



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA QUEIROZ MELLO

**PRODUÇÃO DIRECIONADA DE DI-RAMNOLIPÍDEO POR
CULTIVOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 E
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO
PARA OBTENÇÃO DE UM ÚNICO CONGÊNERE**

ANA PAULA QUEIROZ MELLO

**PRODUÇÃO DIRECIONADA DE DI-RAMNOLIPÍDEO POR
CULTIVOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 E
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO
PARA OBTENÇÃO DE UM ÚNICO CONGÊNERE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Doumit Camillos Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Josiane A. Vignoli

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mello, Ana Paula Queiroz.

Produção direcionada de Di-Ramnolípideo por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 e desenvolvimento de processo de purificação para obtenção de um único congênere / Ana Paula Queiroz Mello. - Londrina, 2019.
65 f. : il.

Orientador: Doumit Camilios Neto.

Coorientador: Josiane Alessandra Vignoli.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Produção de Ramnolípideo - Tese. 2. Desenvolvimento de processo de purificação para congênere de di-ramnolípideo - Tese. 3. Aplicação e potencial farmacológico de congênere de interesse isolado - Tese. I. Camilios Neto, Doumit . II. Vignoli, Josiane Alessandra . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

ANA PAULA QUEIROZ MELLO

**PRODUÇÃO DIRECIONADA DE DI-RAMNOLIPÍDEO POR CULTIVOS
DE *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 E DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSO DE PURIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE UM ÚNICO
CONGÊNERE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Ismael Rodrigues Amador
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de Junho de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, toda minha gratidão a minha mãe, Fátima, e ao meu Pai, Osmar, pelo apoio e por acreditarem na educação e nos meus estudos. Obrigada por me presentear com o privilégio da escolha.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Doumit Camilios Neto, pela compreensão e por sempre estar presente, auxiliando durante o trabalho. Agradeço não só pelos ensinamentos, mas também, pela paciência e compreensão.

Agradeço, também, a co-orientação e auxílio da Prof^a. Dra. Josiane A. Vignoli durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Ismael Rodrigues Amador por todo o auxílio e conhecimento compartilhado durante as longas tardes de HPLC. Obrigada pela atenção e solicitude.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Ismael Rodrigues Amador e Dr. César Tischer pela disponibilidade em participar deste momento e contribuírem para a melhora do presente trabalho.

As colegas do Laboratório de Bioquímica, especialmente, a Kami pela parceria durante a realização desse trabalho e pela amizade que construímos nessa caminhada.

Ao Professor Dr. Cesar Tischer, pelas análises de ressonância magnética nuclear.

Ao técnico do laboratório, Nelson Janeiro, por todo auxílio prestado durante a rotina laboratorial.

Gratidão as minhas amigas e amigos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais essa etapa.

MELLO, Ana Paula Queiroz. **Produção direcionada de di-ramnolípídeo por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e desenvolvimento de processo de purificação para obtenção de um único congênere.** 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Ramnolípídeos (RL) são biossurfactantes constituídos por uma ou duas moléculas de ramnose polar, respectivamente mono e di-ramnolípídeo, ligada a ácidos graxos β -hidroxilados, apolares, estrutura anfipática que lhes confere excelente propriedade tensoativa, detergente e emulsificante. São produzidos por bactérias *Pseudomonas aeruginosa* numa mistura heterogênea contendo diversos congêneres de mono e di-ramnolípídeo. O principal congênere produzido, Di-RL Rha₂C₁₀C₁₀ apresenta ação antibacteriana, antifúngica e cicatrizante, sendo atrativo para o desenvolvimento de produtos farmacológicos. Sabe-se que sua estrutura química está intimamente relacionada à atividade biológica, assim, a obtenção do Rha₂C₁₀C₁₀ de forma isolada é de suma importância para garantir sua ação e potencial terapêutico. Contudo, a recuperação dessa biomolécula isolada ainda é um desafio, pois o processo de purificação de alto custo dificulta sua recuperação e aplicação. Nesse contexto, o presente trabalho objetiva a produção direcionada de di-ramnolípídeos a partir de cultivo em fermentação submersa de *P. aeruginosa* e desenvolvimento de processo viável e eficaz para purificação de um único congênere de interesse, Rha₂C₁₀C₁₀. A produção de RL foi realizada por cultivo submerso de *P. aeruginosa* PAO1 em meio de sais (MSM) em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio de cultivo incubados por 9 dias, 37 °C e 200 rpm. Em seguida, realizou-se a extração líquido-líquido por clorofórmio/metanol para obtenção do extrato bruto concentrado, sendo obtidos 4,28 gramas do extrato bruto de RL por litro de meio cultivado. Para o processo de purificação, visando a recuperação do congênere Rha₂C₁₀C₁₀ foram realizadas: (1) cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAEP); (2) cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP); (3) cromatografia *flash*; e (4) separação por cartucho de sílica. A confirmação da presença de apenas um composto na amostra recuperada foi realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN). As purificações por CLAEP, CCDP e *flash* foram ineficazes devido à presença de contaminantes no composto final, além de apresentarem maior dificuldade para realização e consumo elevado de solventes. Por outro lado, a separação com cartucho de sílica confeccionado em laboratório apresentou alto rendimento, eficácia para a obtenção do Di-RL Rha₂C₁₀C₁₀ isolado e consumo reduzido de solventes. Ao final, foram recuperados 247 mg da biomolécula isolada com grau de pureza de 82%. O método apresentou vantagens de simples execução, não oneroso e reduzido consumo de solventes orgânicos. Conclui-se que o processo de purificação desenvolvido com cartucho de sílica para obtenção do congênere Rha₂C₁₀C₁₀ foi realizado com êxito, sendo uma potencial alternativa para recuperação e aplicação da biomolécula em produtos farmacológicos.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Ramnolípídeos. Di-Ramnolípídeo. Processo de purificação. Potencial farmacológico.

MELLO, Ana Paula Queiroz. **Directed production of di-rhamnolipid by cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and development of purification process to obtain a single congener.** 2019. 65 p. Dissertation (Master's degree in Pharmaceutical Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Rhamnolipids (RL) are biosurfactants composed of one or two molecules of rhamnose polar, respectively mono and di-rhamnolipid, linked to β -hydroxylated fatty acids, nonpolar, an amphipathic structure that gives them excellent tensioactive, detergent and emulsifier properties. They are produced by bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in a heterogeneous mixture containing several congeners of mono and di-rhamnolipids. The main congener produced, Di-RL Rha₂C₁₀C₁₀ acts as antibacterial, antifungal and cicatrizing, being attractive for the development of pharmacological products. It is known that their chemical structure is closely related to the biological activity, thus obtaining Rha₂C₁₀C₁₀ isolated is very important to ensure their action and therapeutic potential. However, recovery this biomolecule isolated is still a challenge because the high cost of downstream process makes production and application too difficult. In this context, the present work aims a directed production of di-rhamnolipids by submerged fermentative crops of *P. aeruginosa* and the development of a viable and efficient purification process for single congener of interest, Rha₂C₁₀C₁₀. The RL production was performed by cultivation of *P. aeruginosa* PAO 1 in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 125 mL of salt medium (MSM) incubated for 9 days under 37 °C and 200 rpm. Then, the liquid-liquid extraction was carried out by chloroform/methanol to obtain the crude concentrate extract, 4,28 grams of crude RL extract was obtained per liter of culture medium. To purification process to recovery Rha₂C₁₀C₁₀ were carried out: (1) preparative high performance liquid chromatography (PHPLC); (2) preparative thin layer chromatography (PTLC); (3) *flash* chromatography; and (4) separation by silica cartridge. The presence of only one compound in the recovered sample was confirmed by hydrogen nuclear magnetic resonance (NMR). Purifications by PHPLC, PTLC and *flash* chromatography were ineffective due to the presence of contaminants in final compound besides presents more difficult to perform and high consumption of solvents. On the other hand, the separation with a silica cartridge made in the laboratory presented high yield and efficacy to obtain Di-RL Rha₂C₁₀C₁₀ isolated and reduced solvents consumption. At the end, were recovery 247 mg of isolated biomolecule with a purity of 82%. The method presented advantages of simple execution, not costly and with greater solvent economy. In conclusion, the purification process developed with silica cartridge to obtain a single congener Rha₂C₁₀C₁₀ was successful, being a potential alternative for recovery and application of biomolecule in pharmacological products.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipids. Di-rhamnolipid. Purification process. Pharmacological potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	(A) Gota de água em superfície hidrofóbica. (B) Adição de moléculas surfactantes ao sistema: aumento da área de contato entre água e superfície hidrofóbica e redução da tensão superficial.....	17
Figura 2.	Organização micelar das moléculas de surfactante no interior de fase polar (A) e no interior da fase apolar (B).....	17
Figura 3.	Estrutura química dos Ramnolipídeos. (A) Mono-ramnolipídeos e (B) Di- ramnolipídeos, subdivididos pelo número de cadeia de ácidos graxos	22
Figura 4.	Modelo esquemático para o processo de produção de RL por cultivo submerso de <i>P. aeruginosa</i> PAO 1	32
Figura 5.	Modelo esquemático: (A) processo de extração de RL e (B) quantificação indireta de RL por método fenol-sulfúrico.....	33
Figura 6.	Confecção de placas de vidro revestidas com sílica (PV) para CCDP	35
Figura 7.	Cromatografia <i>flash</i> : (RL) extrato bruto dissolvido, (Si) sílica empacotada, (SE) solvente de eluição e (V) aplicação de vácuo.....	36
Figura 8.	Cartucho de sílica: (RL) extrato bruto de RL dissolvido, (S) solvente de lavagem ou extrator, (A) algodão e (Si) sílica empacotada	37
Figura 9.	Fluxograma para processo de purificação por Cartucho de sílica	38
Figura 10.	Cromatograma do extrato bruto de RL. (A) pico com retenção em 28.8 min, coleta B3. (B) cromatogramas das coletas de B1 a B7.....	41
Figura 11.	CCD* analítica. (A) extrato bruto de RL: manchas para Di-RL (vermelho), mono-RL (verde) e contaminantes apolares (azul); (B) subfrações coletadas por CLAEP	42
Figura 12.	CCDP*. Placa de sílica identificada com regiões referentes aos compostos do extrato bruto de RL	44
Figura 13.	CCDP. Placa de sílica após raspagem das regiões demarcadas	44
Figura 14.	(A) filtração com metanol e (B) compostos coletados após filtração.....	45

Figura 15.	(A) CCD analítica* e (B) preparativa**: constituintes apolares (vermelho); compostos polares (verde) e região com predomínio de Di-RL	45
Figura 16.	CCDP. Fluxograma com valor absoluto (mg) e identificação de compostos recuperados a partir do extrato bruto de RL.....	46
Figura 17.	CCD analítica*. Subfrações a partir de purificação por cromatografia <i>flash</i> : 1 a 18: ausência de glicolipídeos; 19, mono e Di-RL (vermelho); 21 e 22, maior concentração de Di-RL (verde). (B) Subfrações 19, 21 e 22	46
Figura 18.	Resultados purificação por cromatografia <i>flash</i> *. Valor absoluto (mg) das frações recuperadas a partir do extrato bruto de RL e identificadas por CCD	47
Figura 19.	Fluxograma purificação por cartucho de sílica das frações 21 e 22	48
Figura 20.	Fluxograma para processos de purificação por cartucho de sílica (A, B e C): etapas 1 e 2 solventes de lavagem e valor absoluto (mg) de compostos eliminados; etapa 3 solvente de extração e valor absoluto (mg) para Di-RL recuperado	50
Figura 21.	CCD* analítica. (A) Frações recuperadas processos A, B e C e D: congêneres de interesse (verde). (B) Amostras extrato bruto de RL (EB): mono-RL (vermelho), Di-RL (verde) e compostos apolares (seta)	51
Figura 22.	Estrutura química do di-ramnolipídeo Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos.....	20
Tabela 2.	Componentes do meio Luria- Bertani (LB)	31
Tabela 3.	Componentes do meio de Sais (MSM).....	31
Tabela 4.	Quantificação e obtenção do extrato bruto concentrado de RL produzidos por CSb de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	40
Tabela 5.	Tempo de retenção para coleta dos compostos a partir do extrato de RL 41	
Tabela 6.	Análise comparativa das técnicas realizadas para purificação de um único congêneres de Di-RL	52
Tabela 7.	Custo estimado para execução da purificação por cartucho de sílica, processo C	53
Tabela 8.	Dados de ^1H RMN do composto purificado de $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$	54
Tabela 9.	Composição das amostras analisadas em ^1H RMN	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
C ₄ H ₈ O ₂	Acetato de etila
CHCl ₃	Clorofórmio
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAEP	Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CMC	Concentração micelar crítica
CSb	Cultivo Submerso
dTDPL	deoxidina timidina difosfato
Di- RL	Di- ramnolipídeo
EPS	Matriz polimérica extracelular
FDA	Food and Drug Administration
HAA	3-hidroxiacanoil-3-hidroxiacanoato
HAc	Ácido acético
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
LA	Meio Luria-Bertani adicionado de 1,5% de ágar
LB	Meio Luria-Bertani
MeOH	Metanol
<i>rhl</i>	raminosiltransferase
RL	Ramnolipídeos
SMA	Actina de músculo liso
TGF-β1	Citocinas inflamatórias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	SURFACTANTES	16
3.2	BIOSURFACTANTES	17
3.3	RAMNOLIPÍDEOS (RL)	20
3.4	AÇÃO DOS RAMNOLIPÍDEOS EM PSEUDOMONAS AERUGINOSA	22
3.5	BIOSSÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS EM PSEUDOMONAS AERUGINOSA	23
3.6	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA	24
3.7	RAMNOLIPÍDEOS: POTENCIAL E APLICABILIDADE	25
3.8	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	28
4	MATERIAS E MÉTODOS	30
4.1	PRODUÇÃO DE RL POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA	30
4.1.1	Micro-organismo	30
4.1.2	Meios de Preservação	30
4.1.3	Preparo do Pré-inóculo e Inóculo	31
4.1.4	Cultivos Submersos (CSb)	31
4.1.5	Interrupção da Fermentação Submersa	32
4.2	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE RAMNOLIPÍDEO: OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO CONCENTRADO E QUANTIFICAÇÃO	32
4.3	DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE DI- RAMNOLIPÍDEO	34
4.3.1	Separação dos Congêneres por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAEP)	34
4.3.2	Separação dos Congêneres por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	34

4.3.3	Separação dos Congêneres por Cromatografia Flash.....	35
4.3.4	Separação dos Congêneres por Cartucho de Sílica	36
4.3.5	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONGÊNERE ÚNICO DE DI-RL.....	38
4.3.6	Identificação por CCD Analítica	38
4.3.7	Identificação e Caracterização por RMN de hidrogênio.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA PAO1: QUANTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO- LÍQUIDO.....	39
5.2	AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OBTENÇÃO DE CONGÊNERE ÚNICO DE DI-RL.....	40
5.2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAEP).....	40
5.2.2	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	42
5.2.3	Cromatografia Flash.....	46
5.2.4	Cartucho de Sílica	48
5.3	IDENTIFICAÇÃO DE CONGÊNERE DE DI-RL POR RMN DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRA RECUPERADA POR CARTUCHO DE SÍLICA.....	53
5.4	AVALIAÇÃO DE PUREZA POR RMN DE HIDROGÊNIO: COMPOSIÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO PURIFICADA.....	54
6	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXOS	63
	ANEXO A – ESPECTRO ¹H RMN PARA AMOSTRA PURIFICADA	63
	ANEXO B – ESPECTRO ¹H RMN PARA AMOSTRA PURIFICADA: PRESENÇA DE IMPUREZAS NÃO- RAMNOLÍPÍDICAS	64
	ANEXO C – ESPECTRO ¹H RMN PARA EXTRATO BRUTO.....	65

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam em sua estrutura química região hidrofílica (cabeça polar) e hidrofóbica (cauda apolar). A interação da molécula surfactante com solvente resulta na redução da tensão superficial, conferindo a essas substâncias características valorizadas pela indústria como agente emulsificador, detergente e dispersante (BRUMANO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; NITSCHKE; PASTORE, 2002; VARJANI; UPASANI, 2017). Nesse contexto, os biossurfactantes compartilham das características citadas, porém, com vantagens que os tornam foco de pesquisas em inovação como produção sustentável, baixa toxicidade, maior atividade superficial e interfacial, biodegradabilidade e maior estabilidade, pois suportam alterações nas condições de pH e temperatura sem sofrer degradação (DIAS; FELIPE, 2017; JOY *et al.*, 2017; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Essas biomoléculas produzidas por diferentes micro-organismos (BANAT *et al.*, 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2002; VARJANI; UPASANI, 2017) constituem um grupo heterogêneo e diversificado com destaque para ramnolipídeos (RL): composto de baixo peso molecular que apresenta uma ou duas moléculas de ramnose (açúcar/polar) ligadas a ácidos graxos β -hidroxilados, sendo assim, classificados como glicolipídeos. Essa classe de biossurfactante é produzida, principalmente, por bactérias *Pseudomonas aeruginosa* de forma heterogênea (WADEKAR *et al.*, 2012).

