



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS OBTIDOS
A PARTIR DE ÓLEOS NATIVOS**

MATEUS APARECIDO GONÇALVES DA ROCHA

**Rio Claro – SP
2023**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS OBTIDOS
A PARTIR DE ÓLEOS NATIVOS**

MATEUS APARECIDO GONÇALVES DA ROCHA

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

Orientador: Jonas Contiero

**Rio Claro – SP
2023**

R672p	Rocha, Mateus Aparecido Gonçalves da Produção e caracterização de Ramnolipídios obtidos a partir de óleos nativos / Mateus Aparecido Gonçalves da Rocha. -- Rio Claro, 2023 66 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Jonas Contiero 1. Ramnolipídios. 2. Plantas Nativas. 3. Ácidos Graxos. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS OBTIDOS A PARTIR DE ÓLEOS NATIVOS

AUTOR: MATEUS APARECIDO GONÇALVES DA ROCHA

ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
JONAS CONTIERO
Data: 14/07/2023 15:26:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

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

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

 Documento assinado digitalmente
DAIANE CRISTINA SASS
Data: 14/07/2023 14:45:32-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. LUCIANA FONTES COELHO (Participação Virtual)
x



Rio Claro, 14 de julho de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu querido orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, por ter me aceitado em seu laboratório em 2017 e me ajudado de inúmeras formas e me manter no curso de ciências biológicas, onde mais de uma vez quase desisti da faculdade, devido a problemas financeiros e familiares. Além disso, não é possível afirmar que o professor Jonas não tenha exercido grande influência na formação da minha pessoa atual, me incentivando a me tornar um indivíduo mais persistente e corajoso para enfrentar os diversos desafios da vida. E claro, preciso agradecer também por ele ter sido a minha porta de entrada ao maravilhoso mundo da bioquímica e microbiologia, da onde jamais sairei e que sou extremamente apaixonado, espero alcançar um terço de todo conhecimento que o senhor possui. Do fundo do meu coração, meus mais sinceros agradecimentos, obrigado por nunca ter desistido de mim, você é meu ídolo.

Agradeço também a maravilhosa equipe de pesquisa do LMI por ter me ajudado em diversas análises/experimentos e ter feito o possível para que meu mestrado desse certo, mesmo comigo trabalhando fora, meus profundos agradecimentos a Ingrid Yoshimura, Matheus Lacorte e ao Raphael Neves, sendo esse último meu grande amigo e companheiro de toda vida na Unesp, muito obrigado.

Entre minha vida na Unesp e o mundo do trabalho, conheci pessoas espetaculares onde me vejo na obrigação de mencionar, mesmo que já não os veja mais, porém sempre guardarei boas lembranças e risadas no meu coração. Na cervejaria eu agradeço fortemente ao meu amigo e antigo encarregado, o senhor e recentemente pai, Vitor Betelli (Vitão), e também aos meus companheiros de adega, senhor Leivison, Lelinho, Alex, Thales e Denilson. Sinto imensa saudades de vocês. Já na escola, meus profundos agradecimentos aos outros “tios” da minha equipe: tia Jê, Áurea, Gilberto e Luís, além claro, das minhas inúmeras crianças que fazem meus dias absurdamente alegres e felizes, amo todos vocês.

Ainda em Cajamar, meus agradecimentos se dirigem ao meu querido grupo de consagrados, cuja amizade já ultrapassa os 10 anos, jamais perdendo o contato e dando rolês loucos e perigosos até hoje, forte abraço aos meus queridos Rafael Lima, Patrick Martins e William Gonçalves. Agradeço também as minhas inúmeras tias maternas e paternas, que sempre me apoiaram mesmo não entendendo bem o que eu fazia na faculdade/mestrado. E por fim, agradeço a minha querida irmã Barbara Rocha, a pessoa

mais importante da minha vida, você e nossos gatinhos (Dakota, Nego, Cacao, Afrodite e Cristina) somos uma família.

RESUMO

Os biossurfactantes são metabólicos sintetizados por diversos tipos de micro-organismos, a partir de condições aeróbicas em meios contendo carboidratos, hidrocarbonetos, lipídios e outros. São moléculas anfipáticas, apresentando uma calda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica, proporcionando as mesmas aplicações que o surfactante químico, ainda acrescido de outras vantagens, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade térmica, e produção a partir de fontes renováveis. Dentre os biossurfactantes, um dos mais estudados são os ramnolipídios, um tipo de biotensoativo que apresenta uma ou duas ramnoses na porção hidrofílica da molécula, sintetizado pela bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. As vantagens dos biossurfactantes para o micro-organismo produtor ainda não são bem conhecidas. Existem diversas hipóteses sobre sua atuação como por exemplo no caso da *Pseudomonas aeruginosa*, acredita-se que a produção de ramnolipídios esteja relacionada com a busca por ambientes ricos em nitrogênio. Isso parece estar relacionado ao aumento na produção do biossurfactante e de estruturas de locomoção quando o micro-organismo é submetido a ambientes com falta desse nutriente. Apesar das vantagens dos biossurfactantes frente ao surfactante químico, seu uso não é amplo devido aos custos de produção e baixos rendimentos dos processos fermentativos. Estima-se que em um bioprocessamento a fonte de carbono corresponda a até 30% do custo final do produto. Dessa maneira, o uso de fontes nacionais é uma alternativa para o barateamento do custo e também para a valorização de plantas nativas. Além de constituir-se de fontes alternativas, existe pouco estudo que relacione o uso de óleos nativos com a produção de ramnolipídios, o que permite o melhor aprofundamento sobre a interação dos óleos derivados dessas plantas com o micro-organismo, e sobre quais tipos de congenères são produzidos através desse contato. Nesse projeto, está sendo avaliado a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* 2A1 LBI cultivadas em diversas fontes de carbonos oleosas derivadas de plantas nativas, como buriti, chia, andiroba e açaí. Ademais, também está sendo avaliado o consumo de ácidos graxos desses óleos durante a fermentação e os homólogos produzidos nesse processo.

Palavras-chave: Ramnolipídios; Plantas Nativas; Ácidos graxos.

ABSTRACT

Biosurfactants are metabolic synthesized by several types of microorganisms, from aerobic conditions in media containing carbohydrates, hydrocarbons, lipids and others. They are amphipathic molecules, presenting a hydrophobic tail and a hydrophilic head, providing the same applications as the chemical surfactant, plus other advantages, such as biodegradability, low toxicity, thermal stability, and production from renewable sources. Among the biosurfactants, one of the most studied are rhamnolipids, a type of biosurfactant that has one or two rhamnoses in the hydrophilic portion of the molecule, synthesized by the gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. The advantages of biosurfactants for the producing microorganism are still unknown. There are several hypotheses about its action, for example in the case of *Pseudomonas aeruginosa*, it is believed that the production of rhamnolipids is related to the search for environments rich in nitrogen. This seems to be related to the increase in biosurfactant production and locomotion structures when the microorganism is subjected to environments lacking this nutrient. Despite the advantages of biosurfactants over chemical surfactants, their use is not widespread due to production costs and low yields from fermentation processes. It is estimated that in a bioprocess the carbon source corresponds to up to 30% of the final cost of the product. In this way, the use of national sources is an alternative for lowering the cost and also for valuing native plants. In addition to being constituted of alternative sources, there is little study that relates the use of native oils with the production of rhamnolipids, which allows a better deepening on the interaction of oils derived from these plants with the microorganism, and on which types of congeners are produced through this contact. In this project, the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 2A1 LBI grown on different sources of oily carbons derived from native plants, such as buriti, chia, andiroba and açaí, is being evaluated. Furthermore, the consumption of fatty acids from these oils during fermentation and the homologues produced in this process are also being evaluated.

Keywords: Rhamnolipids; Native Plants; Fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estruturas básicas dos ramnolipídios: RL1 (2 moléculas de ramnose e 2 moléculas de ácidos graxos), RL2 (1 molécula de ramnose e 2 moléculas de ácido graxo), RL3 (2 moléculas de ramnose e 1 molécula de ácido graxo) e RL4 (1 molécula de ramnose e 1 molécula de ácido graxo).....12
- Figura 2** - Modelo proposto para suprimento metabólito de precursores lipídicos de ramnolipídios. Na β -oxidação ocorre um encurtamento da cadeia de ácido graxo até a formação do intermediário trans-2-enoil-CoA. Enquanto que, no caso do glicerol, a síntese de novo via FAS-II forma ácidos graxos que são desviados para a β -oxidação.....16
- Figura 3** – Cromatograma do ramnolipídios obtido através do computador do LMI (Laboratório de Microbiologia Industrial) da amostra de açaí de 48 horas. No eixo X pode-se observar o Rha-Rha-C₁₀C₁₀ em 22,3±0,2 minutos e o para Rha-C₁₀C₁₀ em 23,2±0,2 minutos.....30
- Figura 4** – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de açaí como fonte de carbono (100g/L) para cepa LBI 2A1. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.....32
- Figura 5** – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de açaí durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.....35
- Figura 6** – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de andiroba como fonte de carbono (100 g/L) para cepa 2A1 LBI. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.....36
- Figura 7** – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de andiroba durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.....40
- Figura 8** – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de buriti como fonte de carbono (100 g/L) para cepa 2A1 LBI. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.....41
- Figura 9** – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de buriti durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.....44
- Figura 10** – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de chia como fonte de carbono (100 g/L) para cepa 2A1 LBI. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.....46
- Figura 11** – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de chia durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de ácidos graxos presentes nos óleos em porcentagem %.....	22
Tabela 2 - Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, e concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de açaí.....	33
Tabela 3 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo de açaí a partir de análise GC-MS.....	34
Tabela 4 - Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de andiroba....	38
Tabela 5 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo de andiroba a partir de análise GC-MS.....	38
Tabela 6 - Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de buriti.....	42
Tabela 7 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo de buriti a partir de análise GC-MS.....	43
Tabela 8 - Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de chia.....	47
Tabela 9 - Composição de ácidos graxos presentes no óleo de chia a partir de análise GC-MS.....	47
Tabela 10: Resumo dos dados referentes aos quatro óleos estudados, nos melhores tempos respectivos.....	50
Tabela 11: Composição elementar das espécies homólogas encontradas no ramnolipídios produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI 2A1 utilizando óleo de açaí, andiroba, chia ou buriti como fonte de carbono.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
CG	Cromatografia gasosa
CN	Caldo nutriente
D.O.	Densidade óptica
Mono-RL	Mono-ramnolipídio
Di-RL	Di-ramnolipídio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LB	Lisogenic Broth
LC	Liquid Chromatography
LMI	Laboratório de Microbiologia Industrial
m/z	massa/carga
Mono-RL	Mono-ramnolipídio
MS	Mass Spectrometry
OA	Óleo de semente de açaí
ON	Óleo de semente de andiroba
OB	Óleo de semente de buriti
OC	Óleo de semente de chia.
PG	Propilenoglicol
RL	Ramnolipídio
Rpm	Rotação por minuto
SIR	Single Ion Recording
UPLC	Ultra High Liquid Chromatography
$Y_{P/X}$	Fator de conversão produto/biomassa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	BIOSURFACTANTES.....	9
1.2	CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DOS BIOSURFACTANTES.....	10
1.3	FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO E BIOSÍNTESE.....	12
1.3.1	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE.....	17
1.3.2	Substratos alternativos.....	18
1.3.2	Óleos Nativos.....	19
1.3.2.1	Açaí.....	19
1.3.2.2	Chia.....	20
1.3.2.3	Andiroba.....	20
1.3.2.4	Buriti.....	21
1.4	Aplicações dos biosurfactantes.....	22
2.	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivos gerais.....	26
2.2	Objetivos específicos.....	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Microrganismo.....	27
3.2	Meio de cultura.....	27
3.2.1	Meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato.....	27
3.2.2	Meio mineral livre de cálcio.....	27
3.3	Condições de cultivo.....	27
3.3.1	Preparo do inóculo.....	27
3.3.2	Bioprocessos em mesa agitadora.....	28
3.4	Métodos analíticos.....	28
3.4.1	Processamento das amostras.....	28
3.4.2	Avaliação da produção de ramnolipídios.....	28
3.4.2.1	Cromatografia em camada delgada.....	28
3.4.2.2	Determinação da concentração de Ramnolipídios – HPLC.....	28
3.4.2.2.1	Derivatização.....	28
3.4.2.2.2	HPLC.....	29
3.4.3	Determinação da biomassa microbiana.....	30
3.4.4	Determinação do óleo residual.....	30

3.4.5	Determinação da composição dos homólogos por LC-MS.....	31
3.4.6	Análise estatística.....	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	Produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> 2A1 LBI em óleos essenciais e avaliação do consumo da fonte de carbono.....	32
4.2	Caracterização das espécies homólogas de ramnolipídios por espectrometria de massas.....	50
5.	CONCLUSÃO.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1.Introdução

Os surfactantes são moléculas com dupla polaridade (anfipáticas), permitindo sua dispersão em diferentes fases, como óleo e água, tal característica se dá devido suas cadeias hidrofóbicas e suas cabeças hidrofílicas. Sua principal propriedade consiste em reduzir as tensões superficial e interfacial. Os surfactantes mais eficientes são aqueles que em baixas concentrações são capazes de reduzir as tensões superficial e interfacial (MULLIGAN *et al.*, 2005).

Os biossurfactantes, por sua vez, são metabólitos sintetizados por diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Para a produção desses metabólicos microbianos pode-se empregar o cultivo em condições aeróbicas em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou mistura destes (DESAI; BANAT, 1997).

1.1 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes possuem as mesmas propriedades de um surfactante químico, porém apresentam vantagens frente a esses, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade térmica e química em amplas faixas de pH e, principalmente, produção a partir de fontes renováveis (BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007; LOVAGLIO *et al.*, 2010).

As propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas da biomolécula garantem sua distribuição na interface de fases fluídas em diferentes graus de polaridade. Tais propriedades possibilitam uma grande diversidade de aplicações industriais, como emulsificação, solubilização, dispersão de fases, detergência em produtos industriais como farmacêuticos e cosméticos, biorremediação, síntese de nanopartículas, recuperação terciária de petróleo e outros; além dessas moléculas serem ambientalmente amigáveis (BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007; PALANISAMY; RAICHUR, 2009; GANESH *et al.*, 2010).

Apesar de serem próximos quimicamente, os biossurfactantes também apresentam uma grande diversidade bioquímica (estrutural) se comparado aos surfactantes sintéticos (químicos), como por exemplo: glicolipídeos, lipopeptídios, ácidos graxos, complexos de proteínas e polissacarídeos, lipopolissacarídeos e biossurfactantes poliméricos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Ainda não está claro a função biológica dos biossurfactantes para o microrganismo produtor, mas já foram atribuídas várias proposições, como o favorecimento na colonização de nichos ecológicos em ambientes contaminados por hidrocarbonetos ou bastante oligotrófico; podendo atuar ainda como agente antimicrobiano, permitindo a eliminação de competidores (SOBERÓN-CHAVEZ *et al.*, 2012).

Outra hipótese seria de que os ramnolipídios, no caso da *Pseudomonas aeruginosa*, auxiliam na solubilização de moléculas sinalizadoras (PQS) que são responsáveis pela organização e distribuição das atividades entre os indivíduos participantes do biofilme, formando uma associação mais regular e sólida (VENTURINI, 2017). Esse sinalizador é pouco solúvel em ambientes aquosos, tendo suas funções comprometidas, porém quando o biossurfactante é secretado ele se torna solúvel, aumentando sua dispersão e consequentemente a bioatividade (CALFEE *et al.*, 2005).

1.2 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DOS BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes químicos são classificados com base em seu grupo polar, enquanto os biossurfactantes são classificados pelo seu grupo bioquímico. Os biossurfactantes também podem ser classificados através de sua massa molar; os de baixa massa molar (glicolipídeos, lipopeptídeos e flavolipídeos) (SMYTH *et al.*, 2010 B) e os de alta massa molar (polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas) (SMYTH *et al.*, 2010 A). A diferença na massa molar garante diversas propriedades a essas biomoléculas; os de baixa massa apresentam maior atividade superficial, enquanto os de alta massa exercem melhor atividade de emulsificação (ROSENBERG; RON, 1999).

A parte hidrofóbica do biossurfactante pode apresentar um ou mais ácidos graxos, podendo ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, e a parte hidrofílica pode ter um grupo éster, hidroxil, carboxilato, fosfato ou carboidrato (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Cada espécie de microrganismo produz uma classe diferente de biossurfactante, como a *Pseudomonas aeruginosa* que sintetiza ramnolipídios, a *Candida bombicola* que sintetiza soforolipídeos, o *Bacillus subtilis* que sintetiza a surfactina, e o *Thiobacillus thiooxidans* que sintetiza sulfolipídios (MULLIGAN *et al.*, 2005; HENKEL *et al.*, 2017).

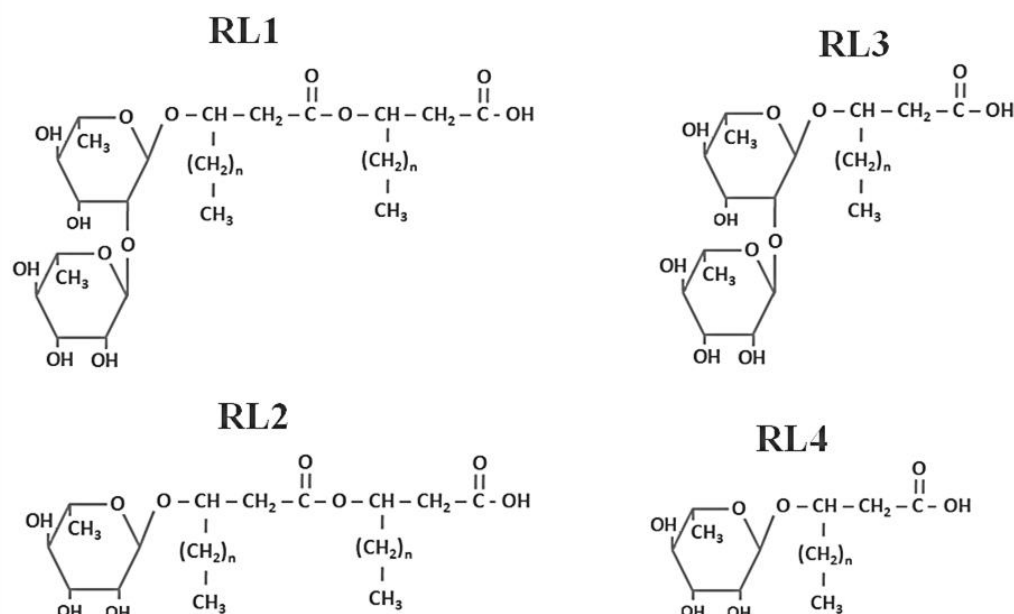
Entre os biossurfactantes, os glicolipídios são os mais pesquisados e, dentro do grupo, os ramnolipídios são os mais citados em literatura e patenteados; em seguida aparece o grupo dos soforolipídios (MULLER *et al.*, 2012; RANDHAWA; RAHMAN,

2014). Os ramnolipídios apresentam uma ou duas moléculas de ramnose na porção hidrofílica da molécula, e na região hidrofóbica, ácidos 3-hidroxiálcanóicos (JARVIS; JOHNSON, 1949).

