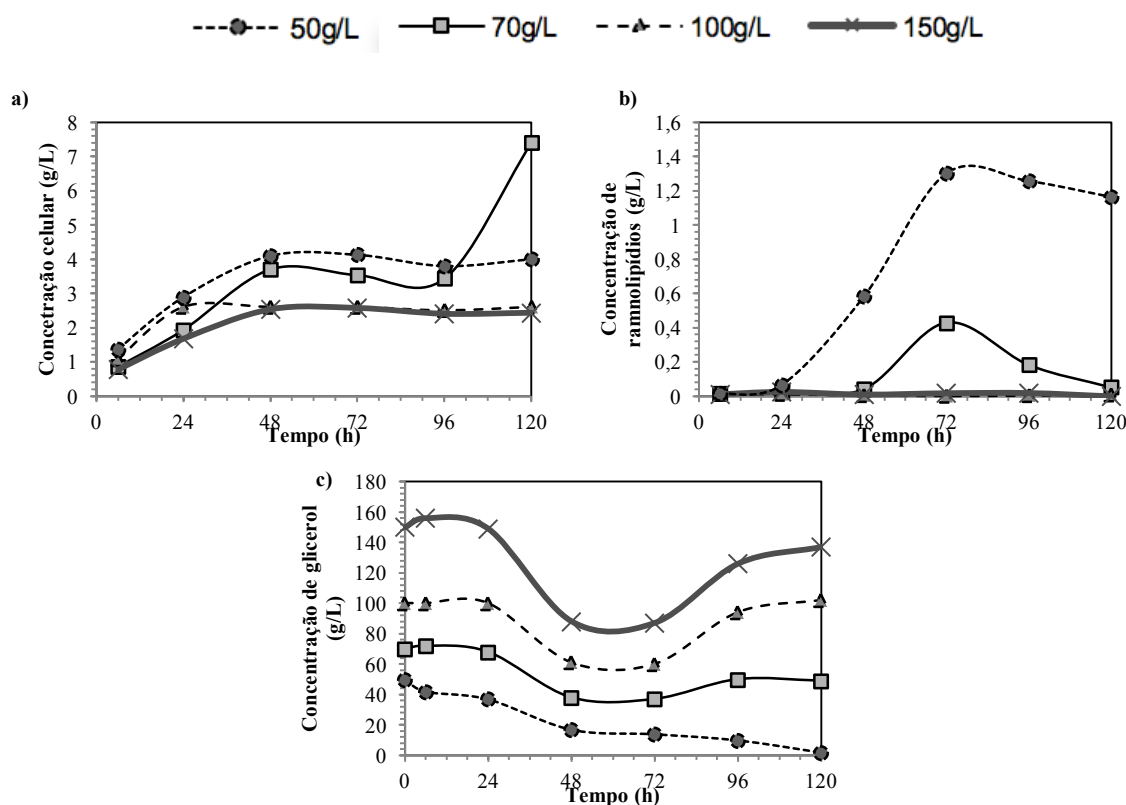
Linhagem	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	0,066	0,051	0,773
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	0,081	0,067	0,832

3.3.3. Produção de ramnolipídio por *P. aeruginosa* LBI com diferentes concentrações de glicerol

Foram conduzidas fermentações, em frasco, com *Pseudomonas aeruginosa* LBI para comparar diferentes concentrações de glicerol da BIOCAPITAL –Charquedda, SP (G2). A maior concentração de células foi obtida com 70g/L de glicerol residual como fonte de carbono, produzindo $7,40 \pm 0,02$ g/L de células (Fig. 3.5a), com esta concentração houve um consumo de 47% da fonte de carbono (Fig. 3.5c), após 72h de fermentação. Com as

concentrações de 50, 100 e 150g/L, a produção de biomassa foi $4,00 \pm 0,03\text{g/L}$, $2,60 \pm 0,02\text{g/L}$ e $2,30 \pm 0,02\text{g/L}$ e o consumo de glicerol foi de 96%, 6% e 8%, respectivamente. Estatisticamente a diferenças de consumo da fonte de carbono são significativas ($p\text{-value} < 0,05$), no entanto não existem diferenças significativas ($p\text{-value} > 0,05$) na concentração celular obtida com as diferentes concentrações.

Figura 3.5. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI utilizando diferentes concentrações de glicerol. **a)** Crescimento celular; **b)** Produção de ramnolipídio; **c)** Consumo da fonte de carbono.



Souza *et al.* (2014) observaram que a concentração de glicerol exerceu influencia na produção de biomassa, no caso de *P. aeruginosa* MSIC02, pois depois de 72h de fermentação quando utilizaram 24g/L de glicerol, o micro-organismo entrou na fase estacionária; ao aumentar a concentração de glicerol (42g/L) a fase estacionaria começou mais cedo. No caso das fermentações realizadas neste trabalho, *P. aeruginosa* LBI entrou na fase estacionaria após 48h, quando foram utilizadas as concentrações de 50, 70 e 150g/L, no caso da concentração de 100g/L, o micro-organismo entrou na fase estacionaria depois de 24h, estes resultados podem confirmar que o glicerol não foi um fator limitante para o crescimento celular (SOUZA *et al.*, 2014), pois ainda tinha disponível substrato no meio quando a bactéria entrou na fase estacionaria.

Assim como observado para o crescimento, a produção de ramnolipídio aumentou conforme a concentração de glicerol diminuiu (Fig. 3.5 b-c). A produção máxima, utilizando 50g/L foi de $1,3 \pm 0,3$ g/L, e no caso das concentrações 70, 100 e 150 g/L, a produção foi de $0,43 \pm 0,01$ g/L; 0,008 e 0,010g/L (Fig. 3.5 b); estas diferenças na produção do biossurfactante são estatisticamente significativas (p-value<0,05).

Existem relatos que o glicerol, em altas concentrações, pode ter um efeito inibidor na síntese de ramnolipídio (SOUZA *et al.*, 2014), o que pode ser observado nos resultados obtidos, pois a medida que se elevou a concentração de glicerol, diminuiu a produção de ramnolipídio. Rahman *et al.* (2000) relata que a maior produção de ramnolipídios obtida foi de 1,66g/L quando usaram 6g/L de glicerol e que esta produção esteve associada à fase estacionária de *P. aeruginosa* DS10-120. Os resultados obtidos por Santa-Anna *et al.* (2002), indicam que ao utilizar 1% de glicerol PA, a fase estacionaria foi atingida depois de 40h e a partir desse momento a produção de ramnolipídios aumentou, até atingir uma concentração de 0,69 g/L de ramnolipídios.

Observou-se que a produção de ramnolipídios nas condições de 50 g/L e 70 g/L de G2, apresentou uma aceleração entre a 48 e 72h de fermentação, sendo este o período em que o micro-organismo entrou na fase estacionária, assim, é possível afirmar que, nestas condições, a produção de ramnolipídio está associada a fase estacionária de crescimento do micro-organismo, caracterizando-o como um metabolito secundário, corroborando o que foi descrito por Souza *et al* (2014). No caso da concentração de 70 g/L de G2, como dito anteriormente, houve um decréscimo considerável na concentração do biossurfactante, o que pode estar relacionado com o consumo do ramnolipídio como fonte de carbono, explicando o aumento na produção da biomassa depois de 120h.

Como mencionado anteriormente, as impurezas do glicerol (metanol, etanol, sais, metais pesados, etc), em altas concentrações podem ser tóxicas para o micro-organismo. Fu *et al.* (2015), apresentaram resultados onde confirmam que em baixas concentrações, estes interferentes não são tóxicos e provavelmente serviriam como nutrientes adicionais para *P. putida* LS46. Estes resultados concordam com os obtidos neste estudo, pois a medida que foi diminuída a concentração de glicerol o micro-organismo apresentou uma melhor adaptação tanto para crescimento quanto para produção de ramnolipídios. Santa-Anna *et al.* (2002) indicam também que altas concentrações de glicerol podem ter um efeito inibitório no metabolismo bacteriano devido a possíveis deficiências no transporte do metabolito.

Os fatores de conversão biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$), são apresentados na Tabela 3.5. Analisando-se tais fatores, observa-se que a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI, em meio com 50g/L de fonte de carbono

exibiu maior taxa de conversão de produto/biomassa ($Y_{p/x}$) e de produto/substrato($Y_{p/s}$); o metabolismo celular parece ter sido direcionado para a produção de biomassa, porém, a medida que diminuiu a concentração de glicerol houve um aumento na taxa de conversão de produto/substrato e produto/biomassa, provavelmente devido a uma inibição da produção dos ramnolipídios por causa das altas concentrações do glicerol.

Tabela 3.5 - Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* 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 ($Y_{p/s}$)

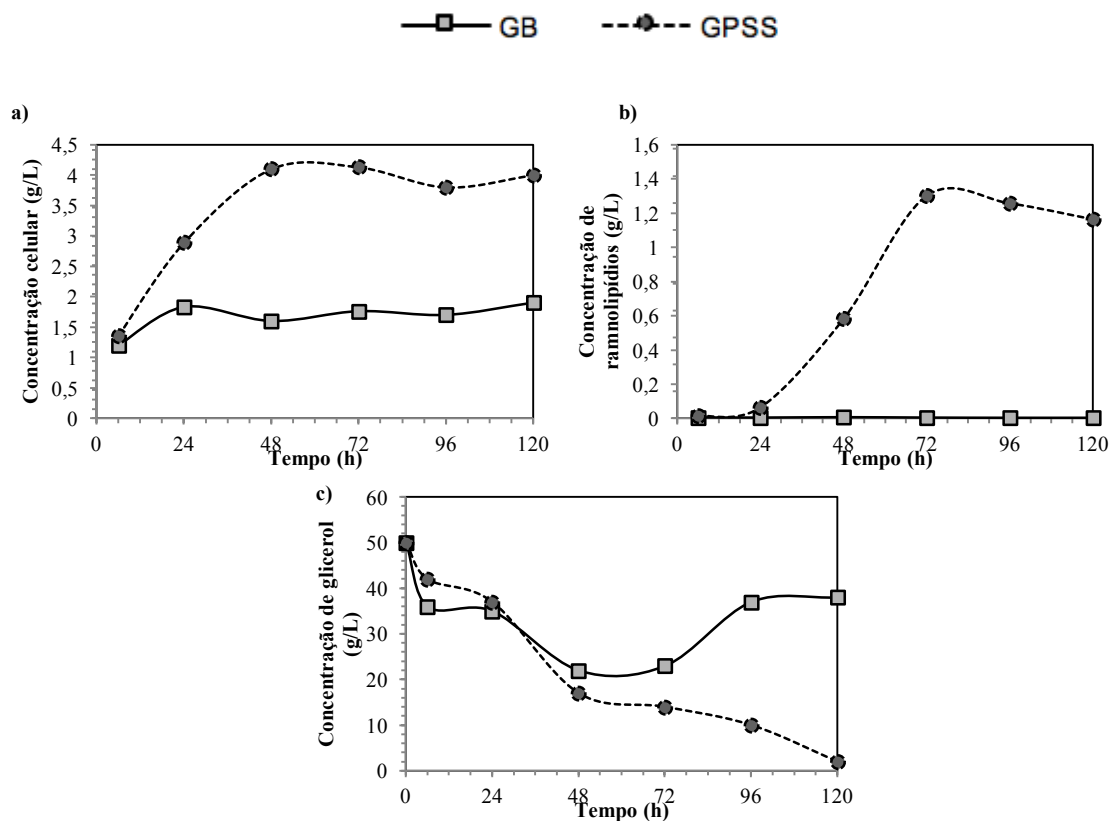
Concentração de Glicerol	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
50g/L	0,066	0,051	0,773
70g/L	0,11	0,001	0,013
100g/L	0	0,002	0,002
150g/L	0,007	0,0005	0,006

3.3.4. Comparação da produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI com dois tipos de glicerol residual: glicerol purificado sem sal (G2) e glicerol bruto (G3).

De acordo com es resultados anteriores, foi escolhida a concentração de 50g/L para comparar dois tipos de glicerol provenientes da mesma indústria. Nos resultados da Fig. 3.6 é possível observar que o G2 foi melhor substrato em relação ao G3, pois a biomassa obtida foi $4,00 \pm 0,02$ g/L e $1,90 \pm 0,01$ g/L, respectivamente.

A síntese de ramnolipídio foi superior com G2, alcançando $1,3 \pm 0,3$ g/L, e $0,003$ g/L a-com G3, sendo estatisticamente diferentes (p-value<0,05) estes resultados. O consumo da fonte de carbono foi de 96% empregando o G2 e 54% com o G3 (Fig. 3.6 c).

Figura 3.6. Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* LBI utilizando Glicerol Purificado Sem Sal (G2) e Glicerol Bruto (G3). **a)** Crescimento celular; **b)** Produção de ramnolipídio; **c)** Consumo da fonte de carbono.



Na tabela 3.6 são apresentadas as relações biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$) para as fermentações conduzidas com G2 e G3. Os maiores valores da relação biomassa/substrato ($Y_{x/s}$); produto/biomassa ($Y_{p/x}$); produto/substrato ($Y_{p/s}$), foram obtidos utilizando o G2 como fonte de carbono. Provavelmente devido a uma inibição tanto do crescimento quanto da produção pela presença de interferentes e contaminantes no G3, sendo este um glicerol que não teve nenhum tratamento de purificação depois da obtenção.

Tabela 3.6 - Comparação das fermentações com *P. aeruginosa* 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 ($Y_{p/s}$)

Tipo de Glicerol	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{p/x}$
G2	0,066	0,051	0,773
G3	0	0,001	0,003

Como descrito anteriormente, é possível que as impurezas do G3 tenham interferido nos processos metabólicos de *P. aeruginosa* LBI. Verhoef *et al.* (2014) relatam o uso do glicerol bruto como fonte de carbono, as impurezas contidas no glicerol foram tomadas como elementos traços no meio de cultivo, assim os autores não adicionaram elementos traços e obtiveram um crescimento celular considerável. Neste caso, é possível que as impurezas do

glicerol (G3) junto com os elementos traços adicionados no meio tenham causado uma inibição no crescimento do micro-organismo e, portanto, na síntese de ramnolipídio.

Foi evidenciado que o glicerol bruto é uma fonte de carbono viável para produção de ramnolipídios, a concentração em que este substrato é utilizado teve influencia no metabolismo das linhagens estudadas. A linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 apresentou a melhor produção de ramnolipídios (2,55 g/L), utilizando uma concentração de glicerol de 50 g/L, que foi a menor concentração avaliada. Dependendo do tipo de tratamento que esse glicerol bruto tiver, pode melhorar a sua condição para ser utilizado como fonte de carbono, *P. aeruginosa* LBI apresentou uma maior produção de ramnolipídios quando a fonte de carbono era glicerol bruto tratado frente ao glicerol bruto não tratado, 1,3 g/L e 0,003 g/L respectivamente.

