



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E  
APLICAÇÃO DE DI-RAMNOLIPÍDEOS EM MODELOS  
MURINOS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

---

Londrina  
2023

KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E  
APLICAÇÃO DE DI-RAMNOLIPÍDEOS EM MODELOS  
MURINOS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Josiane A. Vignoli

Coorientadora: Prof. Dra. Rubia Casagrande

Londrina  
2023

Wessel, Kamila Byanca Baldin.

Produção, extração e purificação de compostos bioativos de *Pseudomonas aeruginosa* e aplicação de di-ramnolipídeos em modelos murinos de dor e inflamação / Kamila Byanca Baldin Wessel. - Londrina, 2023.  
148 f. : il.

Orientador: Josiane Alessandra Vignoli.

Coorientador: Rubia Casagrande.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Metabólitos de *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. 2. Purificação de fenazinas, quinolonas, quinolina e aeruginaldeído - Tese. 3. Modelagem molecular de fenazinas, quinolonas, quinolina e aeruginaldeído - Tese. 4. Efeitos analgésico e anti-inflamatório de di-ramnolipídeos em modelos de dor e inflamação em camundongos - Tese. I. Vignoli, Josiane Alessandra. II. Casagrande, Rubia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E  
APLICAÇÃO DE DI-RAMNOLIPÍDEOS EM MODELOS  
MURINOS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Doutora em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Josiane A. Vignoli  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Ismael Rodrigues Amador  
Adeste Indústria de Produtos Animais/ Controle  
de Qualidade

---

Prof. Dr. Luis Paulo Silveira Alves  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Renata Martinez  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de janeiro de 2023.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Josiane Vignoli por todos os anos de orientação, apoio, compreensão, dedicação, amizade e pela confiança que sempre depositou em mim.

À Profa. Dra. Rubia Casagrande pela coorientação e todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Doumit Camilios-Neto pelo apoio fundamental, competência, disponibilidade e por todos os ensinamentos e incentivo científico.

Ao Dr. Ismael pelo suporte na parte de purificação de compostos orgânicos bem como nas análises de caracterização das moléculas purificadas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Melo por sempre estar disposto a sanar minhas dúvidas no laboratório.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri pela essencial parceria na parte experimental *in vivo* em modelo de dor e inflamação e pela colaboração fundamental de suas alunas Nayara Rampazzo, Marília Manchope e Anelise Franciosi.

Aos membros da banca pela disponibilidade, correções e sugestões que contribuirão com a melhora deste trabalho.

Todo meu respeito e gratidão aos meus pais Bruno e Adna (*in memoriam*) e minha irmã Bruna por sempre apoiarem incondicionalmente minhas escolhas e por todo suporte que me concederam ao longo de minha vida, contribuindo não apenas para minha formação acadêmica como também para meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu grande amor Mateus, pelo incentivo, amizade, compreensão, paciência, apoio e o companheirismo sem igual.

Aos meus amigos de laboratório Karen, Gabriella, Emili, Dâmaris, Thaila, Mayara, Maria, Ariane, Flávia, Jeferson e Mauro pelo companheirismo, auxílios prestados e por tornarem essa jornada mais leve.

Um agradecimento especial à Nayara Rampazzo pela amizade, parceria e colaboração com esta pesquisa.

A todos os meus professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por todos os conhecimentos transmitidos durante as disciplinas ministradas.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro, por cuidar tão bem dos laboratórios e equipamentos e pelos indispensáveis auxílios prestados aos alunos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido e que possibilitou a realização do presente trabalho.

”Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre as ideias.”

Marie Curie

## RESUMO

WESSEL, Kamila Byanca Baldin. **Produção, extração e purificação de compostos bioativos de *Pseudomonas aeruginosa* e aplicação de di-ramnolipídeos em modelos murinos de dor e inflamação.** 2023. 148 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa versátil, um patógeno oportunista capaz de sintetizar e excretar uma gama de metabólitos, conferindo uma habilidade única de interação com o ambiente e hospedeiro. Entre estes metabólitos, estão os ramnolipídeos e as fenazinas, classes de moléculas de interesse para diferentes ramos industriais. Estes compostos são produzidos de forma regulada por um mecanismo de comunicação celular conhecido como *quorum sensing* (QS). Esse mecanismo de regulação atua por meio de duas classes de moléculas sinalizadoras, acil-homoserinolactonas e quinolonas, que exercem papéis fundamentais na coordenação da expressão gênica do patógeno. Entre as quinolonas a 4-hidroxi-2-heptil-quinolona (HHQ) e a 2-heptil-3,4-hidroxi-quinolona (PQS) são as principais moléculas. Outra molécula, potencialmente sinalizadora, recentemente descoberta é o aeruginaldeído, entretanto pouco se sabe sobre as possíveis atividades deste composto. Essa miríade de sinalizadores e metabólitos apresenta papel central durante a infecção causada por *P. aeruginosa*, regulando tanto a expressão de fatores de virulência da bactéria como modulando a resposta do sistema imune do hospedeiro. Na área farmacológica, há uma busca por ativos efetivos e que não provoquem efeitos colaterais, tais como medicamentos anti-inflamatórios. A dor de origem inflamatória é um sintoma comum a diversas patologias, e atualmente o controle da dor ocorre principalmente da utilização de medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), mas que, usualmente, apresentam efeitos colaterais. Considerando a necessidade de novas abordagens terapêuticas o objetivo do presente trabalho foi desenvolver processos de produção, extração e purificação de fenazinas, aeruginaldeído e PQS produzidos por fermentação submersa de *P. aeruginosa* PAO1; e investigar o potencial terapêutico de di-ramnolipídeos purificados em modelos murinos de dor e inflamação. A produção dos metabólitos por *P. aeruginosa* PAO1 ocorreu em meio de sais e glicerol, com e sem caseinato de sódio. A extração ácido-base foi realizada com clorofórmio em quatro pHs, e com acetato de etila em dois pHs. As purificações ocorreram por cromatografia em camada delgada preparativa e por extração em fase sólida. Os principais compostos obtidos com pureza compatível para testar suas possíveis propriedades foram PQS, aeruginaldeído, fenazina-1-carboxiamida, ácido fenazina-1-carboxílico e quinolina 2-hidroximetil-4-quinolinol. Assim, o presente trabalho demonstrou grande relevância no isolamento de bioativos com possíveis propriedades biológicas de interesse para aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética. Ademais, di-ramnolipídeos purificados de *P. aeruginosa* PAO1 apresentaram efeitos analgésicos e anti-inflamatórios em modelos murinos de dor e inflamação, uma vez que inibiram comportamentos de dor induzidos pela carragenina, formalina e ácido acético, assim como reverteram o infiltrado leucocitário no tecido e inibiram o recrutamento leucocitário e a produção de ânion superóxido no peritônio, ambos induzidos por carragenina.

**Palavras-chave:** *P. aeruginosa*; fenazinas; quinolonas; di-ramnolípídeo; analgésico.

## ABSTRACT

WESSEL, Kamila Byanca Baldin Wessel. **Production, extraction and purification of bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* and application of di-rhamnolipids in models of pain and inflammation**. 2023. 148 p. Thesis (Doctoral Degree in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2023.

*Pseudomonas aeruginosa* is an versatile Gram-negative bacterium, an opportunistic pathogen capable of synthesizing and excreting a range of metabolites, conferring a unique ability to interact with the environment and host. Among these metabolites are rhamnolipids and phenazines, classes of molecules of interest to different industrial branches. These compounds are produced in a regulated manner through a cellular communication mechanism known as quorum sensing (QS). This regulatory mechanism operates through two classes of signaling molecules, acylhomoserinolactones and quinolones, which play key roles in coordinating the pathogen's gene expression. Among the quinolones, 4-hydroxy-2-heptyl-quinolone (HHQ) and 2-heptyl-3,4-hydroxy-quinolone (PQS) are the main molecules. Another potentially signaling molecule recently discovered is aeruginaldehyde; however, little is known about the possible activities of this compound. This myriad of signals and metabolites play a central role during the infection caused by *P. aeruginosa*, regulating both the expression of bacteria's virulence factors and modulating the response of host's immune system. In the pharmacological area, there is a search for effective actives that do not cause side effects, such as anti-inflammatory drugs. Inflammatory pain is a common symptom to several pathologies and, currently, the pain control mainly occurs with the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which usually have side effects. Considering the need for new therapeutic approaches, the objective of this work was to develop processes for the production, extraction and purification of phenazines, aeruginaldehyde and PQS produced by submerged fermentation of *P. aeruginosa* PAO1; and to investigate the therapeutic potential of purified di-rhamnolipids in murine models of pain and inflammation. The production of metabolites by *P. aeruginosa* PAO1 occurred in a medium of salts and glycerol, with and without sodium caseinate. Acid-base extraction was performed with chloroform at four pHs, and with ethyl acetate at two pHs. Purifications were performed by preparative thin layer chromatography and solid phase extraction. The main compounds obtained with compatible purity to test their possible properties were PQS, aeruginaldehyde, phenazine-1-carboxamide, phenazine-1-carboxylic acid and 2-hydroxymethyl-4-quinolinol quinoline. Thus, the present work demonstrated great relevance in the isolation of bioactives with possible biological properties of interest for application in the pharmaceutical and cosmetic industries. Furthermore, purified di-rhamnolipids from *P. aeruginosa* PAO1 showed analgesic and anti-inflammatory effects in murine models of pain and inflammation, since they inhibited pain behaviors induced by carrageenan, formalin and acetic acid, as well as reverted the leukocyte infiltrate in the tissue and inhibited the recruitment leukocytes and the production of superoxide anion in the peritoneum, both induced by carrageenan.

**Key words:** *P. aeruginosa*; phenazine; quinolones; di-rhamnolipid; analgesic.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1 -</b>	Via biossintética das principais fenazinas de <i>P. aeruginosa</i> .....	21
<b>Figura 2.2 -</b>	Operons da biossíntese de fenazinas de <i>P. aeruginosa</i> .....	22
<b>Figura 2.3 -</b>	PYO na sobrevivência de <i>P. aeruginosa</i> em condições de baixo oxigênio .....	23
<b>Figura 2.4 -</b>	PYO no estresse oxidativo da célula do hospedeiro .....	23
<b>Figura 2.5 -</b>	Estrutura dos mono- e di-ramnolipídeos .....	26
<b>Figura 2.6 -</b>	Biossíntese de ramnolipídeos .....	27
<b>Figura 2.7 -</b>	Estrutura das moléculas sinalizadoras do QS de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> .....	29
<b>Figura 2.8 -</b>	Biossíntese da PQS .....	30
<b>Figura 2.9 -</b>	Via biossintética da pioquelina em <i>P. protegens</i> Pf-5 .....	31
<b>Figura 3.1 -</b>	Esquema do processo de extração ácido-base empregado para o cultivo A .....	36
<b>Figura 3.2 -</b>	Esquema do processo de extração ácido-base empregado para o cultivo B .....	37
<b>Figura 3.3 -</b>	Fluxograma dos processos de purificação empregados para os extratos provenientes do cultivo A.....	39
<b>Figura 3.4 -</b>	Fluxograma dos processos de purificação empregados para os extratos provenientes do cultivo B.....	40
<b>Figura 4.1 -</b>	Processo de extração ácido-base do sobrenadante livre de células do cultivo de 13 dias com adição de caseinato de sódio 1%, nos pHs 11, 6, 4 e 2.....	48
<b>Figura 4.2 -</b>	CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos nos pHs 11, 6, 4 e 2 utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1% .....	49
<b>Figura 4.3 -</b>	CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos nos pHs 11, 6, 4 e 2 utilizando como fase móvel metanol 70% .....	51
<b>Figura 4.4 -</b>	Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico alcalino .....	52
<b>Figura 4.5 -</b>	Estrutura do IQS e do aeruginol.....	53
<b>Figura 4.6 -</b>	Processo de purificação do extrato de pH 11 por CCDP .....	54
<b>Figura 4.7 -</b>	CCDs analíticas das frações provenientes do processo de purificação, por CCDP, do extrato de pH 11 .....	55

<b>Figura 4.8 -</b>	Estrutura da PYO em dois estados de protonação .....	56
<b>Figura 4.9 -</b>	Purificação da amostra 4 do extrato básico por CCDP .....	57
<b>Figura 4.10 -</b>	CCD analítica das frações provenientes do processo de purificação da amostra 4 do extrato básico por CCDP .....	58
<b>Figura 4.11 -</b>	Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico de pH 6.....	59
<b>Figura 4.12 -</b>	Processo de purificação do extrato de pH 6 por CCDP .....	60
<b>Figura 4.13 -</b>	Espectro de massas obtidos por ESI-qTOF de IQS.....	61
<b>Figura 4.14 -</b>	Espectro de massas obtidos por ESI-qTOF de PCA.....	62
<b>Figura 4.15 -</b>	Estrutura do ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) .....	63
<b>Figura 4.16 -</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C de PCA, em DMSO-d <sub>6</sub> , a 25 °C .....	63
<b>Figura 4.17 -</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC de PCA, em DMSO-d <sub>6</sub> , a 25 °C.....	65
<b>Figura 4.18 -</b>	Análise da pureza de PCA por quantificação relativa a partir do espectro de <sup>1</sup> H RMN.....	66
<b>Figura 4.19 -</b>	Processo de purificação conjunta de PCA e quinolina por CCDP .....	67
<b>Figura 4.20 -</b>	CCDs analíticas da quinolina 2-hidroximetil-4-quinolinol purificada do extrato de pH 6 por CCDP .....	68
<b>Figura 4.21 -</b>	Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico de pH 4.....	69
<b>Figura 4.22 -</b>	Processo de purificação do extrato de pH 4 por CCDP .....	70
<b>Figura 4.23 -</b>	CCDs analíticas do processo de purificação da fração 3 (ponto de aplicação) pré-purificada por CCDP por extração em fase sólida (C18).....	71
<b>Figura 4.24 -</b>	Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico de pH 2.....	72
<b>Figura 4.25 -</b>	Processo de purificação do extrato de pH 2 por CCDP .....	73
<b>Figura 4.26 -</b>	CCDs analíticas do processo de purificação da fração 3 (ponto de aplicação) pré-purificada por CCDP por extração em fase sólida (C18).....	74
<b>Figura 4.27 -</b>	Processo de extração ácido-base do sobrenadante livre de células do cultivo de três dias em meio de sais nos pHs 11 e	

	2.....	75
<b>Figura 4.28</b> -	CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos nos pHs 11 e 2.....	76
<b>Figura 4.29</b> -	Processo de purificação do extrato de pH 11 por CCDP .....	77
<b>Figura 4.30</b> -	Re-purificação do composto de número 1 obtido do processo anterior, por CCDP.....	78
<b>Figura 4.31</b> -	CCDs analíticas das frações provenientes do processo de purificação do extrato básico por CCDP .....	79
<b>Figura 4.32</b> -	Primeiro processo de purificação por CCDP de IQS presente no extrato bruto orgânico de pH 2.....	80
<b>Figura 4.33</b> -	Repurificação de IQS obtido do processo anterior, por CCDP ..	81
<b>Figura 4.34</b> -	CCDs analíticas de PCA purificado do extrato ácido por CCDP .....	82
<b>Figura 4.35</b> -	Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula de PCA.....	83
<b>Figura 4.36</b> -	Coeficiente de partição e solubilidade da PCA em água .....	84
<b>Figura 4.37</b> -	Ponto isoelétrico do PCA .....	85
<b>Figura 4.38</b> -	Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula de PCN.....	86
<b>Figura 4.39</b> -	Coeficiente de partição e solubilidade da PCN em água .....	87
<b>Figura 4.40</b> -	Ponto isoelétrico da PCN .....	88
<b>Figura 4.41</b> -	Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula de IQS .....	89
<b>Figura 4.42</b> -	Coeficiente de partição e solubilidade em água do IQS .....	90
<b>Figura 4.43</b> -	Ponto isoelétrico do IQS .....	90
<b>Figura 4.44</b> -	Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula da PQS.....	91
<b>Figura 4.45</b> -	Coeficiente de partição e solubilidade em água da PQS .....	92
<b>Figura 4.46</b> -	Ponto isoelétrico da PQS .....	92
<b>Figura 4.47</b> -	Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (%) da quinolina .....	93
<b>Figura 4.48</b> -	Coeficiente de partição e solubilidade da quinolina em água ....	94
<b>Figura 4.49</b> -	Ponto isoelétrico da quinolina .....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> -	Rendimento dos extratos brutos orgânicos dos cultivos B.....	52
<b>Tabela 4.2</b> -	Assinalamentos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a molécula PCA obtidos a partir da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aeruginosina A
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
Da	g/mol
Di-RL	Di-Ramnolipídeos
ESI-qTOF	Espectrometria de massa quadrupolo-tempo de voo com ionização por spray de elétrons
HHQ	2-heptil-4-quinolona
HSL	Homoserinolactona
IL	Interleucina
IQS	<i>Integrated Quorum sensing system/ Aeruginaldeído</i>
NBT	Corante nitroazul de tetrazólio
PCA	Ácido fenazina-1-carboxílico
PCN	Fenazina-1-carboxiamida
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>
PYO	Piocianina
RL	<i>Ramnolipídeos</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
QS	Quorum-sensing
UV	Luz Ultravioleta
1-OH-PHZ	1-Hidróxifenazina
2-HM-4Q	2-hidroximetil-4-quinolinol

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	OBJETIVO GERAL.....	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
	<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	METABÓLITOS ATIVOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	19
2.1.1	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	19
2.1.2	Fenazinas.....	20
2.1.2.1	Biossíntese das principais fenazinas.....	20
2.1.2.2	Piocianina (PYO).....	22
2.1.2.3	Ácido fenazina-1-carboxílico (PCA).....	24
2.1.2.4	Fenazina-1-carboxiamida (PCN).....	25
2.1.3	Ramnolipídeos.....	25
2.1.4	Quorum Sensing e Moléculas Sinalizadoras .....	28
2.2	DOR INFLAMATÓRIA.....	32
	<b>CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA</b> .....	35
3.1	OBTENÇÃO DE METABÓLITOS ATIVOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	35
3.1.1	Produção de Metabólitos por Cultivos Submersos de <i>P. Aeruginosa</i> .....	35
3.1.2	Extração Líquida Ácido-Base .....	36
3.1.3	Purificação dos Metabólitos Ativos .....	38
3.1.3.1	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	38
3.1.3.2	Extração em fase sólida .....	38
3.1.3.3	Dissolução fracionada (DF) .....	39
3.1.4	Métodos Analíticos .....	40
3.1.4.1	Gravimetria .....	40
3.1.4.2	Cromatografia em camada delgada (CCD) analítica .....	40
3.1.4.3	Espectrometria de massas .....	41
3.1.4.4	Ressonância magnética nuclear.....	41
3.1.4.5	Quantificação por 1H-RMN .....	41
3.1.5	Modelagem Molecular .....	42

3.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DE DI-RAMNOLÍPIDEO EM MODELOS MURINOS DE DOR E INFLAMAÇÃO .....	42
3.2.1	Animais.....	42
3.2.2	Drogas .....	43
3.2.3	Procedimentos Experimentais .....	43
3.2.4	Testes de Hiperálgia Mecânica.....	44
3.2.5	Teste da Formalina.....	44
3.2.6	Teste de Contorção Abdominal .....	45
3.2.7	Histologia.....	45
3.2.8	Peritonite .....	45
3.2.9	Ensaio de Nitro Blue Tetrazolium (NBT).....	46
3.2.10	Análise Estatística .....	46
	<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
4.1	EXTRATOS ORGÂNICOS DO CULTIVO COM ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO.....	47
4.1.1	Purificação do Extrato Orgânico de pH 11 .....	52
4.1.2	Purificação do Extrato Orgânico de pH 6 .....	59
4.1.3	Purificação do Extrato Orgânico de pH 4 .....	68
4.1.4	Purificação do Extrato Orgânico de pH 2 .....	72
4.2	EXTRATOS ORGÂNICOS DO CULTIVO SEM ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO.....	74
4.2.1	Purificação do Extrato Orgânico de pH 11 .....	76
4.2.2	Purificação do Extrato Orgânico de pH 2 .....	79
4.3	MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPOSTOS OBTIDOS.....	82
4.3.1	PCA.....	83
4.3.2	PCN.....	85
4.3.3	IQS .....	88
4.3.4	PQS.....	91
4.3.5	2-HM-4Q.....	93
	<b>CAPÍTULO 5 - ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>96</b>

<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>143</b>

## Capítulo 1 INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa extremamente versátil e ubíqua (Hardalo e Edberg, 1997). Sua notável adaptabilidade, competitividade e virulência decorrem da capacidade de sintetizar e excretar inúmeros metabólitos (Balasubramanian *et al.*, 2013). Dentre estes metabólitos destacam-se pigmentos da classe das fenazinas (Guttenberger, Blankenfeldt e Breinbauer, 2017a) e os ramnolipídeos (Mulligan, 2009), que despertam interesse, devido aos seus amplos potenciais de aplicação em diversas áreas.

Estes compostos são produzidos pela bactéria de forma regulada através de mecanismos químicos de comunicação vinculado à densidade populacional, conhecidos como *quorum sensing*. Esse sistema de linguagem bacteriana atua por meio de moléculas sinalizadoras (Balasubramanian *et al.*, 2013), que exercem papéis fundamentais na coordenação da expressão gênica, através dos mecanismos de sinalização Las, Rhl e PQS, os quais são interconectados (Nadal Jimenez *et al.*, 2012).

Existem evidências de que a quinolona sinalizadora 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) possui propriedade antioxidante (Häussler e Becker, 2008) e exerce efeitos na modulação da resposta imune em mamíferos (Skindersoe *et al.*, 2009). A molécula 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído, também conhecida como aeruginaldeído, foi descoberta mais recentemente (Lee *et al.*, 2013), entretanto pouco se sabe sobre as possíveis atividades deste composto.

Neste sentido, há um grande interesse na busca por substâncias que tenham potenciais propriedades de aplicação nos campos farmacológico, cosmético e agrícola. Dentro deste contexto, é importante avaliar métodos de extração e purificação destes bioativos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver processos de produção, extração e purificação de fenazinas, aeruginaldeído e PQS produzidos por fermentação submersa de *P. aeruginosa* PAO1, com pureza compatível para testar suas possíveis propriedades; e investigar o potencial terapêutico do di-ramnolipídeo purificado em modelos murinos de dor e inflamação.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver processos de produção, extração e purificação de fenazinas, aeruginaldeído e PQS produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e avaliar os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios do Di-ramnolípídeo (Di-RL) em modelos murinos de dor inflamatória.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar metodologias de produção conjunta de fenazinas, aeruginaldeído e PQS por cultivos submersos de *P. aeruginosa* PAO1 com e sem caseinato de sódio;
- Padronizar metodologias de extração conjunta de fenazinas, aeruginaldeído e PQS;
- Padronizar metodologias de purificação de fenazinas, aeruginaldeído e PQS;
- Caracterizar e avaliar a pureza dos compostos purificados;
- Avaliar o efeito analgésico da curva dose-resposta do Di-RL na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina;
- Avaliar o efeito analgésico do Di-RL no comportamento nociceptivo de contorções abdominais induzidas pelo estímulo intraperitoneal com ácido acético;
- Avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório do Di-RL no comportamento nociceptivo de sacudida da pata pelo estímulo intraplantar com formalina;
- Avaliar o efeito do Di-RL sobre a histopatologia na dor inflamatória induzida pela carragenina;
- Avaliar o efeito do Di-RL na migração leucocitária para a cavidade peritoneal na peritonite induzida por carragenina;
- Avaliar o efeito do Di-RL sobre a produção de ânion superóxido em leucócitos recrutados após peritonite induzida por carragenina.

## Capítulo 2

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, a revisão bibliográfica será dividida em duas partes. A primeira parte abordará compostos bioativos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (item 2.1), com ênfase nos composto fenazínicos, quinolonas sinalizadoras do mecanismo de *quorum-sensing* e ramnolipídeos. A segunda parte tratará de explanar sobre o processo inflamatório relacionado à dor (item 2.2).

### 2.1. METABÓLITOS ATIVOS DE *P. aeruginosa*

#### 2.1.1. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa com elevada capacidade de sobrevivência, sendo encontrada nos mais variados ambientes: tanto no solo e ambientes aquáticos bem como colonizando plantas, animais e humanos. Em circunstâncias normais, esta bactéria não oferece risco para a população geral, apenas para pacientes imunocomprometidos, em especial portadores de fibrose cística, HIV e vítimas de queimaduras graves (Hardalo e Edberg, 1997).

Sua marcante adaptabilidade e resistência a antibióticos e desinfetantes advém de seu extenso genoma, composto de 6,3 milhões de pares de base. Portanto, o maior e mais complexo genoma bacteriano sequenciado, *P. aeruginosa* PAO1 tem a capacidade de expressar diversas proteínas envolvidas em processos de regulação, transporte, metabolismo e virulência (Stover *et al.*, 2000).

A competitividade e virulência deste microrganismo resultam da síntese e secreção de múltiplos metabólitos, chamados de fatores de virulência, que incluem exotoxinas, elastases, proteases, ramnolipídeos, pigmentos e formação de biofilme (Balasubramanian *et al.*, 2013; Jayaseelan, Ramaswamy e Dharmaraj, 2014; Smith e Iglewski, 2003). Estes fatores de virulência são produzidos pela bactéria de forma regulada através de mecanismo químico conhecido como *quorum sensing* (QS), esse sistema de comunicação bacteriana coordena a expressão gênica por meio de moléculas sinalizadoras

(Balasubramanian *et al.*, 2013).

O foco do presente trabalho são pigmentos da classe de fenazinas, di-ramnolipídeos e quinolonas sinalizadoras.

### 2.1.2. FENAZINAS

As fenazinas são pigmentos redox-ativos, heterocíclicos, contendo nitrogênio bem como grupos hidroxil, carboxil, amino e metil adicionais em sua estrutura (Guttenberger, Blankenfeldt e Breinbauer, 2017b; Laursen e Nielsen, 2004; Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Os gêneros bacterianos produtores de fenazinas são limitados e sabe-se que *Pseudomonas* excreta vários homólogos dessas substâncias com diferentes colorações (azul-esverdeado, amarelo e vermelho) conferindo-lhes uma aparência característica na cultura (Chincholkar; Thomashow, 2013 ; Turner; Messenger, 1986).

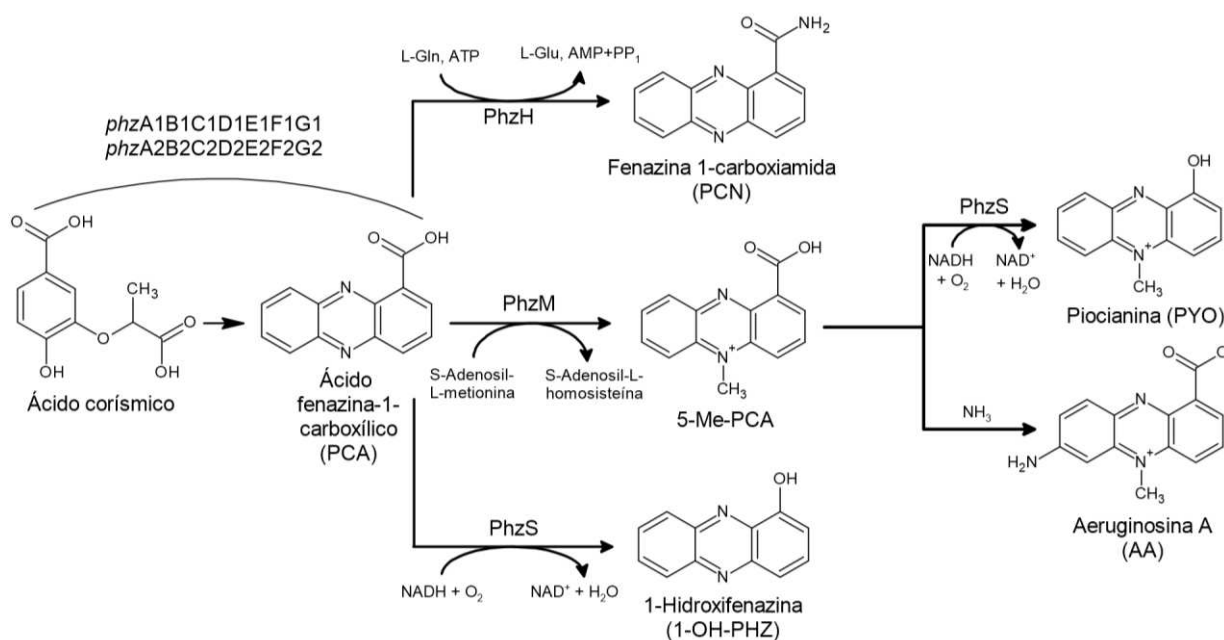
Os compostos fenazínicos produzidos por *P. aeruginosa* são fatores de virulência (Lau, Hassett e Britigan, 2005) que possuem múltiplas funções biológicas, sendo importantes para a competitividade microbiana (Mazzola *et al.*, 1992) e virulência em hospedeiros humanos e animais (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999).

Os principais compostos fenazínicos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* incluem piocianina (PYO), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), 1-hidroxfenazina (1-OH-PHZ), fenazina-1-carboxiamida (PCN), ácido 5-metil-fenazina-1-carboxílico (5-Me-PCA) e aeruginosina A (AA) (Abu *et al.*, 2013; Mavrodi *et al.*, 2001; Saranya, Jayapriya e Tamilselvi, 2012).

#### 2.1.2.1. Biossíntese das principais fenazinas

A principal estrutura fenazínica consiste na molécula de PCA, também chamado de núcleo fenazínico, a qual origina as outras fenazinas ao passarem por modificações catalisadas por enzimas específicas (Figura 2.1) (Guttenberger, Blankenfeldt e Breinbauer, 2017; Mavrodi *et al.*, 2001).

**Figura 2.1** – Via biossintética das principais fenazinas de *P. aeruginosa*



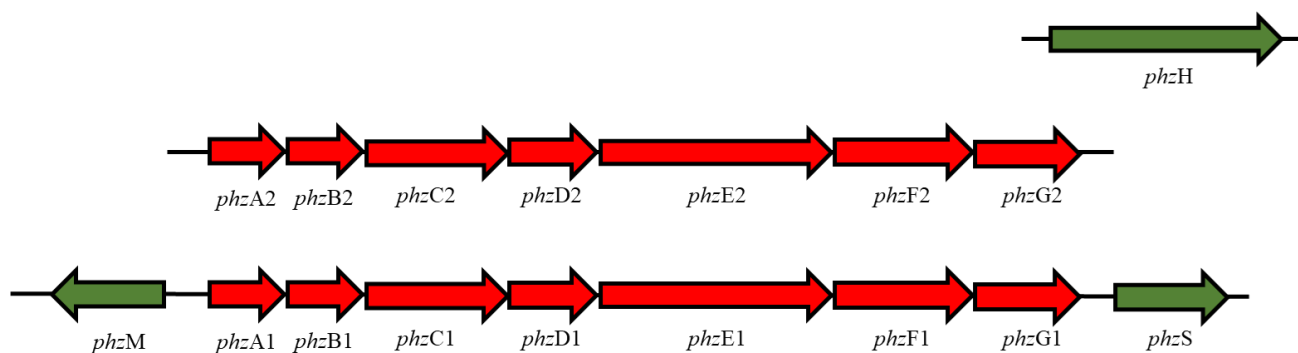
**Fonte:** Adaptado de Mavrodi, 2001.

PhzH: enzima modificadora de fenazina; PhzM: fenazina metiltransferase; PhzS: fenazina monooxigenase.

Em 1962, Millican confirmou que as fenazinas têm como precursor biossintético a molécula de ácido corísmico, tendo como base seu estudo de incorporação deste ácido em PYO por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

O ácido corísmico é produzido pela via do ácido chiquímico, a partir de eritrose 4-fosfato e fosfoenolpiruvato (Guttenberger, Blankenfeldt e Breinbauer, 2017; Laursen e Nielsen, 2004). Como demonstrado por Mentel e colaboradores (2009), a conversão deste precursor no núcleo fenazínico, PCA, é realizada pela ação sequencial de diversas enzimas codificadas por duas cópias de um *cluster* de sete genes (*phz1* e *phz2*), sendo eles *phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2* (Figura 2.2), que codificam as enzimas PhzA/B, 3-desóxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase (PhzC), PhzD, PhzE, PhzF e PhzB. Após a biossíntese de PCA, os genes adicionais *phzH*, *phzM* e *phzS* codificam as enzimas PhzH (enzima modificadora de fenazina), PhzM (fenazina metiltransferase) e PhzS (fenazina monooxigenase) (Figura 2.2), respectivamente, que irão converter PCA em PCN, 5-Me-PCA, 1-OH-PHZ e PYO (Figura 2.1) (Mavrodi *et al.*, 2001).

**Figura 2.2** - Operons da biossíntese de fenazinas de *P. aeruginosa*



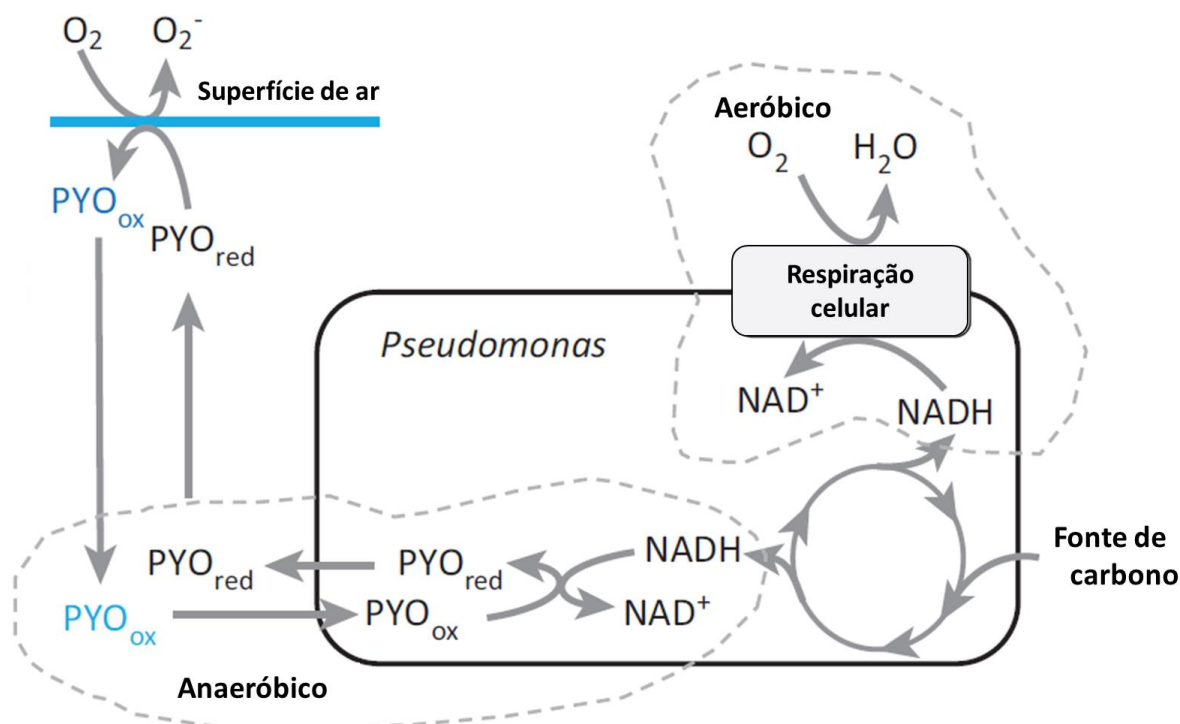
**Fonte:** Adaptado de Mentel et al., 2009.

### 2.1.2.2. Piocianina (PYO)

A primeira fenazina descoberta e a mais estudada desde então é a PYO, de nome químico 5-N-metil-1-hidróxi-fenazina. Os primeiros relatos desta substância, em meados do século XIX, foram de médicos que observaram pus de cor azul nas feridas de pacientes com feridas mais severas (Blankenfeldt e Parsons, 2014). Em 1860, Fordos, foi o primeiro a descrever a extração com clorofórmio de PYO do “pus azul” encontrado nas feridas, denominando este pigmento de piocianina, provenientes das palavras gregas πύο (pus) και κό (azul).

PYO é um zwitterion que pode penetrar facilmente membrana biológicas (Lau *et al.*, 2004). Além disso, é um composto redox-ativo, sendo capaz de aceitar e doar elétrons. Unindo essas duas características, PYO funciona como um carreador móvel de elétrons para a bactéria, aceitando elétrons do NADH gerados pela oxidação da fonte de carbono e transportando esses elétrons gerados pela respiração para aceptores localizados em outras regiões (Rada e Leto, 2013). Assim, PYO contribui para a virulência e persistência das infecções causadas por *P. aeruginosa* (Jayaseelan, Ramaswamy e Dharmaraj, 2014), ao contribuir para a sobrevivência da bactéria em condições de difícil acesso e pouco oxigênio disponível, como é o caso, por exemplo de biofilme formado (Figura 2.3).

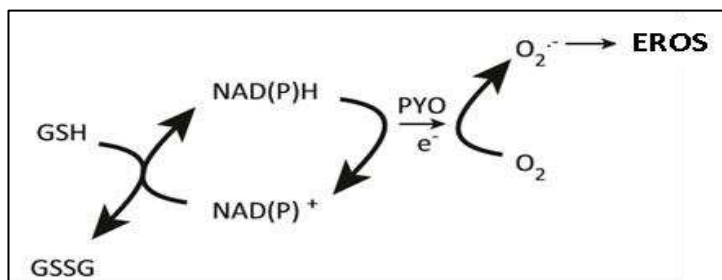
**Figura 2.3** – PYO na sobrevivência de *P. aeruginosa* em condições de baixo oxigênio



Fonte: Adaptado de Rada; Leto, 2013.

Outro modo de ação de PYO, é a produção de espécies reativas de oxigênio, que em excesso, podem ser prejudiciais para as células. PYO oxida diretamente NAD(P)H no citoplasma do hospedeiro e os elétrons adquiridos são doados para o oxigênio molecular levando a produção de ânion superóxido e consequente formação de EROS (Figura 2.4), que juntamente com depleção de glutathiona (GSH) expõe as células do hospedeiro ao estresse oxidativo.

**Figura 2.4** - PYO no estresse oxidativo da célula do hospedeiro



Fonte: Adaptado de Rada; Leto, 2013.

Dietrich e colaboradores (2006) sugerem que PYO também atua como molécula sinalizadora, pois ela ativa a transcrição do fator de transcrição SoxR, que controla a expressão da bomba de efluxo MexGHI-opmD. Essa bomba de efluxo exporta vários tipos de compostos, tais como xenobióticos, como o antibiótico norfloxacin e o corante heterocíclico acriflavina; um precursor ou derivado da molécula sinalizadora conhecida como *Pseudomonas quinolone signal* (PQS); e pigmentos vermelhos que podem ser derivados do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico (5-Me-PCA), bem como o próprio 5-Me-PCA. Sakhtah e colaboradores (2016), demonstraram que 5-Me-PCA, precursor de PYO e de AA, é o substrato natural deste transportador transmembrana.

Devido a seu efeito pró-oxidante, PYO apresenta atividade antibiótica contra bactérias, fungos e protozoários (Abu et al., 2013; Jayaseelan; Ramaswamy; Dharmaraj, 2014; Orlandi et al., 2015; Sudhakar; Karpagam; Premkumar, 2015).

#### 2.1.2.3. Ácido fenazina-1-carboxílico (PCA)

A molécula de PCA é conhecida pelo seu amplo espectro de atividade antifúngica contra vários fitopatógenos de importância agrícola (Liu *et al.*, 2008), como *Fusarium* e *Gaeumannomyces* (Huasong *et al.*, 2020). Assim, existem evidências de que esse composto possui grande importância como pesticida biológico, em virtude de sua atividade fungicida, pouca toxicidade e biodegradabilidade (D'aes *et al.*, 2011).

Na China, PCA é utilizado na prevenção de pragas da pimenta e da queima da bainha do arroz, sendo registrado comercialmente como "Shenqinmycin" (Song *et al.*, 2020).

Adicionalmente, foi demonstrado por Du e colaboradores (2015), que PCA também funciona como molécula sinalizadora, regulando positivamente genes envolvidos no metabolismo, motilidade celular, secreção e mecanismos de defesa e regulam negativamente genes envolvidos na transcrição, tradução e divisão celular. Além disso, PCA altera a expressão do gene *mexH* da bomba de efluxo, através de um mecanismo mediado por SoxR, o que pode acarretar falhas na comunicação celular, suscetibilidade a antibióticos e promoção de virulência e crescimento em *P. aeruginosa*.

#### 2.1.2.4. Fenazina-1-carboxiamida (PCN)

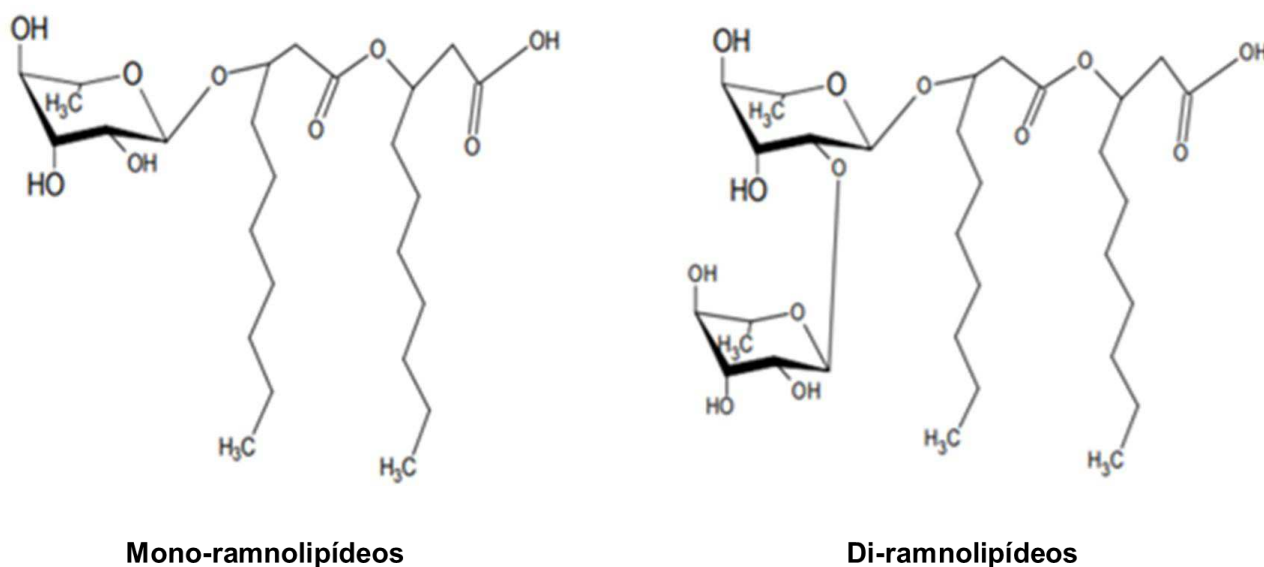
A molécula de PCN apresenta conhecidas atividades antimicrobiana e antifúngica. Segundo Cardozo e colaboradores, no ano de 2013, essa fenazina foi efetiva contra *Staphylococcus aureus*, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), patógeno resistente a antibióticos responsável por diversas infecções. Shanmugaiah e colaboradores (2010), provaram que PCN tem efeito contra o fungo *Rhizoctonia solani* e a bactéria *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, importantes patógenos do arroz.

Ademais, Kennedy e colaboradores (2015) mostraram que esta molécula fenazínica apresenta inibição seletiva contra células cancerosas de pulmão (A549) e mama (MDA MB-231), e não mostrou citotoxicidade para as células sanguíneas normais, sugerindo propriedades anticâncer para PCN.

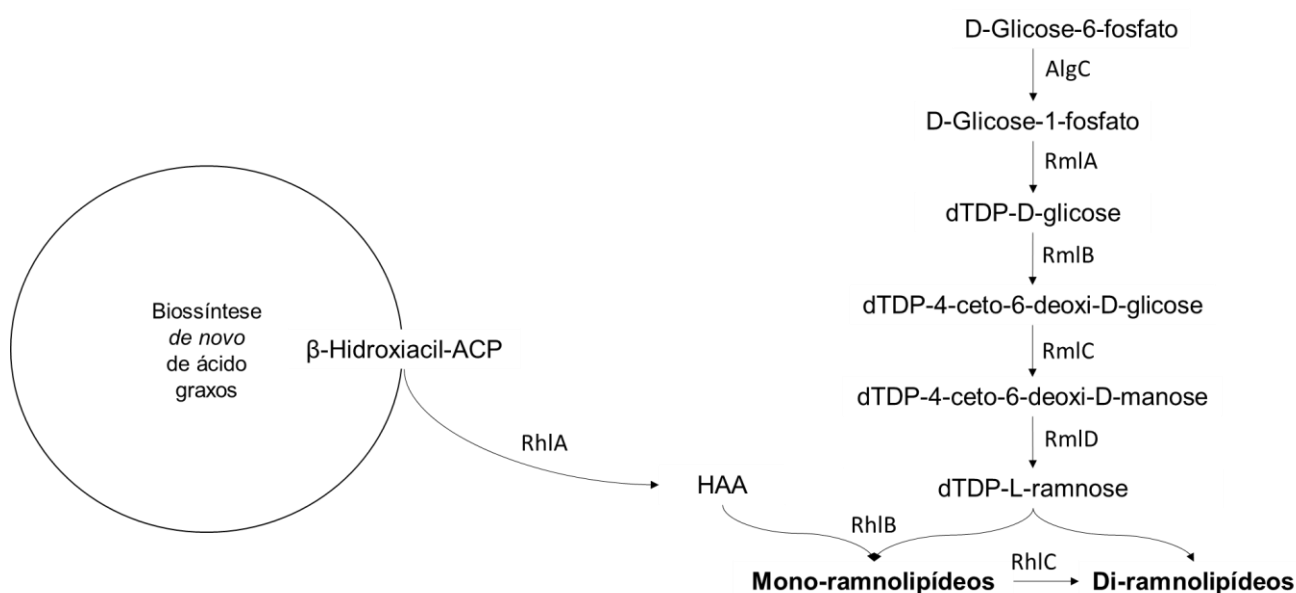
#### 2.1.3. RAMNOLIPÍDEOS

Os ramnolipídeos (RL) pertencem a classe dos glicolipídios, sendo constituídos por uma ou duas moléculas de ramnose polar, respectivamente mono e di-ramnolipídeo (Figura 2.5), ligada a ácidos graxos  $\beta$ -hidroxilados e apolares (Liu *et al.*, 2017; Varjani e Upasani, 2017).