Dentre as diversas propriedades dos RL evidenciadas na literatura como antimicrobiana, antifúngica e como emulsificante em produtos *healthcare*. Destaca-se potencial da atividade biológica dos Di-RL devido à maior presença de grupos polares que resulta em maior interação (RODRIGUES *et al.*, 2017), sendo relatado que mesmo entre homólogos qualquer alteração na estrutura química tem efeito no potencial terapêutico da biomolécula (RIKALOVIĆ *et al.*, 2014), o que torna necessário o desenvolvimento de metodologias para o isolamento de um único congêneres.

Há evidências de intensa atividade inibitória de Di-RL contra fungos, patógenos de planta e ação citotóxica contra células cancerígenas. Além disso, para tratamentos terapêuticos em que este auxilia no fechamento (processo cicatrizante) de feridas na pele, como também, na inibição da formação de cicatrizes fibróticas (queloides) (SHEN *et al.*, 2016; STIPCEVIC *et al.*, 2006; TAWFEEEQ;

YESSER, 2018). Assim, dentre a gama de homólogos produzidos há grande interesse pela produção e obtenção de Di-RL de forma isolada.

A purificação da biomolécula di-ramnolipídica ainda é a etapa de maior custo (SHEN *et al.*, 2016), tornando sua utilização um desafio para o setor farmacológico que requer o princípio ativo puro (JADHAV *et al.*, 2018). Dessa forma, diversos estudos se atentam para a otimização do cultivo, visando maior rendimento, alta produção e recuperação do ramnolipídeo (ARREBOLA *et al.*, 2010; DHANARAJAN *et al.*, 2016; JADHAV *et al.*, 2018). Nesse contexto, o presente trabalho objetiva a produção direcionada de di-ramnolipídeos a partir do cultivo submerso de *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 e desenvolvimento de processo de purificação eficiente e viável para obtenção do congênere Rha₂C₁₀C₁₀.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produção direcionada de di-ramnolipídeos por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, extração e desenvolvimento de processo eficiente e viável para purificação do congênera único de di-ramnolipídeo Rha₂C₁₀C₁₀.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 em fermentação submersa, visando maior produção de di-ramnolipídeos;
- Realizar processo de extração líquido-líquido e quantificação de RL;
- Comparar diferentes técnicas para recuperação de Di-RL obtido por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- Padronizar metodologias de produção e purificação de congênera único de Di-RL obtido por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- Identificar e caracterizar congênera isolado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) analítica e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (¹H RMN).

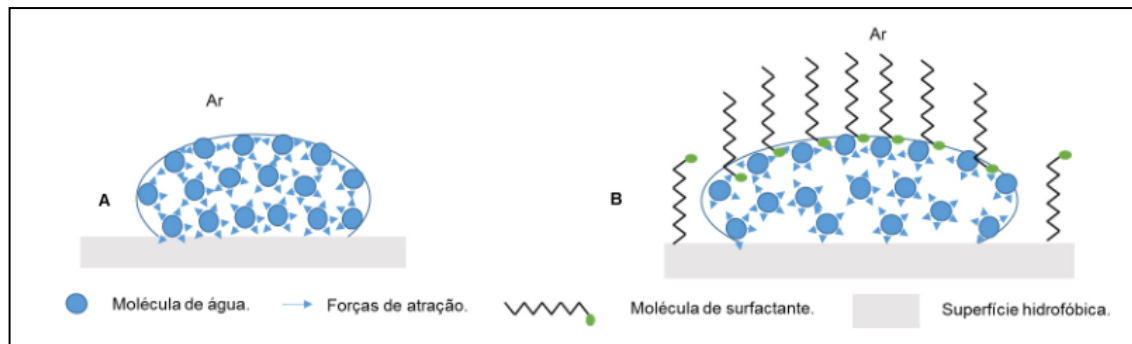
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, apresentam em sua estrutura química região hidrofílica e hidrofóbica. A primeira, com característica polar, sendo iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica, enquanto a região apolar é constituída por cadeia hidrocarbonada. Essa constituição química faz dos surfactantes importantes agentes capazes de reduzir as tensões superficiais e interfaciais entre fluidos imiscíveis ou entre fluido e um sólido. A figura 1 ilustra a redução da tensão superficial na gota de água devido à interação do solvente com surfactante. Isso ocorre, pois a presença das moléculas surfactantes diminui a força de coesão entre as moléculas do solvente localizadas na superfície, reduzindo a tensão superficial. Essa interação confere, a esses compostos, propriedades de grande utilidade para o setor industrial como ação detergente, emulsificante e dispersante (BRUMANO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; NITSCHKE; PASTORE, 2002; VARJANI; UPASANI, 2017).

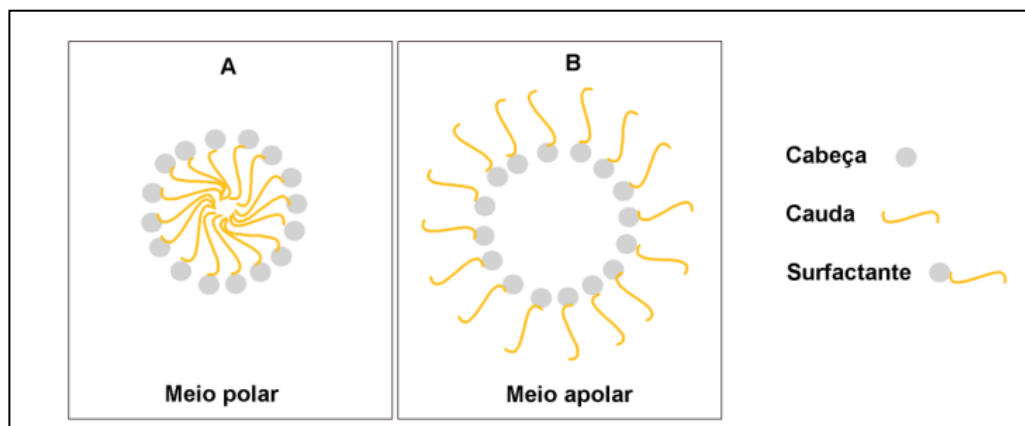
As moléculas de surfactante tipicamente constituídas de cabeça polar e cauda apolar são caracterizadas pela formação de agregados moleculares, as chamadas micelas (Figura 2). A concentração na qual se inicia o processo de formação de micelas é denominada de concentração micelar crítica (CMC). A CMC é uma propriedade intrínseca e característica de cada surfactante, sendo que a adição de mais moléculas surfactantes após atingir a saturação não influenciará a tensão superficial (DIAS; FELIPE, 2017).

Figura 1. (A) Gota de água em superfície hidrofóbica. (B) Adição de moléculas surfactantes ao sistema: aumento da área de contato entre água e superfície hidrofóbica e redução da tensão superficial



Fonte: Adaptado de DIAS; FELIPE, 2017

Figura 2. Organização micelar das moléculas de surfactante no interior de fase polar (A) e no interior da fase apolar (B)



Fonte: Adaptado de DIAS; FELIPE, 2017

3.2 Biossurfactantes

Biossurfactantes são biomoléculas produzidas por diferentes microorganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BANAT *et al.*, 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2002; VARJANI; UPASANI, 2017). Constituem um grupo heterogêneo e diversificado, sendo classificado de acordo com sua natureza bioquímica. Primeiramente, são divididos em dois grupos principais de acordo com o peso molecular, sendo este baixo ou alto. Os biossurfactantes que apresentam baixo peso molecular subdividem-se em: glicolípídeos, lipoproteínas (ou lipopeptídeos) e fosfolípídeos. Enquanto os de alto peso molecular, denominados bioemulsificantes,

são representados pelos lipopolissacarídeos complexados a proteínas e polissacarídeos (JOY *et al.*, 2017).

Semelhante aos surfactantes de origem química, os biossurfactantes apresentam natureza anfipática, ou seja, possuem em sua estrutura química uma região hidrofílica constituída de aminoácidos, peptídeos, proteínas, mono, di ou polissacarídeos, ligada a uma porção hidrofóbica formada por uma cadeia hidrocarbonada de ácidos graxos ou álcoois graxos, saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados (BAFGHI; LOVAGLIO *et al.*, 2015; FAZAEIPOOR, 2012; JOY *et al.*, 2017; RIKALOVIC *et al.*, 2012).

De acordo com o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), a “química verde, química ambiental ou química para o desenvolvimento sustentável é campo emergente que tem como objetivo conduzir ações científicas e/ou processos industriais ecologicamente corretos”. Assim, a produção de inúmeros produtos através do desenvolvimento de bioprocessos foi estimulada, tornando-se uma opção para os produtos tradicionalmente comercializados (CGEE, 2010b). Nesse contexto, a produção e utilização de surfactantes naturais ou biossurfactantes como alternativa aos sintéticos tem sido estimulada não só pela sustentabilidade, mas também pelas diversas vantagens desses biocompostos sobre os de origem sintética (DIAS; FELIPE, 2017; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Dentre as principais vantagens dessas biomoléculas destacam-se: (1) maior atividade superficial e interfacial, conseqüentemente, menores concentrações de biossurfactante são necessárias para diminuir a tensão superficial quando comparado ao surfactante sintético, sendo mais potentes que este último; (2) biodegradabilidade, pois biossurfactantes são obtidos de fonte renovável e são facilmente utilizados por micro-organismos como substrato; (3) estabilidade em força iônica alta, os surfactantes sintéticos são estáveis entre 2 a 3% (m/v) de sais, já os biossurfactantes são estáveis até concentrações salinas de 10% (m/v); (4) utilização de substratos alternativos na produção por via fermentativa, pois esses biocompostos podem ser produzidos a partir de substratos renováveis e resíduos agroindustriais. Além disso, baixa toxicidade apresentada pelos biossurfactantes garante menor probabilidade de provocar reações alérgicas, tornando-os mais seguros para serem utilizados em cosméticos, alimentos e no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (DIAS; FELIPE, 2017; JOY; RHAMAN; SHARMA, 2017).

Sua utilização na confecção de produtos farmacológicos torna-se ainda mais interessante, pois além da baixa toxicidade, as biomoléculas apresentam efetividade em condições diversas como numa ampla faixa de temperatura e de pH, não degradam facilmente, garantindo sua propriedade ativa (função) no corpo humano, o que viabiliza seu uso em formulações. No entanto, ainda há diversos desafios a serem superados e etapas a serem otimizadas para que esses biocompostos sejam produzidos e comercializados de forma economicamente viável.

A principal desvantagem dos biossurfactantes é o custo, estima-se até 50 vezes maior quando comparados aos sintéticos. Também podem ser citadas desvantagens quanto ao bioprocessamento como a produção de espuma, baixa produtividade dos micro-organismos utilizados, dentre outras complexidades presentes no processo produtivo celular que não aparecem no processo químico (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; WINTERBURN; MARTIN, 2012).

Dentre a gama de biossurfactantes sintetizados por diferentes micro-organismos como mostrado na tabela 1, destaca-se como classe mais estudada os glicolipídeos representados pelos ramnolipídeos, trealopídeos, soforolipídeos e lipídeos de manosil eritritol (JADHAV *et al.*, 2018; JOY *et al.*, 2017; KRONENBERGER, 2007; LOVAGLIO *et al.*, 2015).

O arranjo estrutural dessas biomoléculas está diretamente relacionado às atividades tensoativas, como a redução da tensão superficial entre diferentes sistemas e capacidade de formar emulsões. Graças ao seu potencial há crescente interesse em explorar as atividades biomédicas desses compostos, como propriedades antivirais, antimicrobianas, antifúngicas e anticancerígenas (BANAT *et al.*, 2016).

O processo de purificação do biossurfactante está entre os principais desafios a serem superados para tornar sua produção e utilização viáveis. Sabe-se que para obtenção da biomolécula pura são necessárias várias etapas o que resulta numa baixa recuperação do biocomposto e maiores quantidades de efluentes, encarecendo sua purificação. É de suma importância o desenvolvimento de processos que viabilizem a purificação e obtenção isolada do biocomposto de interesse, principalmente, para o setor de produtos farmacológicos que requer aplicação de modo que a ação terapêutica não seja volúvel nas formulações em razão de possíveis contaminações, presença de outras moléculas ativas ou diferença de um lote de produção para outro (BANAT *et al.*, 2016).

Tabela 1. Principais tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos

Biossurfactante	Microrganismo Produtor
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apícola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos	
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: CAMILIOS-NETO, 2010

3.3 Ramnolipídeos (RL)

Ramnolipídeos (RL) são glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e representam uma das mais importantes classes de biossurfactantes microbianos tanto pela excelente propriedade tensoativa como pela possibilidade de produção em altas concentrações (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2009, 2011). RL são compostos de baixo peso molecular, sendo classificados como glicolipídeos devido à presença de uma ou duas moléculas de ramnose em sua estrutura química. A ramnose (açúcar) caracteriza a porção hidrofílica, a qual está ligada a um ou dois ácidos graxos (hidrofóbicos). As moléculas de açúcares encontram-se ligadas aos ácidos graxos β -hidroxilados. Cada um destes dois grupos subdivide-se, ainda, de acordo com as unidades e tipos de ácidos β -hidroxilados. As cadeias de ácidos

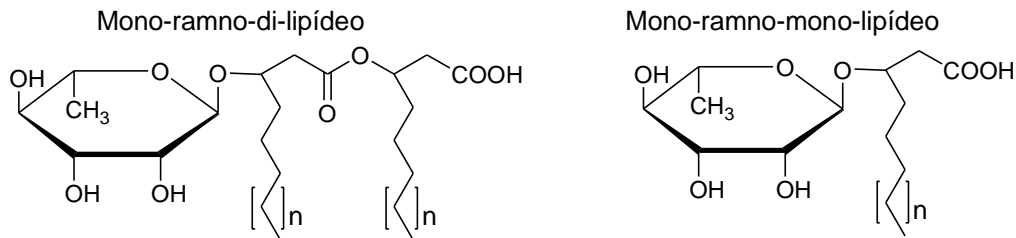
graxos são, em sua grande maioria, saturadas, com menor frequência podem ser encontradas cadeias mono ou poli-insaturadas (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011).

A bactéria *P. aeruginosa* produz o RL de maneira heterogênea com uma gama de congêneres possíveis. Tipicamente, essas biomoléculas contêm ácidos graxos com cadeias que variam entre 8 a 14 carbonos. Até o momento, já foram descritos cerca de 60 homólogos de RL, os quais são obtidos de acordo com as cepas utilizadas e em condições de cultivos específicas, sendo o ácido hidroxidecanóico constituído de 10 carbonos (C₁₀) o mais comumente encontrado na fração lipídica da molécula de ramnolipídeo, podendo ter como possíveis substituintes os ácidos hidroxiocetanóico (C₈), hidroxidodecanóico (C₁₂) e hidroxidodecenóico (C_{12:1}) (WADEKAR *et al.*, 2012).