4. CAPÍTULO II

PROPRIEDADES DE SOLUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL

4.1. INTRODUÇÃO

Por serem moléculas anfipáticas, os ramnolipídios possuem propriedades tenso-ativas permitindo a interação das interfaces entre uma parte aquosa e outra não aquosa numa solução (MARCHANT & BANAT, 2012). Atuam também como emulsificantes, reduzem a tensão superficial de 72mN/m para valores menores que 30mN/m e possuem uma concentração crítica micelar (CMC) que pode variar entre 5 e 200 mg/L, estas propriedades variam de acordo com a proporção dos homólogos presentes na solução (HABA *et al.*, 2003).

Os ramnolipídios possuem a característica de manter a sua atividade de superfície e de emulsificação quando submetidos a grandes variações de pH ou condições extremas de temperatura (LOVAGLIO *et al.*, 2011; PORNSUNTHORNTAWEE *et al.*, 2009). Esta propriedade dos ramnolipídios permite que tenham uma boa aplicabilidade em vários processos industriais de produção de alimentos, fármacos e cosméticos e em processos ambientais de biorremediação ou biodegradação de compostos tóxicos (LOVAGLIO *et al.*, 2011).

Na literatura existem relatos sobre emulsões de n-alcenos, 1-alquenos, compostos aromáticos, petróleo, querosene, óleos vegetais em sistemas aquosos que são estabilizados pelos ramnolipídios e que perderam entre 5% e 25% da estabilidade da emulsão depois de 24 h, dependendo do substrato (LANG & WULLBRANDT, 1999; LOVAGLIO *et al.*, 2011).

Uma interessante propriedade dos ramnolipídios é a formação de várias estruturas que podem ser reversíveis pelo fato deles apresentarem um ácido carboxílico, isto em dependência da variação do pH (KITAMOTO *et al.*, 2009). As estruturas que podem se formar de maneira espontânea são as micelas em pH acima de 6,8, as partículas lipídicas são formadas na faixa de pH 6,6 -6,2, as estruturas lamelares ocorrem quando o pH varia entre 6,5 e 6,0 e finalmente as vesículas são formadas quando a solução atinge pH 5,8 – 4,3 (KITAMOTO *et al.*, 2009). Outros fatores que podem influenciar na formação destas estruturas são os aditivos ou co-solutos, álcoois ou metais (CHAMPION *et al.*, 1995; VILLENEUVE *et al.*, 1998).

Os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* podem ter a forma de mono-ramnolipídios e di-ramnolipídios. O uso de técnicas analíticas como a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas (LC-MS) permitem visualizar os homólogos de ramnolipídios, entre os mais comuns aparece RL1 (Rha₂C₁₀C₁₀), RL2

(RhaC₁₀C₁₀), RL3 (Rha₂C₁₀) e RL4 (RhaC₁₀); no entanto existem mais de 60 espécies de homólogos produzidas por diferentes espécies de *Pseudomonas* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). O tipo de ramnolipídio que é produzido dependerá da linhagem produtora, da fonte de carbono, do meio de cultura e das condições de cultivo (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984).

Com o intuito de estudar as propriedades de solução dos ramnolipídios produzidos pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* 2A1 utilizando glicerol residual como fonte de carbono, foi avaliado o efeito da temperatura e adição de álcool n-propil nas soluções do biossurfactante, bem como a variação de pH nas propriedades de solução dos ramnolipídios. Além disso, foi realizada microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-MEV) para caracterização dos agregados produzidos. Finalmente foi realizada análise por espectrometria de massas dos homólogos produzidos.

4.2. MATERIAL E METODOS

A partir dos resultados do capítulo anterior foi escolhida a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 e o glicerol G2, como fonte de carbono para produzir os ramnolipídios que foram caracterizados, e avaliadas as propriedades de solução.

Os experimentos para produção de ramnolipídios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 300 mL de meio de cultura (descrito no Capítulo I). Os frascos foram mantidos em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 72 horas.

4.2.1. Extração de Ramnolipídios

Foi centrifugado o volume total do frasco depois das 72 h de fermentação. O caldo livre de células foi acidificado com H₃PO₄ 85% 1:100 (v/v), levando a precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do ramnolipídio utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do biossurfactante. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

4.2.2. Análise da estabilidade do biossurfactante e propriedades de solução

Foi avaliado o efeito de diferentes parâmetros que podem afetar a atividade do biossurfactante. Dos ramnolipídios extraídos segundo a metodologia descrita anteriormente foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 1,0; 10; 100; 500; 1000 mg/L. A estabilidade das soluções com respeito à temperatura foi avaliada; as soluções foram aquecidas na autoclave a 121 °C por 15 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas com as soluções à temperatura ambiente e sem controle de pH.

Analisou-se o efeito do pH (5-8) na formação de agregados, assim como o efeito da adição de diferentes concentrações de álcool n-propil (10-70%) sem controle e variando o pH (5 – 8). Todas as leituras foram realizadas com as soluções a temperatura ambiente. Como controle foi utilizada a solução de ramnolipídios em água ultrapura sem adição de álcool nem controle de pH. Para avaliar se existe um efeito sinérgico entre a variação de pH e o aditivo foi utilizado como controle as soluções com pH ajustado sem adicionar n-propil e aquelas com aditivo sem controle de pH.

4.2.3. Atividade de emulsificação (E₂₄)

A atividade de emulsificação foi determinada nas soluções descritas no item 4.2.2. Todos os experimentos foram realizados em tubos de ensaio, adicionando 2mL de solução de ramnolipídios a ser avaliada e 2 mL de solução de óleo mineral e óleos essenciais de cravo e citronela. A mistura foi homogeneizada em vórtex durante 2 minutos e deixaram-se os tubos em repouso durante 24 horas. A atividade de emulsificação foi calculada com a seguinte equação:

$$E_{24} = \frac{AE}{AT} \times 100$$

Onde: *AE*= Altura emulsionada; *AT*=Altura total

4.2.4. Caracterização dos Homólogos de Ramnolipídios por Espectrometria de Massas

A partir do ramnolipídio extraído foi preparada uma solução stock de 3000 ppm, o ramnolipídio foi dissolvido em água ultra-pura. A caracterização dos homólogos foi feita utilizando Ionização por Electrospray (Turbo Ion Spray) no modo negativo, utilizado um espectrômetro de massas 3200 QTRAP (quadrupolo – ion trap linear), AB Sciex. A concentração da amostra foi de 20ppm. O solvente utilizado foi uma solução de metanol/água (1:1) + 0.1% de hidróxido de amônio, a amostra foi injetada com um fluxo de 10 µL/min. A faixa de massas analisada foi de 100 a 1000 *m/z*. As condições de operação utilizadas foram: Ion Spray: -4500 V, Curtain Gas:10 psi, Gas 1:15 psi, DP (Declustering Potential): -20.0 V, EP (Entrance Potential): -7.0 V e CEP (Cell entrance potential): -12.0 V. Para o experimento de fragmentação do ion (MS2 - Fragment ion experiment) Energia de colisão: 35.0 V +/- 15.0V.

4.2.5. Métodos Analíticos

4.2.5.1. Tensão superficial

As medidas de tensão superficial das soluções de ramnolipídios foram realizadas a 25°C, utilizando o método do anel de De Nöuy utilizando-se um tensiômetro Krüss K6. As medidas foram feitas em triplicata.

4.2.5.2. Turbidez

As medidas de turbidez das soluções de ramnolipídios foram realizadas em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC à 600 nm, e temperatura ambiente, sendo realizadas em triplicata.

4.2.5.3. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos agregados formados pelos ramnolipídios foi observada com MEV utilizando um microscópio de varredura de alta resolução (FEG-MEV) JEOL modelo 7500F. Uma gota da solução a avaliar foi colocada em um substrato condutor composto por Silício e deixou-se secar durante 4 dias a temperatura ambiente, após a secagem das amostras foi feito o recobrimento com carbono.

4.2.6. Análise estatística

Foi analisada a normalidade dos dados com a prova Shapiro wilk ($\alpha=0,05$). Aplicou-se uma prova paramétrica (ANOVA, $\alpha=0,05$) para avaliar se existem diferenças entre as médias dos tratamentos. Por fim, para comparar entre quais tratamento existem diferenças, foi aplicada o test de Tukey-Kramer (key-Kr). Foi utilizado o software R (versão 3.2.0).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

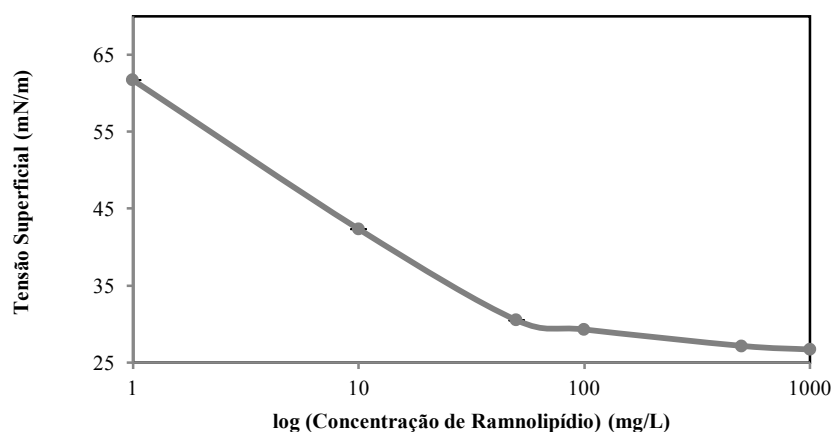
4.3.1. Análise da estabilidade do biossurfactante e propriedades de solução

Os resultados a seguir mostram as análises realizadas para avaliar a estabilidade do biossurfactante e as suas propriedades de solução. O ramnolipídio avaliado foi produzido pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1.

4.3.1.1. Solução de ramnolipídios sem aditivos

O perfil da curva de tensão superficial versus a concentração de ramnolipídios é apresentada na figura 4.1. A tensão superficial da água ultra-pura foi reduzida de 72,0 mN/m até 26,6 mN/m quando utilizados 1000 mg/L de ramnolipídios.

Figura 4.1 Curva tensão superficial (mN/m) versus concentração de ramnolipídios (mg/L)



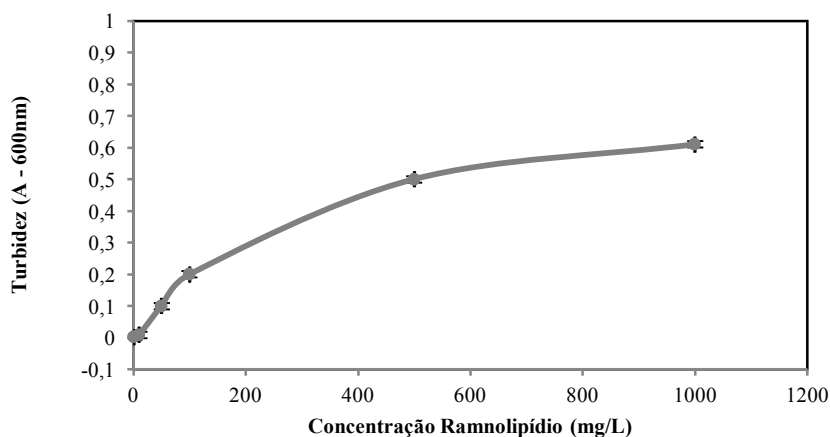
A descrição do perfil das curvas de tensão superficial em função da concentração de ramnolipídios tem sido feita por vários autores uma vez que é uma propriedade importante na hora de caracterizar os tensoativos. Foi reportado por Lovaglio *et al.* (2014) uma redução gradual da tensão superficial quando utilizadas concentrações menores que 30 mg/L, sendo este o primeiro ponto de transição, ao aumentar a concentração de ramnolipídios a pente da curva foi reduzida pois o número de agregados aumentou, mas diminuíram os monômeros livres. Reportaram também que a CMC dos ramnolipídios utilizados foi ~100mg/L. No estudo realizado por Pornsunthorntawe *et al.* (2009) foram descritos dois pontos de transição das soluções dos ramnolipídios utilizados nesse estudo, o primeiro ponto foi de 40 mg/L associado à formação de micelas de mono-ramnolipídios, e o segundo ponto foi em 200 mg/L que foi associado à concentração crítica micelar (CMC) do tensoativo utilizado.

Dependendo da fonte de carbono utilizada a proporção de ramnolipídios pode variar, neste caso a fonte de carbono utilizada foi glicerol, e com respeito á tensão superficial do tensoativo produzido, foram observados dois pontos de transição que ocorreram em 50 mg/L e em 100 mg/L. Em concentrações menores de 50 mg/L a intensidade da redução da tensão superficial foi menor e quando a concentração superava 100 mg/L a tendência era estabilizar a redução da tensão. No seu estudo, Lovaglio *et al.* (2014) utilizaram a mesma linhagem, *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, mas a fonte de carbono utilizada por eles era hidrofóbica.

Sabe-se que as proporções dos homólogos é dependente da fonte de carbono utilizada (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984) e que essa diferença na proporção pode causar uma variação no número de zonas de transição que leva à formação de micelas em diferentes concentrações (COHEN & EXEROWA, 2007; HAN *et al.*, 2004).

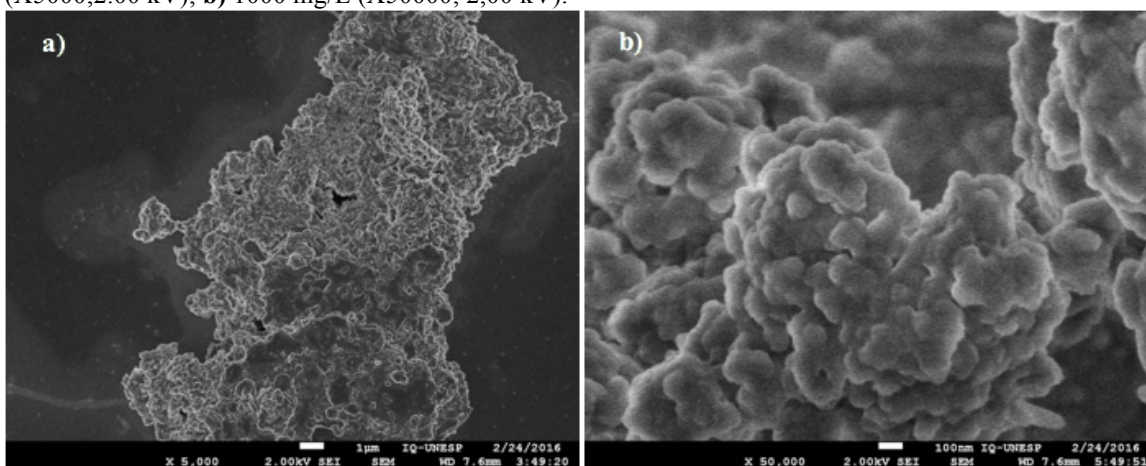
Outra propriedade para avaliar as propriedades de solução dos ramnolipídios é a turbidez e a formação de micelas e agregados. Na figura 4.2 é apresentada a curva de turbidez (A_{600nm}) em função da variação da concentração de ramnolipídios.