**Figura 2.5** – Estrutura dos mono- e di-ramnolipídeos



A biossíntese de ramnolipídeos ocorre a partir de dTDP-L-ramnose e ácidos graxos  $\beta$ -hidroxi (Figura 2.6). A síntese de mono-ramnolipídeos é catalisada pela ramnosiltransferase I, enzima codificada pelo gene *rhIAB*, que combina dTDP-L-ramnose e  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (HAA). Os di-ramnolipídeos são sintetizados a partir do mono-ramnolipídeos e dTDP-L-ramnose pela enzima ramnosiltransferase II, codificada por *rhIC* (Li *et al.*, 2019). A porção hidrofílica (ramnose) é proveniente da glicose-6-fosfato, que é convertida pela AlgC em glicose-1-fosfato, que posteriormente é convertida em dTDP-L-ramnose por uma sequência de reações catalisadas pelas enzimas RmlA, RmlB, RmlC e RmlD (Soberón-Chávez, Lépine e Déziel, 2005). Já a porção hidrofóbica origina-se da biossíntese de novo dos ácidos graxos (Campos-García *et al.*, 1998), com a conversão do intermediário  $\beta$ -hidroxiacil-ACP em  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (HAA) em uma reação catalisada pela RhIA (Zhu e Rock, 2008).

**Figura 2.6** - Biossíntese de ramnolipídeos

**Fonte:** Adaptado de Soberón-Chávez; Lépine e Déziel (2005).

Ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* são produzidos como uma mistura de diversos congêneres, sendo variedades de mono e di-ramnolipídeos (Di-RL) (Wadekar *et al.*, 2012). Pelo fato de serem moléculas anfipáticas, os RL possuem diversas propriedades físico-químicas que lhes conferem grande potencial de aplicação como agentes umectantes, emulsificantes e detergentes (Rikalovic, Avramovic e Karadzic, 2017).

São os biossurfactantes mais estudados, devido ao grande rendimento de produção, excelentes propriedades físico-químicas, biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta estabilidade em condições extremas (Chong e Li, 2017; Liu *et al.*, 2021), com várias aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e petrolífera (Varjani e Upasani, 2017).

Além disso, essa classe de moléculas mostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Benincasa *et al.*, 2004), *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (Vasileva-Tonkova, Sotirova e Galabova, 2011), *Listeria monocytogenes* (Magalhães e Nitschke, 2013), *Klebsiella pneumonia*, entre outros. Bem como atividades contra os fungos *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocadium virens*, *Chaetonium globosum* (Benincasa *et al.*, 2004), *Mucor circinelloides* e *Verticillium dahlia* (Thakur *et al.*, 2021).

O tratamento tópico com o congênera produzido em maior proporção, Di-RL (L-ramnosil-L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxi-decanoato), é eficaz na aceleração da cicatrização de feridas de queimadura e diminui o conteúdo de colágeno na área da ferida que é associado à falha de cicatrização em feridas crônicas, em ratos Sprague-Dawley (Stipcevic, Piljac e Piljac, 2006). Ainda, Di-RL possui efeitos na cicatrização de feridas de excisão em ratos *wister*, o que é favorecido pela sua ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6588, que contribui para proteger o local da ferida de contaminação bacteriana (Sana *et al.*, 2018).

#### 2.1.4. QUORUM SENSING E MOLÉCULAS SINALIZADORAS

A produção de fenazinas e de ramnolipídeos, assim como de outros fatores de virulência, de *P. aeruginosa*, é controlada por um mecanismo químico de comunicação celular chamado *quorum sensing* (QS) (Balasubramanian *et al.*, 2013). No QS, a bactéria secreta e acumula pequenas moléculas sinalizadoras difusíveis, em um processo dependente da densidade celular, que são reconhecidas pelas células adjacentes e são responsáveis por desencadear uma resposta na expressão gênica de genes de virulência (Camilli e Bassler, 2006).

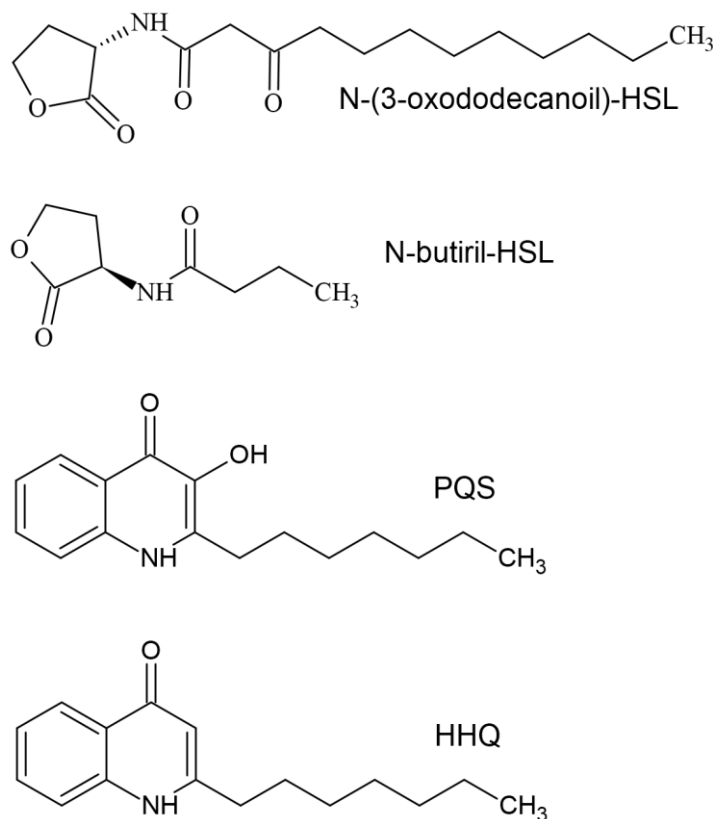
O QS de *P. aeruginosa* consiste em três tipos de mecanismos de sinalização, que são interconectados e organizados de maneira hierárquica, sendo conhecidos com Las, Rhl e PQS (Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Em 2013, Lee e colaboradores descobriram um suposto novo sistema de QS, e o nomearam IQS.

Nos sistemas Las e Rhl, as enzimas LasI e RhlI produzem as moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL) N-(3-oxododecanoil)-HSL e N-butiril-HSL (Figura 2.7), respectivamente. Ao atingir concentrações suficientes, essas moléculas reconhecem e se ligam aos seus receptores cognatos, LasR e RhlR. Esses receptores são fatores de transcrição, que ao serem ativados pela ligação com as acil-HSLs, regulam a expressão de genes-alvo (Schuster e Greenberg, 2006).

O terceiro sistema QS utiliza as moléculas sinalizadoras do tipo 2-alkil-4-quinolonas (AQs) 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (Figura 2.7), também chamado *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), e seu precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ) (Diggle

*et al.*, 2007).

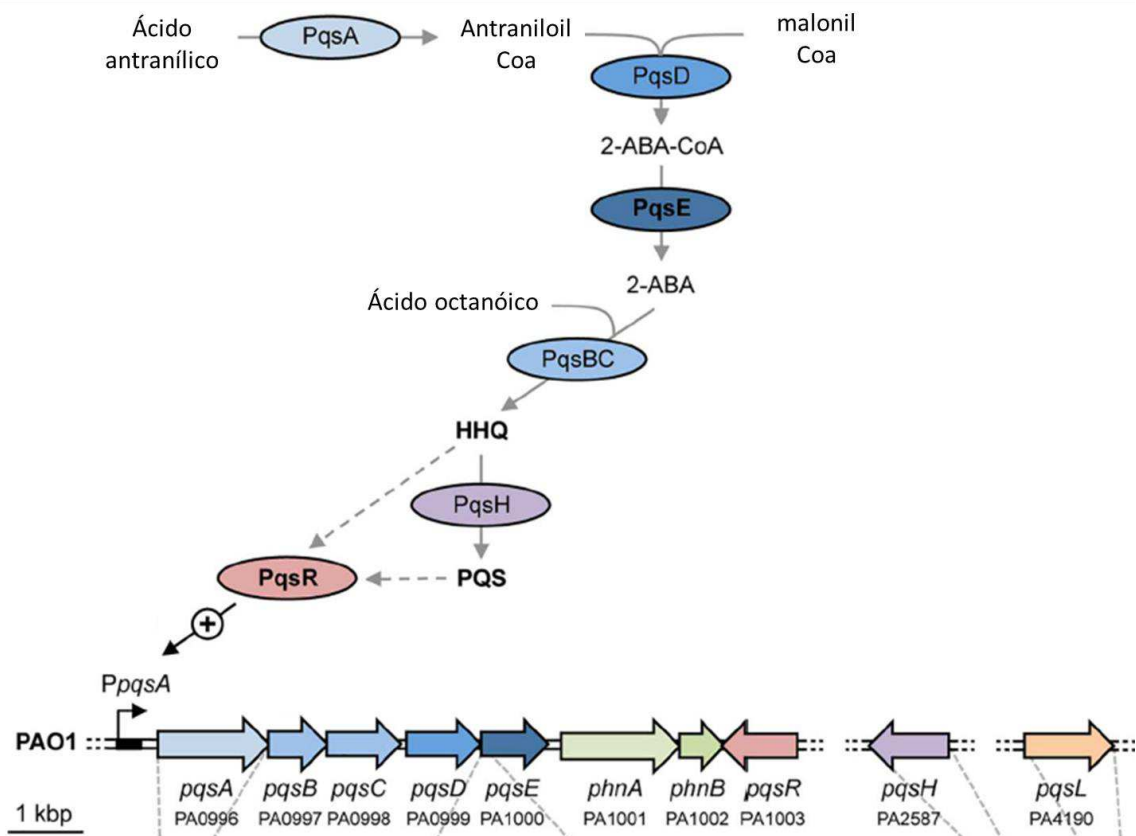
**Figura 2.7** – Estrutura das moléculas sinalizadoras do QS de *P. aeruginosa*



**Fonte:** O autor.

PQS é sintetizado pelos produtos dos genes codificados pelo operon *pqsABCDE* e *pqsH* (Figura 2.8). Neste sentido, o ácido antranílico é convertido em antraniloil-CoA pela enzima PqsA, na sequência antraniloil-CoA é condensado com malonil-CoA pela PqsD para formar 2-aminobenzoil-CoA (2-ABA-CoA). PqsE converte 2-ABA-CoA em 2-aminobenzoilacetato (2-ABA), o qual é condensado com ácido octanóico pelo heterodímero PqsBC, originando HHQ. Finalmente, HHQ é oxidada à PQS pela ação da PqsH. Tanto HHQ quanto PQS se ligam ao regulador transcricional PqsR (também chamado MvfR), o qual atua regulando positivamente a transcrição do operon *pqsABCDE* quando ligado à região promotora *PpqsA* (Rampioni *et al.*, 2016). PQS também atua independentemente de PqsR, induzindo a expressão de diversos genes de virulência (Balasubramanian *et al.*, 2013).

**Figura 2.8** – Biossíntese da PQS



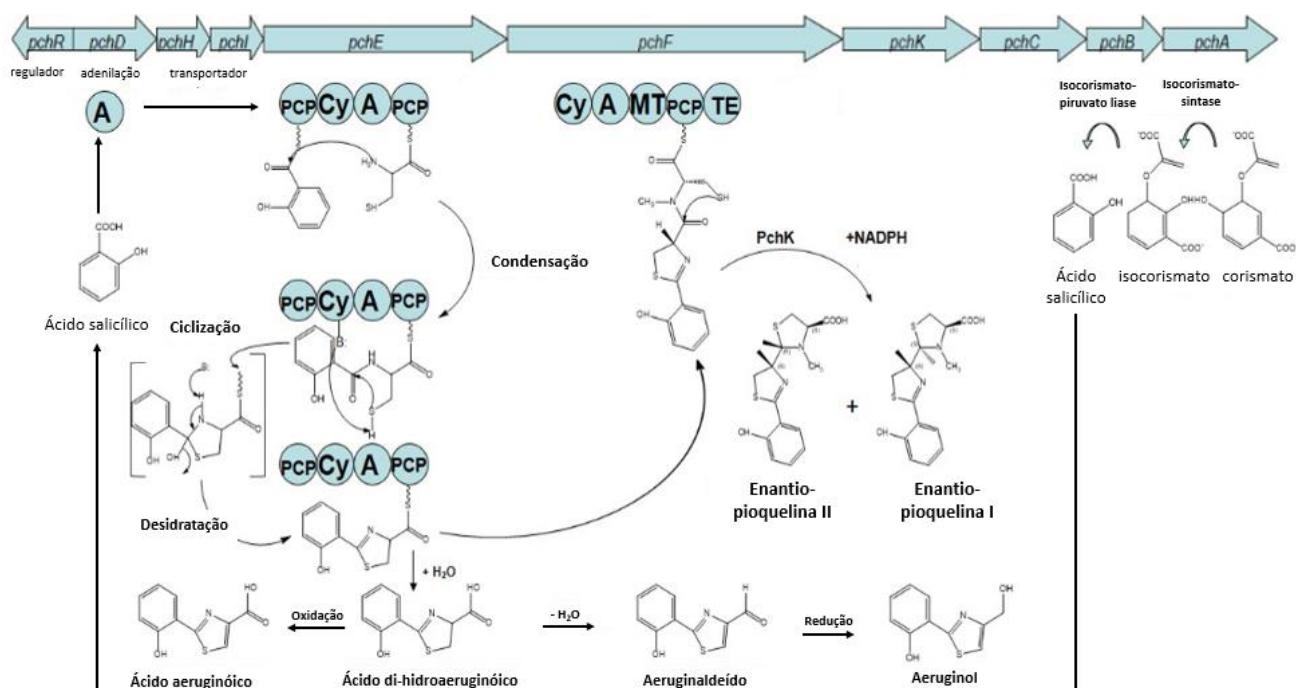
Fonte: Adaptado de Rampioni et al., 2016.

Mais recentemente, LEE e colaboradores (2013) reportaram a descoberta de um novo composto, conhecido como 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído, também denominado aeruginaldeído ou IQS do inglês “*integrated quorum sensing system*” e sugeriram que esta molécula atua como sinalizador de um suposto quarto circuito de QS.

O IQS é sintetizado por peptídeo sintetases não-ribossomais envolvidas na via biossintética das pioquelinas (enantio-pioquelinas), uma classe de sideróforos. A Figura 2.9, mostra a biossíntese de enantio-pioquelina em *Pseudomonas protegens* Pf-5. Primeiramente, as enzimas PchA e PchB sintetizam ácido salicílico a partir do corismato. O ácido salicílico é ativado pela enzima PchD e é ligado ao domínio contendo pantotenato da PchE. O domínio A da PchE ativa uma molécula de cisteína, que é então ligada ao domínio PP da mesma proteína. O anel tiazolina é formado pelo domínio de condensação da PchE e PchF NRPS (peptídeo sintetases não-ribossomais), que carrega as três funções de formação de ligação amida, ciclização e desidratação (Ye et al., 2014).

Infere-se que o ácido di-hidroaeruginóico é liberado pelo domínio de condensação da PchE, ao ser oxidado é convertido em ácido aeruginóico e ao ser desidratado dá origem ao aeruginaldeído, e este pode ser reduzido à aeruginol pela PchK redutase. Na via normal que leva à síntese de enantio-pioquelina, uma segunda molécula de cisteína é ligada pela PchF NRPS e a molécula é liberada pela atividade de tioesterase de PchF (domínio TE) é convertida em enantio-pioquelina pela ação da PchK redutase dependente de NADPH.

**Figura 2.9** – Via biossintética da pioquelina em *P. protegens* Pf-5



Fonte: Adaptado de Ye et al., 2014.

Neste sentido, o uso de indutores do QS pode ser realizado a fim de aumentar a produção de moléculas QS-reguladas. Assim, neste trabalho suplementamos o meio com caseinato de sódio, uma proteína hidrolisada por proteases extracelulares, que são QS reguladas em *P. aeruginosa*. Dessa forma, o consumo dessa proteína pela bactéria é responsável por ativar esse sistema e conseqüentemente aumentar a produção de compostos regulados pelo QS (Sandoz et al., 2007; Camilios-Neto, 2010).

## 2.2. DOR INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta de proteção natural do organismo, que ocorre para combater o agente lesivo (microrganismos, substâncias químicas ou um dano tecidual) com o objetivo de restabelecer a homeostase tecidual (Rodrigues *et al.*, 2007). Os sinais do processo inflamatório são descritos como calor, rubor, edema, dor e se agravado pode levar a perda da função do tecido lesado (Rocha e Silva, 1994).

O início do processo inflamatório se dá pelo reconhecimento da lesão pelo receptor de reconhecimento de padrão (PRR) presente nas células imunes residentes, que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Medzhitov, 2008). Uma vez ativadas, acontece uma cascata intracelular nessas células, que conduz à ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Anrather, Racchumi e Iadecola, 2006).

Ao ser ativado, NF- $\kappa$ B migra para o núcleo, onde inicia a transcrição de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 bem como de moléculas de adesão (Ghosh e Hayden, 2008). Essas citocinas estimulam a produção de outros mediadores da inflamação pelas células endoteliais, como quimiocinas, aminas vasoativas, leucotrieno e prostaglandina, que são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e o aumento da quimiotaxia (Verri *et al.*, 2006).

Através de um gradiente quimiotático, quimiocinas como CXCL1 em conjunto com moléculas de adesão da família das selectinas, recrutam leucócitos para o foco inflamatório (Medzhitov, 2008). Na inflamação aguda, esses leucócitos recrutados tratam-se de monócitos e principalmente de neutrófilos, que produzem grandes quantidades de EROS, como ânion superóxido e óxido nítrico (Anrather, Racchumi e Iadecola, 2006; Salvemini, Riley e Cuzzocrea, 2002). O ânion superóxido dá origem a outras EROS, como radical hidroxila, ácido hipocloroso e oxigênio singlete (Taubert *et al.*, 2003), as quais causam dano tecidual desencadeado pelo estresse oxidativo (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007).

Um dos sinais característicos da resposta inflamatória é a dor, caracterizada como uma sensação desagradável que indica um dano ao organismo e funciona como um alerta para desencadear uma resposta protetiva (Julius e Basbaum, 2001). A dor de origem inflamatória é causada pela liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam os neurônios sensoriais primários (nociceptores) (Braz *et al.*, 2014).

Essas moléculas atuam nas fibras sensoriais periféricas dos nociceptores, ativando canais receptores específicos que vão ser transformados em impulso elétrico, o qual é transmitido até a medula espinal e após é direcionado ao córtex sensorial, onde ocorre a percepção do estímulo doloroso (Julius e Basbaum, 2001).

Os neutrófilos recrutados apresentam papel importante na dor, uma vez que essas células produzem prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), mediador que age nos nociceptores EP2 e EP4 nos neurônios, causando sensibilização neuronal ativando a transmissão de estímulos dolorosos (Pinho-Ribeiro, Verri e Chiu, 2017). Além disso, neutrófilos também são induzidos a produzir citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e ânion superóxido (Anrather, Racchumi e Iadecola, 2006; Salvemini, Riley e Cuzzocrea, 2002). Essas citocinas recrutam mais neutrófilos e os induzem a produzir PGE<sub>2</sub>, que por sua vez, sensibiliza os nociceptores induzindo hiperalgesia (aumento da sensação dolorosa a um estímulo considerado doloroso) (Verri *et al.*, 2006). Já a produção excessiva de ânion superóxido ativa vias de sinalização que contribuem para melhorar sua própria produção (Salvemini, Riley e Cuzzocrea, 2002), e desencadeia cascata de eventos que estimulam NF-B e proteína 1 (AP-1) a produzirem moléculas inflamatórias, como TNF- e IL-1, induzindo inflamação e dor (Choi *et al.*, 2012; Ndengele *et al.*, 2008; Verri *et al.*, 2012).

Para investigar atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias de compostos são utilizados diversos modelos experimentais. Um modelo de inflamação aguda clássica é o da carragenina. A carragenina é um polissacarídeo linear sulfatado extraído de algas-marinhas vermelhas, frequentemente utilizada para desencadear inflamação aguda e dor em experimentos animais (LI *et al.*, 2014). Estudos que utilizaram este carboidrato como estímulo doloroso, demonstraram que houve indução de edema na pata de camundongos, em um processo inflamatório mediado por histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, além de promover aumento na infiltração de neutrófilos locais e consequente liberação de radicais livres como ânion superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico (Necas e Bartosikova, 2013). Já a injeção de carragenina no peritônio induz a produção de EROS e a migração de neutrófilos com a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, *neutrophil extracellular traps*, NETs) (Barth *et al.*, 2016).

Outro modelo aplicado para avaliar efeitos analgésicos em camundongos é o de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (COLLIER *et al.*, 1968). Há evidências de que esta substância estimula macrófagos e mastócitos peritoneais residentes a liberarem as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 (Ribeiro *et al.*, 2000).

O teste da formalina é outro modelo para avaliar dor, em um processo inflamatório que consiste em duas fases, sendo elas neurogênica (primeira-fase) e inflamatória (segunda-fase) (Shibata *et al.*, 1989). Ao ser administrado na pata, o animal demonstra dor através de lambidas e movimentos de sacudidas da pata. A fase neurogênica, que ocorre nos primeiros 5 minutos, está associada com a estimulação direta de nociceptores. Enquanto, na fase inflamatória, que ocorre entre 15-30 minutos, envolve a sensibilização dos neurônios e liberação de prostaglandinas, serotoninas, bradicininas e histaminas (Tjølsen *et al.*, 1992; Yam *et al.*, 2020).

## Capítulo 3 METODOLOGIA

### 3.1. OBTENÇÃO DE METABÓLITOS ATIVOS DE *P. aeruginosa*

#### 3.1.1. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS POR CULTIVOS SUBMERSOS DE *P. AERUGINOSA*

O microrganismo utilizado foi a cepa de *P. aeruginosa* PAO1, isolada na Austrália a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). Esta cepa foi mantida em meio líquido Luria-Bertani (LB), contendo por litro: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl, adicionado de glicerol 20% v/v e estocada a -80°C. A cepa foi transferida para meios sólidos LA (LB adicionado de 1,5% m/v de ágar), antes de ser utilizada para o preparo dos pré-inóculos.

Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio LB. Para o primeiro pré-inóculo inoculou-se 5 colônias de PAO1 proveniente das placas de meio LA e incubou-se por 16 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. O segundo foi inoculado com o primeiro pré-inóculo em uma proporção de 2% v/v e incubado a 37°C por 6 horas sob agitação de 200 rpm.

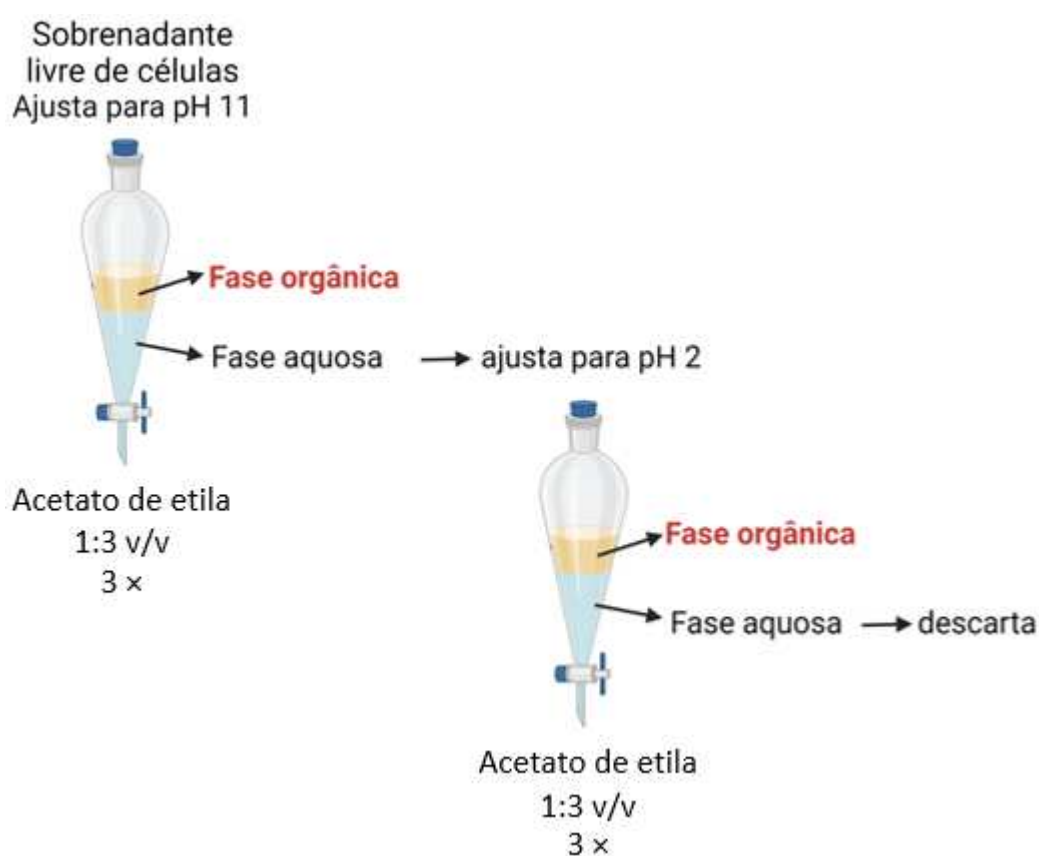
Foram feitos dois tipos de cultivos (A e B) e os ensaios para ambos os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Para o cultivo A, cada frasco continha 100 mL de meio de sais, contendo por litro: 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 1,0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, acrescentado de glicerol 3% v/v. Para o cultivo B cada frasco continha 100 mL de meio de sais adicionado de glicerol 3% v/v e caseinato de sódio 1% m/v. Todos os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121°C, resfriados e inoculados com o segundo pré-inóculo em uma proporção de 2% v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital a 37°C sob agitação de 200 rpm por 3 dias para o cultivo A e por 13 dias para o cultivo B.

Nos tempos apropriados, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 4°C, 4500 rpm por 20 minutos, e os sobrenadantes livres de células foram congelados para posterior processo de extração (item 3.1.2).

### 3.1.2. EXTRAÇÃO LÍQUIDA ÁCIDO-BASE

Para o cultivo A (sem caseinato de sódio) o processo de extração ácido-base foi realizado segundo Bueno (2021). Neste processo, o sobrenadante livre de células teve seu pH ajustado para 11 e extraído com acetato de etila na proporção de 1:3 (acetato de etila/meio) v/v por três vezes utilizando um funil de separação. A fase orgânica foi separada e o pH da fase aquosa foi alterado para 2 e extraída novamente com acetato de etila (Figura 3.1).

**Figura 3.1** – Esquema do processo de extração ácido-base empregado para o cultivo A.

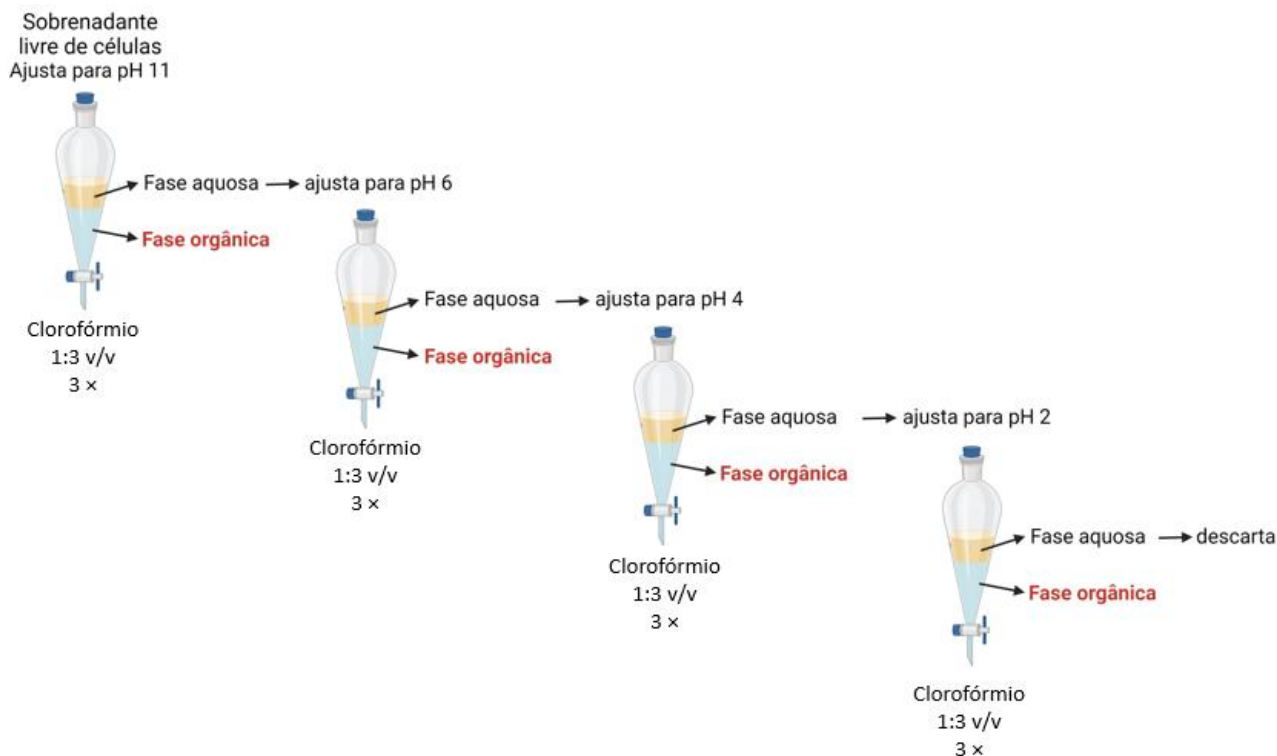


**Fonte:** o próprio autor.

Para o cultivo B (com adição de caseinato de sódio 1%), o processo de extração ácido-base foi realizado segundo Oliveira et al. (2022). O sobrenadante livre de células foi aquecido a 80°C por 45 minutos, resfriado, e após ajuste de pH para 11 foi extraído com clorofórmio na proporção de 1:3 v/v por três vezes. A fase orgânica foi separada e a

fase aquosa teve o pH alterado para 6 e extraída novamente com clorofórmio, e foram feitas sucessivas extrações nos pHs 4 e 2, conforme esquema apresentado na Figura 3.2.

**Figura 3.2** – Esquema do processo de extração ácido-base empregado para o cultivo B



**Fonte:** o próprio autor.

O pH do sobrenadante livre de células e das fases aquosas resultantes das extrações foram ajustados com NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme o valor de pH pretendido. As fases orgânicas de ambos os processos de extração foram evaporadas em evaporador rotatório e após completa secagem sob fluxo contínuo de ar foram obtidos os extratos brutos orgânicos, que tiveram suas massas determinadas por gravimetria (item 3.1.4.1), foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica (item 3.1.4.2), seguido por espectrometria de massas (item 3.1.4.3) e posteriormente submetidos aos processos de purificação (item 3.1.3), que foram acompanhados por CCD analítica.

### 3.1.3. PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS ATIVOS

#### 3.1.3.1. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Para as purificações por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas placas de sílica (15 g de sílica/placa) sob uma superfície de vidro com dimensões de 20 x 20 cm, com 1 mm de espessura de sílica gel 60 P/UV254 (Macherey-Nagel®) e ativadas a 100°C durante 2 horas. Os extratos orgânicos do cultivo B foram dissolvidos em clorofórmio, na concentração de 70 mg/mL, e aplicados nas placas com um capilar. As eluições ocorreram em cuba de vidro utilizando as fases móveis clorofórmio: metanol 10% (para os extratos de pH 11), clorofórmio: metanol 5% (para os extratos de pH 6) e clorofórmio: metanol 7% para os extratos de pHs 4 e 2.

Para o cultivo A, os extratos também foram dissolvidos em clorofórmio na concentração de 70 mg/mL. Utilizou-se a fase móvel clorofórmio: metanol 5% para purificação por CCDP do extrato de pH 2. E para separação da PQS dos extratos básicos por CCDP foi utilizada sílica gel 60 preparada com solução de 5% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (DIGGLES et al., 2003), e a fase móvel utilizada neste processo foi diclorometano: metanol 5%.

Após a separação dos componentes, as placas foram visualizadas sob luz UV e as bandas de interesse foram removidas da sílica, filtradas em funil com clorofórmio e metanol, por fim avaliadas por CCD analítica (item 3.1.4.2). Os compostos a serem raspados das placas foram visualizados por suas cores e/ou fluorescências características: PCA apresenta-se como uma banda amarela, IQS é laranja e PQS é visível apenas sob luz UV, como uma banda que emite fluorescência azul.

Os valores do fator de retenção ( $R_f$ ) foram calculados pela seguinte equação (Stahl, 1969):

$$R_f = \frac{\text{distância do centro da mancha até o ponto de aplicação}}{\text{distância percorrida pelo solvente até o ponto de aplicação}}$$

#### 3.1.3.2. Extração em fase sólida

Amostras purificadas por CCDP dos extratos orgânicos de pHs 4 e 2 passaram por extração em fase sólida utilizando um cartucho de octadecil (Cartucho SPE em PP, C18ec, CHROMABOND®) como fase estacionária (Oliveira, 2022). Primeiramente,

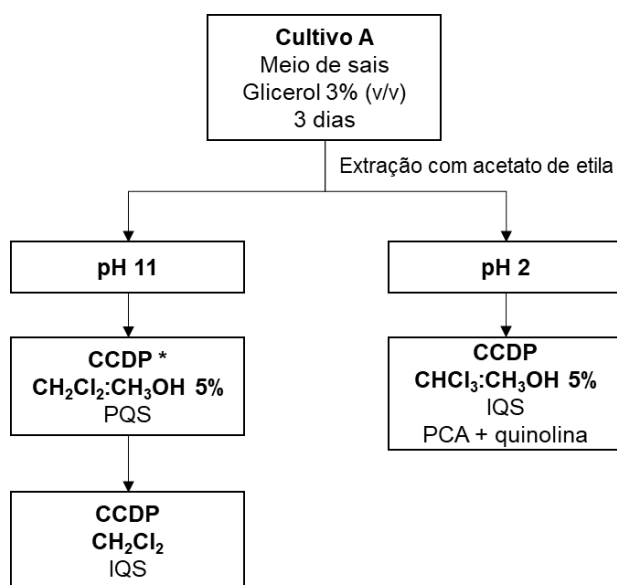
o cartucho de C18 foi ativado com metanol e em seguida lavado com água ultrapura. A amostra, dissolvida em 1 mL de metanol e 4 mL de água ultrapura, foi aplicada no cartucho e extraída (Fração 1). Na sequência foi adicionado 5 mL água ultrapura e extraído (Fração 2), 5 mL de metanol: água 1:1 (Fração 3), 5 mL de metanol: água 1:1 (Fração 4), 5 mL de metanol (Fração 5) e 5 mL de acetonitrila (Fração 6). As frações coletadas foram secas, pesadas e analisadas por CCD analítica.

### 3.1.3.3. Dissolução Fracionada (DF)

À fração purificada por CCDP, que continha as moléculas de PCA e de quinolina, foram adicionados 3 mL de metanol e, após homogeneizar, o composto solúvel neste solvente pôde ser separado.

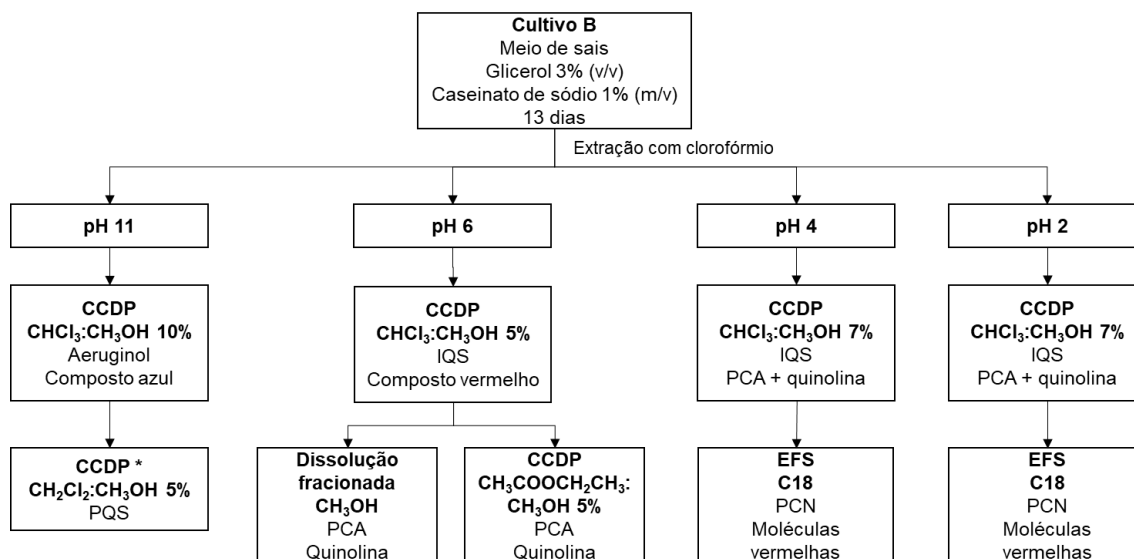
Nas Figuras 3.3 e 3.4 estão apresentados os fluxogramas da metodologia de purificação empregada para cada extrato orgânico e as moléculas foram purificadas por cada método.

**Figura 3.3** – Fluxograma dos processos de purificação empregados para os extratos provenientes do cultivo A.



Fluxograma mostra a técnica de purificação aplicada, o solvente utilizado no processo e a molécula purificada. \* indica que a placa foi ativada com solução de 5% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Figura 3.4** – Fluxograma dos processos de purificação empregados para os extratos provenientes do cultivo B.



Fluxograma mostra a técnica de purificação aplicada, o solvente utilizado no processo e a molécula purificada. \* indica que a placa foi ativada com solução de 5% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### 3.1.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.1.4.1. Gravimetria

As amostras diluídas foram secas em frascos previamente tarados em temperatura ambiente e determinou-se a massa de cada amostra pela diferença de massa.

#### 3.1.4.2. Cromatografia em camada delgada (CCD) analítica

Os extratos brutos orgânicos, as amostras purificadas e os padrões foram dissolvidos em clorofórmio ou metanol e avaliados por CCD (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>) analítica. As fases móveis utilizadas foram as misturas de clorofórmio: metanol 1%, clorofórmio: metanol 10%, metanol 70% e diclorometano: metanol 5%. Para visualização da PQS foi necessário ativar as placas de CCD com solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% por 30 minutos, seguido de incubação a 100°C por uma hora. Após a eluição, as placas foram reveladas sob luz UV e com os reveladores ácido (metanol: ácido sulfúrico 10%) e orcinol (250 mg de orcinol, 45 mL de metanol e 2,5 mL de ácido sulfúrico 98%). Ainda, as placas foram aquecidas em chapa de aquecimento a 235 °C por alguns segundos para

visualização de ramnolípídeos e outros compostos. Calculou-se o fator de retenção dos compostos separados.

#### 3.1.4.3. Espectrometria de massas

A análise foi realizada em um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) de geometria Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray*, operado em modo positivo e negativo com taxa de aquisição de 1 Hz (MS e MS/MS) na faixa de massas de  $m/z$  50 – 600. As análises foram realizadas com voltagem do capilar de 4,0 kV; temperatura da fonte 180°C; e fluxo do gás de dessolvatação 4 L/min. Os experimentos de MS/MS foram realizados utilizando dissociação induzida por colisão (CID) com uma rampa de energia de colisão na faixa de 15 – 40 eV.

#### 3.1.4.4. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da análise de ressonância magnética nuclear (RMN) em estado líquido foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz operado à frequência de 400,6 MHz para  $^1\text{H}$ , e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  usando probe direto de 5 mm, BBO, a 25 °C. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) para hidrogênio são expressos em ppm e calibrados de acordo com o sinal do TMS presente no  $\text{CDCl}_3$  em 0 ppm. Para o carbono foi usado igualmente a escala com unidades em ppm e calibrado com TMS interno em 0 ppm.

#### 3.1.4.5. Quantificação por $^1\text{H}$ -RMN

A determinação da pureza da amostra foi realizada pelo método da quantificação relativa (Bharti & Roy, 2012), realizada a partir do espectro de  $^1\text{H}$  RMN, obtido no equipamento Avance III marca Bruker, utilizando programa de pulso *zgpr* com 8 varreduras (*ns*), com tamanho de *fid* de 65536 (*td, size of fid*), tempo de relaxamento (*d1, relaxation delay*) de 1 s, com ajuste automático polinomial da linha de base. As regiões integradas foram 20 x maiores que a largura do sinal em sua altura média; de 8,77 a

8,00 ppm correspondem aos sinais de hidrogênio relativos ao analito ( $rA$ ); e de 8 a 4,2 ppm e 2.024 a 1,76 ppm para as impurezas ( $rC$ ), observando a ausência de sinais perceptíveis destes contaminantes na região de analito no espectro 2D de  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC (*hsqcedetgmsp.3*, *td* 512x256, número de varreduras *ns* 16). O grau de pureza foi obtido a partir da razão da massa de hidrogênios totais do analito contra a massa total de hidrogênios da amostra seguindo a fórmula abaixo:

$$p\% = \frac{rA}{(rA + rC)} \cdot 100$$

### 3.1.5. MODELAGEM MOLECULAR

Para embasar os resultados experimentais obtidos das extrações ácido-base, foram realizadas as previsões das propriedades físico-químicas das moléculas obtidas, tais como, pKa, protonação em função do pH, ponto isoelétrico, coeficiente de partição e solubilidade em água, utilizando para isto o software Chemicalize® (<https://chemicalize.com/app/calculation>). Estas previsões possibilitaram justificar a obtenção das moléculas extraídas em função do pH do meio. Este método utiliza a estrutura molecular e se baseia na previsão das constantes de ionização aquosa (pKa) de moléculas orgânicas, por meio de parâmetros físico-químicos calculados empiricamente que são obtidos a partir de equações de regressão dos sítios específicos de ionização (Szegezdi e Csizmadia, 2007).

## 3.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DE DI-RAMNOLIPÍDEO EM MODELOS MURINOS DE DOR E INFLAMAÇÃO

### 3.2.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos *swiss*, machos ou fêmeas, adultos, com peso médio de 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas

com livre acesso a água e ração, em ciclo claro/escuro (12/12 h) e temperatura controlada (21°C). Os experimentos comportamentais foram realizados entre 9 e 17 h em uma sala com temperatura controlada. Para coleta das amostras, em momentos apropriados, os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano 5%. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA-UEL) sob processo número 037.2020. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

### 3.2.2. DROGAS

Os compostos utilizados neste estudo foram: solução salina (NaCl 0,9%, Eurofarma Laboratórios S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil), carragenina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), corante nitroazul de tetrazólio (NBT), hematoxilina, eosina (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), xilol (Synth, Diadema, SP, Brasil), ácido acético, formaldeído (Mallinckrodt Baker, S.A., México, Cidade do México) e Di-RL purificado por Mello (2019).

### 3.2.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos foram tratados, por via subcutânea, com Di-RL ou veículo (solução salina) 30 minutos antes da administração de carragenina por via intraperitoneal (i.p.; 1 mg, 100 µL) ou intraplantar (i.pl.; 300 µg, 20 µL). Um grupo induzido com salina foi usado como controle negativo. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 1, 3 e 5 h após a estimulação (i.pl., 300 µg, 20 µL) pelo método eletrônico de von Frey para determinar a dose-resposta de Di-RL (0,3 e 3 mg/kg). A dose de 3 mg/kg de Di-RL foi escolhida para os ensaios seguintes. O método dos filamentos de Von Frey também foi utilizado para o teste de hiperalgesia mecânica realizado 1, 3 e 5 h após a estimulação com carragenina. O número de sacudidas da pata foi avaliado durante 30 minutos após a administração de formalina 1,5% (i.pl., 20 µL). O número de contorções abdominais foi determinado durante 20 minutos após a injeção de ácido acético 0,8% (i.p., 100 µL). Para análise histológica, a pata foi coletada após 5 h de estímulo. Os números de leucócitos totais, células polimorfonucleares e mononucleares foram avaliados no lavado peritoneal 5 h após peritonite induzida pela carragenina. Além disso, a produção de ânion superóxido nos leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal foi avaliada 5 – 6 h após peritonite induzida pela carragenina.

