



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAREN STEFANY CONCEIÇÃO

RAMNOLIPÍDEOS:
DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR E
FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOCURATIVO DE CELULOSE
BACTERIANA

Londrina
2022

KAREN STEFANY CONCEIÇÃO

RAMNOLIPÍDEOS:
DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR E
FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOCURATIVO DE CELULOSE
BACTERIANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Coorientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer

Londrina
2022

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

C744r Conceição, Karen Stefany.
Ramnolipídeos: desenvolvimento de biorreator e funcionalização de biocurativo de celulose bacteriana / Karen Stefany Conceição. - Londrina, 2022.
164 f. : il.

Orientador: Doumit Camílios Neto.
Coorientador: Cesar Augusto Tischer.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Celulose bacteriana - Tese. 2. Ramnolipídeos - Tese. 3. Biomateriais - Tese. 4. Biorreator - Tese. I. Camílios Neto, Doumit . II. Tischer, Cesar Augusto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

KAREN STEFANY CONCEIÇÃO

RAMNOLIPÍDEOS:
DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR E
FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOCURATIVO DE CELULOSE
BACTERIANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Flávia Debiagi
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Prof^a. Dr^a. Mônica Vicky Bahr Arias
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de Setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor Dr. Doumit Camilios Neto e Professor Dr. Cesar Augusto Tischer, pela oportunidade, ensinamentos e suporte durante a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro e a Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela estrutura disponibilizada para realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL, pelo suporte e pela dedicação ao ensino à pesquisa.

A Professora Dra. Mônica Vicky pela parceria na realização dos testes essenciais para conclusão deste trabalho.

Ao Professor Dr. Renato Ribeiro pela parceria em análises e realização de etapas deste trabalho.

Ao Professor Dr. Gerson Nakazato por ceder o seu laboratório para realização de etapas deste trabalho e em especial ao auxílio do Dr. Leonardo Medeiros.

Aos membros da banca examinadora, Professor Dr. Marcelo Rodrigues de Melo, Professora Dr^a Suzana Mali de Oliveira, Professora Dr^a Wilma Aparecida Spinosa, Prof^a. Dr^a. Mônica Vicky Bahr Arias e Professora Dr^a Flávia Debiagi pela disponibilidade em participar deste momento e contribuírem para a melhora do trabalho.

Á minha família pelo apoio, compreensão e carinho que em todos momentos me motivaram e buscassem novos conhecimentos.

Aos técnicos e colaboradores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, ao Nelson, Sandra e Sérgio que sempre estavam dispostas a ajudar. Assim como os técnicos pelo auxílio nas análises de FT-IR, TG e MEV.

A todos meus colegas de laboratório pela amizade, convívio, apoio e troca de experiências, tornando essa caminhada mais leve.

CONCEIÇÃO, Karen Stefany. **Ramnolipídeos**: desenvolvimento de biorreator e funcionalização de biocurativo de celulose bacteriana. 2022. 170 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Biomateriais são materiais destinados a avaliar, melhorar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, de forma parcial ou total. A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero sintetizado por algumas bactérias aeróbias, que forma uma rede de nanofibras quimicamente puras, não tóxicas e biocompatíveis. As membranas de celulose bacteriana são utilizadas como curativo, servindo de barreira física e fornecendo umidade ideal tanto para feridas secas como exsudativas. No entanto, na ausência de funcionalização, não apresentam atividade antimicrobiana, o que restringe, pelo mesmo parcialmente, o espectro de utilização. Estratégias de funcionalização de CB com moléculas que apresentem propriedades farmacológicas (e.g., atividade antimicrobiana), tanto por interações físicas como por ligações químicas, vêm sendo testadas. Os ramnolipídeos (RL) são biossurfactantes glicolipídicos naturais de alta performance tensoativa, biodegradáveis e que apresentam ainda, atividade cicatrizante e antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e leveduras. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver dois protótipos: (i) um biorreator de bancada para produção de ramnolipídeos por fermentação estática em suporte de membrana de celulose bacteriana e (ii) um curativo biocompatível e biofuncional com a incorporação de ramnolipídeos a membrana de celulose bacteriana (CB-RL). Os experimentos de produção de ramnolipídeos, pelo protótipo de biorreator de bancada desenvolvido, sugeriram um potencial de ampliação de escala tanto por empilhamento como por incrementos no diâmetro das “unidades de cultivo”. Adicionalmente, os resultados indicaram a não necessidade de sistema de aeração forçada e a utilização de extrato aquoso de torta de milho promoveu um incremento de 4 vezes produção. O protótipo de curativo (CB-RL) foi submetido a análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier que indicaram a presença da estrutura ramnolipídica, com anéis ramnose e longas cadeias de hidrocarbonetos. Análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a incorporação de ramnolipídeos nas membranas não alterou a estrutura da rede de nanofibras, enquanto, análises termogravimétricas indicaram que a presença destes não afetou a estabilidade térmica das membranas. Cultivo celulares mostraram que células epiteliais aderiram, cresceram e se proliferaram sobre a membrana com o biossurfactante, sugerindo ausência de efeito citotóxico das membranas modificadas. Análises, *in vivo*, do efeito terapêutico do protótipo de curativo, foram analisados na rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da UEL, mostraram boa granulação do tecido, ausência de infecção e rápida cicatrização. O presente trabalho reportou o desenvolvimento de um protótipo de biorreator de fermentação estática, em escala de bancada, com potencial de escalonamento - em um processo simples e de baixo custo operacional; e um biomaterial alternativo para a área biomédica (CB-RL), obtido por fontes naturais, biocompatível e com potencialmente curativo de feridas contaminadas.

Palavras-chave: celulose bacteriana; ramnolipídeos; biomateriais; aplicação biomédica; biorreator.

CONCEIÇÃO, Karen Stefany. **Rhamnolipids**: Development of a bioreactor and functionalization of bacterial cellulose biodressing. 2022. 170 p. Thesis (Doctoral degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Biomaterials are materials intended to evaluate, improve, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body, partially or totally. Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer synthesized by some aerobic bacteria, which forms a network of chemically pure, non-toxic and biocompatible nanofibers. Bacterial cellulose membranes are used as a dressing, serving as a physical barrier and providing ideal moisture for both dry and exuding wounds. However, in the absence of functionalization, they do not present antimicrobial activity, which restricts, at least partially, the spectrum of use. Thus, BC functionalization strategies with molecules that have pharmacological properties (e.g., antimicrobial activity), both through physical interactions and chemical bonds, have been tested. Rhamnolipids (RL) are natural glycolipid biosurfactants with high surface-active, biodegradable performance and which also have healing and antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and yeasts. Within this context, the objective of this work was to develop two prototypes: (i) a benchtop bioreactor for the production of rhamnolipids by static fermentation on bacterial cellulose membrane support and (ii) a biocompatible and biofunctional dressing with the incorporation of rhamnolipids into the membrane of bacterial cellulose (BC-RL). The rhamnolipid production experiments, by the benchtop bioreactor prototype developed, suggested a potential for scaling up both by stacking and by increments in the diameter of the “culture units”. Additionally, the results indicated that there was no need for a forced aeration system and the use of aqueous extract of corn cake promoted a 4-fold increase in production. The dressing prototype (BC-RL) was submitted to Fourier transform infrared spectroscopy analysis, which indicated the presence of a rhamnolipid structure, with rhamnose rings and long hydrocarbon chains. Scanning electron microscopy analyzes showed that the incorporation of rhamnolipids into the membranes did not change the structure of the nanofiber network, while thermogravimetric analyzes indicated that their presence did not affect the thermal stability of the membranes. Cell culture analyzes showed that epithelial cells adhered, grew and proliferated on the membrane with the biosurfactant, suggesting the absence of cytotoxic effect of the modified membranes. *In vivo* analyses, of the therapeutic effect of the dressing prototype, were analyzed in the surgical routine of the Veterinary Hospital of UEL, showed good tissue granulation, absence of infection and rapid healing. Thus, the two prototypes were successfully produced. The present work reports the development of a bench scale of static-fermentation bioreactor-prototype, with potential of scalability - in a simple and cost effective process; and an alternative biomaterial for the biomedical field (BC-RL), obtained from natural sources, biocompatible and potentially curative for contaminated wounds.

Key words: bacterial cellulose; rhamnolipids; biomaterial; biomedical application; bioreactor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Representação da estrutura da pele humana	24
Figura 2	–	Fases do processo de cicatrização	27
Figura 3	–	Fórmula estrutural da celulose	32
Figura 4	–	Ligações intra e intermoleculares nas cadeias de celulose	33
Figura 5	–	Arranjo das fibras de celulose bacteriana	35
Figura 6	–	Estrutura química dos principais homólogos de ramnolipídeos ...	43
Figura 7	–	Fluxograma dos experimentos	70
Figura 8	–	Modelo esquemático de protótipo de biorreator de escala e bancada para produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em fermentações estáticas utilizando como suporte de celulose bacteriana	78
Figura 9	–	Protótipo de biorreator de escala de bancada para produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em fermentações estáticas utilizando como suportes de celulose bacteriana.....	79
Figura 10	–	Produção de ramnolipídeos em biorreator em três diferentes sistemas de incubação.....	80
Figura 11	–	Produção de ramnolipídeos com a utilização de extrato aquoso de torta de milho como suplemento indutor	82
Figura 12	–	Produção de ramnolipídeos em biorreator com 5 mL e 200 mL por unidade de cultivo	83
Figura 13	–	Índice de emulsificação (E) frente a diferentes hidrocarbonetos, de ramnolipídeos por cultivo estático com suporte de celulose bacteriana em reator	85
Figura 14	–	Teste de emulsificação frente a diferentes hidrocarbonetos	86
Figura 15	–	Determinação da concentração micelar crítica (CMC) a partir de diluições seriadas de solução aquosa de ramnolipídeos por cultivo estático com suporte de celulose bacteriana em reator	88
Figura 16	–	Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos ramnolipídeos produzidos por cultivo estático com suporte de celulose bacteriana em reator	89

