

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/11/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

“ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa.”

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada.

Rio Claro-SP

2018

VINÍCIUS LUIZ DA SILVA

**“ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa.”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
grau de Doutor em Ciências Biológicas
- Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientadora: Dra. Roberta Barros Lovaglio

Rio Claro

2018

S586"	Silva, Vinícius Luiz "Estudo do metabolismo dos ramnolipídios produzidos por pseudomonas Aeruginosa. / Vinícius Luiz Silva. -- Rio Claro, 2018 167 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Jonas Contiero Coorientadora: Roberta Barros Lovaglio 1. Biossurfactantes. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3. Ramnolipídios. 4. Biorremediação. 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 TESE: ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS POR
Pseudomonas aeruginosa

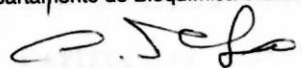
AUTOR: VINICIUS LUIZ DA SILVA

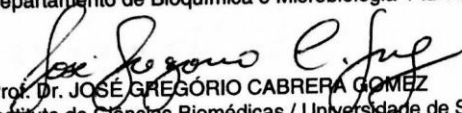
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

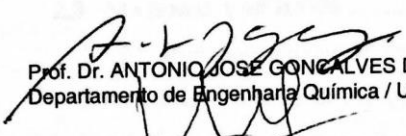
COORIENTADORA: ROBERTA BARROS LOVAGLIO

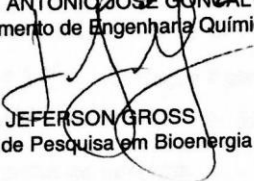
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. JOSÉ GREGÓRIO CABREIRA GOMEZ
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ GONÇALVES DA CRUZ
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. JEFERSON GROSS
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / UNESP

Rio Claro, 21 de novembro de 2018

Dedico esse trabalho aos meus pais, Adevair P. da Silva e Sônia E. Luiz
que mesmo com todas as adversidades da vida sempre me deram
suporte, moral e emocional, pra continuar minha caminhada rumo ao
conhecimento e crescimento pessoal, sei que esse é só o começo mais
obrigado por me trazerem até aqui com muito incentivo e carinho.
A minha esposa Camila A. Kuhl da Silva que me acompanhou no
momento mais assustador e prazeroso da minha vida até agora, sua
companhia é essencial para que eu siga caminhando. Obrigado aos três
por todo amor, afinal ele é a única coisa realmente essencial nessa vida

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a **DEUS**, força motriz de todas as coisas, por me impulsionar permitindo-me ter forças pra levantar todas as manhãs, mesmo que às vezes me faltasse forças e o medo de não ser capaz seguido da insegurança me consumissem por dentro, obrigado pela tua luz pela tua força e por me mostrar que nada sou sem a sua presença em meu coração. Aos meus pais Adevair e Sônia pelo incentivo, força e apoio, nessa jornada de estudos e aventura, sou grato por tudo que você fizeram por mim e ainda fazem mais principalmente pelo amor, pelas broncas e pelos valores que incutiram em mim, se um dia eu falhar em ser um bom homem será o maior dos fracassos, pois meu ponto de partida e meus exemplos foram os melhores possíveis, amo vocês!!! Agradeço ao meu orientador professor Dr. Jonas Contiero pelos 10 anos de trabalho, confiança e principalmente aprendizado. A minha Co-orientadora Dr. Roberta Barros Lovaglio, Rô obrigado por me guiar pelos caminhos da ciência e principalmente pela amizade e conselhos valorosos, isso que é mãe científica!!! Obrigado Lê, por ser esse amigo e parceiro que você é... Qual praia vamos agora??? Kkkk e Theozinho obrigado por eu poder ser o seu Tio Vini te amo mocinho. Obrigado também aos amigos de laboratório LMI e IPEBEN por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional . Os técnicos do departamento de bioquímica e microbiologia Beto, Adriano, Fátima e Carmem pelos reagentes emprestados pelas risadas no corredor e a todos os funcionários desse departamento em especial a Priscila e Samanta pelas pipocas e seções de conversa na cozinha. Aos amigos do departamento por compartilhar os momentos de alegria e tristeza, sushi e cerveja (em especial: Guilherme, Carol, Bill, Rubens, Dú, Marina e Gabi). Obrigado aos colegas do IAMB em Aachen, por me ensinarem novas técnicas de laboratório, uma outra postura pessoal e profissional e por todas aquelas cervejas ao fim do expediente, especialmente aos amigos Carl, Till, Ivan, Isabela e ao professor Dr. Lars

M. Blank, por me receber em seu laboratório e viabilizar a conclusão desse projeto. Obrigado aos meus familiares por todo o apoio e carinho ao longo dessa jornada e pela compreensão da minha ausência por algumas vezes amo vocês!!! Agradeço ainda a minha esposa Camila Antonia Kuhl da Silva, por ser essa parceira incrível que você é e apoiar os meus sonhos e loucuras, sendo muitas vezes a força que eu preciso para superar meus medos e desafios e sabe pensando bem amor sem você essa tese nunca existiria, TE AMO!!! “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”. E obrigado a Ciência que me possibilitou expandir os horizontes me levando a lugares nunca antes imaginados, que eu possa retribuir gerando conhecimento e possibilitando assim o nascimento de mais um degrau nessa escada que leva a caminhos impensáveis.