#### 3.2.4. TESTES DE HIPERALGESIA MECÂNICA

A hiperalgesia mecânica foi avaliada pelo método eletrônico de von Frey (CUNHA et al., 2004). Este teste consiste na aplicação de um estímulo mecânico na pata traseira dos animais, com uma ponteira de 0,5 mm de diâmetro. Assim, foi aplicada pressão crescente na pata traseira direita até que a pressão necessária para a resposta de retirada da pata fosse registrada, e a força (*g*) necessária para induzir essa resposta nociceptiva foi quantificada por um analgesímetro digital (Insight®). Os resultados foram expressos pelo valor de delta ( $\Delta$ ), calculado a partir da diferença entre a média das medidas de cada animal nos tempos de 1, 3 e 5 h após o estímulo e a média das medidas antes do estímulo (basal).

Para mensurar o limiar nociceptivo mecânico, também foi realizado o teste do filamento de von Frey (Aesthesio®), conforme descrito por Chaplan et al. (1994). O estímulo mecânico foi aplicado na pata traseira direita do animal, utilizando uma série de filamentos de von Frey com forças de flexão crescentes (0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1,0; 1,4; 2,0 e 4,0 g). Cada filamento foi mantido na pata por 2 a 3 segundos, sendo levemente flexionado e a pressão causada por um determinado filamento foi detectada pelo movimento de retirada da pata. Na ausência de resposta de retirada da pata ao filamento inicialmente selecionado, foi utilizado um filamento mais espesso correspondente a um estímulo mais forte. No caso de retirada da pata, foi utilizado um estímulo mais fraco. A análise do resultado foi realizada pelo *software* UDReader (Up–Down Reader), conforme descrito previamente por Gonzalez-Cano et al. (2018). Os resultados foram expressos pelo logaritmo dos valores brutos.

#### 3.2.5. TESTE DA FORMALINA

Os camundongos foram estimulados com solução de formalina (formaldeído 1,5%) por via intraplantar. Cada animal foi colocado individualmente em um cilindro de vidro e o número de sacudidas da pata (*flinches*) foi contado durante um período de 30 minutos. O período foi dividido em intervalos de 5 minutos, sendo demonstrada a primeira fase (0 – 5 minutos), que corresponde à dor neurogênica, bem como a segunda fase (10 – 30 minutos), que representa o estágio de origem inflamatória. Os resultados foram indicados pelo número de *flinches* em ambas as fases (DUBUISSON; DENNIS, 1977).

### 3.2.6. TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL

Ácido acético 0,8% foi administrado na cavidade peritoneal dos animais, e cada camundongo foi colocado individualmente em um cilindro de vidro. A intensidade nociceptiva foi quantificada pela contagem de contorções durante um período de 20 minutos (VERRI et al., 2008).

### 3.2.7. HISTOLOGIA

Após 5 h da administração de carragenina, o tecido cutâneo plantar foi coletado para análise histopatológica. As amostras foram armazenadas em formalina 10% por 48 h e após lavagem em água corrente foram armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, foram desidratadas em banhos de soluções de etanol com concentrações crescentes (70, 80, 95 e 100%), e na sequência passaram pelo processo de diafanização com xilol para inclusão em parafina. Após serem cortadas em 6 cortes, as amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E), e observadas por microscopia óptica com aumento de 40 vezes e fotografadas. Por fim, as fotos foram analisadas pelo software Image J® (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012) para avaliar o infiltrado leucocitário por meio dos pixels, dado em porcentagem de células por área dérmica.

### 3.2.8. PERITONITE

Peritonite foi induzida por estímulo com carragenina por via intraperitoneal por 5 h. A cavidade peritoneal foi lavada usando 1 mL de EDTA 2mM contendo BSA. O número de leucócitos totais foi contado em uma câmara de Neubauer usando solução de Turk para lisar as hemácias. A contagem diferencial foi realizada pelo preparo de lâminas, que foram coradas baseadas no método de coloração de Romanowsky (Kit Panótico Rápido, Laborclin®, Pinhais, Paraná). Os resultados foram apresentados como o número de leucócitos totais, células polimorfonucleares e mononucleares  $\times 10^6$  (MARTINEZ et al., 2012; MIZOKAMI et al., 2016).

### 3.2.9. ENSAIO DE NITRO BLUE TETRAZOLIUM (NBT)

O lavado peritoneal foi coletado 5 h após a estimulação com carragenina e a produção de ânion superóxido foi avaliada nos leucócitos recrutados na cavidade peritoneal pelo ensaio microscópico de NBT. O lavado foi incubado com solução de NBT (1 mg mL<sup>-1</sup>) e transferido para uma lâmina, que posteriormente foi corada pelo método de Romanowsky (Kit Panótico Rápido, Laborclin®, Pinhais, Paraná). Os resultados foram o número de células positivas para NBT x 10<sup>6</sup> (HYUNG et al., 2006).

### 3.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão das medidas de 6 camundongos, por grupo por experimento e são representativos de dois experimentos separados. A análise de variância de medidas repetidas de duas vias (ANOVA de duas vias) seguida pelo pós-teste de Tukey foi usada para comparar todos os grupos em todos os tempos quando as respostas foram medidas em diferentes momentos após a injeção de estímulo (avaliação de hiperalgesia mecânica). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey foi realizada para dados de experimentos de ponto de tempo único. Para as análises histológicas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises dos dados foram realizadas no GraphPad Prism® 9.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), bem como a elaboração das figuras.

## **Capítulo 4**

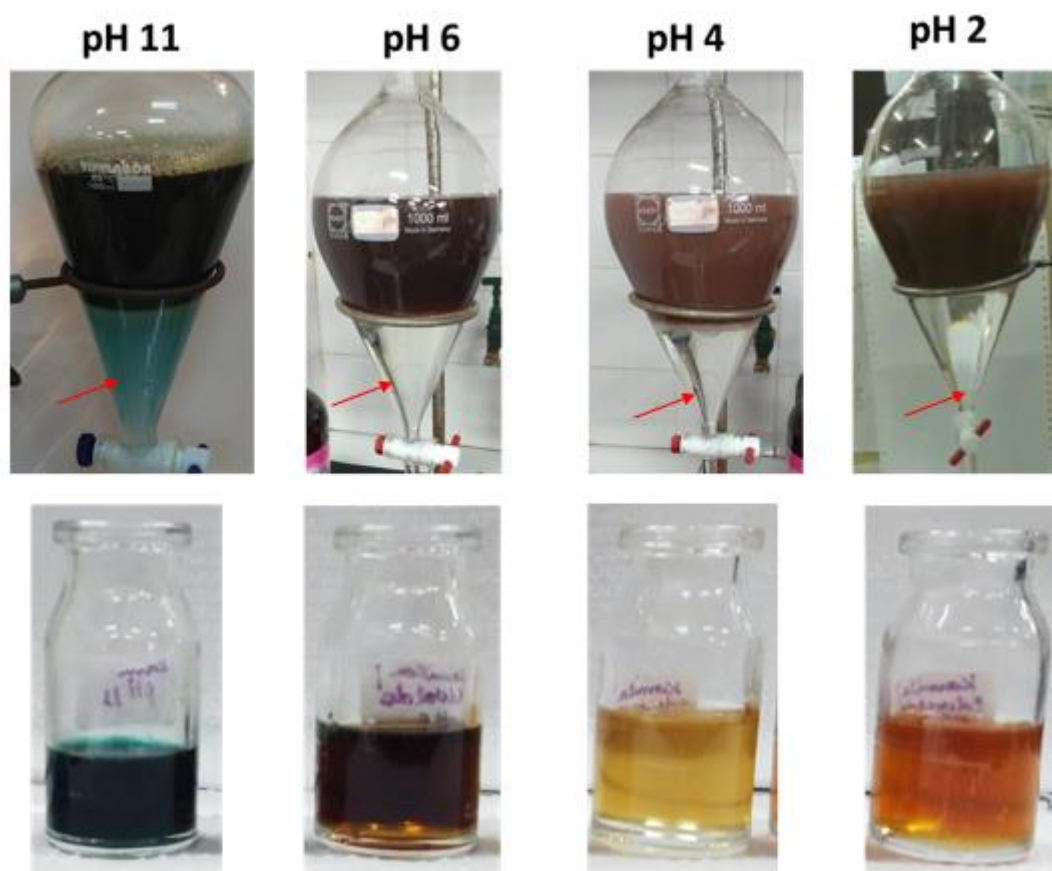
### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo estão apresentados os resultados e discussão dos procedimentos de extração e purificação dos compostos bioativos produzidos por dois tipos de processos fermentativos de *Pseudomonas aeruginosa* (itens 4.1 e 4.2). Adicionalmente, são apresentados resultados de modelagem molecular das principais moléculas obtidas (item 4.3).

#### **4.1. EXTRATOS ORGÂNICOS DO CULTIVO COM ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO**

Os extratos orgânicos advindos do processo de extração ácido-base empregado para o sobrenadante do cultivo com adição de caseinato de sódio (cultivo B) apresentaram diferentes colorações que variaram de azul (pH 11) até tons amarelados (pHs 6 e 4) e alaranjados/avermelhados (pH 2), como pode ser visualizado na Figura 4.1.

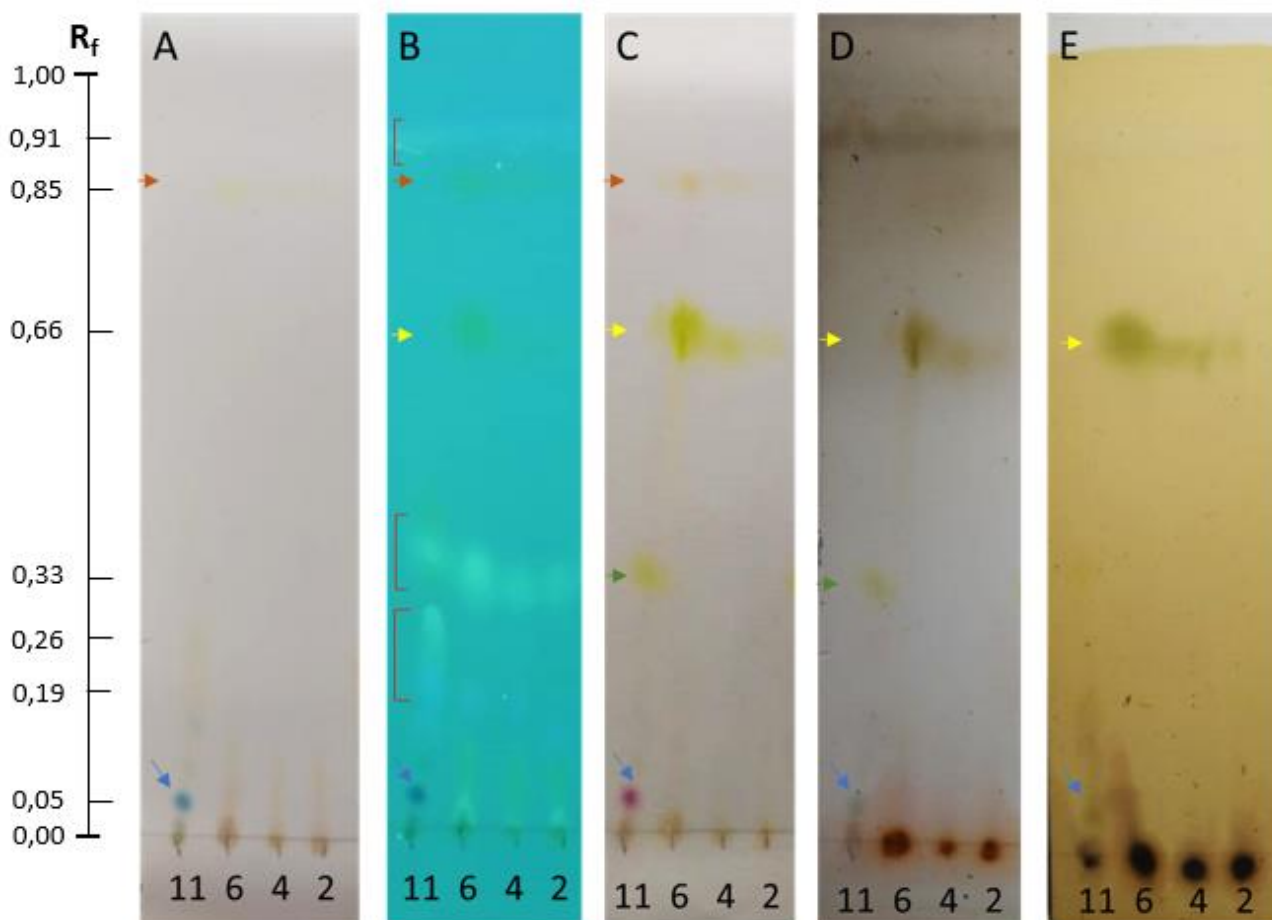
**Figura 4.1** - Processo de extração ácido-base do sobrenadante livre de células do cultivo de 13 dias com adição de caseinato de sódio 1%, nos pHs 11, 6, 4 e 2



Acima (A), está apresentada a separação das fases aquosa e orgânica durante a extração. Setas indicam a fração orgânica. Abaixo (B), as fases orgânicas dos respectivos pHs após evaporação do solvente

As CCDs analíticas dos extratos avaliados mostraram a existência de compostos pigmentados e fluorescentes com diferentes fatores de retenção, como pode ser visualizado na Figura 4.2. A existência de diversos compostos pigmentados, assim como as diferentes cores dos extratos orgânicos, já era esperada, uma vez que a capacidade de secretar estes tipos de compostos coloridos é característica de *P. aeruginosa* (Ali Pambuk, 2017), em especial de compostos da classe de fenazinas (Laursen e Nielsen, 2004; Mentel *et al.*, 2009).

**Figura 4.2** - CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos nos pHs 11, 6, 4 e 2 utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 1%



A) Placa sem revelação; B) revelada sob luz UV; C) com revelador ácido; D) com revelador ácido seguido de aquecimento; E) com orcinol seguido de aquecimento. Setas azuis mostram moléculas azuis. Colchetes vermelhos indicam moléculas fluorescentes. Setas amarelas indicam PCA. Setas verdes indicam composto amarelo. Setas alaranjadas indicam IQS. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

As placas de CCDs analíticas mostram diversos compostos presentes nos extratos: nas placas sem revelação e reveladas sob diferentes formas, como luz UV, e com o uso de reveladores ácido e orcinol, e adicionalmente aquecidas após uso destes reveladores. Os métodos de revelação foram empregados para melhor visualização dos compostos extraídos.

No extrato alcalino, é visível a existência de uma molécula azul desconhecida (indicada pela seta azul), amarela (indicada pela seta verde) e compostos fluorescentes (colchetes vermelhos). O extrato de pH 6 contém compostos fluorescentes (colchetes vermelhos), a fenazina amarela PCA (indicado pela seta amarela) e o IQS (indicado pela seta laranja), ambas já conhecidas e com processos de purificação

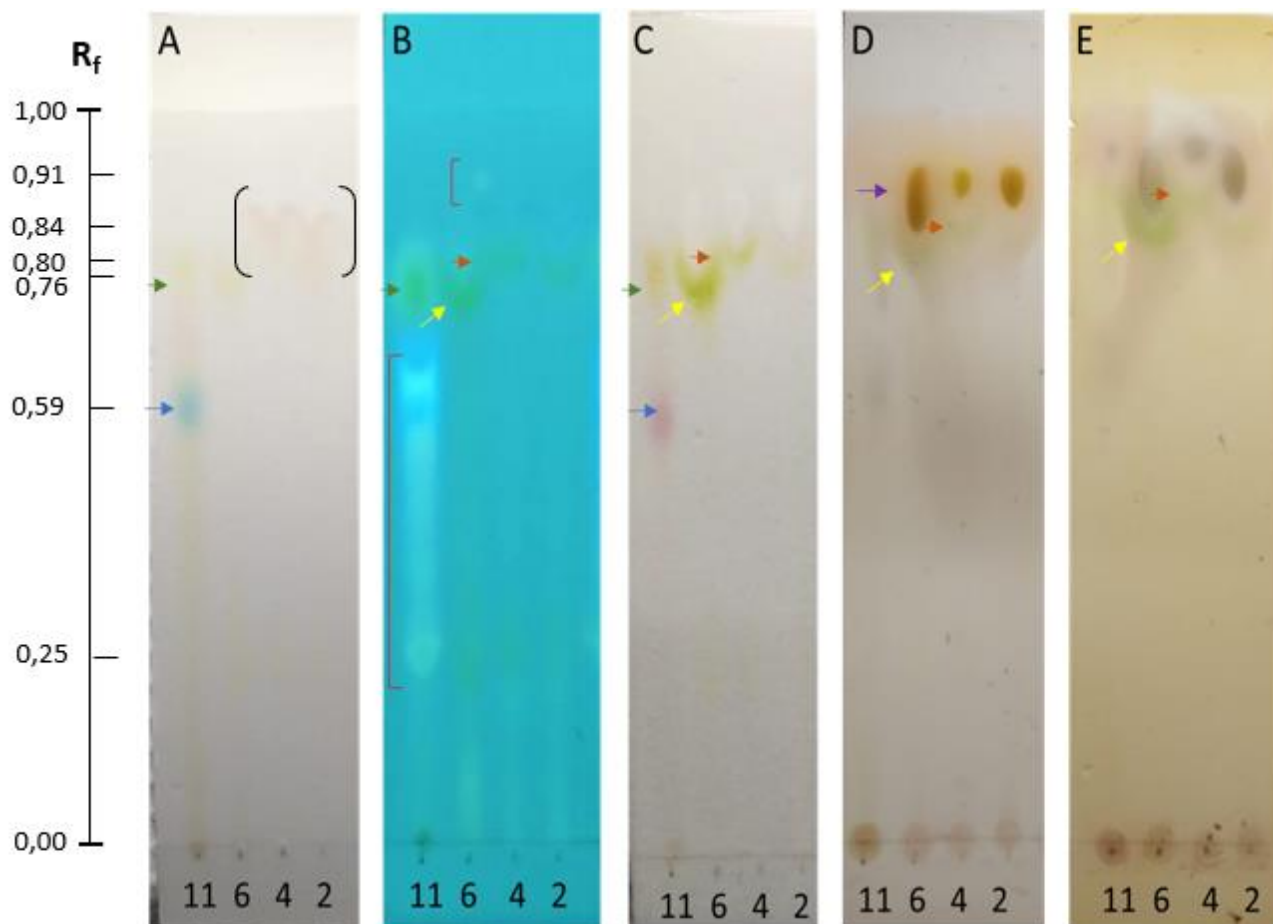
estabelecidos pelo grupo, e caracterizadas por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. Nos extratos mais ácidos (pHs 4 e 2) é possível observar que ainda possui moléculas fluorescentes, IQS e PCA, mas em menor quantidade, e uma proporção maior de moléculas que permaneceram no ponto de aplicação.

As moléculas mais polares permaneceram no ponto de aplicação devido a sua maior afinidade com a sílica em relação à fase móvel de caráter mais apolar. Sendo assim, para obter uma melhor separação destes compostos polares foi necessário utilizar uma fase móvel também de caráter polar como metanol 70% (Figura 4.3).

Nesta fase móvel, as moléculas mais polares migraram do ponto de aplicação, com destaque para moléculas vermelhas desconhecidas e com formato característico extraídas nos pHs 4 e 2, que podem ser observadas na placa sem revelação (entre parênteses). Além disso, ramnolipídeos (de caráter polar) também migraram nesta fase móvel (indicados pela seta roxa) nos extratos de pHs 6, 4 e 2, possuindo o mesmo fator de retenção das moléculas vermelhas. No caso deste processo de extração, ramnolipídeos são contaminantes, já que o processo empregado não foi específico para este composto e mesmo assim foram extraídos em alta quantidade (Wessel, 2018).

Já era esperado que houvesse aumento na produção de ramnolipídeos devido a condição de cultivo empregada, ou seja, da suplementação do meio com caseinato de sódio, uma proteína que atua como indutor transcricional de diversos genes que expressam compostos *quorum*-regulados em *P. aeruginosa*. A adição da caseína no meio foi utilizada com o objetivo de promover maior expressão dos genes relacionados à biossíntese de fenazinas, consequentemente a produção de outras moléculas que também são induzidas por caseinato foram influenciadas positivamente, como a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de ramnolipídeos (Camílios-Neto, 2010; Sandoz, Mitzimberg e Schuster, 2007).

**Figura 4.3** - CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos nos pHs 11, 6, 4 e 2 utilizando como fase móvel metanol 70%



A) Placa sem revelação; B) revelada sob luz UV; C) com revelador ácido; D) com revelador ácido seguido de aquecimento; E) com orcinol seguido de aquecimento. Setas azuis mostram moléculas azuis. Colchetes vermelhos indicam moléculas fluorescentes. Setas amarelas indicam PCA. Setas alaranjadas indicam IQS. Setas verdes indicam composto amarelo. Setas roxas indicam ramnolipídeos. Parênteses indicam moléculas vermelhas. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

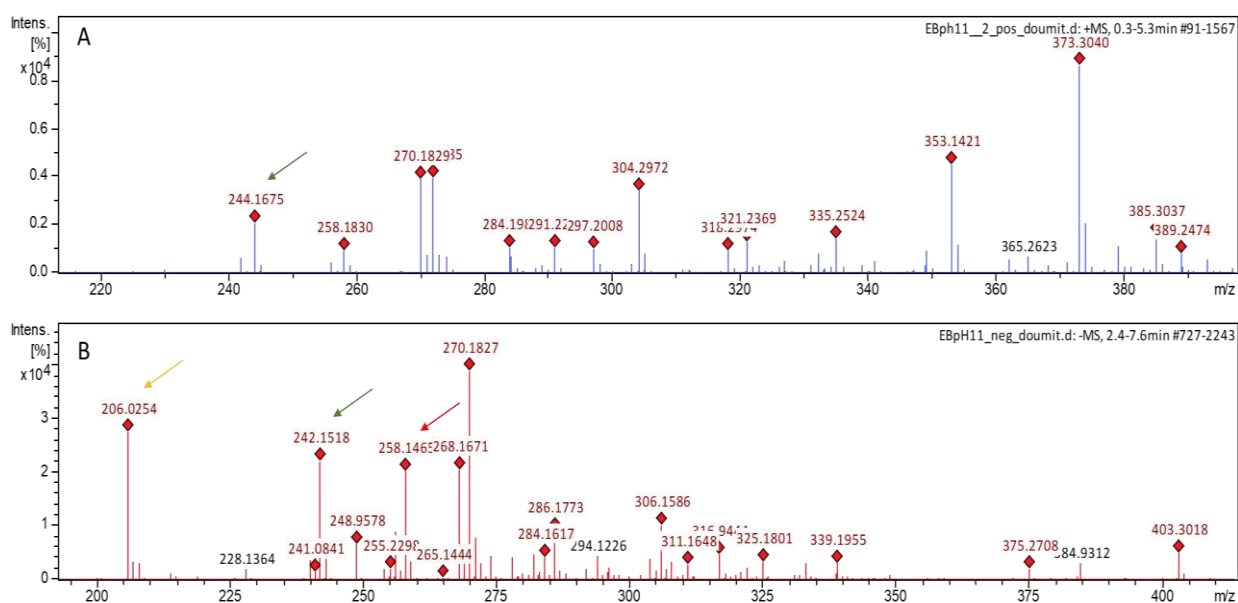
Os rendimentos médios dos extratos orgânicos de três cultivos separados em diferentes pHs estão apresentados na Tabela 4.1. Os extratos de pHs 11 e 6 obtiveram maiores rendimentos e os extratos de pHs 4 e 2 apresentaram menores rendimentos. Esses dados de rendimento foram condizentes com os resultados de Oliveira (2021), que empregou o mesmo processo de produção e extração de compostos bioativos de *P. aeruginosa*.

**Tabela 4.1** - Rendimento dos extratos brutos orgânicos dos cultivos B.

Extrato orgânico	Rendimento (mg L <sup>-1</sup> )
pH 11	105,67 ± 30,32
pH 6	141,66 ± 44,47
pH 4	92,06 ± 28,25
pH 2	83,25 ± 25,47

#### 4.1.1. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO DE PH 11

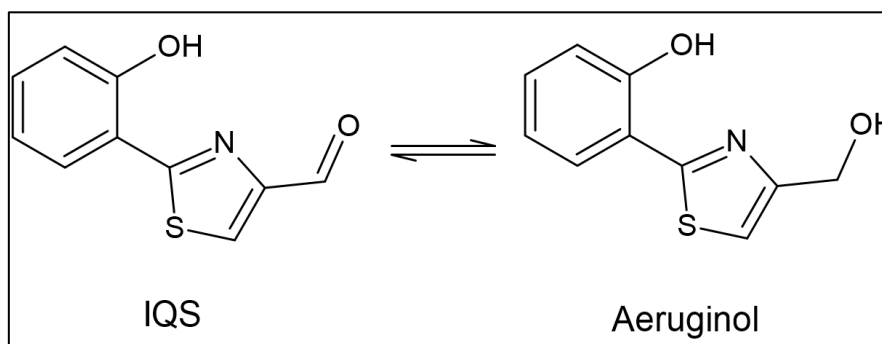
Após análise dos extratos orgânicos por CCDs analíticas, eles também puderam ser analisados por espectrometria de massas. A Figura 4.4 mostra o espectro de massas do extrato bruto orgânico obtido no pH 11, o qual identificou moléculas pertencentes à classe de quinolonas de *P. aeruginosa*, como HHQ e PQS.

**Figura 4.4** - Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico alcalino

A) Modo positivo e B) modo negativo. Seta laranja indica aeruginol, setas verdes indicam HHQ e seta vermelha indica PQS.

O intenso pico do íon molecular em  $m/z$  206,0254, observado no modo negativo  $[M - H]^-$ , caracteriza 2-(2-hidroxi-fenil)-4-hidróxi-metil-tiazol, também denominado aeruginol (indicado pela seta laranja), composto que apresenta massa exata de 207,0354 Da e fórmula molecular  $C_{10}H_9NO_2S$ . Há indícios de que aeruginol e aeruginaldeído (IQS) coexistem e podem funcionar como tampão para evitar o estresse oxidativo no microrganismo produtor (Figura 4.5), uma vez que aeruginol pode ser convertido em IQS por oxidação (Ye *et al.*, 2014).

**Figura 4.5** - Estrutura do IQS e do aeruginol



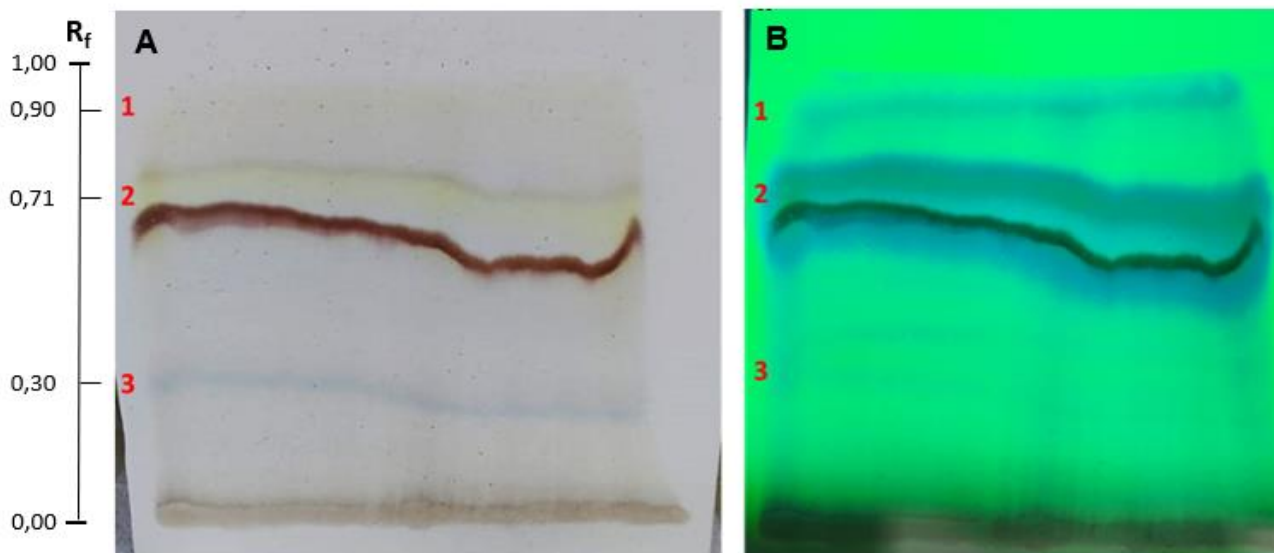
As setas verdes indicam os picos em  $m/z$  244,1675  $[M + H]^+$  e 242,1518  $[M - H]^-$ , nos modos positivo e negativo, respectivamente, referentes a molécula da quinolona HHQ, precursora de PQS, de massa exata 243,1623 Da e fórmula molecular  $C_{16}H_{21}NO$ . O espectro de ESI em modo negativo revela ainda o pico em  $m/z$  258,1465  $[M - H]^-$ , que se trata da quinolona sinalizadora PQS, a qual possui massa exata de 259,1570 Da e fórmula molecular  $C_{16}H_{21}NO_2$ .

O extrato bruto de pH 11 foi submetido a cromatografias de camada delgada preparativa (CCDP) para separação e identificação dos constituintes extraídos. Para o primeiro processo de purificação deste extrato foi utilizada a mistura clorofórmio: metanol 10% como fase móvel. O resultado deste processo está apresentado na Figura 4.6.

Diversos compostos coloridos e fluorescentes foram observados. As zonas de interesse (indicadas pelos números) foram raspadas das placas e extraídas com solvente, sendo a purificação acompanhada por CCDs analíticas. A Figura 4.7 mostra o resultado desta separação, por CCD analítica. Os números representam os compostos purificados na

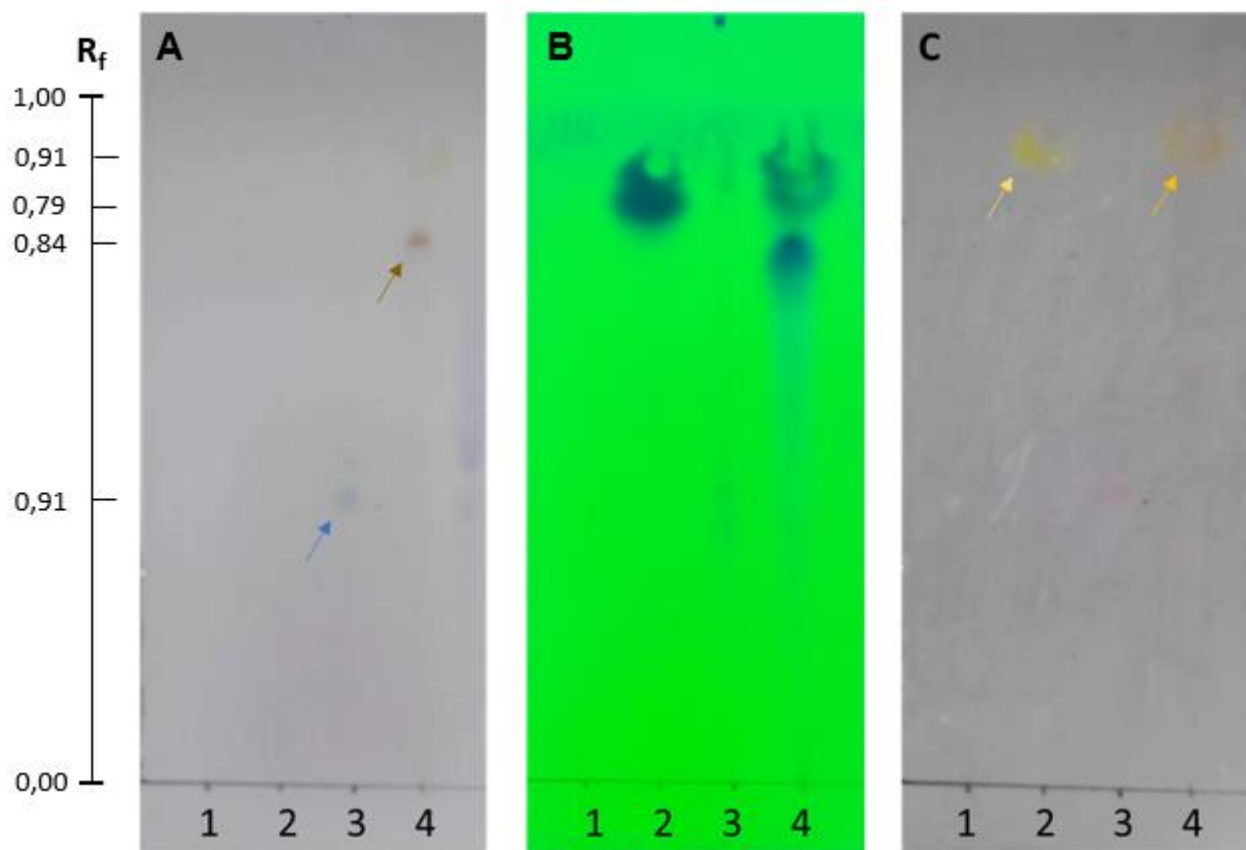
Figura 4.6, sendo o número 4 a fração que extraiu o restante da placa, incluindo o ponto de aplicação, exceto as zonas 1, 2 e 3.

**Figura 4.6** - Processo de purificação do extrato de pH 11 por CCDP



A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 10%. A) Placa após a eluição (sem revelação) e B) placa revelada sob luz UV. Os números indicam as bandas de compostos separados que foram extraídos da placa. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

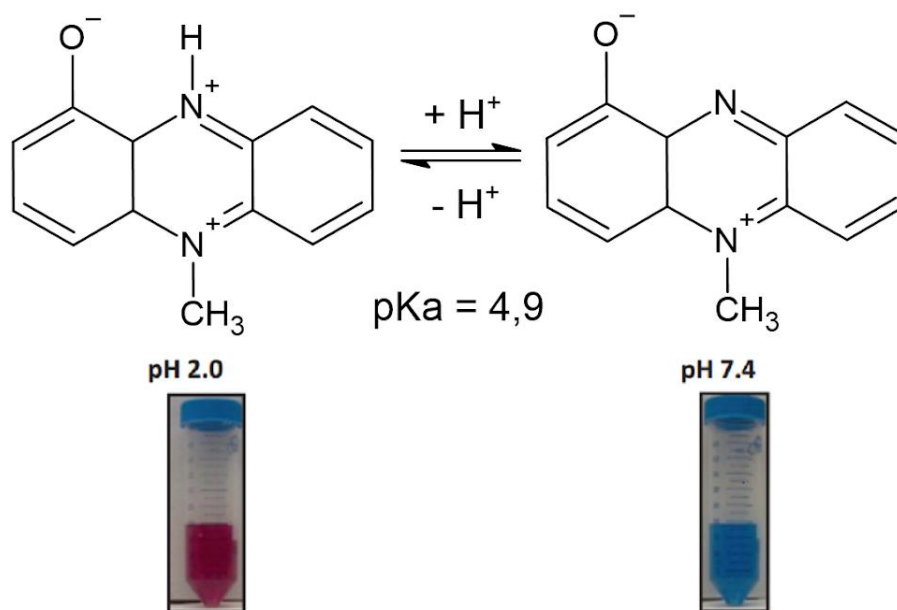
**Figura 4.7** - CCDs analíticas das frações provenientes do processo de purificação, por CCDP, do extrato de pH 11



A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 10%. A) Placa sem revelação, B) placa revelada sob luz UV e C) placa revelada com metanol:ácido sulfúrico 10%. Seta amarela indica composto amarelo, seta laranja indica composto alaranjado, seta marrom indica composto marrom e seta azul indica composto azul. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

As placas de CCDs analíticas acima mostram que um composto amarelo (indicado pela seta amarela) foi purificado na segunda fração ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ), que possivelmente é aeruginol, porém ainda possui um contaminante fluorescente (visualizado sob luz UV) com fator de retenção muito próximo. Composto azul (indicado pela seta azul) desconhecido foi purificado na terceira fração ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ), com alto grau de pureza. Inicialmente, acreditávamos que esse composto seria PYO, pelo fato do pigmento apresentar cor azul em valores de pH alcalino e próximo ao neutro e após revelação com ácido o mesmo se torna rosa/vermelho, essa alteração da cor dependente do pH é característica da PYO (Figura 4.8), como já foi demonstrado por Rada e Leto (2013) e (O'Malley *et al.*, 2004). Porém, o espectro de massas do extrato bruto não apresentou o pico que indica a presença desta molécula, que possui massa exata de  $210,079313 \text{ Da}$  e fórmula molecular  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ .

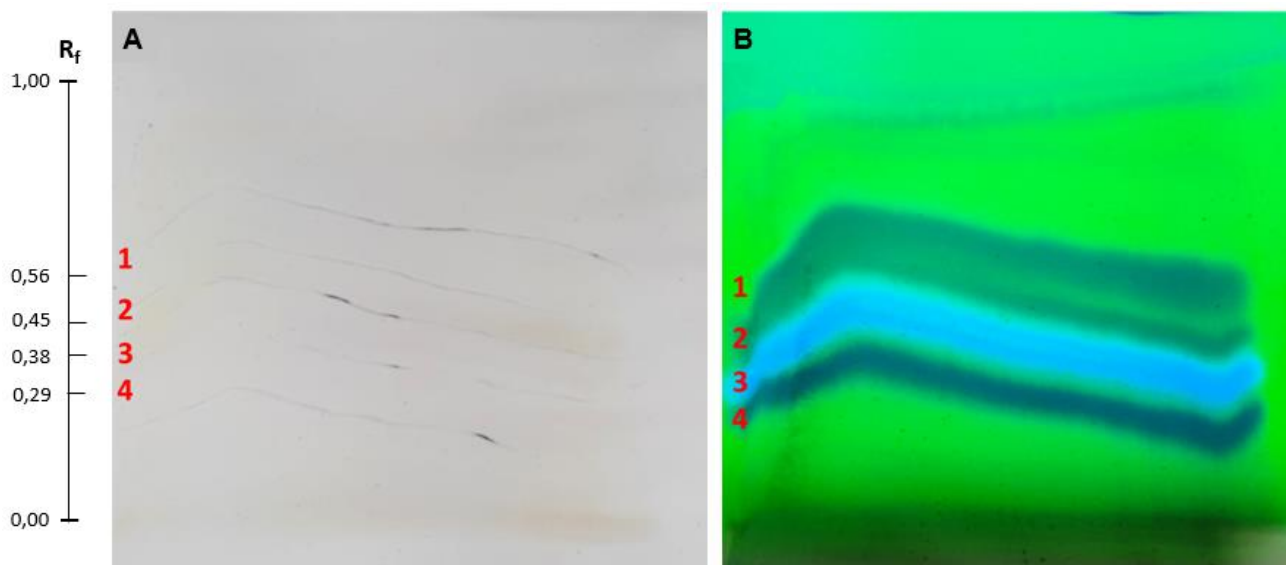
**Figura 4.8** - Estrutura da PYO em dois estados de protonação



**Fonte:** Adaptado de Rada e Leto (2013) e (O'Malley *et al.*, 2004).

A amostra 4, que contém o restante da placa do primeiro processo de purificação, apresentou substâncias de cor marrom (indicada pela seta marrom), laranja (seta laranja) e compostos fluorescentes. Ainda é necessário confirmar a estrutura dessas moléculas purificadas. Dessa forma, a quarta fração passou por mais uma purificação, uma vez que apresentava mais de um composto. Porém, foi utilizada a fase móvel diclorometano: metanol 5% e a placa foi ativada com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5%. Como visualizado na Figura 4.9, foram separadas quatro substâncias fluorescentes, sendo possível identificar a molécula de PQS pela sua fluorescência natural (banda azul fluorescente) visualizada sob luz UV (número 3).

**Figura 4.9** - Purificação da amostra 4 do extrato básico por CCDP

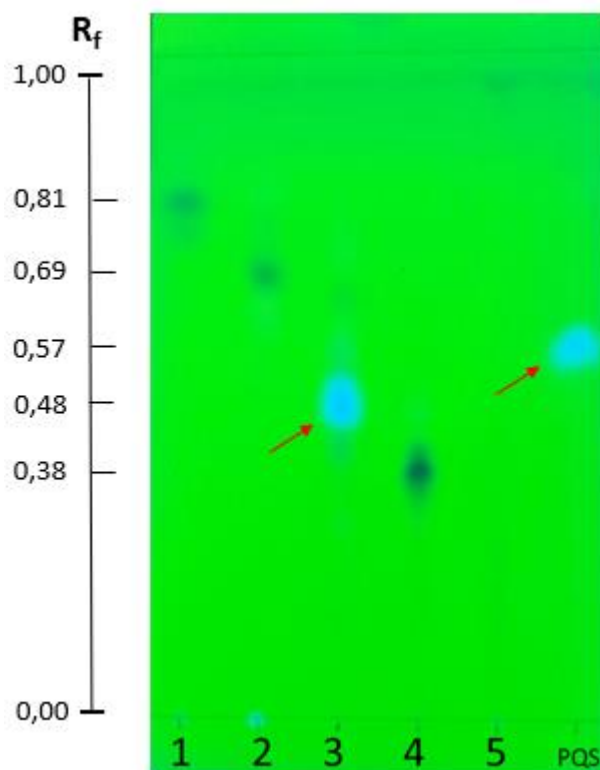


A fase móvel utilizada foi diclorometano: metanol 5% e a placa foi ativada com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5%. A) Placa sem revelação e B) placa revelada sob luz UV. Os números indicam as bandas de compostos separados que foram extraídos da placa. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

De acordo com a CCD analítica (Figura 4.10) dos compostos purificados anteriormente foi possível confirmar a presença de PQS (indicado pela seta vermelha) pela comparação da fluorescência com o padrão comercial desta molécula, o qual foi obtido com bastante pureza, corroborando com os achados do espectro de massas (Figura 4.4). Entretanto, não foi possível avaliar o rendimento devido a pouca massa do composto obtido.

Trabalhos anteriores do grupo, Bueno (2021) e Velasco (2020) avaliaram os tempos de produção de PQS, com 3 e 9 dias, utilizando meio de cultivo sem caseinato de sódio como indutor do sistema QS da bactéria, bem como a extração alcalina com acetato de etila e purificação deste composto. No presente trabalho, PQS foi obtido a partir de um cultivo que utilizou indutor de produção de moléculas QS-reguladas e com duração de 13 dias, ou seja, as condições empregadas provocaram um aumento na produção de substâncias que poderiam dificultar a obtenção de PQS. Bueno (2021), encontrou maior produção de PQS com 3 dias de cultivo (7 mg), indicando que maior produção ocorre nos primeiros dias de fermentação, o que explicaria o baixo rendimento obtido aqui.

**Figura 4.10** - CCD analítica das frações provenientes do processo de purificação da amostra 4 do extrato básico por CCDP



A fase móvel utilizada foi diclorometano: metanol 5% e a placa foi ativada com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5%. Placa revelada sob luz UV. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

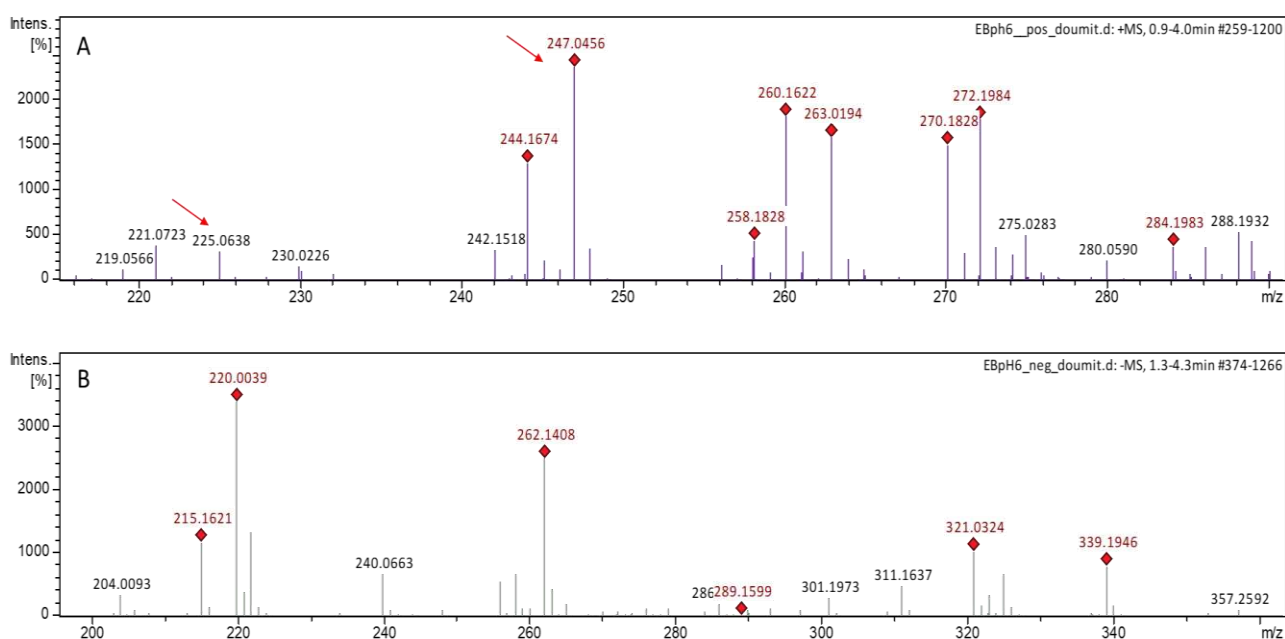
Consistente com esses resultados, McKnight, Iglewski e Pesci (2000) constataram que PQS é produzido em maior concentração entre 30 e 42 h, diminuindo após 48 h de crescimento. Outro fator relacionado ao baixo rendimento, pode ser o fato de *P. aeruginosa* sintetizar dioxigenases que degradam PQS (Pustelny *et al.*, 2009).