Figura 17 – Principais congêneres de ramnolipídeos produzidos com biorreator por fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana	91
Figura 18 – Fluxograma da metodologia experimental	102
Figura 19 – Membrana de celulose bacteriana a) úmida e b) seca.....	114
Figura 20 – Extrato bruto orgânico de ramnolipídeos	116
Figura 21 – Teste de emulsificação frente a diferentes hidrocarbonetos	116
Figura 22 – Índice de emulsificação (E) frente a diferentes hidrocarbonetos, de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso	117
Figura 23 – Determinação da concentração micelar crítica (CMC) a partir de diluições seriais de solução aquosa de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso.....	119
Figura 24 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso.....	120
Figura 25 – Principais congêneres de ramnolipídeos produzidos	122
Figura 26 – Perfil de liberação de ramnolipídeos a partir de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos	123
Figura 27 – Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho de membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).....	125
Figura 28 – Termogravimetria da membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL)	127
Figura 29 – Representação do ângulo de contato	129
Figura 30 – Molhabilidade de uma gota de água deionizada sobre a superfície de a) membrana de celulose bacteriana pura (CB) e b) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL)	129
Figura 31 – Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da superfície de membranas de celulose bacterianas pura	131
Figura 32 – Isotherma de adsorção da membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de	

	celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL)	130
Figura 33	– Microscopia óptica da proliferação de fibroblastos após 72h	134
Figura 34	– Microscopia óptica da adesão de fibroblastos após 4, 8, 24, 48 e 72h em membranas de CB e CB-RL.....	139
Figura 35	– Contagem de células aderidas até 72h.....	141
Figura 36	– Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de fibroblastos L929 aderidos a celulose bacteriana pura e celulose bacteriana incorporada com ramnolipídeos após 72 h.	142
Figura 37	– Envelope com protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) estéril.....	143
Figura 38	– Aplicação de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) em ferida em face medial da coxa de cão em diferentes ângulos....	143
Figura 39	– Ferida em primeiro dígito de membro torácico em gato.....	140
Figura 40	– Ferida em face medial da coxa em cão.	145
Figura 41	– Ferida em região escapular de membro torácico direito em cão	146
Figura 42	– Ferida em região occipital em cão	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Produtores de celulose bacteriana.....	34
Tabela 2	–	Principais fontes de carbono na produção de celulose bacteriana por <i>Gluconacetobacter</i> (atualmente <i>Komagataeibacter</i>).....	36
Tabela 3	–	Diferentes espécies de <i>Pseudomonas</i> e outros gênero descritos como produtores de ramnolipídeos	35
Tabela 4	–	Propriedades antimicrobianas dos ramnolipídeos.....	46
Tabela 5	–	Composição do meio Hestrin-Schramm's (HS).....	71
Tabela 6	–	Composição do meio Luria-Bertani (LB)	72
Tabela 7	–	Composição do meio de sais (MSM)	73
Tabela 8	–	Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos com biorreator por fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana	90
Tabela 9	–	Composição do meio de sais (MSM)	104
Tabela 10	–	Valores obtidos a partir dos ensaios de percentual de água (PA), capacidade de retenção de água (CRA) e percentual de reidratação (PR) da membrana de celulose bacteriana e seus respectivos desvios padrão (DP)	114
Tabela 11	–	Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de membranas	121
Tabela 12	–	Velocidade de liberação de ramnolipídeos a partir de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos.....	120
Tabela 13	–	Resultados do ensaio de ângulo de contato para as amostras de celulose bacteriana e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL)	130
Tabela 14	–	Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água para as amostras de celulose bacteriana (CB) e de protótipo de	

	biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).....	129
Tabela 15	– Parâmetro de ajuste do modelo BET para as isotermas de adsorção a água em membrana de celulose bacteriana pura e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) (R2)...	131
Tabela 16	– Propriedades mecânicas das membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membranas de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL)	132
Tabela 17	– Transparência e opacidade das membranas de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL)	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AC	Ângulo de Contato
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
Aw	Atividade de água
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BS	Biossurfactante
CB	Celulose Bacteriana
CB-RL	Celulose Bacteriana com Ramnolipídeos
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CMC	Concentração Micelar Crítica
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DI	Deionizada
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DO	Densidade Óptica
E	Índice de Emulsificação
E ₂₄	Índice de Emulsificação avaliada em 24%
FDA	Food and Drug Administration
FSb	Fermentação Submersa
FSbE	Fermentação Submersa Estática
FSbE-CB	Fermentação Submersa Estática em Suporte de Membranas de Celulose Bacteriana
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HS	Hestrin-Schramm's
ISO	International Organization for Standardization
LC-QTOF	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
LB	Luria-Bertani
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSM	Meio de Sais
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue
OMS	Organização Mundial da Saúde

PA	Percentual de Água
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Percentual de Reidratação
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
RL	Ramnolipídeos
R1	Mono-ramnolipídeos
R2	Di-ramnolipídeos
TDM	Taxa Degradação Máxima
TGA	Análise Termogravimétrica
TS	Tensão Superficial
UR	Umidade Relativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	A PELE HUMANA	23
3.1.1	Camadas da Pele	23
3.1.2	Feridas e Processo de Cicatrização da Pele	26
3.2	BIOMATERIAIS E BIOCAMPATIBILIDADE	29
3.3	CELULOSE	31
3.3.1	Celulose Bacteriana (CB)	33
3.3.2	Propriedades da Celulose Bacteriana	37
3.3.3	Aplicações da Celulose Bacteriana na Área Biomédica	37
3.3.4	Membranas de Celulose Bacteriana Biofuncionais	39
3.4	RAMNOLIPÍDEOS	40
3.4.1	Estrutura dos Ramnolipídeos	42
3.4.2	Produção dos Ramnolipídeos	43
3.4.3	Atividade dos Ramnolipídeos na Área Biomédica	45
3.5	REFERÊNCIAS	50
4	CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE BANCADA POR FERMENTAÇÃO ESTÁTICA EM SUPORTE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	67
4.1	INTRODUÇÃO	67
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.2.1	Produção de Celulose Bacteriana (CB)	71
4.2.1.1	Microrganismo	71
4.2.1.2	Preparo do pré-inóculo	71
4.2.1.3	Inóculo	71

4.2.1.4	Obtenção da celulose bacteriana (CB).....	72
4.2.2	Produção de Ramnolipídeos (RL)	72
4.2.2.1	Microrganismo	72
4.2.2.2	Preparo do pré-inóculo	72
4.2.2.3	Fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana (FSbE-CB).....	73
4.2.2.4	Interrupção do cultivo	70
4.2.2.5	Quantificação dos ramnolipídeos	74
4.2.2.6	Preparado do extrato bruto de ramnolipídeos	70
4.2.3	Caracterizações das Propriedades Físico-químicas e Estruturais dos Ramnolipídeos.....	74
4.2.3.1	Determinação do índice de emulsificação (E)	74
4.2.3.2	Determinação da tensão superficial (TS)	75
4.2.3.3	Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	75
4.2.3.4	Cromatografia Líquida em camada delgada (CCD).....	76
4.2.3.5	Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana e espectrometria de massas.....	76
4.2.3.6	Análise estatística.....	72
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.3.1	Protótipo de Biorreator de Escala de Bancada para Produção de Ramnolipídeos.....	77
4.3.2	Produção de Ramnolipídeos em Diferentes Processos de Incubação.....	79
4.3.3	Utilização de Indutor para Produção de Ramnolipídeos em Diferentes Processos de Incubação	81
4.3.4	Ampliação da Escala de Produção de Ramnolipídeos	82
4.3.5	Caracterização das propriedades físico-químicas e estruturais dos ramnolipídeos (RL).....	84
4.3.5.1	Índice de emulsificação (E)	84
4.3.5.2	Determinação da tensão superficial (TS) e concentração micelar crítica (CMC)	87
4.3.5.3	Cromatografia em camada delgada (CCD)	83

4.3.5.4	Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por espectrometria de massas.....	89
4.4	CONCLUSÃO.....	92
4.5	REFERÊNCIAS.....	93
5	CAPÍTULO III – PROTÓTIPO DE CURATIVO BIOCAMPATÍVEL E BIOFUNCIONAL COM INCORPORAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS A MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA.....	100
5.1	INTRODUÇÃO.....	100
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	101
5.2.1	Produção e Caracterização das Propriedades da Celulose Bacteriana (CB).....	102
5.2.1.1	Microrganismo.....	102
5.2.1.2	Preparo do pré-inóculo.....	102
5.2.1.3	Inóculo.....	102
5.2.1.4	Obtenção da celulose bacteriana (CB).....	102
5.2.1.5	Espessura.....	103
5.2.1.6	Capacidade de retenção de água (CRA), percentual de água (PA) e percentual de reidratação (PR) das membranas de celulose bacteriana.....	103
5.2.2	Produção e Caracterização das Propriedades dos Ramnolipídeos (RL).....	104
5.2.2.1	Microrganismo.....	104
5.2.2.2	Preparo do pré-inóculo.....	104
5.2.2.3	Fermentação submersa (FSb).....	104
5.2.2.4	Interrupção do cultivo.....	101
5.2.2.5	Quantificação dos ramnolipídeos.....	105
5.2.2.6	Precipitação ácida.....	105
5.2.2.7	Extração com solvente.....	101
5.2.2.8	Determinação do índice de emulsificação (E).....	105
5.2.2.9	Determinação da tensão superficial (TS).....	101
5.2.2.10	Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	101
5.2.2.11	Cromatografia Líquida em camada delgada (CCD).....	106

5.2.2.12	Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana e espectrometria de massas.....	106
5.2.2.13	Análise estatística.....	102
5.2.3	Produção de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos (CB-RL).....	106
5.2.3.1	Estudo de liberação de ramnolipídeos dos protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana.....	107
5.2.3.2	Espectroscopia on infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	107
5.2.3.3	Ângulo de contato (AC)	107
5.2.3.4	Propriedades ópticas: transparência e opacidade.....	103
5.2.3.5	Análise termogravimétrica (TGA)	108
5.2.3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	108
5.2.3.7	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	105
5.2.3.8	Solubilidade em água	105
5.2.3.9	Isoterma de adsorção de água	106
5.2.3.10	Propriedades mecânicas	106
5.2.4	Estudo In Vitro de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos (CB-RL)	107
5.2.4.1	Proliferação celular.....	111
5.2.4.2	Adesão celular.....	111
5.2.4.3	Morfologia celular	112
5.2.3	Estudo In Vivo de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos (CB-RL)	112
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
5.3.1	Caracterização das Propriedades da Celulose Bacteriana (CB)	113
5.3.1.1	Espessura e capacidade de retenção de água (CRA), percentual de água (PA) e percentual de reidratação (PR) das membranas de celulose bacteriana.....	113
5.3.2	Caracterização das Propriedades Físico-químicas e Estruturais dos Ramnolipídeos (RL).....	115
5.3.2.1	Índice de emulsificação (E)	116