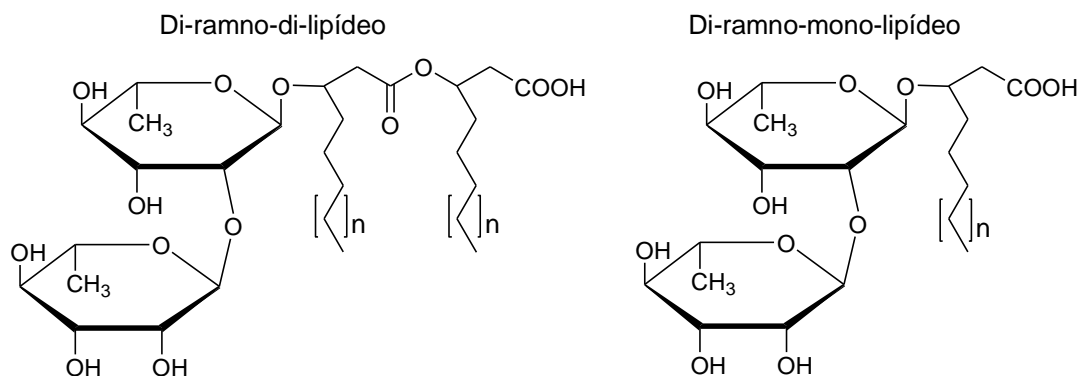
É bem descrito na literatura quatro principais espécies de homólogos presentes numa mistura heterogênea de ramnolipídeos, como ilustrado na figura 3, são eles: mono-ramno-di-lipídeo (RhaC₁₀C₁₀), mono-ramno-mono-lipídeo (RhaC₁₀), di-ramno-di-lipídeo (Rha₂C₁₀C₁₀) e di-ramno-mono-lipídeo (Rha₂C₁₀) (WITTGENS *et al.*, 2017). Destes, os congêneres mais frequentemente produzidos pela *P. aeruginosa* são: RhaC₁₀C₁₀ e Rha₂C₁₀C₁₀ (LOVAGLIO *et al.*, 2015).

Figura 3. Estrutura química dos Ramnolipídeos. (A) Mono-ramnolipídeos e (B) Di-ramnolipídeos, subdivididos pelo número de cadeia de ácidos graxos

A Mono-ramnolipídeos



B Di-ramnolipídeos



Fonte: ADAPTADO de WITTEGENS *et al.*, 2017

3.4 Ação dos Ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são constituídas por bacilos, sendo caracterizadas como gram-negativas aeróbicas. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida por ser um patógeno humano oportunista que apresenta habilidade de causar sérias infecções e desenvolve-se em quantidades mínimas de fontes de carbono (TORTORA *et al.*, 2005). Consta na literatura um rico acervo sobre a cepa PAO1 a qual foi isolada de ambiente hospitalar e é referência para produção de ramnolipídeos com grande potencial para aplicação biotecnológica (MÜLLER *et al.*, 2010, 2012).

A função biológica dos biossurfactantes microbianos está associada ao acesso a substratos hidrofóbicos, aumentando a disponibilidade de nutrientes para os micro-organismos produtores. Apresentam atividade antibiótica, sendo capaz de emulsificar a membrana celular de outros micro-organismos, estimulando a competitividade e a sobrevivência das populações microbianas produtoras desses

compostos (CASSIA DIAS; OLIVEIRA FELIPE, 2017). Os biosurfactantes também afetam a interação entre microrganismo e superfícies, pois alteram a hidrofobicidade da superfície celular do mesmo. A interação microrganismo-superfície pode ocorrer através da ancoragem do biocomposto pela fração hidrofóbica ou hidrofílica, dependendo da natureza da superfície celular (BANAT *et al.*, 2016). Dessa forma, trata-se de um metabólito secundário que compõe o mecanismo de defesa da bactéria ao inibir a presença e a competição com outros micro-organismos.

Além disso, os RL desempenham papel fundamental em processos fisiológicos da célula bacteriana como motilidade celular (*swarming*), formação de biofilme (JOY *et al.*, 2017; RIKALOVIC *et al.*, 2012), proteção e atuação como importante fator de virulência da *P. aeruginosa* (WITTGENS *et al.*, 2017).

3.5 Biossíntese de Ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*

A biossíntese dos RL ocorre através de reações de transferências sequenciais de grupos glicosil em que cada reação é catalisada por uma enzima específica. A síntese das porções hidrofóbica (lipídica) e hidrofílica (ramnose) dos ramnolipídeos ocorre a partir do metabolismo primário, com a participação de grupos específicos de enzimas que atuam na biossíntese e na regulação da produção do biocomposto (JOY *et al.*, 2017; LOVAGLIO *et al.*, 2015).

Três reações enzimáticas catalisadas pelas raminosiltransferases – *rhl A*, *rhl B* e *rhl C*, são necessárias para a biossíntese de RL: (1) *rhl A*, responsável pela síntese de 3-hidroxiacanoil-3-hidroxiacanoato (HAA); (2) *rhl B* é responsável pelo acoplamento da dTDPL-ramnose (deoxidina timidina difosfato L-ramnose) com HAA, formando os mono-ramnolipídeos (RAHIM *et al.*, 2001); e por fim, (3) a *rhl C* que partindo do mono-ramnolipídeo como substrato e dTDP-L-ramnose produz o Di-RL (VARJANI; UPASANI, 2017). De acordo com a literatura, a expressão destas enzimas é controlada por sistemas de *quorum sensing las* e *rhl* que regulam a concentração de compostos autoindutores de *Pseudomonas*, no entanto, são necessários estudos genéticos específicos para maior compreensão desses mecanismos autorregulatórios.

3.6 Otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*

Dentre os diferentes micro-organismos produtores de ramnolipídeos identificados e caracterizados, a *P. aeruginosa* apresenta os níveis mais altos de produção. Das três cepas destacadas como principais produtoras, DSM 7108, DSM 2874 e PAO 1, esta última ainda é a responsável pelos melhores rendimentos (MÜLLER *et al.*, 2011). Na literatura encontra-se rendimentos que variam de 3 a 78 g/L de acordo com cepas utilizadas, condições de cultivo pré-estabelecidas e estratégias de otimização para aumentar rendimento (CHONG; LI, 2017). Estudos mostram que tanto a produção quanto os tipos de homólogos produzidos de RL são afetados pela composição do meio e fonte de carbono e nitrogênio (VARJANI; UPASANI, 2017; VARJANI *et al.*, 2013). Não obstante, a proporção entre mono e di-ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* também é determinada por condições ambientais e nutricionais (VARJANI *et al.*, 2016).

Há dois grupos principais de fatores que afetam a produção de RL por *P. aeruginosa*: (1) os ambientais e (2) os nutricionais. O primeiro grupo consiste nos fatores como pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio, condições importantes para o crescimento microbiano, as quais também apresentam papel na qualidade e quantidade de RL produzido (VARJANI; UPASANI, 2017). Por exemplo, quanto ao controle do pH durante o processo fermentativo, observa-se que o pH neutro ou levemente alcalino (pH 7–7,5) permite crescimento ótimo da bactéria durante a fase inicial de fermentação, seguida de uma leve redução do pH para levemente ácido (pH 6–6,5), resulta na produção máxima de RL (CHONG; LI, 2017; LU *et al.*, 2012). Em estudo, o rendimento para produção de ramnolipídeos aumentou de 24 g/L para 28,8 g/L simplesmente pelo controle do pH durante fermentação em batelada. Posteriormente, atingiu-se valor de 70,5 g/L para cultivos em fermentação com batelada alimentada mantendo-se o controle do pH, agitação de 500 rpm e temperatura de 30 °C (LU *et al.*, 2012).

Já a fonte de substrato utilizada (fator nutricional) pela *Pseudomonas* apresenta grande diversidade, sobretudo, devido à capacidade dessas bactérias em degradar fontes mais difíceis como resíduos orgânicos. Há três tipos de fontes carbônicas utilizadas por essas bactérias: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais (VARJANI; UPASANI, 2017). Dentre as fontes solúveis em água destacam-se o glicerol, glicose, manitol e etanol. No entanto, a maior produção de RL é

observada a partir de fontes imiscíveis como alcanos, petróleo, diesel, azeite e óleo cru (CHONG; LI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017, 2016). Experimentos apontam um aumento significativo da produção desse metabólito secundário a partir da suplementação do meio com extrato de leveduras ou resíduos, por exemplo, cultivos fermentativo de PAO 1 com óleo de girassol como fonte única de carbono, 2,5% (m/v), resultou em rendimento máximo de 36,7 g/L (MÜLLER *et al.*, 2011).

A fonte de nitrogênio também é relevante quando se busca uma produção ótima de RL. Neste caso, estudos apontam que a disponibilidade de nitrogênio pode aumentar ou inibir a produção do biocomposto. Sabe-se que nitrato é a melhor fonte quando se usa meio de cultivo com azeite e parafinas. Para outros cultivos o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e o nitrato de sódio resultaram em melhor produção. A otimização nutricional em cultivo fermentativo de *P. aeruginosa* DN1 suplementado com óleo de palma (5 g/L) e nitrato de sódio (C/N na razão de 20) atingiu produção de 25,9 g/L de ramnolipídeos (YL, Ma *et al.*, 2016). Destaca-se que a adição de nitrogênio nem sempre é positiva. A limitação e manutenção de proporção entre carbono-nitrogênio é de suma importância para melhor rendimento (ROBERT *et al.*, 1989; VARJANI; UPASANI, 2017, 2016). A redução do mineral ferro também mostrou comportamento inversamente proporcional: experimentos observaram aumento relevante da produção de RL quando se reduziu a quantidade de ferro utilizada (NITSCHKE; PASTORE, 2006; VARJANI; UPASANI, 2017). Dessa forma, é possível direcionar a produção para obter o máximo do RL de interesse.

3.7 Ramnolipídeos: potencial e aplicabilidade

A estrutura química dos RL lhes confere um leque de aplicações no setor industrial que abrange desde preservação e recuperação ambiental (biorremediação) até indústria alimentícia, agrícola, cosmética, e mais recentemente, surge também, como forte potencial para setor farmacêutico na produção de biofármacos.

Na cosmética é relatado o uso de RL para tratamento antirrugas, assim como, sua incorporação em formulações de diversos produtos como desodorantes, repelentes, cremes dentais dentre outros produtos de higiene e cuidado pessoal, conhecidos como *healthcare*, devido à ação antifúngica e antimicrobiana (VARVARESOU; IAKOVOU, 2015). Graças à excelente propriedade tensoativa e

emulsificante ramnolípídeos são úteis para tratamentos terapêuticos tópicos, aumentando a biodisponibilidade do princípio ativo. Dessa forma, o *delivery* eficaz do composto terapêutico aumenta a biodisponibilidade do princípio ativo contido no produto, resultando num tratamento bem-sucedido. Além disso, baixa toxicidade do RL, adicionada aos efeitos anti-irritantes e compatibilidade com a pele, tornam seu uso tópico ainda mais interessante (STIPCEVIC *et al.*, 2006). Podem atuar, também, de forma sinérgica com alguns antibióticos (ampicilina, tetraciclina, canamicina), auxiliando na penetração dos mesmos na célula (DAS *et al.*, 2014).

Outro fator de destaque quanto ao uso dos RL está na capacidade de inibição de biofilme bacteriano. Sabe-se que a formação do biofilme tem papel crucial na patogenicidade de várias infecções bacterianas. O biofilme é definido por comunidades de células microbianas associadas à superfície contida em matriz polimérica extracelular (EPS) responsável por aumentar a resistência microbiana contra ação de antibióticos, conferindo, assim, maior gravidade à infecção (DE RIENZO; MARTIN, 2016). Na literatura, a capacidade de inibição da formação de biofilmes por RL é relatada por diversos autores (BENINCASA *et al.*, 2004; DIAZ de RIENZO *et al.*, 2015, 2016; MARTIN, 2016). Essa atividade inibitória está relacionada, principalmente, com uma possível remoção das EPS e alteração da superfície de contato celular (BANAT *et al.*, 2016). Dusane *et al.*, (2012) demonstraram a ação de RL inibindo a formação de biofilme em 50% a 67%, evidenciando o grande potencial antimicrobiano desses compostos.

Como explicado, excelentes propriedades apresentadas pelos RL estão diretamente relacionadas à constituição química, assim, considerando que esse biocomposto é produzido em mistura heterogênea, contendo uma diversidade de congêneres (mono e di-ramnolípídicos), cada congêneres, apresenta interação e atividade biológica específica de acordo com sua estrutura química. A atividade biológica divergente entre os congêneres de mono e Di-RL é justificada, principalmente, devido à maior presença de grupos polares nos compostos di-ramnolípídicos, potencializando ação detergente e de interação com a camada bifosfolípídica que constitui a membrana celular dos micro-organismos (RODRIGUES *et al.*, 2017). Assim, uma pequena mudança da estrutura entre os homólogos tem efeito toxicológico na permeabilidade da membrana celular e no seu potencial terapêutico (RIKALOVIĆ *et al.*, 2014), o que torna crucial o

desenvolvimento de metodologias para o isolamento de um único homólogo de ramnolipídeo.

Em estudo Rodrigues *et al.*, (2017), evidenciaram maior atividade de Di-RL contra crescimento de fungos *A. niger* MUM 92.13 e *A. carbonarius* MUM 05.18 quando comparada com mistura de RL e mono-RL purificado. Maior atividade de Di-RL purificado também foi observada contra diversos patógenos de planta enquanto mono-RL apresentaram atividade inibitória irrelevante (SHA *et al.*, 2012). Não obstante, foi relatado por Thanomsub *et al.*, (2006) diferença nas atividades citotóxicas entre extrato bruto de RL, Rha₂C₁₀C₁₀ e Rha₂C₁₀C₁₂. O extrato bruto de RL não apresentou atividade citotóxica enquanto os congêneres isolados de Rha₂C₁₀C₁₀ e Rha₂C₁₀C₁₂ exibiram inibição significativa contra o crescimento de células de câncer com concentração inibitória mínima (CIM) de 6,25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente.

Tem sido explorado o uso do Di-RL purificado como agente cicatrizante durante processo de fechamento de injúrias da pele. O processo inflamatório que desencadeia mecanismos de migração celular para a cicatrização é complexo, Stipcevic *et al.* (2006) demonstraram a partir de avaliação histológica de tecido de camundongo a influência do Di-RL no processo de cicatrização ao acelerar o fechamento de ferida através da redução de colágeno na área injuriada. Em estudos *in vivo*, Tawfееeq e Yesser (2018) relataram processo acelerado para recuperação de pele infeccionada com ausência de cicatrizes em ratos tratados com RL numa concentração de 30 mg/mL, uso tópico em área injuriada. Por outro lado, grupos que não receberam tratamento com o biossurfactante tiveram um período mais longo (17 dias contra 10 dias do grupo tratado) além de apresentarem formação de cicatriz.

No processo de cicatrização de feridas o miofibroblasto tem papel crucial para formação da rede de fibras e fechamento da ferida. O miofibroblasto é um fibroblasto contrátil especializado a partir da estimulação de fibroblastos por citocinas inflamatórias como TGF-β1. Miofibroblastos expressam α-actina de músculo liso (α-SAM) e secretam propolipeptídeos de colágeno para reparar ferida aberta. Quando ferida cicatricial normal se fecha, os miofibroblastos devem desaparecer por apoptose. No entanto, eventos inesperados podem resultar na proliferação exacerbada dessas células e na reorganização das fibras colágeno no processo de cicatrização, desencadeando aumento da rigidez tecidual devido ao acúmulo de fibras de colágeno na superfície da pele, chamadas cicatrizes

hipertróficas ou queloides. A partir de ensaios de imunofluorescência e análises de *wester blot* estudos evidenciaram a ação supressora do Di-RL na expressão do α -SMA nos miofibrosblastos, acarretando na redução do índice fibrótico (SHEN *et al.*, 2016). Estudos apontam que o efeito contra a formação de cicatriz ocorre por meio de mecanismo de morte celular direcionada (*targeted killing*) aos miofibroblastos. No sistema de cultura de células, Di-RL induziriam maior toxicidade aos miofibroblastos, inibindo os índices fibróticos para expressão de α -SMA e secreção de colágeno. Este efeito antifibrótico foi comprovado em cicatrizes hipertróficas de orelha de coelho (SHEN *et al.*, 2016).

Contudo, relatos quanto à melhor atividade biológica entre os diferentes congêneres (mono e Di-RL) não são unânimes para a comunidade científica, há estudos que demonstram melhor potencial antimicrobiano de RhaC₁₀C₁₀ para bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (DAS *et al.*, 2014), assim como, maior atividade citotóxica de mono-RL contra linhagens de células cancerígenas (CHRISTOVA *et al.*, 2013), sendo necessários estudos específicos para identificar quais congêneres apresentam melhor potencial para determinada atividade.

Deve-se ressaltar a baixa toxicidade dos Di-RL em mamíferos, tanto em aplicação externa, como também, na administração oral (ED₅₀ > 5000 mg/kg) e injeção subcutânea (120 mg/kg por dia), e ainda, a ausência de efeito mutagênico, sendo este composto aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em culturas de frutas, vegetais e leguminosas. Assim, a versatilidade e os diferentes mecanismos de ação de Di-RL adicionada a sua segurança e baixa toxicidade confere a essa biomolécula grandes expectativas para o setor de desenvolvimento de biofármacos (SHEN *et al.*, 2016).