Figura 4.2 Medição da turbidez (A_{600nm}) de diferentes concentrações de ramnolipídios (1 – 1000 mg/L)



A medida de turbidez aumenta com o aumento da concentração de biossurfactante. O ponto onde a medida da turbidez começa a aumentar com maior intensidade ocorre depois de 100 mg/L. A absorção máxima obtida foi 0,61 com a solução de 1000 mg/L, com a inclinação que a reta apresenta é possível afirmar que os valores e turbidez, após esta concentração terão uma estabilização.

Figura 4.3 Micrografias de agregados formados em diferentes concentrações de ramnolipídios. **a)** 100mg/L (X5000;2,00 kV); **b)** 1000 mg/L (X50000; 2,00 kV).

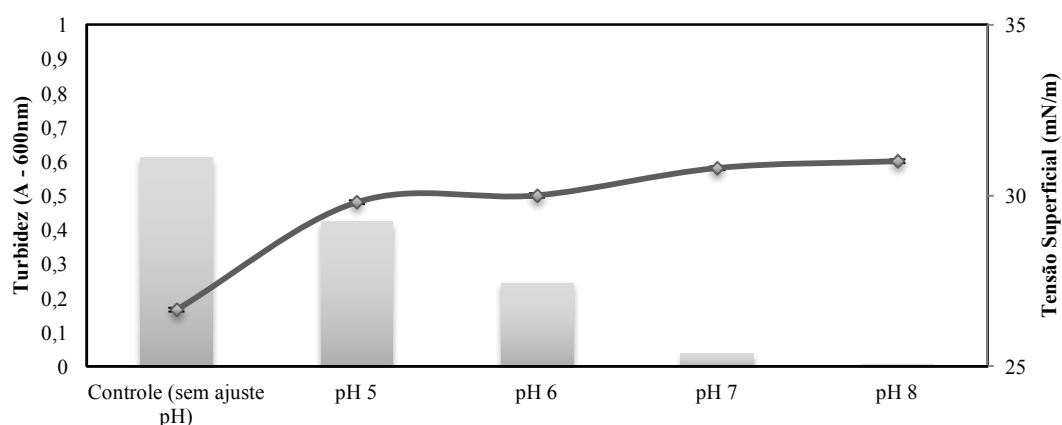


Com a finalidade de visualizar e confirmar os agregados formados pelos ramnolipídios realizou-se microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-SEM) da solução de 100 mg/L, determinado com a CMC e que foi no ponto onde começou-se a obter incrementos nas medidas de turbidez, e da solução de 1000 mg/L que foi onde se percebeu que a curva

começou a se estabilizar. É importante destacar que para estas soluções o pH não foi ajustado, a faixa de pH deste soluções estava entre $4,39 \pm 0,01$ e $5,09 \pm 0,02$. Estas são as condições em que os ramnolipídios começam a ter interações para a formação espontânea de agregados (ISHIGAMI *et al.*, 1993), além da concentração ser um fator importante.

Um dos fatores que mais influencia na formação de agregados de ramnolipídios é o ajuste de pH, segundo Lovaglio *et al.* (2011) a variação de pH influencia na CMC, na tensão superficial mínima e nos coeficientes de elasticidade, que estão relacionados á atividade de emulsificação. Na figura 4.4 é apresentada a medição da turbidez e da tensão superficial com respeito á variação de pH em uma solução de ramnolipídios de 1000 mg/L.

Figura 4.4 Influência do pH na variação da turbidez e da tensão superficial. Barras: Turbidez; Linhas: Tensão superficial.



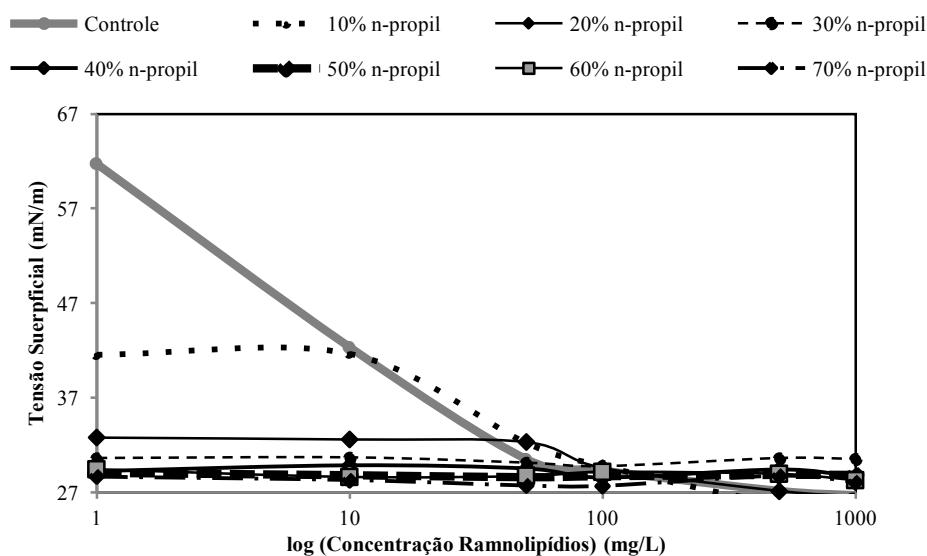
A medida da turbidez foi diminuindo a medida que o pH foi aumentando, havendo diferenças significativas entre os tratamentos ($p\text{-value} < 0,05$), no entanto, a tensão superficial manteve-se estável quando o pH foi ajustado, não houve diferenças significativas entre as tensões superficiais dos tratamentos ($p\text{-value} > 0,05$), porém, todas as soluções apresentaram diferenças significativas com o controle.

De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que os ramnolipídios apresentaram um comportamento como o descrito por Kitamoto *et al.* (2009), pois a morfologia dos agregados de ramnolipídios varia de acordo com o pH que a solução apresentar. Quando o pH está acima de 6,8 há formação de micelas, as partículas lipídicas são formadas a pH 6,6 -6,2, já quando o pH está entre 6,5 e 6,0 ocorrem as estruturas lamelares e as vesículas são formadas na solução com pH 5,8 – 4,3. Quando ajustado o pH para 5 e 6 foram obtidas as maiores medidas de turbidez além do controle que apresentava um pH de $4,39 \pm 0,01$. Segundo Ishigami *et al.* (1993) o pKa dos ramnolipídios é 5,6 sendo que na faixa de pH de 4,3 a 5,8 os ramnolipídios tem a tendência de se aglomerar devido a ausência de repulsão eletrostática entre as moléculas.

4.3.1.2. Efeito da adição de álcool n-propil

Já foi reportado que a adição de álcoois causa efeito na formação de agregados e nas propriedades de solução dos ramnolipídios (LOVAGLIO *et al.*, 2014; PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2006). Na figura 4.5, é apresentada a variação da tensão superficial dos ramnolipídios (1 - 1000 mg/L) em diferentes concentrações de álcool n-propil (10% - 70%). Uma das possíveis aplicações dos ramnolipídios é na indústria cosmética e farmacêutica; os álcoois são amplamente utilizados nestas duas indústrias como solventes e para manter as condições do produto estáveis. Os ramnolipídios podem ser incorporados como agentes emulsificantes e também como agentes antimicrobianos, por isso é importante avaliar a estabilidade do tensoativo em presença do álcool n-propil.

Figura 4.5. Efeito da concentração de álcool n-propil na tensão superficial (mN/m) de soluções de ramnolipídios



Os álcoois têm partes hidrofílicas e hidrofóbicas na sua estrutura química, pelo que atuam como co-surfactante e interage como ramnolipídio formando pontes de hidrogênio entre o grupo hidroxilo do álcool e o grupo hidroxilo da cabeça hidrofílica do biossurfactante permitindo vesículas mistas de ramnolipídios-álcool. A presença do álcool no agregado aumenta a área superficial da vesícula onde a carga está localizada, reduzindo assim a carga de densidade superficial, portanto as moléculas dos ramnolipídios são dissociadas, há um aumento na repulsão eletrostática e é reduzido o tamanho do agregado (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2009).

As soluções de 10% e 20% apresentaram uma redução da tensão superficial do 67% e 53% respectivamente, com 1 mg/L, com respeito ao controle. Nestas duas concentrações de n-propil houve um ponto de transição perto de 100 mg/L que corresponde ao início da agregação dos monômeros de ramnolipídios, neste caso o álcool pode estar agindo como co-surfactante.

A partir de 30% de álcool n-propil na solução de ramnolipídios a tensão superficial não apresentou muita variação, manteve-se entre $28,1 \pm 0,01$ e $30,68 \pm 0,001$ e não houve pontos de transição. Houve diferenças significativas entre os tratamentos e o controle (p -value $< 0,05$).

Lovaglio *et al.* (2014) avaliaram a estabilidade dos ramnolipídios, produzidos com a mesma linhagem, mas com fonte de carbono hidrofóbica, em presença de etanol. A tensão superficial não apresentou muita variação com respeito ao controle, mas a CMC das soluções foi reduzida em presença do aditivo, o pH da solução não foi controlado ($4,3 \pm 0,04$) o que manteve menos reativos os ramnolipídios. Já Pornsunthorntawee *et al.* (2009), descreveu que o incremento de etanol nas soluções aumentou a sua CMC, isto devido a solução de ramnolipídios avaliada ser preparada em tampão fosfato, o que deixou desprotonadas as moléculas do biossurfactante e, portanto, mais suscetíveis aos aditivos.

Nesta parte do estudo não foi controlado o pH das soluções, a variação de pH das soluções de ramnolipídios (1 – 1000 mg/L) nas concentrações de 10 - 70% de álcool n-propil é apresentada na tabela 4.1, é possível observar que a menor concentração de ramnolipídios e de álcool menos protonados se encontram os ramnolipídios reagindo mais, este comportamento só foi observado quando adicionado 10% e 20% de n-propil, o que ocasiona o ponto de transição nestes dois tratamentos.

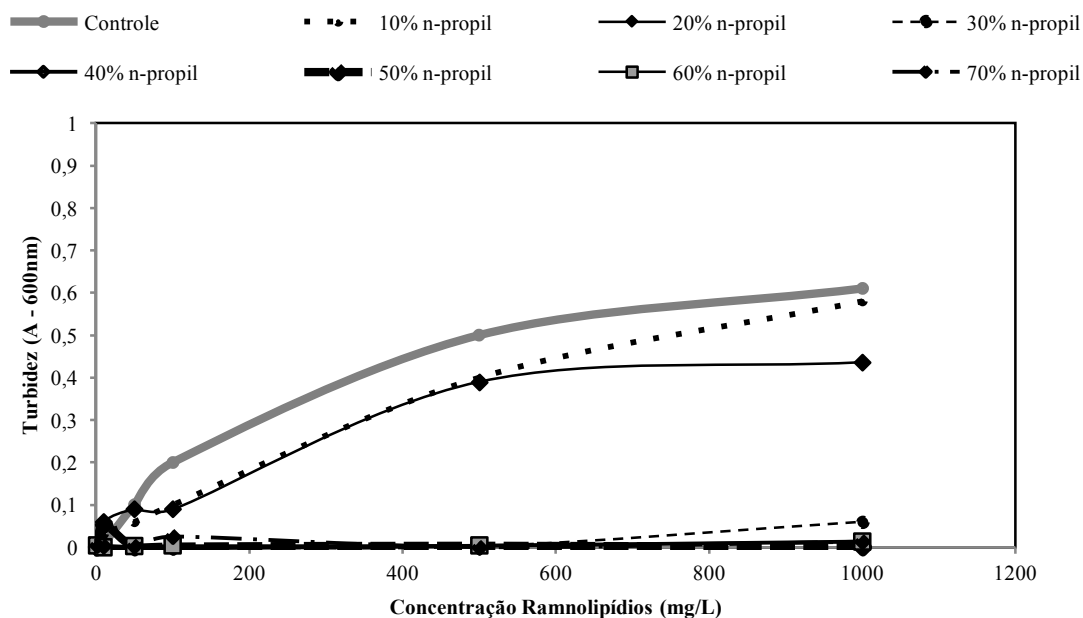
Tabela 4.1 – pH das soluções de ramnolipídios com respeito ao ajuste na concentração de n-propil

% Álcool n-propil	Varição pH solução ramnolipídios (1 – 1000 mg/L)
10%	$7,35 \pm 0,01$ e $4,07 \pm 0,02$
20%	$7,28 \pm 0,01$ e $4,45 \pm 0,01$
30%	$7,2 \pm 0,03$ e $5,01 \pm 0,01$
40%	$7,12 \pm 0,02$ e $5,07 \pm 0,02$
50%	$7,00 \pm 0,02$ e $5,99 \pm 0,03$
60%	$7,01 \pm 0,01$ e $6,65 \pm 0,02$
70%	$7,01 \pm 0,01$ e $6,8 \pm 0,03$

No caso da medida da turbidez, ocorreu o mesmo fenômeno observado ao medir a tensão superficial, onde só houve uma variação notável nas concentrações de 10% e 20% (Figura 4.6). Esta variação ocorreu devido a formação e o tipo de agregados dependerem do pH (KITAMOTO *et al.* 2009), quanto menor concentração de n-propil, menor variação de pH