5.3.2.2	Determinação da tensão superficial (TS) e concentração micelar crítica (CMC)	118
5.3.2.3	Cromatografia em camada delgada (CCD)	119
5.3.2.4	Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por espectrometria de massas	120
5.3.3	Caracterização de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos	122
5.3.3.1	Liberação de ramnolipídeos em protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana.....	122
5.3.3.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	125
5.3.3.3	Análise termogravimétrica (TGA)	127
5.3.3.4	Ângulo de contato (AC)	124
5.3.3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	130
5.3.3.6	Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água	128
5.3.3.7	Isoterma de adsorção de água	129
5.3.3.8	Propriedades Mecânicas e ópticas.....	131
5.3.4	Estudo In Vitro de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos	137
5.3.4.1	Proliferação celular.....	137
5.3.4.2	Adesão celular.....	139
5.3.4.2	Morfologia celular	141
5.3.5	Estudo In Vivo de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos	142
5.4	CONCLUSÃO	147
5.5	REFERÊNCIAS.....	149
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	165
8	ANEXOS	166
	ANEXO A – Pedido de patente obtido com a presente tese	166
	ANEXO B – Composição centesimal da torta de milho.	167

ANEXO C – Protocolo do Comitê de Ética.....	168
---------------------------------------------	-----

1. INTRODUÇÃO

Biomateriais são materiais, de origem natural ou sintética destinados a aplicações médicas podendo ser utilizados temporária ou definitivamente para avaliar, melhorar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (parcial ou totalmente) devendo ser biocompatível (CHEN; WU, 2005; KUNDU *et al.*, 2021; NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

Os polímeros naturais têm se destacado, considerando-se os custos, facilidade de obtenção, desenvolvimento sustentável e preservação ambiental (PENTTILÄ *et al.*, 2018; VENKATARAJAN *et al.*, 2021; WILLIAMS, 2014). A celulose bacteriana (CB) possui características que a tornam promissora para utilização, principalmente, nas áreas biomédicas e biotecnológicas (GODINHO, 2014; GREGORY *et al.*, 2022; KUNDU *et al.*, 2021; PENTTILÄ *et al.*, 2018). A CB é um biopolímero sintetizado por algumas bactérias aeróbias, em forma de rede de nanofibras, quimicamente puras, não tóxicas e biocompatíveis. Quando utilizadas como curativo, fornecem umidade ideal para feridas secas ou exsudativas, formam eficaz barreira física contra infecção e não se aderem à superfície das feridas, o que evita danos ao tecido durante a remoção (CIECHAŃSKA, 2004; CZAJA *et al.*, 2006; GODINHO, 2014; KLEMM *et al.*, 2005; PENTTILÄ *et al.*, 2018).

Estudos de cicatrização de feridas, *in vivo*, demonstram que materiais baseados em CB apresentam regeneração e epitelização mais rápidas do que outros produtos comercialmente disponíveis. No entanto, quando utilizada individualmente a celulose não possui atividade antimicrobiana, por outro lado, é extremamente requerido que possua esta atividade, já que infecções bacterianas são um problema recorrente que afeta feridas crônicas difíceis de curar (FU; ZHANG; YANG, 2013; LIU *et al.*, 2013; SERAFICA *et al.*, 2010). Dessa forma, as funcionalizações de CB, com moléculas que agregam propriedades farmacológicas, através de interações de superfície física ou ligações químicas, vêm sendo intensamente testadas (NEVES *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2022).

Os ramnolipídeos são biossurfactantes glicolipídicos, apresentam grande interesse para a área biomédica por serem biodegradáveis,

atóxicos e não mutagênicos (ELSHIKH *et al.*, 2017; LONG *et al.*, 2016; MOTTA, *et al.*, 2022; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011). Apresentam potencial terapêutico como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunomoduladores, antioxidantes, algicidas e cicatrizantes (DAS; YANG; MA, 2014; DONIO *et al.*, 2013; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; PANDIT *et al.*, 2014; VARJANI; UPASANI, 2017). Como antifúngicos são eficazes contra 23 espécies de fungos e como algicidas, contra várias espécies comuns (GUSTAFSSON *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2017; RANDHAWA; RAHMAN, 2014; REDDY *et al.*, 2016; VARJANI; UPASANI, 2017).

Embora os ramnolipídeos apresentem várias funções, o alto custo de produção ainda é um fator limitante para aplicação no mercado, dessa forma aumentar a produtividade, bem como a escala de produção para alcançar a área industrial é urgentemente desejado. A produção clássica de biossurfactantes por fermentação submersa apresenta graves problemas principalmente causados pela grande formação de espumas durante as fermentações (GONG *et al.*, 2021; LEE; KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010). No entanto estratégias, como a utilização de antiespumantes e métodos físicos de contenção e recuperação da espuma, apresentam elevado custo e não são completamente eficientes, o que tem contribuído para falta de processos de produção em escala comercial. Baseado nessas adversidades, métodos inovadores para produção de ramnolipídeos vêm sendo estudados.

Dentro deste contexto, a proposta desta tese foi desenvolver dois protótipos: (i) um biorreator de fermentação estática em suporte de celulose bacteriana para produção de ramnolipídeos e (ii) um curativo biocompatível e biofuncional com a incorporação de ramnolipídeos a membrana de celulose bacteriana. A incorporação do glicolipídeo aumenta o espectro de aplicação, melhora suas propriedades físico-químicas e adiciona propriedades antimicrobianas e cicatrizantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver dois protótipos: (i) um biorreator de fermentação estática em suporte de celulose bacteriana para produção de ramnolipídeos e (ii) um curativo biocompatível e biofuncional com a incorporação de ramnolipídeos a membrana de celulose bacteriana (CB-RL), avaliar *in vitro* e *in vivo* seu uso como biocurativo em finalidades de regeneração tecidual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver protótipo de biorreator de bancada para fermentação estática na produção de ramnolipídeos (RL) por *Pseudomonas aeruginosa*;
- Testar diferentes processos de incubação e utilização de extrato aquoso de torta de milho como suplemento indutor visando aumento da produção de ramnolipídeos em biorreator;
- Ampliar o sistema do biorreator em escala por empilhamento e aumento de diâmetro das “unidades de cultivo”;
- Caracterizar os ramnolipídeos obtidos por fermentação estática utilizando como suporte membranas de celulose bacteriana através da determinação de: índice de emulsificação (E), tensão superficial (TS), concentração micelar crítica (CMC), cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria de massas;
- Produzir membranas de celulose bacteriana (CB) em fermentação estática;
- Avaliar as propriedades funcionais das membranas de celulose bacteriana por meios dos testes de espessura, capacidade de retenção de água (CRA), percentual de água (PA) e percentual de reidratação (PR);
- Produzir ramnolipídeos por fermentação submersa;
- Caracterizar os ramnolipídeos obtidos por fermentação submersa através da determinação de: índice de emulsificação (E), tensão superficial (TS)

e concentração micelar crítica (CMC), cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria de massas;

- Modificar as membranas de celulose bacteriana com incorporação *ex situ* de ramnolipídeos (CB-RL);
- Caracterizar o material obtido (CB-RL) através das análises de: liberação de ramnolipídeos em membrana de celulose bacteriana, espectroscopia por transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ângulo de contato (AC), permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade em água, isoterma de adsorção de água, resistência máxima a tração, alongamento de ruptura, módulo de Young, transparência e opacidade;
- Realizar testes *in vitro* do comportamento celular utilizando fibroblastos L929 através de análises de proliferação, adesão e morfologia.
- Realizar testes *in vivo* de regeneração celular.

3. CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A PELE HUMANA

A pele foi descrita por Virchow, cerca de 160 anos atrás, como um envoltório com função de revestimento e proteção a órgãos mais complexos (VIRCHOW, 1860). Com o passar dos anos, pôde-se comprovar que a pele também é um órgão funcionalmente aprimorado, com renovação e reparo de seus constituintes a todo o momento. Órgão de estrutura complexa, a pele tem a função de proteger o corpo do ambiente em que vive, ao mesmo tempo em que permite a interação entre estes, é um conjunto completo, altamente dinâmico e integrado de células, tecidos e elemento matriz. Dentre o grande número de funções vitais da pele, destacam-se a proteção das estruturas internas, percepção sensorial, regulação da temperatura corporal, excreção, metabolismo energético e absorção, resistência, elasticidade e alto poder de regeneração. A pele ainda, controla a perda de água e eletrólitos, participa da síntese de vitamina D, protege contra agentes químicos, físicos e biológicos, recebe estímulos sensoriais externos e armazena nutrientes (lipídios, água, vitaminas, entre outros) (BARBOSA, 2011; WOLFF; JOHNSON, 2011; ZHAO; ZHANG; LIU, 2021).