3.8 Extração e purificação de ramnolipídeos

Extração com solventes é o método melhor descrito e mais adequado para recuperação de biossurfactantes de baixo peso molecular como RL. São apropriados os solventes acetona, acetato de etila, clorofórmio e metanol, seguido de centrifugação para recuperação do biocomposto. Para precipitação de biossurfactantes de alto peso molecular é comum o uso de sulfato de amônio. Também é citado método de extração de RL por sulfato de alumínio (*salting out*)

seguido por centrifugação, porém, o uso de solventes para recuperação é o melhor indicado (VARJANI; UPASANI, 2017; BANAT *et al.*, 2010).

Depois de recuperado, RL pode ser caracterizado por métodos analíticos simples desde medição colorimétrica da ramnose até métodos sofisticados como cromatografia e espectrofotometria. Principais métodos de caracterização de biossurfactantes são: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), espectrometria de massa com ionização *electrospray* (ESI-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CL-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Com o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de fornecer detalhes da estrutura dos compostos é possível atingir uma eficiente identificação e caracterização da biomolécula de interesse (VARJANI; UPASANI, 2017; VARJANI; UPASANI, 2016; HEYD *et al.*, 2008).

O processo de purificação (*downstream*) é um dos principais obstáculos, sendo responsável por até 80% dos custos do bioprocesso o que torna a obtenção da biomolécula de interesse onerosa (JADHAV *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2016), sobretudo, a complexidade para obtenção purificada de RL se dá devido à recuperação a partir do caldo de fermentação, mistura complexa contendo substratos não fermentados, sais, aminoácidos, proteínas e outros produtos metabólicos.

Dhanarajan *et al.*, (2016) em estudo pioneiro para purificação dos diferentes homólogos de lipoproteínas avaliaram de forma comparativa a CLAE semipreparativa e analítica. O método analítico já bem descrito na literatura é amplamente empregado para identificação e caracterização de moléculas. No entanto, métodos preparativos não otimizados resultam em baixa resolução e maior tempo de eluição, sendo relatados tempos de execução de até 80 minutos (ARREBOLA *et al.*, 2010) e mesmo com estratégias de otimização como alteração do gradiente durante a corrida, a separação ainda é onerosa e insuficiente (YANG *et al.*, 2015). CLAE em fase reversa (utilizando-se coluna C18) e cristalização são aplicadas para purificação de RL, porém, também são metodologias de alto custo e que demandam maior tempo, além de elevado consumo de solventes, tornando o processo de purificação fonte de resíduos tóxicos eliminados no meio ambiente (BANAT *et al.*, 2018).

Por outro lado, técnicas de remoção de produtos *in situ* (ISPR) apresentam potencial para recuperação de biomoléculas, particularmente, a ultrafiltração para purificação de biossurfactantes produzidos em larga escala (BANAT *et al.*, 2018). Outros métodos ISPR com resultados positivos para purificação de RL inclui cromatografia de adsorção. Em experimento, JADHAV *et al.* (2018) recuperaram RL com pureza de 88,7% utilizando-se resina como fase estacionária e solvente de eluição acetato de etila adicionado de hexano em diferentes concentrações. Devido à polaridade, de acordo com o aumento da % de hexano menor a solubilidade dos compostos ramnolipídicos, conseqüentemente, diferentes congêneres de RL são retidos pela resina.

Com importante papel produção sustentável dos biocompostos e sua aplicação industrial é crucial a busca por novas perspectivas de separação e purificação, visando desenvolvimento de métodos simples, econômicos e com menor consumo de solventes orgânicos para obtenção de massa significativa da biomolécula de interesse.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Produção de RL por *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1 Micro-organismo

Para cultivo de RL proposto, utilizou-se como fonte produtora a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, originalmente isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955), sendo esta a cepa mais utilizada para processos laboratoriais, pois seu genoma, assim como, suas funções encontram-se muito bem descritos na literatura (STOVER *et al.*, 2000).

4.1.2 Meios de preservação

A cepa PAO1 foi mantida em meio Luria-Bertani (LB) composto por tripton, extrato de levedura e cloreto de sódio (Tabela 2) adicionado de glicerol 20% (v/v) e estocada a -80 °C. Para preparo do pré-inóculo a PAO1 foi transferida para placas

contendo meio sólido (LA) composto de LB acrescentado de ágar 1,5% (m/v). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C.

Tabela 2. Componentes do meio Luria- Bertani (LB)

Componentes	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Fonte: SAMBROOK *et al.*, 1989

4.1.3 Preparo do pré-inóculo e inóculo

Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB (Tabela 2) com 3 a 5 colônias de PAO1 preservadas anteriormente em meio LA. O inóculo foi realizado no mesmo meio líquido (LB) com adição de 2% de pré-inóculo (v/v) e incubado em agitador orbital em temperatura de 37 °C e rotação de 200 rpm durante período de 5 horas.

4.1.4 Cultivos Submersos (CSb)

Os ensaios de cultivo submerso foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 125 mL de meio de cultivo (MSM) composto de sais (Tabela 3) e acrescentado de glicerol 3% (v/v). Estes foram inoculados com o inóculo anteriormente preparado (*item 4.1.3*) em proporção de 2 % (v/v) e mantidos em agitador orbital a 37 °C, 200 rpm, durante nove (9) dias.

Tabela 3. Componentes do meio de Sais (MSM)

Componentes	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	3,0
K_2HPO_4	7,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0

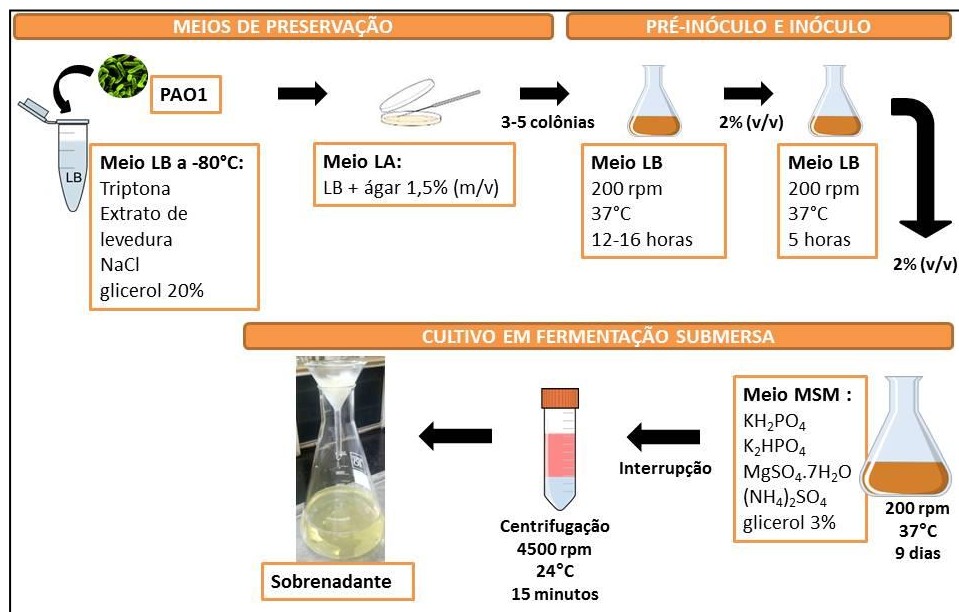
Fonte: CAMILIOS-NETO, 2010

4.1.5 Interrupção da Fermentação Submersa

Interromperam-se os ensaios após período determinado. Em seguida, o conteúdo dos Erlenmeyers foi transferido para tubos *falcon* (50 ml) e centrifugado por 15 minutos a 4.500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi armazenado em béquer e descartou-se a biomassa.

A figura 4 descreve resumidamente as metodologias aplicadas (itens 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 e 4.1.5), desde o preparo da cepa até a interrupção do cultivo.

Figura 4. Modelo esquemático para o processo de produção de RL por cultivo submerso de *P. aeruginosa* PAO 1



Fonte: próprio autor

4.2 Extração líquido-líquido de Ramnolípídeo: obtenção de extrato bruto concentrado e quantificação

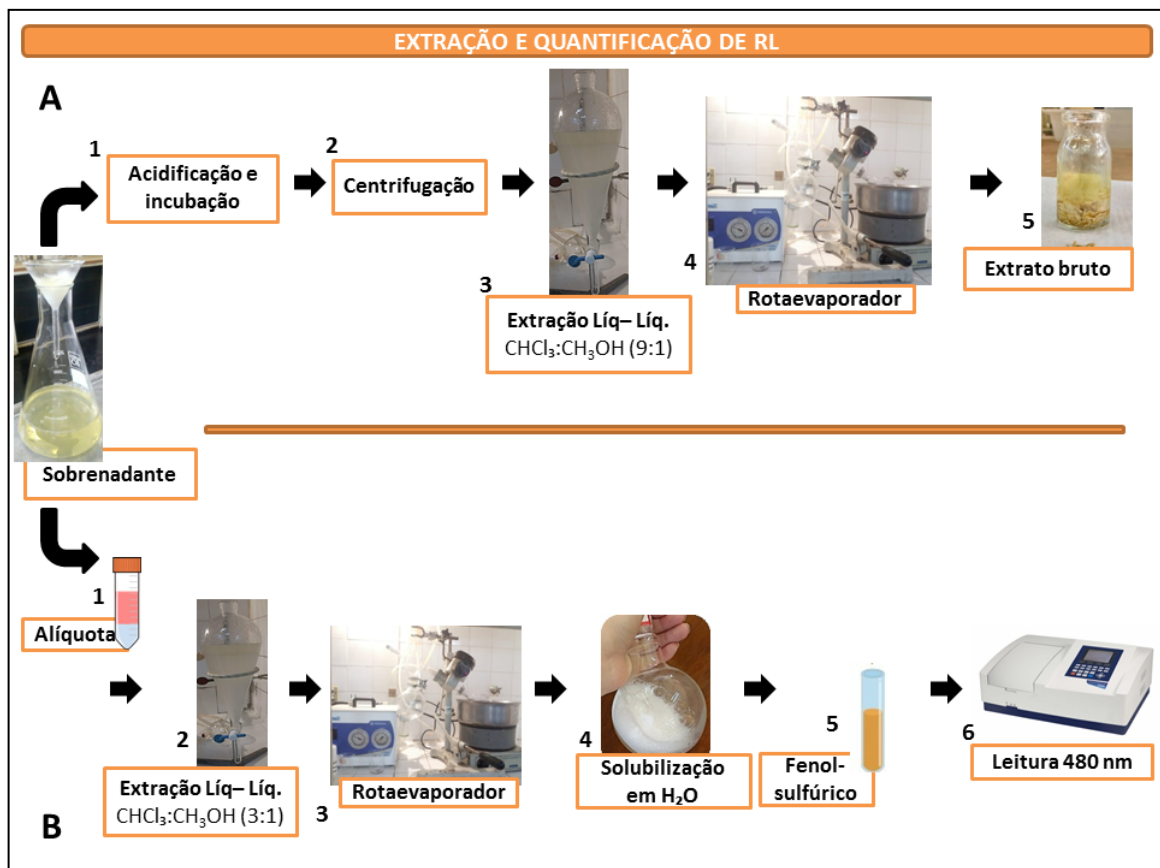
Para obtenção do extrato bruto concentrado de RL, o sobrenadante foi acidificado adicionando-se ácido clorídrico até atingir pH de 2 e, em seguida, armazenado em câmara fria por 5 dias (período de incubação). Após a incubação, realizou-se centrifugação durante 25 minutos, 4.500 rpm a 4°C . O sobrenadante foi descartado e RL retido no tubo foi submetido ao processo de extração com solventes. Os tubos foram lavados repetidamente para coletar todo o material. Em seguida, o material foi vertido em balão volumétrico e extraiu-se o RL com adição de

clorofórmio:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) em proporção de 9:1, seguindo para rotaevaporação. Finalizou-se o procedimento com lavagem do balão e recuperação do RL seco.

Para quantificação indireta de RL pelo método fenol-sulfúrico foi coletada alíquota do sobrenadante recuperado após a interrupção do cultivo submerso (item 4.1.5). A extração foi realizada pela adição de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:1), o material foi rotaevaporado, resultando no extrato orgânico. Este último foi solubilizado em água e a determinação dos açúcares redutores totais, que possibilita a quantificação indireta dos ramnolipídeos, foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando-se uma curva padrão de ramnose e leitura em espectrofotômetro a 480 nm (CAMILIOS-NETO, 2010).

A figura 5 traz em A as etapas para obtenção do extrato bruto de RL concentrado para realização dos processos de purificação. Em B, etapas para quantificação indireta de RL presente no cultivo submerso de *P. aeruginosa* PAO 1.

Figura 5. Modelo esquemático: (A) processo de extração de RL e (B) quantificação indireta de RL por método fenol-sulfúrico



Fonte: próprio autor

4.3 Desenvolvimento de processo de purificação de di-ramnolípídeo

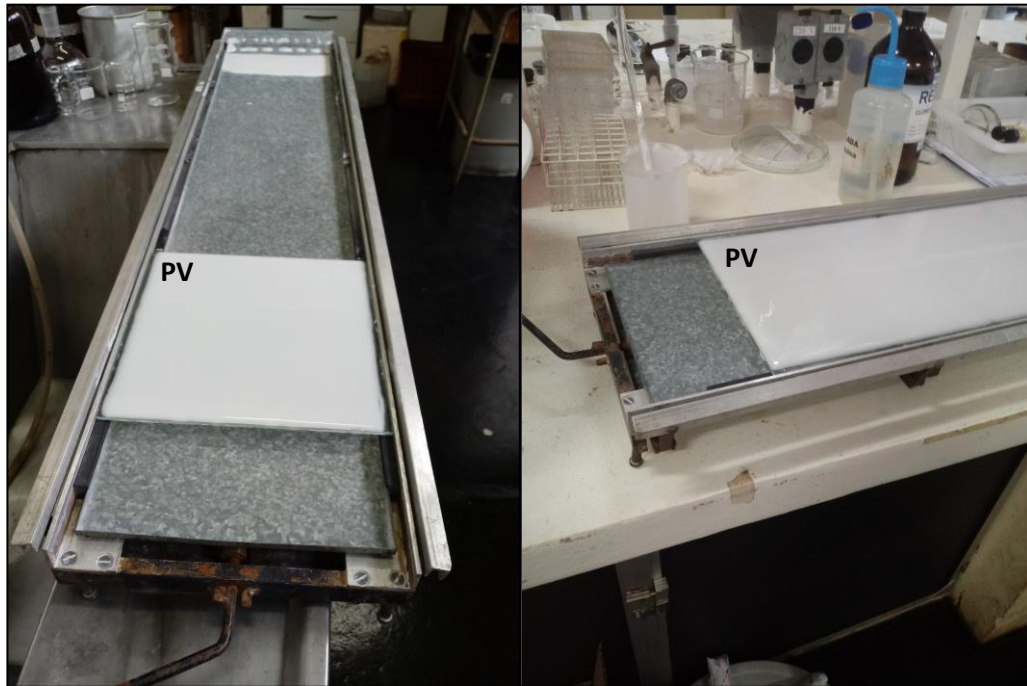
4.3.1 Separação dos congêneres por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAEP)

As análises foram realizadas por sistema cromatográfico Shimadzu composto por bomba LC-6AD, detector SPD110A, coluna C18 *Reystone scientific* (250 x 20 mm, 5 µm, 100 Å). Fase móvel ACN/H₂O (65/35) acidificada com 0,1% de ácido acético, vazão de 3,0 mL min⁻¹ e detecção em 254 nm. Para aquisição de dados *software* Class-CR10 (Shimadzu).

4.3.2 Separação dos congêneres por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Realizou-se a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em placas de vidro de 20 × 20 cm, revestidas com 1,0 mm de sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck®) como fase estacionária (8 g de sílica por placa) previamente ativadas em estufa a 100 °C (Figura 6). Em seguida, após o período de ativação, aplicou-se 200 mg do extrato bruto de RL dissolvido em CHCl₃:CH₃OH e fase móvel solução de CHCl₃:CH₃OH:HAc (450 mL, 50 mL e 16 mL). Posteriormente, as regiões de interesse foram marcadas, raspadas e transferidas para funis para extração das subfrações utilizando-se de 20 a 30 mL de metanol. As subfrações resultantes da separação por CCDP foram submetidas à CCD analítica para avaliar a eficiência da separação dos diferentes compostos.