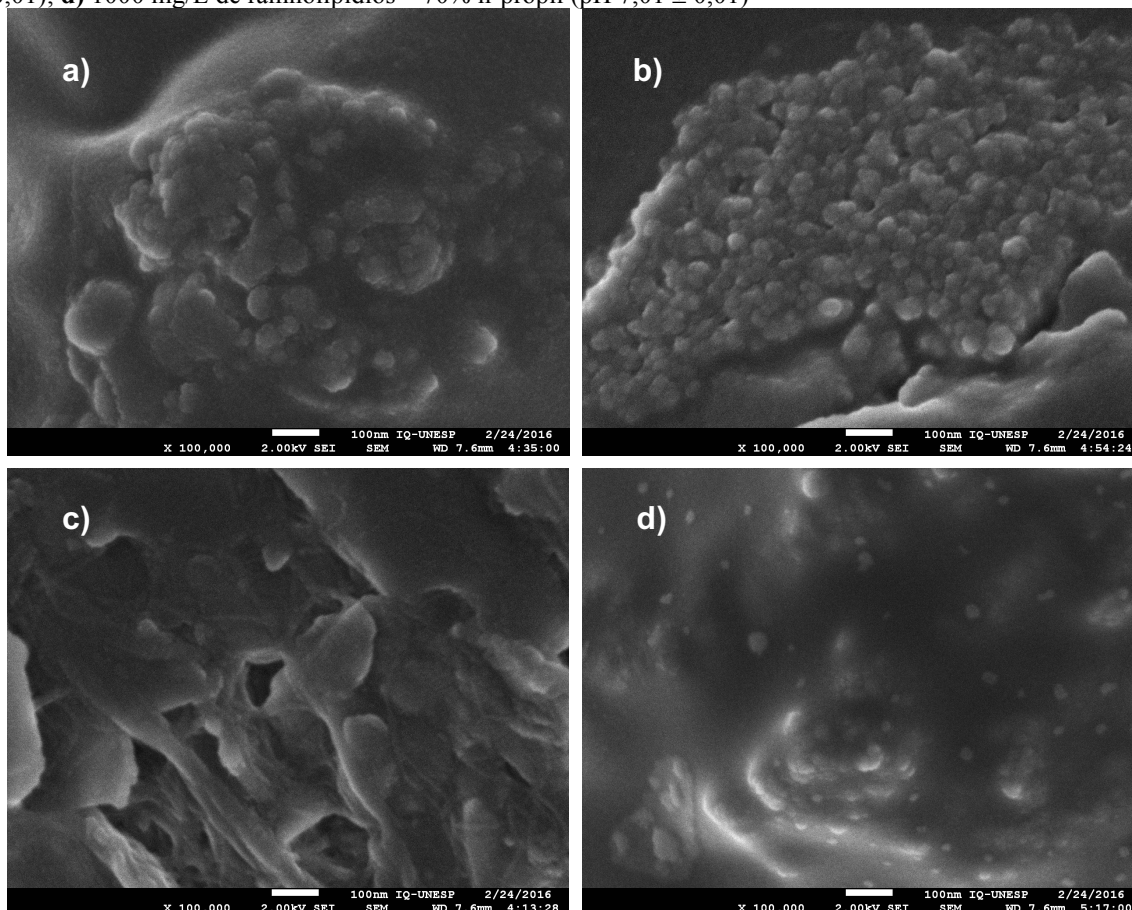
das soluções de ramnolipídio (Tabela 4.1), isto confirma o relatado por Lovaglio *et al.* (2014), que quando o valor do pH diminui na solução há menos protonação dos ramnolipídios, ocorrendo menos reação ao adicionar álcool. Da mesma maneira foi confirmado que a medida que aumenta a concentração de álcool, a formação de micelas não é favorecida, como descrito por Pornsunthorntawee *et al.* (2009).

Figura 4.6 Variação da turbidez com diferentes concentrações de álcool n-propil em função da concentração de ramnolipídios.



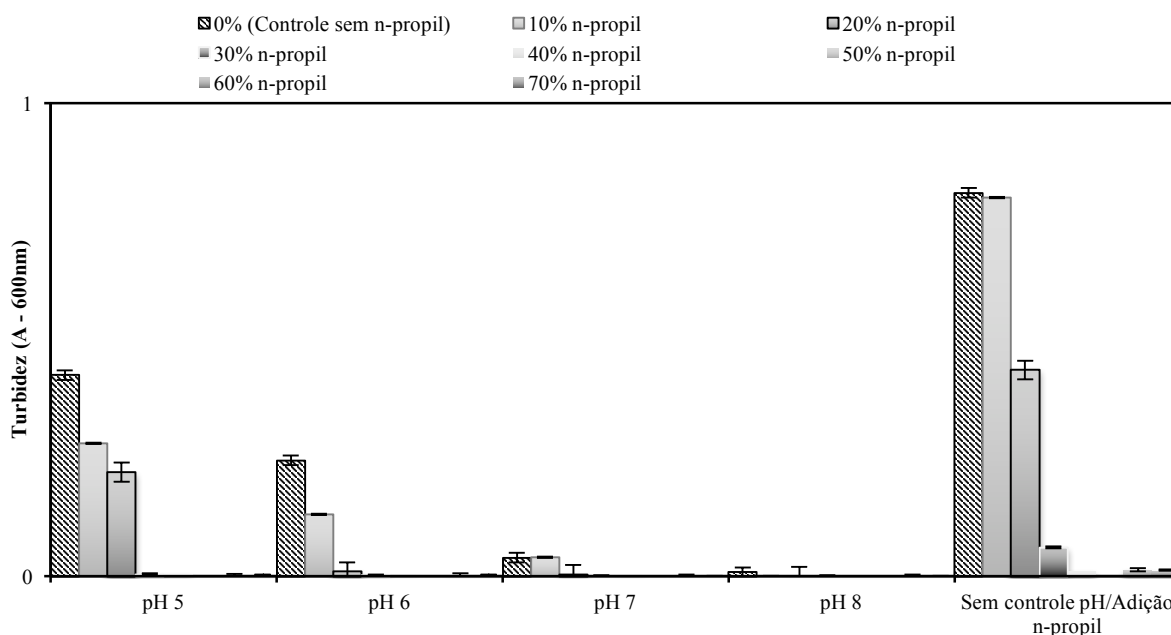
Na figura 4.7 são apresentadas as micrografias das soluções de ramnolipídios submetidas a diferentes concentrações de n-propil sem controle de pH. Na figura 4.7a – b aparecem as soluções de ramnolipídio de 100 mg/L e 1000 mg/L em uma solução com 10% n-propil, respectivamente; é possível observar que na concentração mais baixa (pH $5,17 \pm 0,02$) os agregados apresentam uma forma irregular, já na concentração mais alta (pH $7,35 \pm 0,01$) os agregados de ramnolipídios apresentam uma forma mais compacta, devido as interações que ocorrem por causa do pH. Ao aumentar a concentração de n-propil nas soluções de ramnolipídios corroborou-se que a interação do álcool com o biossurfactante não favoreceu a formação de tantos agregados quanto na concentração mais baixa de n-propil, confirmando assim os resultados obtidos nas medidas da turbidez.

Figura 4.7 Micrografias de agregados formados em diferentes concentrações de ramnolipídios e n-propil, sem ajuste de pH (X100.000 – 2,00kV) **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 $7,01 \pm 0,01$)



De acordo com os resultados anteriores, surgiu a dúvida se o álcool e o pH têm um efeito sinérgico na formação de agregados. Foram realizados testes com solução 1000 mg/L de ramnolipídio com adição de diferentes concentrações de n-propil (10% - 70%) controlando o pH. Como controle foi utilizada uma solução de ramnolipídios com ajuste de pH sem adição de álcool e uma solução sem ajuste de pH nas diferentes concentrações de álcool. Na figura 4.8 são apresentadas as medidas de turbidez das soluções descritas.

Figura 4.8 Efeito da variação de pH na turbidez das soluções de ramnolipídios (1000 mg/L) com diferentes concentrações de álcool n-propil (10% -70%).



A absorção das soluções com pH controlado diminuiu a medida que este ia aumentando, havendo diferenças significativas entre os tratamentos com respeito ao controle (p -value < 0,05). A adição de n-propil em concentrações acima de 20% diminuiu a agregação dos ramnolipídios, a turbidez das soluções sem n-propil foi maior em todos os casos, tanto quando foi controlado o pH, quanto no controle sem ajuste de pH. No seu estudo Pornsunthorntawee *et al.* (2009) relatam que com a adição de maiores concentrações de etanol a turbidez da solução diminui, confirmando que o tamanho do agregado foi reduzido por causa do etanol.

Foi avaliada a atividade de emulsificação da solução de ramnolipídios (1000 mg/L) contendo óleo mineral, de cravo e de citronela, ajustando o pH e a concentração de n-propil, como controle foi utilizada a solução sem ajuste de pH (Fig. 4.9). Após 24 horas foi evidenciado que o índice de emulsificação quando não foi controlado o pH, foi abaixo do 50% para todos os tratamentos. De acordo com Haba *et al.* (2003) a emulsão formada é razoavelmente estável.

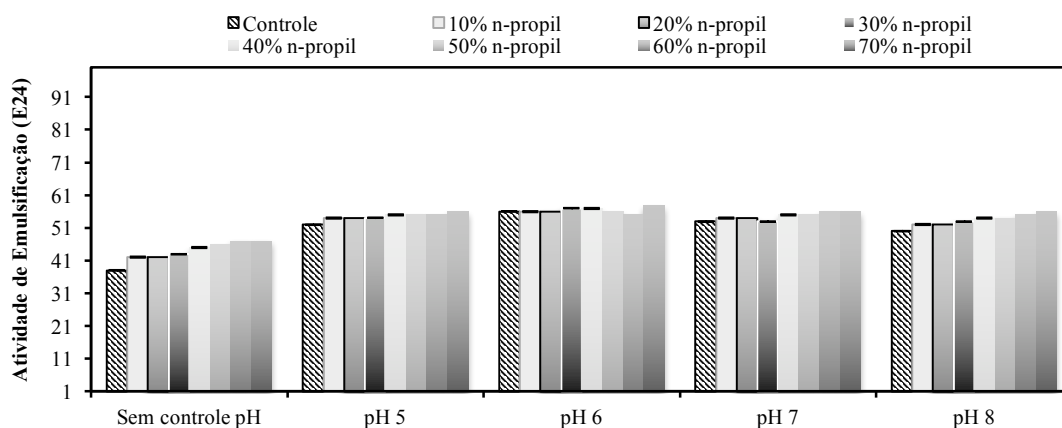
Não houve diferenças significativas entre os resultados de emulsificação obtidos com as soluções contendo óleo mineral, óleo de cravo e óleo de citronela (p -value < 0,05). Igualmente, não houve diferenças significativas entre os tratamentos e o controle de cada solução (p -value < 0,05).

Em todos os casos, óleo mineral, cravo e citronela, os maiores valores de Índice de Emulsificação (E_{24}) ocorreram quando o pH foi ajustado para 5 e para 6, nas concentrações de 60% e 70% de n-propil, respectivamente. Este resultado confirma a ação do álcool agindo

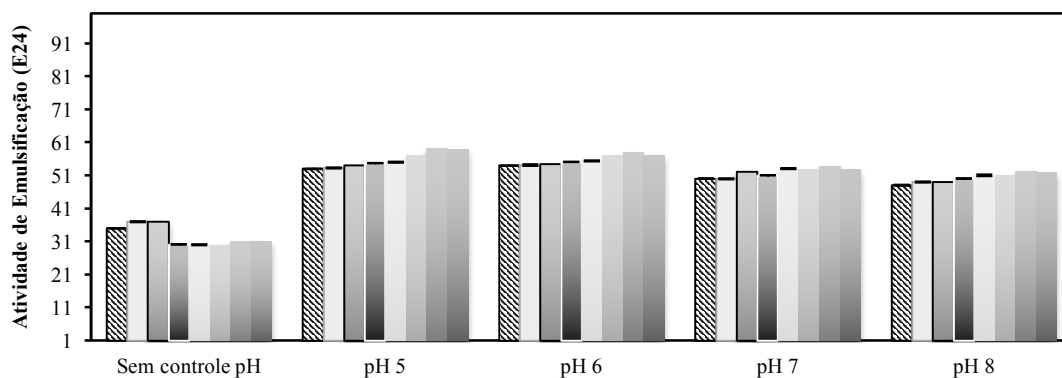
como co-surfactante e a influencia do pH na formação de agregados dos ramnolipídios. No entanto, o índice de emulsificação dos ramnolipídios com os substratos utilizados oscilou entre 48 e 59%. Pornsunthorntaweew *et al* (2007), reportaram que o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* SP4, tem a capacidade de emulsificar vários tipos de óleos vegetais, tais como óleo de palma, soja, coco e azeite de oliva, os índices de emulsificação reportados estão acima do 50%, indicando a viabilidade do biossurfactante para ser utilizado na indústria de alimentos, assim como na industria cosmética e farmacêutica.

Figura 4.9 Atividade de Emulsificação (E_{24}) de uma solução de ramnolipídios (1000 mg/L) com respeito à variação de pH e adição de álcool n-propil. **a)** Óleo mineral; **b)** Óleo de cravo; **c)** Óleo de citronela

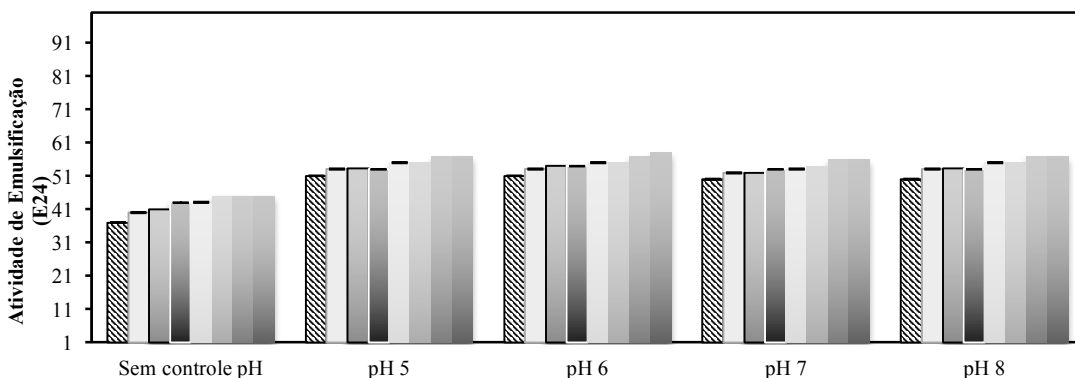
a).



b).