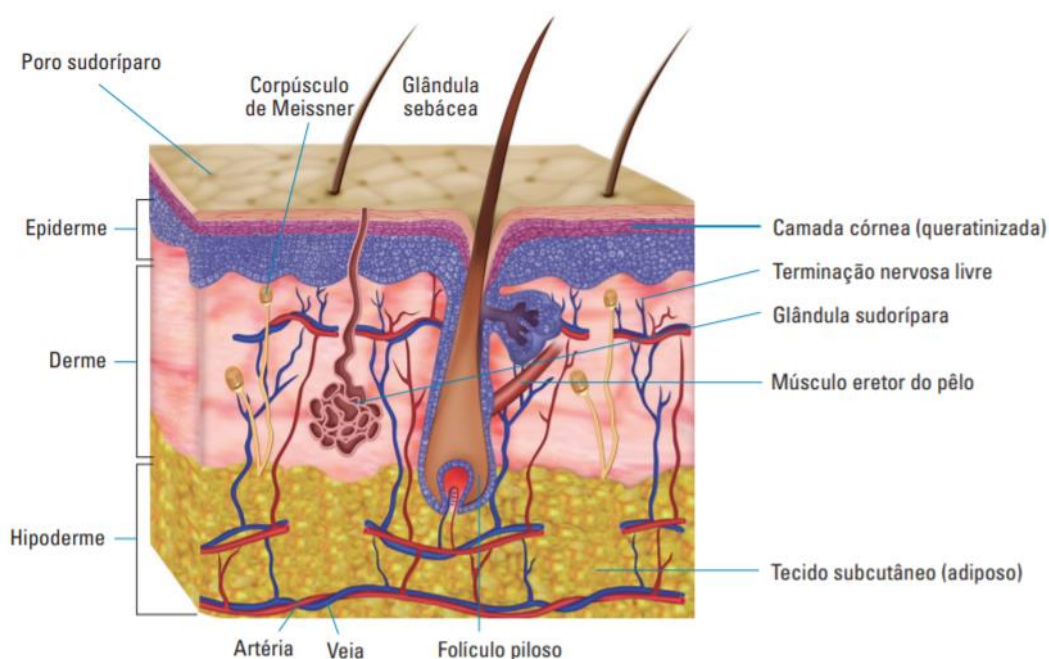
A pele é uma estrutura multicamadas considerada o maior órgão do corpo humano, constituindo cerca de 15% a 20% do peso corporal, com extensão de 1,5 a 2 m² e espessura que pode variar de 1,5 e 5 mm, dependendo da localização. Exerce, além das funções já citadas, o equilíbrio hidro-eletrolítico, função de barreira imunológica e proteção do organismo contra atritos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; LAI-CHEONG, MCGRATH, 2017; TOBIN, 2017).

3.1.1 Camadas da Pele

A pele é constituída por quatro tipos de tecidos, epitelial, conectivo, muscular e nervoso, e é classificada em epiderme (externa), derme (intermediária) e hipoderme (interna) (Figura 1).

A epiderme é a camada mais externa, avascular e representa a barreira fisiológica de proteção, composta principalmente por cerca de 95% de queratinócitos e outros tipos celulares como melanócitos, células de Merkel e Langerhans. A epiderme é dividida em quatro camadas principais, basal, espinhosa, granulosa e córnea, dependendo do estado de diferenciação de queratinócitos e que se distribuem da região mais interna para a mais externa conforme seu estágio de maturação. A camada basal consiste em uma única camada de queratinócitos. A epiderme está em constante renovação, o que ocorre em média à cada 12 dias (CAMPOS; MERCÚRIO, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; LAI-CHEONG, MCGRATH, 2017).

Figura 1 - Representação da estrutura da pele humana.



Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO (2004).

A derme é dividida estruturalmente em derme papilar (superficial) e derme reticular (profunda). Está posicionada sob a epiderme, é um tecido de sustentação e une a epiderme à hipoderme, apresentando espessura variável de 0,3 a 3 milímetros de acordo com a região do corpo. É composta principalmente de fibras colágenas (70 a 80%) e elastina (1 a 3%), determinando a resistência e elasticidade da pele, respectivamente. A derme contém os anexos

cutâneos, os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações nervosas sensoriais, que podem ser livres ou encapsuladas (MONTANARI, 2016; ROSS, 2012).

A camada papilar é delgada, formada por tecido conjuntivo frouxo mais superficial e dá origem às papilas dérmicas, esta camada possui fibras elásticas e fibrilas especiais de colágeno, dos tipos I e II distendidas e organizadas. Ajuda na fixação da derme à epiderme, além de facilitar a nutrição das células da epiderme, pelos vasos sanguíneos presentes na camada reticular da derme (ROSS; PAWLINA, 2016). A camada reticular é formada por tecido conjuntivo denso, possui muitas fibras do sistema elástico, responsáveis, em parte, pela elasticidade da pele, essa camada também possui glândulas sudoríparas, sebáceas, folículos pilosos, vasos sanguíneos e nervos. As principais células da derme são os fibroblastos tendo origem no próprio tecido conjuntivo, são responsáveis pela produção de colágeno e elastina. O colágeno é o principal constituinte fibroso e a proteína extracelular mais abundante do organismo, sendo responsável pela estrutura e firmeza. A elastina é formada por fibras delicadas, sendo responsáveis pela elasticidade do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; ROSS; PAWLINA, 2016).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, composta por tecido conjuntivo frouxo. É um tecido complexo constituído por adipócitos, as células especializadas no armazenamento de gordura, desempenha múltiplas funções essenciais, como reservatório energético, isolante térmico, proteção mecânica, modeladora da superfície corporal e fixadora dos órgãos. Está organizada em lóbulos de gordura divididos por septos fibrosos compostos por colágeno, por onde correm vasos sanguíneos, os vasos linfáticos e nervos, duas camadas podem ser detectadas, areolar e lamelar. A primeira é mais superficial, caracterizada por adipócitos globulares, volumosos e numerosos e delicados vasos, já a segunda, lamelar, é mais profunda e apresenta aumento da espessura associada ao ganho de peso (JAMES *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROSS; PAWLINA, 2016).

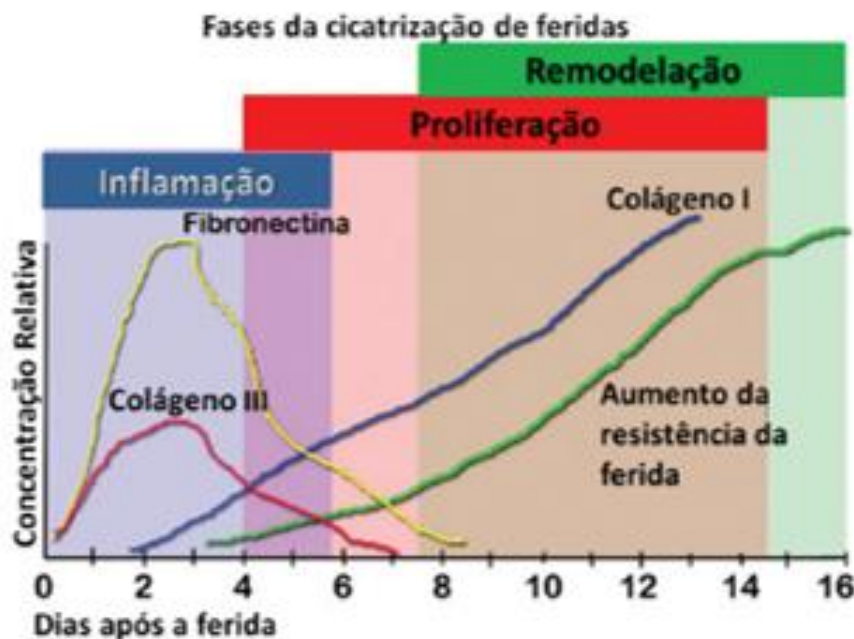
3.1.2 Feridas e Processo de Cicatrização da Pele

Ferida é toda e qualquer lesão que cause descontinuidade no tecido epitelial, podendo ser aguda ou crônica, pode apresentar diferentes origens, tais como, traumas físicos, queimaduras, cortes, ressecções cirúrgicas, úlceras, entre outros. São classificadas segundo parâmetros que auxiliam no diagnóstico, evolução e definição do tipo de tratamento (AZEVEDO; COSTA; JÚNIOR, 2018; SIQUEIRA, 2019).

As feridas agudas podem ser classificadas como aquelas que apresentam início e cura rápida e são comumente causadas por agentes mecânicos, físicos, químicos ou biológicos, podendo ser ainda ulcerativa, como queimaduras e lacerações. As feridas crônicas podem originar-se: i) a partir de um processo agudo de longa duração (que perdure por 3 ou 4 semanas), associado com perda de tecido; ou ii) evoluir de forma mais lenta e apresentar processo cicatricial anormal e com frequência associado a complicações, principalmente infecção. Pode apresentar conteúdo bacteriano e presença de exsudato, um material fluido, composto por células que escapam de um vaso sanguíneo e se depositam nos tecidos ou nas superfícies teciduais, usualmente como resultado de um processo inflamatório (BLANES; FERREIRA, 2014; IRON, 2012; SMANIOTTO *et al.*; 2012).

Quando o tecido é ferido, uma sequência perfeitamente coordenada de acontecimentos é disparada propiciando a reconstituição tecidual e regeneração dos tecidos e órgãos lesados (LEONIDA; KUMAE, 2016; MICERA *et al.*, 2001). A resposta à lesões é dividida em três fases: i) inflamação, ii) proliferação e iii) remodelação tecidual (Figura 2) (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; GURTNER *et al.*, 2008; REINKE; SORG, 2012). Esses eventos ocorrem em cascata e envolvem a migração de diferentes tipos de células no local da ferida, durante as diferentes fases do processo de cicatrização (ENOCH; LEAPER, 2005).

Figura 2 - Fases do processo de cicatrização.



Fonte: Adaptado de BROUGHTON; JANIS; ATTINGER (2006).

O processo inflamatório é iniciado imediatamente após a lesão, e mantém a homeostasia da pele lesada através: i) da liberação de fatores de coagulação e colágeno, necessários para prevenir as perdas contínuas de sangue e fluidos; ii) da remoção de tecidos mortos e desvitalizados e iii) da prevenção de infecções (CHOI *et al.*, 2018; ROGNOLI; WATT, 2018). O processo inflamatório é resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, consistindo no recrutamento de leucócitos para o local da lesão, onde há a liberação de fatores de coagulação, resultando em deposição de um coágulo de fibrina no local da lesão. O coágulo formado é composto por colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina. Polimorfonucleares e macrófagos estão presentes precocemente no local da lesão, enquanto os fibroblastos aparecerão mais tardiamente. Após 48 a 96 horas da lesão, os monócitos do tecido e sangue são atraídos para a área e transformam-se em macrófagos, o que marca o início da transição para a fase de proliferação (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; KUMAR *et al.*, 2010).