**“Nossa maior fraqueza está em desistir.
o caminho mais seguro para o sucesso é
sempre tentar apenas uma vez mais.”**

Thomas Edison

RESUMO

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que devido à presença de regiões com polaridades distintas apresentam propriedades únicas como a capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial. Os biosurfactantes são moléculas biológicas que podem ser sintetizados por uma ampla gama de seres vivos, no entanto os produtores mais estudados são os micro-organismos. Apesar das inúmeras vantagens dos tensoativos biológicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e alta estabilidade, estes compostos não são amplamente utilizados, devido ao custo de produção. Por esse motivo, o presente estudo realizou a construção de linhagens mutantes, com a deleção de genes específicos, *rhlG* e *rhlYZ* e o mutante com a deleção dupla. Posteriormente foram realizados bioprocessos em biorreator, utilizando óleo de girassol e glicerol como fonte de carbono. Esses cultivos permitiram verificar a influência de cada um dos genes na biossíntese dos ramnolipídios. Os dados dos cultivos foram utilizados ainda para traçar os fluxos metabólicos das diferentes linhagens de *P. aeruginosa* MPAO1, a fim de entender melhor o metabolismo dos ramnolipídios e gerar dados para discussão de modificações genéticas dirigidas que visem o aumento da produção. Verificou-se ainda uma nova aplicação para esses glicolipídios, visando a remoção de azocorantes de soluções aquosas. Os cultivos permitiram inferir que o gene *rhlG* não é essencial para a produção dos ramnolipídios, pois sua deleção não resultou em queda na produção dos ramnolipídios, já o operon *rhlYZ* se mostrou necessário para a produção de ramnolipídios quando a fonte de carbono empregada foi hidrofóbica. As análises de fluxo levaram a inferir que a porção hidrofílica seja o gargalo na produção desses biotensoativos. Além disso estudou-se a adsorção do corante têxtil utilizando os ramnolipídios como adsorvente, demonstrou que essas biomoléculas apresentam potencial de biorremediação dos corantes em solução aquosa, a adsorção foi melhor em pHs ácidos

Palavras chaves:

Ramnolipídios, corantes, biorremediação, Análise de fluxo metabólico, *Pseudomonas aeruginosa*, glicolipídios, surfactantes, biosurfactantes.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules, which due to the presence of regions with distinct polarities present unique properties such as the ability to reduce surface and interfacial tension. Biosurfactants are biological molecules that can be synthesized by a wide range of living beings, however the most studied producers are microorganisms. Despite the numerous advantages of biological surfactants, such as low toxicity, biodegradability and high stability, these compounds are not widely used because of the cost of production. For this reason, the present study carried out the construction of mutant lines, with the deletion of specific genes, *rhlG* and *rhlYZ* and the mutant with the double deletion. Subsequently, bioprocesses were performed in bioreactor, using sunflower oil and glycerol as carbon source. These cultures allowed to verify the influence of each of the genes in the biosynthesis of the rhamnolipids. The culture data were also used to trace the metabolic fluxes of the different *P. aeruginosa* MPAO1 strains in order to better understand the metabolism of rhamnolipids and to generate data for the discussion of directed genetic modifications aimed at increasing production. A further application for these glycolipids has been found to remove azocorates from aqueous solutions. The cultures allowed to infer that the gene *rhlG* is not essential for the production of the rhamnolipids, since its deletion did not result in a decrease in the production of the rhamnolipids, whereas the *rhlYZ* operon was necessary for the production of rhamnolipids when the carbon source used was hydrophobic. Flow analyzes have led us to infer that the hydrophilic portion is the bottleneck in the production of these biotensioativos. In addition the adsorption of the textile dye was studied using the rhamnolipids as adsorbent, it was demonstrated that these biomolecules present bioremediation potential of the dyes in aqueous solution, the adsorption was better at acidic pHs

Keywords:

Ramnolipids, dyes, bioremediation, Metabolic flow analysis, *Pseudomonas aeruginosa*, glycolipids, surfactants, biosurfactants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estruturas química básicas dos ramnolipídios, RL1 e RL3, 2 moléculas de ramnose ligadas a 2 e 1 cadeia de ácidos graxos respectivamente , RL2 e RL4 1 molécula de ramnose ligada a 2 e 1 cadeias de ácidos graxos respectivamente.	23
Figura 2: Desenho esquemático do plasmídios pMEG (A) antes e (B) após a digestão pela enzima XBAI.	49
Figura 3: Figura representando as ligações das regiões TS1 e TS2 no backbone do plasmídio digerido com a enzima XBAI.....	51
Figura 4: Esquema do plasmídios pEMG mostrando a localização dos primers BW013 e BW014.....	53
Figura 5: Esquema do mapeamento da inserção do plasmídio no genoma bacteriano (os primers wj13 e wj14 são variáveis para cada fragmento de interesse, uma vez que são os primers usados para amplificar as regiões TS de interesse).....	55
Figura 6: Esquema explicando como ocorre a deleção após a clivagem do DNA genômico ser promovida pela enzima de restrição SclI produzida devido a inserção do plasmídio PSW-2.....	56
Figura 7: Gel das regiões TS1 e TS2 do operon <i>rhlYZ</i> e do gene <i>rhlG</i>	58
Figura 8: (A) esquema do plasmídios pMEG digerido (B) Gel do plasmídios digerido.....	59
Figura 9: modelo dos plasmídios após a reação de Gibson (A) pMEG contendo as regiões TS1 e 2 do gene <i>rhlG</i> (B) pMEG contendo as regiões TS1 e 2 dos genes <i>rhlY</i> e <i>rhlZ</i> .	60
Figura 10: PCR de colônia dos clones de <i>E.coli</i> (A) contendo o plasmídio pMEG e as regiões TS do gene <i>rhlG</i> (B) contendo o plasmídios pMEG com as regiões TS do operon <i>rhlYZ</i>	61
Figura 11: Mapas dos alinhamentos entre o DNA extraído e as sequencias bases elaborado no SnapGen (A) Mapa referente ao plasmídio contendo as regiões TS dos genes <i>rhlYZ</i> (B) mapa referente ao plasmídio com as regiões adjacentes do gene <i>rhlG</i>	62
Figura 12: Confirmação da inserção do plasmídio no genoma bacteriano. (A) Clones contendo o plasmídio pEMG e as regiões TS1 e 2 do gene <i>rhlG</i> . (B) Clones contendo o plasmídio e as regiões adjacentes aos genes <i>rhlYZ</i>	63
Figura 13: Forma de inserção que apresenta os fragmentos menores quando utilizados os primers wj13_ <i>rhlG</i> e BW013 resultando em um fragmento de 2155pb.....	64
Figura 14: figura exemplificando o sceening dos clones de <i>P. aeruginosa</i> após a inserção do plasmídio PSW-2 e a deleção do gene de interesse.....	66