Diversos microrganismos podem sintetizar ramnolipídios, como *Burkholderia* (ANDRÄ *et al.*, 2006; DUBEAU *et al.*, 2009), *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. (ROONEY *et al.*, 2009; VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2007), *Acinetobacter calcoaceticus* (ROONEY *et al.*, 2009), *Pseudoxanthomonas* sp. (NAYAK *et al.*, 2009), porém o principal produtor são as bactérias do gênero *Pseudomonas* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Os ramnolipídios produzidos podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m (ABALOS *et al.*, 2001) e sua concentração micelar crítica está entre 5 – 200 mg/L (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa*, são uma mistura de congêneres, sendo quatro os mais estudados: RL1 (Rha2-C10-C10), RL2 (Rha-C10-C10), RL3 (Rha2-C10) e RL4 (Rha-C10) (LANG; WAGNER, 1987) (Figura 1). As propriedades dos biossurfactantes dependem da composição e distribuição desses congêneres na mistura, que variam com a cepa bacteriana, condições de cultivo e composição do meio (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIECHTER, 1984). A descoberta de novos congêneres está diretamente ligada ao desenvolvimento de novos métodos analíticos, como a espectrometria de massas e a cromatografia líquida de alta precisão (LOVAGLIO, 2011b).

Figura 1: Estruturas básicas dos ramnolipídios: RL1 (2 moléculas de ramnose e 2 moléculas de ácidos graxos), RL2 (1 molécula de ramnose e 2 moléculas de ácido graxo), RL3 (2 moléculas de ramnose e 1 molécula de ácido graxo) e RL4 (1 molécula de ramnose e 1 molécula de ácido graxo).



Fonte: Yoshimura, 2019.

1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO E BIOSÍNTESE

Em muitos casos, a síntese das estruturas anfipáticas deriva diretamente do metabolismo primário. As rotas para a síntese desses precursores são diversas e utilizam grupos específicos de enzimas, que podem participar da síntese, assim como atuar como reguladores (DESAI; BANAT,1997). Segundo Sylatk e Wagner (1987), há quatro possibilidades para a biossíntese de biosurfactantes:

1. Porções hidrofílicas e hidrofóbicas são sintetizadas por duas rotas diferentes;
2. A porção hidrofílica é sintetizada, enquanto a síntese da metade hidrofóbica é induzida pelo substrato;
3. A metade hidrofóbica é sintetizada e a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato;
4. A síntese de ambas, porções hidrofílicas e hidrofóbicas, é dependente do substrato.

A biossíntese de ramnolipídios por *Pseudomonas* ainda é bastante debatida, especificamente sobre as vias de produção, alguns autores relatam que, diferentes partes da molécula não são sintetizadas pelas mesmas vias (SYLDATK *et al.*, 1985) porém

outros autores relatam uma produção da porção hidrofílica pela via glicolítica e a porção hidrofóbica produzida via FASII ou β -oxidação (OLVERA *et al.*, 1999; ROBERTSON *et al.*, 1994).

A produção desses biotensoativos por *P. aeruginosa* é regulada por sistemas quorum sensing, sendo que os dois principais sistemas são *las* e o *rhl* (GAMBELLO *et al.*, 1993; PEARSON *et al.*, 1994). O gene RHLR é responsável por codificar uma proteína denominada RHLR, que é um ativador transcricional, que regula a produção de ramnolipídios (OCHSNER *et al.*, 1994). Duan e Surette (2007) indicaram que, mesmo na ausência do sistema *las*, dependendo das condições de cultivo, o sistema *rhl* pode regular genes controlados pelo sistema *las*.

Zhu e Rock (2008) propuseram que a estereoquímica dos ácidos 3-hidroxi dos ramnolipídios correspondem a intermediários da biossíntese dos ácidos graxos e não dos intermediários da β -oxidação, indicando que a porção lipídica seria sintetizada a partir de duas unidades de carbono (FAS-II); sugeriram ainda que o substrato preferencial da enzima RhlA, responsável pela formação dos ácidos 3-hidroxiálcanóicos (AHA), é o ácido 3-hidroxi-decanoil-ACP. Os intermediários ACP do FAS-II compartilham uma configuração *R* do carbono quiral contendo um grupo 3-hidroxil, como 3-hidroacil-ACP, enquanto os intermediários correspondentes da β -oxidação, como os 3-hidroacil-CoA, estão na forma *S*.

Zhang e Ju (2012) verificaram que tanto a síntese de novo quanto a β -oxidação é responsável pela síntese dos precursores lipídicos dos ramnolipídios. Nesse trabalho, os autores realizaram dois tipos de experimentos: no primeiro, eles utilizaram glicose como fonte de carbono e em outro uma mistura de glicose e ácidos graxos. Monitorando a atividade gênica, eles observaram que com a fonte de carbono hidrofóbica houve um aumento de até 4 vezes na atividade do gene *fadA* (cuja proteína participa da última etapa da β -oxidação) e de 200 a 600 vezes na expressão dos genes *rhlAB* relacionados à biossíntese de ramnolipídios, quando comparados com a fonte de carboidrato. Através da análise de espectrometria de massa, determinou-se o padrão de incorporação de deutério, oriundo do ácido octadecanóico d35, observando-se que o congênere RhaC10 continha de 1 a 15 átomos de deutério em sua molécula, comprovando que a β -oxidação fornece precursores, derivados dos ácidos graxos, para a síntese de ramnolipídios.

Ainda, Zhang e Ju (2012) sugeriram que os intermediários da β -oxidação, que apresentam 8 carbonos, sofrem um alongamento pelo FAS-II para o intermediário de 10 carbonos, que então é entregue para a biossíntese do biossurfactante, e no estudo de Hori

et al. (2011) quando a *P. aeruginosa* foi alimentada com ácidos graxos de cadeia de carbono ímpares foi observado cadeias ímpares na constituição dos ramnolipídios.

Abdel-Mawgoud *et al.*, (2014) relataram que a β -oxidação é a fonte predominante do ácido 3-hidroxiacanoico (3-AHA), principal precursor da parte lipídica dos ramnolipídios, e que a produção de ramnolipídios diminui quando há inibição dessa via, mesmo utilizando fontes hidrofílicas.

Os lipídios seriam entregues à via FAS-II para a produção de metabólicos primários, como estruturas celulares, enquanto a β -oxidação forneceria os precursores lipídicos destinados a metabólicos secundários, como os ramnolipídios. As fontes de carbono hidrofóbicas produziram mais ramnolipídios do que as hidrofílicas, devido os ácidos graxos desses meios serem incorporados diretamente na β -oxidação, enquanto que dos meios hidrofílicos exigiram uma síntese metabólica *de novo* para serem incorporados (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011a), o que corrobora com o estudo de Burger *et al.* (1963) que concluiu que os ácidos graxos são precursores diretos dos ácidos alcanóicos.

Os intermediários da β -oxidação, como Trans-2-enoil-CoA, 3-Hidroxiacil-CoA, e 3-Cetoacil-CoA, podem ser convertidos através de Enoil-CoA Hidratase, Epimerase, e 3-Cetoacil-CoA redutase, em ácidos graxos 3-Hidroxi. Buscando os genes que codificam essas enzimas no genoma da *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (WINSOR *et al.*, 2011), foram encontrados 14 loci para Enoil-CoA Hidratase, enquanto que para Epimerase e 3-Cetoacil-CoA redutase não foram encontrados nenhum. Dos 12 loci testados, três enzimas foram associadas a notáveis reduções na produção de ramnolipídios, em 35%, 56% e 54%, e foram nomeados de *RhlK*, *RhlY* e *RhlZ*, respectivamente (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2014).

Os genes *rhlY* e *rhlZ* estão localizados no mesmo operon (WINSOR *et al.*, 2011). A deleção desses genes causou uma diminuição drástica nos precursores de ramnolipídios (70%), principalmente de 3-OH-C10, seguido dos precursores de 8 e 12 carbonos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2014), esse fato se deve as cadeias de C10 serem mais abundantes que as demais (DÉZIEL *et al.*, 2000). Observou-se também que a ação dos genes *rhlYZ* catalisam a Trans-2-enoil-CoA para formação de ácido 3-Hidrodecanoil-CoA.

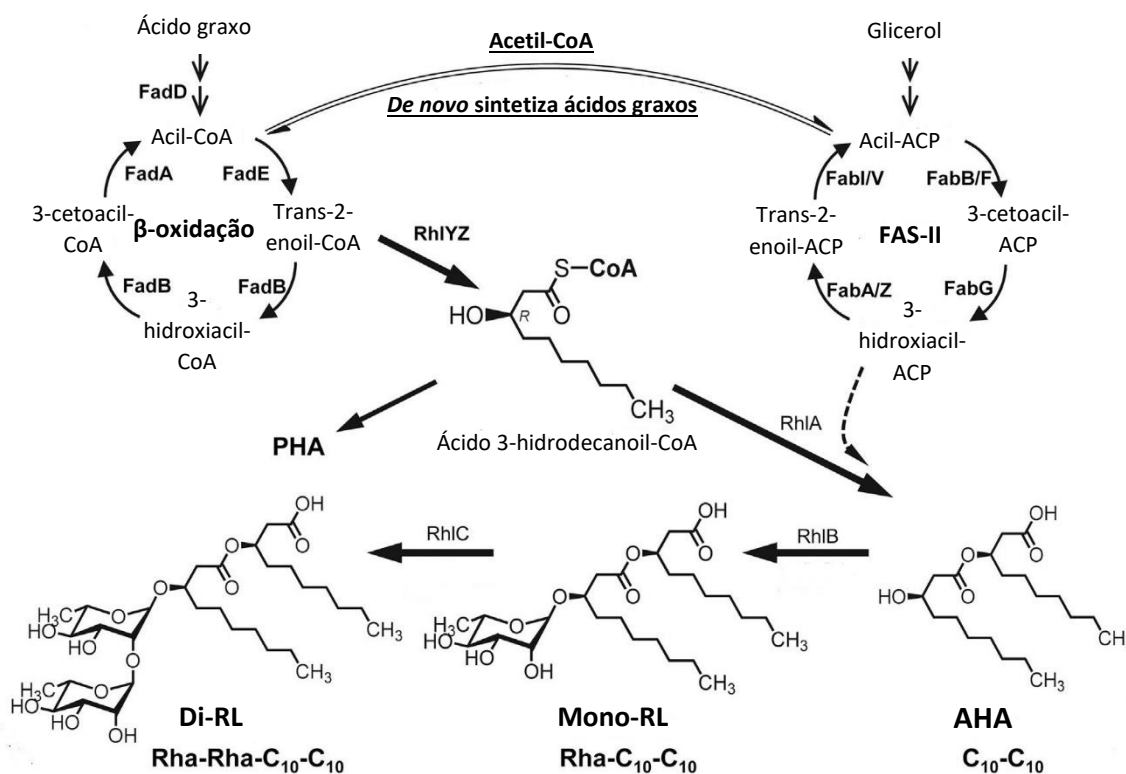
Silva (2018) estudou o efeito da deleção dos genes *rhlYZ* na *P. aeruginosa* MPAO1, usando óleo de girassol e glicerol como fonte de carbono. Usando fonte hidrofóbica, a produção de ramnolipídios com a cepa Δ *rhlYZ* foi 38,35 % inferior a produção quando do uso da cepa selvagem MPAO1, enquanto que no experimento com

a fonte hidrofílica não houve diferença expressiva entre as cepas, porém houve um atraso na produção do biossurfactante, e o consumo da fonte foi mais acentuado, comprovando o observado por Abdel-Mawgoud *et al.*, (2014), onde é afirmado que mesmo em fontes hidrofílicas a produção seria prejudicada sem as devidas vias da β -oxidação.

O ácido 3-Hidroalcanoato é um precursor tanto dos ramnolipídios quanto do Poli-hidroxiálcanoatos (PHA) (MADISON; HUISMAN, 1999; WANG *et al.*, 2012). Abdel-Mawgoud *et al.* (2014) deletaram a maioria dos genes do PHA e observaram aumento de 13% na produção de ramnolipídios, indicando que a produção de PHA causa um desvio de intermediários da produção do biotensioativo. Eles observaram também um aumento notável nos congêneres RL2 (Rha-C₁₀-C₁₀) e uma diminuição dos RL1 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀), demonstrando que o acúmulo de precursores lipídicos junto com um conjunto limitado de ramnose favorecia os congêneres contendo uma ramnose do que aqueles com duas. A deleção do gene *rhIYZ* também causou uma diminuição de 25% na produção de PHA, confirmando que a rota do PHA também faz uso do ácido 3-Hidrodcanoil-CoA.

A enzima RhlA dimeriza os ácidos graxos 3-Hidroxi formando ácidos 3-Hidroxiálcanóicos (AHA), precursor dos ramnolipídios, sendo o mais abundante o C₁₀ – C₁₀. A homologia de RhlA com Transacilases, como a PhaG envolvida na síntese de Poli-hidroxiálcanoatos (PHA), levou a proposição de que RhlA é uma Transacilase que catalisa a transferência do ácido 3-Hidrodcanoil associado à proteína carreadora de acila (ACP) para a coenzima A (CoA). (DÉZIEL *et al.*, 2003; ZHU; ROCK, 2008). Enquanto as enzimas RhlB e RhlC são responsáveis por acrescentar a molécula de ramnose, sendo a enzima RhlB formadora do congênere RL2 (RhaC₁₀C₁₀), e a enzima RhlC do congênere RL1 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) a partir do congênere mono (OCHSNER *et al.*, 1994; RAHIM *et al.*, 2001). O esquema representando os genes da biossíntese de ramnolipídios e das rotas metabólicas envolvidas, podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2: Modelo proposto para suprimento metabólico de precursores lipídicos de ramnolipídios. Na β -oxidação ocorre um encurtamento da cadeia de ácido graxo até a formação do intermediário trans-2-enoil-CoA. Enquanto que, no caso do glicerol, a síntese de novo via FAS-II forma ácidos graxos que são desviados para a β -oxidação.



Fonte: Traduzido de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014).

Lovaglio *et al.* (2015) afirmaram que, quando o carbono hidrofílico (cadeia curta) é empregado como fonte, é mais energeticamente favorável fazer a porção hidrofóbica pela síntese de novo, pois seria oxidado em Acetil-CoA, que passaria para Malonil-CoA, e em seguida para Malonil-ACP, começando o ciclo FAS II. Entretanto, se a fonte de carbono proporcionar ácidos graxos de cadeia longa, é mais favorável que a porção lipídica seja sintetizada na rota da β -oxidação, não exigindo a oxidação completa do Acetil-CoA para ir para o ciclo FAS II, desviando-a para formação de glicolípido.

A Ramnose pode ser obtida pela conversão da glicose, através da enzima Fosfoglicomutase AlgC, convertendo D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, que é utilizado por outras enzimas produzindo, ao final do processo bioquímico, dTDP-Lramnose. A Ramnose também pode ser obtida através da oxidação de lipídios através do ciclo do glioxilato, onde Acetil-CoA, formada na β -oxidação, é convertida à Succinato, que é transformado em Malato no ciclo do ácido cítrico. O Malato é oxidado à Oxaloacetato que pela gliconeogênese é convertido em hexoses, e posteriormente à

ramnose (OLVERA *et al.*, 1999; ROBERTSON *et al.*, 1994).

1.3.1 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

A produção de biossurfactante é influenciada por diversos fatores, tais como: pH, limitações nutricionais, aeração, agitação, formação de espuma, temperatura e fonte de carbono; que afetam o tipo e a quantidade de biotensioativo produzido (FIECHTER, 1992; CHANG *et al.*, 2005).

A temperatura ótima, no caso da *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, é de 37°C (ROBERT *et al.*, 1989); e a melhor faixa de pH é entre 6,0 e 6,5, enquanto que no pH 7,0 a produção cai bruscamente (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1984). Outro parâmetro importante é o oxigênio disponível no meio de cultura, como foi demonstrado por Sheppard e Cooper (1990) em seu estudo acerca da produção de surfactina por *B. subtilis*.

Os compostos nitrogenados são um dos componentes nutricionais que mais afetam a produção de ramnolipídios, podendo induzir ou inibir. O uso de cátions bivalentes demonstrou ser inibitório na produção (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1986; RAMANA; KARANTH, 1989), e o uso de amônio (NH₄⁺), glutamina, asparagina e arginina, diminuíram a produção, porém outras fontes de nitrogênio como nitrato (NO₃⁻), glutamato e aspartato ajudaram na produção (MULLIGAN; GIBBS, 1989; RAMANA; KARANTH, 1989; KÖHLER *et al.*, 2000). O nitrato é relatado como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios, pois estimula a expressão do gene rhIAB, um dos principais responsáveis pela síntese desse bioproduto (VENKATA; RAMANA, KARANTH, 1989; MANRESA *et al.*, 1991; ARINO *et al.*, 1996).

A proporção C/N também demonstrou ser um fator crucial na produção de ramnolipídios, como relata o estudo de Benincasa e Accorsini (2008), que avaliaram a produção por *Pseudomonas aeruginosa* LBI em diferentes proporções, alcançando a melhor produção quando a proporção foi de 8/1, enquanto Lovaglio (2010) alcançou o melhor rendimento em 23/1.

A produção de biossurfactante em biorreator enfrenta um problema que é a formação de espuma com presença de biotensioativo de interesse, junto com células e nutrientes, impossibilitando o descarte do excesso de espuma. Nesse caso ocorre a interrupção da fermentação antes do período estabelecido, acarretando em um menor rendimento (SILVA, 2011).

Uma das maiores dificuldades na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* consiste no fato dela ser um patógeno oportunista, apresentando grande resistência à antimicrobianos (TREEPONG; KOS, GUYEUX, 2017), o que aumenta os custos do bioprocesso, pois exige uma infraestrutura mais segura. Zulianello et al. (2006) relataram que o ramnolipídio pode ser considerado um fator de virulência, devido ele ajudar as bactérias *P. aeruginosa* a romper células epiteliais humanas durante o início da infecção de paciente com fibrose cística.