Figura 6. Confeção de placas de vidro revestidas com sílica (PV) para CCDP



Fonte: próprio autor

4.3.3 Separação dos congêneres por Cromatografia *flash*

Como observado pela figura 7, para separação dos congêneres por cromatografia *flash* utilizou-se coluna de vidro de 14 mm de diâmetro, preenchida com 9 g de sílica gel (230-400 *mesh*, Merck®). Utilizou-se 100 mg de extrato bruto dissolvido em $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, como solventes de eluição (ou fase móvel) foram utilizados na seguinte ordem: 100 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2%; 100 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 20% e 30 mL de CH_3OH (metanol). Concomitantemente à passagem de solventes, foram coletadas frações de aproximadamente 10 mL, totalizando 22 subfrações ao final do experimento. Após coleta e evaporação do solvente eluído (fase móvel) as subfrações foram avaliadas por CCD analítica e reagrupadas quando semelhantes.

Figura 7. Cromatografia *flash*: (RL) extrato bruto dissolvido, (Si) sílica empacotada, (SE) solvente de eluição e (V) aplicação de vácuo



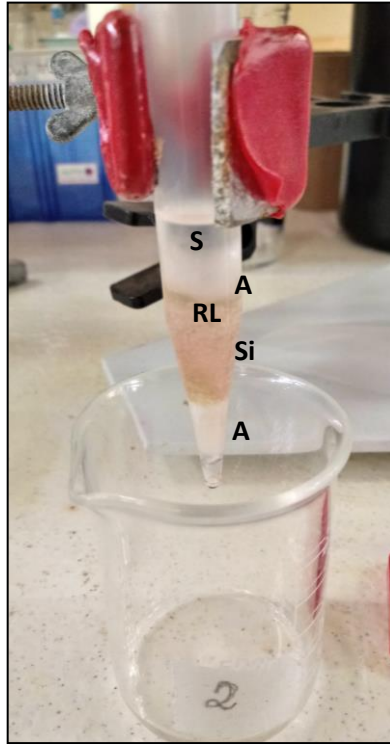
Fonte: próprio autor

4.3.4 Separação dos congêneres por Cartucho de sílica

Para purificação do RL por cartucho de fase normal, utilizou-se como coluna ponteira de 5 mL empacotada com 300 mg de sílica Gel 60 PF₂₅₄ (Merck®). O cartucho foi previamente ativado com 5,0 mL de CH₃OH. A amostra foi aplicada diretamente sobre a sílica (fase estacionária) e coberta por algodão (Figura 8). Como ilustrado pelo fluxograma (Figura 9) o processo de separação dos congêneres se dá pela eluição dos respectivos solventes uma única vez para determinada etapa. Utilizou-se como solventes de lavagem: CHCl₃ ou CH₂Cl₂ (etapa 1); CHCl₃:CH₃OH 2% ou CHCl₃:C₄H₈O₂ 5% (etapa 2); finalizando com solvente extrator CH₃OH:HAc 2% (etapa 3). As etapas 1 e 2 são responsáveis pela retida de compostos apolares e demais congêneres, sendo Rha₂C₁₀C₁₀ recuperado após passagem do solvente

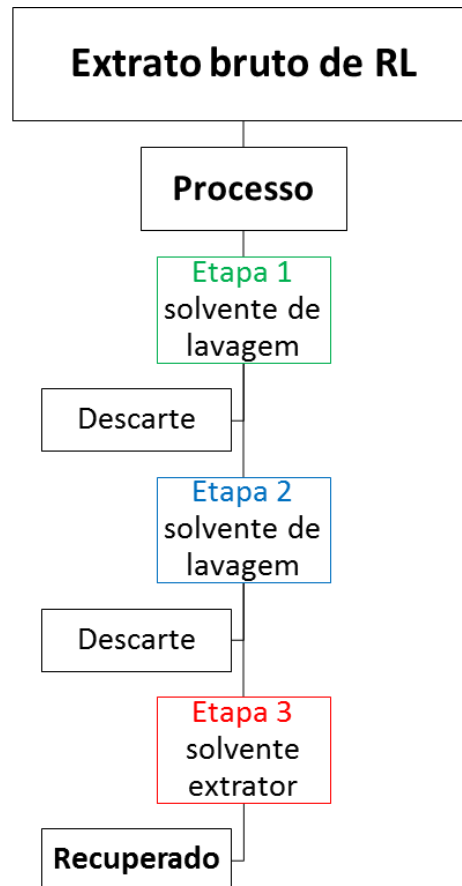
extrator. As frações coletadas após cada etapa do processo foram secadas e analisadas em CCD analítica.

Figura 8. Cartucho de sílica: (RL) extrato bruto de RL dissolvido, (S) solvente de lavagem ou extrator, (A) algodão e (Si) sílica empacotada



Fonte: próprio autor

Figura 9. Fluxograma para processo de purificação por Cartucho de sílica



Fonte: próprio autor

4.4 Identificação e caracterização de congênere único de Di-RL

4.4.1 Identificação por CCD analítica

Realizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) sobre sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, 20x20cm), sendo o eluente composto por uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético. A presença dos ramnolípídeos foi identificada com a utilização de revelador orcinol específico para carboidrato aquecido a 100 °C por 5 minutos.

4.4.2 Identificação e caracterização por ^1H RMN

O produto purificado foi submetido à análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em estado líquido. Os espectros de hidrogênio (^1H) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz operado à frequência de 400,6 MHz usando probe direto de 5 mm, BBO, a 25 °C. Os deslocamentos químicos (δ) para hidrogênio são expressos em ppm e calibrados de acordo com o sinal do TMS presente no CDCl_3 em 0 ppm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: quantificação e extração líquido-líquido

Para cultivo submerso optou-se pelo uso do meio de sais (MSM), um meio limpo, sem resíduos industriais. Sabe-se que processo com resíduos pode aumentar em muitas vezes o rendimento do cultivo, porém, no presente trabalho almeja-se a obtenção do biocomposto puro e a utilização de resíduos vegetais durante o cultivo poderia dificultar o processo de purificação.

O procedimento realizado para obtenção do extrato bruto concentrado (item 4.2.1) resultou em 7,5 g de RL (Tabela 4), e rendimento igual a 4,28 g de extrato bruto por litro de meio cultivado. A quantidade bruta recuperada foi inferior ao rendimento médio obtido pela quantificação (item 4.2.1), 9.7 g/L, em razão das perdas presentes no processo de extração. Mesmo assim, o rendimento de 4,28 g/L é significativo: dados da literatura mostram que a produção média para o biocomposto variam de 2 a 5 g/L. Em casos excepcionais, visando a otimização do cultivo, como demonstrado nos experimentos de Jadhav *et al.* (2018) foi obtido 10,8 g/L.

Tabela 4. Quantificação e obtenção do extrato bruto concentrado de RL produzidos por CSb de *P. aeruginosa* PAO1

Total de Erlenmeyer (250 mL) ^a	Volume total (L)	RL (g/L) ^b	Massa extrato bruto (g) ^c	Rendimento (g/L) ^d
14	1,75	9,7±0,7	7,5	4,28

^a Relação meio coluna de ar 1:2

^b Extração líquido-líquido: quantificação de RL por fenol-sulfúrico

^c Precipitação ácida seguida de extração líquido-líquido

^d Extração líquido-líquido: grama de extrato bruto obtido por litro de meio cultivado

Fonte: próprio autor

5.2 Avaliação dos processos de purificação desenvolvidos para obtenção de congênere único de Di-RL

5.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAEP)

Foram realizados seis corridas (ciclos) para identificação e coleta dos diferentes compostos presentes no extrato bruto de RL. A partir dos ciclos de CLAEP foram coletadas sete subfrações provenientes do extrato de RL (B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7), sendo recuperada cada subfração de acordo com intervalo de retenção em minutos, sendo t_0 início e t_1 final para a coleta (Tabela 5). Os cromatogramas obtidos são mostrados pela figura 10.

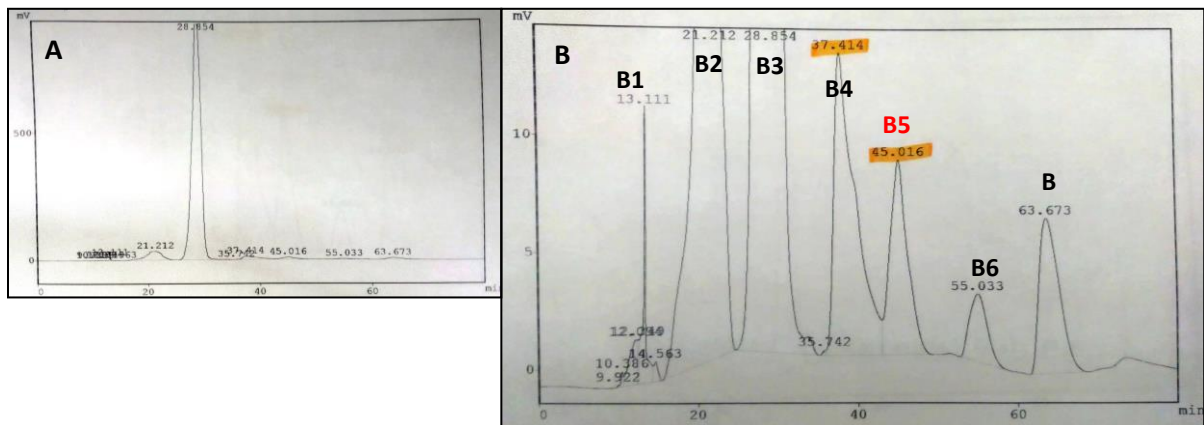
Foi observado sinal de maior intensidade para fração coletada no tempo médio de 28.8 min, fração B3, no entanto, não foi identificada a presença de RL, a CCD analítica revelada com orcinol não apontou nenhuma marcação para glicolípídeos (Figura 11). Infere-se que o sinal intenso não equivale à concentração de compostos ramnolipídicos e, provavelmente, compostos diversos apresentaram uma absorvância maior que os RL no comprimento de onda analisado (254 nm). As amostras B4 e B5 apresentaram concentração de Di-RL, porém, como observado pela CCD analítica (Figura 11), as manchas com arraste evidenciam a presença de diferentes congêneres além de possíveis contaminantes. Dessa forma, a partir dos resultados observados para as principais coletas B3, B4, B5 e B7 conclui-se que a CLAEP realizada não foi suficiente para recuperação de um único congênere de Di-RL. Apesar de a técnica apresentar credibilidade para identificação e caracterização, o experimento preparativo realizado nas condições determinadas (item 4.3.1) não possibilitou a obtenção de massa significativa do Di-RL de interesse.

Tabela 5. Tempo de retenção para coleta dos compostos a partir do extrato de RL

Ciclo	Intervalo de coleta (min)						
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
	$t_0 - t_1$	$t_0 - t_1$	$t_0 - t_1$	$t_0 - t_1$	$t_0 - t_1$	$t_0 - t_1$	$t_0 - t_1$
I	10.4-15.5	15.5-25.0	25.7-31.0	36.2-42.9	42.9-49.8	49.8-57.9	60.9-67.1
II	10.0 -15.5	15.5- 24.2	25.7-30.9	35.4-43.0	43.0-49.0	52.7-58.3	61.1-68.1
III	9.9 -15.6	15.6- 24.8	25.7-31.0	35.0-42.8	42.8-49.3	52.5-58.3	61.9-68.0
IV	9.8-15.6	15.5-24.9	25.8-31.2	35.5-43.2	43.2-50.1	53.3-59.5	61.9-69.1
V	9.9-15.7	15.7-24.9	25.9-31.2	35.5-43.2	43.2-49.8	53.2-59.4	62.0-68.5
VI	9.9-15.0	15.0-24.8	26.1-31.1	35.4-43.2	43.2-49.8	53.2-59.0	61.8-68.9

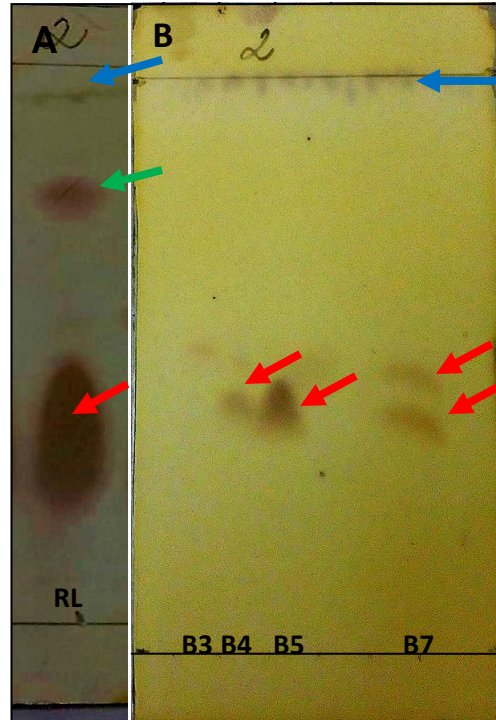
Fonte: próprio autor

Figura 10. Cromatograma do extrato bruto de RL. (A) pico com retenção em 28.8 min, coleta B3. (B) cromatogramas das coletas de B1 a B7



Fonte: próprio autor

Figura 11. CCD* analítica. (A) extrato bruto de RL: manchas para Di-RL (vermelho), mono-RL (verde) e contaminantes apolares (azul); (B) subfrações coletadas por CLAEP



*fase móvel composta por CHCl_3 :MeOH (10%):HAc (3%); revelador orcinol

Fonte: próprio autor

5.2.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

A CCDP identificou 6 regiões distintas que correspondem aos diferentes componentes do extrato de RL (Figura 12). Ao término da corrida cromatográfica as regiões delimitadas foram raspadas, dissolvidas em metanol e filtradas (Figura 13). Após filtração, secagem do solvente e pesagem das subfrações foi coletado para cada região: (1) 6,6 mg; (2) 8 mg; (3) 18,2 mg; (4) 52,3 mg; (5) 78,9 mg e (6) 9,2 mg. As subfrações foram analisadas por CCD analítica.

Infere-se que compostos da região 1 e 2 sejam constituídos, sobretudo, por constituintes apolares e mono-ramnolipídeos, pois sua característica apolar faz com que sejam carregados por mais tempo pela fase móvel já que não possuem forte afinidade com a fase estacionária polar (sílica). Para as regiões 3, 4 e 5 observou-se coloração rosa, sinalizando a presença de contaminantes (Figura 14B), pois RL não apresentam tal coloração, a pigmentação rósea está relacionada à presença de

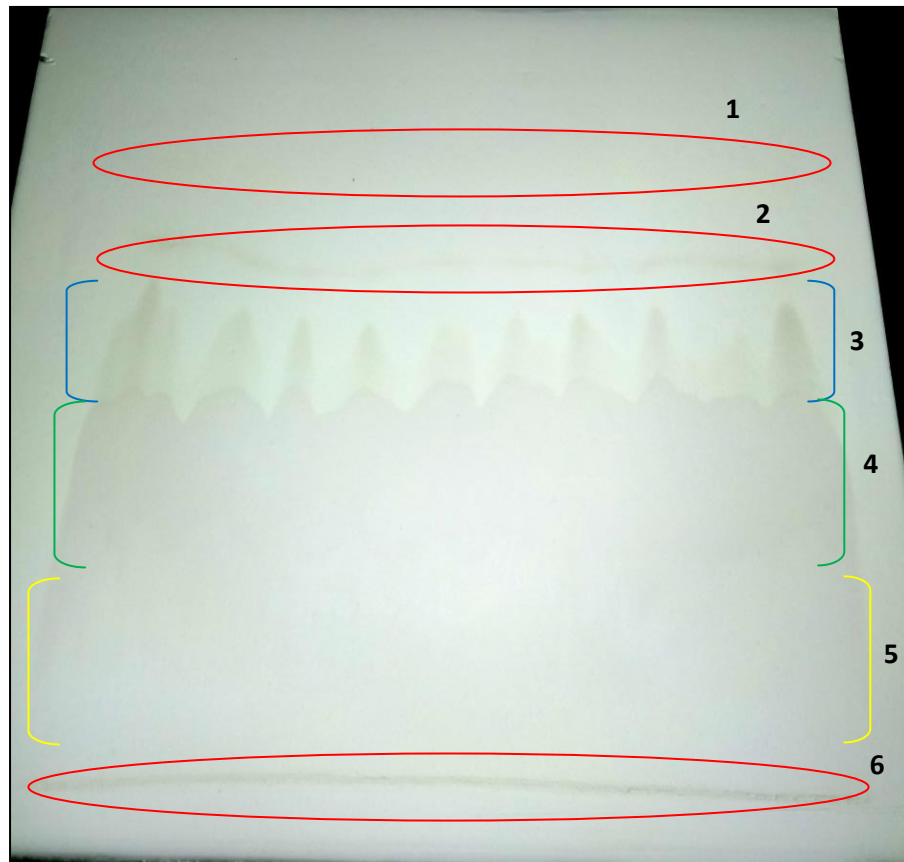
fenazinas. As frações provenientes das regiões 4 e 5 contêm Di-RL de interesse em maior concentração totalizando 131,2 mg, porém, este valor absoluto não equivale à biomolécula, pois mesmo após secagem havia água e solvente residuais além de partículas de sílica provenientes da raspagem da placa. Não foi possível eliminar o contaminante que causou coloração atípica nas frações, impossibilitando estimar com precisão Di-RL recuperado. A região 6 ou ponto de aplicação é composta por qualquer constituinte polar não carregado pela fase móvel.