Figura 15: Esquema demonstrando as regiões a serem amplificadas na linhagem selvagem e na linhagem com a deleção do gene <i>rhlG</i>	67
Figura 16: Gel demonstrando o resultado final da reação de PCR das regiões onde deveria estar o gene de <i>rhlG</i> , para verificar o sucesso da deleção do gene <i>rhlG</i>	68
Figura 17: Esquema demonstrando as regiões a serem amplificadas na linhagem selvagem e na linhagem com a deleção dos genes <i>rhlYZ</i>	69
Figura 18: Gel demonstrando o resultado final da reação de PCR das regiões onde deveria estar o operon <i>rhlYZ</i> , para verificar o sucesso da deleção do operon <i>rhlYZ</i>	70
Figura 20: Fermentador montado no início da fermentação ilustrando o setup do processo.	80
Figura 20: Cinética de produção de ramnolipídios da linhagem selvagem (<i>P. aeruginosa</i> MPAO1) utilizando óleo de girassol como fonte de carbono.	84
Figura 21: Perfil de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de óleo de girassol da linhagem com a deleção no gene <i>rhlG</i>	85
Figura 22: Cinética de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de óleo de girassol da linhagem com a deleção do operon <i>rhlYZ</i>	86
Figura 24: Perfil do bioprocesso, apresentando o consumo de óleo de girassol, o crescimento microbiano e a produção de ramnolipídios, quando utilizada linhagem <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlG</i> Δ <i>rhlYZ</i>	88
Figura 25: Cinética de produção consumo e crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 utilizando glicerol como fonte de carbono.	89
Figura 26: Perfil de produção consumo e crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlG</i> utilizando glicerol como fonte de carbono.	91
Figura 27: Perfil cinético do mutante <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlYZ</i>	92
Figura 28: Perfil cinético do mutante <i>P. aeruginosa</i> MPAO1 Δ <i>rhlYZ</i> Δ <i>rhlG</i>	93
Figura 29: Figura apresentando os fluxos metabólicos dos bioprocessos realizados utilizando óleo de girassol como fonte de carbono. A legenda no canto superior da figura mostra que cada cor de fluxo representa uma linhagem diferente.	97
Figura 30: Figura apresentando os fluxos metabólicos dos bioprocessos realizados utilizando glicerol como fonte de carbono. A legenda no canto superior da figura mostra que cada cor de fluxo representa uma linhagem diferente.	102
Figura 31: Concentração residual do corante Direct Orange 2GL após a remoção utilizando ramnolipídios em diferentes concentrações de pH.	115

Figura 32: Gráfico do espectro de remoção do corante Direct Orange 2GL variando a concentração de ramnolipídios.	117
Figura 33: Remoção do corante utilizando diferentes concentrações de ramnolipídios, da esquerda para a direita as concentrações utilizadas foram: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25 e 2,12 mg/ml de ramnolipídios.....	118
Figura 34: Gráfico do estudo cinético da remoção do corante Direct Orange 2GL utilizando ramnolipídios como adsorvente.....	118
Figura 35: difusão intra-particular.....	121
Figura 36: Corante adsorvido aos ramnolipídios e precipitado antes do teste de recuperação do corante (dessorção).....	129
Figura 37: corante e desadsorvido do biossurfactante após processo de alcalinização do pH.	130
Figura 38: Espectro do corante Direct Orange 2GL antes da adsorção.....	131
Figura 39: Estrutura química do corante Direct Orange 2GL.	131
Figura 40:Espectro dos ramnolipídios antes da adsorção.....	132
Figura 41: Espectro do corante antes e depois da adsorção utilizando ramnolipídios.	134
Figura 42: Possíveis interações entre o corante Direct Orange 2GL e uma molécula de ramnolipídios.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela dos primers utilizados para amplificação da região TSI e TS2 do gene <i>rhlG</i>	50
Tabela 2: Tabela dos primers utilizados para amplificação da região TSI e TS2 dos genes <i>rhlYZ</i>	50
Tabela 3: Velocidades específicas de crescimento, calculadas e obtidas pelo modelo em todos os bioprocessos.	95
Tabela 4: Fluxo obtidos em cada ciclo da β -oxidação pelas diferentes linhagens nos bioprocessos utilizando óleo de girassol.	99
Tabela 5: Valores dos fluxos de síntese de ácidos graxos, obtidos nos bioprocessos utilizando óleo de girassol, para todas as linhagens estudadas.	100
Tabela 6: Quantidade de HAAs produzida com 37 horas de bioprocessos utilizando Óleo de girassol como fonte de carbono.	101
Tabela 7:Valores dos fluxos de síntese de ácidos graxos, obtidos nos bioprocessos utilizando glicerol, para todas as linhagens estudadas.	104
Tabela 8: Resultado dos estudos de cinética de remoção do corante Direct Orange 2GL utilizando ramnolipídios.	120
Tabela 9: Resultado dos parâmetros de isotermas.....	125
Tabela 10: Resultados dos estudos de termodinâmica.	128
Tabela 11: Valores do teste de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> antes e depois da adsorção.	138