1.3.2 Substratos alternativos

A utilização de fontes de carbono alternativas contribui para redução da poluição ambiental, e agrega valor aos mesmos, uma vez que cerca de 10 – 30% do custo de produção de um produto biotecnológico é referente à matéria-prima utilizada (MUKHERJEE *et al.*, 2006). O uso de fontes alternativas também possibilita o descobrimento de novos tipos de congêneres, como foi o caso de Benincasa *et al.*, (2004) que caracterizaram, e testaram a eficiência antimicrobiana de um novo congênere de ramnolipídio proporcionado pelo cultivo em borra de óleo de girassol.

A natureza da fonte de carbono é um dos fatores mais relevantes na distribuição de congêneres quando se trata da composição do meio. Na cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi observado a predominância do congênere RL2 (RhaC₁₀C₁₀) nas fontes hidrofóbicas, enquanto que nas fontes hidrofílicas predominou o congênere RL1 (Rha2C₁₀C₁₀) (NITSCHKE *et al.*, 2005). Na cepa UG2, os substratos hidrofóbicos geraram quantidades maiores de ramnolipídios em relação ao uso de substratos hidrofílicos (MATA-SANDOVAL; KARNS; TPRRENTS, 2001).

Nitschke *et al.*, (2005) avaliaram a produção de ramnolipídios por meio de 5 fontes diferentes: glicose, glicerol, óleo de soja, borra de óleo de soja e gordura de galinha. O melhor resultado foi obtido com borra de óleo de soja, atingindo uma produção de 11,72 gL⁻¹. A biomassa produzida em todas as fontes foi parecida: a menor apresentando 1,39 mg/mL (gordura de galinha) e a maior 1,75 mg/mL (óleo de soja). Um dado interessante é que o glicerol, uma fonte hidrofílica, apresentou maior produção do biotensoativo do que duas fontes hidrofóbicas, com uma concentração de 8,05 gL⁻¹, enquanto que, a gordura de galinha e o óleo de soja, produziram 6,8 gL⁻¹ e 7,63 gL⁻¹ respectivamente.

No experimento de Benincasa *et al.* (2002) foi avaliado a produção de ramnolipídios a partir de óleo de oliva, óleo de soja, óleo e borra de óleo de girassol. O

resíduo produziu 12 gL⁻¹ de ramnolipídios, superior a produção de oliva (5.4 gL⁻¹), óleo de soja (4.8 gL⁻¹) e até de óleo de girassol (4.9 gL⁻¹). Os autores também estudaram a composição de ácidos graxos contidos nessa fonte de carbono, e observaram a rápida diminuição do ácido linoleico no experimento, indo de 50% para 4% após as primeiras 48 horas, e do ácido oleico, indo de 25% para 0,12% ao final do experimento. No óleo de girassol, a concentração inicial de ácido linoleico era de 65-70%, enquanto que do ácido oleico era de 20-25%. Vale observar que não houve consumo do ácido esteárico.

Há alguns óleos nativos como: buriti, maracujá, andiroba, castanha-do-Brasil, e babaçu, que apresentaram bons rendimentos na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI, e que poderão conferir novos congêneres e, conseqüentemente, novas aplicações para estes, assim como aumentar o valor agregado desse tipo de insumo (COSTA *et al.*, 2006).

1.3.2 Óleos Nativos

1.3.2.1 Açaí

A palmeira *Euterpe oleracea* conhecida como açaizeiro, é nativa da região norte do Brasil e se constitui como uma das principais plantas da fruticultura local. Seu fruto contém proteínas, antocianinas, fibras e, principalmente, lipídios. Estima-se que 53% do peso seco da polpa de açaí é composta por óleo vegetal (NOGUEIRA, 1995; OLIVEIRA, 1995).

O óleo de açaí é formado de ácidos graxos mono-insaturados e poli-insaturados, 60% e 14%, respectivamente. A composição em ácidos graxos no óleo de açaí é: ácido oleico (C18:1) (60%), ácido palmítico (C16:0) (22%), ácido linoleico (C18:3) (12%), ácido araquidônico (C20:4) (2,5%), ácido palmitoleico (C16:1) e esteárico (C18:0) (2% cada) (ROGEZ, 2000). Outros óleos com composição semelhantes são o óleo de oliva e abacate.

No estudo de Nascimento *et al.* (2008) foram analisadas as características físico-químicas da polpa de açaí e a extração de óleo a partir de duas técnicas: uma com solvente orgânico (hexano) e outra com enzimas. A polpa de açaí apresenta, em g/100g, 89,1 de umidade, 4,6 de lipídios, 0,1 de proteínas, 5,6 de carboidrato, e pH 5. Na extração do óleo, não houve diferença significativa em ambas às técnicas, mas ressalva-se que, usando hexano, foram obtidos menos ácidos graxos insaturados e monoinsaturados, 3% e 2,5%, respectivamente, se comparado com a extração com enzimas.

1.3.2.2 Chia

A chia (*Salvia hispânica L.*) é nativa do sul do México e norte da Guatemala, onde há séculos constituiu o alimento base dos índios do sudoeste da América (TOSCO, 2004). Ultimamente, ela recebeu grande atenção pela alta quantidade de ácidos graxos, como ácido linolênico, apresentando concentrações próximas de 68%, e do ácido linoleico, com concentrações variando de 17% a 26% dos lipídios totais do óleo (AYERZA; COATES, 2000; CAPITANI *et al.*, 2012). Além do ácido linolênico e linoleico, o óleo de chia conta também com o ácido esteárico, palmítico, oleico, araquídico e behênico (SOUZA *et al.*, 2014).

O ácido linoleico e linolênico são os precursores do ômega 6 e 3, considerados óleos essenciais para o ser humano, devido não serem sintetizados pelo organismo. Eles possuem alto valor nutricional, ajudando na prevenção e redução de várias doenças, como as coronárias, inflamatórias e diabetes (BORNEO *et al.*, 2007; PUWASTIEN, 1999).

Do ponto de vista da estabilidade, os ácidos graxos poli-insaturados sofrem mais oxidação do que os saturados, devido à alta quantidade de duplas ligações (ANTONIASSI, 2001), o que compromete seu processamento e armazenamento, diminuindo a qualidade do produto e seu valor nutricional, sendo a encapsulação uma maneira de reverter isso (GOKMEN *et al.*, 2011).

Durante o processo de encapsulação ocorre perda de ácidos graxos, em parte devido à própria oxidação do composto, e outra recorrente do processamento que envolve aumento da temperatura e aplicação de ultrassom (BRINKMANN, 2000; LUZIA, 2012). No estudo de Souza *et al.* (2014), durante o encapsulamento em partículas de ácido esteárico, observou-se a maior eficiência no encapsulamento de ômega-3 do que do ômega-6, com rendimento de 82% e 64%, respectivamente. Tal diferença foi atribuída à conformação molecular dos ácidos; o ômega-6 apresenta menos instauração, deixando a estrutura menos compacta, prejudicando a estabilização dentro da estrutura semi-critalina do ácido esteárico.

Tosco (2004) estudou os valores nutricionais da semente e óleo de chia. O óleo apresenta maior valor energético se comparado à semente, porém a semente retém todas as proteínas. Em 100 ml de óleo, estima-se que existem 92 gramas de gordura total, sendo 74,8 gramas de gordura poli-insaturada, seguido de 14 gramas de gordura mono-insaturada.

1.3.2.3 Andiroba

Também situada na região norte do Brasil, a andiroba (*Carapa guianensis*) possui propriedades fitoterápicas e medicinais, sendo bastante apreciada pela medicina popular, favorecendo a economia regional (CAMPOS *et al.*, 2013; MIRANDA-JÚNIOR *et al.*, 2012; TAPPIN *et al.*, 2008). Em 2004 foi estimado que foram consumidos 30 mil litros de óleo de andiroba no Brasil, e exportado 450 mil litros (NEVES *et al.*, 2004).

Uma das principais propriedades fisiológicas do óleo de andiroba reside na sua ação antialérgica, anti-inflamatória e anti-plasmódica (COSTA-SILVA *et al.*, 2008; MIRANDA-JÚNIOR *et al.*, 2012; PENIDO *et al.*, 2005). Tais propriedades ocorrem devido à presença de triglicerídeos (ácidos graxos), tocoferóis, carotenoides, compostos fenólicos e, principalmente, de limonoides, fitoquímico comum em plantas da família Meliaceae, correspondendo a quase 5% do teor do óleo (SILVA *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos presentes no óleo da semente são de maioria insaturada, como o ácido oleico, apresentando 42,71% da composição total, seguido pelo ácido palmítico que já é um ácido saturado, com um valor de 31,02%. Além desses ácidos, encontram-se também no óleo os ácidos esteárico (10,53%), linoleico (12,93%), araquidônico (2,26%) e behênico (0,5%) (SILVA, 2018).

1.3.2.4 Buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa*) é conhecido em algumas regiões como muriti, muritim ou palmeira-dos-brejos, e é nativo do cerrado brasileiro. Como característica dos frutos desse bioma, eles possuem alto valor nutritivo e lipídico, além de possuírem atrativos sensoriais, sendo alimento de diversas aves e mamíferos (AGOSTINI; VIEIRA, 2004; BATISTA *et al.*, 2012; RUFINO, 2008).

Assim como o óleo de andiroba, o óleo de buriti apresenta compostos antioxidantes e fotoprotetoras, como carotenóides e tocoferol (BITAR; ALCANTARA, 2014). Além disso, é possível listar a presença de outros componentes bioquímicos, como vitaminas do complexo B (B₁, B₂ e PP), aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), fibras, retinol, vitamina C e carboidratos (AFONSO, 2013; MARTINS, *et al.*, 2006; BATISTA, *et al.*, 2012). Com toda essa composição, o óleo de buriti se destaca pelas ações de anti-oxidante, anti-inflamatório e anti-bacteriano.

O buriti possui diversas aplicações na indústria de cosmético e biodiesel, e também para os ribeirinhos da região, que se utilizam da madeira pra construção de pontes e casas, das folhas para cobertura da casa, e do fruto para produção de produtos artesanais, como doces e vinho (SANTOS; COELHO-FERREIRA, 2012).

A polpa de buriti é conhecida pela alta quantidade de ácido ascórbico, poli fenóis e de lipídios; estima-se que com 10 kg de massa é possível obter entre 1 a 2 litros de óleo (SAMPAIO, 2011; SANTANA; JESUS, 2012). O óleo é constituído principalmente por ácidos graxos mono-insaturados como o ácido oleico (72,23%), seguido pelo ácido saturado palmítico (22,18%). Os poli-insaturados representam apenas 1,7% da composição total de ácidos graxos do óleo (CRUZ *et al.*, 2016).

A relação dos ácidos graxos com cada óleo exemplificado pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração de ácidos graxos presentes nos óleos em porcentagem %.

Ácido Graxo	Açaí ¹	Andiroba ²	Buriti ³	Chia ⁴
C 16:0 Palmítico	22	31	19,5	7,3
C16:1 Palmitoleico	2	0	0	0
C18:0 Esteárico	2	10,5	1,8	2,9
C18:1 Oléico	60	42,7	73,3	5,5
C18:2 Linoléico	12	12,9	2,3	19,7
C18:3 Linolênico	0	0	1,7	64,1
C20:0 Araquídico	2,5	2,2	0	0,2
C22:0 Behênico	0	0,5	0	0,05

Fonte: 1- Rogez, 2000; 2- Silva, 2018; 3- Martins *et al.*, 2016.; 4- Souza *et al.*, 2014.

1.4 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes possuem diversas aplicações, atraindo a atenção de diversos setores da indústria, como da agroindústria, medicina, petroquímica, alimentícia e cosmética, porque além de suas propriedades funcionais, os biossurfactantes também são menos nocivos ao meio ambiente, e mantêm suas propriedades em uma ampla faixa de pH e salinidade, permitindo sua utilização na indústria sustentável (KITAMOTO *et al.*, 2002; SANDRIN *et al.*, 2000; RAHMAN *et al.*, 2003; LOVAGLIO *et al.*, 2010; MARCHANT; BANAT, 2012).

Uma das maiores áreas de aplicação dos biossurfactantes é na indústria petroquímica, onde são incorporados em formulações de óleos lubrificantes e na produção de petróleo, assim como na biorremediação, dispersão no derramamento de óleo, recuperação melhorada de petróleo, e na remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques (DESAI; BANAT, 1997).

Venkatesh e Vedaraman (2012) demonstraram que uma solução contendo 2% de ramnolipídios é capaz de remover 74% do cobre contido em solo contaminado. Enquanto o estudo de Wang e Mulligan (2009) relataram sua eficiência na remoção de arsênio de rejeitos da mineração.

Na medicina, os ramnolipídios podem desempenhar diversas funções, como agente antimicrobiano, sendo efetivo em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, e em fungos filamentosos, porém ele não apresenta papel significativo contra leveduras (VATSA *et al.*, 2010).

Os biossurfactantes possuem a propriedade de remover e impedir a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções internas (SINGH; CAMEOTRA, 2004; SANTOS; DRUMMOND, DIAS-SOUZA, 2017), e em materiais na indústria de alimentos também. Quando aplicado surfactina e ramnolipídio na superfície de materiais, ocorre a alteração de suas propriedades externas, dificultando a formação de biofilmes gerados por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* (GOMES; NITSCHKE, 2012).

Outra aplicação dos biotensoativos é como inseticida biológico, não se restringindo apenas na área rural. O estudo de Kim *et al.* (2011) utilizou os congêneres de di-ramnolipídios $C_{32}H_{58}O_{13}$ e $C_{34}H_{62}O_{13}$ contra os pulgões da espécie *Myzus persicae*, demonstrando a eliminação de 100% da população quando a concentração foi de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Em 2015 foi estudado a ação dos ramnolipídios frente a mosquitos vetores de dengue, chikungunya, febre amarela e malária, realizado Prabakaran *et al.* (2015) que descreveram a atividade de di-ramnolipídios em pupas dos mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*, apresentando concentração letal média (LC50) em 0,003mg/100mL de di-ramnolipídios. Já o estudo realizado por Silva *et al.* (2015) avaliou o potencial inseticida, larvicida e a atividade de repelência desses biossurfactantes contra mosquitos *Aedes aegypti*, sendo que as concentrações de 800, 900 e 1000 mgL^{-1} de ramnolipídios eliminaram todas as larvas do mosquito em 18 horas, e houve a eliminação total dos adultos em 1000 mgL^{-1} .

Os ramnolipídios apresentam enorme diversidade de aplicações na área da agroindústria, devido diversas propriedades, como sua atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, possuindo potencial para o controle biológico de fito-patógenos que produzem zoósporos (ABALOS *et al.*, 2001).

As classes de biossurfactantes sorolipídios e ramnolipídios, foram usados para combater os fungos causadores da perda de rigidez e de manchas cinzas em tomates e maçãs (KIM *et al.*, 2000). Os ramnolipídios já demonstraram serem eficaz na proteção de videiras contra ataques de *Botrytis cinerea* (VARNIER *et al.*, 2009), e também no controle da incidência de fungos da espécie *Colletotrichum falcatum*, principal fungo causador da doença “red hot” na cana de açúcar, que causa grande perda no cultivo em diversos países (GOSWAMI *et al.*, 2015). Os ramnolipídios também são eficientes no controle de muitos outros tipos de fungos patogênicos de plantas, como *Botrytis sp*, *Rhizoctonia sp*, *Pythium sp*, *Phytophthora sp*, e *Plasmopara sp* (VATSA *et al.*, 2010); reforçando ainda mais sua característica antifúngica.

Os ramnolipídios podem ser usados como fungicida tanto na forma pura como misturado ao caldo fermentado livre de células, levando o barateamento do produto não purificado, tornando-o mais competitivo em relação aos antifúngicos comerciais (SHA *et al.*, 2012).

Na área alimentícia, quando empregados, eles podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor, e na conservação de produtos da panificação (NITSCHKE *et al.*, 2011), ou ainda no combate a adesão de alguns microrganismos, como *Listeria monocytogenes* (Gram-positivo) e *Pseudomonas fluorescens* (Gram-negativo), em superfícies de poliestireno e aço inoxidável, sendo que no poliestireno houve redução da adesão em 79%, e no aço inoxidável de 83% (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Uma das áreas em que há grande interesse atualmente está relacionada ao uso antimicrobiano, propriedades de hidratação da superfície da pele e baixa toxicidade dos biossurfactantes glicolipídicos e lipopeptídicos, os quais poderiam substituir surfactantes químicos atualmente usados em cosméticos e formulações farmacêuticas para cuidados com a pele (ADU *et al.*, 2020).

Diversos microrganismos habitam a pele, alguns oferecendo benefícios, como controlar possíveis infecções na epiderme, enquanto outros são patógenos oportunistas. O uso excessivo de cosméticos que se utilizam de surfactantes de origem petroquímica afeta esse microbioma externo, podendo causar irritação, alergia e até infecções, devido ao enfraquecimento dos microrganismos benéficos, além de prejudicar as diversas funções atribuídas a pele (BUJAK; WASILEWSKI; NIZIOL-LUKASZEWSKA, 2015).

A substituição do surfactante químico pelo biossurfactante demonstrou manter o equilíbrio do microbioma cutâneo, garantindo também os mesmos benefícios de um surfactante petroquímico, além de não formar ligações danosas na pele, como do

surfarctante com os lipídios na epiderme que, futuramente, podem se desenvolver em câncer (BUJAK; WASILEWSKI; NIZIOL-LUKASZEWSKA, 2015; KARLAPUDI *et al.*, 2020).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a produção de ramnolipídios utilizando a cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (LOVAGLIO, 2011) frente a diferentes óleos nativos .

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar quais as melhores fontes de carbono derivados de plantas brasileiras, como chia, andiroba, açaí e buriti; para produção de ramnolipídios por meio da cepa *P. aeruginosa* LBI 2A1.

- Observar os diferentes congêneres de ramnolipídios originados de cada um dos óleos utilizados e comparar com aqueles obtidos de fontes comerciais

3. Material e métodos

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente estudo será *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (LOVAGLIO, 2011) que estava acondicionado a -20 °C proveniente do Departamento do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (IB/UNESP, câmpus Rio Claro).

3.2 Meio de cultura

3.2.1 Meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato

O meio de cultura utilizado para preparo do inóculo possuiu a seguinte constituição em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,1; NaNO_3 - 1,5; fonte de carbono - 50; tampão fosfato 0,1M 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; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,28; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,4; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,8.

3.2.2 Meio mineral livre de cálcio

Para a produção de ramnolipídios foi utilizado o seguinte meio (g/L): K_2HPO_4 - 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl - 1,0; NaNO_3 - 15; e a fonte de carbono - 100.

As fontes de carbono utilizadas na composição do meio foram: óleo de andiroba, óleo de açaí, óleo de buriti e óleo de chia, provenientes da empresa “Mundo dos Óleos” (<https://www.mundodosoleos.com/>). O volume e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item 3.2.1. A concentração dos reagentes utilizados nos meios estão descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2 e tem por base o volume de meio, excluindo-se o volume da fonte de carbono empregado.