Além de maior dificuldade para realização do procedimento a recuperação das frações a partir da CCDP é limitada, pois foi verificada a presença de contaminantes e de partículas residuais de sílica no produto final, resultando num método trabalhoso e pouco eficaz.

A figura 15 destaca a coerência entre as metodologias aplicadas para a identificação dos compostos a partir do extrato bruto de RL em que são observados: compostos apolares no superior da placa e mono-ramnolipídeos; manchas não delimitadas devido à mistura heterogênea de RL; e maior concentração de Di-RL na região inferior da placa.

A CCDP foi efetiva para observação e identificação dos diferentes compostos presentes no extrato bruto (regiões de 1 a 6), porém, mostrou-se onerosa e ineficaz para recuperação de um único congênere isolado, não possibilitando a eliminação de constituinte fenazina do composto de interesse. O fluxograma (Figura 16) resume os resultados obtidos: quantitativamente (valor absoluto recuperado) e qualitativamente (compostos identificados por CCD analítica).

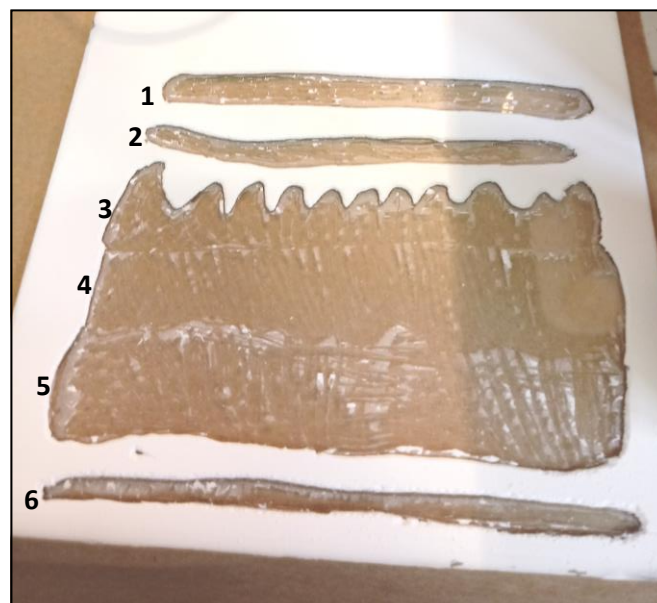
Figura 12. CCDP*. Placa de sílica identificada com regiões referentes aos compostos do extrato bruto de RL



*fase móvel: CHCl_3 :MeOH(10%):HAc (3%); ausência de revelador

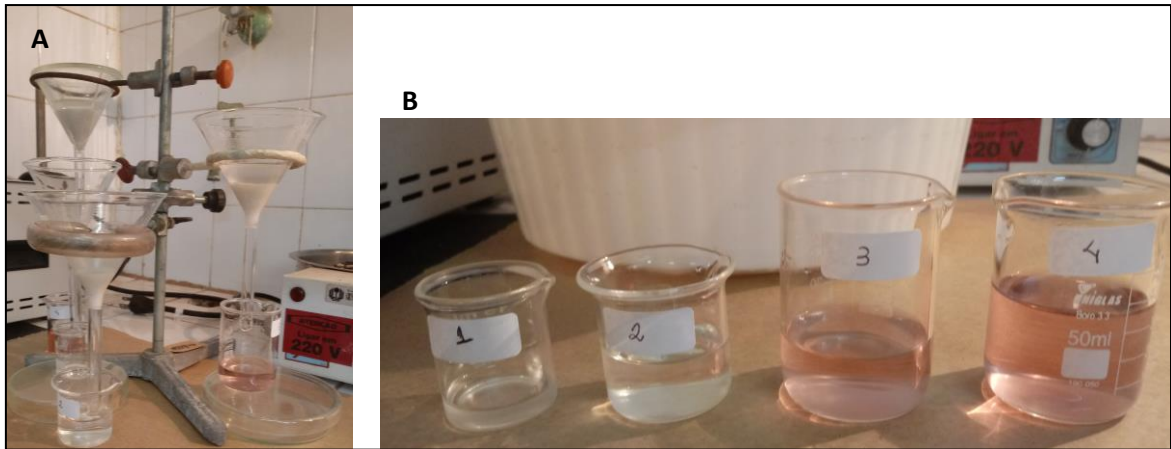
Fonte: próprio autor

Figura 13. CCDP. Placa de sílica após raspagem das regiões demarcadas



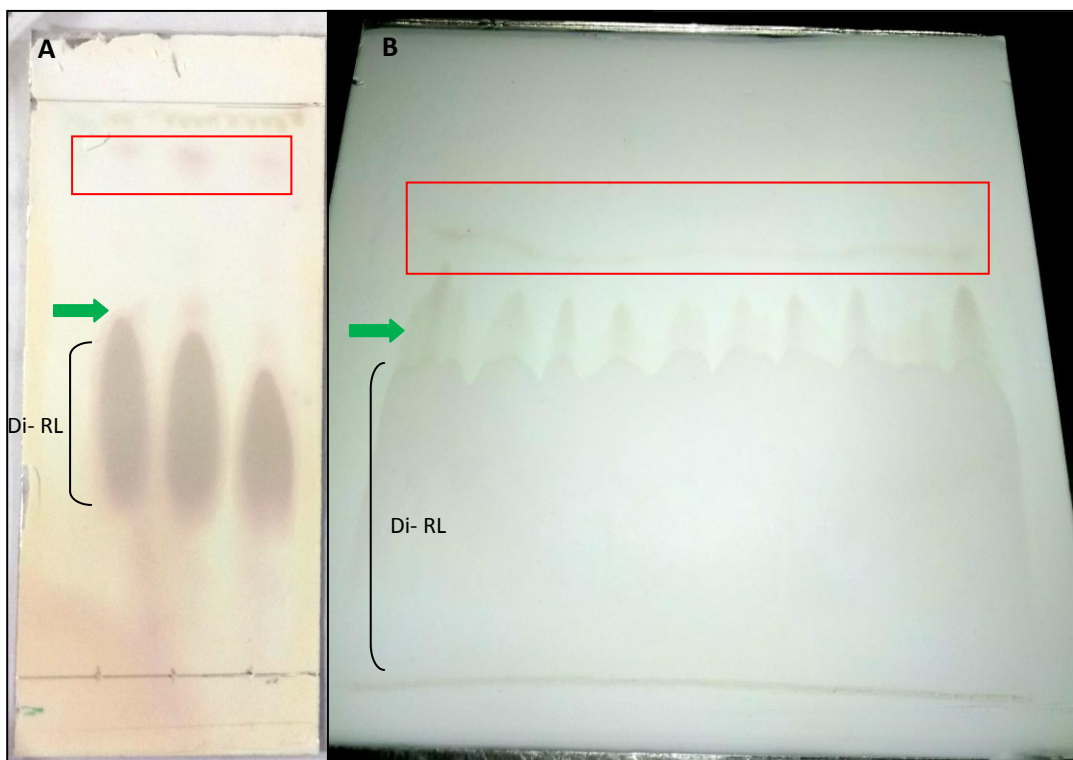
Fonte: próprio autor

Figura 14. (A) filtração com metanol e (B) compostos coletados após filtração



Fonte: próprio autor

Figura 15. (A) CCD analítica* e (B) preparativa**: constituintes apolares (vermelho); compostos polares (verde) e região com predomínio de Di-RL

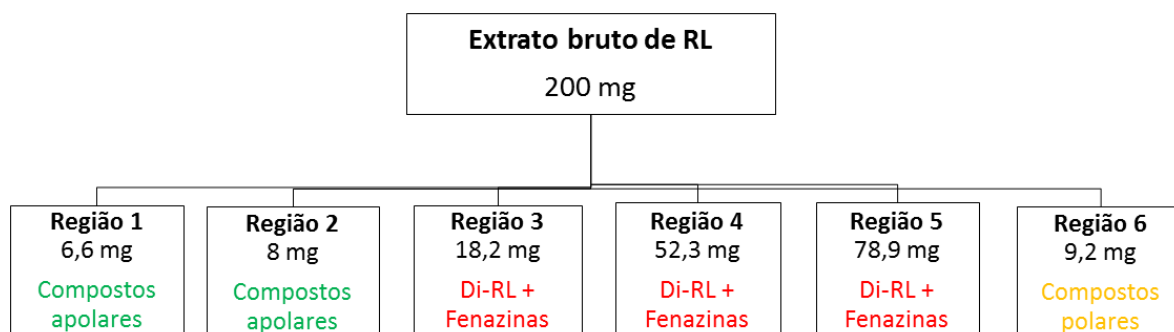


*fase móvel: CHCl_3 :MeOH (10%):HAc (3%); revelador orcinol

**fase móvel: CHCl_3 :MeOH (10%):HAc (3%); ausência de revelador

Fonte: próprio autor

Figura 16. CCDP. Fluxograma com valor absoluto (mg) e identificação de compostos recuperados a partir do extrato bruto de RL



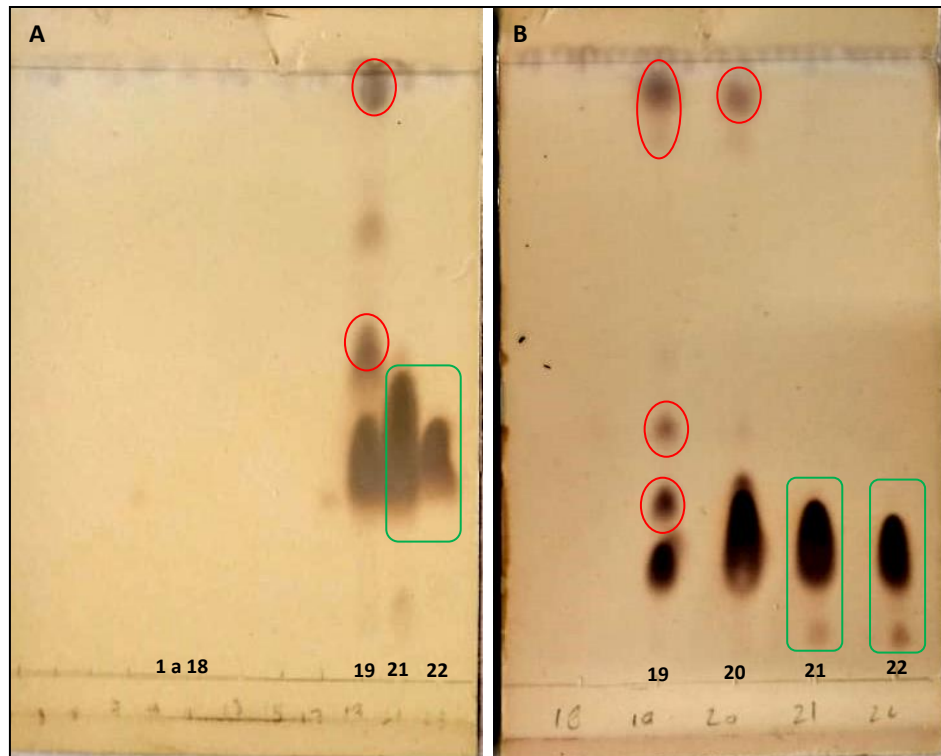
Fonte: próprio autor

5.2.3 Cromatografia *flash*

A partir da CCD analítica das frações coletadas destaca-se a ausência de RL nas frações de 1 a 18 (Figura 17 A) e presença de diferentes congêneres de RL nas frações 19, 20, 21 e 22 (Figura 17). As frações 19 e 20 apresentaram manchas por toda extensão da placa cromatográfica devido à presença de constituintes de diversas polaridades desde RL de característica mais apolar como mono-ramnolípídeos quanto homólogos de Di-RL (polares). As frações 21 e 22 foram consideradas de maior pureza para $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$, mesmo com presença de manchas que sinalizam outros congêneres di-ramnolípídicos. O fluxograma (Figura 18) esquematiza o resultado obtido para cada fração coletada após identificação por CCD analítica.

O conteúdo de 69 mg recuperado por cromatografia *flash* (frações 21 e 22) foi significativo, por isso, optou-se pela realização de nova purificação por cartucho de sílica (item 4.3.4). A figura 19 esquematiza os resultados obtidos para o processo de purificação por cartucho de sílica realizado a partir das frações 21 e 22: foram recuperados 63 mg de um único congênere de Di-RL, $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$. A purificação por cartucho de sílica foi eficaz para eliminação dos constituintes não eliminados na cromatografia *flash*.

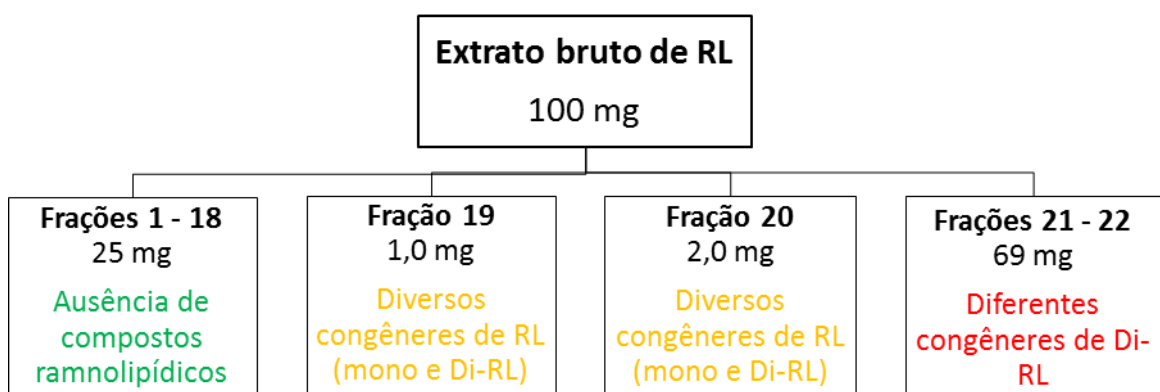
Figura 17. CCD analítica*. Subfrações a partir de purificação por cromatografia *flash*: (A) 1 a 18: ausência de glicolípídeos; 19, mono e Di-RL (vermelho); 21 e 22, maior concentração de Di-RL (verde). (B) Subfrações 19, 21 e 22



*fase móvel: CHCl_3 :MeOH (20%):HAc (3%); revelador orcinol

Fonte: próprio autor

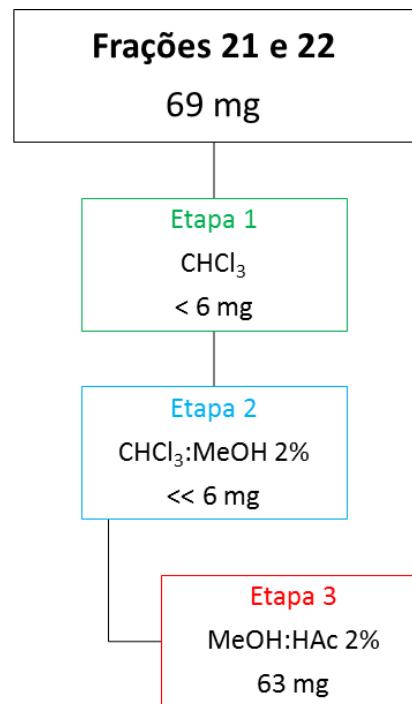
Figura 18. Resultados purificação por cromatografia flash*. Valor absoluto (mg) das frações recuperadas a partir do extrato bruto de RL e identificadas por CCD



*Eluentes utilizados na coluna *flash*: CHCl_3 :MeOH 2% (frações 1 a 10); CHCl_3 :MeOH 20% (frações 11 a 20); e MeOH (frações 21 e 22)

Fonte: próprio autor

Figura 19. Fluxograma purificação por cartucho de sílica das frações 21 e 22



Fonte: próprio autor

5.2.4 Cartucho de Sílica

Foram realizados três processos de purificação utilizando mesmo cartucho de sílica, cada processo consiste em três etapas em que são modificados os solventes de lavagem, visando recuperação do congênera $Rha_2C_{10}C_{10}$ de forma isolada. Conforme o fluxograma (Figura 20), no primeiro processo (A), iniciou-se com 150 mg de extrato bruto e foram eluídos, respectivamente: (etapa 1) 17 mL $CHCl_3$; (etapa 2) 8 mL $CHCl_3:MeOH$ 2% e (etapa 3) 3 mL $MeOH:HAc$ 2%. Para o segundo processo (B) também foram aplicados 150 mg de RL, eluindo com: (etapa 1) 8 mL $CHCl_3$; (etapa 2) 4,5 mL de $CHCl_3:C_4H_8O_2$ 5%, neste processo, utilizou-se para a segunda etapa acetato de etila como solvente de lavagem, este apresenta polaridade intermediária afim de melhorar a separação de mono e di-ramnolípido; (etapa 3) 10 mL de $MeOH:HAc$ 2%, maior volume de metanol acidificado resulta em maior extração de compostos polares para garantir a recuperação de todo composto de interesse. No processo B, análises a partir de CCD analítica, mostraram a presença de diferentes homólogos de RL no composto final recuperado, por isso, foi aplicado novamente solvente de lavagem, $CHCl_3$ e extrator, $MeOH:HAc$ 2% para melhor

purificação do composto de interesse. Essa condição não foi observada para o processo A, por isso, infere-se que a escolha por acetato de etila como solvente de lavagem na etapa 2 não foi eficaz.