1 SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1	BIOSURFACTANTES	21
1.1.1	<i>Classificação e estrutura dos biosurfactantes</i>	<i>21</i>
1.2	BIOSSÍNTESE DOS BIOSURFACTANTES	24
1.3	REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE	28
1.4	BALANÇO DE MASSA.....	30
1.5	APLICAÇÕES DOS BIOSURFACTANTES	31
1.5.1	<i>Função biológica dos biosurfactantes</i>	<i>31</i>
1.5.2	<i>Biosurfactantes na medicina</i>	<i>32</i>
1.5.3	<i>Aplicações na agroindústria.....</i>	<i>34</i>
1.5.4	<i>Biorremediação</i>	<i>35</i>
1.5.5	<i>Outras aplicações</i>	<i>37</i>
1.6	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	37
1.6.1	<i>Substratos alternativos</i>	<i>38</i>
1.6.2	<i>Fatores que influenciam a produção.....</i>	<i>39</i>
1.6.3	<i>Melhoramento de linhagens</i>	<i>41</i>
1.6.4	<i>Produção em biorreatores.....</i>	<i>42</i>
2	CAPÍTULO II – CONSTRUÇÃO DAS CEPAS MUTANTES DE <i>P. AERUGINOSA</i>.	45
2.1	INTRODUÇÃO	46
2.2	OBJETIVO	47
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.3.1	<i>Micro-organismo utilizado</i>	<i>47</i>
2.3.2	<i>Procedimento de deleção dos genes de interesse</i>	<i>48</i>
2.3.2.1	<i>Extração e purificação do DNA genômico.....</i>	<i>48</i>
2.3.2.2	<i>Construção do plasmídio pMEG contendo as regiões adjacentes aos genes de interesse</i>	<i>48</i>
2.3.2.2.1	<i>Amplificação das regiões adjacentes aos genes de interesse.....</i>	<i>49</i>
2.3.2.3	<i>Reação de Gibson</i>	<i>51</i>
2.3.2.4	<i>Inserção dos plasmídios na bactéria e incorporação no DNA genômico utilizando o mating triparental.....</i>	<i>51</i>

2.3.2.5	Inserção do plasmídeos PSW2.....	55
2.3.2.6	Remoção do plasmídeos PSW2	57
2.3.2.7	Softwares utilizados.....	57
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
2.5	CONCLUSÃO	71
3	CAPITULO III - ESTUDO DO METABOLISMO DOS RAMNOLIPÍDIOS	
	PRODUZIDOS POR <i>P. AERUGINOSA</i>.”	72
3.1	INTRODUÇÃO.....	73
3.2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	76
3.3	OBJETIVOS.....	76
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3.4.1	<i>Micro-organismos utilizados</i>	77
3.4.2	<i>Meios de cultura</i>	77
3.4.2.1	Caldo Lisogênico (LB)	77
3.4.2.2	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTP).....	77
3.4.2.3	Meio Mineral livre de cálcio	78
3.4.3	<i>Condições de cultivo</i>	78
3.4.3.1	Preparo do Inóculo	78
3.4.3.2	Biorreator	79
3.4.4	<i>Métodos Analíticos</i>	81
3.4.4.1	Amostras	81
3.4.4.1.1	Quantificação de Ramnolipídios	81
3.4.4.1.2	Quantificação do Óleo de Girassol	82
3.4.4.1.3	Quantificação da Biomassa	82
3.4.5	<i>Análise de Balanço de Fluxo</i>	82
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.5.1	<i>Bioprocessos utilizando óleo de girassol como fonte de carbono</i>	83
3.5.2	<i>Bioprocessos utilizando glicerol como fonte de carbono</i>	89
3.5.3	<i>Análise de balanço de fluxo nas rotas envolvidas na produção de ramnolipídios pelas linhagens <i>P. aeruginosa</i> MPAO1, <i>P. aeruginosa</i> MPAO1ΔrhIG, <i>P. aeruginosa</i> MPAO1ΔrhLYZ e <i>P. aeruginosa</i> MPAO1ΔrhIGΔrhLYZ utilizando óleo de girassol como fonte de carbono</i>	94
3.6	CONCLUSÃO	105

4	CAPITULO IV- APLICAÇÃO DOS RAMNOLIPÍDIOS: ADSORÇÃO DE CORANTES TEXTÉIS UTILIZANDO RAMNOLIPÍDIOS.	106
4.1	INTRODUÇÃO.....	107
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	109
4.2.1	<i>Micro-organismo</i>	109
4.2.2	<i>Meios de cultura</i>	109
4.2.2.1	Meio Mineral livre de cálcio com tampão fosfato.....	109
4.2.2.2	Meio Mineral livre de cálcio	110
4.2.2.3	Extração e purificação dos ramnolipídios	110
4.2.3	<i>Experimentos de adsorção</i>	111
4.2.3.1	Estudos de cinética e equilíbrio	112
4.2.3.2	Recuperação do corante após a adsorção	113
4.2.3.3	Análise em espectrofotometria FT-IR	114
4.2.3.4	Teste de toxicidade após a remoção do corante	114
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	115
4.3.1	<i>Experimentos de adsorção</i>	115
4.3.2	<i>Cinética e equilíbrio</i>	118
4.3.2.1	Estudos de equilíbrio	123
4.3.3	<i>Recuperação do corante após a adsorção</i>	128
4.3.4	<i>Análise em FT-IR</i>	130
4.3.4.1	Teste de toxicidade utilizando <i>Daphnia similis</i>	137
4.4	CONCLUSÃO	139
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnol. Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 313-316, 2000.