3.3 Condições de cultivo

3.3.1 Preparo do inóculo

O microrganismo foi pré-cultivado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de caldo lisogênico e 100 µL da cultura estoque do microrganismo, o cultivo ocorreu em mesa agitadora, por 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida 1,25 mL desse pré-cultivo foi transferido para frascos de 500 mL com 100 mL de meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato; o frasco foi incubado por 24 horas à 37°C e 200 rpm. pH 6.5 - 7.0. Esta cultura foi utilizada posteriormente para inoculação do meio de fermentação resultando em uma densidade ótica (D.O) 580 nm inicial de 0,1.

3.3.2 Bioprocessos em mesa agitadora

Os bioprocessos realizados a fim de verificar a produção de ramnolipídios foram realizados em mesa agitadora tipo shaker, a 37 °C sob agitação de 200 rpm, por um período de 120 horas, com injeção de elementos traços nos períodos de 0, 20, 40 ,70 e 120 (item 3.2.1) horas de cultivo. Amostras de 5ml foram retiradas a cada 24h para avaliação do perfil de produção de ramnolipídios, os meios de cultura foram o meio mineral livre de cálcio, tendo por fonte de carbono os óleos descritos no item 3.2.2. Todo procedimento foi realizado em triplicata.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Processamento das amostras

A cada amostra foi adicionado n-hexano no volume 1:1, com objetivo de obter óleo residual, seguido de agitação das amostras por 1 minuto e posteriormente essas amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos para que ocorresse a separação de fases células / fase aquosa / n-hexano. O hexano com o óleo residual se concentrou na parte mais superior da amostra.

Para a extração do biotensoativo foi utilizado acetato de etila 1:1,25 (v/v); centrifugando à 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos; na fase superior ficou retido o ramnolipídios junto ao acetato de etila, enquanto que embaixo ficou água. Depois o solvente é evaporado, obtendo-se ramnolipídios puro. O procedimento de extração com acetato de etila foi repetido 2 vezes.

3.4.2 Avaliação da produção de ramnolipídios

3.4.2.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar a produção de ramnolipídios antes de prosseguir para as análises em HPLC e foram realizadas de acordo com a metodologia utilizada por Lovaglio (2011a). Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte solução: clorofórmio / metanol / ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi composto da mistura 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico. As amostras consistindo de 10 µL de extratos de ramnolipídios foram obtidos a partir do caldo livre de células, em diferentes tempos de fermentação.

3.4.2.2 Determinação da concentração de Ramnolipídios - HPLC

3.4.2.2.1 Derivatização

Para a análise em HPLC as amostras e os padrões contendo ramnolipídios foram derivatizadas de acordo com o descrito por Schenk *et al.* (1995) com pequenas modificações, a fim de serem detectadas via detector de UV.

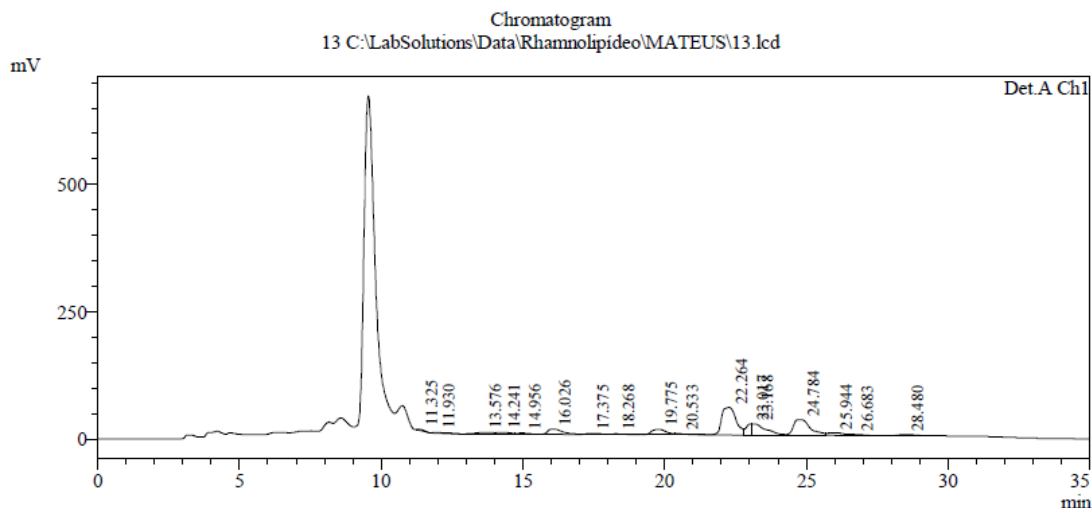
As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionaram-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e trietilamina 20mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 h a 60°C e 1400 rpm, em um termomixer (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG).

3.4.2.2.2 HPLC

As análises foram realizadas em equipamento HPLC (Shimatzu) acoplado a um detector UV como descrito por MÜLLER et al., (2010). Para a calibração do HPLC foi utilizado solução padrão de mono- e di-ramnolipídio (Sigma Aldrich) nas seguintes concentrações: 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g/L. Para as análises foi utilizada uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC18, Supelco - 150 mm x 4.6 mm, 5 µm silica gel) a 30°C. As fases móveis foram: solução A com 5% de metanol e solução B com 95%, ambas em água ultrapura. Para que ocorra separação dos congêneres 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 ocorra equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados a 254 nm. Os tempos de retenção foram 22,3 – 22,5 minutos pra Rha-Rha-C₁₀C₁₀ e 23,2 – 23,4 minutos para Rha-C₁₀C₁₀ (Figura 3).

Figura 3 – Cromatograma do ramnolipídios obtido através do computador do LMI (Laboratório de Microbiologia Industrial) da amostra de açaí de 48 horas. No eixo X pode-se observar o Rha-Rha- $C_{10}C_{10}$ em $22,3 \pm 0,2$ minutos e o para Rha- $C_{10}C_{10}$ em $23,2 \pm 0,2$ minutos.

<Chromatogram>



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.4.3 Determinação da biomassa microbiana

Após a separação das 3 fases (item 3.4.1) o pellet de células foi resuspenso em NaCl 0,85% (v/v) (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado à 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantido em estufa à 100°C até atingir peso constante.

3.4.4 Determinação do óleo residual

O óleo residual foi quantificado após a retirada da fase orgânica, através da sua junção com o hexano descrito no item 3.4.1, para determinação gravimétrica. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente dentro de capela de exaustão até a completa evaporação do solvente.

As amostras de óleo foram submetidas a reação de esterificação (Método Oficial da AOAC 969.33, 1969), a partir de 100 mg de óleo residual e 4 mL de NaOH 0,5 M em MeOH. A reação ocorreu em sistema de refluxo e foi mantida por aproximadamente 10 min. Em seguida, adicionou-se 5 mL da solução de BF₃ 10% em MeOH através do condensador e o sistema foi mantido sob ebulição por mais 2 min. Ao final, foi acrescentado heptano (2 mL) também através do condensador e mantido sob ebulição durante 1 min. O sistema foi retirado do refluxo com a interrupção do aquecimento e retirada do condensador. Em seguida, adicionou-se de 15 mL de solução saturada de NaCl

e agitou-se vigorosamente por 15 s. A solução foi transferida para um tubo vidro para que ocorresse separação de fases, e em seguida transferiu-se 2ml para um eppendorf contendo Na_2SO_4 e depois retirou-se outra alíquota para ser analisada em GC-MS.

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

3.4.5 Determinação da composição dos homólogos por LC-MS

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

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

3.4.6 Análise estatística

Os dados foram comparados utilizando análise de variância, as diferenças significativas se deram com $P < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1995) através do Excel 2016.

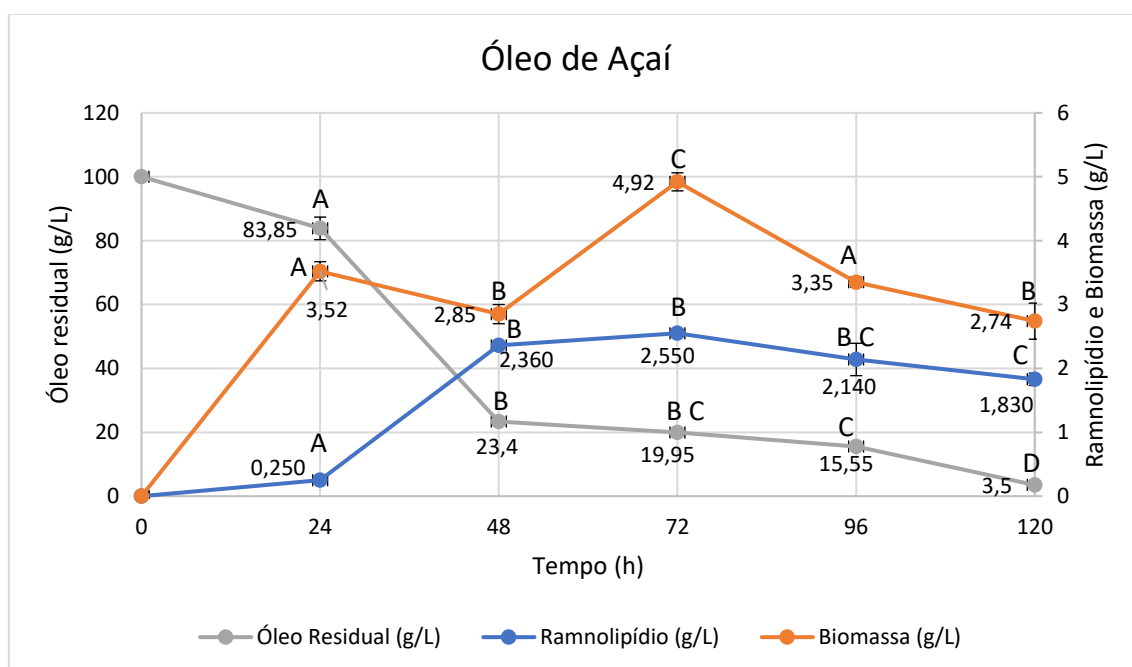
4. Resultados e Discussão.

4.1 Produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* 2A1 LBI em óleos essenciais e avaliação do consumo da fonte de carbono

Os resultados obtidos dos experimentos com a LBI 2A1 utilizando óleos essenciais como açaí, andiroba, buriti e chia, estão esquematizados nas Figuras 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A figura 4 representa os dados obtidos através do processamento da amostra que utilizou óleo de açaí como fonte de carbono.

Figura 4 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de açaí como fonte de carbono (100g/L) para cepa LBI 2A1. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.



*A, B e C representam mudança significativa ($p > 0,05$) de cada valor de amostra, através do teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A produção de ramnolipídios usando óleo de açaí, como fonte de carbono, alcançou sua máxima produção em 72 h, não apresentando diferença significativa entre 48 h, 72 h e 96 h, se alterando apenas em 120h, já ao final do experimento e da fonte de carbono restante (3,5 g/L)

O consumo da fonte de carbono ocorreu paralelamente a produção de ramnolipídios, especificamente entre 24 h e 48 h, pois houve um consumo de 60,45 g/L, refletindo-se em um aumento de 2,11 g/L de ramnolipídio, porém, vale ressaltar, que o mesmo não foi observado na biomassa, ocorrendo, inclusive, uma diminuição durante

esse período. O decréscimo acentuado do substrato mostra que o mesmo foi dirigido para a produção de ramnolípido.

O experimento com óleo de açaí se destaca por ser o primeiro, dentre os experimentos, a alcançar produção de ramnolípido mais rápido; em 48 h a concentração já era mais de 2g/L. Na composição desse óleo, o ácido linoleico (C=18:2) é o que apresenta maior concentração, além de apresentar ácidos graxos raros também, como ácido palmitoleico (C=16:1) e eicosadienóico (C=20:2) que serão discutidos posteriormente. Também vale mencionar que, dentre os óleos estudados, o óleo de açaí é o que se destaca por possuir quantidades altas de carboidrato, o que poderia explicar 3,5 g/L de biomassa em 24 h.

A tabela 2 apresenta os fatores de conversão produto/biomassa; produto/fonte de carbono e produção de mono e di-ramnolípido; da amostra se utilizou de óleo de açaí como fonte de carbono.

Tabela 2: Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, e concentração dos homólogos mono e di ramnolípidios durante a fermentação com óleo de açaí.

Tempo (h)	Produto/Biomassa (g/g)	Produto/Fonte de carbono (g/g)	Mono-RL (g/L)	Di-RL (g/L)
0	0	0	0	0
24	0,071	0,015	0,07	0,18
48	-3,149	0,035	1,32	1,04
72	0,092	0,055	1,39	1,15
96	0,261	-0,093	1,15	0,99
120	0,508	-0,026	1,01	0,83

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A produção de mono-ramnolípido foi superior ao de di a partir de 48h, com ambas apresentando as mesmas curvas de produção ao longo do experimento. Observando o fator produto/biomassa, é possível inferir que, de 72h até o final do experimento, a produção de ramnolípidios adquiriu melhor rendimento do que a biomassa produzida, devido os valores do fator aumentarem, mesmo com os dois componentes perdendo concentração, e o sinal negativo do fator produto/fonte de carbono em 96h e 120h, evidencia a diminuição do ramnolípido nos dois últimos dias de fermentação com relação a concentração do óleo.

A tabela 3 demonstra todos os ácidos graxos obtidos na análise GC-MS do óleo

de açaí.

Tabela 3: Composição de ácidos graxos presentes no óleo de açaí a partir de análise GC-MS.

Simbologia	Ácido Graxo	Fórmula molecular	Concentração (%)
C8:0	Caprílico (octanóico)	$C_8H_{16}O_2$	3,5
C12:0	Láurico (dodecanóico)	$C_{12}H_{24}O_2$	2,6
C13:0	Tridecanóico	$C_{13}H_{26}O_2$	1
C14:0	Mirístico (tetradecanóico)	$C_{14}H_{28}O_2$	1,1
C16:1	Palmitoleico (9-hexadecenóico)	$C_{16}H_{30}O_2$	0,9
C16:0	Palmítico (hexadecanóico)	$C_{16}H_{32}O_2$	4,8
C17:0	Margárico (heptadecanóico)	$C_{17}H_{34}O_2$	1,3
C18:2	Linoleico (9,12-octadecadienóico)	$C_{18}H_{32}O_2$	42,4
C18:1	Oléico (9-octadecenóico)	$C_{18}H_{34}O_2$	23,6
C18:0	Esteárico (octadecanóico)	$C_{18}H_{36}O_2$	7
C20:2	Eicosadienóico (11,14-eicosadienóico)	$C_{20}H_{36}O_2$	1,5
C20:1	Gadoleico (11-eicosenóico)	$C_{20}H_{38}O_2$	1
C20:0	Araquídico (eicosanóico)	$C_{20}H_{40}O_2$	0,9
C21:0	Heneicosanoico	$C_{21}H_{42}O_2$	2,6
C22:0	Behênico (docosanóico)	$C_{22}H_{44}O_2$	3
C23:0	Lignocérico (tetracosanóico)	$C_{23}H_{46}O_2$	1,8

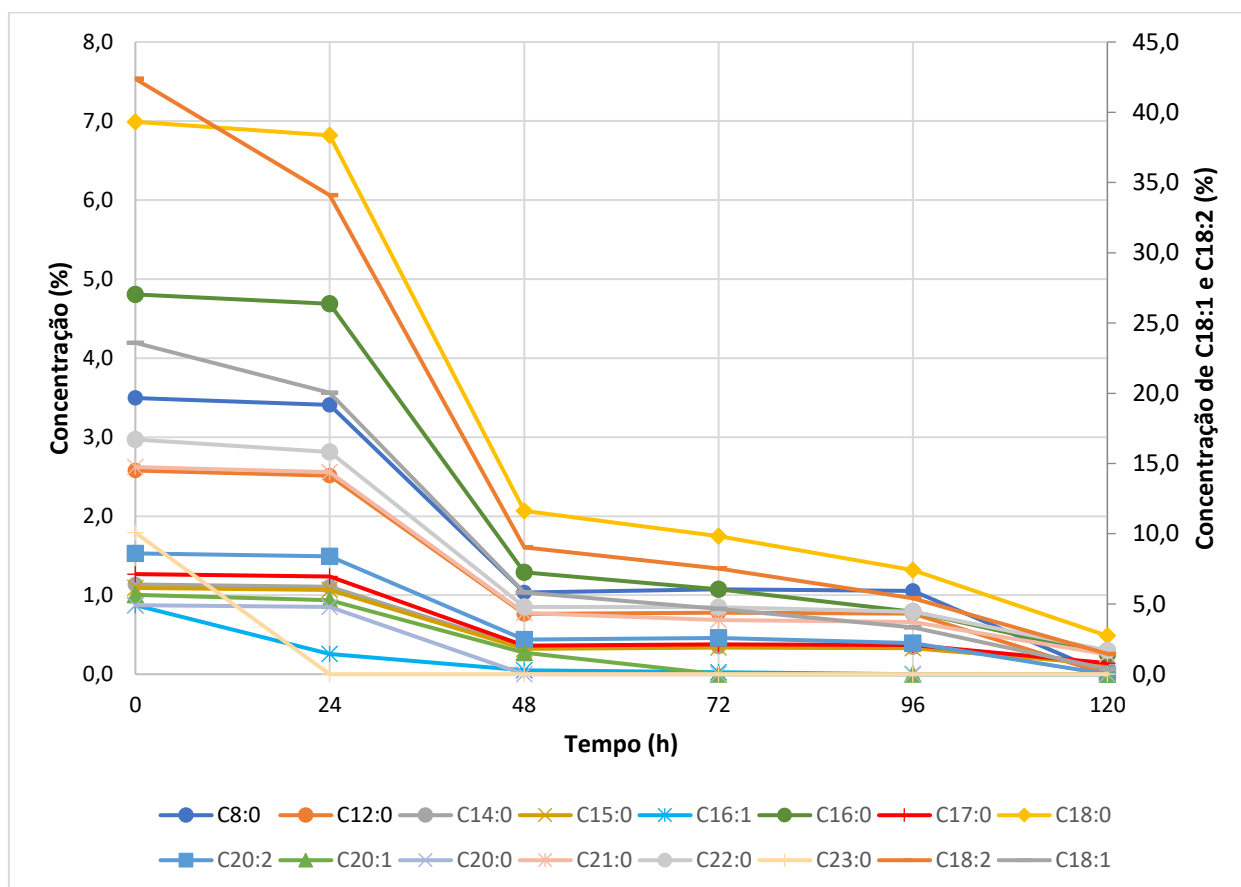
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A análise dos ácidos graxos do óleo de açaí em GC-MS apresentou diferenças notórias quando comparadas com as contidas na literatura, como de Rogez (2000); uma das maiores diferenças é a presença de outros ácidos graxos que não continham no registro literário, como os ácidos com menos de 16 carbonos, tal como o caprílico (C8:0) e o láurico (C12:0); e ácidos acima de 20 carbonos, como behênico (C22:0) e o lignocérico (C23:0). Outra diferença foi a porcentagem dos ácidos graxos presentes em ambas as análises; é registrado que o ácido palmítico (C16:0) possuía a concentração de 22% enquanto que na análise do presente trabalho ela tem apenas 4,8%.