Segundo Häussler e Becker (2008), PQS diminui os níveis intracelulares de EROS, exibindo atividade antioxidante semelhante à do ascorbato, propriedades não pertencentes à HHQ. Além disso, essa molécula está envolvida na tolerância da bactéria à raios UV. Skindersoe e colaboradores (2009), demonstraram que essa quinolona sinalizadora diminui a produção de IL-12 por células dendríticas derivadas da medula óssea estimuladas por LPS de *Escherichia coli*, sem alterar sua liberação de IL-10. No estudo de Kim e colaboradores (2010), foi revelado que PQS e HHQ suprimem a resposta imune inata de mamíferos, ao atrasar a degradação de I $\kappa$ B e conseqüentemente reduzir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, responsável pela expressão de genes de inflamação, como das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6.

#### 4.1.2. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO DE PH 6

O espectro de massas do extrato bruto orgânico obtido no pH 6 (Figura 4.11), mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  225,0638  $[M + H]^+$  e um pico abundante em  $m/z$  247,0456  $[M + Na]^+$ , indicados pelas setas vermelhas, ambos caracterizando a molécula de PCA, cuja massa exata é 224,0585 Da e fórmula molecular  $C_{13}H_8N_2O_2$ .

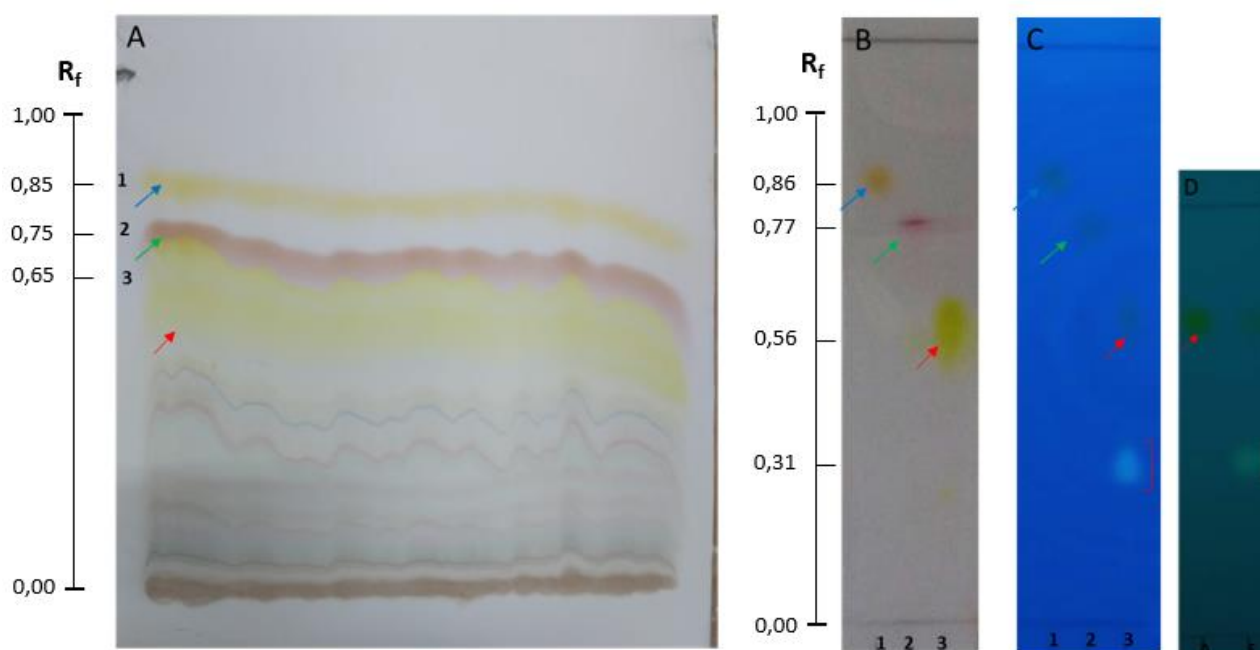
**Figura 4.11** - Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico de pH 6



A) Modo positivo e B) modo negativo. Setas vermelhas indicam PCA.

A partir da purificação por CCDP do extrato de pH 6 (Figura 4.12 A) foram visivelmente separadas três substâncias pigmentadas: composto alaranjado (1), composto vermelho (2) e composto amarelo (3). Estes foram extraídos da placa e posteriormente avaliados por CCD analítica (Figura 4.12 B e C).

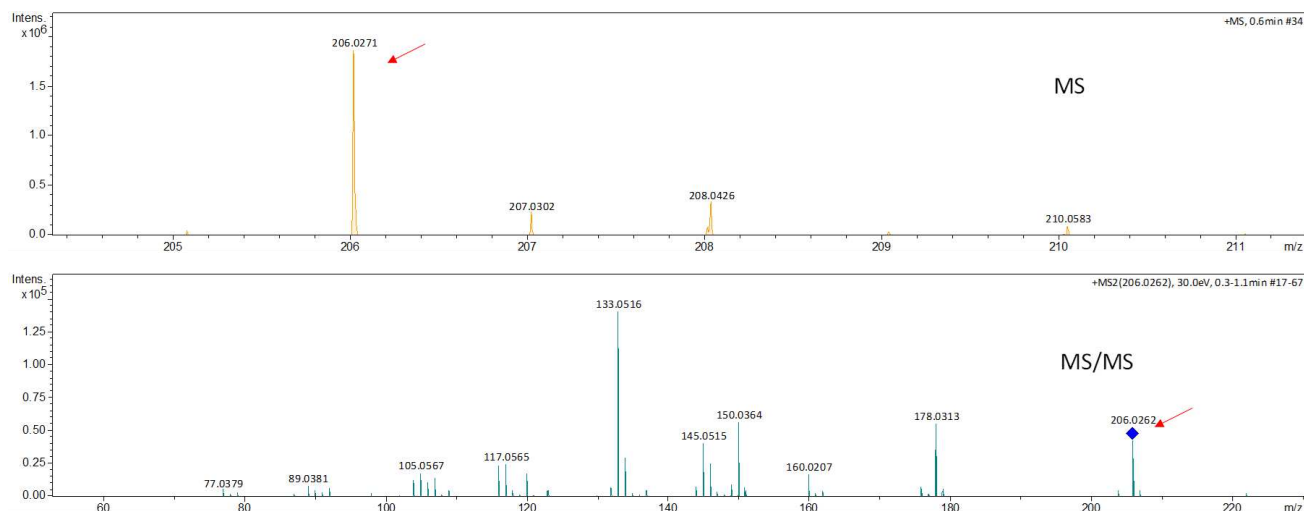
**Figura 4.12** - Processo de purificação do extrato de pH 6 por CCDP



A) A fase móvel utilizada na CCDP foi clorofórmio: metanol 5%. Placa sem revelação. A fase móvel utilizada nas CCDs analíticas (B, C e D) foi clorofórmio: metanol 1%, sendo B) placa revelada com ácido, C) placa revelada sob luz UV e D) placa revelada sob luz UV após processo de dissolução fracionada. Os números indicam as bandas de compostos separados que foram extraídos da placa de CCDP. Seta azul indica IQS. Seta verde indica composto vermelho. Seta vermelha indica PCA e colchete vermelho indica quinolina. Fração "A" indica PCA e fração "F" indica quinolina. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

O composto laranja, foi obtido com alta pureza ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ), sendo identificado como IQS (Figura 4.13), com pico predominante em  $m/z$  206,0271  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (indicado pela seta vermelha). A massa exata deste composto é 205,0192 Da, cuja forma molecular é  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ .

**Figura 4.13** - Espectro de massas obtidos por ESI-qTOF de IQS



Seta vermelha indica IQS.

É provável que IQS tenha efeito contra fungos e bactérias, pois já foi reportado que seu precursor, o ácido di-hidroaruginóico sintetizado por *P. fluorescens* PFM2, mostrou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola*, *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas fluorescens* e atividade antifúngica contra *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* (Carmi *et al.*, 1994). Mais recentemente, Thissera e co-autores (2020), mostraram que o IQS apresenta boa atividade antifúngica contra *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*.

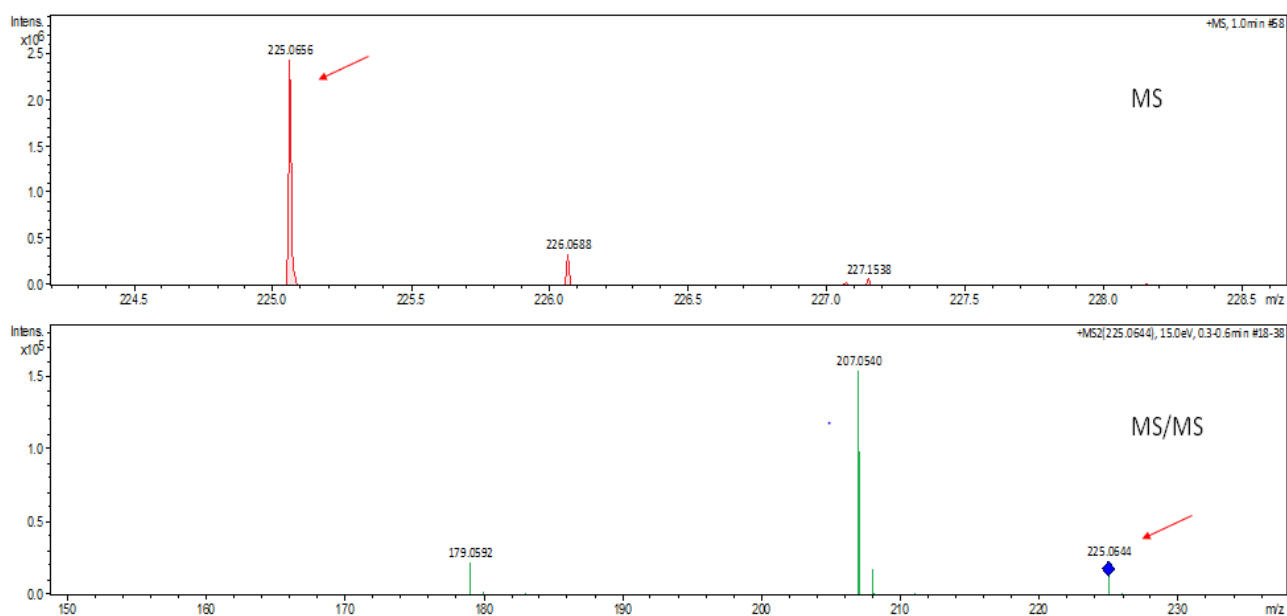
Wang e colaboradores (2019), forneceram evidências de que IQS induz a apoptose de células do hospedeiro, contribuindo para a infectividade de *P. aeruginosa*. Além disso, Kaplan, Musaeu e Wuest (2021) avaliaram os subprodutos ácido di-hidroaeruginóico, ácido aeruginóico, IQS e aeruginol, da via biossintética da pioquelina, e revelaram que essas moléculas são capazes de se ligarem ao ferro e promover o crescimento de *P. aeruginosa*, de forma semelhante a um sideróforo.

O composto vermelho também foi purificado ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), e será caracterizado posteriormente. Por outro lado, a fração de número 3 (Figura 4.12 C) que contém o composto amarelo (indicado pela seta vermelha) ainda continha um contaminante fluorescente de  $R_f$  menor, indicado pelos colchetes. Para separar estes compostos desta amostra, foi utilizado o método de dissolução fracionada, que consistiu em utilizar metanol para solubilizar apenas uma das moléculas, e assim possibilitando a separação. Pela análise da placa D da Figura 4.12 constatou-se que foi possível purificar o composto amarelo (fração A), solúvel em

metanol, sem contaminantes (seta vermelha). Porém, a fração que concentrou o composto fluorescente (fração F) ainda continha pequena quantidade do composto amarelo.

Esse composto amarelo purificado foi identificado por espectrometria de massas como PCA (Figura 4.14), apresentando o pico do íon molecular em  $m/z$  225,065 [M + H]<sup>+</sup>. A massa exata de PCA é 224,0580 Da com a fórmula molecular C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

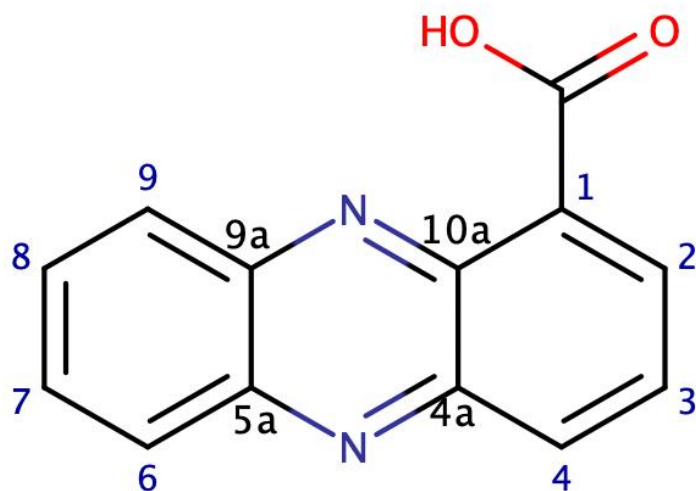
**Figura 4.14** - Espectro de massas obtidos por ESI-qTOF de PCA



Seta vermelha indica PCA.

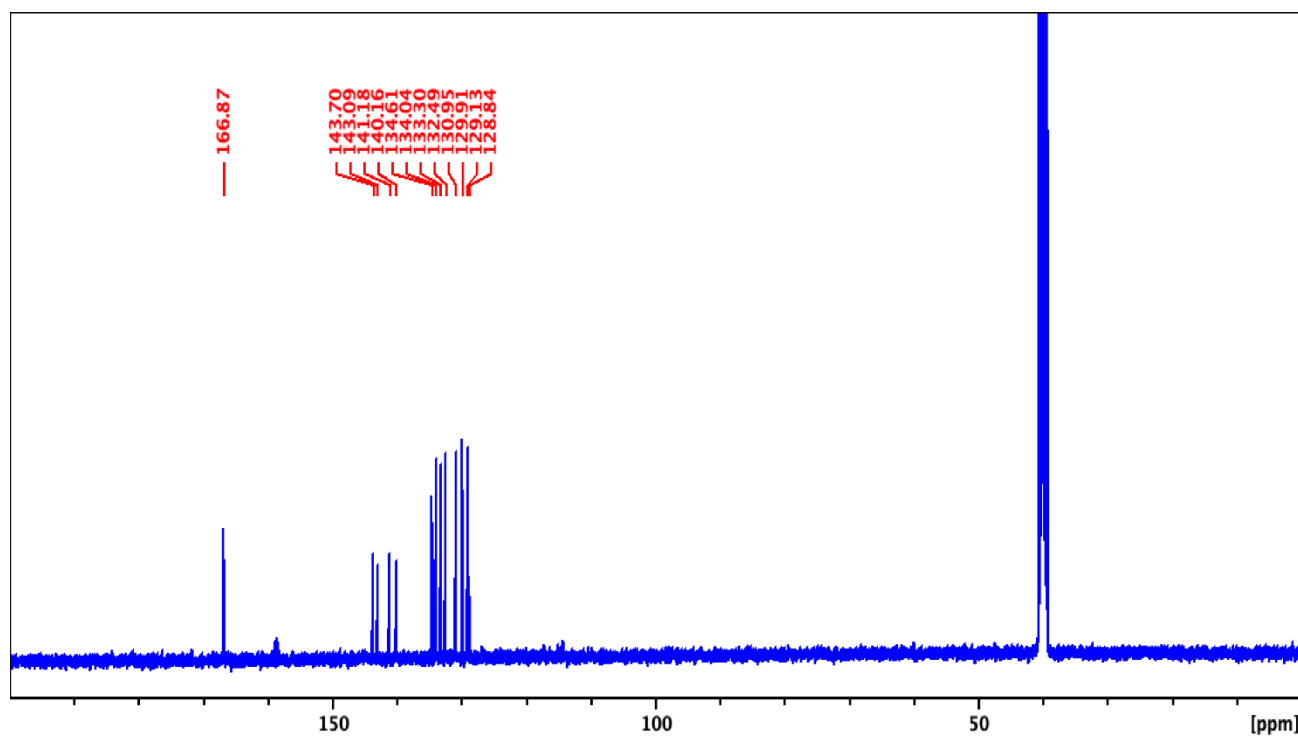
A estrutura desta molécula (Figura 4.15) foi confirmada por dados de RMN. O espectro de <sup>13</sup>C RMN apresenta 7 sinais de carbonos acoplados a hidrogênios, que poderiam corresponder aos carbonos 2, 3 e 4 no anel substituído e 6, 7, 8 e 9 no anel à esquerda.

**Figura 4.15** - Estrutura do ácido fenazina-1-carboxílico (PCA)



O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN apresentando 13 carbonos (Figura 4.16) está simplificado na Tabela 4.2, sendo os sinais de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  RMN assinalados segundo descrito na literatura (Luo *et al.*, 2015; Rosandy & Khalid, 2020).

**Figura 4.16** - Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  de PCA, em DMSO- $d_6$ , a 25 °C



**Tabela 4.2** - Assinalamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a molécula PCA obtidos a partir da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear

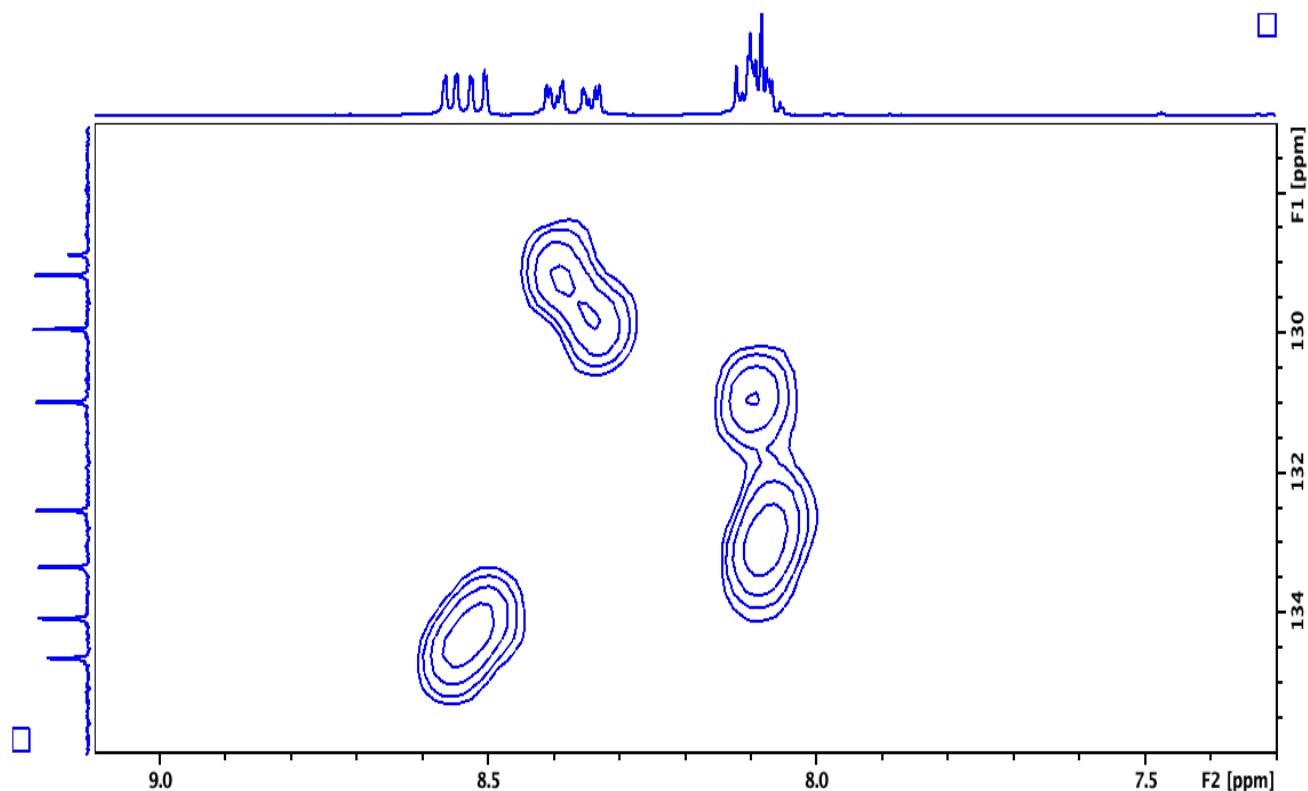
Posição	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm) *	$^{13}\text{C}$ (ppm) **
1	---	128,8	---	125,0
2	8,51	133,8	8,54	135,1
3	8,09	130,9	8,05	130,3
4	8,56	134,5	8,99	137,5
4a	---	143,7	---	144,1
10a	---	143,1	---	143,4
5a	---	141,2	---	140,1
6	8,33	132,9	8,35	130,1
7	8,09	130,9	7,99	131,8
8	8,07	133,3	8,02	133,2
9	8,38	129,9	8,29	128,0
9a	---	140,2	---	139,9
-COOH	---	166,9	---	165,9

\* Luo *et al.*, 2015

\*\* Rosandy & Khalid, 2020

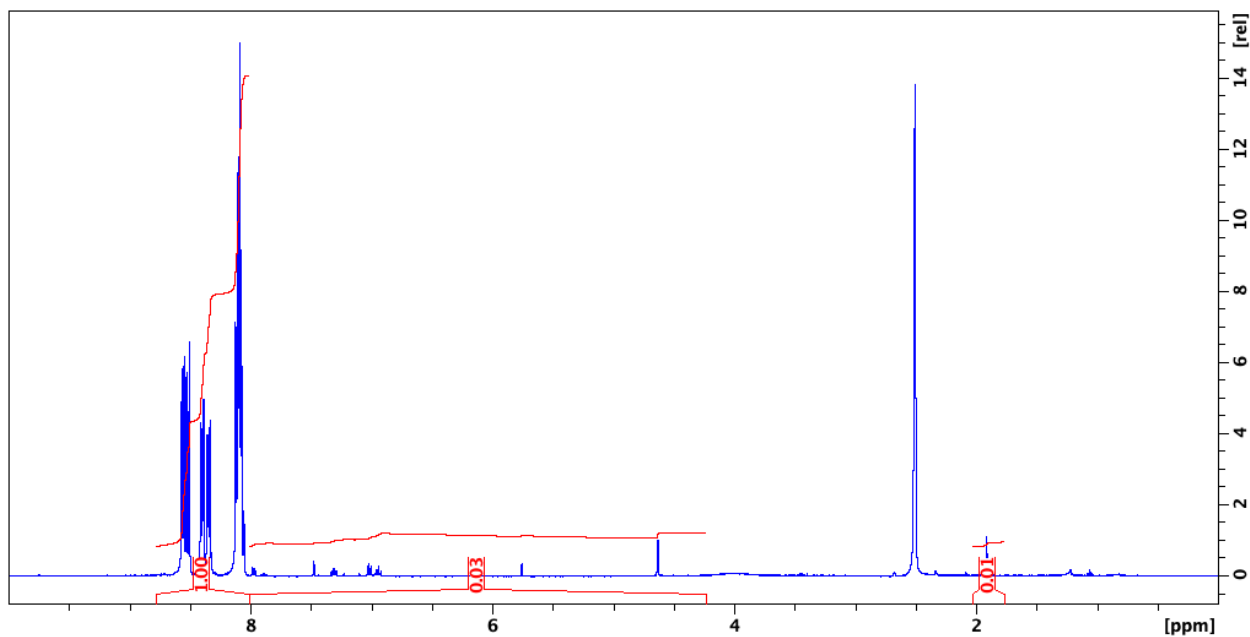
O sinal mais característico é o do grupo carboxílico em 166,9 ppm, sem acoplamento com hidrogênio, assim como os quatro sinais de carbono quaternários do heterociclo. Os núcleos de hidrogênio 2, 3, 4 e 6, 7, 8, 9 tem sinais próximos e foram assinalados segundo os deslocamentos químicos e acoplamentos observados no espectro de  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (Figura 4.17), e encontrados na literatura.

**Figura 4.17** - Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de PCA, em DMSO-d<sub>6</sub>, a 25 °C



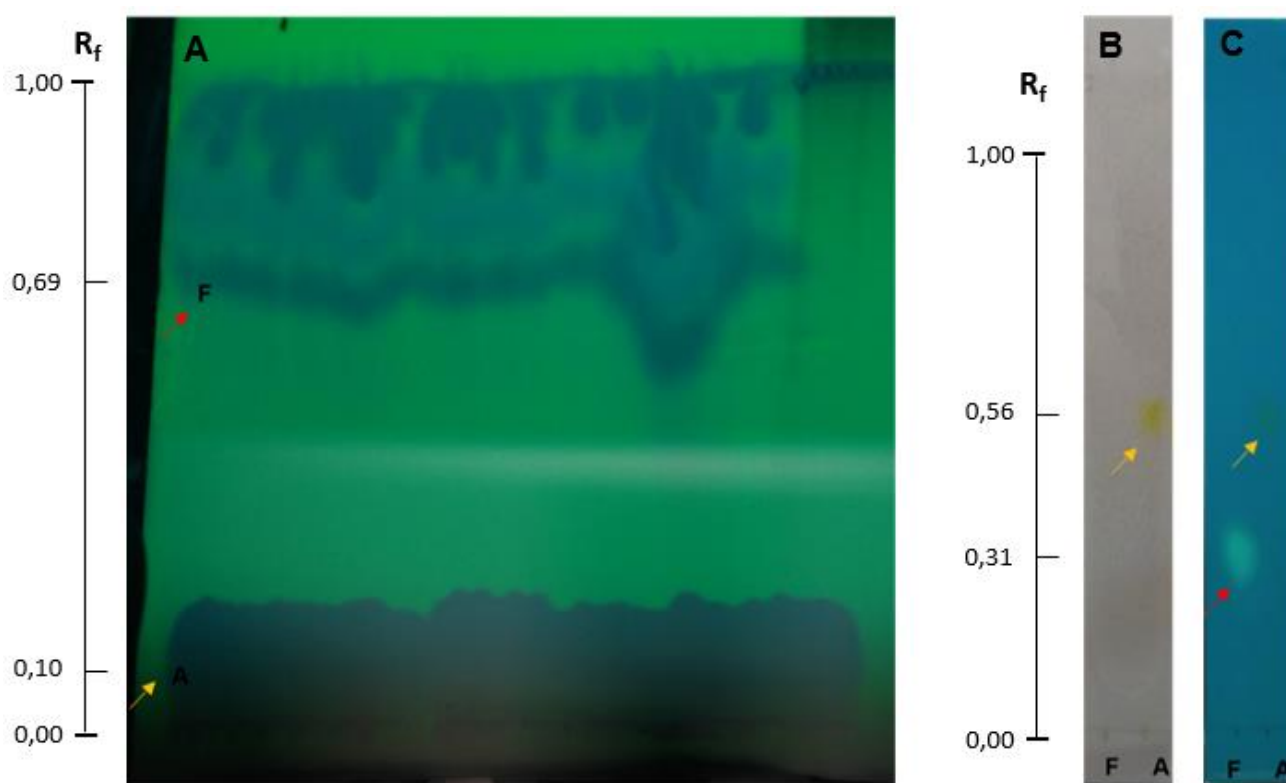
A análise de pureza deste composto foi realizada por quantificação do espectro de  $^1\text{H}$  RMN. A medida de integração da região de sinais de hidrogênio relativos ao analito principal,  $r_A$ , foi de 1,00. Enquanto a soma dos sinais das regiões de contaminantes,  $r_C$ , foi de 0,04 (Figura 4.18). Aplicadas na fórmula a quantificação relativa indicou 96% de pureza para o analito principal.

**Figura 4.18** – Análise da pureza de PCA por quantificação relativa a partir do espectro de  $^1\text{H}$  RMN



Este processo de obtenção de PCA com alta pureza teve pedido de patente solicitado (número do processo: BR 10 2021 018835-9). Com base neste processo, foi avaliado a melhor forma de separar o composto fluorescente do PCA, a fim de obtê-lo com maior pureza. A Figura 4.19 apresenta o resultado da purificação por CCDP de uma mistura de PCA (indicada pela seta vermelha) e do composto fluorescente (indicada pela seta amarela), utilizando acetato de etila: metanol 5% para a eluição dos componentes da mistura.

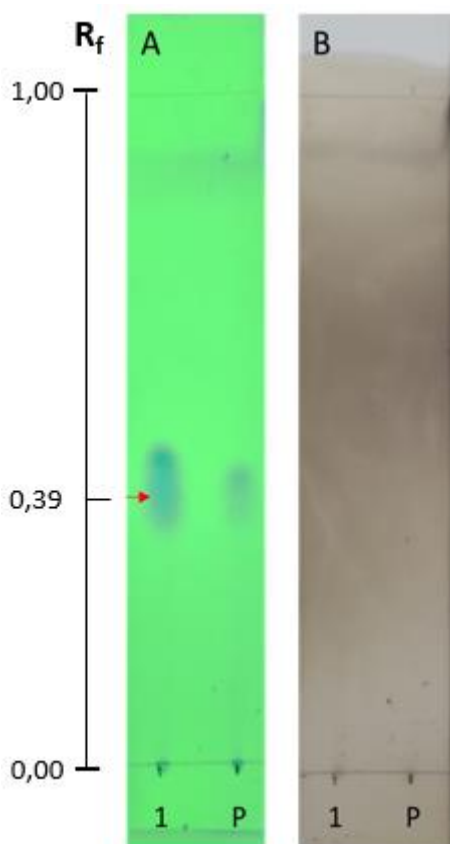
**Figura 4.19** - Processo de purificação conjunta de PCA e quinolina por CCDP



- A) A fase móvel utilizada na CCDP foi acetato de etila: metanol 5%. A fase móvel utilizada na CCD analítica foi clorofórmio: metanol 1%, sendo B) placa revelada com ácido e C) placa revelada sob luz UV. Seta vermelha indica PCA e seta amarela indica quinolina. Fração “A” indica PCA e fração “F” indica quinolina. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

A revelação sob luz UV permitiu visualizar a separação de ambas as substâncias, na qual foi possível extraí-las da placa. A CCD analítica das zonas purificadas permitiu constatar que as substâncias foram efetivamente separadas, com alto grau de pureza e sem perda, obtendo  $3,75 \text{ mg L}^{-1}$  de PCA. Através de uma CCD comparativa (Figura 4.20), foi possível identificar essa substância fluorescente como sendo a quinolina 2-hidroximetil-4-quinolinol (2-HM-4Q) indicada pela seta vermelha ( $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), utilizando como padrão de referência a molécula obtida por Velasco (2020) em cultivos submersos de seis dias em meio de sais e caracterizada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (indicada pela letra P). O presente processo de obtenção desta quinolina também foi solicitado depósito de patente pelo grupo (número do processo: BR 10 2022 017052-5).

**Figura 4.20** - CCDs analíticas da quinolina 2-hidroximetil-4-quinolinol purificada do extrato de pH 6 por CCDP



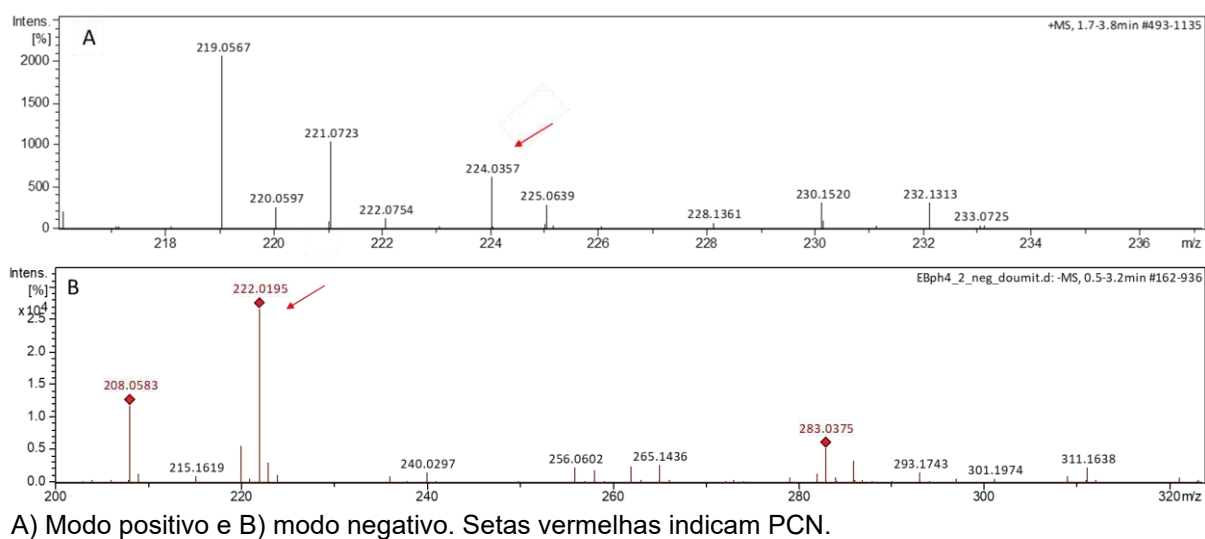
A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 1%. A) Placa revelada sob luz UV e B) placa revelada com revelador ácido seguido de aquecimento. Fração “1” indica quinolina obtida neste processo e fração “P” indica um padrão de referência deste mesmo composto obtido por outro processo em trabalho prévio do grupo. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

Esses achados nos levam a concluir que ambas as moléculas, PCA e 2-HM-4Q são produzidas, extraídas e purificadas concomitantemente pelo processo fermentativo de treze dias, na presença de caseinato de sódio.

#### 4.1.3. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO DE PH 4

O espectro de massas do extrato orgânico de pH 4 (Figura 4.21) apresentou um pico intenso de íon molecular em  $m/z$  224,0357  $[M + H]^+$  e em  $m/z$  222,0195  $[M - H]^-$  (indicados pelas setas vermelhas), o qual caracteriza a fenazina PCN, de fórmula molecular  $C_{13}H_9N_3O$ , e massa exata igual a 223,0745 Da.

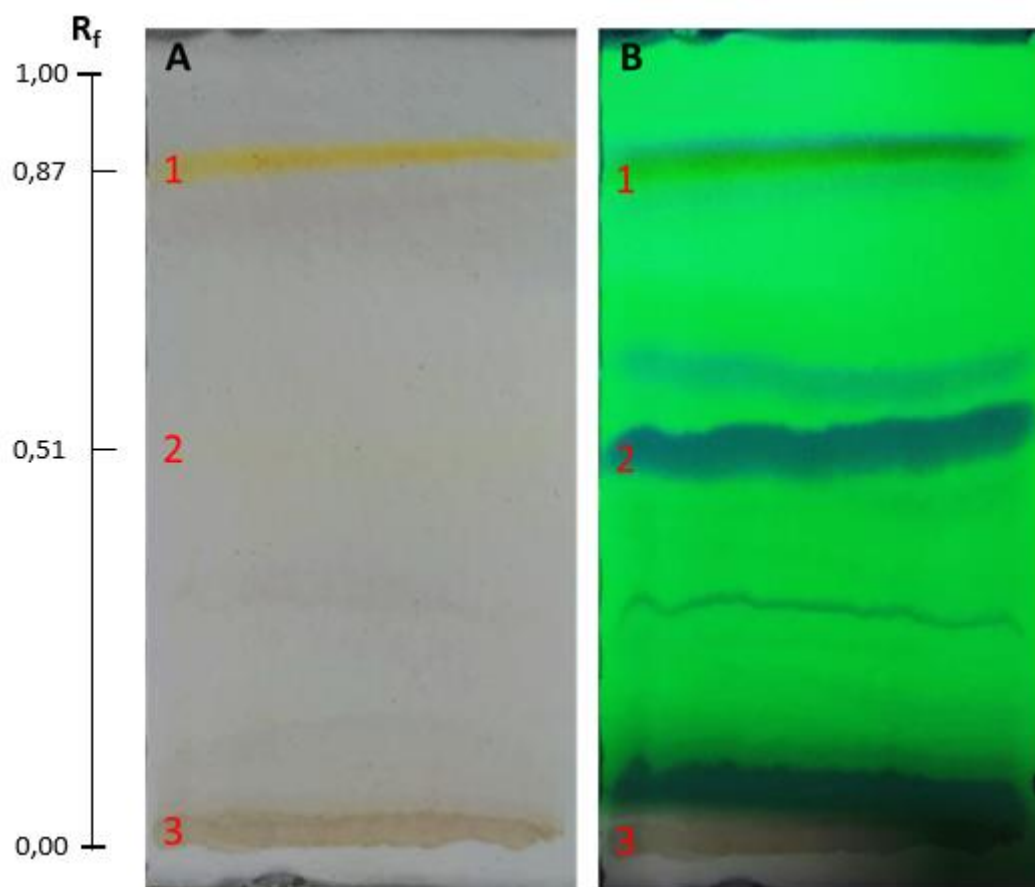
**Figura 4.21** - Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico de pH 4



O extrato bruto de pH 4 foi purificado por CCDP utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol 7% e o resultado deste processo encontra-se na Figura 4.22. Como observado, neste extrato ainda havia aeruginaldeído ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (representado pelo número 1), bem como a mistura de PCA e quinolina ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (representados pelo número 2). Então, o objetivo para este extrato foi purificar as moléculas presentes no ponto de aplicação (representado pelo número 3).

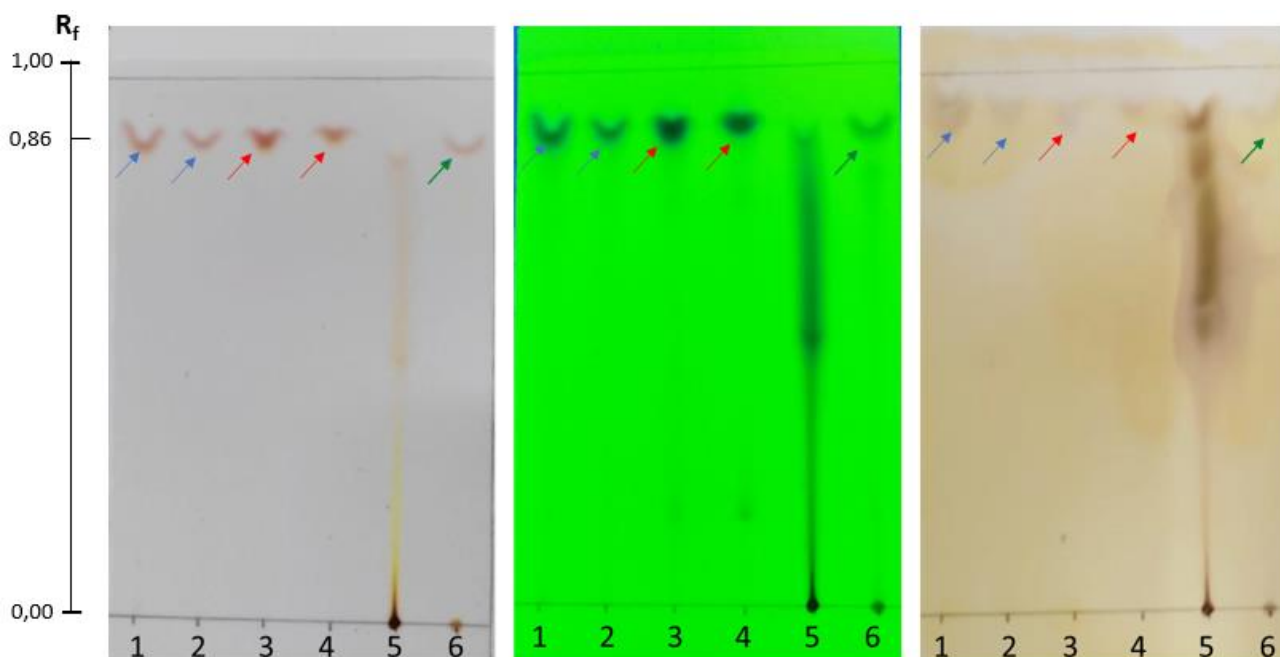
Sabe-se que as moléculas presentes nesta fração são altamente polares, uma vez que interagiram com a sílica, e não eluíram com a fase móvel (de natureza mais apolar), e por isso permaneceram no ponto de aplicação. Dessa forma, o ponto de aplicação foi extraído da placa para ser submetido a um processo adicional de purificação por extração em fase sólida utilizando um cartucho de sílica C18 (apolar). Deste processo, obteve-se seis frações, que foram analisadas por CCD analítica (Figura 4.23).

**Figura 4.22** - Processo de purificação do extrato de pH 4 por CCDP



A fase móvel utilizada na CCDP foi clorofórmio: metanol 7%. A) Placa sem revelação e B) placa revelada sob luz UV. Os números indicam as bandas de compostos separados que foram extraídos da placa. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

**Figura 4.23** – CCDs analíticas do processo de purificação da fração 3 (ponto de aplicação) pré-purificada por CCDP por extração em fase sólida (C18)



A fase móvel utilizada foi metanol 70%. A) Placa após a eluição, B) placa revelada sob luz UV e C) placa revelada com orcinol seguido de aquecimento. Cores das setas indicam possíveis compostos diferentes. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

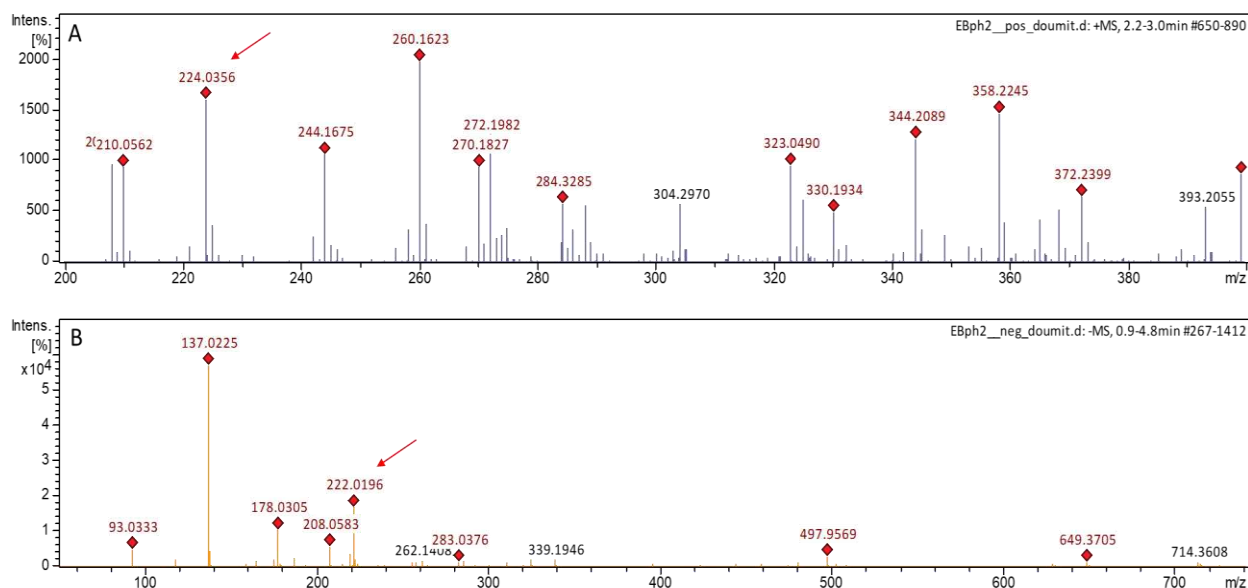
Compostos vermelhos de natureza muito polar foram visivelmente obtidos com bastante pureza, como mostram as placas A e B. Aparentemente, pela coloração e formato característicos, acreditamos que as frações 1 ( $9,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 2 ( $1,43 \text{ mg L}^{-1}$ ) (setas azuis) se tratam do mesmo composto, as frações 3 ( $7,81 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 4 ( $3,75 \text{ mg L}^{-1}$ ) (setas vermelhas) de outro composto semelhante, e a sexta fração ( $0,93 \text{ mg L}^{-1}$ ) (setas verdes) extraída com acetonitrila seja outro composto. No placa C, revelado com orcinol, a quinta fração apresenta grande quantidade de contaminante extraído com metanol, que foi separado das demais frações, e que possivelmente são ramnolipídeos.

Estes compostos ainda necessitam identificação, mas podemos inferir que em uma ou mais frações há PCN, pois esses resultados corroboram com os achados de Oliveira (2021) que obteve PCN com elevado grau de pureza nestas condições.