ADANE B, SIRAJ K, MEKA N. Kinetic, equilibrium and thermodynamic study of 2-chlorophenol adsorption onto *Ricinus communis* pericarp activated carbon from aqueous solutions. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v.8, p 1-12, 2015.

AGHAJANI, M.; RAHIMPOUR, A.; AMANI, H.; TAHERZADEH, M. J. Rhamnolipid as new bio-agent for cleaning of ultrafiltration membrane fouled by whey **In Eng. Life Sci.**, v.18, p. 272–280, 2018.

AGUIRRE-RAMÍREZ, M., MEDINA, G., GONZÁLEZ-VALDEZ, A., GROSSO-BECERRA, V., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa*

rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ_s .

Microbiology v.158, p. 908–916, 2012.

AHMED, K.; SHAIK, A. B.; KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; RANI, P. U.; KRISHNA, K.V.S. R.; MAMIDYALA, S. K.; JOSEPH, J. Metabolic Profiling and Biological Activities of Bioactive Compounds Produced by *Pseudomonas* sp. Strain ICTB-745 Isolated from Ladakh, India. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 22, p.69–79, 2012.

ARA, I.; MULLIGAN, C. N. Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid. 61. St Canadian Geotechnical Conference, Edmonton, Sept. 20-24, 2008.

ARAUJO, J. C., ASSIS, J. T., MONINE, V. I., & BERTOLINO, L. C. Characterization of kaolinite microstructure by X ray diffraction. *Materia (Rio de Janeiro)* v.11 p. 361-371, 2006.

ARAVINDHAN, R., RAO, J. R., & NAIR, B. U. Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green algae *Caulerpa scalpelliformis*. **Journal of Hazardous Materials**, v.142 p. 68-76, 2007

ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Environ. Microbiol**, 45, 162-168, 1996

AWASTHI N, KUMAR A, MAKKAR R, CAMEOTRA SS Bio-degradation of soil-applied endosulfan in the presence of a biosurfactant. **J Environ Sci Health** v.34 p.793–803, 1999.

BANAT I.M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal- state of art. **Acta Biotechnol** v.15 p. 251-267, 1995.

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

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.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **J. Food Eng, Essex**, v.54, p.283-288, 2002.

BLANK, L. M.; KUEPFER, L. Metabolic flux distributions: Genetic information, computational predictions, and experimental validation, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.86, p.1243-55, 2010.

BOYD, G. E., ADAMSON, A. W., E MYERS, L. S. The exchange adsorption of ions from aqueous solution by organic zeolites, II. Kinetics, Journal of the **American Chemical Society**, v.69, p.2836-2848, 1947.

BRUNELLI, T. F. T.; GUARALDO, T. T.; PASCHOAL, F. M. M.; ZANONI, M. V. B. Degradação fotoeletroquímica de corantes dispersos em efluente têxtil utilizando fotoanodos de Ti/TiO₂. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 67-71, 2009.

BUCHHOLZ T, FRIEDLAND AJ, HORNIG CE, KEETON WS, ZANCHI G, NUNERY J Mineral soil carbon fluxes in forests and implications for carbon balance assessments. GCB Bioenergy. doi:10.1111/gcbb.12044, 2013.

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. 878–88 ,2005.

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

CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A. D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene Encodes NADPH-dependent β -ketoacyl Reductase Which is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 17, p. 4442 – 4451, 1998.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. *The Color*. 2 ed. Elsevier **Academic Press**: London, 588 p., 2004.

CERESANA MARKETING RESEARCH, <https://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/surfactants>: acesso em 21 de Dezembro de 2018.

CHEN DH; HUANG, SH Fast separation of bromelain by polyacrylic acid- bound iron oxide magnetic nanoparticles. **Process Biochemistry** v.39, p.2207–2211, 2004.

CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK,. K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World J Microbiol Biotechnol** v. 28 p.401–419, 2012.

CONTRERAS E., SEPULVEDA L., PALMA C. (2012) Valorization of Agro-industrial Wastes as Biosorbent for the Removal of Textile Dyes from Aqueous Solutions. **International Journal of Chemical Engineering**, 2012, 9.

COSTA, S.G.V.A.O; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN,M.; CONTIERO, J. production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Proc. Biochem.** Oxford, v. 41, p. 483-488, 2005

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Proc. Biochem**, v. 41, 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.

DEKIMPE, V, DÉZIEL, E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. **Microbiol**, v.155, p.712–723, 2009.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Rev**, Salem, v.61, p.47-64, 1997.

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

DÉZIEL, E.; 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)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

FATHI, M. R., ASFARAM, A., HADIPOUR, A., & ROOSTA, M. Kinetics and thermodynamics studies for removal of Acid Blue 129 from aqueous solution by almond shell. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v.12, p. 62, 2014.