Tais diferenças podem ser devido a origem das amostras, pois, em ambos os trabalhos, a metodologia de obtenção de ácidos graxos, através dos triglicerídeos do óleo de açaí, e a análise em GC-MS foram iguais.

A figura 5 exemplifica o consumo de ácidos graxos ao longo do tempo de fermentação que utilizou óleo de açaí como fonte de carbono.

Figura 5 – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de açaí durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em 24 h, poucos ácidos graxos foram consumidos, preservando, basicamente, sua concentração inicial, como o ácido caprílico (C8:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), margárico (C17:0), esteárico (C18:0), eicosadienóico (C20:2), gadoleico (C20:1), araquídico (C20:0), heneicosanoico (C21:0) e behênico (C22:0). Os ácidos que foram consumidos inicialmente foram palmitoleico (C16:1), linoleico (C18:2), oleico (C18:1) e lignocérico (C23:0), com esgotamento desse último. Entre 24h e 48h é quando ocorre o maior consumo dos ácidos graxos do óleo de açaí, independente da insaturação ou comprimento de cadeia carbônica. O consumo bruto de todos os ácidos graxos nesse período é concomitantemente com o maior consumo de óleo, 83,85 g/L para 23,4 g/L, e de produção de biossurfactante, de 0,250 g/L para 2,360 g/L.

De 48 h até 96 h ocorre a estagnação dos ácidos graxos de cadeia média, como caprílico (C8:0) e láurico (C12:0), o baixo consumo de ácidos saturados, como palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), e o consumo constante dos ácidos graxos insaturados, como

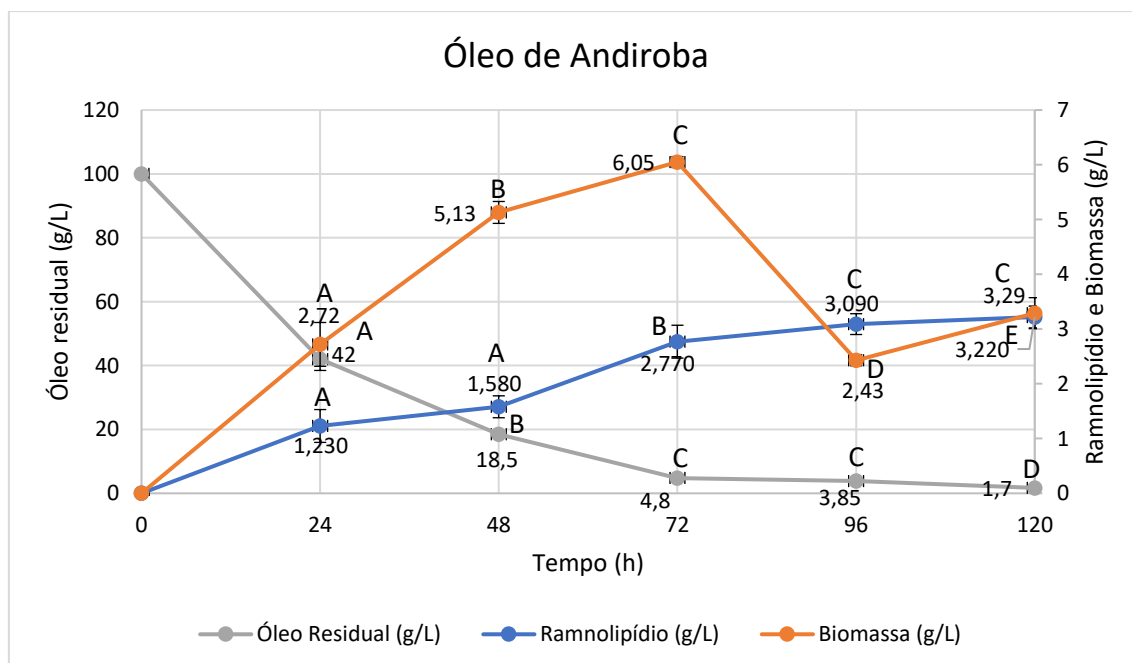
linoleico (18:2) e oleico (C18:1). Em 96h segue-se o consumo total de diversos ácidos, como araquídico (C20:0), gadoleico (C20:1) e palmitoleico (C16:1), o que pode ser interpretado como o motivo da queda da biomassa e da produção de ramnolipídios na Figura 3.

Em 120 h, é possível observar que, os ácidos graxos restantes, ou consistem de ácidos graxos de mais de 20 carbonos de cadeia ímpar, como heneicosanoico (C21:0) e behênico (C22:0), ou de ácidos cujas concentrações foram as mais altas observadas no óleo, podendo ser poli-insaturado, como linoleico (C18:2), ou saturado, como esteárico (C18:0). Não foi observado presença de ácido oleico (C18:1) ao final do experimento.

Os ácidos graxos de cadeia ímpar possuem algumas diferenças quando comparados aos ácidos graxos de cadeia par durante a β -oxidação. Os ácidos graxos de cadeia par são oxidados de 2 em 2 carbonos, restando ao final, uma calda de Acetil-CoA; já nos ácidos graxos de cadeia ímpar, a calda consiste de uma molécula de Propionil-CoA que será convertido em Succinil-CoA e entrará direto no ciclo do ácido cítrico.

A figura 6 representa os dados obtidos através do processamento da amostra que utilizou óleo de andiroba como fonte de carbono.

Figura 6 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de andiroba como fonte de carbono (100 g/L) para cepa 2A1 LBI. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.



*A, B e C representam mudança significativa ($p > 0,05$) de cada valor de amostra, através do teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

É possível observar que, tanto o experimento envolvendo o óleo de açaí quanto o de andiroba, em 72 h foi quando houve o maior desenvolvimento de biomassa, com 4,92 g/L e 6,05 g/L, respectivamente. Já a mesma similaridade não foi observada na produção de ramnolipídios.

No experimento com óleo de andiroba, a biomassa e a produção de ramnolipídios ocorreram concomitantemente. A biomassa alcança seu ápice em 72 h, e o ramnolipídio em 120 h, porém, nesse último caso, pode-se afirmar que em 96 h esse valor já foi atingido, uma vez que não houve diferença significativa na produção até o final do experimento.

O óleo de andiroba possui altos valores de ácidos derivados do esteárico (C18:0), seguido de ácidos saturados de cadeia longa, como heneicosanoico (C21:0), behênico (C22:0) e nervônico (C24:0). Em 72 h ocorre o consumo de quase todos os ácidos, com a extinção, principalmente, dos ácidos de cadeia longa e curta saturados; os detalhes do consumo serão discutidos na Figura 6.

Dentre os óleos estudados, o óleo de andiroba possui peculiaridades bem únicas, como a presença de tocoferóis (vitamina E), carotenóides, compostos fenólicos e, principalmente, limonóides (COSTA-SILVA *et al.*, 2008; MIRANDA-JÚNIOR *et al.*, 2012; PENIDO *et al.*, 2005). Como pode ser observado, os valores de biomassa e ramnolipídios foram bem satisfatórios, como a estabilidade da produção de ramnolipídios e o maior valor de biomassa observado em todo presente trabalho (6 g/L em 72 h), o que pode ter sido uma atribuição dessas propriedades.

Os tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes nas células, diminuindo o envelhecimento celular e garantindo o melhor combate aos radicais livres, sendo que o primeiro age especificamente contra H_2O_2 e o segundo contra radiação UV, além de ser um componente característico da cor de diversos alimentos, como laranja e cenoura, e precursor da vitamina A (UENOJO; MARÓSTICA-JÚNIOR; PASTORE, 2007; GUINAZ, *et al.*, 2009; SOARES, *et al.*, 2008).

Como é característico das plantas da família Meliaceae, a andiroba é rica em limonoides, cuja função é de proteger a planta contra animais herbívoros, através do amargor cítrico. Esse composto possui propriedades anti-inflamatórias, anti-oxidantes e inseticidas (PASSOS, *et al.*, 2020; SILVA; SARAIVA-NUNOMURA; MASSAYOSHI-NUNOMURA, 2012).

A tabela 4 apresenta os fatores de conversão produto/biomassa; produto/fonte de carbono e produção de mono e di-ramnolipídio; da amostra se utilizou de óleo de andiroba como fonte de carbono.

Tabela 4: Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de andiroba.

Tempo (h)	Produto/Biomassa (g/g)	Produto/Fonte de carbono (g/g)	Mono-RL (g/L)	Di-RL (g/L)
0	0	0	0	0
24	0,452	0,021	0,78	0,45
48	0,145	0,015	0,86	0,72
72	1,293	0,087	1,58	1,19
96	-0,088	0,337	1,84	1,25
120	0,151	0,060	1,83	1,4

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Diferente do experimento com o óleo de açaí, a produção de mono-ramnolipídio foi superior ao de di em todos os tempos. O sinal negativo em 96h no fator produto/biomassa representa a queda súbita de biomassa que ocorreu no tempo correspondente, enquanto que a produção de ramnolipídios se manteve, já o fator produto/fonte de carbono, no mesmo período, demonstrou o melhor valor do experimento.

A tabela 5 demonstra todos os ácidos graxos obtidos na análise GC-MS do óleo de andiroba.

Tabela 5: Composição de ácidos graxos presentes no óleo de andiroba a partir de análise GC-MS.

Símbologia	Ácido Graxo	Fórmula molecular	Concentração (%)
C8:0	Caprílico (octanóico)	C ₈ H ₁₆ O ₂	3,1
C11:0	Undecílico (Undecanóico)	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1
C12:0	Láurico (dodecanóico)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2,2
C14:0	Mirístico (tetradecanóico)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1
C16:0	Palmítico (hexadecanóico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6,6
C17:0	Margárico (heptadecanóico)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1,2
C18:2	Linoleico (9,12-octadecadienóico)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	23,1
C18:1	Oléico (9-octadecenóico)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	38,6
C18:0	Esteárico (octadecanóico)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	9,6

C19:0	Nanodecílico (nonadecanóico)	$C_{19}H_{38}O_2$	0,8
C20:2	Eicosadienóico (11,14-eicosadienóico)	$C_{20}H_{36}O_2$	1,5
C20:0	Araquídico (eicosanóico)	$C_{20}H_{40}O_2$	0,1
C21:0	Heneicosanoico	$C_{21}H_{42}O_2$	3,7
C22:0	Behênico (docosanóico)	$C_{22}H_{44}O_2$	2,8
C23:0	Lignocérico (tetracosanóico)	$C_{23}H_{46}O_2$	1,6
C24:0	Nervônico	$C_{24}H_{48}O_2$	2

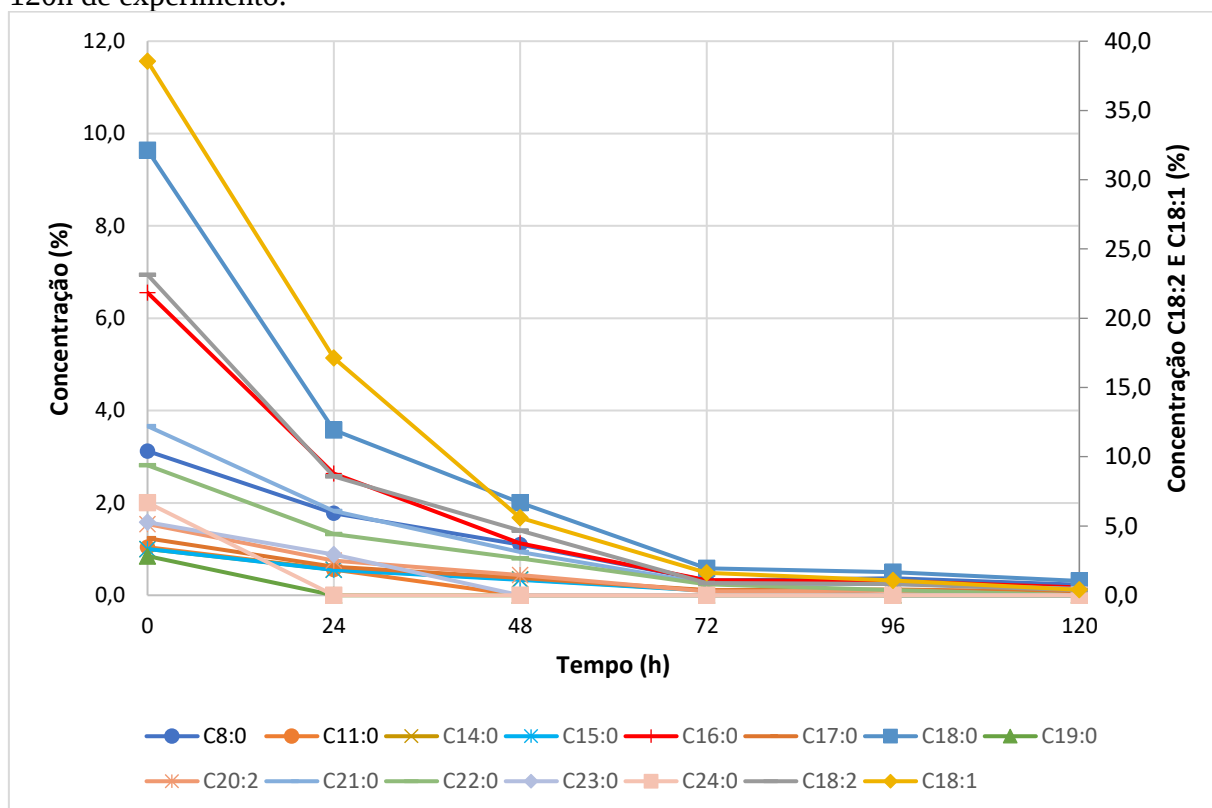
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Semelhante as informações contidas na literatura sobre a composição de ácidos graxos presentes no óleo de andiroba (SILVA, 2018), tanto o ácido oleico quanto o linoleico foram as maiores concentrações presentes. Porém existe uma grande diferença se tratando da concentração do ácido palmítico; enquanto que no registro literário consta 31 %, no presente experimento o valor foi de 6,6 %.

Também houve diferença na presença de determinados tipos de ácidos graxos que foram encontrados na análise em GC-MS, como lignocérico (C23:0), nervônico (C24:0) (cadeia longa), caprílico (C8:0), undecílico (C11:0), láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) (cadeia curta). A metodologia empregada na literatura citada foi diferente da metodologia aplicada no presente trabalho.

A figura 7 exemplifica o consumo de ácidos graxos ao longo do tempo de fermentação que utilizou óleo de andiroba como fonte de carbono.

Figura 7 – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de andiroba durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Diferente do observado no óleo de açaí, o consumo dos ácidos graxos no óleo de andiroba já foi alto nas primeiras 24 h, sem distinção se o ácido era de cadeia curta ou longa, saturado ou insaturado. Durante esse período, foi quando houve o maior consumo da fonte de carbono, indo de 100 g/L para 42 g/L (Figura 5).

Em 72h diversos ácidos tiveram suas concentrações zeradas, como nervônico (C24:0), lignocérico (C23:0), nanodecílico (C19:0), pentadecanóico (C15:0), láurico (C12:0) e undecilíco (C11:0); a partir desse tempo foi quando houve uma queda bruta da biomassa e uma desaceleração na produção de biossurfactante que estava alta até então, como observado na Figura 5 e nos dados da Tabela 4. Restou-se apenas 4,8 g/L de fonte de carbono nesse período no experimento.

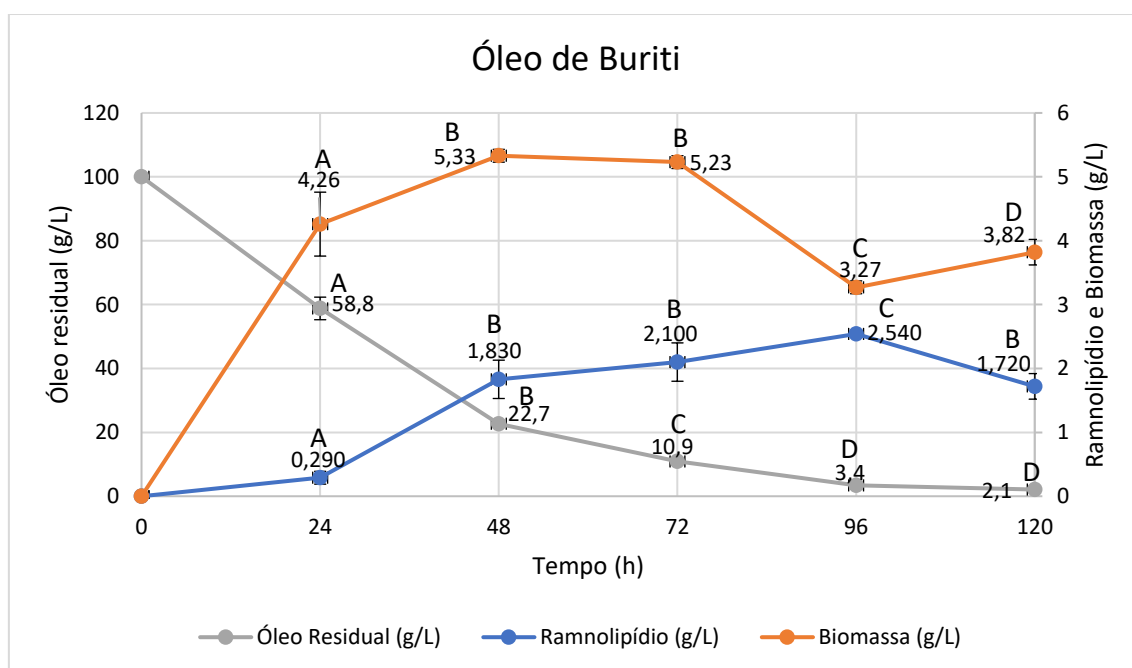
Em 96 h, houve o esgotamento de todos os ácidos graxos de cadeia média saturado, como ácido undecilíco (C11:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e pentadecanóico (C15:0); implicando em um aumento considerável de ramnolipídios no experimento, mesmo com uma diminuição da biomassa. Enquanto que, em 120 h, os ácidos graxos de cadeia muito longa saturado, como behênico (C22:0) e heneicosanoico (C21:0), foram esgotados também, implicando em uma recuperação significativa da

biomassa. A formação da biomembrana das células envolve, normalmente, ácidos graxos de 16 e 18 carbono (MORAN, 2013), o que pode ter acontecido na reta final do experimento (120 h), onde a biomassa voltou a crescer com o consumo de ácidos graxos muito longos.