#### 4.1.4. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO DE pH 2

Os espectros de massas do extrato orgânico de pH 2 (Figura 4.24) mostram picos referentes ao íon molecular de PCN em  $m/z$  224,0356  $[M + H]^+$  e em  $m/z$  222,0195  $[M - H]^-$  (indicados pelas setas).

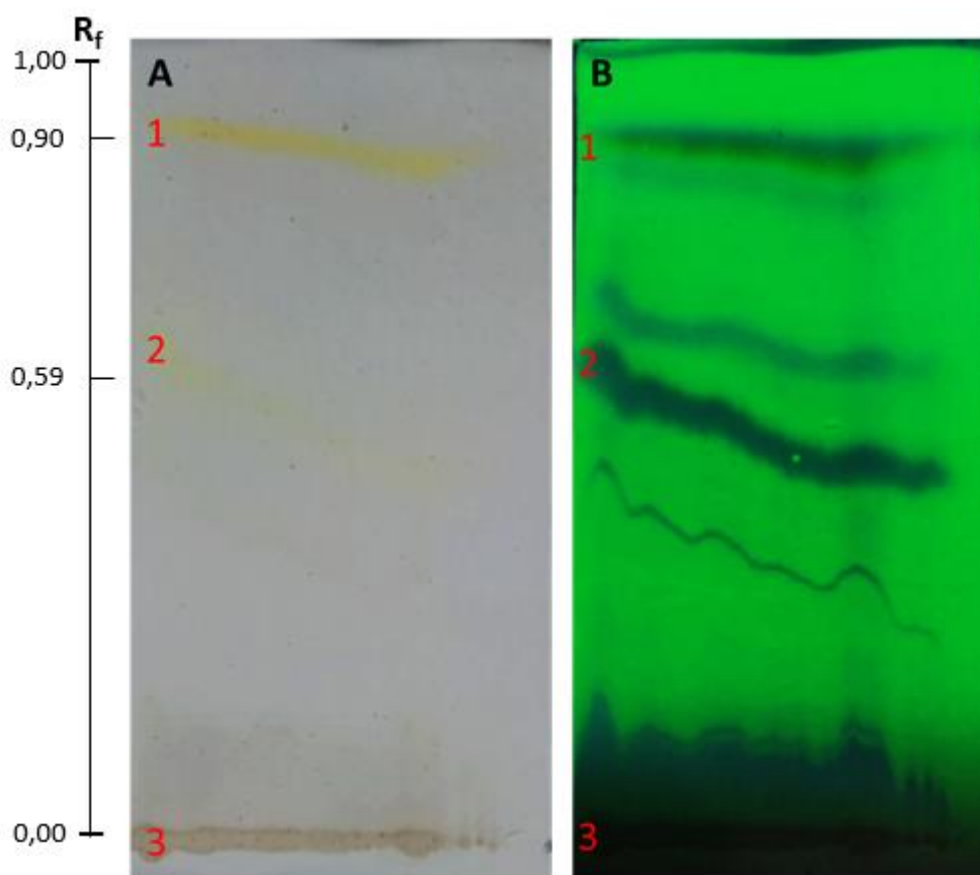
**Figura 4.24** - Espectros de massas obtidos por ESI-qTOF do extrato orgânico de pH 2



A) Modo positivo e B) modo negativo. Setas vermelhas indicam PCN.

O extrato de pH 2 foi purificado por CCDP (Figura 4.25) e da mesma forma que o anterior foi possível constatar a presença de aeruginaldeído ( $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) (representado pelo número 1) e de PCA + quinolina ( $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (representados pelo número 2), sugerindo que estas moléculas, apesar de serem extraídas mais abundantemente no pH 6, ainda são extraídas, como resquícios, subsequentemente nos pHs 4 e 2.

**Figura 4.25** – Processo de purificação do extrato de pH 2 por CCDP

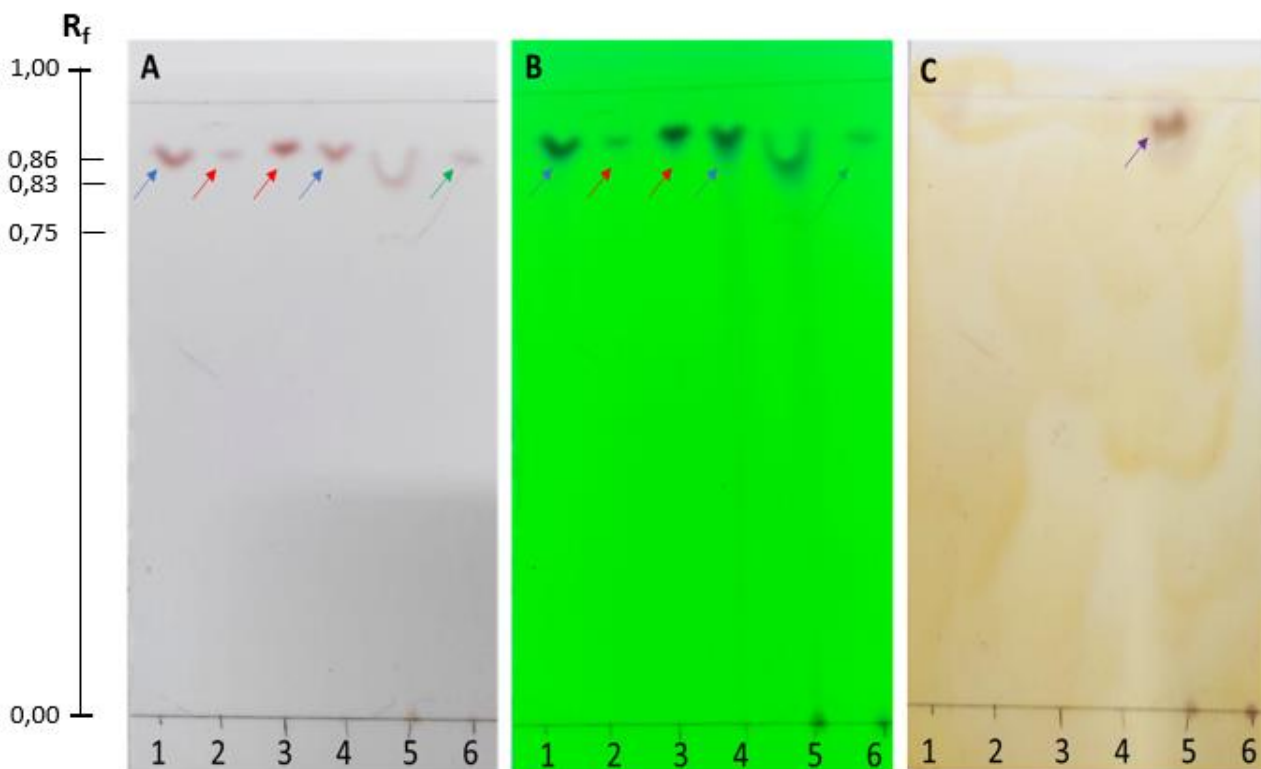


A fase móvel utilizada na CCDP foi clorofórmio: metanol 7%. A) Placa sem revelação e B) placa revelada sob luz UV. Os números indicam as bandas de compostos separados que foram extraídos da placa. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

Foi realizado um passo adicional de purificação do ponto de aplicação, submetendo-o a processo de extração em fase sólida utilizando cartucho de C18, seguindo a mesma sequência utilizada anteriormente para o ponto de aplicação do extrato de pH 4. Os resultados encontram-se na Figura 4.26.

Pigmentos vermelhos com alto grau de pureza foram obtidos deste processo. Os compostos, aparentemente são os mesmos encontrados no extrato de pH 4, e PCN provavelmente foi purificada em alguma(s) da(s) fração(ões). Setas nas mesmas cores sugerem compostos iguais. Os rendimentos obtidos foram 12,5; 0,46; 3,35; 3,28; 10,78 e 1,81 mg L<sup>-1</sup>, para cada fração. Ramnolipídeos (indicados pela seta roxa) foram separados na quinta fração.

**Figura 4.26** – CCDs analíticas do processo de purificação da fração 3 (ponto de aplicação) pré-purificada por CCDP por extração em fase sólida (C18)



A fase móvel utilizada foi metanol 70%. A) Placa após a eluição, B) placa revelada sob luz UV e C) placa revelada com orcinol seguido de aquecimento. Cores das setas indicam possíveis compostos diferentes. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

## 4.2. EXTRATOS ORGÂNICOS DO CULTIVO SEM ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO

O sobrenadante do cultivo de três dias em meio de sais sem caseinato de sódio foi extraído com acetato de etila, originando extratos orgânicos ácido (pH 2) e alcalino (pH 11) de colorações distintas, como mostra a Figura 4.27.

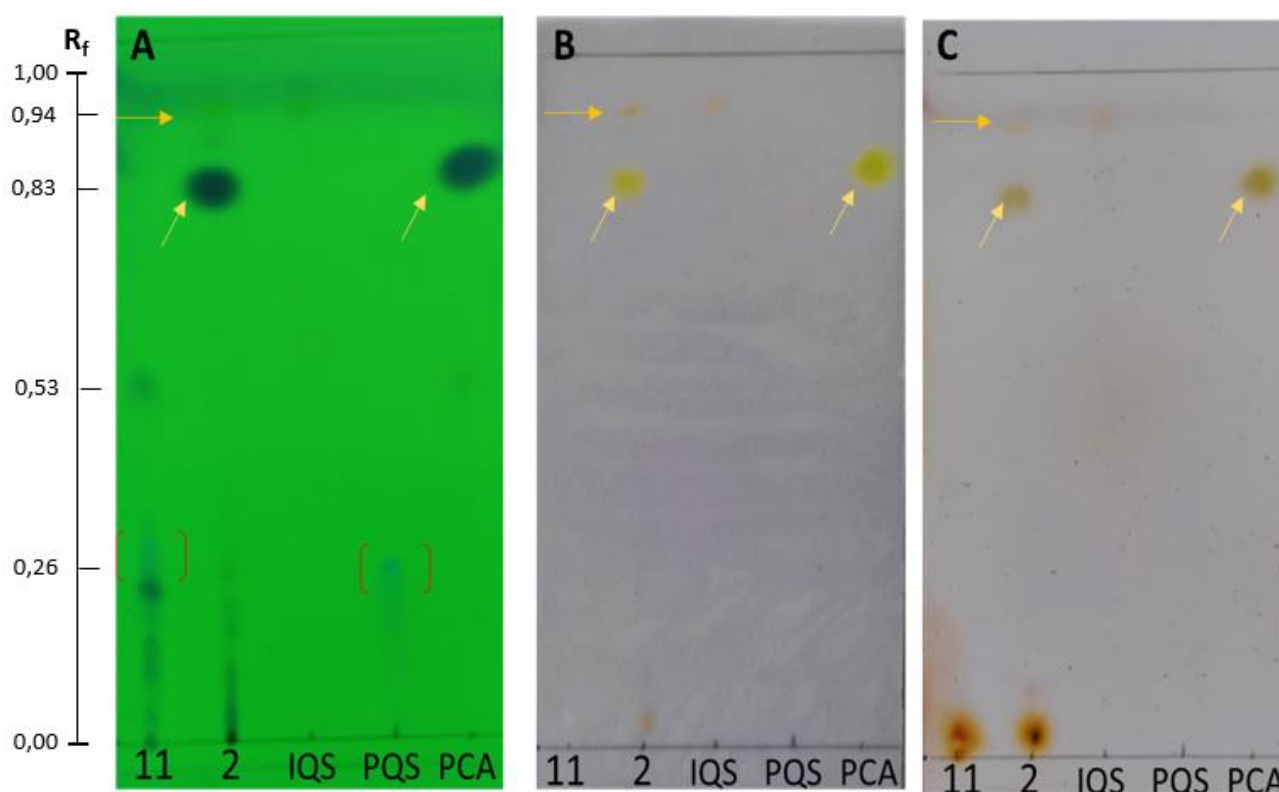
**Figura 4.27** - Processo de extração ácido-base do sobrenadante livre de células do cultivo de três dias em meio de sais nos pHs 11 e 2



Acima, mostra o processo de extração com acetato de etila nos pH's 11 e 2, respectivamente. As setas indicam a fase orgânica da extração. Abaixo, mostra os extratos brutos orgânicos de cada extração (fases orgânicas) após evaporação do solvente.

Ambos os extratos foram avaliados por CCD analítica (Figura 4.28), em comparação com o padrão comercial de PQS e os padrões identificados de IQS e PCA. Como observado, o extrato alcalino apresenta PQS (indicado pelos colchetes vermelhos), enquanto o extrato ácido possui IQS (indicado pela seta laranja) e PCA (indicado pela seta amarela).

**Figura 4.28** - CCDs analíticas dos extratos brutos orgânicos nos pHs 11 e 2



A fase orgânica utilizada foi clorofórmio: metanol 1%. A) Placa revelada sob luz UV, B) placa revelada com revelador ácido e C) placa revelada com revelador ácido seguido de aquecimento. Setas laranjas indicam IQS, setas azuis indicam PCA e colchetes vermelhos indicam PQS. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

Os rendimentos médios dos extratos orgânicos de três cultivos separados foram de  $283,04 \pm 85,61$  e  $391,86 \pm 150,16$  mg para os pHs 11 e 2 respectivamente.

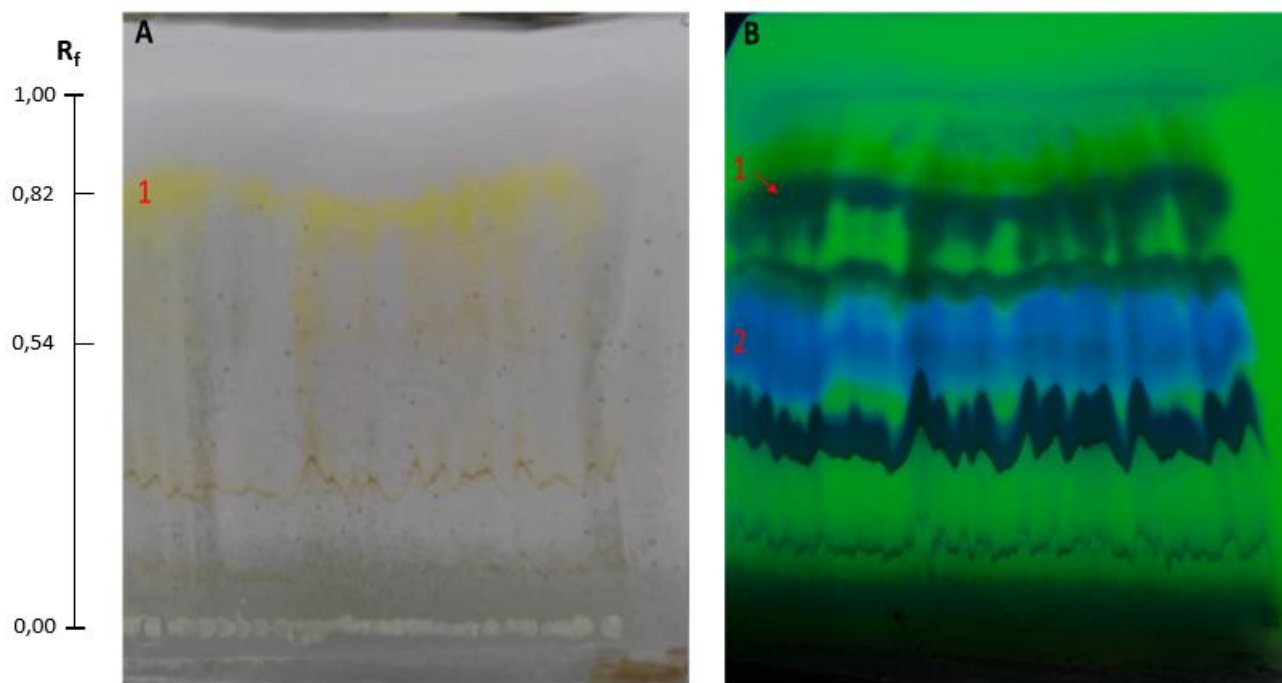
#### 4.2.1. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO DE PH 11

PQS foi purificado por CCDP a partir do extrato bruto alcalino, utilizando uma placa de sílica ativada como fase estacionária e como fase móvel diclorometano: metanol 5%. A Figura 4.29 mostra o resultado desse processo, no qual foi purificado além do PQS (representado pelo número 2) um outro composto desconhecido de coloração amarela (representado pelo número 1).

A fim de melhorar a pureza, o composto amarelo passou por outro processo de purificação por CCDP (Figura 4.30), porém utilizando uma fase móvel mais apolar, constituída apenas de diclorometano. Nesta eluição, o fator de retenção da molécula

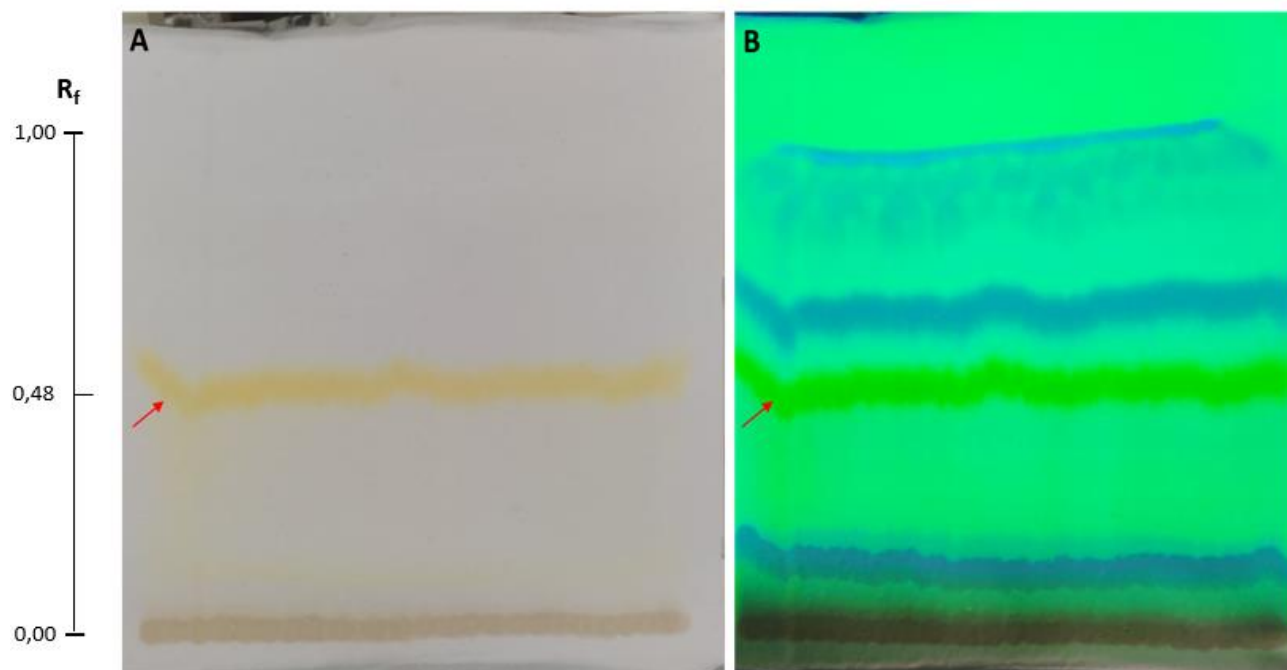
desconhecida (indicada pela seta vermelha) diminuiu, permitindo uma melhor separação dos contaminantes.

**Figura 4.29** - Processo de purificação do extrato de pH 11 por CCDP



A fase móvel utilizada foi diclorometano: metanol 5% e a placa foi ativada com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5%. A) Placa sem revelação e B) revelada sob luz UV. Os números indicam as bandas de compostos separados que foram extraídos da placa. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

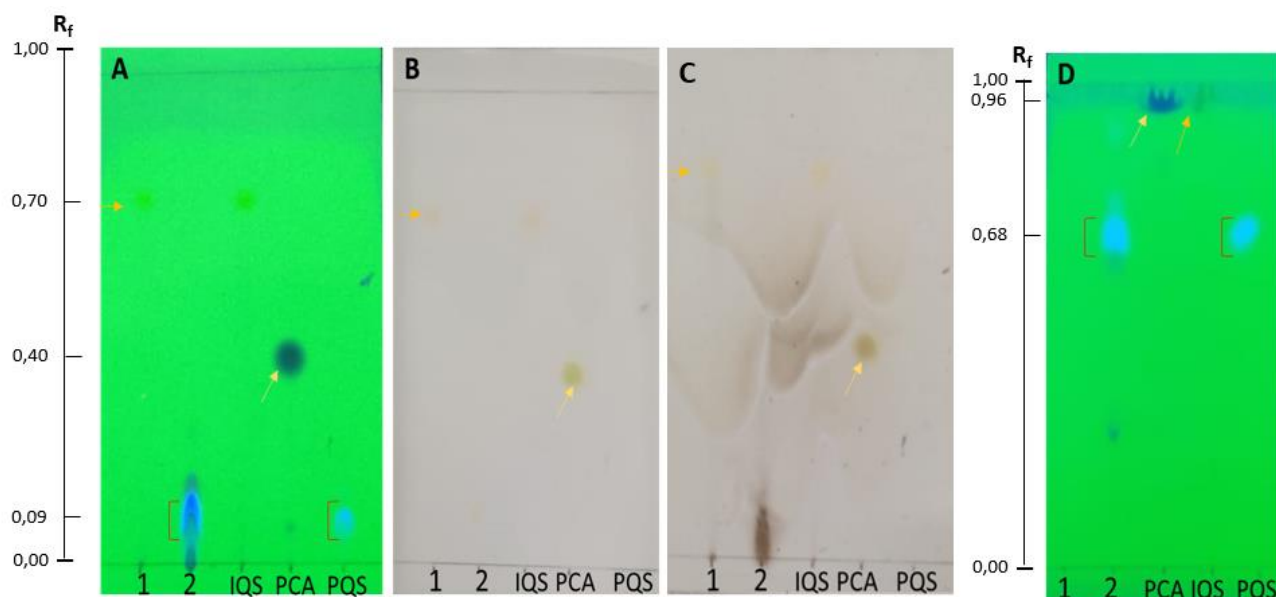
**Figura 4.30** - Re-purificação do composto de número 1 obtido do processo anterior, por CCDP



A fase móvel utilizada foi diclorometano puro. A) Placa sem revelação e B) revelada sob luz UV. A seta indica o composto de interesse purificado. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

Estes dois compostos purificados foram avaliados por CCD comparativa (Figura 4.31) e com base nos padrões utilizados (IQS, PCA e PQS) pôde-se constatar que a substância 1 trata-se de aeruginaldeído (indicado pela seta laranja), com rendimento de  $6,4 \text{ mg L}^{-1}$ , como pode ser observado nas placas A, B e C. Já a fração 2 contém PQS (indicado pelos colchetes vermelhos), com rendimento de  $4,1 \text{ mg L}^{-1}$  (placa D), o qual pôde ser melhor visualizada utilizando uma placa ativada com solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5%, que foi eluída com a fase móvel diclorometano: metanol 5%.

**Figura 4.31** - CCDs analíticas das frações provenientes do processo de purificação do extrato básico por CCDP



A fase móvel utilizada em A, B e C foi clorofórmio: metanol 1%. A) placa revelada sob luz UV, B) placa revelada com revelador ácido e C) placa revelada com revelador ácido seguido de aquecimento. A fase móvel utilizada em D foi diclorometano: metanol 5%. As placas foram ativadas com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5%. Setas laranjas indicam aeruginaldeído, setas amarelas indicam PCA e colchetes vermelhos indicam PQS. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

#### 4.2.2. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO DE PH 2

O extrato bruto ácido também foi purificado por CCDP. A Figura 4.32 mostra o resultado deste processo, que separou a molécula de IQS (seta vermelha) e de PCA (seta verde), utilizando clorofórmio: metanol 5% como fase móvel.

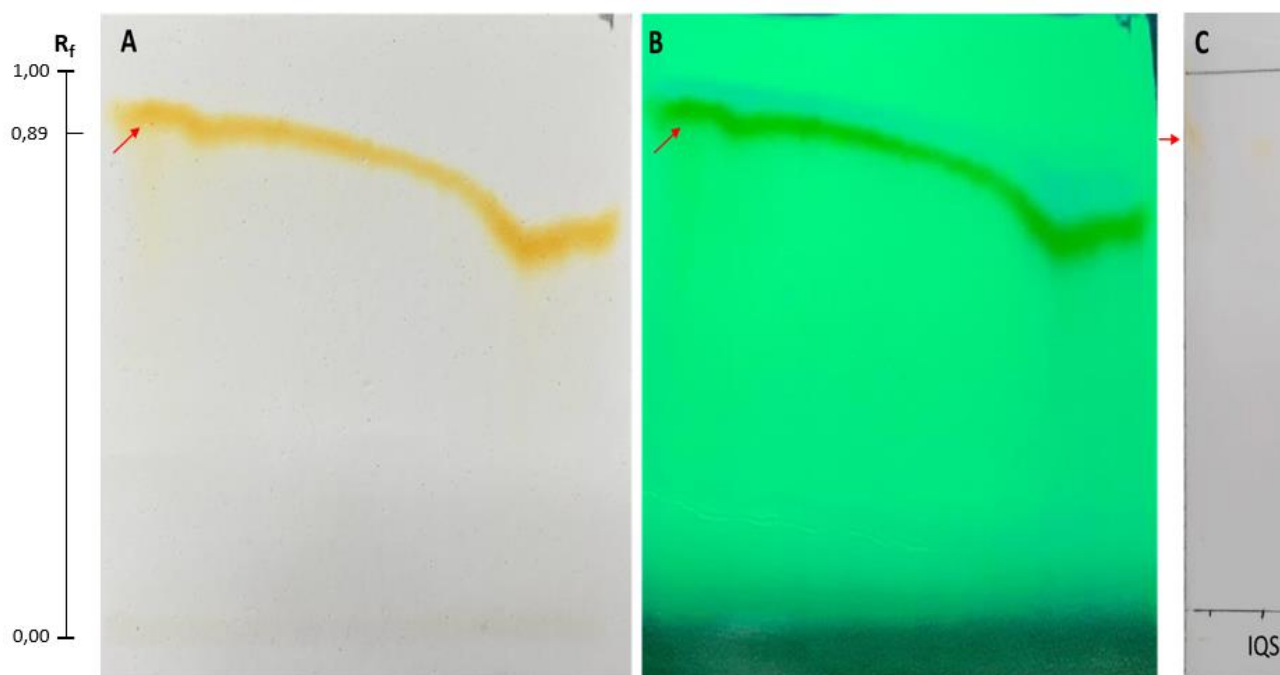
**Figura 4.32** - Primeiro processo de purificação por CCDP de IQS presente no extrato bruto orgânico de pH 2



A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 5%. A seta vermelha indica IQS e seta verde indica PCA. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

Com o objetivo de melhorar a pureza, a molécula de IQS purificada anteriormente, foi repurificada por CCDP, utilizando a mesma fase móvel (Figura 4.33 A e B). Após esses processos de purificação pôde ser constatado por CCD analítica que a substância obteve alto grau de pureza, com rendimento de  $3,38 \text{ mg L}^{-1}$ , ao ser comparada com o seu padrão (Figura 4.33 C).

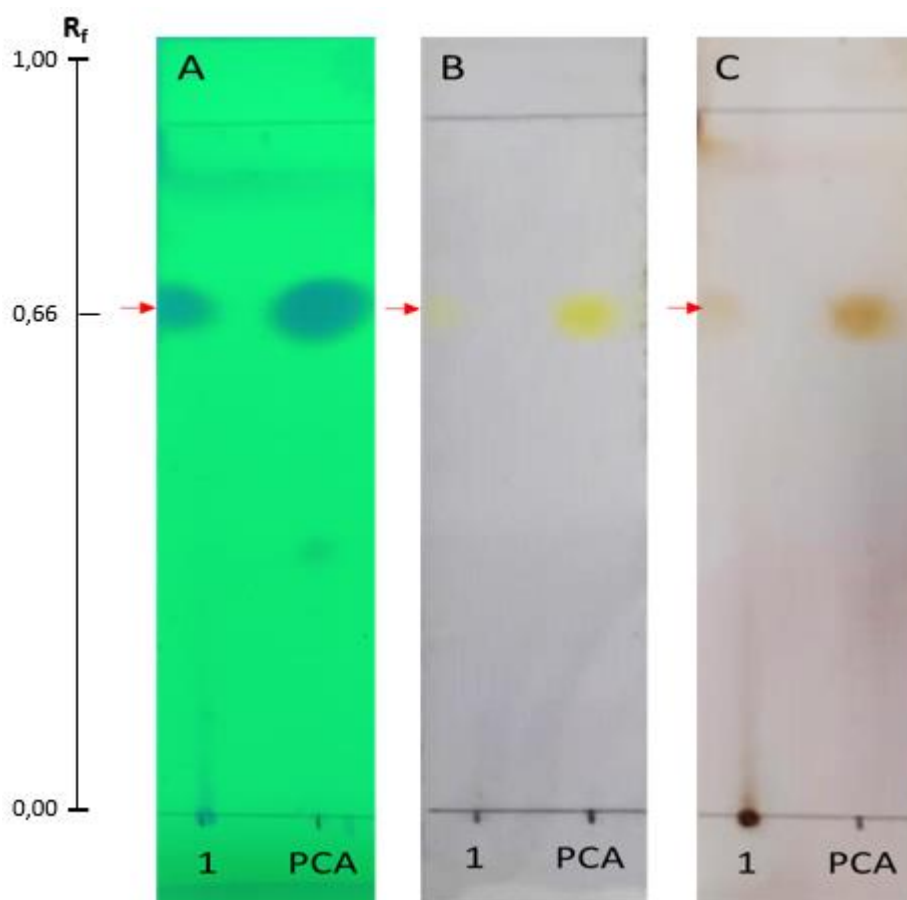
**Figura 4.33** – Repurificação de IQS obtido do processo anterior, por CCDP



A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 5%. A) Placa sem revelação e B) placa revelada sob luz UV. C) Fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 1%. A seta vermelha indica IQS. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

PCA, indicado pela seta verde na Figura 4.32, também foi purificado, com rendimento de  $3 \text{ mg L}^{-1}$ . O resultado deste processo encontra-se na CCD analítica da Figura 4.34. Diferentemente do PCA purificado do cultivo de 13 dias, este não apresentou a presença concomitante da quinolina, que seria uma substância de  $R_f$  menor e fluorescência opaca nesta fase móvel. Esses dados são consistentes com aqueles encontrados por Velasco (2020), que demonstrou que a quinolina é produzida a partir do sexto dia de cultivo em meio de sais.

**Figura 4.34** - CCDs analíticas de PCA purificado do extrato ácido por CCDP



A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol 1%. A) placa revelada sob luz UV, B) placa revelada com revelador ácido e C) placa revelada com revelador ácido seguido de aquecimento. Ao lado esquerdo encontra-se uma escala de fator de retenção ( $R_f$ ).

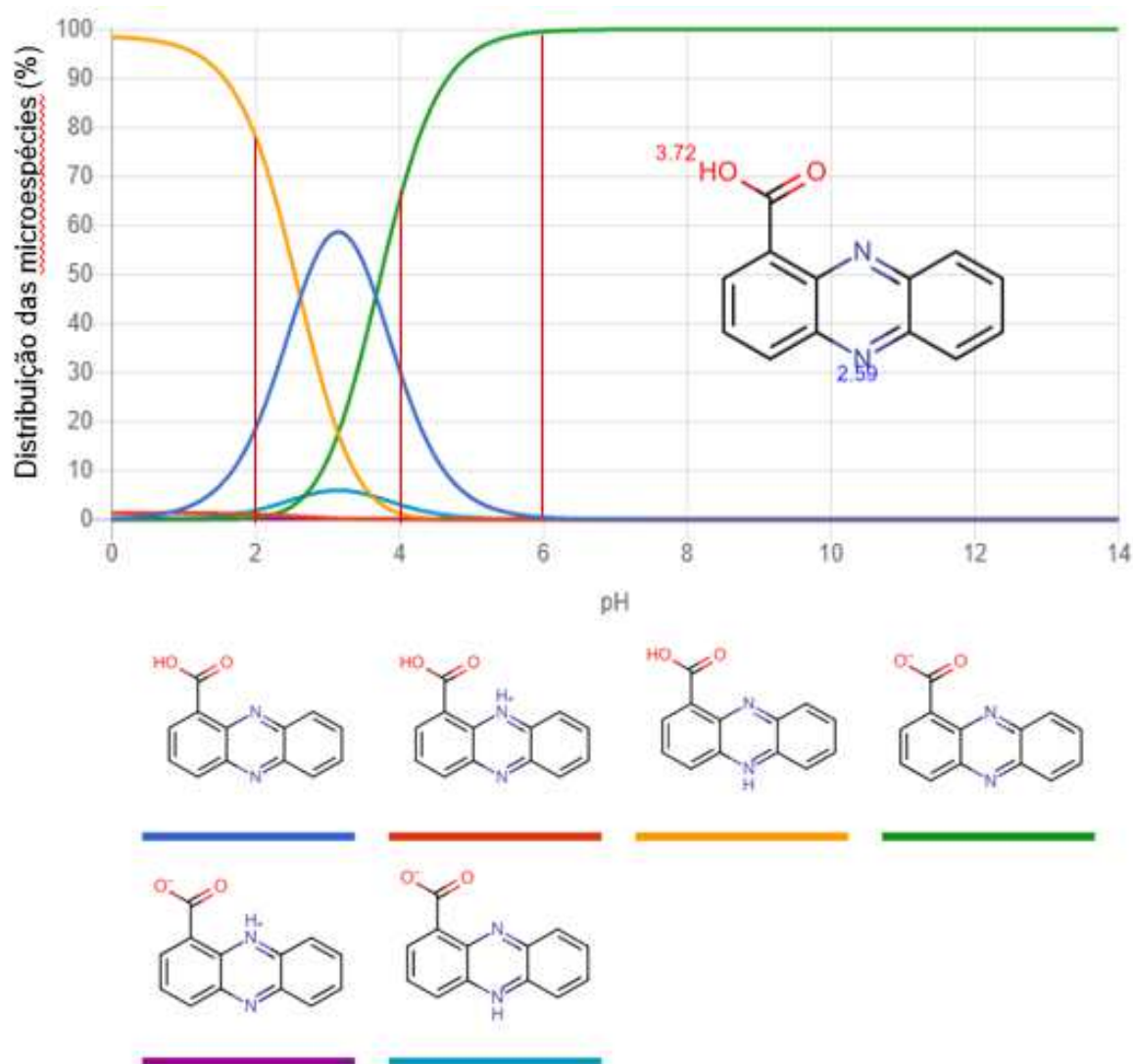
### 4.3. MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPOSTOS OBTIDOS

Os resultados da modelagem molecular dos principais compostos obtidos nos dois processos de extração ácido-base corroboraram com os resultados experimentais, uma vez que foi possível identificar as moléculas extraídas em diferentes pHs e seus respectivos estados de protonação, por meio das análises das seguintes propriedades físico-químicas: pKa, coeficiente de partição, solubilidade em água e ponto-isoelétrico.

## 4.3.1. PCA

A Figura 4.35 apresenta os resultados dos cálculos dos valores de pKa e a distribuição das microespécies, em porcentagem molar, da molécula de PCA nos diferentes pHs. O pKa ácido mais forte é igual a 3,72 e o pKa básico mais forte é 2,59. Conforme mostra o gráfico, a espécie de PCA desprotonada no grupo carboxílico (indicado na cor verde) prevalece nos pHs superiores a 6 e no pH 4 essa espécie predomina com aproximadamente 65%. Já no pH 2, a molécula protonada no grupo ácido carboxílico e no átomo de nitrogênio do anel (indicado na cor amarela) é a mais abundante apresentando aproximadamente 78%.

**Figura 4.35** – Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula de PCA

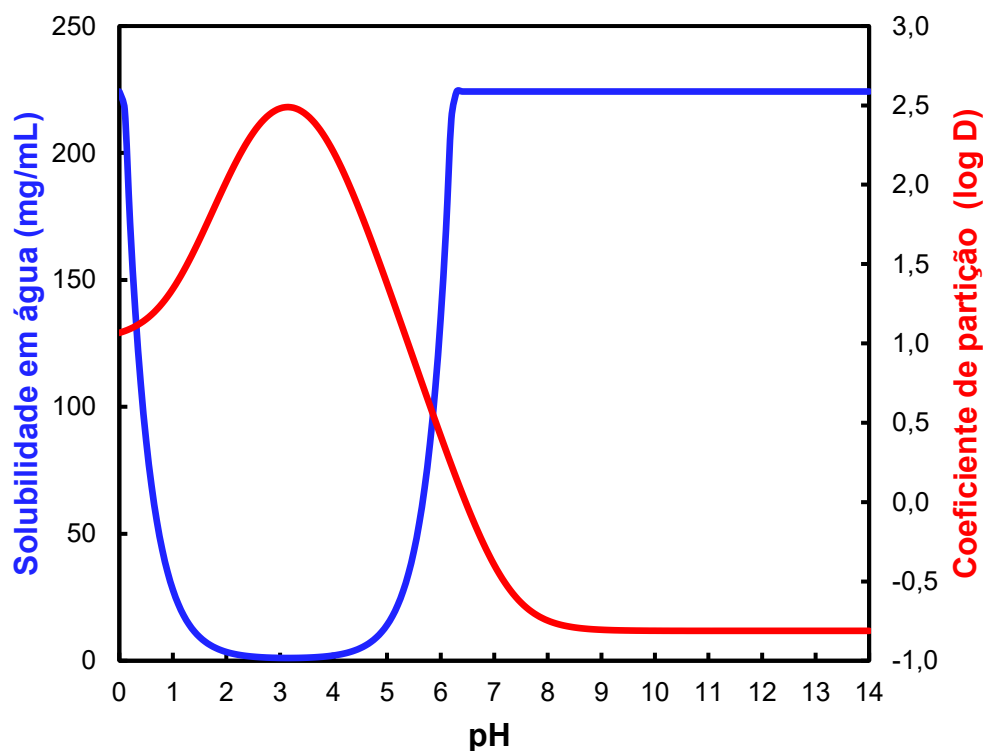


As linhas vermelhas indicam os pHs que a molécula foi extraída experimentalmente.

Esses dados são consistentes com a obtenção de PCA no pH 6 no cultivo B, uma vez que a forma desprotonada da molécula (indicada em verde) é polar, apresentando solubilidade parcial (Figura 4.36) em solvente apolar ( $\log D = 0,42$ ). Assim, o gráfico do coeficiente de partição (em vermelho) explica o porquê desta molécula não ser obtida no pH 11 ( $\log D = -0,81$ ) e que parte da extração ocorreu nos pHs 4 ( $\log D = 2,21$ ) e 2 ( $\log D = 2,02$ ) devido a não ter sido totalmente extraído no pH 6 (parcialmente solúvel), uma vez que PCA apresenta maior solubilidade em solvente apolar nos pHs 4 e 2. Isto também explica PCA ser obtido no pH 2 da extração com acetato de etila do cultivo em meio de sais (cultivo A).

Este gráfico também mostra a solubilidade do PCA em água (em azul). A partir do pH 6,3 a molécula apresenta alta solubilidade em água (aproximadamente  $224 \text{ mg mL}^{-1}$ ). É interessante observar que a curva de solubilidade em água apresenta seus valores mínimos entre os pHs 4 e 2, voltando a ficar solúvel em valores de pH iguais a 0 ( $224 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Estes dados são importantes, pois auxiliam a previsão de qual o pH indicado (neste caso em torno de 7) para solubilizar a molécula em meio aquoso, para posterior aplicação.

**Figura 4.36** – Coeficiente de partição e solubilidade da PCA em água

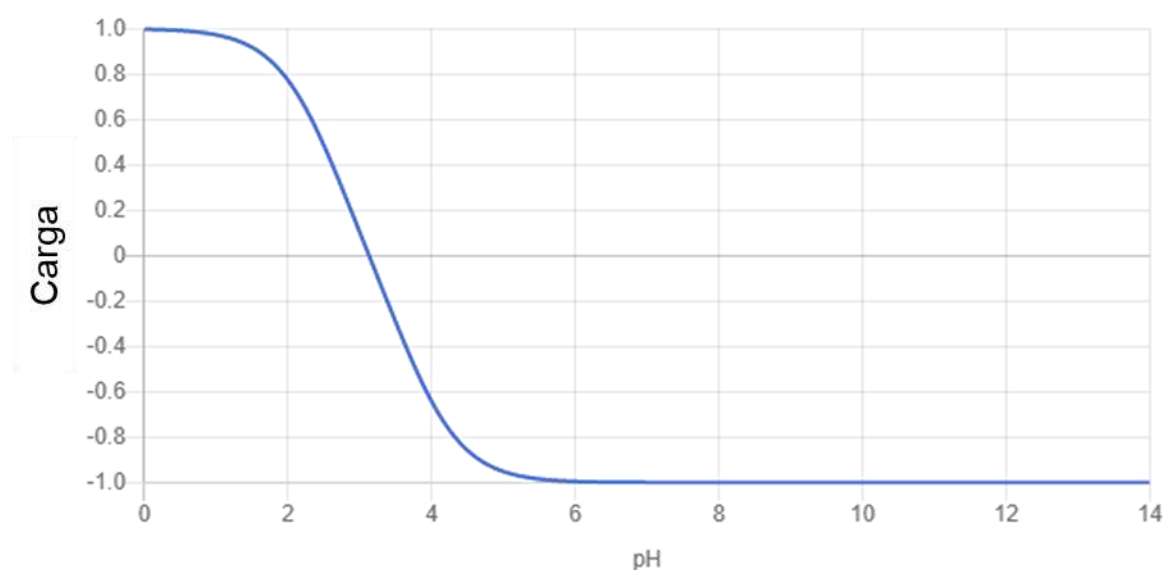


$\log D$  é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

O gráfico da Figura 4.36 ainda demonstra que o pH 3 é o melhor para extração deste composto, obtendo-o em sua forma neutra (indicada em azul escuro) e, portanto, mais apolar e solúvel em solventes apolares e menos solúvel em água.

Esse dado de solubilidade em pH 3 também pode ser relacionado ao valor do ponto isoelétrico da molécula. Como mostra o gráfico da Figura 4.37, o ponto isoelétrico do PCA é aproximadamente 3. Ou seja, neste valor de pH, PCA não apresenta carga elétrica líquida.

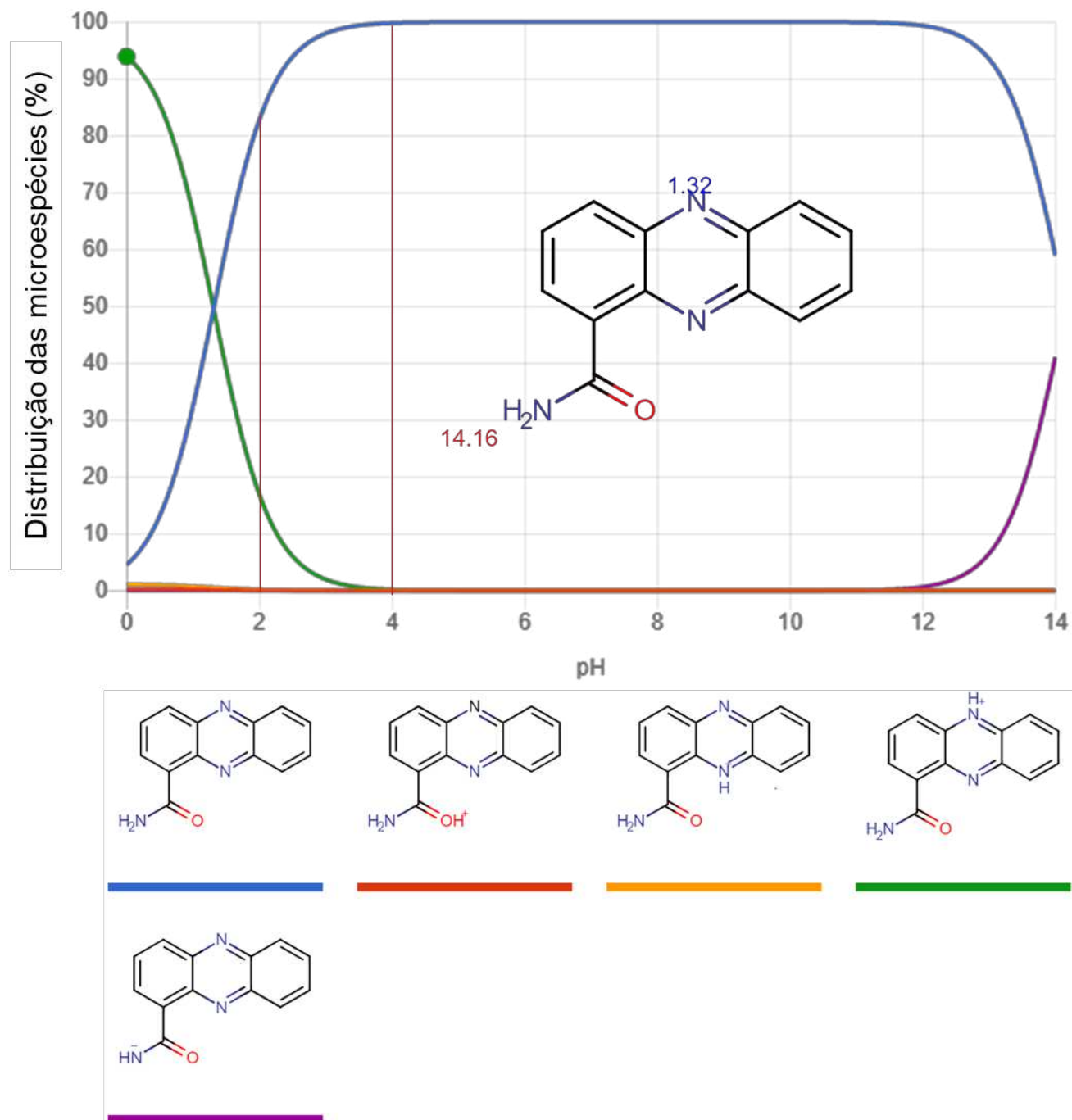
**Figura 4.37** - Ponto isoelétrico do PCA



#### 4.3.2. PCN

A distribuição de cinco formas da molécula de PCN em diferentes pHs está apresentada na Figura 4.38. A forma neutra (indicada pela cor azul) prevalece nos pHs superiores a 2. No pH 1,3 a distribuição das formas em azul e verde é de 50%. O pKa ácido mais forte é igual a 14,16 e o pKa básico mais forte é 1,32.