Na fase de proliferação, também chamada de granulação, o foco principal do processo de cicatrização depende da cobertura da superfície da

ferida. Ocorre em quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Forma-se no local o tecido de granulação, resultado da proliferação intensa das células endoteliais vasculares e dos fibroblastos, com uma grande quantidade de colágeno, em que a epitelização ocorre gradativamente. Inicialmente a matriz provisória contém fibrina, fibronectina e colágeno tipo III, substituído durante todo o processo pelo colágeno tipo I (Figura 2) (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; KUMAR *et al*, 2010).

O estágio de maturação ou remodelamento é a última fase da cicatrização da ferida e ocorre até 1 ano após a lesão e é em parte, responsável por diminuir o espaço entre as extremidades da derme e reduzir a área de cicatriz. Apresenta como característica mais importante a deposição de uma nova matriz com a deposição de colágeno de maneira organizada. O colágeno produzido inicialmente na proliferação é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, então é substituído por fibras tipo I, fibroblastos e leucócitos. Estes últimos são responsáveis por secretarem colagenases, que promovem a lise da matriz antiga, assim aumentando a resistência da ferida e sendo um processo importante da cicatrização (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; ERTEN; ARSLAN, 2018; ROGNOLI; WATT, 2018).

Entretanto, diversos fatores ou condições patológicas podem prejudicar o processo de cicatrização, como idade, estado nutricional, presença de anemia, hipotireoidismo, diabetes, anormalidades venosas e infecções entre outras. Dessa forma, é extremamente importante o uso de biomateriais, que atuem como suportes ou substitutos temporais da pele e que possam auxiliar ou acelerar o processo de cura (BEDOYA, 2019; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). A utilização de compostos biocompatíveis, como polímeros naturais ou sintéticos otimizados pela incorporação de princípios ativos, pode promover redução no tempo de cicatrização, aumento na taxa de sucesso de reparação e reconstrução do tecido danificado (BOATENG; CATANZANO, 2015; JAMES *et al.*, 2009).

3.2 BIOMATERIAIS E BIOCAMPATIBILIDADE

O termo biomaterial compreende substâncias nativas ou compostas, podendo ser materiais sintéticos ou naturais, que devem estar em contato na interface e interagir com sistemas biológicos. São materiais destinados a aplicações médicas, utilizados temporária ou definitivamente para avaliar, melhorar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, parcial ou totalmente. O critério para escolha de um biomaterial passou a ser feito de acordo com a similaridade química e física deste, em relação ao tecido a ser substituído. Ultimamente se tem dado mais atenção aos polímeros naturais para o desenvolvimento sustentável e preservação ambiental (KUNDU *et al.*, 2021; MORAES, 2013; PENTTILÄ *et al.*, 2018; WILLIAMS, 2014).

Os requisitos necessários para um biomaterial incluem ser biocompatível, não tóxico, não carcinogênico, não podem causar resposta inflamatória ou ser rejeitado, nem induzir respostas teciduais ou imunológicas adversas. Devem ser quimicamente projetados para as funções a que se destinam, possuir estabilidade mecânica, custo relativamente baixo, reprodutível, fácil fabricação, peso e densidade adequados e estimular reações biológicas favoráveis em relação à sua função. Dessa forma, devem promover a cura e a regeneração tecidual e, quando necessário depois de servir ao seu propósito deve ser biodegradável (CHEN; WU, 2005).

O termo biocompatibilidade prevê que a aplicação clínica de um biomaterial não resulte em reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente, surge associado à definição da capacidade de habilidade do material para poder atuar, através de uma resposta apropriada, quando colocado em contato com o receptor em uma dada aplicação específica (BARBANTI *et al.*, 2005). Inclui uma variedade de mecanismos de interações entre biomateriais e tecidos ou componentes teciduais. Com a crescente diversidade de produtos a serem analisados, há necessidade de estudos através de avaliações da capacidade de células aderentes para anexar, crescer e proliferar em um dispositivo ou superfície do material para que possa responder melhor se há presença de possíveis elementos tóxicos (BODIN, 2017; LOPES, 2017; WILLIAMS, 2014).

Se fazem necessários a fim de aferir sua segurança no uso, também de promover crescimento e regeneração celular com efeito terapêutico, devido às propriedades novas e interessantes dos materiais produzidos para aplicação direta em humanos, quer seja para fins cosméticos, farmacológicos ou médicos como substituinte de tecidos. Estas possibilidades de aplicações demandam ensaios biológicos para avaliação da biocompatibilidade dos materiais, com testes *in vitro* e *in vivo*. Esses testes podem fornecer dados úteis a respeito da interação do material com o ambiente fisiológico e dos possíveis riscos associados à sua aplicação, permitindo assim, identificar os materiais que não apresentam características adequadas (BATTAL *et al.*, 2015; DEMIR *et al.*, 2014).

A avaliação de materiais e dispositivos é imprescindível para que a sua utilização clínica tenha o máximo de segurança associada, assim no Órgão Internacional de Padronização, a norma ISO 10.993 orienta um modelo adequado de avaliação biológica de forma a garantir a biocompatibilidade do biomaterial. Segundo essa norma, devem ser realizados ensaios nos materiais ou produtos em condições finais de uso, caso haja qualquer modificação na matéria prima, processamento, esterilização ou indicação clínica, há necessidade de se reavaliar o biomaterial.

De acordo com essa norma, o ensaio de citotoxicidade '*in vitro*' deve ser o primeiro teste a ser realizado para avaliação biológica de dispositivos ou artigos médicos, para garantir a biossegurança avaliando de forma a perceber se estes não causam comportamento citotóxico. Apresentam vantagens como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente e em muitos casos em um período de teste mais curto. Esses testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, para verificar alterações celulares por diferentes mecanismos, avaliando diversos parâmetros em relação as alterações celulares, como aderência, proliferação alterações morfológicas, potencial genotóxico e alterações do metabolismo (DUNN; ZICHA, 1995; FERREIRA, 2016). Idealmente, as linhas celulares adequadas devem ser fáceis para cultivar, apresentar alta sensibilidade a efeitos citotóxicos e derivado das espécies relevantes (BROWN; WEINSTEIN, 1983; FERREIRA, 2016; GOLBAMAKI *et al.*, 2015). A necessidade de testar os materiais utilizados sobre

influência de culturas de células já foi declarada no final dos anos 1950 por Giardinello e colaboradores. A avaliação *in vivo* assegura a biofuncionalidade para determinar se o dispositivo executa sua função como pretendido (ANDERSON; LANGONI, 1999; GIARDINELLO; MCLIMANS, 1957; ISO 10993-5, 2009).

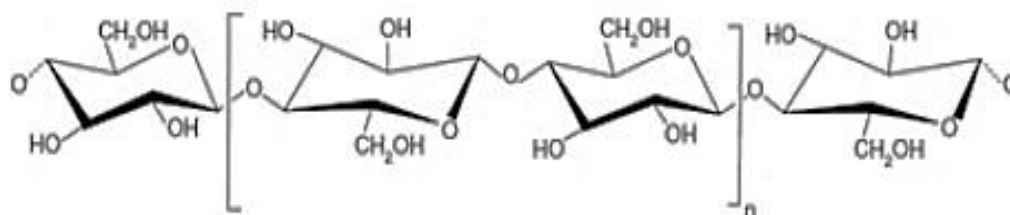
Além da necessária biocompatibilidade e biodegradabilidade também é essencial que a superfície do biomaterial possibilite a adesão celular e o subsequente crescimento tecidual. O ideal é que seja capaz de se ajustar as propriedades de superfície para atender à aplicação desejada, geralmente sem alterar outras propriedades, como sua resistência mecânica ou suas propriedades térmicas. Diversos polissacarídeos de origem microbiológica possuem propriedades físicas e biológicas interessantes para uso como biomaterial, e podem ser utilizados em várias aplicações como, por exemplo, o ácido hialurônico, dextrano, alginato e a celulose bacteriana (CZAJA *et al.*, 2006; DRIESSEN *et al.*, 2015; EVANS *et al.*, 2017; ISO 10993-5, 2009).

3.3 CELULOSE

A celulose é um material renovável, biodegradável e não tóxico. É um dos polímeros naturais mais importantes e mais abundantes na natureza, constitui a parede celular de todas as células de plantas, além de ser um produto industrial de alto impacto econômico e apresentar amplas aplicações (DAI *et al.*, 2019; DURMAZ; ÇULFAZ-EMECEN, 2018; GIBRIL *et al.*, 2012; HÄNNINEN *et al.*, 2018; SRIPLAI *et al.*, 2018). Foi primeiramente isolada em 1838, pelo químico francês Anselme Payen, das paredes celulares de plantas, desde então, sua importância estrutural e sua presença em outros organismos foram elucidadas (BODIN, 2017).

A estrutura química da celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ independente da fonte, apresenta a mesma forma, mas diferem no arranjo físico das moléculas da estrutura do polímero, portanto, em algumas propriedades. O polissacarídeo é composto por cadeias lineares não ramificadas, apresentam a união de moléculas β -glicose, através de ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), com unidade estrutural de repetição celobiose, composta por duas moléculas de glicose (Figura 3).

Figura 3 - Fórmula estrutural da celulose.

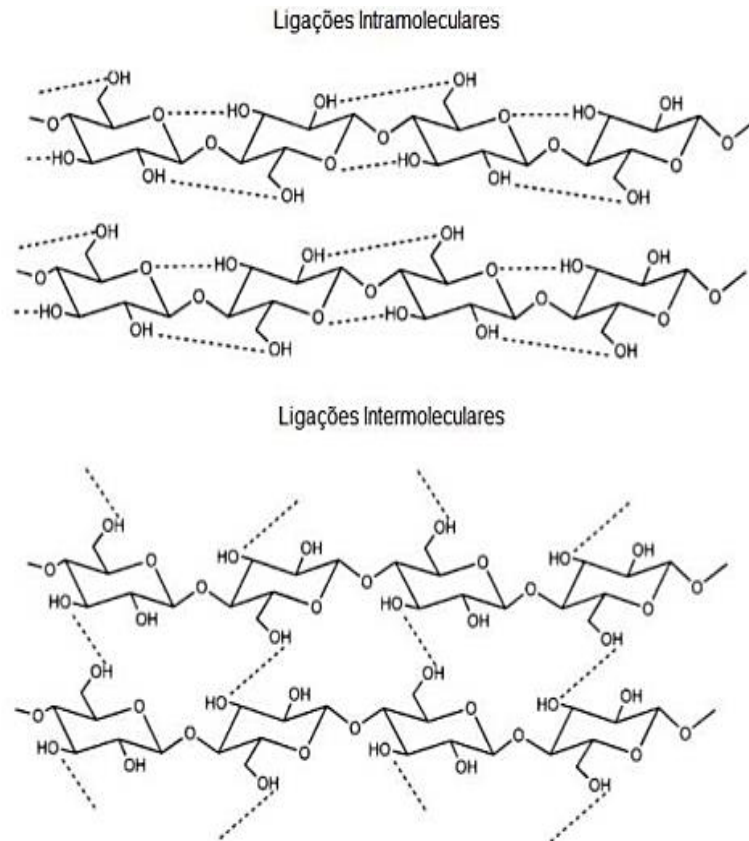


Fonte: SAXENA; BROWN JR (2008).