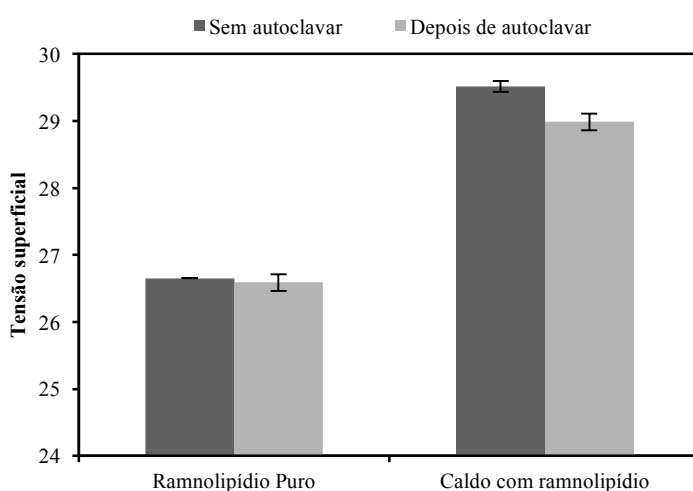
c).



4.3.1.3. Efeito da temperatura

Apesar do pH ser um dos fatores mais importantes nas propriedades de solução dos ramnolipídios, é importante estudar a influencia da temperatura como fator que afeta as propriedades tenso-ativas do biossurfactante, devido a que vários processos industriais utilizam variações de temperatura extremas ou requerem de temperaturas específicas para a formação de um composto ou conseguir realizar um processo, visando a aplicabilidade dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, foi avaliado o efeito da temperatura tanto no ramnolipídio extraído (1000 mg/L) quanto no caldo livre de células (2500 mg/L) medindo a tensão superficial das soluções (Figura 4.10).

Figura 4.10 Comparação da Tensão superficial antes e depois do processo de auto-clavagem de uma solução de ramnolipídio extraído (1000 mg/L) e do caldo livre de células com ramnolipídio presente (2500 mg/L)



Quando medida a tensão superficial na temperatura ambiente e depois de autoclavar, ficou evidenciado que o ramnolipídio tanto extraído quanto no caldo mantém uma certa estabilidade com respeito à sua atividade tensoativa. Houve uma pequena diminuição da tensão superficial depois de autoclavar o caldo livre de células o que pode indicar que com o processo de autoclavagem foi modificado algum componente presente no meio que não permitia uma disposição adequada dos monômeros de ramnolipídios na superfície da solução afetando a mesma, no entanto esta pequena variação não apresenta diferenças significativas com o caldo que não foi autoclavado.

4.3.2. Caracterização dos homólogos de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

O espectro de massas do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 apresentou uma mistura de mono e diramnolipídios, os íons m/z obtidos e a sua

correspondência com o devido congênere de ramnolipídio são apresentados na tabela 4.2. Foram identificados 9 homólogos de ramnolipídios com peso molecular entre 475 e 677.

Foi reportado por Nitschke *et al.* (2010) ao utilizar borra de óleo de soja como fonte de carbono houve a produção de 10 homólogos de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Já, Lovaglio *et al.* (2014) reportaram a produção de 9 homólogos de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, utilizando e óleo de girassol, mamona e borra de óleo de milho.

A variação da proporção de homólogos produzidos depende da linhagem, do meio de cultura utilizado, as condições de cultivo e o tempo da cultura (MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999). Esta variação na composição de homólogos, influencia as propriedades físico-químicas dos ramnolipídios (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; PERFUMO *et al.*, 2006).

Tabela 4.2 – Composição elementar e abundância relativa dos homólogos de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 determinado por ESI (-) - MS

Homólogos	[M-H] ⁻ m/z	Abundância relativa (%)
RhaC ₈ C ₁₀ / RhaC ₁₀ C ₈	475	40
RhaC ₈ C _{10:1} / RhaC _{10:1} C ₈	476	8
RhaC ₁₀ C ₁₀	503	45
RhaC ₁₀ C _{12:1} / RhaC _{12:1} C ₁₀	529	12
RhaC ₁₀ C ₁₂ / RhaC ₁₂ C ₁₀	531	37
RhaRhaC ₈ C ₁₀ / RhaRhaC ₈ C ₁₀	621	63
RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	649	100
RhaRhaC ₁₀ C _{12:1} / RhaRhaC _{12:1} C ₁₀	675	19
RhaRhaC ₁₀ C ₁₂ / RhaRhaC ₁₂ C ₁₀	677	68

Lovaglio *et al.* (2014) observaram que o perfil de ramnolipídios pela linhagem foi semelhante ao utilizar três fontes de carbono hidrofóbicas e o emprego deste tipo de fonte de carbono poderia direcionar o metabolismo a não sintetizar *de novo* a porção lipídica. Eles obtiveram pelo menos 10 β-hidroxiácidos livres ou associadas na amostra analisada. Foi reportado que estes ácidos graxos não são provenientes da degradação de ramnolipídios e sim são intermediários dos mesmos. O mais provável é que estes intermediários provenham ou sejam sintetizados a partir das fontes de carbono hidrofílicas utilizadas pelos autores, como por exemplo os di e tri-hidroxiácidos que são produzidos a partir de ácido ricinolêico, principal componente do óleo de mamona (KIM *et al.*, 2000).

Neste estudo foi utilizado glicerol como fonte de carbono, em comparação com os resultados de Lovaglio *et al.* (2014), na amostra analisada foram detectados poucos β-hidroxiácidos que podem ser produto de resíduos oleosos presentes no glicerol cru utilizado. Por ser uma fonte de carbono hidrofílica, o glicerol demanda uma síntese *de novo* dos precursores dos ácidos graxos para depois entrar na β-oxidação; esta fonte de carbono está

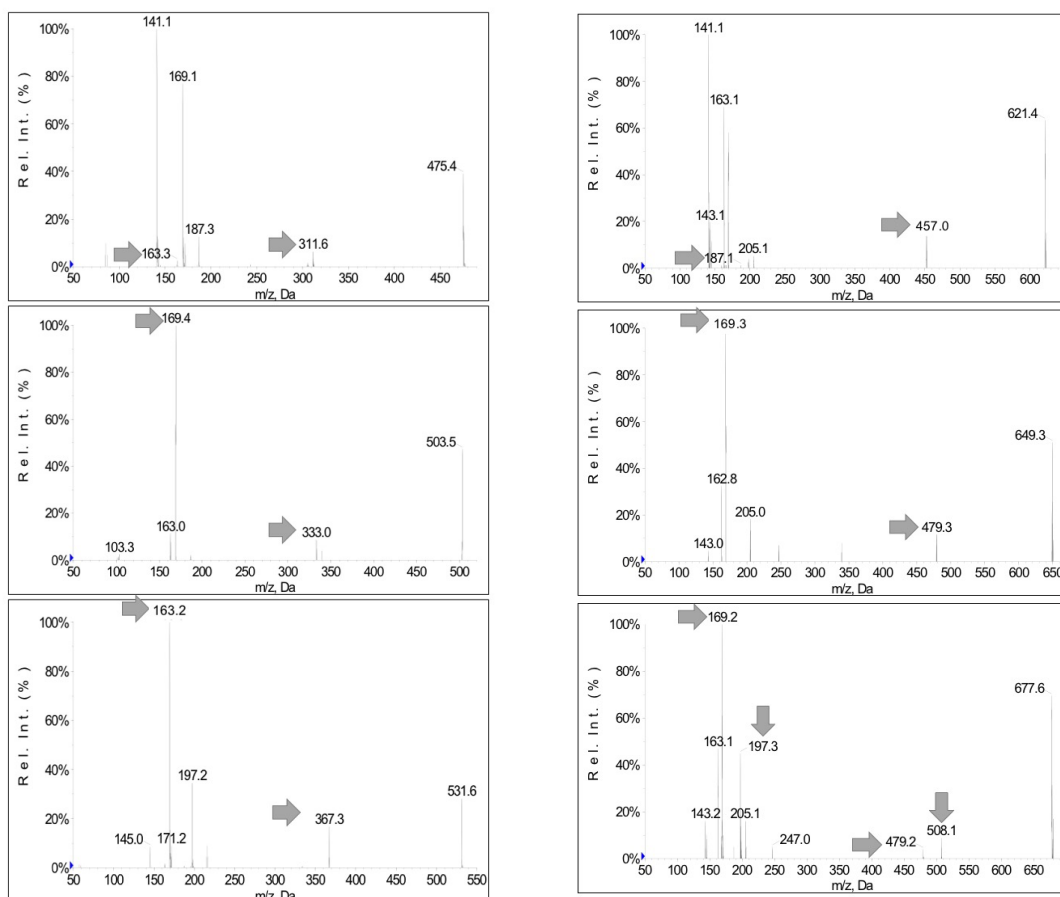
metabolicamente mais próxima para formar o precursor da ramnose (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2014).

Foi observado por Mata-Sandoval *et al.* (2001), a variação da fonte de carbono não alterou a composição dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UG2. Wadekar *et al.* (2011), reportou também ao utilizar tanto glicerol puro quanto glicerol crú não houve uma grande diferença na composição dos homólogos, no estudo deles não detetaram mono-ramnolipídios, a diferença dos resultados aqui reportados, pois foram reportados 6 homólogos de mono-ramnolipídios.

No caso do estudo de Deizel *et al.* (1999) foi sim reportada uma alteração na composição dos homólogos de ramnolipídios obtidos utilizando naftaleno e manitol como fonte de carbono. Ao comparar os resultados deste trabalho com o reportado com Lovaglio *et al.* (2014), pois nos dois estudos foi utilizada a mesma linhagem, não houve uma grande diferença na composição dos homólogos obtidos, mas sim na abundância relativa.

As fragmentações dos íons m/z 475, 503, 531, 621, 649 e 677 é apresentada na figura 4.11, onde é comprovada a composição lipídica e glicídica dos homólogos obtidos. Para o mono-ramnolipídio RhaC₈C₁₀ / RhaC₁₀C₈ (m/z 475) os principais íons fragmentados foram [Rha]⁻ (m/z 163) e [C₈C₁₀]⁻ (m/z 311). Para o mono-ramnolipídio RhaC₁₀C₁₀ (m/z 503) a fragmentação resultou nos íons [C₁₀]⁻ (m/z 169) e [RhaC₁₀]⁻ (m/z 333), que são originados a partir da ruptura da ligação éster.

Figura 4.11 – ESI (-) – MS/MS dos íons a) 475; b) 503; c) 531; d) 621; e) 649; f) 677.



Para os congêneres RhaC₁₀C₁₂ / RhaC₁₂C₁₀ (m/z 531), RhaRhaC₈C₁₀/RhaRhaC₁₀C₈ (m/z 621), RhaRhaC₁₀C₁₀ (m/z 649) e RhaRhaC₁₀C₁₂ / RhaRhaC₁₂C₁₀ (m/z 677), os íons fragmentados foram: [Rha]⁻ (m/z 163) e [C₁₀C₁₂]⁻ (m/z 367); [C₁₀]⁻ (m/z 187) e [RhaRhaC₈]⁻ (m/z 457); [C₁₀]⁻ (m/z 169) e [RhaRhaC₁₀]⁻ (m/z 479); [C₁₂]⁻ (m/z 197), [RhaRhaC₁₀]⁻ (m/z 479), [C₁₀]⁻ (m/z 169) e [RhaRhaC₁₂]⁻ (m/z 508); respectivamente.

Foi evidenciado que o valor do pH e a adição de álcool n-propil influenciam nas propriedades físico-químicas dos ramnolipídios. A agregação das moléculas aumentou quando o pH foi ajustado para valor maior na faixa de 5-8. O n-propil agiu como co-surfactante em concentrações entre 10 – 30%, acima dessa faixa, o n-propil agiu como solvente dos agregados de ramnolipídios. Por outra parte, a temperatura não modificou significativamente a estabilidade dos ramnolipídios tanto purificados quanto em caldo livre de células. Com a análise de MS/MS, foi comprovado que o perfil de ramnolipídios pode ver-se influenciado pela fonte de carbono utilizada.

5. CAPÍTULO III

RAMNOLIPÍDIOS COMO AGENTES ESTABILIZANTES NA FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

5.1. INTRODUÇÃO

Com o surgimento da nanotecnologia nos últimos anos aumentou aplicabilidade de materiais e estruturas da escala nano, que geralmente estão entre 1 e 100 nm. Esta tecnologia emergente tem sido acolhida principalmente na indústria biomédica, para o controle de micro-organismos que não são erradicados facilmente com formulações convencionais. A nanotecnologia permite sintetizar formulações que resistem à degradação ou desnaturação por causa de pH adstringentes, esta tecnologia permite também que a disseminação dos fármacos ocorra por um tempo prolongado mantendo-os estáveis (KIRAN *et al.* 2011).

Entre os nano objetos mais estudados para aplicações na indústria encontram-se os nanotubos, os nanocanais, os nanoporos, nanofibras e nanopartículas. Os materiais produzidos em escala nano têm sido bastante estudados para disseminação de fármacos, emulsões, criação de bio-materiais, bio-sensores e diagnóstico *in vitro* (KIRAN *et al.* 2011).

A síntese de nanopartículas geralmente é realizada por processos físicos e químicos complexos que incluem altas temperaturas e pressões. Além disso, o uso de compostos químicos tóxicos também é uma complicação na hora de realizar este processo, pois além de ser dispendioso tem uma implicação ambiental pela disposição dos químicos utilizados no processo (PLAZA *et al.*, 2014).

O método mais comum para a síntese de nanopartículas é o método de redução química utilizando agentes redutores como citrato, etileno glicol e hidrazina, que possuem implicação de risco ambiental alto (PLAZA *et al.*, 2014). Outros processos utilizados na síntese das nanopartículas é a redução fotoquímica, as técnicas de aerossol e a micelas reversas, onde são utilizados surfactantes cujo uso também tem implicações ambientais (KIRAN *et al.* 2011).

Consequentemente, tem surgido a nano-biotecnologia, onde a síntese das nanopartículas é mediada por métodos biológicos ou com a integração da biotecnologia microbiana, utilizando micro-organismos ou os seus produtos. Um dos processos de “*química verde*” para a síntese de nanopartículas é a fabricação de micelas reversas utilizando biosurfactantes (KIRAN *et al.* 2011).

Os ramnolipídios, biosurfactantes do tipo glicolipídico produzidos por bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, são uma opção viável para a síntese das nanopartículas

utilizando esta metodologia, por causa das propriedades físicas e químicas que apresentam. Estas moléculas têm a capacidade de formar estruturas de maneira espontânea, que podem ser reversíveis. O tipo de estrutura formada dependerá principalmente do pH da emulsão. Tem sido reportado que os ramnolipídios servem como protetores na formação de nanopartículas de prata quando expostas a NaCl (BHARALI *et al.*, 2013), assim como estabilizantes e ajudam na formação de nanopartículas com morfologia uniforme devido às forças de atração eletrostáticas (FARIAS *et al.*, 2014).