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

FILLOUX, A.. RAMOS, J. *Pseudomonas* Methods and Protocols **Springer**, v.5, 2007.

Frank, D. W. *Pseudomonas aeruginosa*, Biology, genetics, and Host-pathogen Interactions **Frontiers in Microbiology**, 2012.

FREUNDLICH, H. Adsorption in solution. **Z Phys Chem**, v.40, p.1361-1368, 1906.

FUQUA, W.C.; GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 183 – 189, 1998.

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

GLENN JK, GOLD MH Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental Microbiology** v.45 p.1741-1747, 1983.

GOMBERT, A.K.; NIELSEN, J. Mathematical modeling of metabolism. **Curr. Opin Biotechnol.**, v. 11, p. 180-186, 2000.

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.

GONG, R.; ZHANG, X.; LIU, H.; SUN, Y.; LIU, B. Uptake of cationic dyes from aqueous solution by biosorption onto granular kohlrabi peel. **Bioresource Technology**, V. 98, p. 1319-1323, 2007.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Revista Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-79, 2000.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. and Environ. Microbiol.** 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 envirommental factors. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, Oxford, v.24, p. 443-448, 1986.

.

HO, Y. S., MCKAY, G. Sorption of dye from aqueous solution by peat. **Chemical Engineering Journal**, v.70, p.115-124, 1998.

HOSSEINI, S. D.; ASGHARI, F. S.; YOSHIDA, H. Decomposition and discoloration of synthetic dyes using hot/liquid (subcritical) water. **Water Research**, v. 44, p. 1900-1908, 2010.

IMMICH APS, SOUZA AAU, GUELLI SMA, SOUZA U. Removal of Remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.1580-1585 2009.

ISHIGAMI, Y.; SUZUKI, S. Development of biochimecalsfunctionalization of biosurfactants and natural dye. **Progress in Organic Coatings**, v.31, p.51–61, 1997.

ISODA, H.; KITAMOTO, D.; SHINMOTO, H.; MATSUMOTO, M.; NAKAHARA, T.; Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.61 p.609-614, 1997.

JARVIS, F. G.; JOHSON, M. J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

JESUS, G. J. *Utilização de Neurospora crassa 74A para a avaliação da bioissorção e biodegradação dos corantes ácidos, xanteno, direto e reativo*. 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMER, B. Quorum-sensing: the power of cooperation in the world of pseudomonas. **Environ. Microbiol.** v.7, p.459–471, 2005.

KADIRVELU, K.; KAVIPRYA, M.; KARTHIKA, C.; RADHIKA, M.; VENNILAMINI, N.; PATTABHI, S. Utilization of various agricultural wastes for activated carbon preparation and application for the removal of dyes and metal ions from aqueous solutions. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 1, p. 129-132, 2003.

KHANDANLOU R, AHMAD MB, FARD MASOUMI HR, SHAMELI K, BASRI M, KALANTARI K. Rapid Adsorption of Copper(II) and Lead(II) by Rice Straw/Fe₃O₄ Nanocomposite: Optimization, Equilibrium Isotherms, and Adsorption Kinetics Study. **PLoS ONE** 10(3): e0120264, 2015.

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 MY, KIM IS. 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.

KLOCKGETHER, J.; MUNDER A.; NEUGEBAUER, J.; DAVENPORT, C. F.; STANKE, F.; LARBIG, K. D.; HEEB, S.; SCHOCK, U.; POHL, T. M.; WIEHLMANN, L.; TUMMLER, B. Genome Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Laboratory Strains **journal of bacteriology**, p. 1113–1121, 2010.

KRÖMER, J. O.; NIELSEN, L. K.; BLANK, L. M. Metabolic Flux Analysis: Methods and Protocols: 1^a ed. 2014.

KUAI L, KERSTENS W, CUONG NP, VERSTRAETE W. Treatment of domestic wastewater by enhanced primary decantation and subsequent naturally ventilated trickling filtration, **Water, Air and Soil Pollution** v.113: p.43-62, 1999.

KUHN D, BLANK LM, SCHMID A, BUHLER B. Systems biotechnology—rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design. **Eng. Life Sci.**, v. 10, p.384–397, 2010.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p.78-82, 2002.

LAGERGREN S Zurtheorie der sogenannten adsorption gel osterstoffe. Kung-liga Svenska Vetenskapsakademiens, Handlingar v24: p.1–39, 1898.

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

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

LANGMUIR, I.. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, 40, 1361-1368, 1918.

LATIFI, A.; FOGLINO, M.; TANAKA, K.; WILLIAMS, P.; LAZDUNSKI, A. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. **Mol Microbiol**. v.21 p.:1137-46, 1996.

LEVANDOWSKI, J.; KALKREUTH, W. Chemical and petrographical characterization of feed coal, fly ash and bottom ash from the Figueira power plant. **International Journal of Coal Geology**, v. 77, p. 269-281, 2009.

LINHARDT RJ, BAKHIT R, DANIELS L, MAYERL F, PICKENHAGEN W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnolipids. **Biotechnol Bioeng** V.33P.365–368, 1989

LIU, G.; ZHONG, H.; YANG, X.; LIU, Y.; SHAO, B.; LIU, Z. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review **Biotechnology and Bioengineering**. V.115, p. 796–814, 2017.

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.; 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, 2011.

LOVAGLIO, R. B. Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI **Tese de Doutorado, depositada na biblioteca virtual da UNESP**, 2011.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 58, 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 for Ind. Microbiol.** Amsterdam, v. 8, p. 133-136, 1991.