Possui vários grupos hidroxila e ligações das redes de hidrogênio, agregam com as regiões altamente ordenadas (estrutura cristalina) correspondente às ligações intramoleculares, que promove alta rigidez e resistência e a regiões desordenadas (estrutura amorfa) correspondente as ligações intermoleculares que agrega flexibilidade (Figura 4) (DUFRESNE, 2013; DURMAZ; ÇULFAZ-EMECEN, 2018; HÄNNINEN *et al.*, 2018; SAXENA; BROWN, 2008).

A celulose bacteriana é produzida a partir do cultivo de bactérias e tem recebido atenção devido às propriedades únicas de suas fibrilas (PENTTILÄ *et al.*, 2018), sendo usada em sua forma pura (HU *et al.*, 2013; MARTSON *et al.*, 1999); combinada, ou modificada quimicamente (LAI *et al.*, 2015).

Figura 4 - Ligações intra e intermoleculares nas cadeias de celulose.



Fonte: Adaptado de PHANTHONG *et al.* (2018).

3.3.1 Celulose Bacteriana (CB)

A celulose extracelular foi descrita como “*um tipo de pele úmida, gelatinosa e escorregadia*” pela primeira vez por Louis Pasteur. Foi cientificamente reportada em 1886 por Brown, que identificou o crescimento de uma película não ramificada sob o vinagre, produzida por bactérias (BROWN, 1886; FORESTI; VAZQUEZ; BOURY, 2016). A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo extracelular secretado por diversas espécies de bactérias como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Produtores de celulose bacteriana.

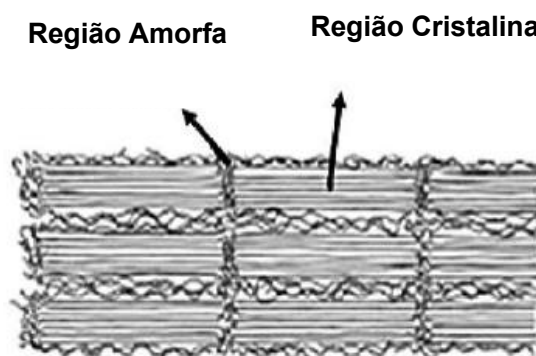
Microrganismos	Referências
<i>Gluconacetobacter</i>	(CHEN <i>et al.</i> , 2018; CHENG; YANG; LIU, 2017; COSTA <i>et al.</i> , 2017; LIMA <i>et al.</i> , 2017; REVIN <i>et al.</i> , 2018; SINGHSA, 2018; VOLOVA <i>et al.</i> , 2018; ZHAO <i>et al.</i> , 2018)
<i>Agrobacterium</i>	(CANNON; ANDERSON, 2008; MATTHYSSE, 1983)
<i>Azotobacter</i>	(CANNON; ANDERSON, 2008; DEIDEMA, M. H.; ZEVENHUIZEN, 1971)
<i>Aerobacter</i>	(DEIDEMA, M. H.; ZEVENHUIZEN, 1971; MATTHYSSE, 1983)
<i>Agrobacterium</i>	(DEIDEMA, M. H.; ZEVENHUIZEN, 1971)
<i>Pseudomonas</i>	(CANNON; ANDERSON, 2008; DEIDEMA, M. H.; ZEVENHUIZEN, 1971; MATTHYSSE, 1983)
<i>Rhizobium</i>	(CANNON; ANDERSON, 2008)
<i>Achromobacter</i>	(MATTHYSSE, 1983)
<i>Sarcina</i>	(CANALE-PAROLA; WOLFE, 1964; CANNON; ANDERSON, 2008).

Fonte: O próprio autor.

As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (atualmente *Komagataeibacter*) recebem destaque, são bactérias Gram-negativas quimioheterotróficas, estritamente aeróbias, não patogênicas, que secretam a celulose em fitas compostas de microfibrilas organizadas e formam membranas (KLEMM *et al.*, 2005). As fibras de celulose bacteriana apresentam pureza química, sem outros componentes da biomassa lignocelulósica, assim como a lignina, hemicelulose e pectina. Também há as regiões desordenadas,

conhecidas como regiões amorfas, conforme apresentado na Figura 5. Este gênero apresenta elevados níveis de produção utilizando diferentes açúcares. As películas se formam na interfase meio-ar, em cultivos estáticos, de bactérias não patogênicas e normalmente encontradas em vegetais e frutas (BROWN, 1886). A formação da membrana de celulose bacteriana tem a finalidade de proteger as células de outros microrganismos, proteger as células do efeito nocivo da luz ultravioleta, manter a umidade, prevenir a desidratação, facilitar a adesão das células em um ambiente aeróbico e aumentar a colonização celular. A CB é branca, cristalina, resistente à ruptura, flexível, semitransparente e permeável à água (CASTRO *et al.*, 2015; ROMLING; GALPERIN, 2015; SETYAWATI; CHIEN; LEE, 2009).

Figura 5 - Arranjo das fibras de celulose bacteriana.



Fonte: JESUS SILVA; D'ALMEIDA (2009).

A síntese da CB pode ser realizada utilizando diversas fontes de carbono e com um pH ótimo entre 4 e 7, temperatura entre 25 e 30 °C. Embora diferentes fontes de carbono possam ser utilizadas (Tabela 2) a mais utilizada para a produção da CB é a glicose, que não atua somente como fonte de energia, mas também como precursora da biossíntese do biopolímero. Além disso, algumas propriedades das membranas de CB podem ser devidamente adaptadas, variando as condições fisiológicas de crescimento bacteriano, tais como composição do meio de cultura, pH, temperatura e tensão de oxigênio (REVIN *et al.*, 2018; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; VIEIRA, 2013).

Tabela 2 - Principais fontes de carbono na produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter* (atualmente *Komagataeibacter*).

Fontes de Carbono	Cepa Bacteriana	Referências
Glucose	<i>G. hansenii</i> UCP 1619	(ALVES, E. A.;
	<i>G. sucrofermentans</i> B-11267	GUIMARÃES, 2010;
	<i>G. xylinus</i> BC-11	COSTA <i>et al.</i> , 2017;
	<i>G. hansenii</i> UAC09	RANI; APPAIAH,
	<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	2011; REVIN <i>et al.</i> ,
	<i>G. xylinus</i> B-12068	2018; SINGHSA,
	<i>G. xylinus</i> TISTR 086 428, 975, 1011	2018; SOUZA;
Manitol	<i>G. xylinus</i> CGMCC 295	PORTO, 2014;
	<i>G. xylinus</i> ATCC 23769	VOLOVA <i>et al.</i> ,
	<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	2018; ZHAO <i>et al.</i> ,
	<i>G. xylinum</i> ATCC 23767	2018; ZHONG;
	<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	ZHANG; LIU, 2013)
Frutose	<i>G. xylinus</i> CH001	(CHENG; YANG;
	<i>G. xylinus</i> ATCC 700178	LIU, 2017; COSTA
Glicerol	<i>G. amnigenus</i> GH-1	<i>et al.</i> , 2017; LIMA <i>et</i>
	<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	<i>al.</i> , 2017; LU;
Xilose	<i>G. xylinus</i> ATCC 23769	ZHANG; CHI, 2011;
	<i>G. xylinus</i> CH001	SOUZA; PORTO,
		2014; VIEIRA, 2013)
		(CHEN <i>et al.</i> , 2018;
		GUPTA, 2010)
		(SOUZA; PORTO,
		2014)
		(YANG <i>et al.</i> , 2014)

Fonte: O próprio autor.

3.3.2 Propriedades da Celulose Bacteriana

A CB pode ser empregada como um biomaterial promissor a ser em diversas aplicações, possui características de biocompatibilidade, elevada resistência mecânica e pureza, transparência e atoxicidade (BERTI *et al.*, 2013; GODINHO, 2014; JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009; JOZALA *et al.*, 2016; KUO *et al.*, 2016).

Apresenta estrutura quimicamente semelhante à celulose vegetal, porém, mais pura (livre de lignina e hemicelulose) e morfologicamente diferente, principalmente por apresentar fibras de caráter nanométrico contra o micrométrico da vegetal, o que lhe confere excelentes propriedades mecânicas, maior cristalinidade, maior poder de absorção de água e maior resistência à tração, além de um baixo grau de polimerização, melhor adaptabilidade biológica e maior umidade (KLEMM; HEUBLEIN; BOHN, 2005; KUMAR *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2013; SHINODA *et al.*, 2012).

As fibras de caráter nanométrico desse material apresentam alta absorção de água, alta molhabilidade, alta pureza e alta cristalinidade (PENTTILÄ *et al.*, 2018), possuem diâmetro de 20-100 nm e são altamente hidrofílicas absorvendo mais de 100 vezes sua massa em água (BROWN, 2004; CHOI, SONG *et al.*, 2009; CZAJA, ROMANOVICZ). As propriedades mecânicas, bem como a micro e a macroestrutura da CB são influenciadas pelo ambiente (meio e condições de cultivo) e do tratamento após a síntese. As propriedades físico-químicas excelentes deste biopolímero têm impulsionado o desenvolvimento de novos métodos de produção em grande escala, assim como, a aplicação em novos ramos industriais (KLEMM *et al.*, 2005; PENTTILÄ *et al.*, 2018).