Visando a aplicabilidade dos ramnolipídios em diferentes campos da indústria, o objetivo deste capítulo foi estudar a formação de nanopartículas de prata mediada por ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de glicerol como subproduto da indústria do biodiesel.

5.2. MATERIAL E METODOS

A partir dos resultados do capítulo I foi escolhida a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 e o glicerol G2 como fonte de carbono para produzir os ramnolipídios que foram caracterizados e avaliadas as propriedades de solução.

Os experimentos para produção de ramnolipídios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 300 mL de meio de cultura (descrito no Capítulo I). Os frascos foram mantidos em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 72 horas.

5.2.1. Extração de Ramnolipídios

Foi centrifugado o volume total dos frascos depois das 72 h de fermentação. O caldo livre de células foi acidificado com H_3PO_4 85% 1:100 (v/v), levando a precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do ramnolipídio utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do biossurfactante. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

5.2.2. Síntese de Nanopartículas

Com o ramnolipídio purificado foi realizada a formação de micelas reversas com soluções de $AgNO_3$, metodologia modificada de Ganesh *et al.* (2010). Para produção das micelas reversas foram feitas duas soluções: primeiro misturou-se 0,15 mL de uma solução de 10g/L de ramnolipídio com 0,0008g de $AgNO_3$ e foi completado com água ultrapura o volume para 0,5 mL, esse volume foi misturado com 1,5g de n-butanol e n-heptano e na segunda foi feita a mesma mistura substituindo a o $AgNO_3$ por 0,15 g de $NaBH_4$. As duas soluções foram misturadas e agitadas durante 1 h até conseguir a formação homogênea das

micelas. As nanopartículas foram extraídas utilizando Etanol (1ml do solvente foi utilizado a cada 0,5 ml de micelas).

5.2.3. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução

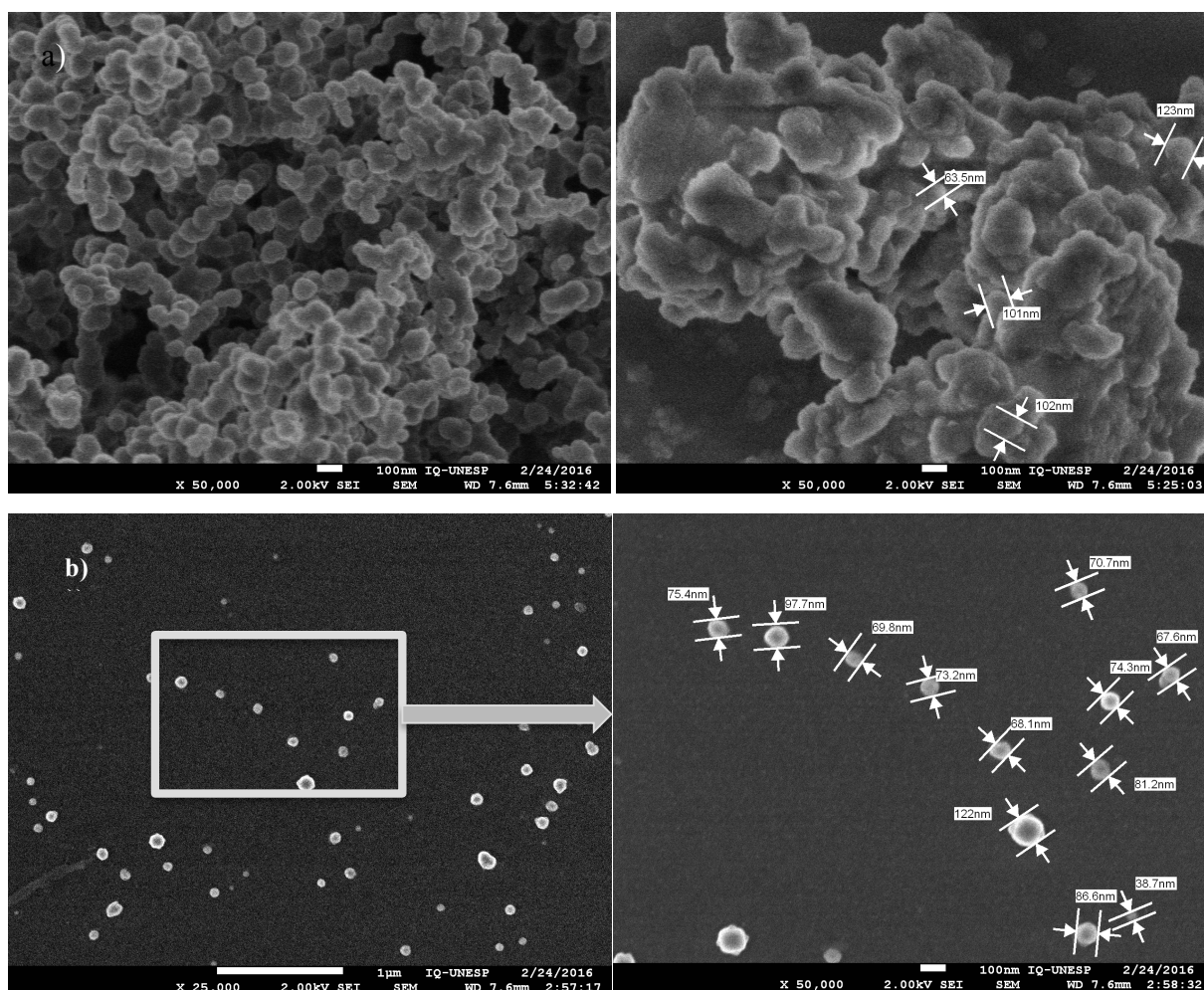
A morfologia das micelas reversas formadas pelos ramnolipídios na síntese das nanopartículas assim como a morfologia das nanopartículas já extraídas, foram observadas por MEV com um microscópio de varredura de alta resolução (FEG-MEV) JEOL modelo 7500F equipado com um detector EDS com o que foi realizada também a espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, O espectro da EDS foi medido numa aceleração de 10kV de voltagem. Uma gota da solução a avaliar foi colocada em um substrato condutor composto por Silício e deixou-se secar durante 4 dias em condições naturais, após a secagem das amostras foi feito o recobrimento com carbono.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a síntese das nanopartículas de Ag. Para analisar a morfologia fez-se a micrografia das micelas reversas contendo as nanopartículas (Fig. 5.1a). Além disso foram feitas micrografias das nanopartículas após a extração (Fig. 5.1b).

É possível observar na figura 5.1b que a morfologia das nanopartículas de prata é esférica, apresentando a mesma morfologia que as micelas reversas contendo nanopartículas de prata *encapsuladas* (Fig. 5.1a). Este resultado indica que a morfologia das nanopartículas sintetizadas depende do tipo de agregação do biossurfactante que ocorre durante a síntese, neste caso micelas reversas. Os ramnolipídios atuam como agente estabilizante que recobre as nanopartículas durante as reações químicas acontecem quando estas são formadas (KUMAR *et al.*, 2010). Foi relatada também essa propriedade dos ramnolipídios quando foram sintetizadas nanopartículas de ZnS (HAZRA *et al.*, 2013). Além de agir como estabilizante na síntese das nanopartículas em condições normais, já foi reportado que os ramnolipídios ajudam a manter a estabilidade das nanopartículas quando expostas a NaCl (SAIKIA *et al.*, 2013).

Figura 5.1 Micrografia das a) micelas reversas contendo as nanopartículas b) nanopartículas extraídas com etanol e resuspendidas em água.

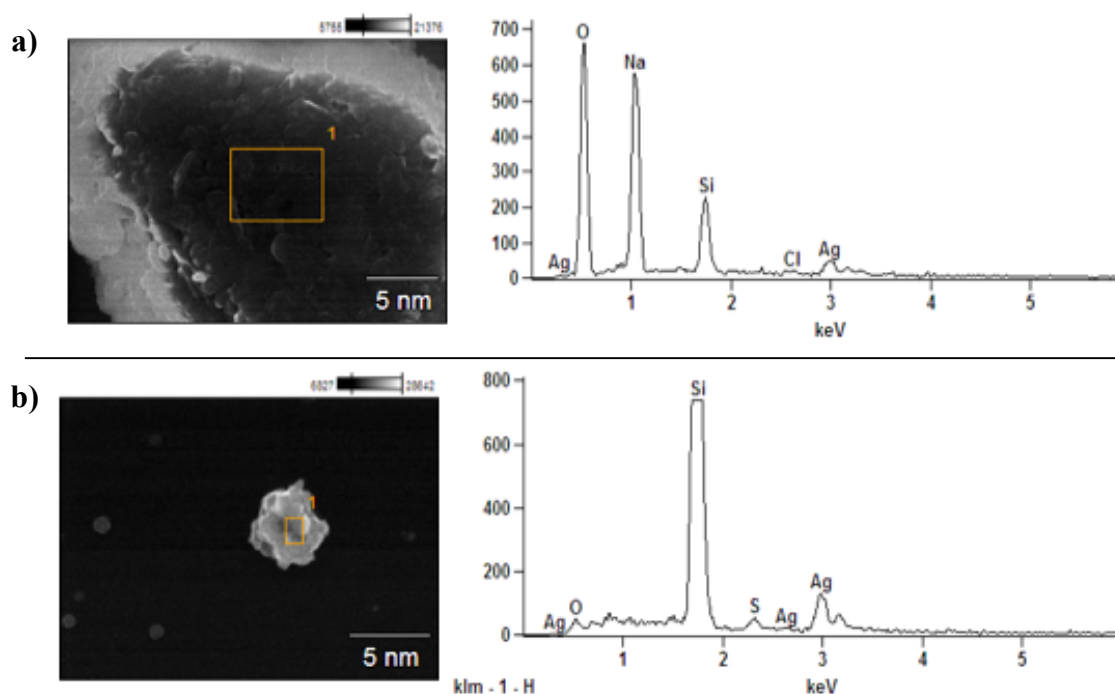


Ao misturar ramnolipídios e n-heptano em um sistema aquoso junto com um álcool como o n-butanol, este último agindo como co-surfactante, a formação de micelas reversas é favorecida na micro-emulsão (KUMAR *et al.*, 2010). A *auto-agregação* dos ramnolipídios ocorre quando a concentração do biossurfactante está acima da CMC (LIANG *et al.*, 2011). Neste caso a concentração utilizada de ramnolipídios na micro-emulsão superava a CMC, o que favoreceu a formação espontânea das micelas reversas. A precipitação de partículas metálicas em um sistema de micelas reversas tem sido reportada como uma metodologia simples e efetiva para produção de nanopartículas (CAPEK, 2004).

Como relatado por Carvalho & Cabral (2000), as micelas reversas apresentam a habilidade de solubilizar água em um sistema oleoso, quando na micro-emulsão há um componente hidrossolúvel ou aquoso além da água, este é micro-encapsulado no interior da fase aquosa deste tipo de micelas. Com as análises de EDS foi possível confirmar que dentro

das estruturas formadas na micro-emulsão havia nanopartículas de prata (Fig. 5.2a), devido à presença de elétrons de prata no espectro obtido.

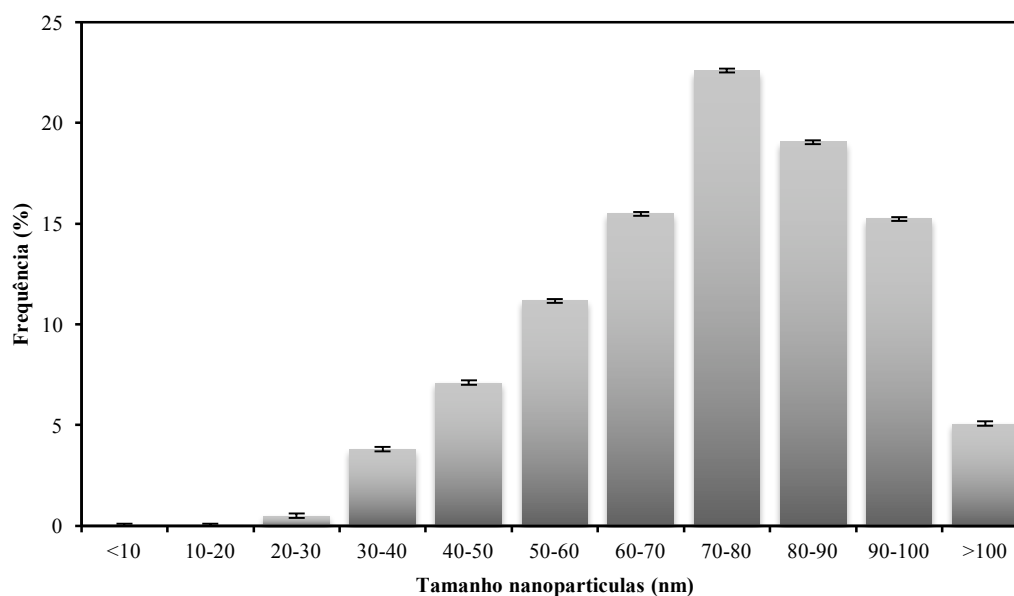
Figura 5.2 Análises de EDS **a)** micelas reversas contendo as nanopartículas **b)** nanopartículas extraídas com etanol e resuspendidas em água.



As interações moleculares que mantêm a estrutura das micelas reversas incluem interações de tipo hidrofóbico, van der Waals, de tipo eletrostático e pontes de hidrogênio, o que permite manter a fluidez das micelas (CARVALHO & CABRAL, 2000) pelo que as substâncias *encapsuladas* podem ser extraídas facilmente, como no caso das nanopartículas sintetizadas. Foi confirmado por meio de EDS (Fig. 5.2b) a presença de Ag nas nanopartículas observadas na figura 5.1b, que foram obtidas fazendo extração com etanol.

A técnica de formação de nanopartículas metálicas por meio de micelas reversas permite obter nanopartículas uniformes e com tamanho controlável (CAPEK, 2004). Como observado na figura 5.3, o tamanho das nanopartículas oscilou entre 70 – 80nm; os biossurfactantes reduzem a formação de agregados devido as forças de atração eletrostáticas e facilitam a obtenção de nanopartículas uniformes e mais estáveis (FARIAS *et al.*, 2014).