MARCELINO, P. R. F.; SILVA, V. L.; PHILIPPINI, R. R.; VON-ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases **Plos one**, 2017.

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

MARSUDI S, UNNO H, HORI K Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Microbiol Biotechnol** V.78 P.955–961, 2008.

MARTINEZ-GARCIA, E.; DE LORENZO, V. Engineering multiple genomic deletions in gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. **Environ. Microbiol.** v.13, p.2702–2716, 2011.

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

MCKAY, G., BLAIR, H. S., & GARDNER, J. R. Adsorption of dyes on chitin: Equilibrium studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v.27, p.3043-3043, 1982.

MENDES CR, DILARRI G, PELEGRINI RT. Application of biomass *Saccharomyces cerevisiae* as adsorption agent of dye Direct Orange 2GL and possible interactions mechanisms adsorbate/adsorbent. *Materia* (Rio de Janeiro), v.20 p.898-908, 2015.

MITTAL A, MITTAL J, MALVIYA A, GUPTA VK . Adsorptive removal of hazardous anionic dye “Congo red” from wastewater using waste materials and recovery by desorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.340, p.16-26, 2009.

MONASH, P., & PUGAZHENTI, G. Adsorption of Crystal Violet dye from aqueous solution using mesoporous materials synthesized at room temperature. **Adsorption**, v.15, p.390-405, 2009.

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

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, HÖRMANN, B, SYLDATK, C, HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 87, p. 167-174, 2010.

MÜLLER, M.M; HAUSMANN, R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. **Appl Microbiol Biotechnol** v.91 p.251 –264, 2011.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol**, Washington, v. 55, p. 3016-3019, 1989.

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.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K. ; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 25, 2008.

NANDI BK, GOSWAMI A, PURKAIT MK. Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin, **Journal of Hazardous Materials** v.161, p. 387-395, 2009.

NGAH, W. S. W., KAMARI, A., FATINATHAN, S., NG, P. W. Adsorption of chromium from aqueous solution using chitosan beads. **Adsorption**, v.12, p.249-257, 2006.

NIELSEN, J. Metabolic Engineering. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 263-283, 2001.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; 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, 2005a.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnol. Prog.** New York, v. 21, p. 1593-1600, 2005 b.

OBERHARDT, M. A.; PUCHAŁKA, J.; DOS SANTOS, V. A. P. M.; PAPIN, J. A. Reconciliation of Genome-Scale Metabolic Reconstructions for Comparative Systems Analysis **Plos one**, 2011.

OLIVEIRA, A. C. S. M.; BEZERRA, M. S.; PADILHA, C. E. A.; MELCHUNA, A. M.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Recovery of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Using Acidic Precipitation, Extraction, and Adsorption on Activated Carbon Separation **Science and Technology**, v.48 p.2852–2859, 2013.

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.

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

PILJAC A, STIPCEVIĆ T, PILJAC-ZEGARAC J, PILJAC G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamno lipid ointment. **J. Cutan. Med. Surg.** V.12, p.142–146, 2008.

PODKOSCIELNY P, NIESZPOREK K. Adsorption of phenols from aqueous solutions: Equilibria, calorimetry and kinetics of adsorption, **Journal of Colloid and Interface Science** v.354 p.282-291, 2011.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJA, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.72, p.6–15, 2009.

RABELO R, VIEIRA R, LUNA F, GUIBAL E, BEPPU M (2012) Adsorption of copper (II) and mercury (II) ions onto chemically-modified chitosan membranes: equilibrium and kinetics properties, **Adsorption Science and Technology** 30:1-22.

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.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, p. 115-121, 2007.

RIKALOVIC, M. G.; ABDEL-MAWGOUD, A. M.; DÉZIEL, E.; GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; NESTOROVIC, Z.; VRVIC, M. M.; KARADZIC, I. M. Comparative Analysis of

Rhamnolipids from Novel Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Surfact Deterg**. 2013.

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.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

ROSENBERG E, RON EZ . High and low molecular mass microbial surfactants. **Appl Micro biol Biotechnol** v.52 p.154-162, 1999.

ROSSITER, O.; ROCHA, S.; NASCIMENTO, G. E.; CAMPOS, N. F.; SILVA, V. L.; DUARTE, M. M. M. B. Avaliação do processo adsorptivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante cinza reativo BF-2R. **Química Nova**, v. 35, n.7, p. 1369-1374, 2012.

SABER-SAMANDARI, S., HEYDARIPOUR, J. Onion membrane: An efficient adsorbent for decoloring of wastewater. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 13, 16, 2015.

SALMOND, G.P.C.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.A.B.; WILLAMS, P. The bacterial enigma: cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.*, Salem, v. 16, p. 615-624, 1995.

SALWA, M. S.; NUR ASSHIFA, M. N.; AMIRUL, A. A.; AHMAD R. M. Y. Different Feeding Strategy for the Production of Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* USM AR2 in Modified Bioreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.14 p. 763-768, 2009.

SANCHEZ, L.; COURTEAUX, B.; HUBERT, J.; KAUFFMANN, S.; RENAULT, J.; CLÉMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY S. rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in arabidopsis and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiology*, v.160, p. 1630 – 1641, 2012.

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.

SANTOS, A. S.; JUNIOR, N. P.; FREIRE, D. M. G. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1 *PeerJ* v. 4, 2016.

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, F. M.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S. Adsorção do corante têxtil azul de remazol R por pseudocaule da bananeira (*Musa* sp). **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, p. 71-77, 2010a.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Coll. Surf. B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174 – 183, 2010b.