**Figura 4.38** - Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula de PCN

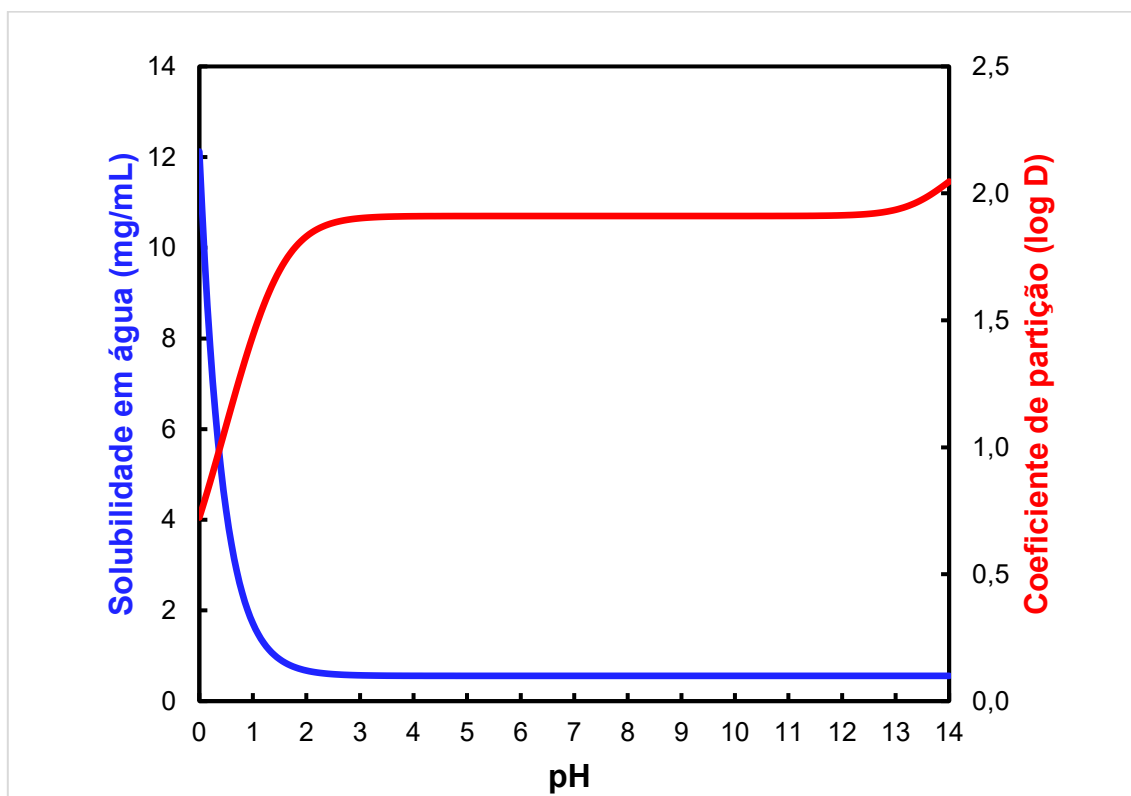


As linhas vermelhas indicam os pHs que a molécula foi extraída experimentalmente.

O cálculo da solubilidade em água e o coeficiente de partição de PCN está representado pelo gráfico da Figura 4.39, apresentando maior solubilidade em solvente apolar (em vermelho) a partir de pH 2 com valores de logD entre 1,83 (pH 2) e 1,91 (pH 11). Estes dados sugerem que PCN é extraída em todos os pHs utilizados, porém até o momento

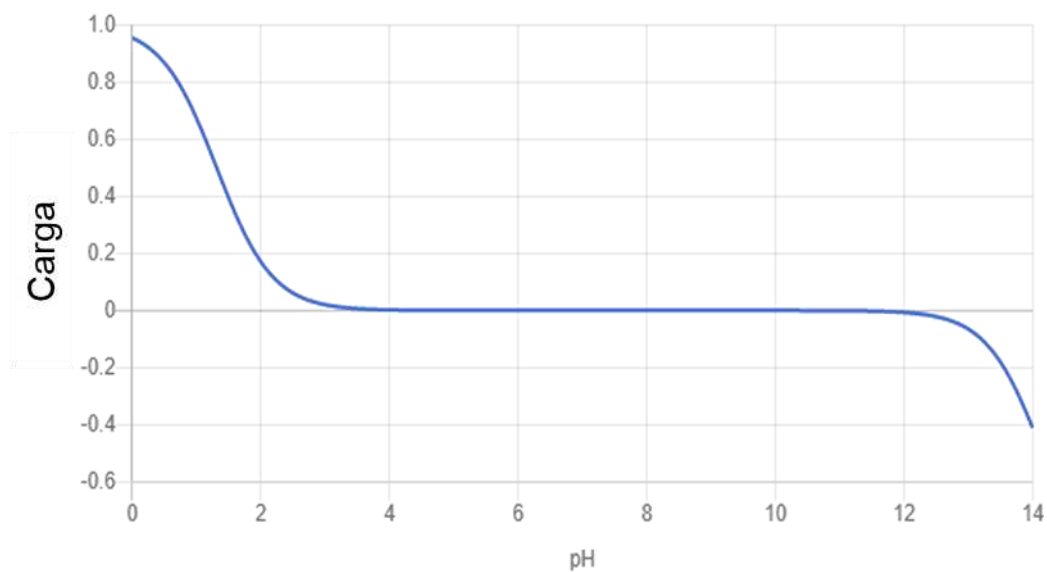
constatamos a presença desta molécula nos extratos brutos de pHs 4 e 2, segundo análise por espectrometria de massas. Além disso, apresenta baixa solubilidade em água, possuindo solubilidade de aproximadamente  $12 \text{ mg mL}^{-1}$  em pH 0.

**Figura 4.39** – Coeficiente de partição e solubilidade da PCN em água



logD é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

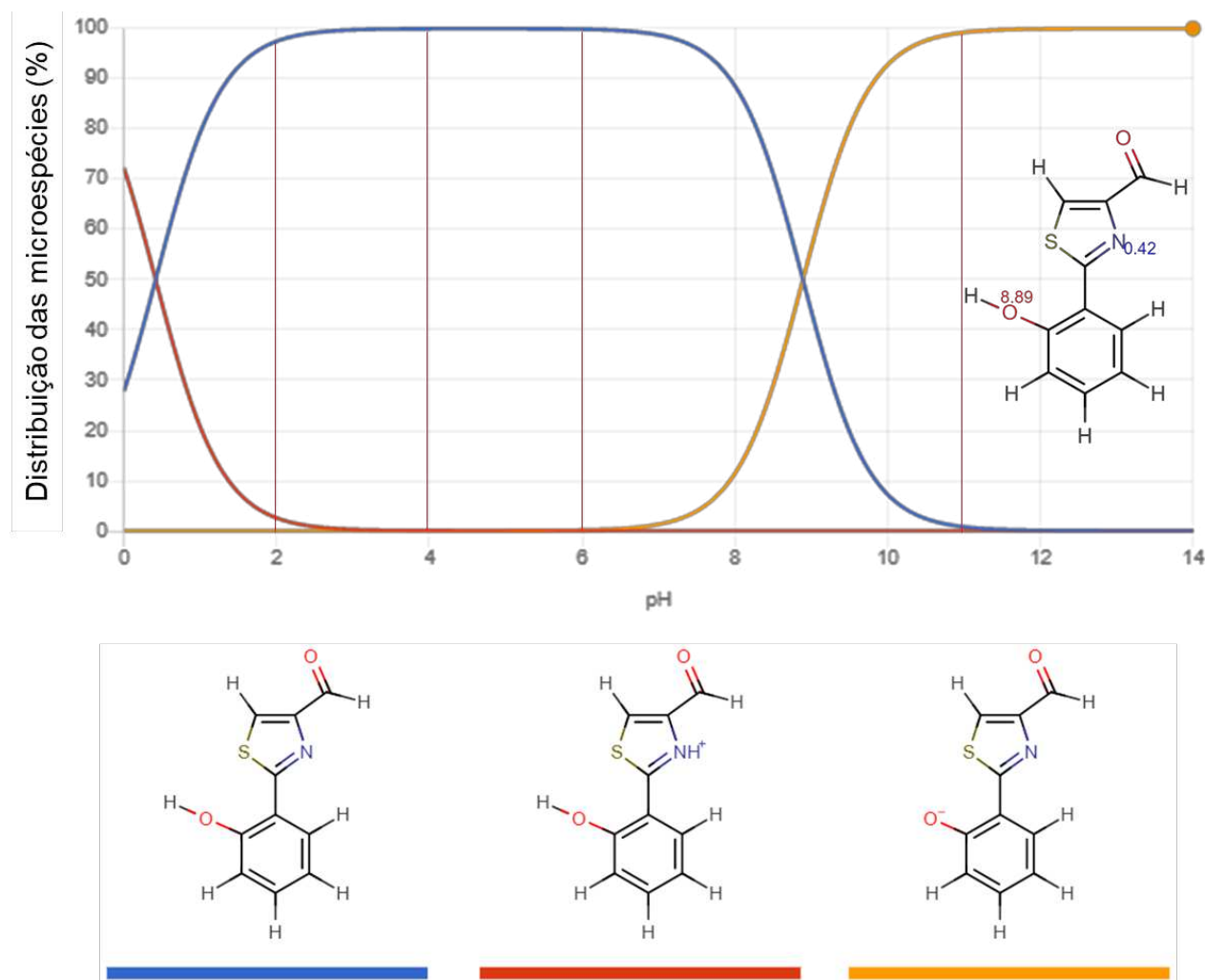
Conforme mostra a Figura 4.40, o valor do ponto isoelétrico da PCN foi calculado como 7,73.

**Figura 4.40** - Ponto isoelétrico da PCN

#### 4.3.3. IQS

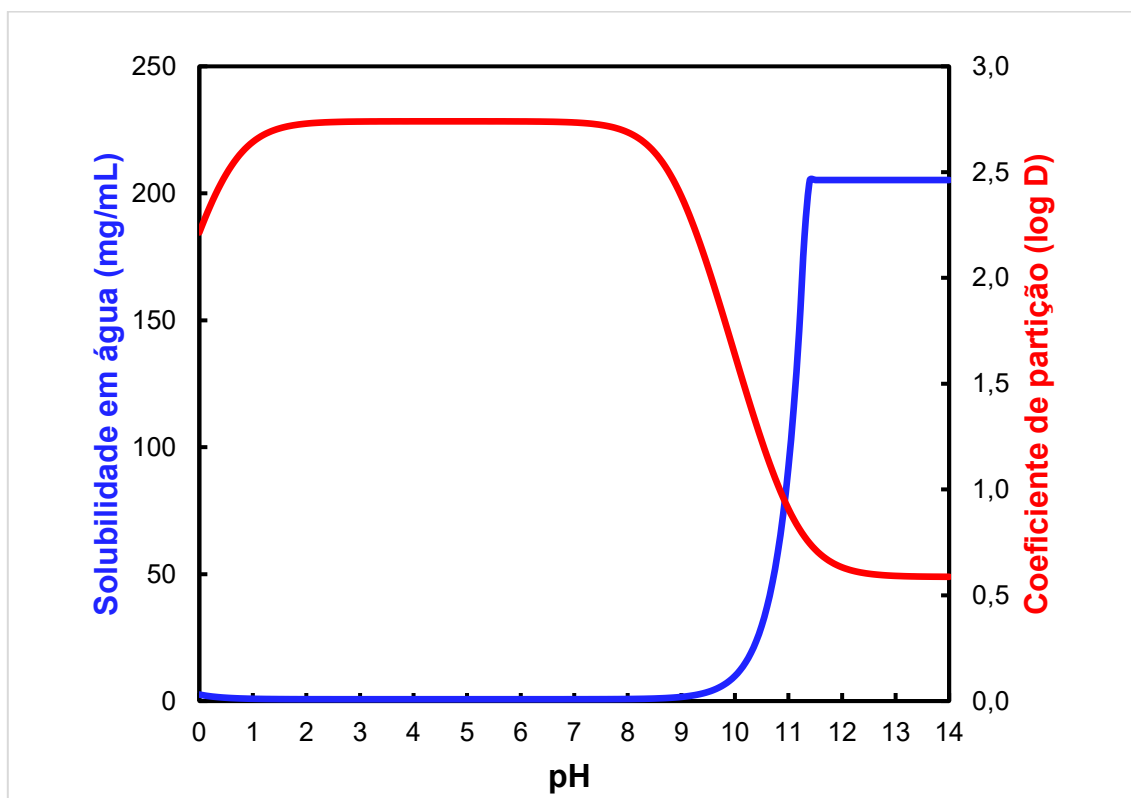
De acordo com as propriedades previstas, IQS apresenta três formas possíveis representadas em cores diferentes, com pKa ácido mais forte de 8,89 e o pKa básico mais forte de 0,42 (Figura 4.41). No pH 11 a forma desprotonada de IQS prevalece (indicada pela cor amarela), com distribuição de 99,23%. Já nos pHs 6, 4 e 2 a forma neutra (indicada pela cor azul) é a mais abundante.

**Figura 4.41** - Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula de IQS

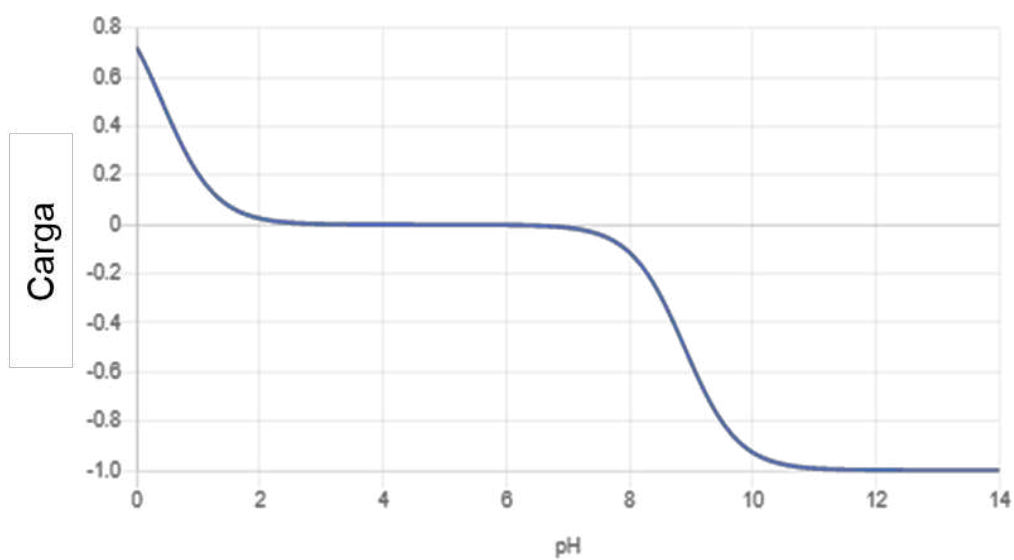


As linhas vermelhas indicam os pHs que a molécula foi extraída experimentalmente.

Em relação à solubilidade em n-octanol (Figura 4.42), IQS é mais solúvel nos pHs 6, 4, e 2 ( $\log D = 2,74$ ) e apresenta solubilidade parcial no pH 11 ( $\log D = 0,91$ ). Isso explica a obtenção de IQS nos extratos de pHs 6, 4 e 2 do cultivo de treze dias com caseinato (cultivo B), bem como a presença desta molécula nos extratos de pHs 11 e 2 no cultivo de três dias em meio de sais (cultivo A). Por outro lado, IQS apresenta alta solubilidade em água a partir do pH 11,4 (aproximadamente  $205 \text{ mg mL}^{-1}$ ). O valor do ponto isoelétrico calculado para esta molécula é 4,65 (Figura 4.43).

**Figura 4.42** – Coeficiente de partição e solubilidade em água do IQS

logD é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

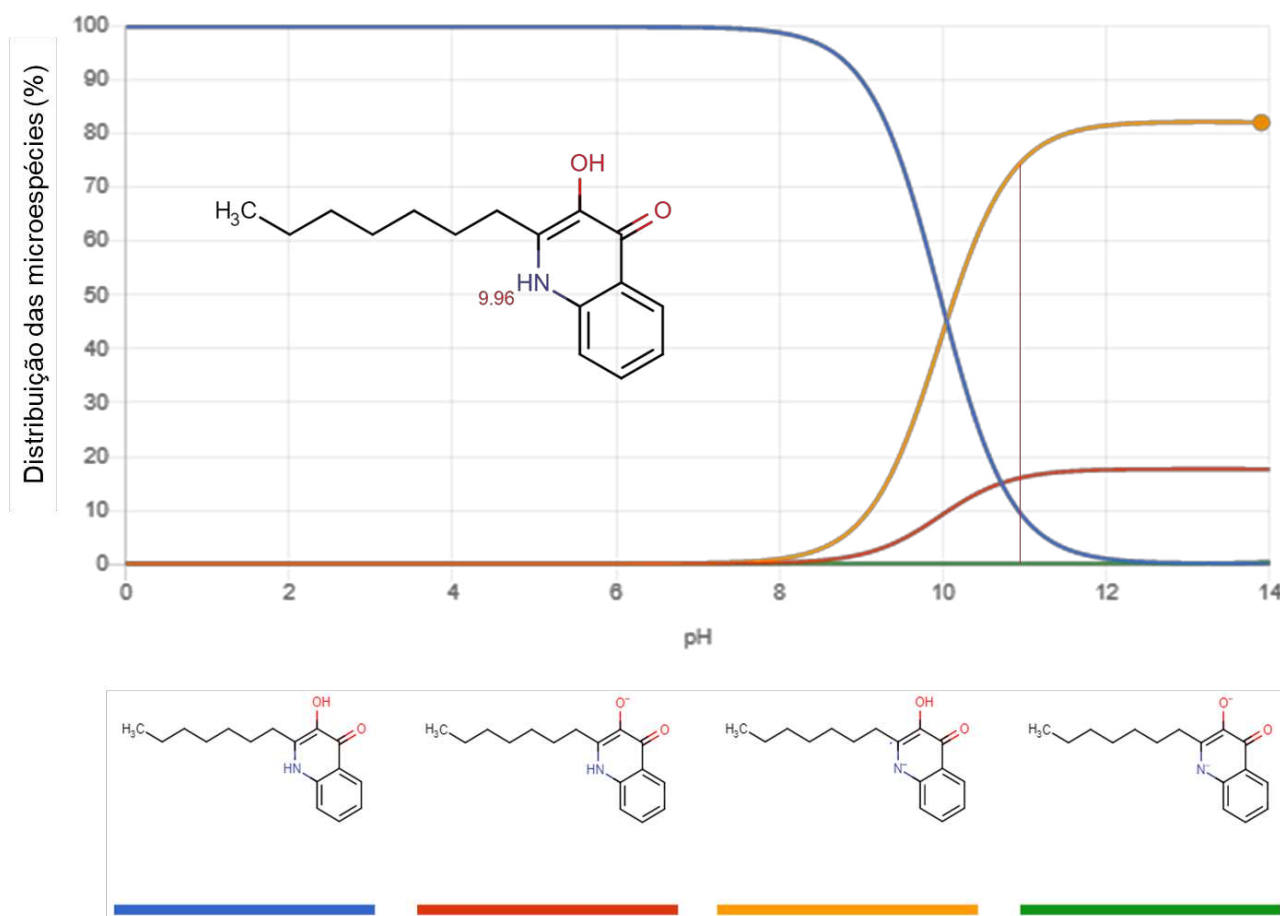
**Figura 4.43** – Ponto isoeletrico do IQS

## 4.3.4. PQS

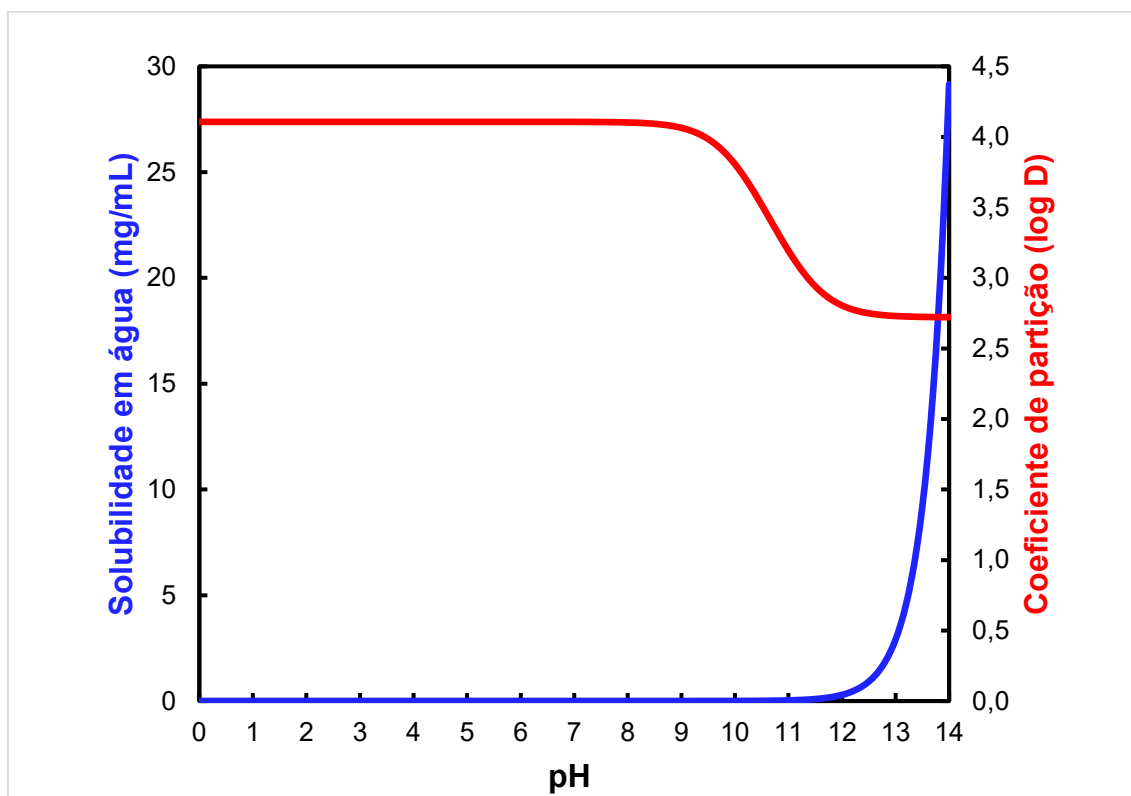
PQS possui valor de pKa igual a 9,96 (Figura 4.44) e quatro possíveis estados de ionização. No pH 11, no qual foi extraído PQS em ambos os processos fermentativos empregados para os cultivos A e B, a espécie prevalente, com aproximadamente 75%, é desprotonada no heteroátomo de nitrogênio (indicada pela cor amarela). Porém, é mais abundante a molécula em sua forma neutra (mais apolar) entre os pHs 0 e 8.

Dessa forma, essa quinolona é mais solúvel em n-octanol em pHs que variam entre 0 e 8 (Figura 4.45), com valor aproximado de  $\log D = 4,11$ . Como observado, PQS apresenta pouca solubilidade em água, em pH 14 a solubilidade é aproximadamente  $29 \text{ mg mL}^{-1}$ . O valor do ponto isoelétrico da PQS é 4,1 (Figura 4.46).

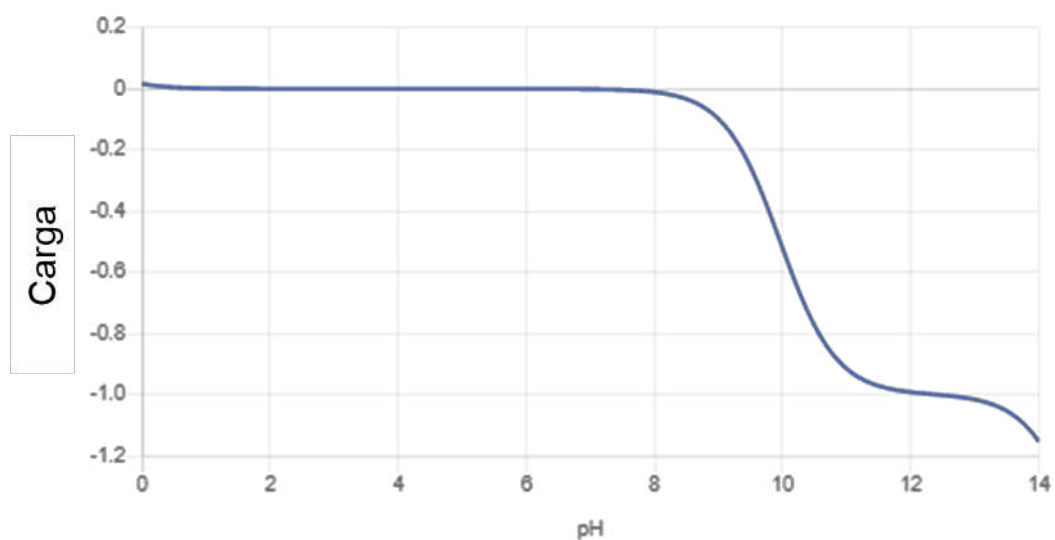
**Figura 4.44** - Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (% molar) da molécula da PQS



A linha vermelha indica o pH que a molécula foi extraída experimentalmente.

**Figura 4.45** – Coeficiente de partição e solubilidade em água da PQS

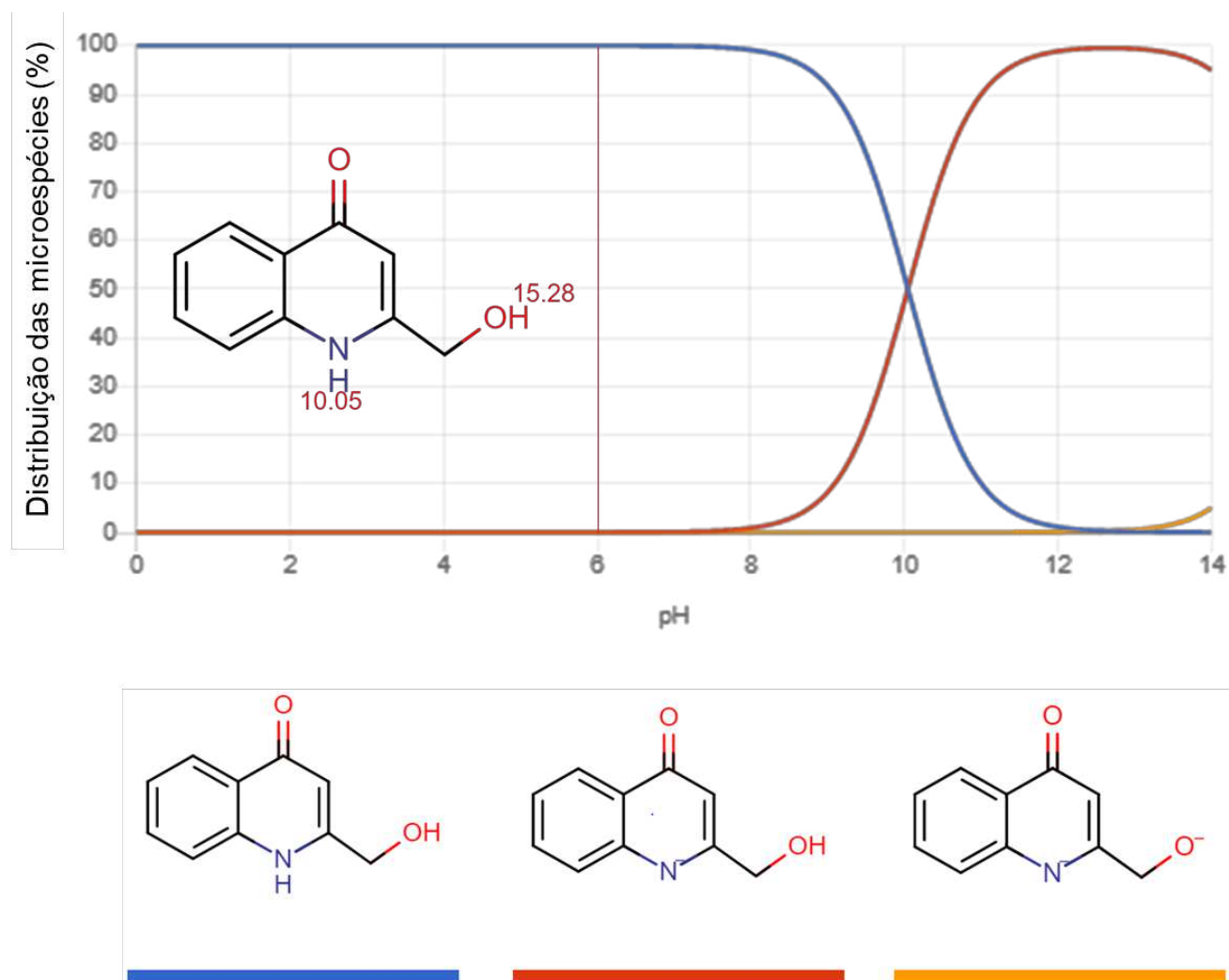
logD é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

**Figura 4.46** - Ponto isoelétrico da PQS

## 4.3.5. 2-HM-4Q

A quinolina 2-HM-4Q apresentou pKa ácido mais forte de 10,05 e três possíveis formas (Figura 4.47). Em pH 11 a forma mais abundante é a desprotonada no átomo de nitrogênio do anel (indicada em vermelho), enquanto entre os pHs 0 e 8 prevalece a molécula neutra (indicada em azul).

**Figura 4.47** - Valores de pKa calculados e distribuição das microespécies (%) da quinolina



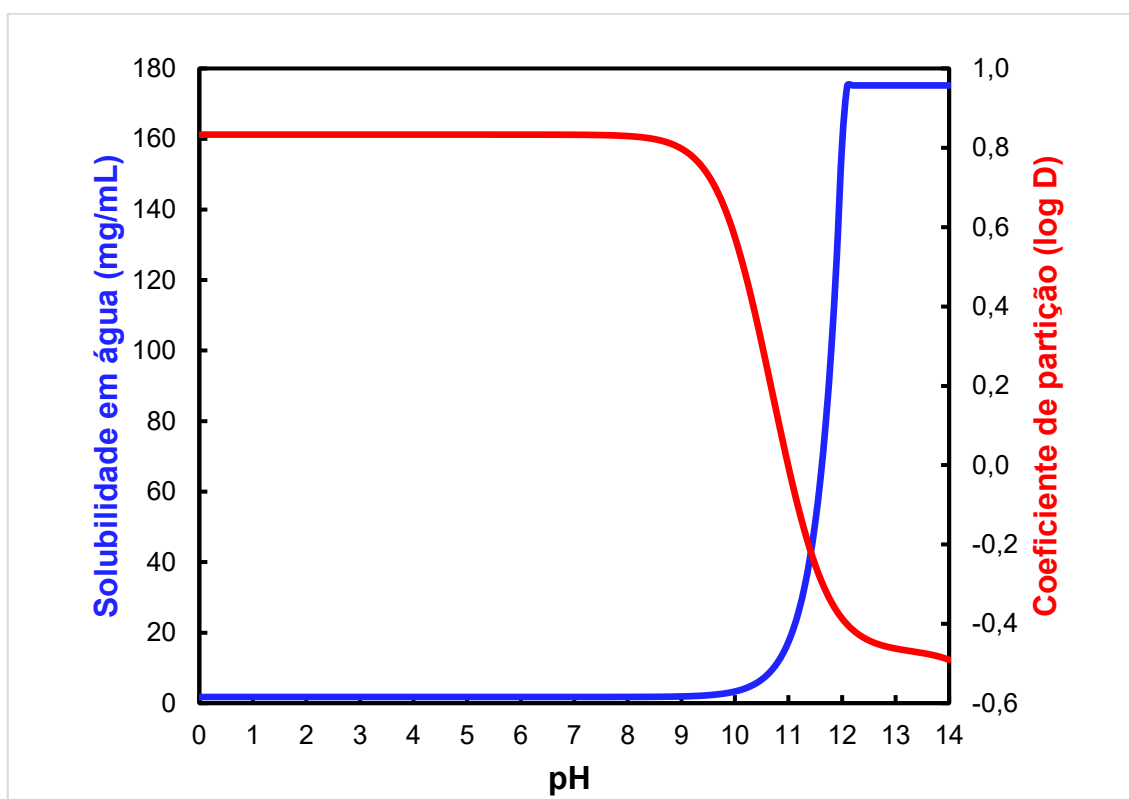
A linha vermelha indica o pH que a molécula foi extraída experimentalmente.

No presente trabalho, obtivemos a quinolina em pH 6, ou seja, na forma neutra. Velasco (2020), obteve o mesmo composto ao extrair o sobrenadante de cultivo de

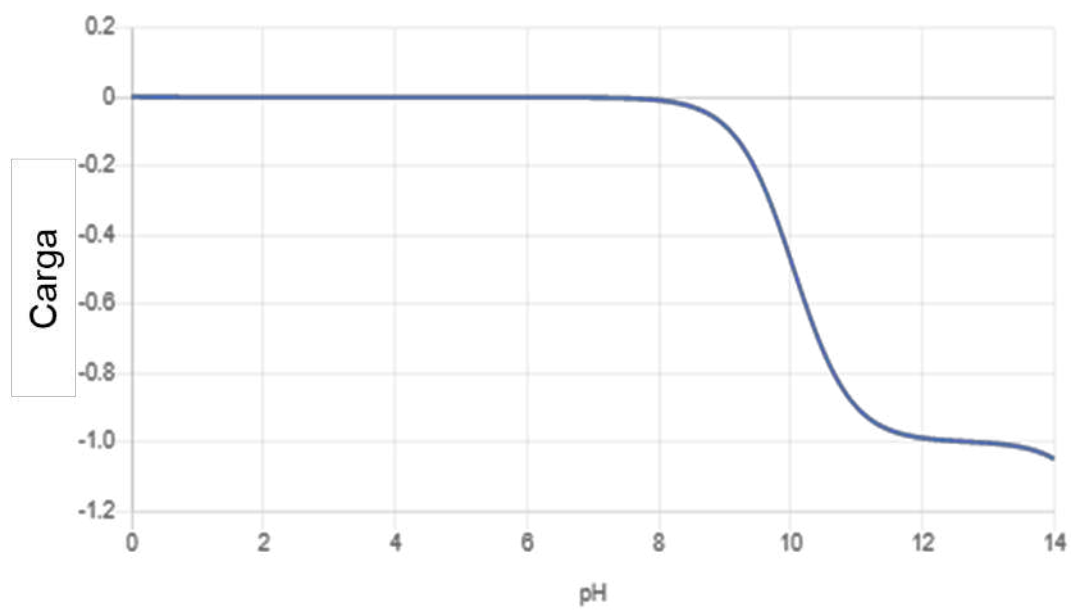
seis dias em meio de sais, no pH 11 com acetato de etila. Então, possivelmente houve uma extração parcial deste composto no pH básico, sendo obtido em sua forma desprotonada (indicada em vermelho).

De acordo com a Figura 4.48, esta quinolina é mais solúvel em solventes orgânicos entre os pHs 0 e 9, com logD aproximado em 0,83. Em relação à solubilidade em água, a quinolina apresenta alta solubilidade a partir do pH 12, atingindo aproximadamente  $175 \text{ mg mL}^{-1}$ . Esse composto apresenta carga nula entre os pHs 0 e 8 não sendo possível definir um único ponto isoelétrico (Figura 4.49).

**Figura 4.48** – Coeficiente de partição e solubilidade da quinolina em água



logD é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

**Figura 4.49** – Ponto isoelétrico da quinolina

## Capítulo 5

### ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados e discussão, no formato de artigo, sobre a aplicação de Di-ramnolipídeos purificados de *P. aeruginosa* em modelos de dor e inflamação, realizada no Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina. A intenção é a publicação desse trabalho na revista International Journal of Biological Macromolecules, com o título “Di-rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* reduces pain behaviors, leukocyte recruitment and superoxide anion production”.

## Di-rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* reduce pain behaviors, leukocyte recruitment and superoxide anion production

Kamila B. B. Wessel<sup>1</sup>, Ana Paula Mello<sup>1</sup>, Ismael Rodrigues Amador<sup>1</sup>, Marília F. Manchope<sup>2</sup>, Nayara Rampazzo Morelli<sup>3</sup>, Anelise Franciosi<sup>3</sup>, Tiago Zaninelli<sup>3</sup>, César Tischer<sup>1</sup>, Rubia Casagrande<sup>4</sup>, Waldiceu A. Verri Jr<sup>3</sup>, Doumit Camilios-Neto<sup>1</sup>, Josiane A. Vignoli<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

<sup>2</sup>Rudolf Virchow Center for Integrative and Translational Bioimaging, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

### ABSTRACT

Inflammatory pain is caused by the release of inflammatory mediators that sensitize peripheral nociceptive sensory neurons. In this sense, it is relevant to seek new therapeutic approaches with fewer adverse effects. Thus, we aimed to obtain di-rhamnolipid (Di-RL), a biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*, in an unprecedented production and purification process, and to investigate the effects of this purified compound (pDi-RL) in animal models of pain and inflammation induced by carrageenan, acetic acid and formalin. The mice were pre-treated with pDi-RL at doses of 0.3 and 3 mg/kg, subcutaneously, 30 minutes before stimulus administration. pDi-RL at a dose of 3 mg/kg reduced mechanical hyperalgesia and leukocyte infiltrate in plantar skin induced by carrageenan, overt pain behaviors induced by formalin and acetic acid. Furthermore, it reduced the number of total leukocytes, mono and polynuclear cells and the production of superoxide anion induced by carrageenan in the peritoneal lavage. Thus, we demonstrate for the first time the analgesic and anti-inflammatory effects of di-rhamnolipid in these models of pain and inflammation.

## INTRODUCTION

Inflammation is a natural protective response of the body, which occurs to combat tissue damage, with the aim of restoring tissue homeostasis [1]. When recognizing the harmful agent, resident cells, such as macrophages and mast cells, lead to the activation of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), responsible for the transcription of pro-inflammatory mediators, such as adhesion molecules and the cytokines as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleucin (IL)- 1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 [2]. These cytokines stimulate the production of more cytokines and other mediators of inflammation by endothelial cells, such as chemokines, vasoactive amines, leukotriene and prostaglandin, which are responsible for increased vascular permeability and increased chemotaxis [3]. Through a chemotactic gradient, chemokines such as CXCL1 together with adhesion from the selectin family, recruit leukocytes to the inflamed focus [4].

In acute inflammation, these recruited leukocytes are monocytes and mainly neutrophils, which produce reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion and nitric oxide [5,6]. The superoxide anion gives rise to other ROS, such as hydroxyl radical, hypochlorous acid and singlet oxygen [7], which cause tissue damage triggered by oxidative stress [8].

One of the characteristic signs of the inflammatory response is pain, an important signal that indicates damage to the organism [9]. Inflammatory pain is caused by the release of inflammatory mediators that sensitize primary sensory neurons (nociceptors) [10]. Recruited neutrophils play an important role in pain, since these cells produce prostaglandin E2 (PGE2), a mediator that acts on EP2 and EP4 nociceptors in neurons, causing neuronal sensitization and activating the transmission of painful stimuli [11]. In addition, neutrophils are also induced to produce cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and superoxide anion [5]. The exacerbated production of superoxide anion activates signaling pathways that contribute to improving its own production [6], and triggers a cascade of events that stimulate NF- $\kappa$ B to produce inflammatory molecules, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , that amplify inflammation and pain [12–14].

Pharmacological control of pain is mostly performed using non-steroidal anti-inflammatory drugs. However, there is evidence that the use of this type of drug causes

significant adverse effects. Therefore, it is of great importance to develop new drugs that control pain and inflammation and do not cause as many side effects [15].

Rhamnolipids (RL) are glycolipids consisting of one or two rhamnose molecules, respectively called mono and di-rhamnolipids (Di-RL), linked to  $\beta$ -hydroxylated fatty acids [16,17]. This class of compounds are biosurfactants produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* as a mixture of congeners, being varieties of mono and Di-RL [18]. RLs have known antibacterial [19–21] and antifungal [19,22] action, and are widely used in agriculture, bioremediation and in the oil, food, cosmetics, pharmaceuticals and cleaning products industries [17]. They are the most studied biosurfactants, due to their high production yield, excellent physicochemical properties, biodegradability and high stability under extreme conditions [16,23]. The main congener produced, Di-RL, is cytotoxic against some types of human cancer cells [22] and is an important agent in healing different types of wounds in animal models [24–26]. In addition, this molecule has low toxicity and its use is safe, being approved by the Food and Drug Administration for use in vegetable, fruit and legume crops [27]. In this sense, we sought to purify Di-RL produced by *P. aeruginosa* and test its therapeutic effects in murine models of inflammatory pain.

## MATERIAL AND METHODS

### Production and extraction of rhamnolipids

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was the strain used for RL production [28]. PAO1 was stored in Luria-Bertani (LB) broth with 20 % glycerol at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Seed culture was prepared by inoculating colonies from LB agar plate into 25 mL of LB broth, within a 125-mL Erlenmeyer flask. The culture was incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm in an orbital shaker until mid-exponential phase (optical density at 600 nm between 0.6 to 0.8). 2.0 mL of mid-exponential phase seed culture was inoculated into a 250-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL sterile salt solution, contained, per liter, 3.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7.0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 3% (v/v) glycerol. Submerged cultivations were incubated in orbital shaker at 200 rpm for 9 days at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cultures were interrupted by centrifugation for 20 min at 2500g [29,30]. The cell-free supernatant was acidified to pH 2 with 1 M HCl solution and stored at 4

°C for 5 days, followed by centrifugation for 25 min, 2500g at 4°C. The RL pellet was extracted with chloroform–methanol (9:1, v/v). The organic solvents were evaporated through reduced pressure at 60 °C giving rise to a crude extract of RL, which was solubilized in distilled water and lyophilized.

### **Rhamnolipids purification**

A silica cartridge purification procedure was carried according to Mello (2019); briefly, the cartridge consisted of a 5 mL tip packed with 300 mg of silica Gel 60 PF254 (Merck®), activated with 5 ml of methanol followed by a cleaning step with 5 ml of dichloromethane. The lyophilized crude RL was solubilized in methanol and applied directly on the silica cartridge, followed by two steps of cleaning with 5 ml of dichloromethane and 5 ml of chloroform: 2% methanol. Purified Di-RL (pDi-RL) was recovered by elution of 5 ml methanol: 2% acetic acid [31]. The purified Di-RL (pDi-RL) was evaluated by orcinol stained thin layer chromatography (TLC), on silica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, 20×20 cm), with a mobile phase of chloroform-methanol-acid acetic (65:15:2). pDi-RL was also subjected to mass spectrometry analysis and liquid nuclear magnetic resonance. The first was performed on a high-resolution Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics Corporation, Germany) with Q-TOF geometry, equipped with an electrospray type ionization source, operated in negative modes with an acquisition rate of 1 Hz (MS and MS/MS) in the mass range of  $m/z$  50 – 600. The analyzes were performed with a capillary voltage of 4.0 kV; source temperature 180 °C; and desolvation gas flow 4 L min<sup>-1</sup>. MS/MS experiments were performed using collision-induced dissociation (CID) with a collision energy ramp in the range of 15 – 40 eV. For nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra were obtained in a direct Bruker Avance III spectrometer 400 MHz operating at a frequency of 400.6 MHz for <sup>1</sup>H, and 100 MHz for <sup>13</sup>C using a 5 mm probe, BBO, at 25°C. Chemical shifts ( $\delta$ ) for hydrogen are expressed in ppm and calibrated according to the TMS signal do not show CDCl<sub>3</sub> at 0 ppm. For carbon, the scale with units in ppm was also used and calibrated with internal TMS at 0 ppm.

### **Animals**

Swiss mice were used in this study, male or female, (20-25g) from Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil. Mice were kept in standard clear cages with water and

food *ad libitum*, in a light/dark cycle (12/12 h) and controlled temperature (21°C). The behavior experiments were carried out between 9 a.m. and 5 p.m. in a temperature-controlled room. The animals were euthanized by inhalation of 5% isoflurane followed by exsanguination. This study was approved by the animal welfare from Londrina State University (037.2020 CEUA-UEL). All efforts were made to minimize animal numbers and suffering.