Figura 5.3 Frequência (%) do tamanho das nanopartículas (nm)



No entanto, foram obtidas nanopartículas fora do tamanho médio, o que pode indicar que houve agregação das nanopartículas que estão dentro das micelas por causa da fluidez que apresentam as micelas reversas, ou depois da extração e re-dispersão, as nanopartículas podem ter impactado umas com outras o que pode ter causado alguns agregados (FARIAS *et al.*, 2014).

Em consequência, o uso de ramnolipídios para formação de nanopartículas de prata é uma alternativa viável e rápida pois permitem controlar o tamanho e a forma desejada, para diferentes aplicações biotecnológicas.

6. CAPÍTULO IV

CONTROLE DE VETORES TRANSMISORES DE DOENÇAS TROPICAIS: RAMNOLÍPIDIOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

6.1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por mosquitos estão concentradas principalmente nos países tropicais. Um sexto das infecções mundiais está associado a doenças transmitidas por vetores, sendo os mosquitos os de maior incidência (McGRAW & O'NEIL, 2013). A dengue, uma doença transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, tem uma incidência que tem aumentado nos últimos 10 anos, tornando-se um grande problema de saúde pública, com aproximadamente 2.4 milhões de casos reportados anualmente, desde 2012 (McGRAW & O'NEILL, 2013). *Aedes aegypti* não só é transmissor desta infecção arboviral, mas é conhecido por transmitir outras arboviroses como o Chikungunya e o Zika Virus, este último relacionado à microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (McGRAW & O'NEILL, 2013; LUPI *et al.*, 2013). *Culex quinquefasciatus* é outro vetor de doenças tropicais, como a filariose linfática causada por *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*, esta doença tropical que apesar de ter uma incidência importante encontra-se no grupo das doenças negligenciadas, pelo que eliminação desta doença ainda é um desafio (HOTEZ & FUJIWARA, 2014).

Dentre os mecanismos de controle e eliminação das doenças tropicais transmitidas por vetores, encontra-se o controle do vetor. As estratégias de controle dos vetores desenvolvidas geralmente visam ao uso de inseticidas químicos que podem ter potenciais efeitos negativos, além disso, tem aumentado os níveis de resistência a estes inseticidas (LENG *et al.*, 2011). Os pesticidas biológicos surgem como alternativas amigáveis ambientalmente e eficazes, além de apresentar baixa resistência por parte do vetor.

Os óleos essenciais têm sido estudados na sua efetividade para o controle de diferentes insetos incluídos os mosquitos transmissores de doenças, na revisão feita por Dias & Moraes (2014), foi reportado que 361 óleos essenciais extraídos de uma grande variedade de plantas já foi testado contra *A. aegypti*, no entanto 40% é considerado como ativo ($LC_{50} < 100$ mg/L). Um dos óleos mais estudados é o óleo de cravo devido a um composto ativo que já mostrou resultados positivos em relação ao controle de vetores, o eugenol (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012).

Os ramnolípídios, são biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e apresentam características que podem ser aproveitadas à procura de um inseticida verde. Estes biossurfactantes, de tipo glicolípídico, têm sido reportados como potenciais metabólitos para controle biológico. Estudos recentes têm utilizado os ramnolípídios para o controle de larvas,

adultos (Da SILVA *et al.*, 2015) e pupas (PRABAKARAN *et al.*, 2015) de mosquitos da espécie *A. Aegypti*. Estes metabolitos apresentaram uma boa atividade tanto larvicida e inseticida, quanto pupicida.

Além de terem propriedades inseticidas, os ramnolipídios têm propriedades físico-químicas que permitem fazer emulsões, o que possibilita que ao serem misturados com outros compostos que apresentem atividade inseticida e que, como os óleos essenciais, precisam de um agente emulsionante, ajudem à dispersão do composto com maior facilidade. Partindo deste princípio, surge a possibilidade de aproveitar as propriedades emulsionantes dos ramnolipídios com óleos essenciais para avaliar se existe uma atividade sinérgica entre a ação do ramnolipídio e a do óleo essencial.

6.2. MATERIAL E METODOS

Partindo dos resultados do capítulo I foi escolhida a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 e o glicerol G2 como fonte de carbono para produzir os ramnolipídios que foram utilizados para realizar os bio-ensaios.

Os experimentos para produção de ramnolipídios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1L, contendo 300 mL de meio de cultura (descrito no Capítulo I). Os frascos foram mantidos em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 72 horas.

6.2.1. Extração de Ramnolipídios

Foi centrifugado o volume total do frasco depois das 72 h de fermentação. O caldo livre de células foi acidificado com H_3PO_4 85% 1:100 (v/v), levando à precipitação dos ramnolipídios presente. Para a extração do ramnolipídio utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v); agitou-se por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso, retirou-se a fase superior para evaporação do solvente em rotavapor e obtenção do biossurfactante. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido com a fase inferior.

6.2.2. Coleção e manutenção dos insetos

Os insetos utilizados para os bio-ensaios são descritos na tabela 4.4. Os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas a temperatura controlada de 27 ± 1 °C e foto período de 12 horas.

Tabela 6.1 – Descrição dos insetos utilizados para os bioensaios

Inseto	Doença que transmite	Origem
<i>Aedes aegypti</i>	Dengue / Chikunguã / Zika Virus	Miereux – NutriSciences, São Paulo BR
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Filariase linfática	Miereux – NutriSciences, São Paulo BR

A alimentação dos adultos foi feita com glicose 10% e para a ovo-posição, foi utilizada sangue de camundongos de laboratório. Após as fêmeas fizerem as posturas de ovos em frascos contendo água mineral. As larvas emergiram depois de 3-5 dias, e foram alimentadas com ração para peixes.

6.2.3. Óleo essencial

Foi utilizado óleo extraído de folhas de *Eugenia caryophyllata* (cravo) para realizar bio-ensaios da atividade larvicida, inseticida e repelente. O óleo foi comprado da empresa Phytoterapica ®- São Paulo, Brasil.

6.2.4. Bio-ensaios da ação larvicida

Os testes de mortalidade por contato direto foram utilizados para avaliar a toxicidade dos ramnolipídios e do óleo de cravo tanto separadamente quanto em conjunto para avaliar se existe uma ação sinérgica entre as substâncias avaliadas.

6.2.4.1. Ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa*

Foram colocados em frascos de 60 ml, 20 mosquitos no terceiro estado larval. Foram avaliadas as soluções de 100, 200, 400, 600, 800 e 1600 mg/L de ramnolipídio, pH 7. Foi calculada a LC₅₀ após 24 h de exposição ao ramnolipídio (Modificado de WHO, 1996). Os experimentos foram feitos em triplicata. Como controle foi utilizada água mineral.

6.2.4.2. Óleo essencial de Cravo

Foram colocados em frascos de 60 ml, 20 mosquitos no terceiro estado larval. Foram avaliadas as soluções de 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 mg/L de óleo de cravo, o óleo foi diluído em água mineral com etanol (1% v/v). Foi calculada a LC₅₀ após 24 h de exposição ao óleo (Modificado de WHO, 1996). Os experimentos foram feitos por triplicata. Como controle foi utilizada água mineral.

6.2.4.3. Ação sinérgica dos ramnolipídios em emulsão com óleo de cravo

Para avaliar a ação larvicida do ramnolipídio em emulsão com o óleo essencial foram avaliadas as concentrações de ramnolipídio e de óleo obtidas como a LC₅₀, assim como o

limite inferior e o superior. Em cada frasco foram adicionados 40 ml da solução a avaliar. Como controle negativo foi utilizada água destilada estéril e para avaliar se existe um efeito sinérgico entre o ramnolipídio e o óleo de cravo foi utilizado como controle negativo tanto a solução de ramnolipídio quanto a solução de óleo de cravo. Os experimentos foram feitos por triplicata. Foi calculada a porcentagem de mortalidade após 24 h de exposição à emulsão.

6.2.5. Bio-ensaios da ação inseticida

Para os testes de ação inseticida dos ramnolipídios e do óleo de cravo tanto separadamente quanto em conjunto foram avaliadas as soluções tanto de ramnolipídio e óleo de cravo quanto de emulsão que mostraram maior efetividade nos testes de ação larvicida. Foram colocados nas gaiolas 10 adultos. Foram borrifados 3 ml em cada gaiola, o borrifador foi pesado antes e depois de aspergir a solução para controlar o volume liberado. Como controle negativo foi utilizada água destilada. Os experimentos foram feitos em triplicata (Modificado de SILVA *et al.*, 2015). Foi calculado o tempo necessário para matar a metade da população com a solução utilizada (KD_{50}) e para os sobreviventes, foi providenciada água com glicose 10% e depois de 24 h foi monitorado se houve mortalidade.

6.2.6. Bio-ensaios da ação repelente

Para os testes de ação repelente foram avaliadas as soluções tanto de ramnolipídio e óleo de cravo, assim como da emulsão que mostrou maior efetividade nos testes de ação larvicida. As soluções foram aspergidas nos camundongos que serviram para o repasto sanguíneo, cada animal recebeu 3 ml de solução; o borrifador foi pesado antes e depois de aspergir a solução para controlar o volume liberado. Os camundongos foram anestesiados com Quetamina. Cada gaiola continha um camundongo e 10 mosquitos adultos. O tempo de exposição do camundongo aos mosquitos foi de 40 minutos. Foi avaliada a quantidade de mosquito pousada no camundongo. Como controle negativo foi utilizada água destilada. Os experimentos foram feitos por triplicata (Modificado de SILVA *et al.*, 2015).

6.2.7. Análise estatística

Os dados de mortalidade foram corrigidos com a fórmula de Abbott (1925), quando no controle negativo houve uma mortalidade do 10%. O cálculo da LC_{50} foi realizado utilizando a Análise de Probit (*software* R - versão 3.2.0), utilizando a função descrita por Pacheco & Rebelo (2013).

Foi analisada a normalidade dos dados com a prova Shapiro wilk ($\alpha=0,05$). Aplicou-se uma prova paramétrica (ANOVA), $\alpha=0,05$ para avaliar se existem diferenças entre os tratamentos. Para isso foi utilizado o *software* R (versão 3.2.0).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Bio-ensaios da ação larvicida

Foi comparada a toxicidade dos ramnolipídios e do óleo essencial de cravo para duas espécies de mosquitos transmissores de doenças tropicais (Tabela 6.2). Após 24 h foi avaliada a LC_{50} , que para as larvas de *A. aegypti* foi de 140 mg/L quando utilizado ramnolipídio e 154 mg/L quando utilizado óleo de cravo. No caso de *C. quinquefasciatus*, a LC_{50} dos ramnolipídios foi de 130 mg/L e do óleo foi de 19 mg/L. Os resultados de toxicidade dos ramnolipídios são virtualmente iguais para as duas espécies, no entanto, no caso do óleo de cravo houve diferenças na toxicidade das concentrações avaliadas.

Na LC_{50} os ramnolipídios reduzem a tensão superficial da água para 30mN/m, o que pode ocasionar nas larvas, dos dois gêneros, uma dificuldade para respirar pois estas não conseguem se manter na superfície pelo que a posição do sifão se vê afetada causando morte no inseto por deficiência no intercâmbio de gases (Da SILVA *et al.*, 2015).

Tabela 6.2 – Toxicidade do ramnolipídio e óleo de cravo para larvas de mosquito utilizando o bio-ensaio de contato direto

Sustância avaliada	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
	LC_{50} mg/L (95% NC ^a)	LC_{50} mg/L (95% NC ^a)
Ramnolipídio	140 (93,64 – 185,8)	130 (81,86 – 178,8)
Óleo de Cravo	154 (98,25 – 203,71)	19 (7,04 – 31,06)

^a NC: Nível de confiança

Para os testes das emulsões de ramnolipídios com óleo de cravo, foram utilizadas as concentrações obtidas como limite inferior, limite superior e concentração letal 50 (LI; LS; LC_{50}), houve diferenças significativas ($p\text{-value} < 0,05$) entre as combinações (Ramnolipídio : Óleo de cravo) que não apresentaram 100% da mortalidade (LI:LI, LC_{50} :LI, LI: LC_{50} , LI:LS). Quando misturadas as concentrações dos limites superiores de uma das soluções, seja ramnolipídio o de óleo de cravo, com qualquer outra concentração do outro metabólito foi obtida uma mortalidade do 100% após 24 h.

Tabela 6.3 – Toxicidade da emulsão ramnolipídio-óleo para larvas de mosquito utilizando o bio-ensaio de contato direto após 24 h (% de mortalidade)

	Emulsão (Ramnolipídio : Óleo de Cravo)								
	LI:LI	LC ₅₀ :LI	LS:LI	LI:LC ₅₀	LC ₅₀ :LC ₅₀	LS:LC ₅₀	LI:LS	LC ₅₀ :LS	LS:LS
<i>Aedes aegypti</i>	30	63	100	56	100	100	100	100	100
<i>C. quinquefasciatus</i>	41	57	100	59	100	100	100	100	100

LI: Limite inferior; LS: Limite superior; LC₅₀: Concentração letal 50

Quando misturados os limites inferiores das concentrações de ramnolipídio e de óleo de cravo obteve-se que a mortalidade não apresentou diferença significativa frente ao controle da cada solução sozinha (LI:0 e 0:LI). No entanto ao misturar o limite inferior com qualquer outra concentração se obteve um aumento na mortalidade com respeito ao controle, tanto no caso ramnolipídio quanto do óleo de cravo.

Ao misturar as LC₅₀ de cada solução, obteve-se em 24 h aumento da mortalidade de 50% para 100%, indicando uma ação sinérgica entre os compostos. Provavelmente, pela atividade emulsionante do ramnolipídio que bio-disponibiliza o óleo na água para ele entrar em contato com as larvas.

A tensão superficial da água com óleo de cravo nas concentrações do limite inferior, superior e LC₅₀ foi 75mN/m, ao ser misturado com ramnolipídio a tensão superficial da solução final foi reduzida para 37mN/m. Ao reduzirem a tensão superficial da água, os ramnolipídios causam impedimento para as larvas se alimentarem. Além disso, o óleo de cravo é conhecido por ter o composto ativo eugenol, de natureza fenólica, que interfere com os receptores GABA do sistema nervoso dos insetos (REGANURT-ROGERS *et al.*, 2012), pelo que além da interação da região hidrofóbica do sifão com o ramnolipídios, a movimentação das larvas também se vê afetada. A mistura entre o ramnolipídio e o óleo de cravo pode estar tendo um efeito sinérgico devido a que o ramnolipídio permite a bio-disponibilidade do óleo, permitindo que este tenha um efeito mais rápido ou maior em uma menor concentração, como o ocorrido ao misturas as soluções em LC₅₀.