Para o processo de purificação (C), foram empregados 130 mg de extrato bruto, eluição de: (etapa 1) 8 mL CH_2Cl_2 ; (etapa 2) 4,5 mL CHCl_3 :MeOH 2%, substituindo o $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ utilizado no processo B; e (etapa 3) 10 mL de MeOH:HAc 2%. Decidiu-se pelo diclorometano na etapa inicial, pois experimentos evidenciaram maior eficiência deste solvente para a retirada de constituintes apolares como fenazinas.

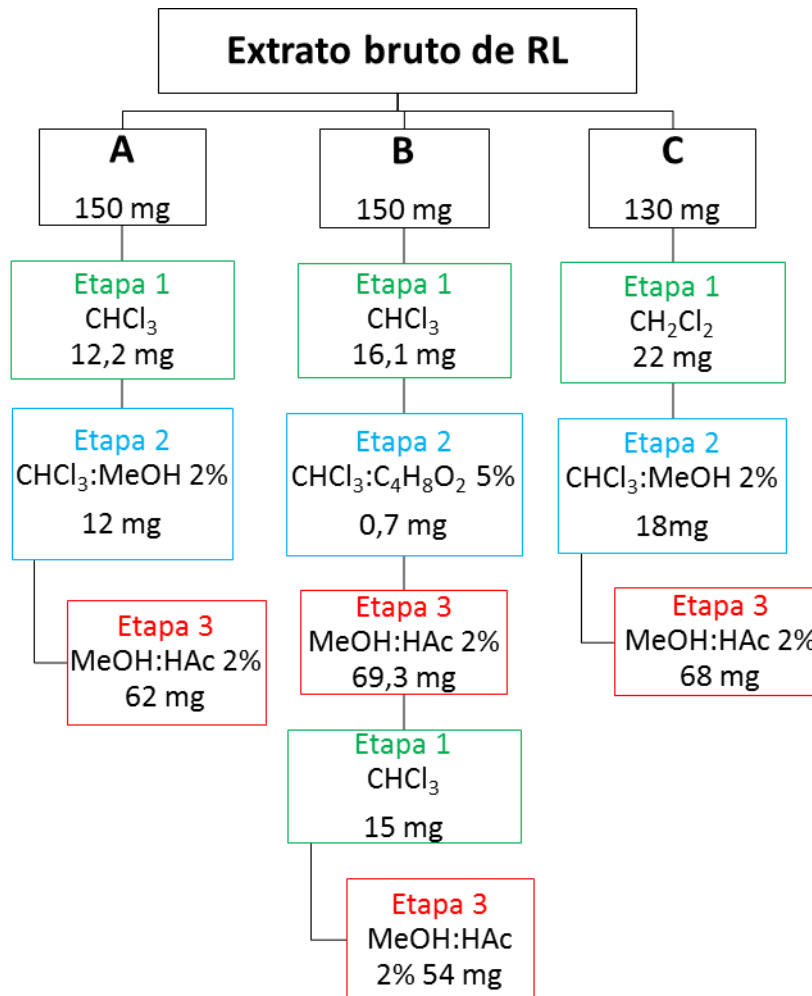
Ressalta-se que o extrato bruto como mistura heterogênea contém compostos apolares como fenazinas, mono-ramnolipídeos e diferentes congêneres de Di-RL. Quanto ao rendimento e viabilidade do procedimento realizado, em A, recuperou-se 62 mg do congêneres $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ a partir de 150 mg de extrato bruto, resultando num rendimento de 41,3%. No processo B foram recuperados 54 mg, apresentando menor rendimento (36%), pois o solvente extrator CHCl_3 : $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 5% não foi eficiente para a etapa 2. Já o processo C, partindo de 130 mg de extrato bruto, teve como resultado final uma purificação de 68 mg com maior rendimento, 52,3%.

Infere-se que maior potencialidade e eficácia observada no processo C ocorre pela escolha de solvente de lavagem diclorometano (maior eficácia para retirada de contaminantes apolares) e pela aplicação de maior volume de solvente extrator na última etapa. A vantagem da purificação por cartucho de fase normal (sílica) está na simples execução e custo-benefício do processo (não oneroso, economia de solventes) e, sobretudo, no alto rendimento para obtenção de um único congêneres de Di-RL.

O fluxograma (Figura 20) esquematiza cada processo realizado A, B, C, apontando os solventes utilizados e a quantia recuperada de um único congêneres de Di-RL, $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$. Ao final dos procedimentos foram obtidos um total de 247 mg de $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$. A eficiência do método de purificação por cartucho é evidenciada pela CCD analítica (Figura 21 A): ausência de mono-RL e contaminantes apolares; identificado congêneres único, $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$. Ao lado (Figura 21 B) destaca-se a CCD analítica para o extrato bruto, contendo os compostos eliminados pelo processo de purificação. Além da verificação por CCD analítica as frações recuperadas foram analisadas em CLAE analítica separadamente, confirmando equivalência da biomolécula recuperado nos processos A, B, C e D, resultando num total de 247 mg

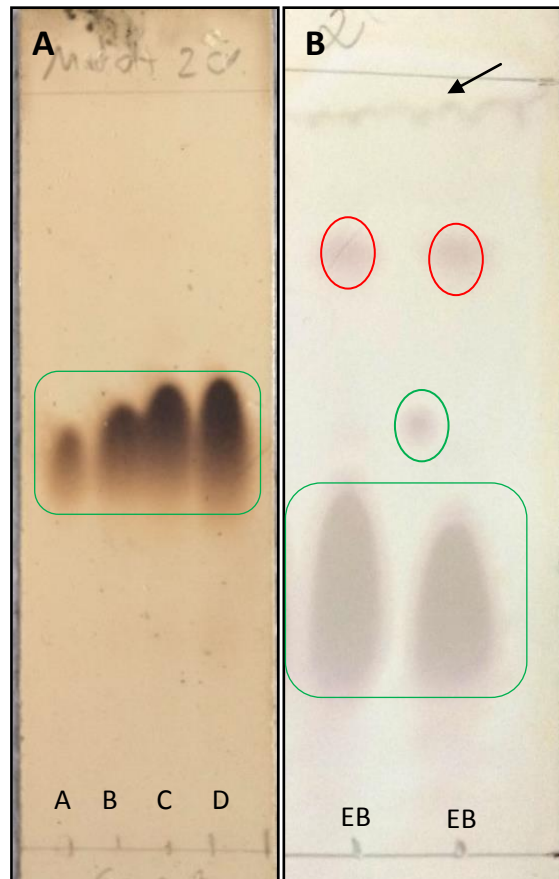
de Rha₂C₁₀C₁₀ purificado, quantidade significativa para a realização de testes *in vivo*, comercialização e desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

Figura 20. Fluxograma para processos de purificação por cartucho de sílica (A, B e C): etapas 1 e 2 solventes de lavagem e valor absoluto (mg) de compostos eliminados; etapa 3 solvente de extração e valor absoluto (mg) para Di-RL recuperado



Fonte: próprio autor

Figura 21. CCD* analítica. (A) Frações recuperadas processos A, B e C e D: congêneres de interesse (verde). (B) Amostras extrato bruto de RL (EB): mono-RL (vermelho), Di-RL (verde) e compostos apolares (seta)



*fase móvel: CHCl_3 :MeOH (20%):HAc (3%); revelador: orcinol

Fonte: próprio autor

A tabela 6 conclui a partir de variáveis comparativas os resultados obtidos para cada técnica empregada na purificação de um único congêneres de Di-RL. As variáveis quantitativas referem-se, respectivamente: (1) a quantidade total de solvente utilizado, (2) extrato bruto aplicado, (3) fração de interesse purificada (Di-RL isolado) e (4) rendimento (massa inicial/final). Para a variável qualitativa (5) eficiência da purificação considerou-se as análises de CCD analítica realizadas após cada procedimento. Assim, para eficiência da purificação tem-se: baixa quando observado presença de contaminantes na fração final de interesse (CCD analítica figura 11 A e presença de fenazinas figura 14 B); média indica uma boa separação de Di-RL, porém ainda com presença de diferentes congêneres (considerar CCD analítica figura 17 B); e alta eficiência para metodologia que resulta em um único

congêneres de Di-RL recuperado (Figura 21 A). Para (6) dificuldade técnica, considerou-se tempo de preparo, materiais e condições necessários para a realização da técnica. Verifica-se maior eficácia e viabilidade para obtenção de massa significativa (mg) de congêneres $Rha_2C_{10}C_{10}$ a partir da purificação com cartucho de sílica, processo C.

O processo de purificação por cartucho de sílica (C) é passível de escalabilidade, podendo estimar uma produção piloto visando maior recuperação da biomolécula de interesse. A partir dos valores dos materiais consumíveis para a realização do processo C (Tabela 7) foi estimado um custo de R\$ 1,14 para 68 mg de $Rha_2C_{10}C_{10}$. Assim, é possível estimar um custo de produção igual a R\$ 16,82/g de $Rha_2C_{10}C_{10}$ recuperado.

Tabela 6. Análise comparativa das técnicas realizadas para purificação de um único congêneres de Di-RL

Técnica preparativa	Variáveis comparativas					
	Solvente aplicado (mL)	Extrato bruto (mg)	Congêneres Di-RL recuperado (mg)	Rendimento (%)	Eficiência da purificação	Dificuldade técnica
CLAEP	3000	68	Não significativo	Não significativo	----	Alta
CCDP	700	200	131.2	65.6	Baixa	Alta
Cromatografia flash	230	100	69.0	69	Média	Alta
Cartucho de Sílica	30	130	68	52.3	Alta	Baixa

Fonte: próprio autor

Tabela 7. Custo estimado para execução da purificação por cartucho de sílica, processo C

Materiais Consumíveis		Custo (R\$)	
Solventes	R\$/litro ou kg	Processo C	
Clorofórmio	79,80	0,35	
Metanol	25,95	0,25	
Diclorometano	49,95	0,4	
Ácido acético	19,46	0,004	
Total	---	1,004	
Sólidos			
Sílica gel 60	464,69	0,14	
Custo total	---	1,14	

Fonte: próprio autor

5.3 Identificação de congêneres de Di-RL por RMN de hidrogênio em amostra recuperada por cartucho de sílica

Na tabela 8 são mostrados sinais dos referentes prótons de hidrogênio identificado na fração submetida ao método cartucho de sílica (item 5.2.4). A partir do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) foram identificados: dois sinais característicos para Di-RL, sendo estes representados pelos prótons anoméricos de ramnose (4,89 e 4,91 ppm para $\text{C}^{1'}$ e $\text{C}^{1''}$, respectivamente); hidrogênios de ramnoses distribuídos na região entre 3 ppm e 3.8 ppm; e hidrogênios do grupo metil (CH_3), também para a ramnose, com ressonância em 1,1 ppm. Em relação a cadeia alifática, sinais do éster graxo são visíveis em 3,89 ppm. Metilenos (CH_2) apresentam ressonância em 1,26 ppm variando apenas aqueles vizinhos a carbonilas e ao éster com 2,38 e 2,5 ppm, respectivamente. Além disso, foi identificado sinal 5,1 ppm que é marcador para $\text{H}^{1'-\text{O}-\text{H}^{1'}}$ e sinais próprios de cadeias alifáticas de ramnolipídeos como grupos metil terminais em 0,87 ppm integrados com seis hidrogênios. A integração dos sinais identificados (Anexo A) torna-se ferramenta utilizada na caracterização do tamanho da cadeia alifática graxa (MOUSSA; MOHAMED; SAMAK, 2014).

A soma dos hidrogênios integrados a partir do espectro de ^1H RMN corresponde a 44,03 átomos, que corresponde à soma teórica para cadeias constituídas por 20 carbonos totais. Dentre os congêneres possíveis congêneres de Di-RL correspondem a esse valor o $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ e $\text{Rha}_2\text{C}_8\text{C}_{12}$ (ambos com soma

teórica para 44 hidrogênios). Infere-se, para a amostra final obtida a presença isolada do congêneres Rha₂C₁₀C₁₀ (Figura 20), primeiramente, devido ao cultivo otimizado para sua produção, e também, pela atividade metabólica da enzima ramnosil transferase responsável pela reação de adição da segunda ramnose à estrutura do mono-RL, formando assim, o Di-RL. Estudos evidenciam que essa enzima apresenta afinidade pela cadeia do ácido hidroxidecanóico, portanto, a reação enzimática por si só beneficiaria a biossíntese de Rha₂C₁₀C₁₀. Mesmo na literatura são ausentes cultivos com concentração de Rha₂C₈C₁₂ (DEZIEL *et al.*, 2003; ZHU; ROCK, 2008).

Tabela 8. Dados de 1H RMN do composto purificado de Rha₂C₁₀C₁₀

H, TIPO	SINAL (ppm)	INTEGRAÇÃO	POSSÍVEIS CONGÊNERES (integração teórica)			
			C ₈ C ₈	C ₈ C ₁₀	C ₈ C ₁₂	C ₁₀ C ₁₀
CH ₃ ALIFÁTICO	0,87	6,0	6	6	6	6
CH ₃ RAMNOSE	1,1	6,1	6	6	6	6
CH ₂ ALIFÁTICO	1,26	19,8	16	18	20	20
CH ₂ (C=O/ CH-O-)	2,38 – 2.50	8,9	9	9	9	9
C1'	4,89	1,0	1	1	1	1
C1''	4,91	1,1	1	1	1	1
CH ₁ (H1-O-H1')	5,1	1,1	1	1	1	1
INTEGRAÇÃO		44,03	40	42	44	44

Fonte: próprio autor

5.4 Avaliação de pureza por RMN de hidrogênio: composição do extrato bruto e da fração purificada

A comparação entre composição do extrato bruto e do composto final após purificação é apresentada pela tabela 9. Observa-se que o extrato bruto é composto majoritariamente por compostos di-ramnolipídicos, 95%, e mono-RL apenas 5%, comparando com cultivos fermentativos tradicionais que resultam num proporção de, aproximadamente, 72% de Di-RL para 28% de mono-RL (JADHAV *et al.*, 2018) destaca-se o resultado bem sucedido para produção direcionada de Di-RL.