## Drugs

The compounds used in this study were saline (NaCl 0.9%, Eurofarma Laboratórios S.A., Ribeirão Preto, SP, Brazil), carrageenan (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), nitroblue tetrazolium dye (NBT), hematoxylin, eosin (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil), xylene (Synth, Diadema, SP, Brazil), acetic acid and formaldehyde (Mallinckrodt Baker, S.A., Mexico, Mexico City) and pDi-RL obtained as aforementioned.

## Experimental procedures

Mice were treated subcutaneously with pDi-RL (0.3 and 3 mg/kg) or vehicle (saline 0.9%) 30 minutes before carrageenan administration intraperitoneally (1 mg, 100  $\mu$ L; i.p.) or intraplantar (i.pl.; 300  $\mu$ g, 20  $\mu$ L). Saline group was used as negative control. Mechanical hyperalgesia was assessed using an von Frey filaments or its electronic version at 1, 3, and 5 h after carrageenan stimuli by von Frey electronic. The dose of 3 mg/kg of Di-RL was chosen for the following experiments. Overt pain-like behavior was evaluated through paw flinches induced by formalin (1.5%, 20 $\mu$ l, i.pl), or writings induced by acetic acid. The number of paw flinches was assessed over 30 minutes after administration, and writings during 20 minutes after stimuli. Paw histopathology was assessed after 5h carrageenan induced inflammatory pain. Total leukocyte recruitment, polymorphonuclear and, mononuclear cells were assessed in the peritoneal lavage 5h after carrageenan-induced peritonitis. Moreover, superoxide anion-positive recruited leukocytes were also evaluated 5h after carrageenan-induced peritonitis.

### **Mechanical hyperalgesia test**

Mechanical hyperalgesia was assessed by the electronic von Frey method [32]. This test consists of applying a mechanical stimulus to the animals' hind paw, with a 0.5 mm<sup>2</sup> diameter tip. Thus, increasing pressure was applied to the right hind paw until the pressure required for the paw withdrawal response was recorded, and the force (g) required to induce this nociceptive response was quantified by a digital analgesimeter (Insight®). The results were expressed by the delta value ( $\Delta$ ), obtained by the difference between the measurement of each animal on the time points 1, 3 and 5 h after the stimulus with carrageenan (i.pl.; 300  $\mu$ g, 20  $\mu$ L) and the measurement before the stimulus (baseline).

To measure the mechanical nociceptive threshold, the von Frey filament test (Aesthesio®) was also performed, as described by Chaplan et al. (1994) [33]. The mechanical stimulus was applied to the animal's right hind paw, using a set of filaments of von Frey with increasing bending forces (0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0 and 4.0 g). Each filament was kept in the paw for 2 to 3 seconds, being slightly flexed and the pressure caused by a given filament was detected by the movement of withdrawal of the paw. In the absence of a paw withdrawal response to the initially selected filament, a thicker filament corresponding to a stronger stimulus was used. In the case of paw withdrawal, a weaker stimulus was used. The analysis of the result was carried out by a computer program, the UDReader (Up–Down Reader) as described previously by Gonzalez-Cano et al. (2018) [34]. The results were expressed by the log of gross values.

### **Writhing test**

Writhing was induced by an i.p. stimulus with acetic acid (0.8%). Each mouse was individually placed in a glass cylinder and the writhing behavior was assessed. Results are expressed by the total number of writhes over 20 minutes [35].

### **Formalin test**

Mice were stimulated i.pl. with 1.5% formalin solution (1.5% formaldehyde) which induced a biphasic response over 30 minutes. The neurogenic phase is observed for 0-5 minutes and the inflammatory phase between 10-30 minutes after the formalin stimulus. The

number of paw flinches was counted during both phases. Results were indicated by the number of flinches in both phases [36].

### **Histology**

After 5h of carrageenan-induced inflammatory pain, plantar skin tissue was dissected for histopathological analysis. The samples were stored in 10% formalin for 24h and then washed in running water for 2h. Subsequently, plantar skin was dehydrated in ethanol baths with increasing concentrations (70%, 80%, 95% and 100%), followed by diaphanization with xylene for paraffin embedment. Six slices of each sample were cut in a serial interrupted manner. Slides were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and imaged by optical microscopy at 40×. Finally, the photos were analyzed using the Image J<sup>®</sup> software [37] to assess the leukocyte infiltrate through pixels, given in percentage of cells per dermal area.

### **Peritonitis**

Peritonitis was induced by an i.p. stimulus with carrageenan (1 mg per peritoneal cavity) for 5h. The peritoneal cavity was washed using 1 mL of 2mM EDTA containing 0.5% of BSA. The total number of leukocytes was counted in a Neubauer chamber using Turk's solution to lyse hemaeces (10 uL lavage plus 180 uL Turk's solution). Differential counting was performed by preparing slides stained by Romanowsky stain-based method (Fast Panoptic Kit, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). The results were presented as the number of total leukocytes, polymorphonuclear and mononuclear cells  $\times 10^6$  [38,39].

### **Nitro tetrazolium blue (NBT) assay**

Peritoneal lavage was collected 5h after carrageenan stimulus. Superoxide anion-positive leukocytes were assessed by NBT assay. Cells suspension was incubated an equal part of NBT solution ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and added to a slide for later counter stained by Romanowsky stain-based method (Fast Panoptic Kit, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). The results were the number of NBT positive cells  $\times 10^6$  [40].

## Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  SEM of 6 mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. Two-way repeated measures analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Tukey's post hoc were used to compare groups and doses at all time points when responses were measured at different time points after stimulus injection (mechanical hyperalgesia assessment). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc was performed for data from single time point experiments. For histological analyses was used the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. All data analyses were performed using GraphPad Prism<sup>®</sup> 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

## RESULTS

### Rhamnolipids production

First, RL production was evaluated by liquid submerged cultivation, using a very basic composition medium (salt solution plus glycerol as carbon source), in which, 3.5 g/L of RL was reached after 8 days of cultivation (Table 1). The achieved RL yield was not so impressive. Wide range of RL concentration have been reported, from 0.43 g/L using palm fatty acid distillate as sole under batch fermentation [41] to 70.56 g/L, in soybean oil fed-batch pH stage-controlled fermentation [42].

**Table 1-** Rhamnolipids production and purification: yields, composition, and purity

	<b>Rhamnolipids yield (g/L)</b>	<b>Purity</b>	<b>Di- rhamnolipids</b>	<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>	<b>Recovery Rate</b>
<b>Rhamnolipids</b>	3.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	-	-	-	-
<b>Crude Extract</b>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	> 90.0 % <sup>c</sup>	95.1 % <sup>e</sup>	72.4 % <sup>e</sup>	-
<b>Purified di-RL</b>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	99.0 % <sup>d</sup>	97.5 % <sup>e</sup>	79.3 % <sup>e</sup>	52.3 % <sup>f,g</sup>

<sup>a</sup> Values plotted are the means of triplicate flasks  $\pm$  the standard error of the mean.

<sup>b</sup> Values plotted are the means of duplicate  $\pm$  the standard error of the mean.

<sup>c</sup> Estimated by the sum of integrated signals rhamnolipids proton spectra (Fig S2)

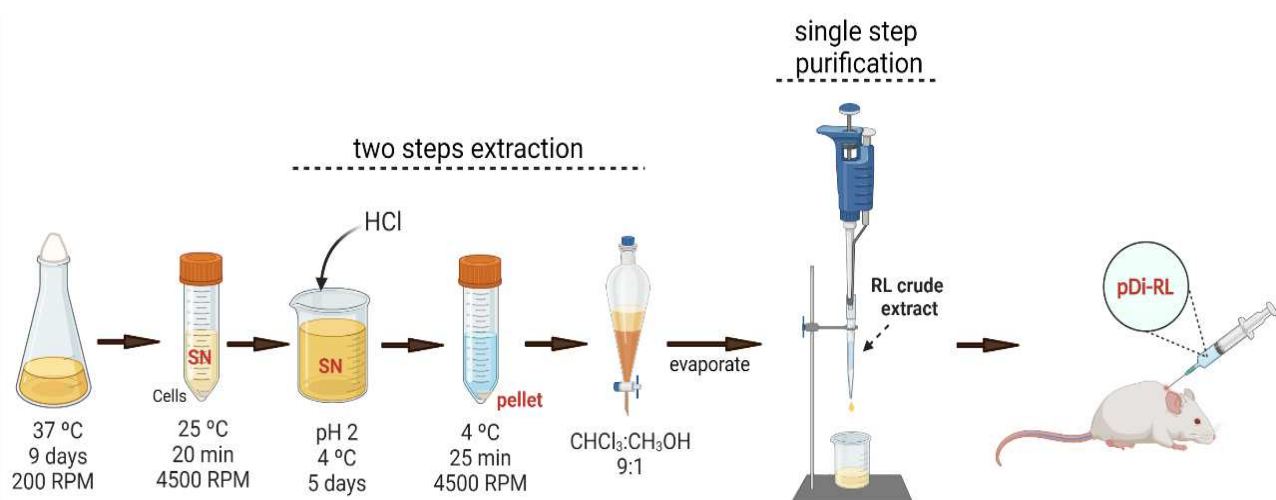
<sup>d</sup> Calculated through NMR proton spectra analysis (Fig S5)

<sup>e</sup> Calculated through mass spectrometry (Table 2)

<sup>f</sup> Percentage of recovery of purified rhamnolipids from crude extract

Production processes that usually reach expressive yields are those based on complex-composition substrates, mostly, the hydrophobic ones [29,43] and in bioreactor experiments, which might reach concentration up to 100-fold higher than shake flask experiments [44]. We also have been working on those complex-medium based process, in which, up to 54 g/L of RL might be reached [29,43,45,46]. Even so, the downstream processes of purification procedures are usually much more complicated in these complex-medium based cultivation [30,47]. In fact, we could not find a worthwhile procedure for RL purification in any of these processes (data not shown).

Here, a 1.5 g/L of RL crude-extract (Table 1) was obtained through a simple two steps procedures; cold-acid precipitation followed by solvent extraction (Fig. 1 and Fig. S1), which turns in a very clean RL extract, achieving at least 90 % of purity (Table 1 and Fig S2). Furthermore, solvent extractions were carried out in precipitated RL sample, quite reducing the amount of solvent used, turning the whole process more feasible. Consequently, the following purification experiments were run using this easy and clean process for RL production and extraction, with an affordable medium in very usual and scalable fermentative technology.



**Figure 1.** Simplified scheme of di-rhamnolipids purification.

## Purification of Rhamnolipids

The RL crude-extract was submitted to analysis of congeners composition by mass spectroscopy (Table 2), which showed a very high percentage of Di-RL congeners (over 95%), also checked by nuclear magnetic resonance (NMR) through integration of the anomeric proton peaks (Fig S2).

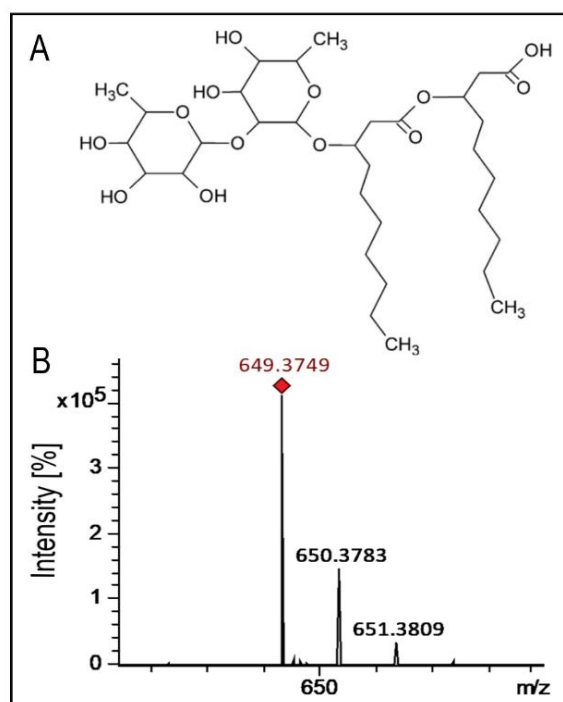
**Table 2** - Chemical composition and relative abundance of the crude extract and the purified rhamnolipid mixture produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

	[M-H] <sup>-</sup>	Crude Extract		Purified *	
		Congeners percentage	Total percentage	Congeners percentage	Total percentage
<b>Mono-rhamnolipids</b>			4.9		2.5
<b>Rha<sub>1</sub>C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>	475.2657 <sup>a</sup>	0.7		-	
<b>Rha<sub>1</sub>C<sub>8</sub>C<sub>10</sub></b>					
<b>Rha<sub>1</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>	503.2974	4.2		2.5	
<b>Di-rhamnolipids</b>			95.1		97.5
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>8</sub></b>	621.3225 <sup>a</sup>	9.3		7.0	
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>8</sub>C<sub>10</sub></b>					
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub></b>	649.3483	72.4		79.3	
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12</sub></b>	677.3778 <sup>a</sup>	6.5		6.8	
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>12</sub>C<sub>10</sub></b>					
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub></b>	675.3584 <sup>a</sup>	7.0		4.4	
<b>Rha<sub>2</sub>C<sub>12:1</sub>C<sub>10</sub></b>					

<sup>a</sup> Isomers

The congener Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> (Fig. 2) is the most abundant (≈ 80 %) (Table 2). It has been well reported that the most abundant congener of RL is Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>, however the Di-RL abundance presented here (over 95 %) is not so frequent. Recently, we have described an alternative fermentation technology (static submerged cultivation using membranes of

bacterial cellulose as substrate) for RL production that reached 95.6 % of Di-RL abundance [29].



**Figure 2.** Most abundant di-rhamnolipid congener (Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>). (A) Structure Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>, (B) mass spectra of Rha<sub>2</sub>C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>.

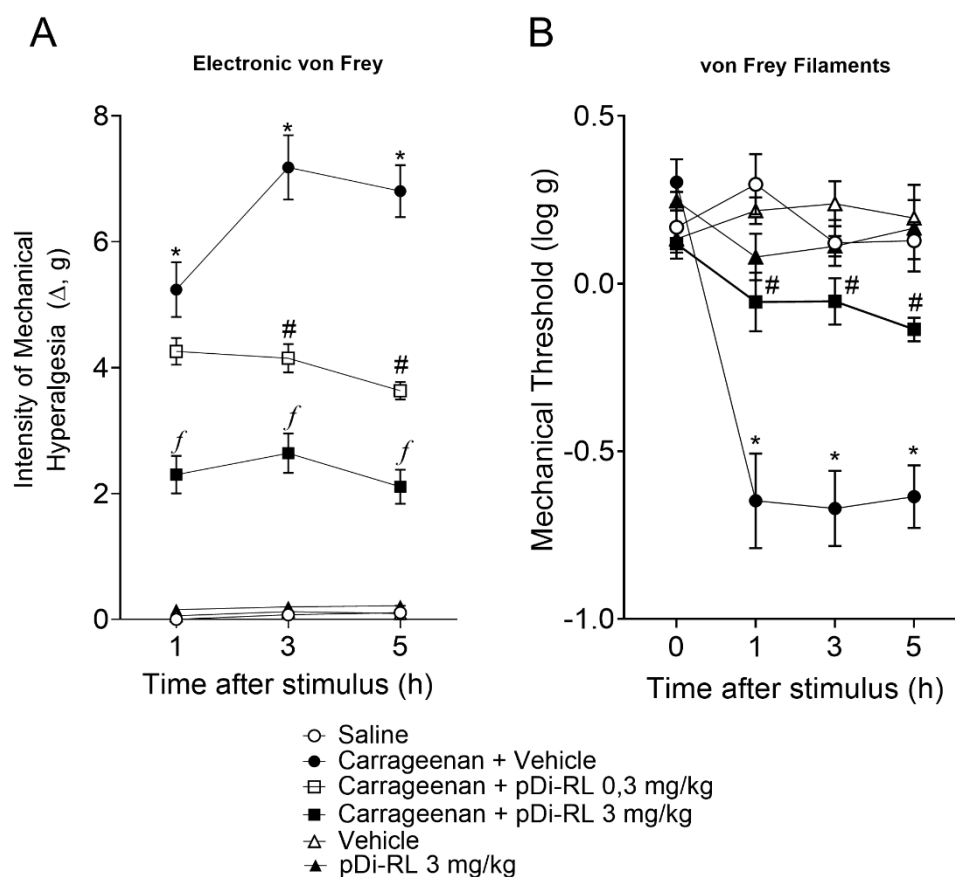
Previous reports of claiming high Di-RL yielding strains, *P. aeruginosa* YM4 [48] and *P. aeruginosa* KT1115 [49] achieved 85.7% and 88.5% of Di-RL, respectively. Note that here and in our previous report, besides the higher amount of Di-RL attained, we have worked with the PAO1 strain, a worldwide laboratory model of *P. aeruginosa* studies, including for RL production [44]. Di-RL have been stated to be the more successful ones in treatment of wound healing [26], in stimulation of immune system of animals and plants [50–55], and in scar formation therapy [24]. Given that, fermentation processes that produce mixtures of RL, highly abundant in Di-RL, might present industrial advantage [29,48,49].

The crude extracted was then submitted to the purification procedure (Fig. 1 and S1) through a home-made silica gel 60 cartridge (Fig. S3). Different sequences of solvent-washing were run to find the best quality and recovery rate of the Di-RL (Table 1, Fig. S4). Different purification procedures were also tried (Table S1), being the silica cartridge the best one; highly efficient, easy-to-do and most cost effective. Highly pure mixture of RL, 99.0 % of

RL/ 97.5 % of Di-RL (Table 1, Table 2, and Fig S5), was reached following the proposed workflow (Fig. 1 and Fig. S1). Since the pure mixture of RL is mainly composed by Di-RL, hereafter will be named as pure Di-RL (pDi-RL).

### **pDi-RL inhibited carrageenan-induced mechanical hyperalgesia**

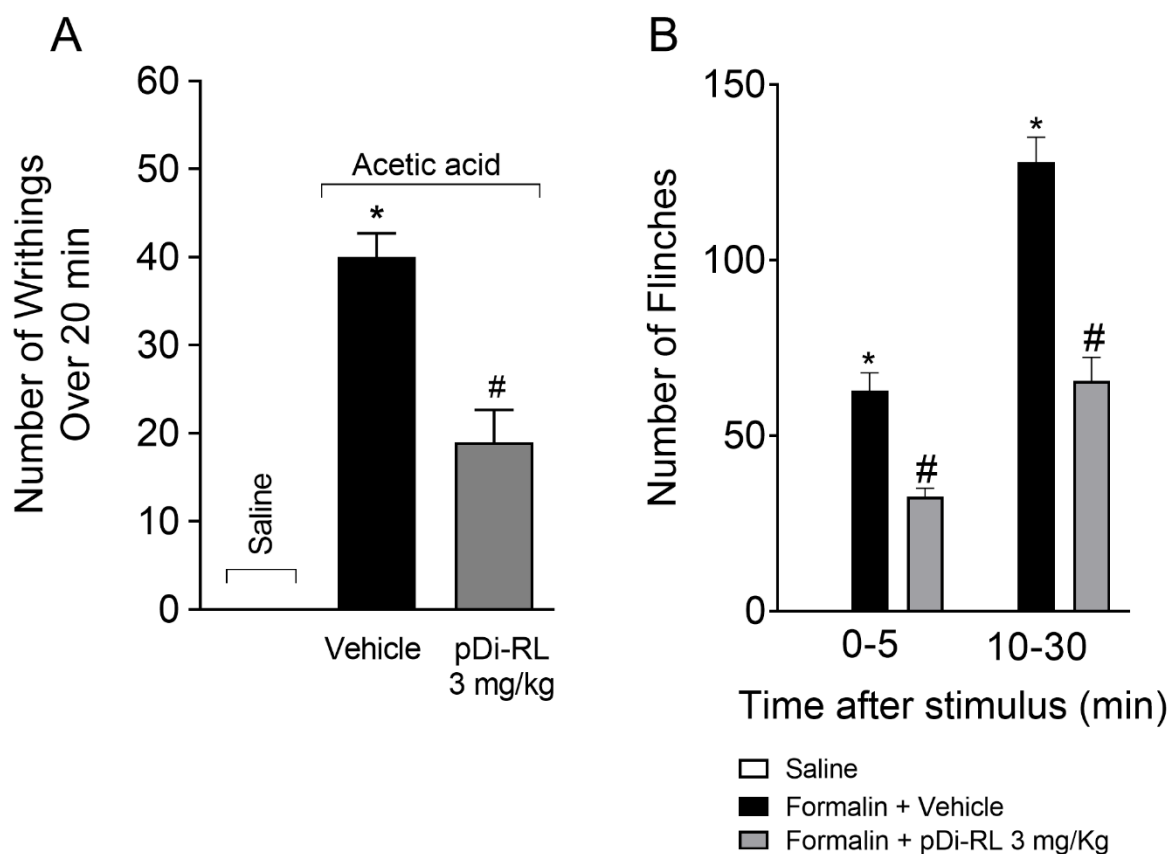
In the first set of experiments, the analgesic effect of pDi-RL of the doses 0.3 and 3 mg/kg were evaluated in carrageenan-induced inflammatory pain using an electronic version of von Frey filaments. Both doses of pDi-RL inhibited the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (Fig. 3A) after 3h. The 3 mg/kg dose induced more analgesia when compared to the lowest dose, since there was a significant difference in all evaluated times (1-5h), thus being selected for the following experiment. Next, we assessed the mechanical hyperalgesia using von Frey filaments. The 3 mg/kg dose induced analgesia in carrageenan-induced inflammatory pain (Fig. 3B). Here we also rule out any effect induced by only the drug vehicle or pDi-RL (Fig. 3B). Therefore, pDi-RL has an analgesic effect in carrageenan-induced inflammation.



**Figure 3.** pDi-RL inhibited carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. Mice received pDi-RL (0.3 and 3 mg/kg; subcutaneous) or vehicle (saline) 30 minutes before carrageenan intraplantar stimulus (300  $\mu$ g, 20  $\mu$ L, i.pl.). The mechanical hyperalgesia was evaluated 1, 3 and 5 h after stimulus by electronic von Frey method (**A**) or von Frey filaments (**B**). Results are presented as means  $\pm$  SEM of 6 mice per group per experiment and are representative of 2 separate experiments. Two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc were performed. \* $p < 0.05$  carrageenan + vehicle compared to saline group; # $p < 0.05$  pDi-RL (0,3 mg/kg) compared to carrageenan + vehicle group;  $f$  $p < 0.05$  pDi-RL (3 mg/kg) compared to the other dose and to carrageenan + vehicle group.

### pDi-RL inhibited overt pain-like behavior induced by acetic acid and formalin

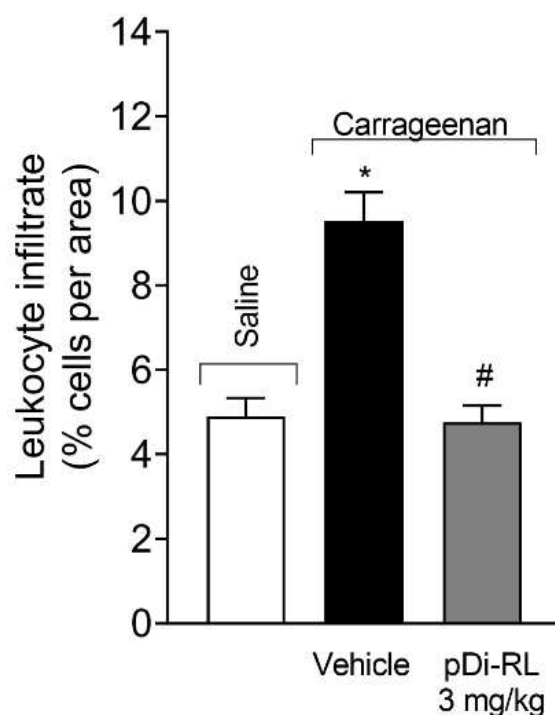
To verify the effect of pDi-RL on overt pain-like behavior, we analyzed the number of abdominal contortions induced by acetic acid (0.8%, 100  $\mu$ L; i.p.) and paw flinches induced by formalin (1.5% formaldehyde, 20  $\mu$ L, i.pl.). The dose of 3 mg/kg significantly inhibited the writhing response induced by acetic acid over 20 minutes (Fig. 4A). We also found that the tested dose exerted an analgesic effect on the formalin-induced paw flinches both in the first (0 - 5 minutes) and second (10 - 30 minutes) phases (Fig. 4B).



**Figure 4.** pDi-RL inhibited overt pain-like behavior. Mice were treated with pDi-RL (3 mg/kg; subcutaneous) or vehicle (saline) 30 minutes before intraplantar injection of 0.8% acetic acid (A) and 1.5% formalin (B). The cumulative number of writhing was evaluated over 20 minutes and total number of paw flinches were evaluated over 30 minutes. Results are presented as means  $\pm$  SEM of 6 mice, respectively, per group per experiment and are representative of 2 separate experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test were performed. \* $p < 0.05$  carrageenan + vehicle compared to saline group; # $p < 0.05$  pDi-RL (3 mg/kg) compared to carrageenan + vehicle group.

#### pDi-RL reversed the leukocyte infiltrate caused by carrageenan administration

To verify the effect of pDi-RL on the leukocyte infiltrate, we carried out a histological analysis of the plantar skin tissue. Each photo taken after the histological technique was analyzed using the Image J® software, which calculated the leukocyte infiltrate, given in percentage of cells per dermal area. pDi-RL at a dose of 3 mg/kg reversed the infiltrate caused by the administration of carrageenan, since there was no significant difference between the saline and treated group.

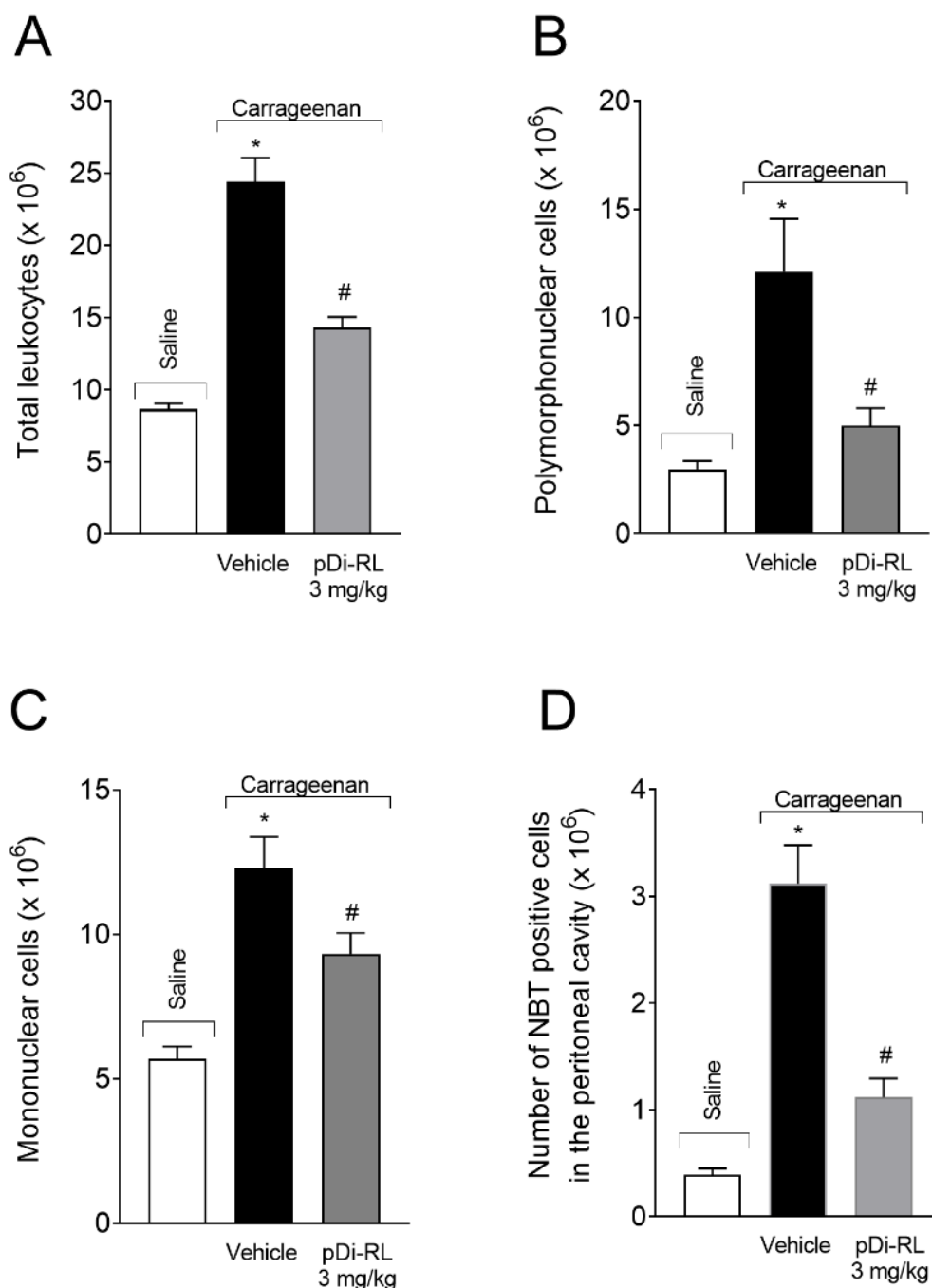


**Figure 5.** pDi-RL reversed the leukocyte infiltrate caused by carrageenan administration. Mice received pDi-RL (3 mg/kg, subcutaneous) or vehicle (saline) 30 minutes before carrageenan intraplantar stimulus (300  $\mu$ g, 20  $\mu$ L, i.pl.). 5 hours after stimulation, the plantar tissue was collected for histological analysis. Leukocyte infiltrate was evaluated by Image J<sup>®</sup> software, given in percentage of cells per dermal area. Results are presented as means  $\pm$  SEM of 6 mice per group per experiment. For statistical analysis was used the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc. \* $p < 0.05$  carrageenan + vehicle compared to saline group; # $p < 0.05$  pDi-RL (3 mg/kg) compared to carrageenan + vehicle group.

**pDi-RL inhibited carrageenan-induced total leukocyte recruitment, polymorphonuclear and mononuclear cells and superoxide anion production in the peritoneal cavity**

After 5h of stimulus administration, peritoneal exudate was collected to assess leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. The stimulus led to a significant increase of total leukocytes as well as at the polymorphonuclear and mononuclear cells recruitment. The treatment with pDi-RL at 3 mg/kg reduced the total leukocytes recruitment (Fig. 6A), polymorphonuclear (Fig. 6B) and mononuclear cells (Fig. 6C) induced by carrageenan.

In addition, the peritoneal exudate was collected to analyze NBT-positive cells. pDi-RL reduced the number of NBT positive cells from peritoneal cavity (Fig. 6D) suggesting a reduction in superoxide anion production in the cells.



**Figure 6.** pDi-RL inhibited carrageenan-induced leukocyte recruitment and superoxide anion production in the peritoneal cavity. Mice were treated with pDi-RL (3 mg/kg, subcutaneous) or vehicle (saline) 30 minutes before carrageenan intraperitoneal administration (1 mg, 100  $\mu$ L, i.p.). Total number of leukocytes recruitment (A), polymorphonuclear (B) and mononuclear cells (C) and the number of NBT positive cells (D) from peritoneal exudate were evaluated 5h after stimulus. Results are presented as means  $\pm$  SEM of 6 mice per group per

experiment and are representative of 2 separate experiments. One-away ANOVA followed by Tukey's post hoc test were performed. \* $p < 0.05$  carrageenan + vehicle compared to saline group; # $p < 0.05$  pDi-RL (3 mg/kg) compared to carrageenan + vehicle group.

## DISCUSSION

Rhamnolipids (RLs) are secondary metabolites produced heterogeneously, as a mixture of congeners, mainly by *Pseudomonas aeruginosa* [18]. This class of compounds presents a well-known surfactant activity, being a great potential for industrial and environmental applications [56]. The greatest applicability of RL is in the biodegradation of hydrophobic pollutants, such as oil spills cleaning [57]. RL have higher surface and emulsifying activity when compared to chemical surfactants, such as SDS and Tween 80. This biosurfactant also showed better stability in extreme conditions of temperature, pH and ionic strength [49].

Additionally, *in vitro* antimicrobial [19–21] and antifungal properties have also been reported [24,27–29]. These properties allow the incorporation of RLs in deodorants, repellents and toothpastes [58].

We report a cost-effective process for production and purification of Di-RL. Highly pure Di-RL mixture (pDi-RL: RL 99.0 %, Di-RL 97.5 %) was reached following the developed procedure. RL crude extract was obtained through a simple two steps procedure followed by a single step purification procedure. The whole process of production and purification showed to be easy, fast and affordable.

We evaluated the analgesic effect of pDi-RL on mechanical paw hyperalgesia induced by carrageenan. Carrageenan is a classic model of acute inflammation. This polysaccharide induces the migration of leukocytes to the inflammatory focus [59], and these cells are induced to produce pro-inflammatory mediators such as CXCL1, TNF- $\alpha$  and IL-1B. CXCL1 recruits neutrophils and IL-1 $\beta$  induces these cells to produce PGE2, which in turn acts on nociceptors via EP2 and EP4 receptors, causing neuronal sensitization and detected as hyperalgesia [60–62]. Our results show that pDi-RL, administered subcutaneously, significantly reduced the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan between 1 and 5 h, at the dose of 3 mg/kg, evaluated by the electronic von Frey method. Furthermore, the anti-nociceptive effect of this dose was confirmed by the von Frey filament method.

Subcutaneous administration of Di-RL in Swiss–Webster mice demonstrated that this compound has low toxicity at 120 mg/kg per day [26].

Next, the anti-nociceptive efficacy was assessed in the abdominal writhing model induced by acetic acid. There is evidence that this compound causes the release of mediators that modulate pain in the peritoneum, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33 and spinal activation of MAP-kinases [63,64]. Thus, we demonstrated that treatment with pDi-RL significantly reduced the number of abdominal contortions. Also, aiming to evaluate the pDi-RL anti-nociceptive effect, we used the formalin model to induce pain and inflammation in the animal's paw. The formalin test has two phases: the first one is neurogenic pain while the second one is inflammatory pain, which are modulated by different mediators [65]. The neurogenic phase, which occurs in the first 5 minutes, is associated with direct stimulation of nociceptors. While, in the inflammatory phase, which occurs between 15-30 minutes, it involves the sensitization of neurons and the release of prostaglandins, serotonin, bradykinins and histamines [66,67]. Here we show that pDi-RL was able to reduce pain of neurogenic and inflammatory origin (both phases), verified by the decrease in the number of flinches by the mouse. Due to this, we decided to evaluate the anti-inflammatory activity.

From the histological analysis, we observed that pDi-RL at the treated dose reversed the leukocyte infiltrate induced by carrageenan in the plantar skin tissue. In view of this, we decided to investigate which of these inflammatory cells the molecule had the greatest effects on. So, we performed a model of peritonitis induced by carrageenan. Barth et al. (2016) demonstrated that carrageenan promotes the generation of ROS and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) when injected into the peritoneum of mice [59]. As expected, carrageenan increased the migration of total leukocytes, polymorphonuclear and mononuclear cells into the inflammatory focus. Pre-treatment with pDi-RL reduced the number of these immune defense cells, especially polymorphonuclear cells (mostly neutrophils). TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are important mediators involved in the recruitment of neutrophils by chemotactic mechanisms [61]; however, pDi-RL did not reduce the production of these cytokines in the paw in the carrageenan model (data not shown). Therefore, we hypothesize that pDi-RL decreases inflammation induced by carrageenan in the peritoneum reducing the recruitment of mono and polymorphonuclear cells. This effect of pDi-RL may also be associated with an inhibition of oxidative stress since free radicals also lead to inflammation and pain [68].

Neutrophils also produce large amounts of superoxide anion, and the excessive production of this free radical triggers signaling pathways that induce its own production, as well as pain and inflammation [69]. The production of superoxide anion in cells induced by carrageenan was evaluated by microscopic assay of NBT positive cell counts. In this study, we found that pre-treatment with pDi-RL reversed the number of positive cells for NBT, since there was no significant difference between the control group and the treated group. Thus, we demonstrate that pDi-RL has an anti-inflammatory effect by inhibiting the production of superoxide anion in stimulated cells, and thus acts by inhibiting oxidative stress in the peritoneum.

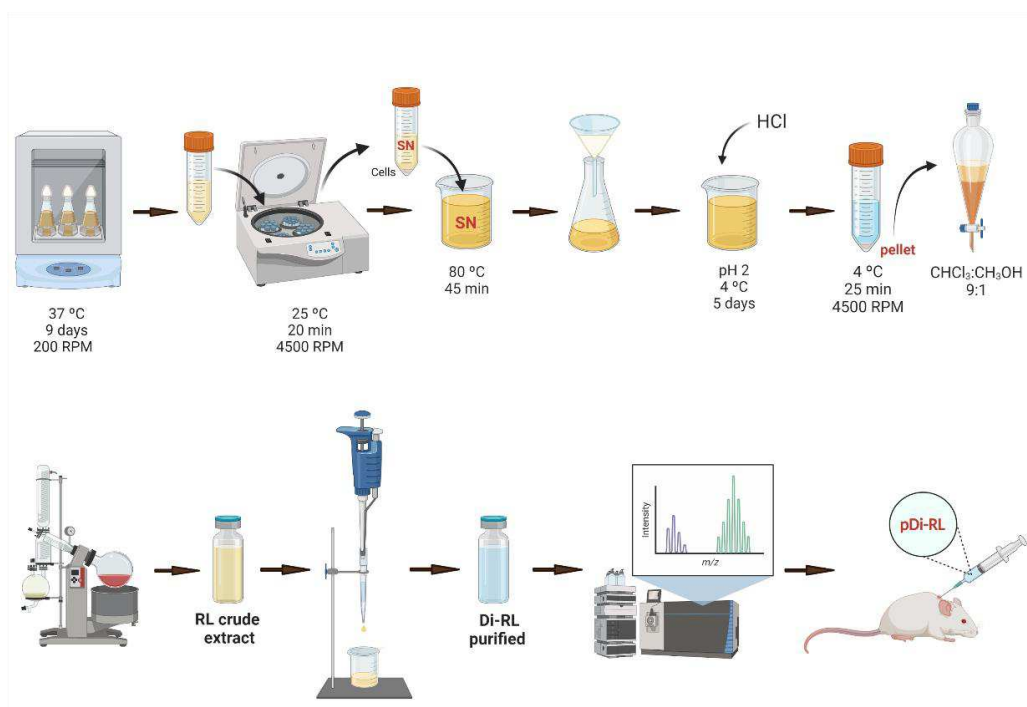
It has already been demonstrated that RLs present cytotoxicity against cervical, leukemic, breast and bladder cancer cells [22,70]. In addition, the congener produced in greater proportion, Di-RL, has therapeutic efficacy *in vivo* healing processes. Topical treatment (ointment) of Di-RL (0.1% in eucerin) was effective in healing burn wounds caused by boiling water in Sprague-Dawley rats, an effect achieved through the reduction of collagen in the injured area which is associated with failure to heal in chronic wounds [26]. Topical treatment of Di-RL (2 g/L in PBS) inhibited keloid formation in rabbit ear wound healing caused by puncture, this effect occurs via a cell death mechanism directed at myofibroblasts [24]. Topical treatment (ointment) of Di-RL (5 g/L) has effects on the healing of excision wounds in Wistar rats caused by an 8 mm circular blade, which is favored by its antimicrobial action against *Staphylococcus aureus* ATCC6588, which contributes to protecting the wound site from bacterial infection [25].

It has already been reported that rhamnolipids demonstrated anti-inflammatory effects in another *in vivo* model [71], but this is the first work that demonstrated analgesic effects. In the present study, Di-RL (pDi-RL) purified from *Pseudomonas aeruginosa* reduced inflammation and pain behaviors in mice, induced by carrageenan and formalin in the paw and by acetic acid in the peritoneum, as well as presenting inhibitory effects on leukocyte migration and superoxide anion production in carrageenan-induced peritonitis. The use of RLs is safe due to their non-toxicity and high biodegradability, being used in the food, pharmaceutical, petrochemical and health sectors [22]. Its biological properties combined with anti-irritant effects and compatibility with the skin, allow RLs to be used in therapeutic applications [26].

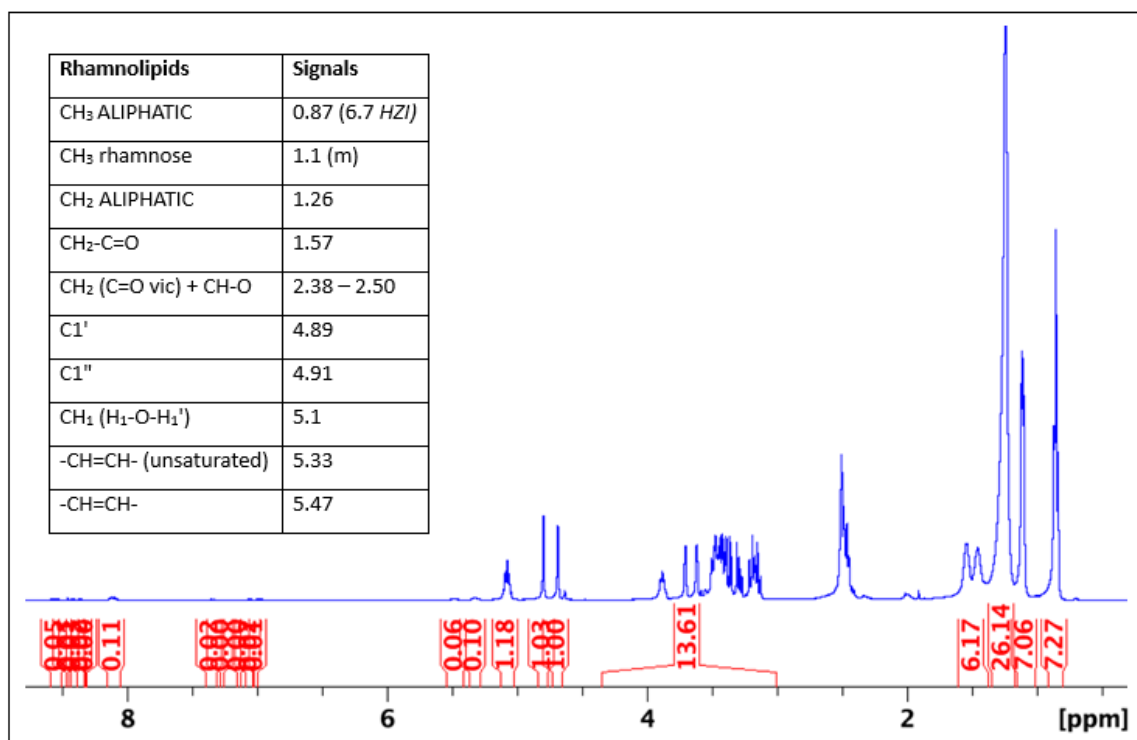
## CONCLUSIONS

In conclusion, this study demonstrated for the first time the analgesic and anti-inflammatory effects of Di-RL in mice. This compound, which was produced by *Pseudomonas aeruginosa* and purified in an unprecedented process in a fast, simple and high purity way, attenuated acute pain behaviors induced by acetic acid in the peritoneum and by formalin in the paw, reduced mechanical hyperalgesia and histological damage caused by carrageenan in the paw. pDi-RL were able to reduce inflammation induced by carrageenan in the peritoneum and its effects may be related to decrease in the production of superoxide anion and the recruitment of leukocytes to the inflammatory focus. However, further studies should be carried out to establish the mechanisms of therapeutic efficacy of Di-RL in pain and inflammation.