Os ácidos graxos de maiores concentrações, como ácido linoleico (C18:2) e oleico (C18:1) tinham perdido metade da sua concentração em 24 h, e em 96 h eles já estavam abaixo de 1 g/L. Ao final da fermentação (120 h), sobrou apenas os ácidos palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), oleico (C18:1) e esteárico (C18:0). Os antioxidantes podem ter protegidos esses óleos da oxidação.

A figura 8 representa os dados obtidos através do processamento da amostra que utilizou óleo de buriti como fonte de carbono.

Figura 8 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de buriti como fonte de carbono (100 g/L) para cepa 2A1 LBI. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.



*A, B e C representam mudança significativa ($p > 0,05$) de cada valor de amostra, através do teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O óleo de buriti apresentou um aumento na produção de ramnolipídios interrompido até 96 h, ao mesmo tempo em que a biomassa cresceu e se estabilizou até 96 h, quando houve uma queda acentuada na biossíntese, que possivelmente implicou na diminuição da produção do biossurfactante em 120 h. Em 24 h, o consumo do óleo foi direcionado para formação de estruturas primárias, como a biomassa, uma vez que apresentou rápido

crescimento celular com 4g/L, o maior de todo presente trabalho, já em 48 h e 72 h, esse fator se estabilizou, e a produção de biossurfactante obteve maiores proporções, alcançando o ápice em 96 h.

Vale ressaltar que, tanto a produção de ramnolipídios utilizando óleo de buriti quanto utilizando óleo de açaí, apresentaram similaridades; ambas alcançam sua máxima produção na faixa de 72 h a 96 h de experimento, e a partir disso é observado uma diminuição na síntese.

A tabela 6 apresenta os fatores de conversão produto/biomassa; produto/fonte de carbono e produção de mono e di-ramnolipídio; da amostra se utilizou de óleo de buriti como fonte de carbono.

Tabela 6: Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de buriti.

Tempo (h)	Produto/Biomassa (g/g)	Produto/Fonte de carbono (g/g)	Mono-RL (g/L)	Di-RI (g/L)
0	0	0	0	0
24	0,068	0,007	0,08	0,21
48	1,439	0,043	0,95	0,88
72	-2,700	0,023	1,14	0,97
96	-0,224	0,059	1,35	1,19
120	-1,491	-0,631	0,90	0,82

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Seguindo o mesmo comportamento que o óleo de açaí, a primeira 24 h apresentou uma produção de di-ramnolipídio maior que o mono-ramnolipídio, diferente do observado com o óleo de andiroba, para depois perder espaço para o mono-ramno. Vale destacar o fator produto/biomassa de 48 h, onde a produção de biossurfactante alcançou uma proporção maior que o de biomassa, mesmo com ambas apresentando aumento nesse período. Os valores negativos desse fator se devem ao comportamento diferente que cada componente adquiriu no meio do experimento, enquanto um o componente aumenta, no outro o componente diminuía.

A tabela 7 demonstra todos os ácidos graxos obtidos na análise GC-MS do óleo de buriti.

Tabela 7: Composição de ácidos graxos presentes no óleo de buriti a partir de análise GC-MS.

Simbologia	Ácido Graxo	Fórmula molecular	Concentração (%)
C8:0	Caprílico (octanóico)	C ₈ H ₁₆ O ₂	4
C11:0	Undecílico (Undecanóico)	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	2,9
C12:0	Láurico (dodecanóico)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2,8
C13:0	Tridecanóico	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	1,3
C14:0	Mirístico (tetradecanóico)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1,3
C16:1	Palmitoleico (9-hexadecenóico)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0,3
C16:0	Palmítico (hexadecanóico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	21
C17:0	Margárico (heptadecanóico)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1,4
C18:2	Linoleico (9,12-octadecadienóico)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	5,9
C18:1	Oléico (9-octadecenóico)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	36,7
C18:0	Estearico (octadecanóico)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	9,1
C19:0	Nanodecílico (nonadecanóico)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	0,8
C20:4	Araquidônico (eisosatetranóico)	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	1,1
C20:3	Eicosatrienóico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	1,7
C20:2	Eicosadienóico (11,14-eicosadienóico)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	1,8
C20:1	Gadoleico (11-eicosenóico)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	1
C21:0	Heneicosanoico	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	3,3
C22:0	Behênico (docosanóico)	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	3,3

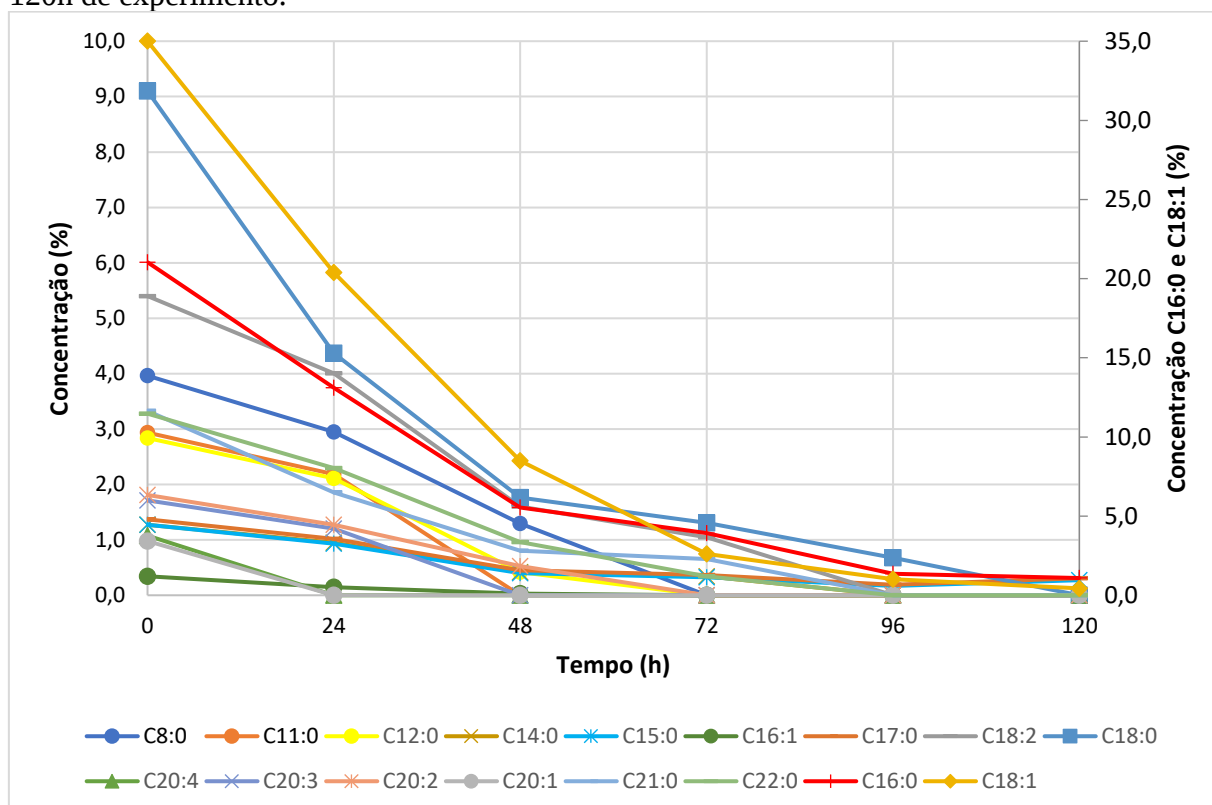
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como observado no mapeamento de ácidos graxos do óleo de andiroba, o ácido graxo oleico foi o que apresentou maior concentração, seguido do ácido palmítico, dados semelhantes aos encontrados na literatura (MARTINS *et al.*, 2016), porém com valores de concentração diferentes.

Outra diferença importante é a alta presença de ácidos graxos poli-insaturados no óleo de buriti, como os derivados do ácido araquídico (C20:0) que apresentaram até 4 insaturações na cadeia carbônica. Além disso, não foi detectado nenhuma concentração do ácido linolênico (C18:3), e no trabalho de Martins (2016) não foi observado nenhum ácido graxo com cadeia superior a 18 carbonos.

A figura 8 exemplifica o consumo de ácidos graxos ao longo do tempo de fermentação que utilizou óleo de buriti como fonte de carbono.

Figura 9 – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de buriti durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nas primeiras 48 h, todos os ácidos tinham perdido metade da sua concentração, especificamente o ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e esteárico (C18:0), enquanto o araquidônico (C20:4) e gadoleico (C20:1) tiveram suas concentrações zeradas. Observando a Figura 7, em 48 h, a biomassa já tinha alcançado 5,3 g/L e o ramnolipídio 1,8 g/L, valores altos em um curto espaço de tempo, restando apenas 22g/L de fonte de carbono.

Entre 72 h e 96 h os ácidos graxos de cadeia curta e média saturados e cadeia longa poli-insaturado foram consumidos, marcando o ápice da produção de biossurfactante no experimento (2,5 g/L), e entre 96 h e 120 h todos os de cadeia muito longa saturados se esgotaram, demonstrando um crescimento considerável na produção de biomassa.

Em 96 h, a maioria dos ácidos graxos presentes no óleo foram consumidos, restando apenas o ácido palmítico (C16:0), margárico (C17:0), oleico (C18:1) e esteárico (C18:0). Os ácidos de cadeia longa saturado e insaturado foram os últimos a serem consumidos, se devendo também a alta concentração destes frente aos demais ácidos.

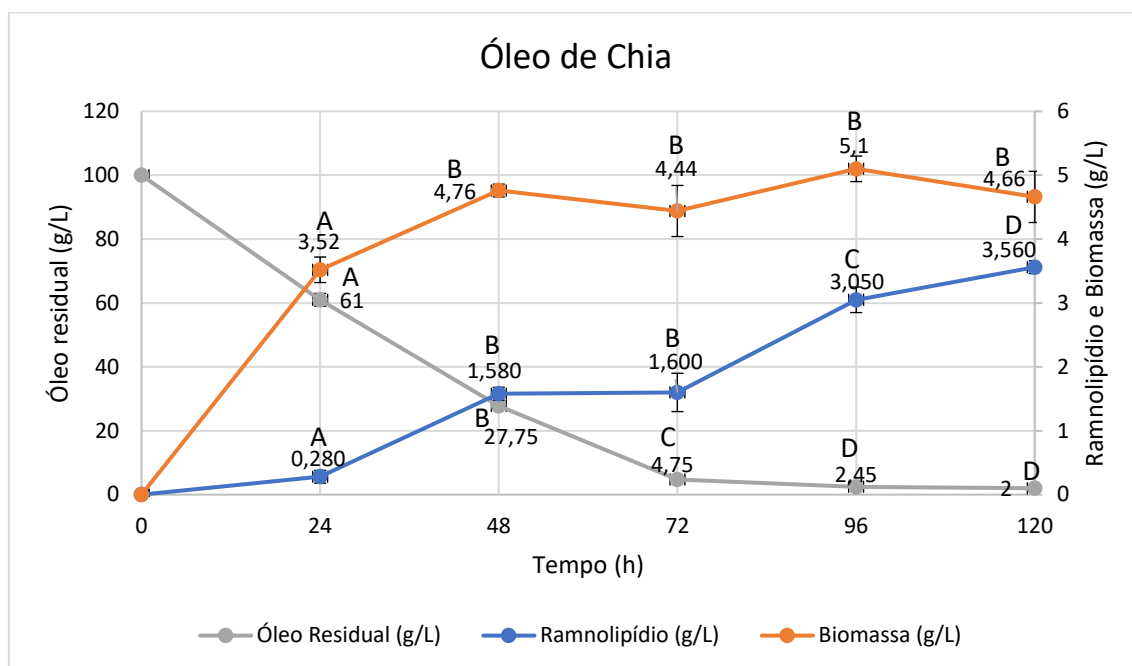
Na análise de consumo de ácidos graxos do óleo de buriti, é possível observar o consumo rápido dos ácidos de cadeia muito longa poli-insaturado, como linoleico (C18:2), araquidônico (C20:4), eicosatrienóico (C20:3) e eicosadienóico (C20:2), concomitante com os ácidos de cadeia curta saturado, como caprílico (C8:0) e undecílico (C11:0). Enquanto que os ácidos de cadeia longa saturado perduraram por mais tempo, como ácidos heneicosanoico (C21:0) e behênico (C22:0).

No estudo de Yoshimura (2022), utilizando óleo de goiaba como fonte de carbono para produção de biossurfactante através da *P. aeruginosa* LBI 2A1, foi observado um rápido consumo dos ácidos graxos saturados de cadeia longa, começando por C:20, C:18 e C:16, para depois ocorrer a metabolização dos ácidos graxos insaturados. Tais dados diferem do observado no óleo de buriti, onde houve rápido consumo dos ácidos graxos de cadeia muito longa insaturado e cadeia média saturado, seguido dos ácidos graxos de cadeia muito longa saturado.

Na β -oxidação, os ácidos graxos insaturados fornecem menos Acetil-CoA do que os ácidos saturados, diminuindo o saldo energético final; isso se deve ao fato de que, nos insaturados e somente no ponto onde houver insaturação, é pulado a primeira etapa da oxidação (formação da dupla ligação entre o carbono alfa e beta), onde é fornecido uma molécula de FADH₂, o que vale, aproximadamente, 1,5 ATP. Quanto maior a cadeia carbônica do ácido graxo, mais FADH₂, NADH e Acetil-CoA é fornecido (MORAN, 2012).

A figura 10 representa os dados obtidos através do processamento da amostra que utilizou óleo de chia como fonte de carbono.

Figura 10 – Biomassa, consumo de óleo e produção de ramnolipídios em diferentes tempos empregando-se óleo de chia como fonte de carbono (100 g/L) para cepa 2A1 LBI. Condições: 37°C, 200 rpm e 120 horas de fermentação.



*A, B e C representam mudança significativa ($p > 0,05$) de cada valor de amostra, através do teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O experimento, usando óleo de chia como fonte de carbono, apresentou algumas peculiaridades, como por exemplo, a biomassa foi a única que se manteve constante por todo o experimento desde as 48h, ficando na faixa entre 4,7 g/L a 5,1 g/L. Além disso, a produção do biossurfactante ficou constante entre 48 h e 72 h, para depois dobrar o valor e ter sua máxima produção em 120 h, com 3,56 g/L, o maior de todos experimentos realizados no estudo.

Outro óleo que alcançou valores próximos da produção do ramnolipídio foi o de andiroba; ambos os experimentos apresentaram aumento constante do biossurfactante ao longo do tempo de análise, além da estabilidade na biomassa. Tanto o óleo de andiroba quanto de chia apresentam carotenoides e tocoferóis em sua composição, o que garantiu rendimento satisfatório da biomassa, devido a ação anti-oxidantes desses bioquímicos (BITAR; ALCANTARA, 2014).

Dentre os óleos apresentados, o óleo de chia é o que apresenta maior concentração de ácidos insaturados, ou seja, possuem ligações duplas entre seus carbonos. Porém, mesmo com o esgotamento de mais de 95% da fonte de carbono, ainda houve aumento da produção de biossurfactante em 96 h e 120 h. A composição do óleo de chia conta com notável presença de carboidratos, quase 10% do peso do óleo (AFONSO, 2013), o que

poderia explicar o alto rendimento do ramnolipídio no experimento, através do direcionamento desse substrato para a síntese de ácidos graxos (FASII), mesmo com o quase esgotamento da fonte lipídica (MORAN, 2013).

A tabela 8 apresenta os fatores de conversão produto/biomassa; produto/fonte de carbono e produção de mono e di-ramnolipídio; da amostra se utilizou de óleo de chia como fonte de carbono.

Tabela 8: Fator de conversão de produto com biomassa e fonte de carbono, concentração dos homólogos mono e di ramnolipídios durante a fermentação com óleo de chia.

Tempo (h)	Produto/Biomassa (g/g)	Produto/Fonte de carbono (g/g)	Mono-RL (g/L)	Di-RI (g/L)
0	0	0	0	0
24	0,080	0,007	0,11	0,18
48	1,048	0,039	0,92	0,65
72	-0,063	0,001	0,85	0,75
96	2,197	0,630	1,70	1,35
120	-1,159	1,133	2,03	1,53

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os congêneres de ramnolipídios repetiram o mesmo padrão observado nos demais experimentos; em 24h o di-ramnolipídios se destaca, porém em 48h até o final do experimento ocorre o predomínio de mono-ramnolipío. Observando a razão produto por biomassa, é possível reparar que, em 96 h, a produção do bioproduto adquiriu considerável vantagem frente a biomassa; o mesmo destaque foi observado na razão produto por óleo (fonte de carbono) nos tempos 96 h e 120 h, que é quando os valores ficam acima de 0,5 g/g.

A tabela 9 demonstra todos os ácidos graxos obtidos na análise GC-MS do óleo de chia.

Tabela 9: Composição de ácidos graxos presentes no óleo de chia a partir de análise GC-MS.