3.3.3 Aplicações da Celulose Bacteriana na Área Biomédica

A CB possui características que tornam promissora a sua utilização, principalmente, nas áreas biomédicas e biotecnológicas, funcionam como uma substituta temporária da pele (GODINHO, 2014; KLEMM *et al.*, 2005; PENERARI *et al.*, 2008; PENTTILÄ *et al.*, 2018). Utilizada como biocurativo, fornece umidade ideal para feridas secas, absorve exsudatos, é uma barreira

física eficaz contra infecção, não adere a superfície da ferida e assim tem fácil aplicação e remoção evitando a retirada de pele durante a troca de curativos. A CB apresenta ainda, alta permeação de vapor de água, aderência em diversos tipos de ferimentos e regiões irregulares do corpo, biocompatibilidade e hipoalergênia e permeabilidade à gases enquanto mantém uma permeabilidade mínima para líquidos (evitando o processo de desidratação e perda de sais minerais, comuns em queimados) e pode ainda apresentar efeito analgésico. Adicionalmente, apresenta a vantagem de não necessitar de trocas frequentes, podendo ficar por dias, o que em casos de queimadura é uma grande vantagem, já que evita danos ao tecido durante remoção, por fim, após a cicatrização resseca e se destaca naturalmente (MATEOS, 2004; STOCHERO; TORNIEUX, 2006).

Do ponto de vista comercial, a celulose bacteriana tem despertado interesse na confecção de curativos, aceleram a cicatrização das feridas em espaço de tempo muito menor do que quando curativos convencionais são utilizados (SULAEVA, I. *et al.*, 2015). De forma tradicional desde a década de 70 os curativos são feitos com gazes e tem como principal desvantagem danos à pele recém-formada após a sua remoção além de dificultar as trocas gasosas da pele e provoca o seu ressecamento pela alta absorção do exsudato levando a contaminação da lesão com crescimento bacteriano acelerado (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017).

Os curativos de CB têm grande potencial de aplicação (CIECHAŃSKA, 2004; CZAJA *et al.*, 2006) em casos de regeneração (LIU *et al.*, 2013) para lesões de difícil cicatrização como úlceras de pressão (SERAFICA *et al.*, 2010), feridas de diabetes (BASMAJI, 2014), moldando-se à pele e ao ferimento (FU; ZHANG; YANG, 2013). Utilizada também para recuperação da dura-máter, revestimento de “stents” arterial (CZAJA *et al.*, 2006), produção de vasos sanguíneos, recuperação de nervos (KLEMM *et al.*, 2001); válvula cardíaca, liberação de fármacos (PETERSEN; GATENHOLM, 2011; WAN *et al.*, 2006), cartilagem artificial, material de regeneração óssea (SVENSSON *et al.*, 2005); prótese artificial (WANG *et al.*, 2010); recuperação da gengiva (WANG *et al.*, 2010), entre outros.

Estudos de biocompatibilidade de CB, *in vivo*, em modelos animais têm demonstrado excelente integração da CB com o tecido lesado,

ausência de processos inflamatórios agudos, epitelização rápida e ausência de rejeição ao longo do tempo (BACKDAHL *et al.*, 2006). Apesar das excelentes propriedades, a CB não apresenta atividade antibacteriana, o que limita a aplicação em feridas infeccionadas, usualmente crônicas e difíceis de curar (FU; ZHANG; YANG, 2013; LIU *et al.*, 2013; SERAFICA *et al.*, 2010). Neste contexto, sendo motivos de estudo a funcionalização da celulose bacteriana com compostos que agreguem propriedades ao polímero, como atividade antimicrobiana, tanto através de interações físicas como por ligações químicas (NEVES *et al.*, 2011).

3.3.4 Membranas de Celulose Bacteriana Biofuncionais

Uma estratégia de destaque no uso da membrana de CB é a possibilidade de se incorporar moléculas com aplicações distintas, compostos ativos com biofuncionalidades, sem causar alterações nas suas propriedades originais do ativo. Esta estratégia aumenta o espectro de aplicação e melhora as propriedades físico-químicas do biomaterial (CHEN *et al.*, 2018; GODINHO, 2014).

Há diversas as formas de incorporações de moléculas na CB (LANZA *et al.*, 2007), como a incorporação de agentes antimicrobianos como as nano partículas de prata (WOEHL, 2014), imunoativos como a aloe vera (PIAIA, 2014) e anti-inflamatórios como o ibuprofeno (ZANOTI, 2017). Adicionalmente, os suportes bioativos como a CB podem efetuar uma libertação controlada de compostos (WILLERTH; SAKIYAMA-ELBERT, 2008).

A incorporação de antimicrobianos na membrana de CB minimiza as reinfecções, diminui a possibilidade das bactérias adquirirem resistência aos antibióticos, um problema recorrente nas infecções de feridas (NEVES *et al.*, 2011; SHAH; AI-BARGI, 2013).

Logo, a inclusão de agentes em membranas de CB é bastante relevante e promissora, pois permite não só a recuperação dos tecidos lesados pela ação do biopolímero, mas também pela ação do agente terapêutico.

3.4 RAMNOLIPÍDEOS

Os ramnolipídeos (RL) foram primeiramente descritos por Bergström e colaboradores (1946 a, b), como compostos glicolipídicos “oleosos” produzidos por *Pseudomonas pyocianea* (atualmente *P. aeruginosa*) crescida em glicose e denominados como ácido piolípico. Jarvis e Johnson (1949) elucidaram a estrutura deste grupo de moléculas e os denominaram ramnolipídeos. Os RL pertencem a classe dos glicolipídeos e são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de bactérias (Tabela 3), tendo como principal produtor a *Pseudomonas aeruginosa*, sintetizados quando entram na fase estacionária de crescimento. Estão entre os biossurfactantes mais estudados e promissores, sobretudo devido à sua natureza biodegradável, baixa toxicidade, diversidade de aplicações e produção a partir de fontes renováveis (BAI; MCCLEMENTS, 2016; GDANIEC *et al.*, 2022; LONG *et al.*, 2016; MOTTA, *et al.*, 2022; RAMÍREZ *et al.*, 2016).

Tabela 3 - Diferentes espécies de *Pseudomonas* e outros gênero descritos como produtores de ramnolipídeos.

(continua)

Espécies	Referências
<i>Pseudomonas putida</i>	BONILLA <i>et al.</i> , 2005; JOHANN <i>et al.</i> , 2016
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ;	HOSKOVÁ <i>et al.</i> , 2015
<i>Enterobacter asburiae</i>	ROONEY <i>et al.</i> , 2009
<i>Enterobacter hormaechei</i> ; <i>Pantoea stewartii</i>	COSTA; DÉZIEL; LÉPINE, 2011 PANTAZAKI, PAPANEOPHYTOU;
<i>Burkholderia glumae</i> AU6208	LAMBROPOULOU, 2011
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	CAMILIOS-NETO, 2010; RAMIREZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	GUNTHER <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas clemancea</i> ; <i>P. collierea</i>	RAHMAN <i>et al.</i> , 2009

Tabela 3 - Diferentes espécies de *Pseudomonas* e outros gênero descritos como produtores de ramnolipídeos.

(conclusão)

Espécies	Referências
<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. luteola</i> , <i>P. shutzeri</i> , <i>P. teessidea</i>	OBASLI; ASLIM, 2009
<i>Pantoea</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Enterobacter</i>	RONEY <i>et al.</i> , 2009
<i>Burkholderia</i>	ANDRĂ <i>et al.</i> , 2006; DUBEAU <i>et al.</i> , 2009; HÄUSSLER <i>et al.</i> 1987.
<i>Pseudoxanthomonas</i>	NAYAK <i>et al.</i> , 2009

Fonte: o próprio autor.

Na fisiologia bacteriana, os RL são importantes na mobilidade celular, interações célula-célula, acessos aos substratos hidrofóbicos, defesa do microrganismo, expulsão de compostos tóxicos das células e formação de canais de água que são característicos em biofilmes (DAVEY; CAIAZZA; O'TOOLE, 2003; MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; NEALSON *et al.*, 1970). A composição e as propriedades destes compostos dependem da estirpe microbiana, condições de cultivo e substratos utilizados para produzi-los (OLIVEIRA, 2010; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

Os RL apresentam uma ampla gama de aplicações potenciais em diversos setores industriais, (1) Indústria do petróleo, na biorremediação e recuperação melhorada do petróleo em que apresentam excelentes propriedades de emulsificação, remoção eficaz de petróleo bruto e tratamento de solo contaminado; (2) Indústria farmacêutica, produtos farmacêuticos e terapêuticos pelo fato de serem agentes tensoativos e apresentarem baixa toxicidade, adicionalmente apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas, algicida e cicatrizantes; (3) Indústria cosmética, como ingrediente ativo em tratamentos de pele, diminuição de fibrose e tratamento de rugas; (4) Indústria de produtos de higiene e limpeza, em produtos de lavanderia, shampoos e sabões; (5) Indústria agrícola, na remediação de solos, no controle de fitopatógenos, como biopesticidas e para auxiliar a absorção de fertilizantes e nutrientes (6) Indústria de alimentos, com importante papel na formação da

textura e consistência, assim como na solubilização de aromas e na dispersão de fase (COSTA *et al.*, 2006, 2010; LEE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016; NITSCHKE; COSTA, 2007; RANDHAWA; RAHMAN, 2014; REDDY *et al.*, 2016; VARJANI; UPASANI, 2017).