6.3.2. Bio-ensaios da ação inseticida

Foram avaliadas as concentrações das soluções de ramnolipídios e óleo de cravo no limite inferior, superior e concentração letal 50 e o tempo em que estas têm um efeito fulminante para o 50% da população (KD₅₀) (Tabela 6.5).

Tanto para a solução de ramnolipídios quanto para a de óleo de cravo a concentração da solução no limite superior apresentou um KD₅₀ menor com respeito às outras concentrações, tanto para *A. aegypti* quanto para *C. quinquefasciatus*.

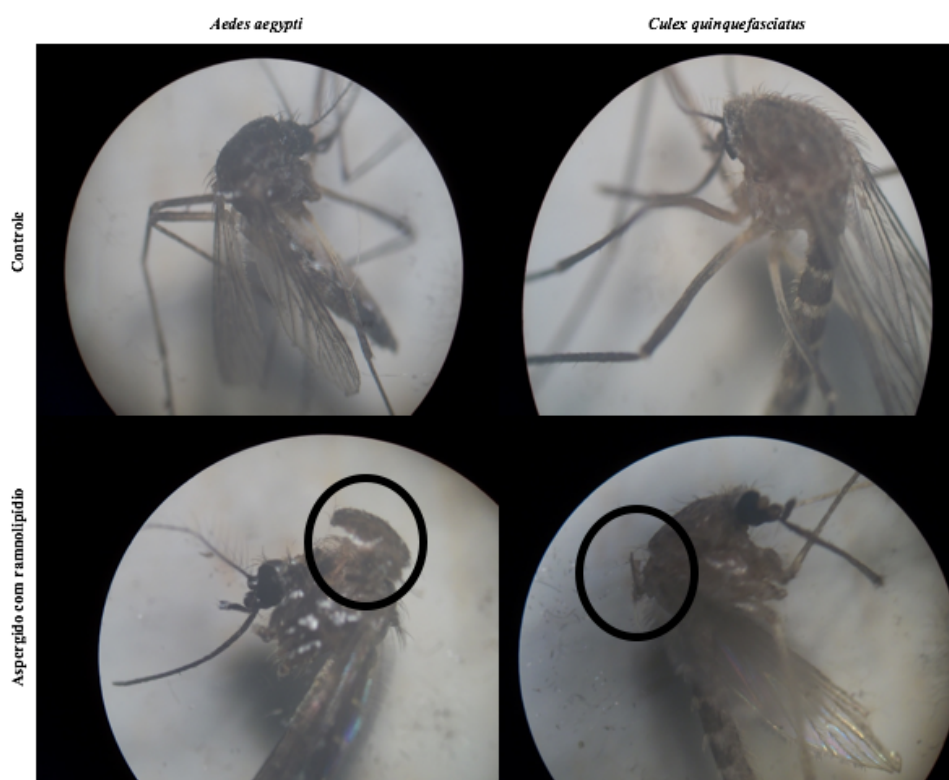
Tabela 6.5 – Toxicidade do ramnolipídio e óleo de cravo para mosquitos adultos utilizando o bio-ensaio de contato direto

Sustância avaliada	Concentração utilizada	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
		KD ₅₀ min (95% NC ^a)	KD ₅₀ min (95% NC ^a)
Ramnolipídio	LI	31 (19,45 – 40,12)	43 (37,56 – 50,31)
	LC50	18 (9,45 – 27,24)	24 (11,85 – 31,8)
	LS	11 (8,25 – 17,13)	16 (10,70 – 22,11)
Óleo de Cravo	LI	15 (10,11 – 22,63)	10 (6,01 – 14,2)
	LC50	9 (5,10 – 18,24)	7 (5,04 – 11,06)
	LS	25 (12,01 – 33,8)	5 (3,51 – 8,19)

NC: Nível de confiança; LI: Limite inferior; LS: Limite superior; KD₅₀: Knockdown Time 50

Nos resultados obtidos, além de ter mortalidade nos adultos estudados, foi também evidenciada a ruptura/degradação da cutícula dos insetos (Figura 6.1). De acordo com Kim *et al* (2011), os ramnolipídios debilitam as cutículas dos áfidos, ocorre também desidratação das membranas celulares o que ocasiona a morte do inseto. Foi reportado por Da Silva *et al.* (2015) que os ramnolipídios têm este efeito na cutícula de *Aedes aegypti*, o que ocasionou a morte dos insetos.

Figura 6.1 Microscopia ótica de adultos de mosquito após o bio-ensaio de contato direto.



A partir dos resultados anteriores foi realizada também a avaliação da mortalidade dos adultos (Tabela 6.6) com as emulsões foram misturadas as concentrações no limite inferior, superior e a LC₅₀, que foram estabelecidas nos bio-ensaios por contato direto com larvas. Quando utilizada uma solução na concentração do limite superior mistura com qualquer outra houve uma mortalidade do 100%. Quando utilizadas soluções na LC₅₀ misturadas com o limite inferior da outra solução houve mortalidade maior que 50%, mas este aumento na mortalidade não apresentou diferença significativa (p-value>0,05) com o controle da solução seja de ramnolipídio ou de cravo na concentração LC₅₀.

Tabela 6.6 – Toxicidade da emulsão ramnolipídio-óleo para mosquitos adultos utilizando o bio-ensaio de contato direto após 24 h (% de mortalidade)

	Emulsão (Ramnolipídio : Óleo de Cravo)								
	LI:LI	LC ₅₀ :LI	LS:LI	LI:LC ₅₀	LC ₅₀ :LC ₅₀	LS:LC ₅₀	LI:LS	LC ₅₀ :LS	LS:LS
<i>Aedes aegypti</i>	23	51	100	52	100	100	100	100	100
<i>C. quinquefasciatus</i>	31	51	100	50	100	100	100	100	100

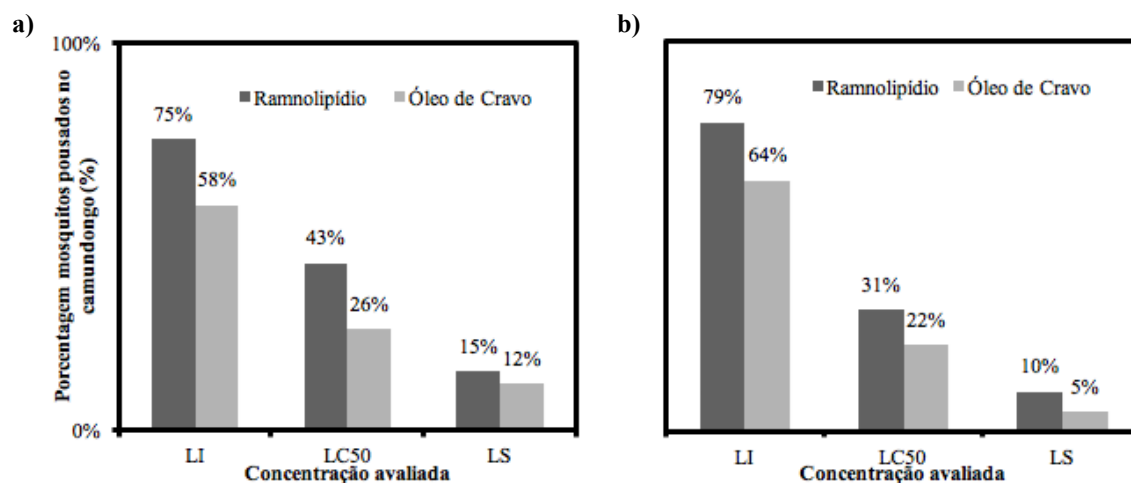
LI: Limite inferior; LS: Limite superior; LC₅₀: Concentração letal 50

Já utilizando a solução de ramnolipídios e de cravo na concentração letal 50, houve uma mortalidade do 100%, apresentando diferenças significativas (p-value<0,05) ao serem comparados com o controle de cada solução em LC₅₀. Evidenciando uma possível atividade sinérgica entre as duas soluções, além da ruptura da cutícula do mosquito por parte do ramnolipídio, é provável que o óleo de cravo esteja interferindo no comportamento de voo do inseto, a regulação metabólica ou a pressão cardíaca (STEVENSON, 2005).

6.3.3. Bio-ensaios da ação repelente

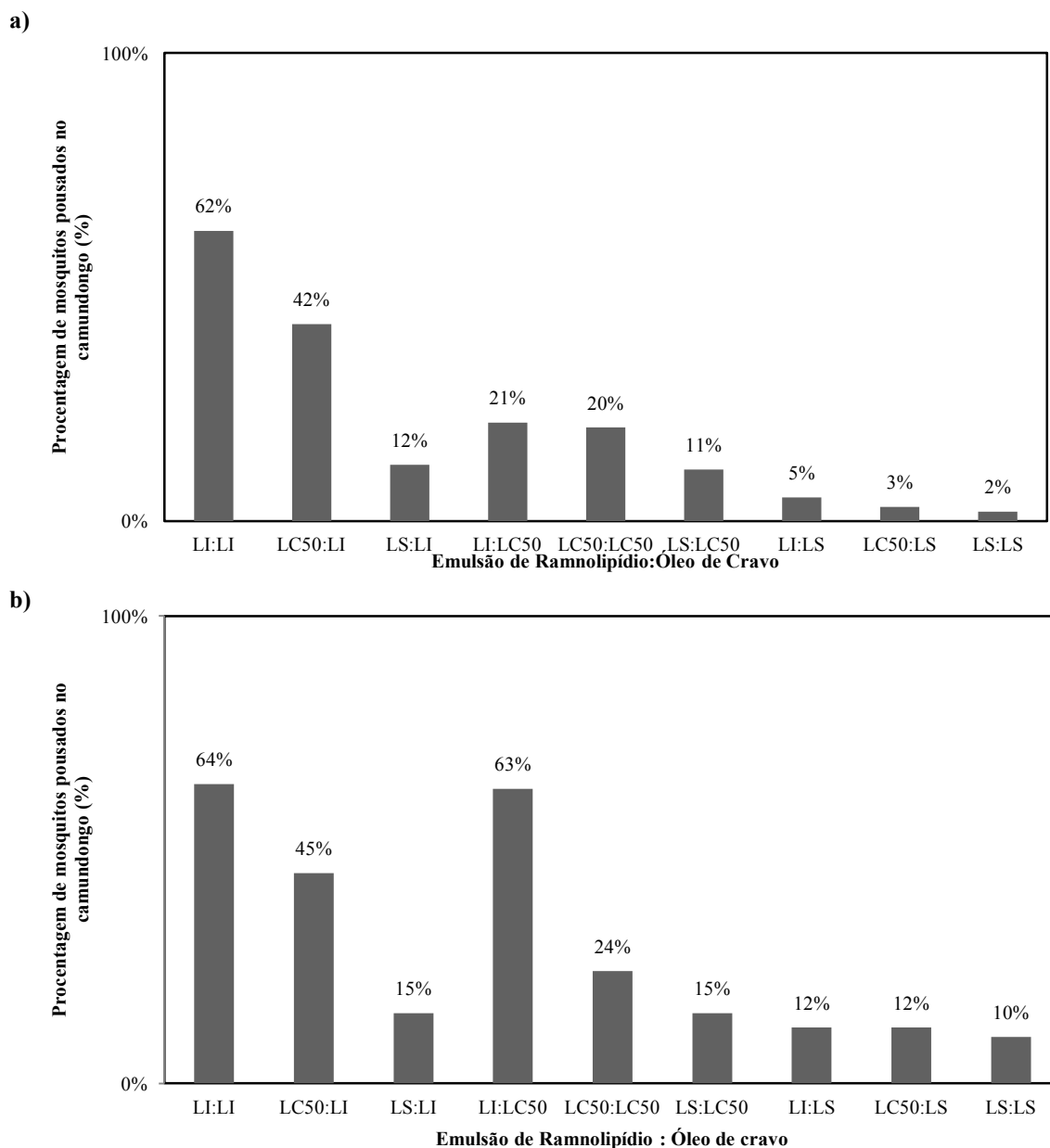
A ação repelente dos ramnolipídios e do óleo de cravo foi avaliada no período de 40 min, após a aplicação do produto (Figura 6.2). Nos dois casos, tanto para ramnolipídio quanto para óleo de cravo, a solução na concentração no limite superior foi a que apresentou uma maior atividade de repelência contra as duas espécies de mosquito.

Figura 6.2 – Porcentagem de mosquitos pousados no camundongo que fizeram hematofagia utilizando ramnolipídios e óleo de cravo. **a)** *Aedes aegypti*; **b)** *Culex quinquefasciatus*



Ao avaliar as emulsões na ação repelente (Figura 6.3), as que tinham uma das soluções na concentração do limite superior apresentaram uma maior repelência e com respeito ao controle houve diferenças significativas ($p\text{-value}<0,05$) o que indica uma possível ação sinérgica. Ao utilizar as soluções na LC₅₀ obteve-se que houve um aumento na ação larvicida, havendo diferenças significativas com respeito ao controle ($p\text{-value}<0,05$), este aumento também indica a possível ação sinérgica que existe entre os compostos.

Figura 6.3 – Porcentagem de mosquitos pousados no camundongo que fizeram hematofagia utilizando emulsões ramnolipídio: óleo de cravo. LI: Limite inferior; LS: Limite superior; LC₅₀: Concentração letal 50. **a)** *Aedes aegypti*; **b)** *Culex quinquefasciatus*



Foram utilizados o ramnolipídio e o óleo de cravo como agentes larvicidas, mosquitocidas e repelentes contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, estes compostos apresentaram uma alta eficácia em baixas concentrações (140 e 130 mg/L de ramnolipídios e 154 – 19 mg/L de óleo de cravo, respetivamente), que ao serem testadas em emulsão apresentaram da mesma maneira uma boa atividade larvicida, mosquitocida e repelente frente a ambas espécies, apresentado na maioria dos casos um 100% da mortalidade dos insetos. Estes resultados indicam que uma possível interação sinérgica entre os compostos pode aumentar sua eficácia e aplicabilidade.

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 último, 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 biossurfactante 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 vetores 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. Biosurfactans.** 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. **Larvicidal 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 rhamnolipídios por mutantes de Pseudomonas aeruginosa LBI.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, 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 *Pseudomonas fluorescens* (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.

QUIZHUO, 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.** Biotechnology 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.; LEPINE, 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.; GONÇALVEZ, L.; CRUZ, A. **Cinetica 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. **Rhamnolipis Productions in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*.** *European Journal of Science Technology*, v. 112, p. 1082-1087, 2010.

VAN HAESENDONCK, I. P. H. & VANZEVEVEREN, 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.