Simbologia	Ácido Graxo	Fórmula molecular	Concentração (g/L)
C8:0	Caprílico (octanóico)	C ₈ H ₁₆ O ₂	3,2
C11:0	Undecílico (Undecanóico)	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	2,4
C12:0	Láurico (dodecanóico)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2,3
C14:0	Mirístico (tetradecanóico)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1
C15:0	Pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	1

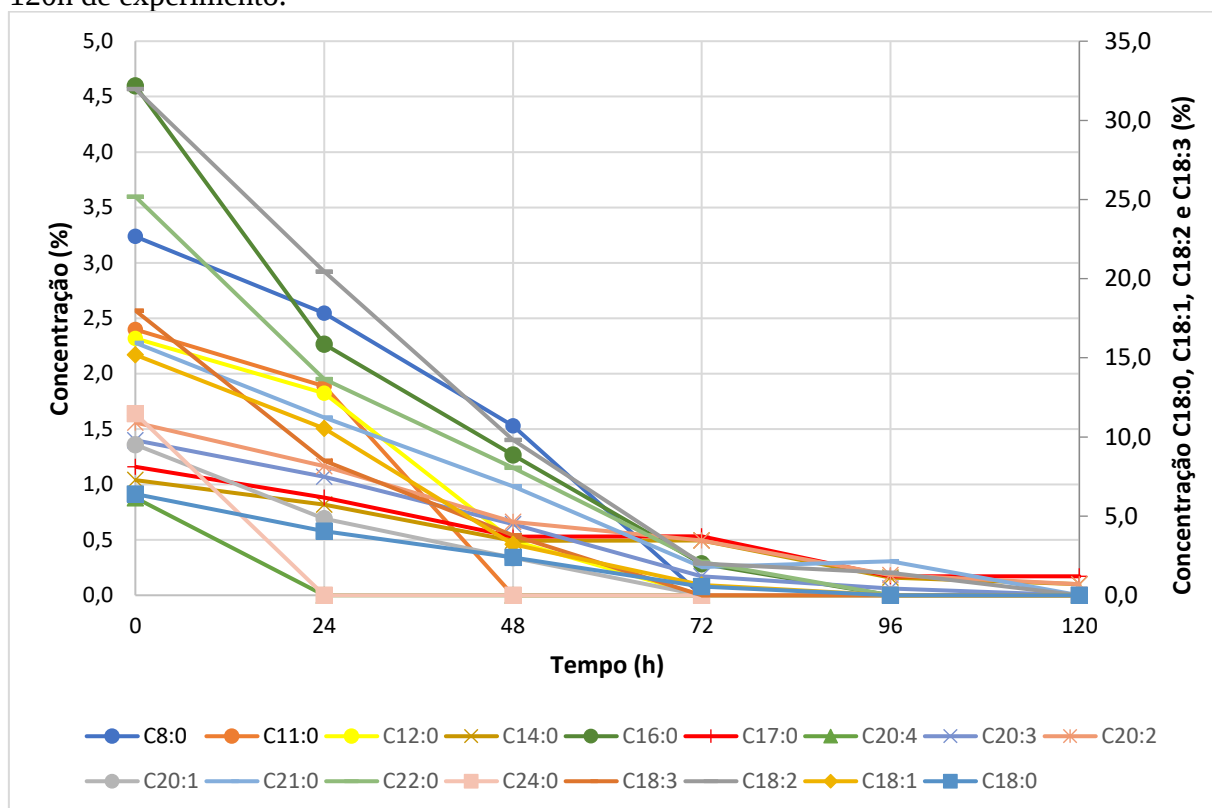
C16:0	Palmítico (hexadecanóico)	$C_{16}H_{32}O_2$	4,6
C17:0	Margárico (heptadecanóico)	$C_{17}H_{34}O_2$	1,2
C18:3	Linolênico (9,12,15-octadecatrienóico)	$C_{18}H_{30}O_2$	18
C18:2	Linoleico (9,12-octadecadienóico)	$C_{18}H_{32}O_2$	32
C18:1	Oléico (9-octadecenóico)	$C_{18}H_{34}O_2$	15,2
C18:0	Esteárico (octadecanóico)	$C_{18}H_{36}O_2$	6,4
C20:4	Araquidônico (eisosatetranóico)	$C_{20}H_{32}O_2$	0,9
C20:3	Eicosatrienóico	$C_{20}H_{34}O_2$	1,4
C20:2	Eicosadienóico (11,14-eicosadienóico)	$C_{20}H_{36}O_2$	1,6
C20:1	Gadoleico (11-eicosenóico)	$C_{20}H_{38}O_2$	1,4
C21:0	Heneicosanoico	$C_{21}H_{42}O_2$	2,3
C22:0	Behênico (docosanóico)	$C_{22}H_{44}O_2$	3,6
C24:0	Nervônico	$C_{24}H_{48}O_2$	1,6

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O óleo de chia se destaca por apresentar alta quantidade de ácidos graxos insaturados, especificamente derivados do ácido esteárico (C18:0), e isso foi observado tanto na literatura (SOUZA *et al.*, 2014) quanto na análise em GC-MS, porém os valores de concentração foram diferentes; na literatura consta que o ácido linolênico apresentaria 17,7 g/L, porém, no presente trabalho, foi de 18g/L. Entre os analisados, o que se destaca é o ácido linoleico (C18:2) com 32 g/L. Ambas analisadas apresentadas se utilizaram da mesma metodologia.

A figura 10 exemplifica o consumo de ácidos graxos ao longo do tempo de fermentação que utilizou óleo de chia como fonte de carbono.

Figura 11 – Consumo dos ácidos graxos presentes no óleo de chia durante a biotransformação de ramnolipídios, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em 120h de experimento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nas primeiras 24 h houve um consumo acentuado dos ácidos graxos insaturados derivados do ácido esteárico (C18:0), como linolênico (C18:3), linoleico (C18:2) e oleico (C18:1), e a extinção dos ácidos nervônico (C24:0) e araquidônico (C20:4), enquanto que não houve consumo dos outros derivados insaturados do ácido araquídico (C20:0), ocorrendo apenas depois de 48 h.

Em 72 h já ocorre a extinção dos ácidos graxos abaixo de 16 carbonos, junto com os ácidos poli-insaturados de cadeia grande, como linolênico (C18:3) e eicosatrienóico (C20:3). Vale ressaltar que os ácidos poli-insaturados de 18 carbonos eram os que continham maiores concentrações no óleo de chia. Após 96 h, restou apenas o ácido margárico (C17:0), linoleico (C18:2) e eicosadienóico (C20:2).

Entre 72 h e 96 h não havia ácido graxo com concentração maior que 2%, porém, observando a Figura 9, foi quando houve um aumento na produção de ramnolipídios que se manteve até 120 h, implicando que, possivelmente, a produção da biomolécula se deveu a outros fatores além dos triglicerídeos, não se utilizando mais da β -oxidação; é possível observar isso na Tabela 8, onde em 120 h o fator produto/fonte de carbono

alcançou 1,1 g/g, pois a biossíntese se manteve alta e o consumo da fonte de carbono foi baixa.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados prove menos energia do que a oxidação dos ácidos graxos saturados, como já mencionado, junto com o fato do óleo de buriti possuir propriedades antimicrobianas, poderia justificar a baixa produção de biomassa, que ainda se manteve constante, devido as propriedades anti-oxidantes da fonte. A produção de ramnolipídios ainda ficou a cargo da β -oxidação, porém vale mencionar o papel da síntese de ácidos graxos para a produção, uma vez que o óleo e buriti também é rico em carboidratos que podem ser convertidos em substratos para via FASII, como Citrato, Acetil-CoA e Malonil-CoA.

Na tabela 10 é possível ver o resumo dos principais dados de biomassa, produção de biosurfactante (com seus respectivos homólogos) e consumo de óleo (óleo residual).

Tabela 10: Resumo dos dados referentes aos quatro óleos estudados, nos melhores tempos respectivos.

	Açaí	Andiroba	Buriti	Chia
Biomassa g/L (72h)	4,92	6	5,23	4,44
Ramnolipídio g/L (96h)	2,14	3	2,54	3
Mono-RL g/L	1,15	1,84	1,35	1,7
Di-RI gh/L	0,99	1,25	1,19	1,35
Óleo Residual g/L (24h)	17,1	57	42,1	39

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2 Caracterização das espécies homólogas de ramnolipídios por espectrometria de massas

A análise da composição dos ramnolipídios obtidos pelo óleo de andiroba, chia, açaí e buriti, por LC-MS, podem ser observada na tabela 11. No total foram encontrados 24 homólogos para o óleo de açaí, 29 para o óleo de andiroba, 25 para o óleo de buriti e 26 para o óleo de chia. Porém, alguns desses exemplares foram desconsiderados, devido à ausência de informações sobre a razão massa/carga (m/z) que constam na literatura (ABDEL-MAWGOUD, 2011b), principal meio para discussão dos resultados desse tópico, o que torna necessário mais estudo para a modulação dessas moléculas. No final, foram descartados 7 do OA, 13 do ON, 10 do OB e 11 do OC.

Tabela 11: Composição elementar das espécies homólogas encontradas no ramnolipídios produzido por *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando óleo de açaí, andiroba, chia ou buriti como fonte de carbono.

Nº	Composição Elementar	Estrutura Molecular	m/z (± 1)	Tempo de retenção (min)	Óleo
<i>Mono-ramnolipídio</i>					
I	Rha-C8:2	C ₁₄ H ₂₂ O ₇	301.32	16:40	OA-ON-OB-OC
II	Rha-C8	C ₁₄ H ₂₆ O ₇	305	26:25	OA-ON-OB-OC
II	Rha-C10	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	332	08:40	OA
IV	Rha-C12:2	C ₁₈ H ₃₀ O ₇	357	13:40	OA-ON-OB-OC
V	Rha-C12	C ₁₈ H ₃₄ O ₇	360	10:70	OA
VI	Rha-C14:2	C ₂₀ H ₃₄ O ₇	385	15:50	OA-ON-OB-OC
VII	Rha-C10:1-C8*	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	475.6	10:30	OA-ON-OB-OC
VIII	Rha-C10-C10	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	503.65	12:30	OA-ON-OB-OC
IX	Rha-C10-C10 Rha-C8-C12 Rha-C12-C8	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	505.58	12:35	OA-ON-OB-OC
X	Rha-C10-C12:1*	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	529	13:55	OA-ON-OB-OC
XI	Rha-C10-C12*	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	531.71	14:45	OA-ON-OB-OC
XII	Rha-C10-C14:1 Rha-C12-C12:1	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	559.76	16:53	OA-ON-OB-OC
<i>Di-ramnolipídio</i>					
XIII	Rha-Rha-C8-C8	C ₂₈ H ₅₀ O ₁₃	595	07:50	OA-ON-OB-OC
XIV	Rha-Rha-C8-C10*	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	621.74	09:60	OA-ON-OB-OC
XV	Rha-Rha-C10-C10	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	649.79	11:35	OA-ON-OB-OC
XVI	Rha-Rha-C10-C10-CH3	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₃	663.82	10:75	OA
XVII	Rha-Rha-C10-C12:1*	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	675.83	12:50	OA-OB-OC
XVIII	Rha-Rha-C10-C12*	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	677.84	13:30	ON-OB-OC
XIX	Rha-Rha-C10-14:1 Rha-Rha-C12-C12:1 Rha-Rha-C12:1-C12	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₃	705.9	10:40	ON

* OA: Óleo de açaí; ON: Óleo de andiroba; OB: Óleo de buriti; OC: Óleo de chia.

* Homólogos de ramnolipídios com “*” indica a possibilidade de a parte hidrofóbica estar invertida, exemplo: C10:C8 ou C8:C10.

* Homólogos de ramnolipídios ocupando a mesma linha e coluna indicam que uma mesma razão M/Z pode representar mais de uma molécula.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em todas as amostras, o número de homólogos de mono-ramnolipídios foi maior do que de di-ramnolipídios, algo que já podia ser suposto através dos dados nas tabelas 2, 6 e 8, devido a maior concentração observada. Na tabela 4, consta que a concentração de di-ramnolipídios foi maior em todos os tempos usando óleo de andiroba como fonte

de carbono, não se podendo afirmar que a diversidade de homólogos foi menor do que de mono, uma vez que foi a amostra com mais exemplares indeferidos.

Os ramnolipídios derivados do óleo de açaí foram os que apresentaram maior diversidade; apenas 2 dos 19 homólogos observados não foram produzidos por essa fonte, além de apresentar 3 espécies únicas da sua composição: II, V e XVI. Nesse sentido, outro que apresentou exemplar único foi a fonte de andiroba, com o tipo XIX. Ainda assim, mesmo considerando os tipos preterido, não houve uma grande distinção de homólogos de uma amostra para outra, algo já observado no trabalho de Salazar-Bryam (2016).

A partir da tabela 11, é possível refletir que os ácidos insaturados tiveram papel fundamental na composição, através das espécies: I, IV, VI, VII, X, XII, XVII e XIX. Excluindo os dois últimos, todos os tipos estiveram presentes em todas as amostras derivadas dos óleos estudados, com uma ou duas insaturações na cadeia carbônica. Vale destacar também o papel dos ácidos de cadeia curta, especificamente dos abaixo de 14 carbono.

A formação das biomembranas, normalmente, envolve ácidos graxos entre 16 e 18 carbonos (MORAN, 2013), algo que corresponde ao observado no trabalho, especificamente nos experimentos com óleo de andiroba e buriti, enquanto que o consumo de ácidos graxos menores de 15 carbonos afetava diretamente a produção de ramnolipídios, o que corresponde com o observado na análise dos homólogos, onde a maior diversidade era de cadeias carbônicas médias.

Comparando a composição de ramnolipídios presentes no trabalho de Yoshimura (2022), é nítido a diferença entre os homólogos encontrados, pois, no trabalho da autora, os homólogos encontrados possuíam poucas insaturações, mesmo quando a fonte de carbono foi um óleo. Tal fato se deve, principalmente, devido ao óleo do referido estudo ser composto majoritariamente por ácidos graxos saturados. Como mencionado no trabalho de Mata-Sandoval *et al.* (1999), a composição e proporção dos homólogos de biosurfactante se baseia na cepa, meio de cultura e condições de cultivo.

5. Conclusão

A fermentação utilizando óleos nativos se demonstrou satisfatório, no sentido de produção de ramnolipídios e biomassa. Em todos os experimentos, a produção de ramnolipídio alcançou valores acima de 2,5 g/L, e biomassa acima de 4 g/L. Em termos de maiores concentrações, o óleo de andiroba alcançou a maior biomassa, 6 g/L em 72h, enquanto que de ramnolipídios, o óleo de chia chegou em 3,5 g/L em 120h. Em 72 h foi quando o ápice da biomassa foi atingido de 3 dos 4 óleos estudados (açai, andiroba e buriti).

Tanto o óleo de andiroba quanto de chia possuíram os melhores rendimentos de biomassa e ramnolipídios em todos os tempos, com biomassa estável e produção crescente de ramnolipídios ao longo de todo tempo de experimento. Ambas apresentam propriedades anti-oxidantes em suas composições, o que certamente contribuiu para o bom desempenho e similaridade entre eles.

A produção de ramnolipídios seguiu um padrão em seus homólogos; em 24 h o di-ramnolipíio se destacava na composição, porém, ele era logo substituído pelo mono-ramnolipíio; o único óleo que não seguiu esse padrão foi o de andiroba, cuja produção de di-ramnolipíio foi alta o tempo todo.

Com relação as comparações entre os ácidos graxos listados na literatura com os obtidos na análise GC-MS do presente trabalho, houve diferença em um ou dois aspectos, por exemplo, nenhum dado obteve as mesmas concentrações do que as listadas em artigos, e em muitos casos não havia a menção a diversos tipos de ácidos graxos encontrados no trabalho, especificamente os de cadeia curta, média e os poli-insaturados, mesmo de autores que se utilizaram da mesma metodologia. O mais similar foi a listagem de quais ácidos deveriam estar em mais abundância.

Referente ao consumo de ácidos graxos ao longo do experimento não houve um padrão para os quatro óleos, e sim semelhanças na velocidade e preferência do tipo de ácido graxo consumido. Em 48 h foi quando houve o maior consumo de todos os ácidos graxos do óleo de açai e buriti, porém isso foi diferente do óleo de andiroba e chia, onde, especificamente, o maior consumo foi em 24 h e 72 h. Ao final dos quatro experimentos, restaram apenas alguns ácidos que iam do C16:0 ao C20:0, com no máximo duas insaturações no ácido esteárico (C18:0) ou Araquídico (C20:0).

Ainda sobre o consumo, foi observado em mais de um tipo de óleo que, o esgotamento dos ácidos graxos menores que 15 carbonos e maiores de 20 carbonos insaturados eram acompanhados do aumento na produção de ramnolipídios, enquanto que

a extinção dos ácidos graxos entre 15 e 24 carbonos saturados aumentavam a produção da biomassa.

Os homólogos encontrados na análise LC-MS fazem jus a maioria dos ácidos graxos consumidos dos óleos no experimento, pois a grande maioria apresentou insaturações e cadeia média, o que reforça a ideia de os ácidos graxos de cadeia média estarem sendo responsáveis pela produção do biossurfactante, enquanto os ácidos graxos de cadeia muito longa formam produtos primários, como a biomembrana das células.

A diversidade de homólogos de ramnolipídios entre as amostras foi baixa, com exceção do óleo de açaí e andiroba. Cada amostra apresentou mais de 20 tipos de homólogos, porém quase 1 terço de todas as amostras não foi considerado, devido à ausência de informações literárias sobre. Mesmo os homólogos que foram preservados, se fazem necessário uma melhor análise para comprovação real das moléculas, além dos dados literários.

6. Referências

- 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: The ACS Journal of Surfaces and Colloids, Washington, v.17, n.5, p.1367-1371, 2001.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 86, p. 1323–1336, 2010.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MULLER, M.M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation & bioengineering of production. In: SOBERON-CHAVEZ, G; STEINBUCHER, A. (ed.). Biosurfactants: From Genes to Applications. Munster: Springer, 2011a. p. 280.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 86, p. 1323-36, 2011b.
- 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.
- ADU, S. A.; NAUGHTON, P. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal Skincare Pharmaceutical Formulations. Pharmaceutics, n.11, v.12, p. 0-21, 2020.
- AFONSO, S. R. A cadeia produtiva do buriti (Mauritia sp). 2013. 13 f. Tese (Doutoranda em Ciências Florestais)-Universidade de Brasília, Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.cnf.org.pe/secretaria_conflat/memorias/DOCUMENTO%20MESAS/MESA%204/Sandra%20Regina%20Afonso.pdf>. Acesso abril de 2023.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F. Frutas nativas do cerrado: qualidade nutricional e sabor peculiar. Brasília, 2004. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/am2004/arquivos/27100403.pdf>.
- ANDRÄ, J.; RADEMANN, J.; HOWE, J.; KOCH, M.H.J.; HEINE, H.; ZÄHRINGER, U.; BRANDENBURG, K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. Biol. Chem., v. 387, p. 301–310, 2006.
- ANTONIASSI, R.; PEÇANHA, B.R. B; LAGO, R.C.A. Efeito da adição de óleo de abacate na estabilidade oxidativa de óleos de soja e girassol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. Anais... Campinas-SP: UNICAMP, 1998.
- ARAUJO, L.V.; GUIMARAES, R. C.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V.M.J.; SOUZA, M.P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D.M.F. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. Food Control, v.63, p. 171-178, 2016.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Environ. Microbiol., v. 45, p. 162-168, 1996.
- AYERZA, R; COATES, W. Dietary levels of chia: Influence on Yolk Cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. Poultry Science, v. 79, p. 724-739, 2000.

BANAT, I.M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal state of art. Acta Biotechnol., v.15, p. 251-267, 1997.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., Oxford, v. 53, p. 495-508, 2000.

BATISTA, J. S.; OLINDA, R. G.; MEDEIROS, V. B.; RODRIGUES, C. M. F.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; FREITAS, C. I. A.; MEDEIROS, A. C. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. Ciência Rural, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 136-141, 2012.

BATISTA, J. S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. Ciência Rural, v.42, 2012.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. Journal of Food Engineering. Oxford: Elsevier B.V., v. 54, n. 4, p. 283-288, 2002.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. Anton. Leeuw. Int. J. G. v.85, p.1-8, 2004.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, F.R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. Biores. Technol., Essex, v. 99, p. 3843-3849, 2008.