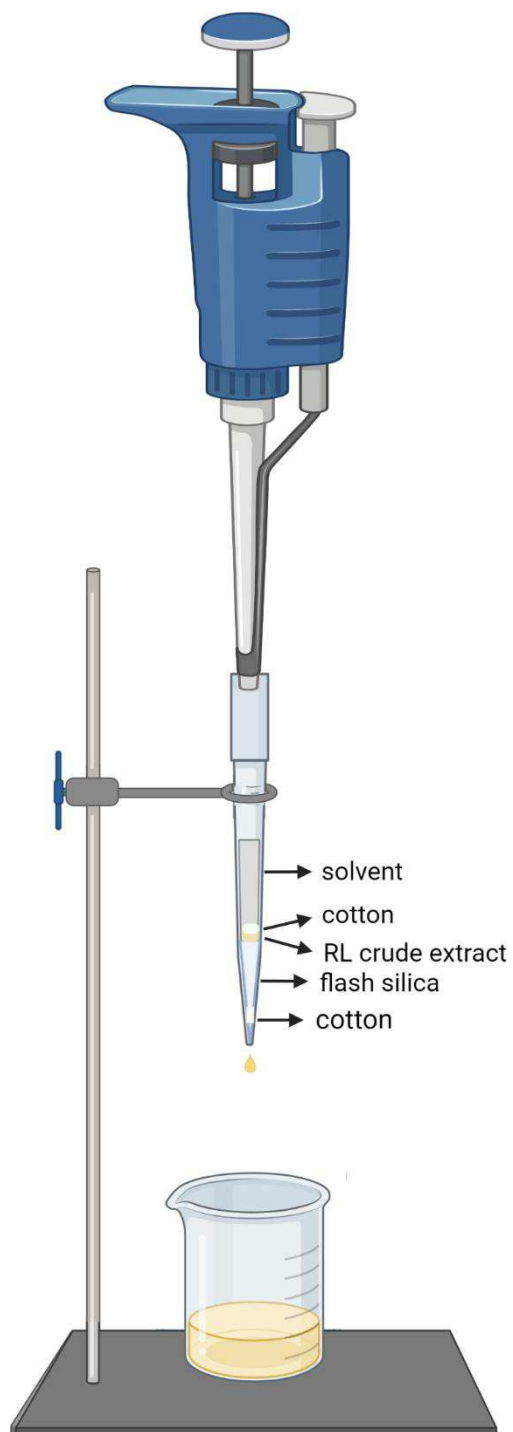
## SUPPLEMENTARY MATERIAL



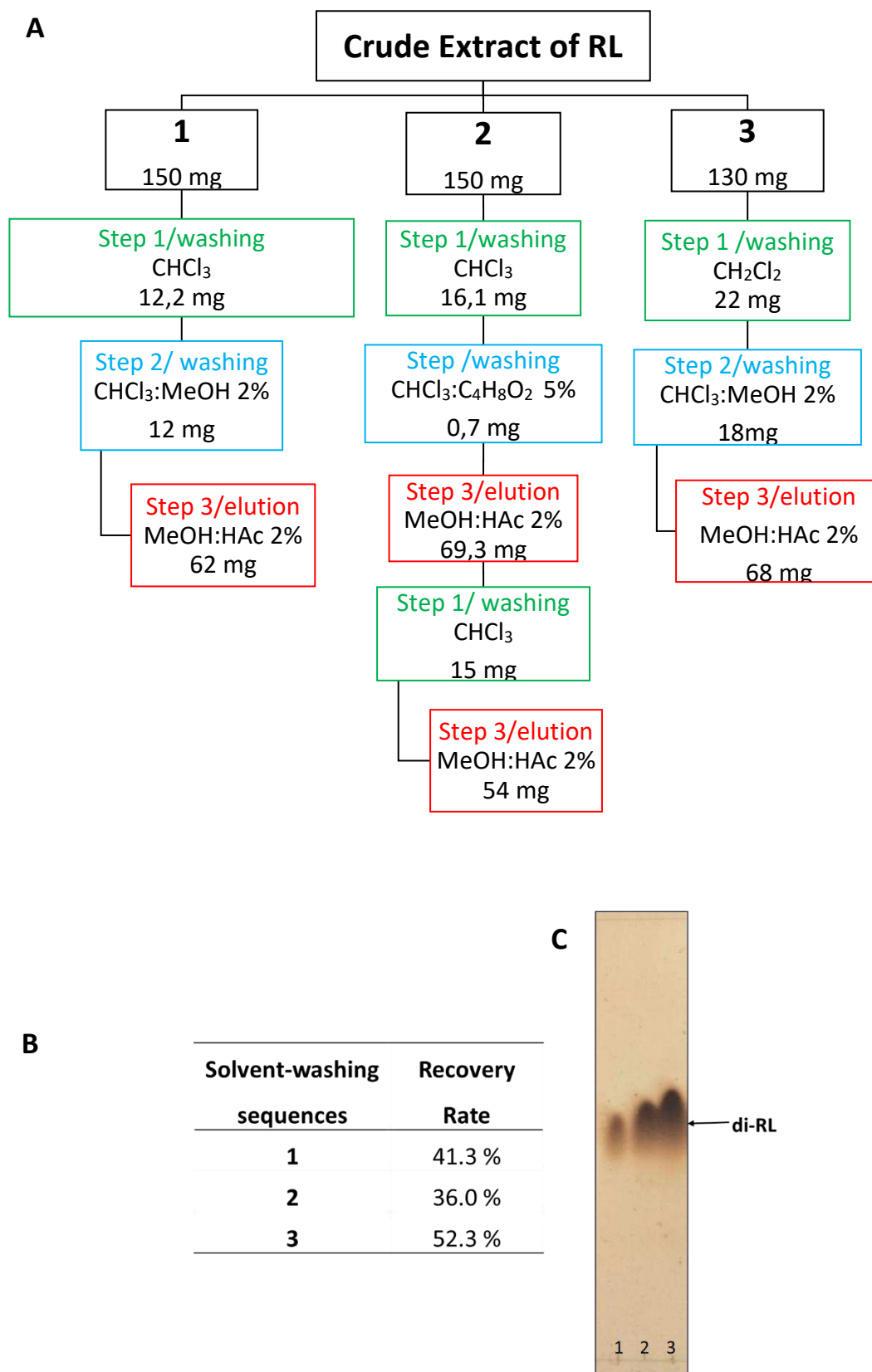
**Fig S1** di-Rhamnolipids production and purification: complete workflow



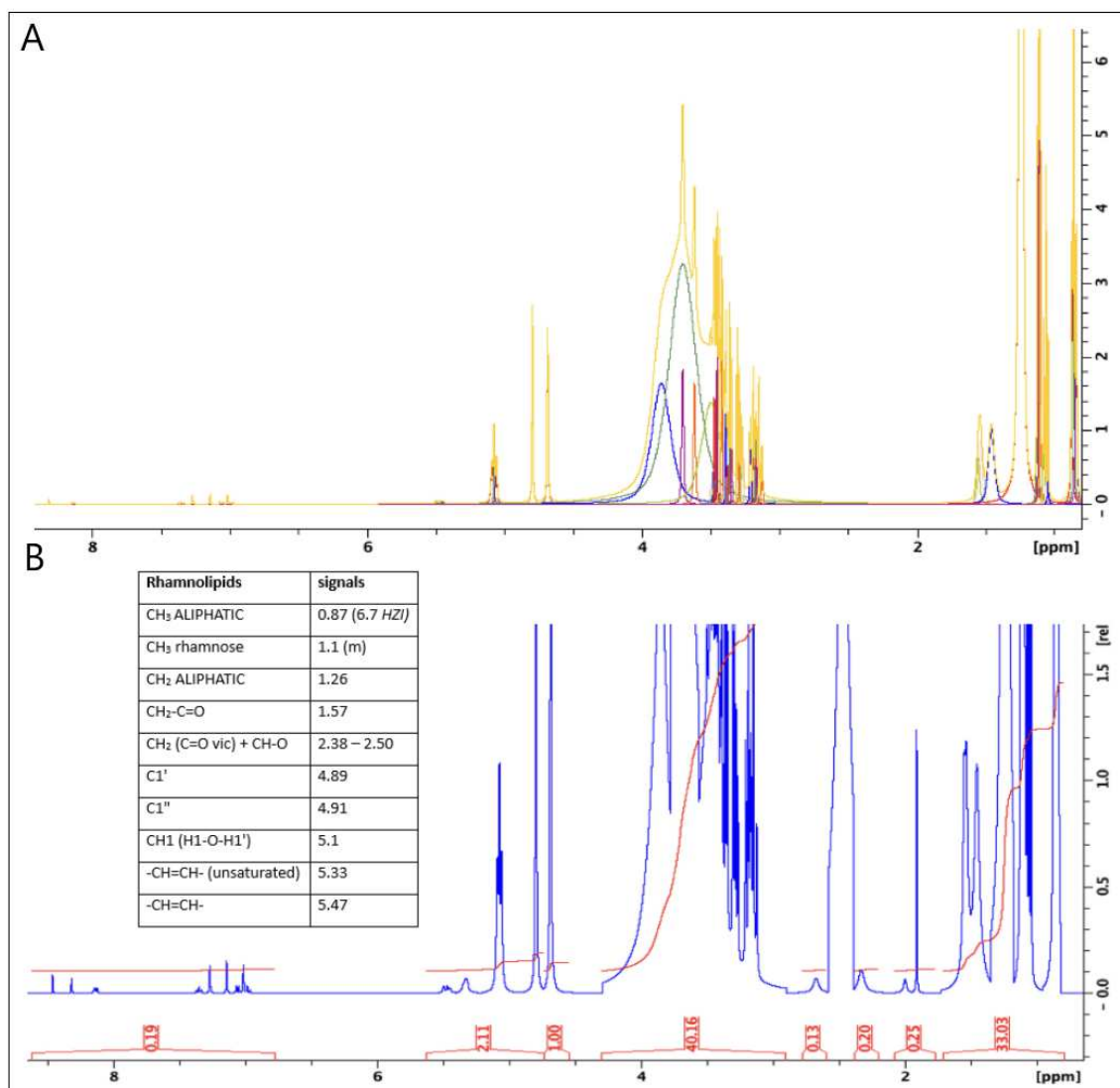
**Fig. S2** Nuclear magnetic resonance proton spectra with the integrated regions of rhamnolipids crude-extract



**Fig S3** Home-made silica gel cartridge



**Fig. S4** Evaluation of solvent washing and elution procedure for silica gel cartridge purification. (A) sequences of solvent-washing, (B) recovery rate, (C) orcinol stained analytical TLC from the recovery di-RL from solvent-washing sequences 1, 2 and 3. TLC mobile phase:  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (20%): $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (3%).



**Fig S5** Relative purity analysis of purified di-rhamnolipids by nuclear magnetic resonance proton-quantification. (A) Deconvolution sum of each hydrogen signal present in the rhamnolipids nuclear magnetic resonance proton spectra. (B) Calculated area for each signal from the deconvolution of the hydrogen signals in rhamnolipid spectrum, with the integrated regions and values.

### Relative purity analysis of purified di-rhamnolipids (pdi-RL) by nuclear magnetic resonance proton-quantification.

The determination of the rhamnolipids purity was carried out by the modified method of relative quantification [46]. The analysis was performed from the deconvolution graphs of the <sup>1</sup>H NMR spectra, obtained in the Bruker Avance III equipment, using pulse program *zgpr* with 8 scans (*ns*), with fid size of 65536 (*td*, *size of fid*), relaxation time (*d1*, *relaxation delay*) of 1 s, with polynomial automatic adjustment of the baseline. First, the deconvolution of all

hydrogen signals was performed except for the solvent DMSO-*d*6, and the graph was reconstructed from the quantitative data Fig S5A. The integrated regions were 20-times larger than the signal width at their average height. For calculation of relative purity, the areas of hydrogen signals (Table 1) were aggregated as values of the analyte, *rA*. All other signals present in the spectrum were assigned as impurities, *rC*. Note that no perceptible signal of these contaminants in the regions quantified as analyte in the 2D spectrum of <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (*hsqcedetgpcp.3*, *td* 512x256, number of scans *ns* 16) (data not shown). The degree of purity was obtained from the ratio of the mass of total hydrogens of the rhamnolipids against the total mass of hydrogens of the sample following the formula below:

$$p\% = \frac{rA}{(rA + rC)} \cdot 100$$

The relative hydrogen measurement considered that the total mass of hydrogen is representative of the total mass of the sample, and that the hydrogens of each molecular entity end up composing the fraction of the whole. Thus, once all the rhamnolipid hydrogen signals were characterized, the sum of their areas is a representation of their mass present in the sample. Applying the integration data for the main analyte (rhamnolipids), it leads to a percent purity of 99.001%.

**Table S1** Evaluation of different methods for rhamnolipids purification

<b>Purification procedures</b>	<b>Solvent volume per mass of crude extract (mL/g)</b>	<b>Recovery rate (%) <sup>a</sup></b>	<b>Purification Efficiency <sup>b</sup></b>	<b>Technical difficulties <sup>c</sup></b>
<b>Preparative Thin Liquid Chromatography</b>	3.5	65.6	Low	High
<b><i>Flash Liquid Chromatography</i></b>	2.5	69.0	Medium	High
<b>Home-Made Silica Cartridge</b>	0.2	52.3	High	Low

<sup>a</sup> Recovery rate were estimated based on the difference from initial to final masses

<sup>b</sup> Purification efficiency was estimated by analytical TLC performed after each procedure

<sup>c</sup> the evaluation of technical difficulties was based on preparation time, materials used and conditions necessary to perform the technique

## References

- [1] R. Rodrigues, A. Maria, R. Costa, R. Duarte, D.E. Souza, W. Gomes-Leals, Inflamação em doenças neurodegenerativas, *Rev. Para. Med.* 21 (2007) 29–34. [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-59072007000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-59072007000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) (accessed November 30, 2022).
- [2] S. Ghosh, M.S. Hayden, New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 837–848. <https://doi.org/10.1038/nri2423>.
- [3] W.A. Verri, T.M. Cunha, C.A. Parada, X.Q. Wei, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN- $\gamma$ , endothelin, and prostaglandin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006). <https://doi.org/10.1073/pnas.0603286103>.
- [4] R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, *Nature.* 454 (2008) 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.
- [5] J. Anrather, G. Racchumi, C. Iadecola, NF- $\kappa$ B Regulates Phagocytic NADPH Oxidase by Inducing the Expression of gp91, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5657–5667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506172200>.
- [6] D. Salvemini, D.P. Riley, S. Cuzzocrea, Sod mimetics are coming of age, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 367–374. <https://doi.org/10.1038/nrd796>.
- [7] D. Taubert, T. Breitenbach, A. Lazar, P. Censarek, S. Harlfinger, R. Berkels, W. Klaus, R. Roesen, Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.005>.
- [8] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>.
- [9] D. Julius, A.I. Basbaum, Molecular mechanisms of nociception, *Nature.* 413 (2001) 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>.
- [10] J. Braz, C. Solorzano, X. Wang, A.I. Basbaum, Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control, *Neuron.* 82 (2014) 522–536. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.018>.
- [11] F.A. Pinho-Ribeiro, W.A. Verri, I.M. Chiu, Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation, *Trends Immunol.* 38 (2017) 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>.
- [12] D.C. Choi, J.Y. Lee, E.J. Lim, H.H. Baik, T.H. Oh, T.Y. Yune, Inhibition of ROS-induced p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves neuropathic pain after spinal cord injury in rats, *Exp. Neurol.* 236 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.014>.
- [13] M.M. Ndengele, S. Cuzzocrea, E. Esposito, E. Mazzon, R. Di Paola, G.M. Matuschak, D. Salvemini, Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity, *FASEB J.* 22 (2008).

<https://doi.org/10.1096/fj.08-108159>.

- [14] W.A. Verri, F.T.M.C. Vicentini, M.M. Baracat, S.R. Georgetti, R.D.R. Cardoso, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, M.J.V. Fonseca, R. Casagrande, Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms, in: *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2012: pp. 297–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>.
- [15] M. Batlouni, Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais, *Arq. Bras. Cardiol.* 94 (2010) 556–563. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>.
- [16] Y. Liu, G. Zeng, H. Zhong, Z. Wang, Z. Liu, M. Cheng, G. Liu, X. Yang, S. Liu, Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability: enhancement or reduction?, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.025>.
- [17] S.J. Varjani, V.N. Upasani, Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant, *Bioresour. Technol.* 232 (2017) 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>.
- [18] S.D. Wadekar, S.B. Kale, A.M. Lali, D.N. Bhowmick, A.P. Pratap, Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42 (2012) 249–266. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.603000>.
- [19] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa, Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 85 (2004) 1–8. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>.
- [20] E. Vasileva-Tonkova, A. Sotirova, D. Galabova, The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater, *Curr. Microbiol.* 62 (2011) 427–433. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9725-z>.
- [21] L. Magalhães, M. Nitschke, Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin, *Food Control.* 29 (2013) 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.009>.
- [22] P. Thakur, N.K. Saini, V.K. Thakur, V.K. Gupta, R. V. Saini, A.K. Saini, Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine, *Microb. Cell Fact.* 20 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01497-9>.
- [23] H. Chong, Q. Li, Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies, *Microb. Cell Fact.* 16 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>.
- [24] C. Shen, L. Jiang, H. Shao, C. You, G. Zhang, S. Ding, T. Bian, C. Han, Q. Meng, Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation, *Sci. Rep.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37553>.

- [25] S. Sana, S. Datta, D. Biswas, B. Auddy, M. Gupta, H. Chattopadhyay, Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp., *Wound Med.* 23 (2018) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.09.006>.
- [26] T. Stipcevic, A. Piljac, G. Piljac, Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid, *Burns.* 32 (2006) 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2005.07.004>.
- [27] M. Nitschke, S.G.V.A.O. Costa, Biosurfactants in food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>.
- [28] B.W. HOLLOWAY, Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology.* 13 (1955) 572–581. <https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-572>.
- [29] K.S. Conceição, M. de Alencar Almeida, I.C. Sawoniuk, G.D. Marques, P.C. de Sousa Faria-Tischer, C.A. Tischer, J.A. Vignoli, D. Camilios-Neto, Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* grown on membranes of bacterial cellulose supplemented with corn bran water extract, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 30222–30231. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09315-w>.
- [30] D.C. Neto, J.A. Meira, E. Tiburtius, P. Peralta Zamora, C. Bugay, D.A. Mitchell, N. Krieger, Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils, *Biotechnol. J.* 4 (2009) 748–755. <https://doi.org/10.1002/biot.200800325>.
- [31] A.P.Q. Mello, Produção direcionada de Di-Ramnolípídeo por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 e desenvolvimento de processo de purificação para obtenção de um único congêneres, Universidade Estadual de Londrina, 2019.
- [32] T.M. Cunha, W.A. Verri, G.G. Vivancos, I.F. Moreira, S. Reis, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, An electronic pressure-meter nociception paw test for mice, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37 (2004). <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300018>.
- [33] S.R. Chaplan, F.W. Bach, J.W. Pogrel, J.M. Chung, T.L. Yaksh, Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, *J. Neurosci. Methods.* 53 (1994) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).
- [34] R. Gonzalez-Cano, B. Boivin, D. Bullock, L. Cornelissen, N. Andrews, M. Costigan, Up-Down reader: An open source program for efficiently processing 50% von frey thresholds, *Front. Pharmacol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00433>.
- [35] W.A. Verri, T.M. Cunha, D.A. Magro, A.C. Domingues, S.M. Vieira, G.R. Souza, F.Y. Liew, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 588 (2008) 207–212. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2008.04.010>.
- [36] D. Dubuisson, S.G. Dennis, The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain.* 4 (1977). [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0).

- [37] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*. 9 (2012) 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [38] R.M. Martinez, A.C. Zarpelon, V.V.M. Zimmermann, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, M.J.V. Fonseca, F.T.M.C. Vicentini, I.C. Moreira, C.C. Andrei, W.A. Verri, R. Casagrande, Tephrosia sinapou extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: Effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production, *Rev. Bras. Farmacogn.* 22 (2012) 587–597. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000006>.
- [39] S.S. Mizokami, M.S.N. Hohmann, L. Staurengo-Ferrari, T.T. Carvalho, A.C. Zarpelon, M.I. Possebon, A.R. De Souza, R.C.S. Veneziani, N.S. Arakawa, R. Casagrande, W.A. Verri, Pimaradienoic acid inhibits carrageenan-induced inflammatory leukocyte recruitment and edema in mice: Inhibition of oxidative stress, nitric oxide and cytokine production, *PLoS One*. 11 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149656>.
- [40] H. Sim Choi, J. Woo Kim, Y. Cha, C. Kim, A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells, *J. Immunoass. Immunochem.* 27 (2006) 31–44. <https://doi.org/10.1080/15321810500403722>.
- [41] M.N. Radzuan, I.M. Banat, J. Winterburn, Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste, *Bioresour. Technol.* 225 (2017) 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.052>.
- [42] L. Zhu, X. Yang, C. Xue, Y. Chen, L. Qu, W. Lu, Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process, *Bioresour. Technol.* 117 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.091>.
- [43] D. Camilios-Neto, C. Bugay, A.P. De Santana-Filho, T. Joslin, L.M. De Souza, G.L. Sasaki, D.A. Mitchell, N. Krieger, Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2987-3>.
- [44] M.M. Müller, B. Hörmann, C. Syltatk, R. Hausmann, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 167–174. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2513-7>.
- [45] M. de A. Almeida, Produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, Universidade Estadual de Londrina, 2018.
- [46] D. Camilios Neto, J.A. Meira, J.M. De Araújo, D.A. Mitchell, N. Krieger, Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 441–448. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1663-3>.
- [47] K. Invally, A. Sancheti, L.K. Ju, A new approach for downstream purification of rhamnolipid biosurfactants, *Food Bioprod. Process.* 114 (2019) 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.12.003>.

- [48] Z. Li, Y. Zhang, J. Lin, W. Wang, S. Li, High-Yield Di-Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its Potential Application in MEOR, *Molecules*. 24 (2019) 1433. <https://doi.org/10.3390/molecules24071433>.
- [49] J. Zhou, R. Xue, S. Liu, N. Xu, F. Xin, W. Zhang, M. Jiang, W. Dong, High Di-rhamnolipid Production Using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, Separation of Mono/Di-rhamnolipids, and Evaluation of Their Properties, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00245>.
- [50] J. Andrä, J. Rademann, M.H.J. Koch, H. Heine, U. Zähringer, K. Brandenburg, Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: Immune cell stimulation and biophysical characterization, *Biol. Chem.* 387 (2006) 301–310. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.040>.
- [51] J. Howe, J. Bauer, J. Andrä, A.B. Schromm, M. Ernst, M. Rössle, U. Zähringer, J. Rademann, K. Brandenburg, Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids, *FEBS J.* 273 (2006) 5101–5112. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05507.x>.
- [52] J. Bauer, K. Brandenburg, U. Zähringer, J. Rademann, Chemical synthesis of a glycolipid library by a solid-phase strategy allows elucidation of the structural specificity of immunostimulation by rhamnolipids, *Chem. - A Eur. J.* 12 (2006) 7116–7124. <https://doi.org/10.1002/chem.200600482>.
- [53] A.L. Varnier, L. Sanchez, P. Vatsa, L. Boudesocque, A. Garcia-Brugger, F. Rabenoelina, A. Sorokin, J.H. Renault, S. Kauffmann, A. Pugin, C. Clement, F. Baillieul, S. Dorey, Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine, *Plant, Cell Environ.* 32 (2009) 178–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x>.
- [54] P. Vatsa, L. Sanchez, C. Clement, F. Baillieul, S. Dorey, Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 5095–5108. <https://doi.org/10.3390/ijms11125095>.
- [55] L. Sanchez, B. Courteaux, J. Hubert, S. Kauffmann, J.H. Renault, C. Clément, F. Baillieul, S. Dorey, Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid, *Plant Physiol.* 160 (2012) 1630–1641. <https://doi.org/10.1104/pp.112.201913>.
- [56] R.M. Maier, G. Soberón-Chávez, *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (2000) 625–633. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>.
- [57] C.N. Mulligan, Recent advances in the environmental applications of biosurfactants, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14 (2009) 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.005>.
- [58] A. Varvaresou, K. Iakovou, Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals, *Lett. Applied Microbiol.* 61 (2015) 214–223. <https://doi.org/10.1111/lam.12440>.

- [59] C.R. Barth, G.A. Funchal, C. Luft, J.R. de Oliveira, B.N. Porto, M.V.F. Donadio, Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis, *Eur. J. Immunol.* 46 (2016) 964–970. <https://doi.org/10.1002/eji.201545520>.
- [60] T.M. Cunha, W.A. Verri, J.S. Silva, S. Poole, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice, *102* (2005) 1755–1760.
- [61] T.M. Cunha, W.A. Verri, I.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 824–832. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907654>.
- [62] A.C. Zarpelon, T.M. Cunha, J.C. Alves-filho, L.G. Pinto, S.H. Ferreira, IL-33 / ST2 signalling innate inflammation and inflammatory pain : role of cytokines , endothelin-1 and prostaglandin E 2, (2013). <https://doi.org/10.1111/bph.12110>.
- [63] G.F. Pavao-de-souza, A.C. Zarpelon, G.C. Tedeschi, S.S. Mizokami, J.S. Sanson, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, Pharmacology , Biochemistry and Behavior Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases , PI 3 K and microglia in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101 (2012) 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.01.018>.
- [64] D.A.C. Magro, M.S.N. Hohmann, S.S. Mizokami, T.M. Cunha, An interleukin-33 / ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice, *46* (2013) 601–606.
- [65] M. Shibata, T. Ohkubo, H. Takahashi, R. Inoki, Modified formalin test : characteristic biphasic pain response, *Pain.* 38 (1989) 347–352. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4).
- [66] A. Tjølsen, O.-G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole, The formalin test: an evaluation of the method, *Pain.* 51 (1992) 5–17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T).
- [67] M.F. Yam, Y.C. Loh, C.W. Oo, R. Basir, Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal “Pain-Like” Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 4355. <https://doi.org/10.3390/ijms21124355>.
- [68] D. Salvemini, J.W. Little, T. Doyle, W.L. Neumann, Free Radical Biology & Medicine Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 951–966. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026>.
- [69] F.A. Pinho-Ribeiro, V. Fattori, A.C. Zarpelon, S.M. Borghi, L. Staurengo-Ferrari, T.T. Carvalho, J.C. Alves-Filho, F.Q. Cunha, T.M. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in the paw skin and spinal cord by targeting NF-κB and oxidative stress, *Inflammopharmacology.* 24 (2016) 97–107. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0266-3>.

- [70] B. Thanomsub, W. Pumeechockchai, A. Limtrakul, Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste, 97 (2006) 2457–2461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.029>.
- [71] R. Zhang, X. Shi, Y. Chen, J. Liu, Y. Wu, Y. Xu, Multi-Omics Revealed the Protective Effects of Rhamnolipids in Lipopolysaccharide Challenged Broilers, *Front. Immunol.* 13 (2022) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.824664>.

## CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos métodos de produção conjunta das fenazinas ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) e fenazina-1-carboxiamida (PCN), da quinolona 2-heptil-3,4-hidróxi-quinolona (PQS), aeruginaldeído (IQS) e da quinolina 2-hidroximetil-4-quinolinol (2-HM-4Q) por cultivos na ausência e presença do indutor de produção caseinato de sódio.

O método de produção de PCN e fenazinas vermelhas foi pelo cultivo de 13 dias na presença de caseinato. PCA e aeruginaldeído foram produzidos por ambos os processos empregados, mostrando a importância destes compostos para *P. aeruginosa*. Foi possível confirmar que a produção da quinolina, recentemente descoberta pelo grupo, ocorre a partir do sexto dia de cultivo, em ambos os cultivos.

Os processos de extração ácido-base foram eficazes na obtenção de compostos de diferentes classes separados nos diferentes pHs de extração.

Os métodos de purificação empregados, utilizando CCDP e cartucho de C18, mostraram-se eficientes, rápidos e de fácil operação, para a obtenção das fenazinas, PQS, aeruginaldeído e quinolina. Algumas substâncias ainda não caracterizadas também foram purificadas.

Além disso, o trabalho teórico de modelagem molecular destes compostos forneceu importantes informações sobre pKa, ponto isoelétrico, os estados de protonação, coeficiente de partição e suas solubilidades em água, informações úteis para compreender e melhorar o processo de extração.

Dessa forma, com a junção dos processos de produção, extração e purificação foi possível obter alguns compostos bioativos com pureza suficiente para testar suas propriedades.

Além disso, Di-RL purificado de *P. aeruginosa*, foi testado em modelo animal de dor e inflamação. Este composto reduziu comportamentos de dor aguda induzida por ácido acético e formalina, reduziu a hiperalgesia mecânica e danos histológicos causados por carragenina. Foi capaz de reduzir a inflamação induzida por carragenina no peritônio e seus efeitos podem estar relacionados à diminuição da

produção do ânion superóxido e do recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório. No entanto, mais estudos devem ser realizados para estabelecer os mecanismos de eficácia terapêutica do Di-RL na dor e na inflamação.

## REFERÊNCIAS

- ABU, E. A.; SU, S.; SALLANS, L.; BOISSY, R. E.; GREATENS, A.; HEINEMAN, W. R.; HASSETT, D. J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Microbiology** (United Kingdom), v. 159, n. 8, p. 1736–1747, 2013.
- ALI PAMBUK, C. I. Pigments of *Pseudomonas aeruginosa*. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, v. 2, n. 1, 9 jan. 2017.
- ANRATHER, J.; RACCHUMI, G.; IADECOLA, C. NF- $\kappa$ B Regulates Phagocytic NADPH Oxidase by Inducing the Expression of gp91. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5657–5667, mar. 2006.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–20, 2013.
- BARTH, C. R.; FUNCHAL, G. A.; LUFT, C.; OLIVEIRA, J. R. DE; PORTO, B. N.; DONADIO, M. V. F. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 964–970, 2016.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1–8, jan. 2004.
- BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, 2012.
- BLANKENFELDT, W.; PARSONS, J. F. The structural biology of phenazine biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 29, p. 26–33, dez. 2014.
- BRAZ, J.; SOLORZANO, C.; WANG, X.; BASBAUM, A. I. Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. **Neuron**, v. 82, n. 3, p. 522–536, maio 2014.
- BUENO, E. B. T. Produção, extração e purificação de quinolonas do quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. 2021. 48 f. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.
- CAMILIOS-NETO, D. Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido. 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113–1116, 2006.

CAMPOS-GARCÍA, J.; CARO, A. D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R. M.; AL-TAHHAN, R. A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG gene encodes an NADPH-dependent  $\beta$ -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4442–4451, 1998.

CARDOZO, V. F.; OLIVEIRA, A. G.; NISHIO, E. K.; PERUGINI, M. R. E.; ANDRADE, C. G. T. J.; SILVEIRA, W. D.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 17 jun. 2013.

CARMI, R.; CARMELI, S.; LEVY, E.; GOUGH, F. J. (+)-(S)-dihydroaeruginosic acid, an inhibitor of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria, produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 9, p. 1200–1205, 1 set. 1994.

CHOI, D. C.; LEE, J. Y.; LIM, E. J.; BAIK, H. H.; OH, T. H.; YUNE, T. Y. Inhibition of ROS-induced p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v. 236, n. 2, 2012.

CHONG, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, fev. 1968.

D'AES, J.; HUA, G. K. H.; MAEYER, K. DE; PANNECOUCQUE, J.; FORREZ, I.; ONGENA, M.; DIETRICH, L. E. P.; THOMASHOW, L. S.; MAVRODI, D. V.; HÖFTE, M. Biological control of rhizoctonia root rot on bean by phenazine and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. **Phytopathology**, v. 101, n. 8, p. 996–1004, 2011.

DIETRICH, L. E. P.; PRICE-WHELAN, A.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; NEWMAN, D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1308–1321, 2006.

DIGGLE, S. P.; MATTHIJS, S.; WRIGHT, V. J.; FLETCHER, M. P.; CHHABRA, S. R.; LAMONT, I. L.; KONG, X.; HIDER, R. C.; CORNELIS, P.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 1, p. 87–96, jan. 2007.

DU, X.; LI, Y.; ZHOU, Q.; XU, Y. Regulation of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* M18 by phenazine-1-carboxylic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 813–825, 2015.

FORDOS, M. J. Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues: pyocyanine. **CR Acad. Sci**, v. 51, p. 215-217, 1860.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 11, p. 837–848, nov. 2008.

GUTTENBERGER, N.; BLANKENFELDT, W.; BREINBAUER, R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 22, p. 6149–6166, 2017.

HARDALO, C.; EDBERG, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 47–75, 1997.

HÄUSSLER, S.; BECKER, T. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in *Pseudomonas aeruginosa* Populations. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000166, 26 set. 2008.

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

HUASONG, P.; QINGWEN, H.; BILAL, M.; WANG, W.; ZHANG, X. Kinetics, mechanism, and identification of photodegradation products of phenazine-1-carboxylic acid. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 41, n. 14, p. 1848–1856, 2020.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1159–1168, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, set. 2001.

KAPLAN, A. R.; MUSAEV, D. G.; WUEST, W. M. Pyochelin Biosynthetic Metabolites Bind Iron and Promote Growth in Pseudomonads Demonstrating Siderophore-like Activity. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 544–551, 2021.

KENNEDY, R. K.; VEENA, V.; NAIK, P. R.; LAKSHMI, P.; KRISHNA, R.; SUDHARANI, S.; SAKTHIVEL, N. Phenazine-1-carboxamide (PCN) from *Pseudomonas* sp. strain PUP6 selectively induced apoptosis in lung (A549) and breast (MDA MB-231) cancer cells by inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. **Apoptosis**, v. 20, n. 6, p. 858–868, 2015.

KIM, K.; KIM, Y. U.; KOH, B. H.; HWANG, S. S.; KIM, S. H.; LÉPINE, F.; CHO, Y. H.; LEE, G. R. HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing

molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 578–588, abr. 2010.

LAU, G. W.; HASSETT, D. J.; BRITIGAN, B. E. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 389–397, ago. 2005.

LAU, G. W.; HASSETT, D. J.; RAN, H.; KONG, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, p. 599–606, dez. 2004.

LAURSEN, J. B.; NIELSEN, J. Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 3, p. 1663–1685, 2004.

LEE, J.; WU, J.; DENG, Y.; WANG, JING; WANG, C.; WANG, JIANHE; CHANG, C.; DONG, Y.; WILLIAMS, P.; ZHANG, L.-H. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 5, p. 339–343, 31 maio 2013.

LI, L.; NI, R.; SHAO, Y.; MAO, S. Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 15 mar. 2014.

LI, Z.; ZHANG, Y.; LIN, J.; WANG, W.; LI, S. High-Yield Di-Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its Potential Application in MEOR. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019.

LIU, H.-M.; YAN, A.; XUE-HONG, Z.; XU, Y.-Q. Phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas Chlororaphis* GP72 is positively regulated by the sigma factor RpoN. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1961–1966, 2008.

LIU, Q.; NIU, J.; YU, Y.; WANG, C.; LU, S.; ZHANG, S.; LV, J.; PENG, B. Production, characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* L20 for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Cleaner Production**, v. 307, n. May, p. 127193, 2021.

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, 2017.

LUO, Q.; HU, H.; PENG, H.; ZHANG, X.; WANG, W. Isolation and structural identification of two bioactive phenazines from *Streptomyces griseoluteus* P510. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 699–703, 1 abr. 2015.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 138–142, jan. 2013.

MAHAJAN-MIKLOS, S.; TAN, M. W.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 47–56, 1999.

MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; ZIMERMANN, V. V.M.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; FONSECA, M. J.V.; VICENTINI, F. T.M.C.; MOREIRA, I. C.; ANDREI, C. C.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE, R. Tephrosia sinapou extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: Effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 3, p. 587-97, 2012.

MAVRODI, D. V.; BONSALL, R. F.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6454–6465, 2001.

MAZZOLA, M.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; PIERSON, L. S. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2616–2624, 1992.

MCKNIGHT, S. L.; IGLEWSKI, B. H.; PESCI, E. C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2702–2708, 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.

MENTEL, M.; AHUJA, E. G.; MAVRODI, D. V.; BREINBAUER, R.; THOMASHOW, L. S.; BLANKENFELDT, W. Of two make one: The biosynthesis of phenazines. **ChemBioChem**, v. 10, n. 14, p. 2295–2304, 2009.

MILLICAN, C. Biosynthesis of pyocyanine . Incorporation of [ <sup>14</sup>C ] shikimic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 57, p. 407–409, 1962.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 372–378, 2009.

NADAL JIMENEZ, P.; KOCH, G.; THOMPSON, J. A.; XAVIER, K. B.; COOL, R. H.; QUAX, W. J. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 46–65, 1 mar. 2012.

NDENGELE, M. M.; CUZZOCREA, S.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; PAOLA, R. DI; MATUSCHAK, G. M.; SALVEMINI, D. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 9, 2008.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinárni Medicína**, v. 58, n. No. 4, p. 187–205, 7 maio 2013.

O'MALLEY, Y. Q.; RESZKA, K. J.; SPITZ, D. R.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B. E. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 1 31-1, p. 94–103, 2004.

OLIVEIRA, Gabriella Gonçalves. Produção, extração e purificação de piorrubrinhas de *Pseudomonas aeruginosa*. 2021. 45f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ORLANDI, V. T.; BOLOGNESE, F.; CHIODAROLI, L.; TOLKER-NIELSEN, T.; BARBIERI, P. Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 12, p. 2298–2309, 2015.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 1, p. 315–424, jan. 2007.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

PUSTELNY, C.; ALBERS, A.; BÜLDT-KARENTZOPOULOS, K.; PARSCHAT, K.; CHHABRA, S. R.; CÂMARA, M.; WILLIAMS, P.; FETZNER, S. Dioxygenase-Mediated Quenching of Quinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Biology**, v. 16, n. 12, p. 1259–1267, 2009.

RADA, B.; LETO, T. L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 73–81, fev. 2013.

RAMPIONI, G.; FALCONE, M.; HEEB, S.; FRANGIPANI, E.; FLETCHER, M. P.; DUBERN, J. F.; VISCA, P.; LEONI, L.; CÂMARA, M.; WILLIAMS, P. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, 2016.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111–118, nov. 2000.

RIKALOVIC, M. G.; AVRAMOVIC, N. S.; KARADZIC, I. M. Structure-Function Relationships of Rhamnolipid and Exopolysaccharide Biosurfactants of *Pseudomonas aeruginosa* as Therapeutic Targets in Cystic Fibrosis Lung Infections. In: Progress in Understanding Cystic Fibrosis. [s.l.] **InTech**, 2017. p. 127–158.

ROCHA E SILVA, M. A brief Survey of the History of Inflammation. **Agents Actions**, v. 43, p. 86–90, 1994.

RODRIGUES, R.; MARIA, A.; COSTA, R.; DUARTE, R.; SOUZA, D. E.; GOMES-LEALS, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29–34, 2007.

ROSANDY, A. R.; KHALID, R. M. Phenazine-1-carboxylic acid (PCA) from Cold-Adapted Yeast *Glaciozyma antarctica* P112. **Current Research on Biosciences and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 93–96, 31 ago. 2020.

SAKHTAH, H.; KOYAMA, L.; ZHANG, Y.; MORALES, D. K.; FIELDS, B. L.; PRICE-WHELAN, A.; HOGAN, D. A.; SHEPARD, K.; DIETRICH, L. E. P. The *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that controls gene expression and biofilm development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 25, p. E3538–E3547, 2016.

SALVEMINI, D.; RILEY, D. P.; CUZZOCREA, S. Sod mimetics are coming of age. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 5, p. 367–374, maio 2002.

SANA, S.; DATTA, S.; BISWAS, D.; AUDDY, B.; GUPTA, M.; CHATTOPADHYAY, H. Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. **Wound Medicine**, v. 23, n. September, p. 47–52, 2018.

SANDOZ, K. M.; MITZIMBERG, S. M.; SCHUSTER, M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 40, p. 15876–15881, 2007.

SARANYA, R.; JAYAPRIYA, J.; TAMILSELVI, A. Dyeing of silk fabric with phenazine from *Pseudomonas* species. **Coloration Technology**, v. 128, n. 6, p. 440–445, 2012.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, jul. 2012.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E. P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2–3, p. 73–81, 2006.

SHANMUGAIAH, V.; MATHIVANAN, N.; VARGHESE, B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 703–711, 2010.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.

SKINDERSOE, M. E.; ZEUTHEN, L. H.; BRIX, S.; FINK, L. N.; LAZENBY, J.; WHITTALL, C.; WILLIAMS, P.; DIGGLE, S. P.; FROEKIAER, H.; COOLEY, M.; GIVSKOV, M. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 335–345, 2009.

SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 56–60, 2003.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718–725, 2005.

SONG, C.; JIE, S.; WEN, Y.; LIU, H.; FAN, Y.; CHENG, Z.; ZHANG, H.; TONG, T.; HONG, F.; HU, B. Engineering of glycerol utilization in *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for enhancing phenazine - 1 - carboxylic acid production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 1–8, 2020.

STAHL, E. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. **Springer-Verlag Berlin**: New York, 1969.

STIPCEVIC, T.; PILJAC, A.; PILJAC, G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. **Burns**, v. 32, n. 1, 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* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.

SUDHAKAR, T.; KARPAGAM, S.; PREMKUMAR, J. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015, 7 (3): 921-924 Research Article Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. v. 7, n. 3, p. 921–924, 2015.

SZEGEZDI, J.; CSIZMADIA, F. A method for calculating the pK values of small and large molecules. **ACS Meeting**, p. 1–2, 2007.

TAUBERT, D.; BREITENBACH, T.; LAZAR, A.; CENSAREK, P.; HARLFINGER, S.; BERKELS, R.; KLAUS, W.; ROESEN, R. Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 12, 2003.

THAKUR, P.; SAINI, N. K.; THAKUR, V. K.; GUPTA, V. K.; SAINI, R. V.; SAINI, A. K. Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2021.

THISSERA, B.; ALHADRAMI, H. A.; HASSAN, M. H. A.; HASSAN, H. M.; BEHERY, F. A.; BAWAZEER, M.; YASEEN, M.; BELBAHRI, L.; RATEB, M. E. Induction of Cryptic Antifungal Pulicatin Derivatives from *Pantoea Agglomerans* by Microbial Co-Culture. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 268, 10 fev. 2020.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, out. 1992.

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.

VASILEVA-TONKOVA, E.; SOTIROVA, A.; GALABOVA, D. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 427–433, 2011.

VELASCO, P. F. Produção, extração e purificação de quinolonas sinalizadoras do quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; WEI, X. Q.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN- $\gamma$ , endothelin, and prostaglandin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 25, 2006.

VERRI, W. A.; VICENTINI, F. T. M. C.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; CARDOSO, R. D. R.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; FONSECA, M. J. V.; CASAGRANDE, R. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. **In: Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 36, p. 297-330, 2012.

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 and Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 249–266, 2012.

WANG, J.; WANG, C.; YU, H.-B.; AHATOR, S. DELA; WU, X.; LV, S.; ZHANG, L.-H. Bacterial quorum-sensing signal IQS induces host cell apoptosis by targeting POT1-p53 signalling pathway. **Cellular microbiology**, v. 21, n. 10, p. e13076, out. 2019.

WESSEL, K. B. B. Fenazinas de *Pseudomonas aeruginosa*: Produção e avaliação do potencial antioxidante. 2018. 86p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

YAM, M. F.; LOH, Y. C.; OO, C. W.; BASIR, R. Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal “Pain-Like” Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4355, 19 jun. 2020.

YE, L.; CORNELIS, P.; GUILLEMYN, K.; BALLEST, S.; CHRISTOPHERSEN, C.; HAMMERICH, O. Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde

[aeruginaldehyde]. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 6, p. 789–794, 1 jun. 2014.

ZHU, K.; ROCK, C. O. RhIA converts  $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the  $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3147–3154, 2008.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE

Título: Produção, extração e purificação de ácido fenazina1-carboxílico por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa*.



22/09/2021

870210087140  
09:44

29409161939418517

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 018835 9

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 78640489000153

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO

**Cidade:** Londrina

**Estado:** PR

**CEP:** 86055-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (043) 3371 5812

**Fax:** (043) 3371 5812

**Email:** aintecpi@uel.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 22/09/2021 às 09:44, Petição 870210087140

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO FENAZINA-1-CARBOXÍLICO POR CULTIVOS SUBMERSOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

**Resumo:** A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um processo de produção, extração e purificação de ácido fenazina-1-carboxílico produzido por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa*. Com este processo de produção é possível induzir a biossíntese de moléculas da classe de fenazinas por incrementar o meio de cultivo com caseinato de sódio, que atua como indutor do mecanismo de quorum sensing, o qual é responsável pela regulação da síntese de diversas moléculas relacionadas com a virulência, inclusive de compostos fenazínicos. O processo de extração foi desenvolvido para obter um extrato mais concentrado de fenazinas. E a purificação empregada possibilita a obtenção da fenazina com poucas perdas utilizando um método simples, rápido e de baixo custo. Desta forma, este processo apresenta características biotecnológicas para obter ácido fenazina-1-carboxílico com pureza significativa para avaliação in vivo de suas propriedades biológicas.

**Figura a publicar:** Fig1

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/09/2021 às 09:44, Petição 870210087140

## ANEXO 2 – PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE

Título: Di-ramnolípídeos contendo ação analgésica na dor inflamatória.



20/07/2022

870220063887  
14:55

29409161951914723

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 014349 8

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 78640489000153

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS  
UNIVERSITARIO

**Cidade:** Londrina

**Estado:** PR

**CEP:** 86055-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (043) 3371 5812

**Fax:** (043) 3371 5812

**Email:** aintecpi@uel.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/07/2022 às 14:55, Petição 870220063887

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** DI-RAMNOLIPÍDEOS CONTENDO AÇÃO ANALGÉSICA NA DOR INFLAMATÓRIA.

**Resumo:** A presente invenção refere-se à utilização de Di-Ramnolipídeos como princípio ativo com ação analgésica na dor inflamatória. O invento avaliou os efeitos do composto ramnolipídico em modelos murinos no contexto da dor inflamatória, com resultados positivos. Os Di-RL são seguros para uso em mamíferos, possuem baixa toxicidade, ausência de efeito mutagênico e podem desempenhar importante eficácia terapêutica no contexto da dor inflamatória. Adicionalmente, levando em consideração que os medicamentos utilizados clinicamente para este fim possuem diversos efeitos colaterais, e que os Di-RL são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), a invenção apresenta potencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

**Figura a publicar:** fig 1

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/07/2022 às 14:55, Petição 870220063887