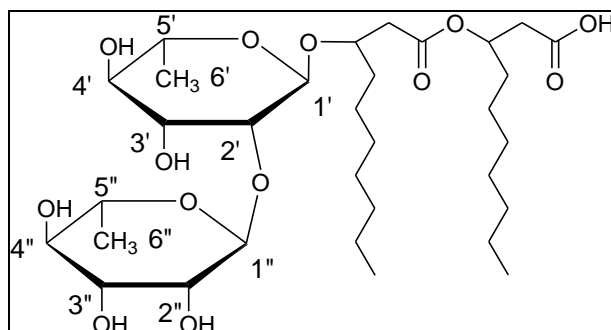
O produto final (purificado) é constituído em sua totalidade por um único congêneres de Di-RL Rha₂C₁₀C₁₀ (100%). Quanto ao grau de pureza, a proximidade observada entre as duas amostras (80 e 82%, respectivamente) ocorre, pois a produção direcionada para compostos di-ramnolipídicos resulta em um extrato bruto rico em Di-RL e, conseqüentemente, a retirada de mono-RL e contaminantes apolares pelo processo de purificação, aumenta, proporcionalmente, a porcentagem de impurezas não-ramnolipídicas (Anexos B e C). No entanto, a purificação atendeu a demanda para recuperação de um único congêneres de interesse. Assim, a partir de técnica simples e não onerosa foi recuperada fração com 99-100% de único congêneres Rha₂C₁₀C₁₀. Há, ainda, a presença de contaminantes não-ramnolipídicos, provavelmente carregados pela própria molécula de interesse e que não são retidos pela sílica. Uma possível abordagem para resolver essa questão seria a realização de purificação com cartucho C18. Sabe-se que a comercialização deste biocomposto é feita com purezas entre 88% a 95%, sendo promissor o resultado obtido no presente trabalho.

Tabela 9. Composição das amostras analisadas em ¹H RMN

Amostra	Porcentagem de Di-RL	Pureza
Extrato bruto	95,0 %	80,4 %
Fração purificada	99,0 - 100 %	82,0 %

Fonte: próprio autor

Figura 22. Estrutura química do di-ramnolipídeo Rha₂C₁₀C₁₀



Fonte: próprio autor

6 CONCLUSÕES

- As metodologias aplicadas para produção direcionada e extração líquido-líquido de Di-RL por cultivo submerso de *P. aeruginosa* foram bem sucedidas com alta produção de extrato bruto enriquecido de Di-RL;
- Para desenvolvimento de processo de purificação para obtenção de único congênere Rha₂C₁₀C₁₀, as metodologias preparativas CLAEP e CCDP mostraram-se pouco eficazes para o objetivo proposto, pois foi observada presença de impurezas no produto final recuperado. A metodologia de purificação por cromatografia *flash* apresentou menor viabilidade devido à maior demanda de solvente e necessidade de repetição de processo de purificação por cartucho de sílica;
- A purificação por cartucho de sílica mostrou-se simples e eficaz para a obtenção de um único congênere de Di-RL Rha₂C₁₀C₁₀ com grau de pureza de 82%. O método de separação via cartucho mostrou-se limitado para a retirada de contaminantes não-ramnolipídicos, porém, é uma alternativa de purificação com menor demanda de solvente, menor complexidade para realização e custo reduzido. O processo em questão é promissor pela qualidade do produto recuperado e possibilidade de aplicação em maior escala, viabilizando a comercialização e uso da biomolécula purificada para desenvolvimento de produtos farmacológicos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M. M.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. **Microbiology Monographs**, v. 20, p. 13-55, 2011.
- ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, n. 2, p. 386–395, 2010.
- BAFGHI, K.; FAZAEIPOOR, M. H. Application of Rhamnolipid in the Formulation of a Detergent Mansureh. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 15, p. 679-684, 2012.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; EBRAHIMPOUR, G.; NAJMI, Z. In Situ Downstream Strategies for Cost-Effective Bio/Surfactant Recovery. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, p. 523-532, 2018.
- BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; ELSHIKH, M. Biosurfactants: promising bioactive molecules for oral-related health applications. **FEMS Microbiology Letter**, v.363, n.18, 2016.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p.1–8,2004.
- BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; DA SILVA, S. S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.
- CAMILIOS-NETO, D.; BUGAY, C.; SANTANA-FILHO, A. P.; JOSLIN, T.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1395-1403, 2011.
- CAMILIOS-NETO, D.; MEIRA, J.A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P.P.; BUGAY, C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 748-755, 2009.
- CAMILIOS-NETO, D. **Produção de Rhamnolipídeos por Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Tese (Doutorado Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CASSIA DIAS, S.; OLIVEIRA FELIPE, L. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

CHRISTOVA, N.; TULEVA, B.; KRILL A.; GEORGIEVA, M.; KONSTANTINOV, S.; TERZIVSKI, I.; NIKOLOVA, B. STOINEVA, I. Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 170, n.3, p. 676–689, 2013.

CHONG, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. **Microb Cell Fact**, v. 16, n. 137, p.1-12, 2017.

DAS, P.; YANG, X. P.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2014.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e Biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Quím. nova esc.** v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

DHANARAJAN, G.; RANGARAJAN, V.; SRIDHAR, P. R.; SEN, R. Development and Scale-up of an efficient and green process for HPLC purification of antimicrobial homologues of commercially important microbial lipopeptides. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 4, p. 6638–6646, 2016.

DÍAZ DE RIENZO, M. A.; BANAT, I. M.; DOLMAN, B.; WINTERBURN, J.; MARTIN, P. Sophorolipid biosurfactants: possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnol**, v. 32, n. 6, p. 720–726, 2015.

DÍAZ DE RIENZO, M. A.; MARTIN, P. J. Effect of Mono and Di-rhamnolipids on Biofilms. **Curr Microbiol**, v. 73, p.183–189, 2016.

DIAZ DE RIENZO, M. A.; STEVENSON, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Antibacterial properties of Biosurfactants against selected gram positive and negative bacteria. **FEMS Microbiol Lett**, v. 363, n. 2, p. 1-8, 2015.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. *rhIA* is required for production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalnoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K ; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUSANE, DH. et al. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. **Aquatic Biosystems**, v.8, n.17m p. 1–7, 2012.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHOFER, F.;

BRENNER-WEISS, G.; FRANZREB, M.; BERENSMEIE, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 1579–1590, 2008.

HOLLOWAY, B. W. Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 572–581, 1955.

JADHAV, J.; DUTTA, S.; KALE, S.; PRATAP, A. P. Fermentative production of Rhamnolipid and purification by adsorption chromatography. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 234-241, 2018.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**. v. 317, p. 232–241, 2017.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas.** (2007). Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LIU, Y.; ZENG, G.; ZHONG, H.; WANG, Z.; LIU, Z.; CHENG, M.; LIU, G.; YANG, X.; LIU, S. Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability enhancement or reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, p. 394-401, 2016.

LU, W.; ZHU, L.; YANG, X.; XUE, C.; CHEN, Y.; QU, L. Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 208–213, 2012.

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.

MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and Characterization of Di-Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 04, p. 867-880, 2014.

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R.; J. Rhamnolipids-next generation surfactants? **Biotechnol**, v. 162, p. 366, 2012.

MÜLLER, M. M.; HÖRMANN, B.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Biotechnological products and process engineering**, v. 87, p. 167-174, 2010.

MÜLLER, M. M.; HÖRMANN, B.; KUGEL, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 585 – 592, 2011.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresour. Technol**, v. 97, p. 336– 341, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

RIKALOVIC, M. G; GOJGIC-CVIJOVIC, G.; VRVIC, M. M; KARADZIC, I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, p. 27-42, 2012.

RIKALOVIĆ, M. G.; VRVIĆ, M. M.; KARADŽIĆ, I. M. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*- from discovery to application in contemporary technology. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 80, n.3, p. 279–304, 2014.

ROBERT, M.; MERCADE, M.E.; BOSCH, 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**, v. 11, n. 12, p. 871–874, 1989.

RODRIGUES, A. I.; GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12907 , p.1-9, 2017.

SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning; a laboratory manual. 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, v. 3, 1989.

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. **J. Basic Microbiol**, v. 52, p.458–466, 2012.

SHEN, C.; JIANG, L.; SHAO, H.; YOU, C.; ZHANG, G.; DING, S.; BIAN, T.; HAN, C.; MENG, Q. Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 37553, p. 1 – 10, 2016.

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

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.

409, p. 959-964, 2000.

TAWFEEEQ, H. M.; YESSER, S. B. Study of inhibitory activity for rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* against some types of pathogenic bacteria in vivo. **AL-Qadisiyah Journal of pure Science**, v.23, n. 1, p. 34- 47, 2018.

THANOMSUB, B.; PUMEECHOCHCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKOR, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2457-2461, 2006.

TORTORA, G. J.; BERDELLI, R. F.; CHRISTINE L. C. **Microbiologia**. 8^a ed., Porto Alegre: Editora Artmed, p. 312, 2005.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389–397, 2017.

VARJANI, S.J., RANA, D.P., BATEJA, S., UPASANI, V.N. Isolation and screening for hydrocarbon utilizing bacteria (HUB) from petroleum samples. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 2, n. 4, p. 48–60, 2013.

VARJANI, S.J., UPASANI, V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant. **Bioresour. Technol**, v. 221, p. 510–516, 2016.

VARVARESOU, A.; IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, p. 214- 223, 2015.

WADEKAR S, D.; KALE, S. B.; LALI, A. M.; BHOWMICK, D. N; PRATAP, A. P. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, p. 249-266, 2012.

WINTERBURN, J. B.; MARTIN, P. J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 2, p. 187-195, 2012.

WITTEGENS, A.; KOVACIC, F.; MÜLLER, M. M.; GERLITZKI, M.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; HOFMANN, D.; TISO, T.; BLANK, L. M.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R.; SYLDATK, C.; WILHELM, S.; ROSENAU, F. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, p. 2865-2878, 2017.

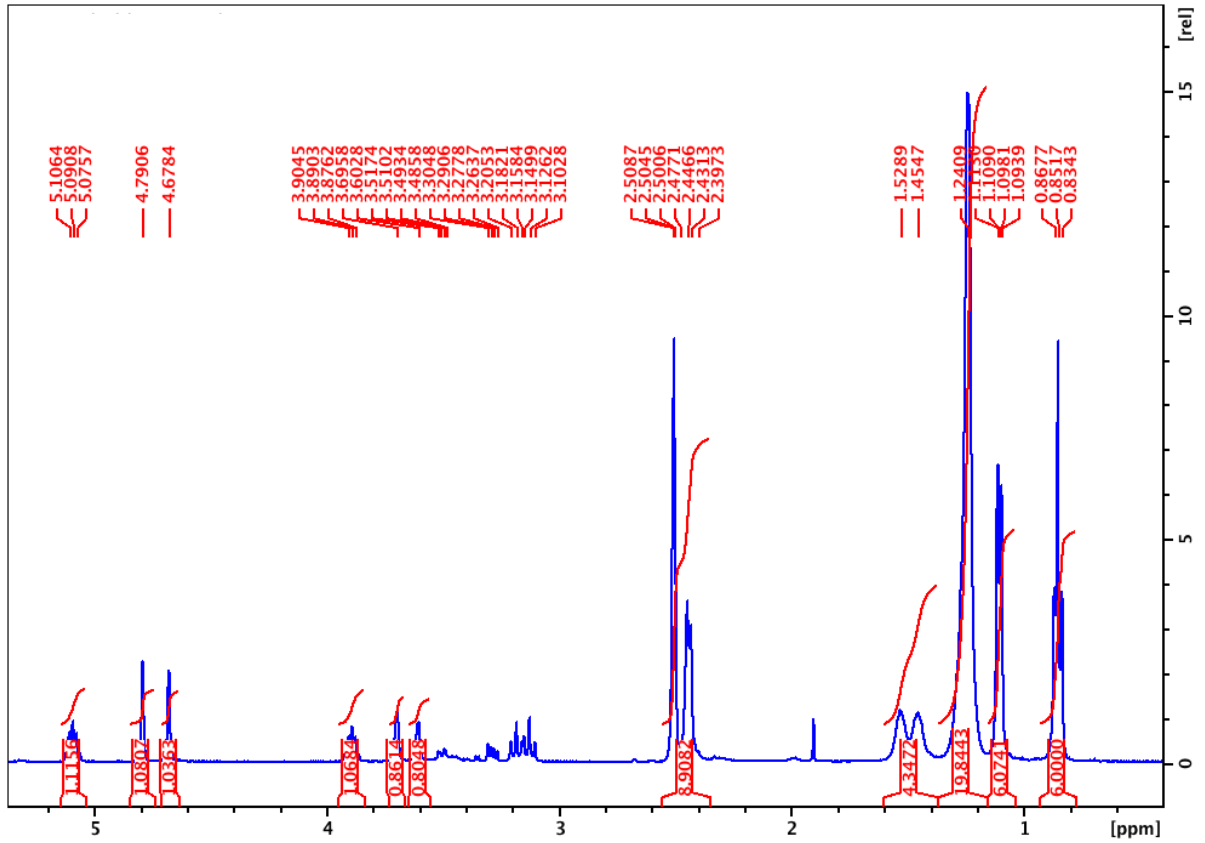
YANG, H.; LI, X.; LI, X.; YU, H. M.; SHEN, Z. Y. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP- HPLC. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 407, n. 9, p. 2529–2542, 2015.

Y.-L, Ma.; K-Y, Ma.; SUN, M-Y.; DONG, W.; HE, C-Q.; CHEN, F-L. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain

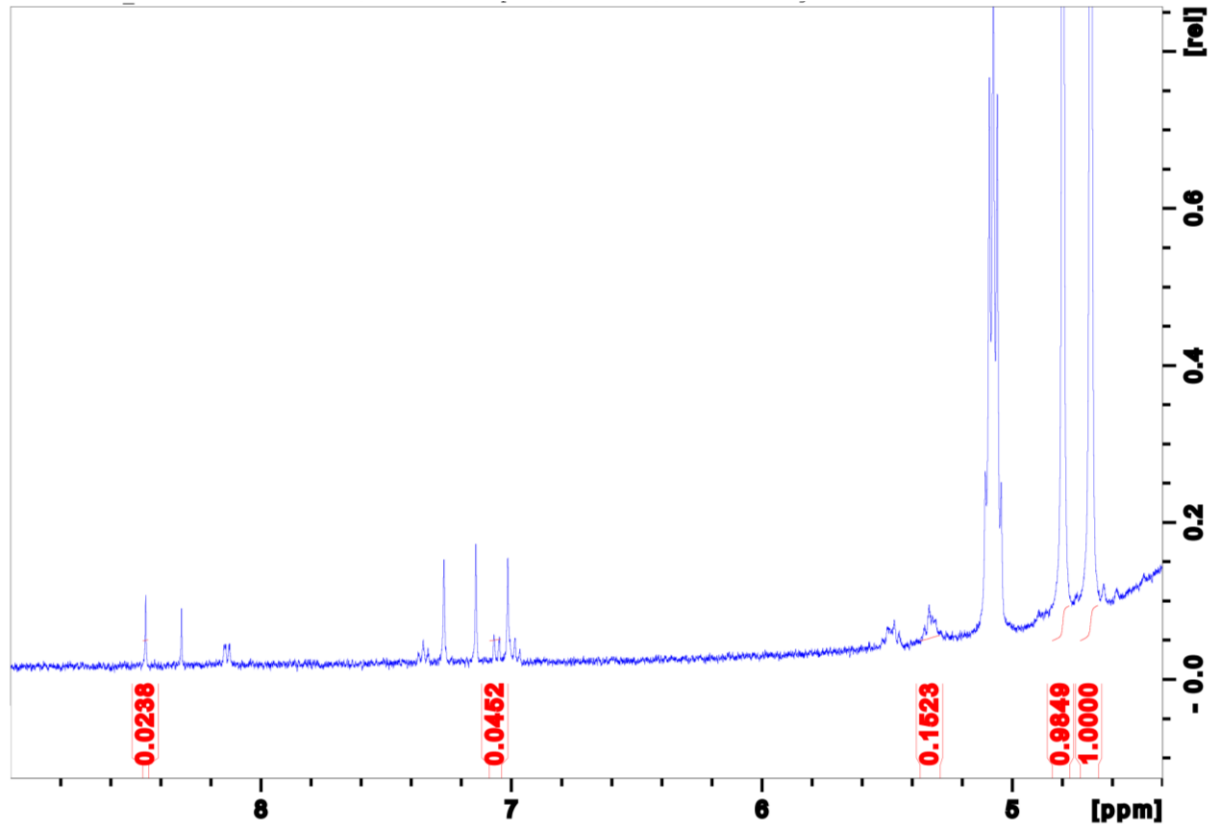
DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 144-151, 2016.

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*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 3147-3154, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – ESPECTRO ^1H RMN PARA AMOSTRA PURIFICADA

ANEXO B – ESPECTRO ^1H RMN PARA AMOSTRA PURIFICADA: PRESENÇA DE IMPUREZAS NÃO-RAMNOLIPÍDICAS



ANEXO C – ESPECTRO ^1H RMN PARA EXTRATO BRUTO