BITAR, M. J. F.; ALCÂNTARA, M. M. Extração do óleo vegetal da palmeira de buriti, *mauritia flexuosa* l. f., em Itumbiara. III Semana Interdisciplinar, X Seminário de Iniciação Científica e IV Semana da Família, Itumbiara, v.1, n.1, 2014. Disponível em: < <http://www.anais.ueg.br/index.php/semanainterdisciplinar/article/view/4316> >. Acesso em: 25 de abril de 2023.

BORNEO, R.; KOCER, D.; GHAI, G.; TEPPER, B. J.; KARWE, M. V. Stability and consumer acceptance of long- chain omega- 3 fatty acids (eicosapenatenoic acid, 20:5, N-3 and docosahexaenoic acid, 22:6, N-3) in cream- filled sándwich cookies, J. Food SCI, v. 72, n.1, p. 49 – 54, 2007.

BRINKMANN, B. Quality criteria of industrial frying oils and fats. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 102, n.8, p. 539-541, 2000.

BUJAK, T.; WASILEWSKI, T.; NIZIOL-LUKASZEWSKA, Z. Role of macromolecules in the safety of use of body wash cosmetics. Colloids Surf. B Biointerfaces, v. 135, p 497-503, 2015.

BURGER, M.M.; GLASER, L.; BURTON, R.M. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. v. 238, p. 2595–2602, 1963.

CALFEE, M. W.; SHELTON, J. G.; MCCUBREY, J. A.; PESCI, E. C. Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa* produced surfactant. Infection and immunity, p.878–882 ,2005.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. Oxford, v. 50, p. 520-529, 1998.

- CAMPOS, T.; CUNHA, M. O.; DE SOUSA, A. C. B.; TEIXEIRA, R. B.; RAPOSO, A.; SEBBENN, A. M.; WADT, L. H. O. Mating system parameters in a high density population of andirobas in the Amazon forest. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, n.5, p.504-509, 2013.
- CHANG, J.S.; CHOU, C.L.; LIN, G.H.; SHEU, S.Y.; CHEN, W.M. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. Syst. and Appl. Microbiol., Stuttgart, v. 28, n. 2, p. 137-144, 2005.
- CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. LWT - Food Sci. Technol., v. 45, n. 1, p. 94–102, 2012.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex-Stan 210: codex standard for comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p.1768–1774, 2009.
- COSTA-SILVA, J. H.; LIMA, C. R.; SILVA, E. J. R.; ARAÚJO, A. V.; FRAGA, M. C. C. A.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A. C.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of the Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) seed oil. Journal of Ethnopharmacology, v.116, n.3, p.495-500, 2008.
- COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. Process Biochemistry, Londres, v.41, n.2, p.483-488, 2006.
- COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. Process Biochemistry, v.45, p.1511–1516, 2010.
- CRUZ, M. B., OLIVEIRA, W., BARCIA, M. T., KONDA, P. B. P. Extração de óleo de polpa de buriti: Perfil de ácidos graxos e capacidade antioxidante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (CBCTA), 25, 2016, Gramado. Anais [...]. Gramado: UFRGS, 2016.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v.61, p.47–64, 1997.
- DÉZIEL E. et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. Biochim Biophys Acta 1440:244–252. 1999.
- DEZIEL, E.; LEPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochim. Biophys. Acta, v.1485, p.145-152, 2000.
- DÉZIEL, E.; LÉPINE, 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. Microbiology, v. 149, p. 2005–2013, 2013.
- DUAN, K. e SURETTE, M. Environmental Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl Quorum-Sensing Systems. J. Bacteriol., v.189, n. 13, 2007.

DUBEAU, D.; DÉZIEL, E.; WOODS, D.; LÉPINE, F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. BMC Microbiol., v. 9, n. 263, p. 1–12, 2009.

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

GANESH, K.C.; 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. 1061–1068, 2010.

GÖKMEN, V.; ATAC, B.; BARONE, R.; FOGLIANO, V.; KAPLUN, Z. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega -3 fatty acids, v. 105, p. 585 -591, 2011.

GOMES, M. Z. V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. Food Control, v.25, p.441-447, 2012.

GOSWAMI, D.; BORAH, S. N.; LAHKAR, J.; HANDIQUE, P.J.; DEKA, S. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. J. Basic Microbiol, v. 55, p.1 –10, 2015.

GRUNDY, S.M. Which saturated fatty acids raise plasma cholesterol levels? In: Health Effects of Dietary Fatty Acids. Ed. G.J. Nelson; Am. Oil Chem. Soc. Champaign, Ill. 1991

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microb. Washington, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol., Oxford, v. 24, p. 443-448, 1986.

GUINAZ, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. Quím. Nova, v.32, n.8, 2009.

HENKEL, M.; GEISLER, M.; WEGGENMANN, F.; HAUSMANN, R. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. Biotechnology Journal, v.12, n.7, 2017.

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, n. 2, p. 196–202, 2011.

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

KARLAPUDI, A. P.; VENKATESWARULU, T. C.; SRIRAMA, K.; KOTA, R. K.; MIKKILI, I. KODALI, V. P. Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extrated from an *Acinetobacter* M6 strain. J. King Saud Univ.Sci, v.32, p. 223-227, 2020.

KIM, B.S.; LEE, J.Y.; HWANG, B.K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. Pest Manage. Sci, v.56, p.1029–1035, 2000.

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

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.94, p.187–201, 2002.

KÖHLER, T.; CURTY, L.K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol., Washington, v. 182, p. 5990-5996, 2000.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: Biosurfactants and Biotechnology; Kosaric, N., Cairns, W. L. Eds.; Marcel Dekker: New York, 1987; p 21- 45.

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

LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S.S.G.V.A.O.; GONÇALVES, L. A.G.; CONTIERO, J. Effect of C/N ratio and physicochemical conditions on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Libyan Agriculture Research Center Journal International, v.1, p.85-92, 2010.

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

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

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.

LUZIA, D. M. M. Propriedades funcionais de óleos extraídos de sementes de frutos do cerrado brasileiro. 2012. 221 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 63, n.1, p. 21–53, 1999.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.58, n.4, p.428-434, 2002.

MANRESA, A.; BATISDA, J.; MERCADÉ, M.E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Society Ind. Microbiol. Amsterdam, v. 8, p. 133-136, 1991.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology, v.30, n.11, p.558- 564, 2012.

- MATA-SANDOVAL, J. C. et al. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn 104 oil. Journal Of Chromatography A, [s.l.], v. 864, n. 2, p. 211-220, dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00979-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00979-6).
- MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNES, J.; TORRENTS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. Microbiol. Res. v.155, p. 249-256, 2001.
- MEDEIROS, S. R.; ALBERTINI, T.Z.; MARINO, C. T. Lipídios na nutrição de ruminantes. In: EMBRAPA. Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações. 1ªed. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte. Cap.5. p.63-76, 2015.
- MIRANDA-JÚNIOR, R. N. C.; DOLABELA, M. F.; SILVA, M. N.; PÓVOA, M. M.; MAIA, J. G. S. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. Journal of Ethnopharmacology, v.142, n.3, p.679-683, 2012.
- MONSMA, C.C.; NEY, D.M. Interrelationship of stearic acid content and triacylglycerol composition of lard, beef tallow and cocoa butter in rats. Lipids v.28, n.6, p. 539-547, 1993.
- MORAN, L. A. et al. Bioquímica. 5. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol., Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.
- MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids – next generation surfactants?. J. Biotechnol., v. 162, n. 4, p. 366–380, 2012.
- MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., v. 12, p. 199-210, 1989.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollution, Barking, v.133, p.183-198, 2005.
- NASCIMENTO, R. J. S., COURI, S., ANTONIASSI, R., FREITAS, S. P. Composição em Ácidos Graxos do Óleo da Polpa de Açaí Extraído com Enzimas e com Hexano. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.
- NAYAK, A.S.; VIJAYKUMAR, M.H.; KAREGOUDAR, T.B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp PNK-04 and its application in bioremediation. Int. Biodeterior. Biodegrad., v. 63, p. 73–79, 2009.
- NEVES, O. S. C.; BENEDITO, D. S.; MACHADO, R. V.; CARVALHO, J. G. Crescimento, produção de matéria seca e acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S na parte aérea de mudas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) cultivadas em solos de várzeas, em função de diferentes doses de fósforo. Revista Árvore, v.28, n.3, p.343-349, 2004.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L.A.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Biotechnol. Prog., New York, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

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.

NOGUEIRA, O.L; CARVALHO, C.; MULLER, C.; GALVÃO, E.; SILVA, H.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, M.; CARVALHO NETO, J.O.; NASCIMENTO, W.; CALVAZARRA, B. A Cultura do açaí. Brasília: Embrapa/Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, 1995. 50p. (Coleção plantar, 26).

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

OLIVEIRA, M. S. P. Avaliação do modo de reprodução e de caracteres quantitativos em 20 acessos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart. Arecaceae) em Belém-Pa, 1995. 146 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1995.

OLVERA, C.; GOLDBERG, J. B.; SÁNCHEZ, R.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. FEMS Microbiol.Letters, Amsterdam, v. 179, p. 85-90, 1999.

PALMIQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídios. In: Nutrição de ruminantes. Editores: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG. Funep (Jaboticabal-SP), p. 287-308, 2006.

PASSOS, M. S. et al. Revisão dos limonoides do gênero *Trichilia* e suas atividades biológicas. In: ANAIS DO XII CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA / V CONGRESSO FLUMINENSE DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2020, Campos dos Goytacazes. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2020. Disponível em: <<https://proceedings.science/confict-conpg/confict-conpg-2020/trabalhos/revisao-dos-limonoides-do-genero-trichilia-e-suas-atividades-biologicas?lang=pt-br>>. Acesso em: 27 Maio. 2023.

PALANISAMY, P., RAICHUR, A.M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique. Mater. Sci. Eng., v, 29, p. 199–204, 2009.

PEARSON, T.A. Metabolic consequences of stearic acid relative to long-chain fatty acids. Paper presented to conference on metabolic consequences of stearic acid relative to other long-chain fatty acids. Atlanta, Ga.; 1993.

PENIDO, C.; COSTA K. A.; PENNAFORTE, R. J.; COSTA, M. F. S.; PEREIRA, J. F. G, SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. Inflammation Research, v.54, n.7 p.295-303, 2005.

PEARSON, J.P.; GRAY, K.M.; PASSADOR, L.; TUCKER, K.D.; EBERHARD, A.; IGLEWSKI, B.H.; GREENBERG, E.P. Structure of the autoinducer required for expression. of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 91, p. 197 – 201, 1994.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. Colloid Surf. B-Biointerfaces, v.72, p. 6–1, 2009.

- PORTIN, Y. K. F.; SGORLON, J. G.; GOMES, M. C. S.; SUZUKI, R. M.; MENEZES, M. L. Comparação de métodos de extração de ácidos graxos da bora obtida na neutralização do óleo de milho visando reaproveitamento. Scientia Cum Industria, v.4, n.2, p. 92-97, 2016.
- PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L.; RAO, H. S. P.; VIJJAPU, S. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). Acta Tropica, v. 148, p 24-31, 2015.
- PUWASTIEN, P. K.; NAKNGAMANONG, Y.; BHATTACHARJEE, L. Proximate composition of raw and cooked thai freshwater and marine fish. Journal Food Composition and Analysis, v. 12, p. 9-16, 1999.
- RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERON-CHA VEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol. Microbiol. v. 40, p. 708–718, 2001.
- RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technology, v.90, p.159–168, 2003.
- RAMANA, K.V.; KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J. Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, v. 45, p. 249-257, 1989.
- RANDHAWA, K.K.S.; RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipids biosurfactants – past, presente and future scenario of global market. Front. Microbiol., v. 5, artigo 454, 2014.
- ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnol. Lett., Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.
- ROBERTSON, B.D.; FROSCHE, M.; VAN PUTTEN, J.P. The identification of cryptic rhamnose biosynthesis genes in *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to lipopolysaccharide biosynthesis. J. Bacteriol., v. 176, p. 6915-6920, 1994.
- ROGEZ, H. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: Edufpa, 2000. 313 p.
- ROONEY, A.P.; PRICE, N.P.; RAY, K.J.; KUO, T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. FEMS Microbiol. Lett., v. 295, p. 82–87, 2009.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low molecular mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.52, p.154-162, 1999.
- RUFINO, M. S. M. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. 2008. 263 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, 2008.
- SALAZAR-BRYAM, A. M. Aproveitamento de glicerol residual como fonte de carbono para produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. 2016. 80 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2016.

SAMPAIO, M. B. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do Buriti. Brasília: Embrapa ; ISPN, 2011. 80 p.

SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. Applied in Environmental Microbiology, v.66, p.4585–4588, 2000.

SANTANA, G. P. e JESUS, J. A. Estudo de presentes na *Mauritia flexuosa* L. E Euterpe precatoria mart. da região do pólo industrial de Manaus. Scientia Amazonia, Manaus, v. 1, n.1, 2012.

SANTOS, R. S.; COELHO-FERREIRA, M. Estudo etnobotânico de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em comunidades ribeirinhas do Município de Abaetetuba, Pará, Brasil. Acta Amazonica, Manaus, v.42, n.1, 2012.

SANTOS, V. L.; NARDI-DRUMMOND, R. M.; DIAS-SOUZA, M. V. Biosurfactants as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, p.371–402, 2017

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

SHA, R.; JIANG, L.; MENG, Q.; ZHANG G.; SONG, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. Journal of Basic Microbiology, v.52, p.458 – 466, 2012.

SHEPPARD, J. D.; COPPER, D. G. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. J.Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, v. 48, p. 325-336, 1990.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol.Adv., v.27, p.30–39, 2009.

SILVA, V. P.; OLIVEIRA, R. R.; FIGUEIREDO, M. R. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet. (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. Phytochemical Analysis, v.20, n.1, p.77-81, 2009.

SILVA, V. L. Estudo dos micronutrientes na produção de ramnolipídios por mutante de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2011.45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

SILVA, S. G.; SARAIVA-NUNOMURA, R. C.; MASSAYOSHI-NUNOMURA, S. Limonoides isolados dos frutos de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). Quím. Nova, v.35, n.10, 2012.

SILVA, V. L. Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator. 2014.Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

- SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R.B.; VON ZUBEN, C.J.; CONTIERO, J. Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*?. Front. Microbiol., v. 06, 2015.
- SILVA, V. L. Estudo do metabolismo dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Tese (Doutorado em microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2018.
- SILVA, L. R. Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo de andiroba. Nativa, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2018.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends in Biotechnol. Amsterdam, v. 22, n. 3, p.142-146, 2004.
- SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (Timmis, K.N., ed.), p. 3687–3704, Springer-Verlag, 2010a.
- SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology (Timmis, K.N., ed.), p. 3705–3723, Springer-Verlag, 2010b.
- SOARES, M. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. Rev. Bras. Frutic., v.30, 2008.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R. M. Biosurfactants: A General Overview In: Soberón-Chavez Glória (Ed.) Biosurfactants from genes to application, p.13 -5, 2012.
- SOUZA, M F.; SANCHEZ, J. L.; BONA, E.; TANAMATI, A. A. C.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H. Perfil de ácidos graxos do óleo de chia encapsulado em partículas de ácido esteárico. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, Florianópolis. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2014. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2014/papers/perfil-de-acidos-graxos-do-oleo-de-chia-encapsulado-em-particulas-de-acido-estearico?lang=pt-br>>. Acesso em: 01 jun. 2020.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry: The Principles and Pratices of Statistics in Biological Research. New York.pp. p. 200-230, 1995.
- SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of 4 interfacial active rhamnolipids from normal-alkanes or glycerol by resting cells of pseudomonas species dsm 2874. Zeitschrift fur Naturforschung c-a Journal of Biosciences, Tubingen, v. 40, n. 1-2, p. 61-67, 1985.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants: In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), Biosurfactants and Biotechnology. New York: Marcel Dekker, p. 89-120, 1987.
- TAPPIN, M. R. R.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in Carapa guianensis seed oil by experimental design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.48, n.4, p.1090-1095, 2008.
- 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.

- TOSCO, G. Os Benefícios da “chia” em Humanos e Animais. Atualidades Ornitológicas, México, n. 119, p. 7, 2004.
- TREEPONG, P.; KOS, V.N.; GUYEUX, C. et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin. Microbiol Infect, v.23, n.3, p. 258-266, 2017.
- UENOJO, M.; MARÓSTICA-JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. Quím. Nova, v.30, n.2, 2007.
- VARNIER, A.L. et al. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. Plant Cell Environ, v. 32, p. 178-193, 2009.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Biosurfactant production by Antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp during growth on hydrocarbons. Curr. Microbiol., v. 54, p. 136–141, 2007.
- VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. int. J. Mol. Sci, v.11 p.5095-5108, 2010.
- VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J. Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, v. 45, p. 249-257, 1989.
- VENKATESH, N. Y. M.; VEDARAMAN N. Remediation of soil contaminated with copper using Rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. Ann. Microbiol., v.62, p.85-91, 2012.
- VIEITEZ, I.; CALLEJAS, N.; IRIGARAY, B.; PINCHAK, Y.; MERLINSKI, N.; JACHMANIÁN, I.; GROMPONE, M. A. Acid Value, Polar Compounds and Polymers as Determinants of the Efficient Conversion of Waste Frying Oils to Biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 91, n.4, p. 655–664, 2014.
- WANG, S.; MULLIGAN, C. N. Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant. Appl. Geochem, v.24, p.928-935, 2009.
- WANG, Q.; TAPPEL, R.C.; ZHU, C.; NOMURA, C.T. Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. Appl. Environ. Microbiol. v. 78, n. 2, p. 519–527, 2012.
- WINSOR, G.L.; LAM, D.K.; FLEMING, L.; LO, R.; WHITESIDE, M.D.; YU, N.Y.; HANCOCK, R.E.; BRINKMAN, F.S. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* 39 (Database issue), D596– D600, 2011.
- YOSHIMURA, I. Produção de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerol residual e abordagem da evolução adaptativa. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências da Natureza, Buri, 2019.
- YOSHIMURA, I. produção e caracterização de ramnolipídios a partir de substratos alternativos. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2022.

ZHANG, Q.; JU, L.K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of β -glucosidase from cellulase enzyme mixture. Enzyme Microbial Technol., v. 48, p. 175–80, 2012.

ZHANG, Y.; ZHAO, Q.; JIANG, J.; WANG, K.; WEI, L.; DING, J.; YU, H. Accelation of organic removal and electricity generation from dewatered oily sludge in bioelectrochemical system by rhamnolipid addition. Bioresource Technology, v. 243, p. 820-827, 2017.

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

ZULIANELLO, L.; CANARD, C.; KÖHLER, T.; CAILLE, D.; LACROIX, J.; MEDA, P. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary 167 Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity, p. 3134–3147, 2006.