SILVA, V. L. Desenvolvimento de estratégias de alimentação para produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em biorreator **Dissertação de mestrado, depositada na biblioteca virtual da UNESP**, 2014.

SILVA, V.L.; LOVAGLIO, R.B;VONZUBEN, C; CONTIERO, J. Rhamnolipids: solution against *Aedesaegypti*? **Frontiers in microbiology** v.6 2015a.

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

SIM L.; WARD, O.P.; LI Z.Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v.19 , 232-238, 1997.

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; AGUIRRE-RAMIREZ, M.; SANCHEZ, R. The *Pseudomonas aeruginosa* Rhla enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, Hampshire, v. 32, n. 11-12, p. 675-677, 2005.

SOBERÓN-CHÁVEZ G, MAIER R M.: Biosurfactants: A General Overview In: Soberón-Chavez Glória (Ed.) Biosurfactants from genes to application. 1ª ed. 2011, p. 13-5.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. **New York**.pp. 200-230, 1995.

STEPHANOPOULOS, G.N.ARISTIDOU, A.A.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering principles and Methodologies. **San Diego: Academic Press**, 1998,

STIPCEVIC, T.; PILJAC, A.; PILJAC, G.; Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. **Burns** v.32, p.24-34, 2006.

SUTEU, D., BLAGA, A. C., DIACONU, M., & MALUTAN, T. Biosorption of reactive dye from aqueous media using *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Equilibrium and kinetic study. **Central European Journal of Chemistry**, 11(12), 2048-2057, 2013.

SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F. Chemical and physical characterization of 4 interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec* dsm 2874 grown on normal-alkanes. **Zeitschrift fur Naturforschung c-a Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 40, n. 1-2, p. 51- 60, 1985a.

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, 1985b.

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.

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.

THINAKARAN, N.; PANNEERSELVAM, P.; BASKARALINGAM, P.; ELANGO, D.; SIVANESAN, S. Equilibrium and kinetic studies on the removal of Acid Red 114 from aqueous solutions using activated carbons prepared from seed shells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, n. 1, p. 142-150, 2009.

TISO, T.; SABELHAUS, P.; BEHRENS, B.; WITTGENS, A.; ROSENAU, F.; HAYEN, H.; BLANK, L. M. Creating Metabolic demand as an engineering strategy in *Pseudomonas putida* – Rhamnolipid synthesis as an example. **Metabol. Eng. Comm.**, v. 3, p. 234 – 244, 2016.

TRUMMLER K, EFFENBERGER F, SYLDATK C An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp DSM 2874. **Eur J Lipid Sci Technol** v.105 p.563–571,2003.

VARMA, A.; PALSSON, B. O. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. Synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. **Journal of Theoretical Biology**. V. 165, p. 477–502, 1993.

VARNIER, A. L.; SANCHEZ, L.; VATSA, P.; BOUDESOCQUE, L.; GARCIA-BRUGGER, A.; RABENOELINA, F.; SOROKIN, A. Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell Environ**, v.32, p.178–193, 2009.

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* TCC 2297 using waste frying rice bran oil **Ann Microbiol** p.62-85, 2012.

WAGNER, V.E.; FILIATRAULT, M.J.; PICARDO, K.F.; IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and pathogenesis issues. in: cornelis, P. *pseudomonas* genomics and molecular biology. **norfolk: caister academic press**, p. 129 – 158, 2008.

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

WANG X, SUN L, WANG H, WU H, CHEN S, ZHENG X.. Surfactant-enhanced bioremediation of DDTs and PAHs in contaminated farmland soil. *Environ Technol*. doi: 10.1080/09593330.2017.1337235, 2017.

WEBER, W. J., & MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption on carbon from solution. **Journal of the Sanitary Engineering Division**, 89, 31-60, 1963.

WEI YH, WANG LF, CHANG JS, KUNG SS. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **J Biosci Bioeng** v.96p.174–8 2003.

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

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnol.**, v. 26, p.321–327, 2008

WU, J. Y.; YEH, K.L.; LU, W.B.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresour. Technol**, 2007.

WU, Z.; ZHONG, H.; YUAN, X.; WANG, H.; WANG, L.; CHEN, X.; ZENG, G.; WU, Y. Adsorptive removal of methylene blue by rhamnolipid-functionalized graphene oxide from wastewater **water research**. V.6 7, p. 330-344, 2014.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Bioreactor design for enhanced carrier – assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Proc. Biochem.**, v. 41, p. 1799-1805, 2006.

YOUSEF RI, EL-ESWED B, AL-MUHTASEB AH. Adsorption characteristics of natural zeolites as solid adsorbents for phenol removal from aqueous solutions: Kinetics, mechanis and thermodynamics studies, **Chemical Engineering Journal** v.171 p.1143-1149 2011.

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.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhIA converts β -Hydroxyacyl-Acyl carrier protein Intermediates in fatty Acid synthesis to the β -Hydroxydecanoyl- β -Hydroxydecanoate Component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. of Bacteriol.**, Washington, v. 190, n. 9, p. 3147 – 3154, 2008.

ZHU, L. ; YANG, X.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L.; LU, W. Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. **Bioresource Technology** p.208–213, 2012.

ZHU L, ZHANG M Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. **Environ Pollut**, v.156, P. 46–52, 2008.

ZULIANELLO, L.; CANARD, C.; KÖHLER, T.; CAILLE, D.; LACROIX, J.; MEDA, P. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary

Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and immunity**, p. 3134–3147, 2006.