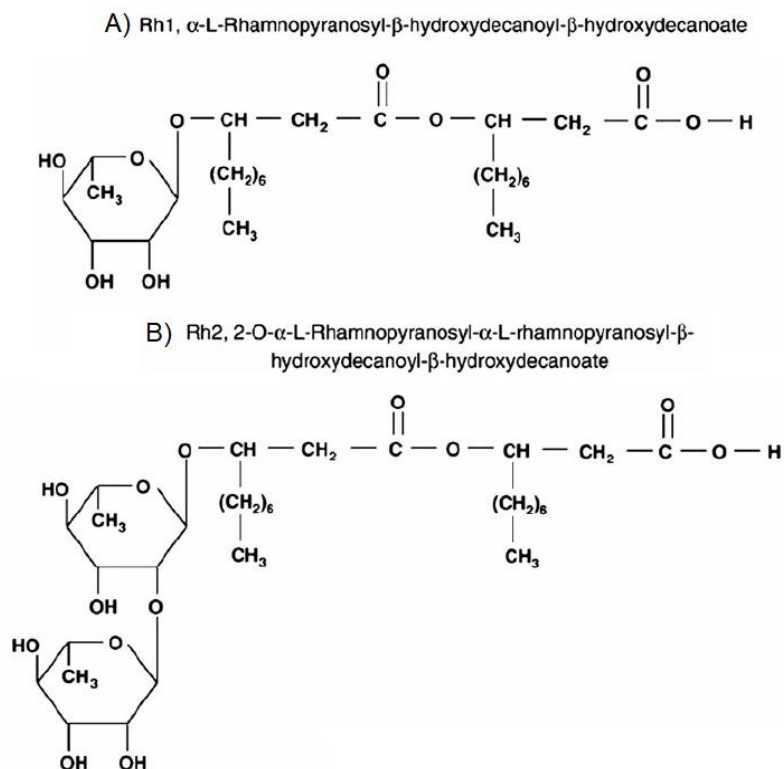
Os RL são aprovados pelas Agências de Proteção Ambiental e de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (USEPA e FDA, respectivamente) para uso em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos (HENKEL *et al.*, 2012; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010). Estima-se que o mercado de biossurfactantes à base de ramnolipídeos atinja mais de US\$ 145 milhões até 2026, com uma taxa de crescimento anual composta de > 5% (AHUJA; SINGH, 2020; MORDOR INTELLIGENCE, 2021).

3.4.1 Estrutura dos Ramnolipídeos

Os RL são compostos por uma parte hidrofílica, composta por ramnose, e uma parte hidrofóbica, por ácido β -hidroxialcanóico (HAA). Sua classificação é atribuída por conter uma (mono-ramnolipídeos) ou duas moléculas (di-ramnolipídeos) de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxialcanóico contendo de 8-14 átomos de carbonos. Os principais glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são dos tipos 1 e 2, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, respectivamente (Figura 6), com mais de 60 congêneres ramnolipídicos já foram descritos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; VARJANI; UPASANI, 2017; WOZNIAK-KARCZEWSKA, 2017).

A carboxila do ácido β -hidroxialcanóico confere uma característica hidrofílica (Figura 6), o que oferece aos ramnolipídeos um caráter aniônico sobre condições de pH apropriadas (LONG; MCCLEMENTS, 2016; REDDY *et al.*, 2016; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2005).

Figura 6 - Estrutura química dos principais homólogos de ramnolipídeos.



Fonte: Adaptado de MULLIGAN (2005).

A composição da mistura de homólogos, a presença de insaturações, o comprimento da cadeia alquílica e a composição da porção hidrofílica (uma ou duas moléculas de ramnosos) podem afetar propriedades físico-químicas destes compostos, a sua capacidade de reduzir tanto a tensão interfacial quanto a tensão superficial da água pode variar em função dos diferentes homólogos produzidos. Isso os torna mais ou menos eficientes, dependendo da aplicação desejada (LOVAGLIO, 2011; MONTEIRO, 2007).

3.4.2 Produção dos Ramnolipídeos

Apesar dos RL serem produzidos em elevadas concentrações, o processo de produção deve ser otimizado de acordo com a aplicação pretendida. Entre os parâmetros que influenciam o tipo e a quantidade de produto formado pode-se citar a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, geração de espuma, temperatura e pH, fatores nutricionais e ambientais ao qual

o microrganismo é submetido. As melhores produções de RL ocorrerem em pH em torno de 7,0, enquanto em pH abaixo de 6 e acima de 8 ocorre uma redução drástica no crescimento bacteriano, o que leva também a uma grande diminuição na produção (CHANG *et al.*, 2005; ELSHIKH *et al.*, 2017; FIECHTER, 1992).

De acordo com Mukherjee e colaboradores (2006) três estratégias devem ser adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixos: (1) substrato - utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo; (2) desenvolvimentos de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo e (3) desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biosurfactante.

A obtenção de elevados índices de RL já foram descritos na utilização de substratos alternativos como hidrolisado de azeitona (RAMIREZ *et al.*, 2016), resíduos de óleo de cozinha (LAN *et al.*, 2015), glicerol (SANTANA FILHO, 2009), óleo de côco (GEORGE; JAYACHANDRAN, 2013) e óleo de milho (LINHARDT *et al.*, 1987), dessa forma constitui uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento da produção industrial de biosurfactantes, bem como redução dos custos do processo (CHRZANOWKI; LAWNICZAK; CZACZYK, 2012; COSTA, 2010; WOZNIAK-KARCZEWSKA, 2017).

A produção de RL por *P. aeruginosa* está sujeita ainda a outros fatores além dos mecanismos de resposta ao *quorum sensing* (QS), como o estresse por falta de nutrientes, por alterações no padrão de salinidade e temperatura, entre outros (SIVASAMY *et al.*, 2016). A relação carbono-nitrogênio (C/N) também é um dos fatores que influencia diretamente na produtividade de ramnolipídeos. Diferentes relações C/N podem ser encontradas na literatura, de 10 até 55 (RAZA *et al.*, 2007; ABOUSEOUD *et al.*, 2008). Alguns autores relatam haver uma relação entre aumento da relação C/N e produção de ramnolipídeos (MONTEIRO, 2007; SANTANA FILHO, 2009). A fonte de nitrogênio também é um fator importante a ser considerado, uma vez que a limitação deste componente promove a síntese de ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo alguns autores a produção é inibida na presença de glutamina, asparagina e arginina e promovida na presença de nitrato, glutamato e aspartato (LEE *et al.*, 2004). Embora ainda exista muitos desafios para se alcançar a obtenção em larga escala de ramnolipídeos, estes surfactantes microbianos são

considerados como a classe de biotensoativos mais promissora em termos de produção industrial (DAMIAO, 2012).

3.4.3 Atividade dos Ramnolipídeos na Área Biomédica

Os RL são de grande interesse para a área biomédica por serem biodegradáveis, atóxicos e não mutagênicos (ELSHIKH *et al.*, 2017; LONG *et al.*, 2016; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011). Destaca-se o potencial do congêneres di-ramnolipídeo, devido à maior presença de grupos polares que resulta em maior interação (MELLO, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2007), sendo relatado que mesmo entre homólogos qualquer alteração na estrutura química tem efeito no potencial terapêutico da molécula (RIKALOVIC *et al.*, 2014). Dentre as várias propriedades dos RL evidenciadas na literatura destacam-se o potencial terapêutico da biomolécula como antibacteriano, antifúngico, antivirais, imunomodulador, antioxidante e algicida (Tabela 4) (DONIO *et al.*, 2013; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; PANDIT *et al.*, 2014; VARJANI; UPASANI, 2017).

O mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana dos RL não é completamente compreendido, mas por apresentar caráter anfifílico, os estudos apontam que agem diminuindo a hidrofobicidade da superfície e solubilizando proteínas e lipídeos constituintes da superfície da membrana celular, perturbando sua integridade e permeabilidade por meio da formação de poros transmembrana que servem como canais para o interior da célula (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013; ORTIZ *et al.*, 2006; SHULGA *et al.*, 2008). Alguns autores apontam que os RL aumentam a permeabilidade da membrana celular, habilidade com consequente alteração desta barreira e assim causa danos (SÁNCHEZ *et al.*, 2006; SHULGA *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Propriedades antimicrobianas dos ramnolipídeos.

(continua)

Microrganismo	Ramnolipídeo aplicado	Referências
Bactérias (Gram-negativas)		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Erwinina carotovora</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Proteus mirabilis</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Serratia marcescens</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Xanthomonas campestris</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
Bactérias (Gram-positivas)		
<i>Bacillus cereus</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
	Rha-Rha-C10-C10, Rha-C10-C10	NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004

Tabela 4 - Propriedades antimicrobianas dos ramnolipídeos.

(continuação)

Microrganismo	Ramnolipídeo aplicado	Referências
		HABA <i>et al.</i> , 2003
	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Micrococcus luteus</i>	Mistura de RL	NITSCHKE; COSTA;
	Rha-Rha-C10-C10,	CONTIERO, 2010
	Rha-C10-C10	
		HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mistura de RL	NITSCHKE; COSTA;
	Rha-Rha-C10-C10,	CONTIERO, 2010
	Rha-C10-C10	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptococcus faecalis</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
Fungos		
<i>Alternaria alternata</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Alternaria mali</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Aspergillus niger</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Botrytis cinerea</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Candida albicans</i>	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Cercospora kikuchii</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Chaetonium globosum</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000

Tabela 4 - Propriedades antimicrobianas dos ramnolipídeos.

(continuação)

Microrganismo	Ramnolipídeo aplicado	Referências
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Didymella bryoniae</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Fusarium solani</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Fusarium sp.</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Gliocadium virens</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
		BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Magnaporthe grisea</i>	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
<i>Neurospora crassa</i>	Mistura de RL	NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2010
<i>Penicillium funiculosum</i>	Mistura de RL	HABA <i>et al.</i> , 2003
	Mistura de RL	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Phytophthora sp.</i>	Mistura de RL	STANGHELLINI; MILLER, 1997
	Rha-Rha-C10-C10	KIM; LEE; HWANG, 2000
	RL mixture: Rha-Rha-C10-C10, Rha-Rha-C10-C10:1, Rha-C10-C10, Rha-Rha-C10-C12:1, Rha-C10-C12:1, Rha-C10-C12, Rha-Rha-C10-C12, Rha-Rha-C10-C8, Rha-C8-C10, RhaRha-C8-C10, Rha-Rha-C12-C12, Rha-Rha-C12-C12:1)	SHARMA <i>et al.</i> , 2007

Tabela 4 - Propriedades antimicrobianas dos ramnolipídeos.

(conclusão)

Microrganismo	Ramnolipídeo aplicado	Referências
<i>Rhizoctonia solani</i>	Rha-Rha-C10-C10 Mistura de RL	KIM; LEE; HWANG, 2000 HABA <i>et al.</i> , 2003
Alga (Heterosigma akashiwo)	Rha-Rha-C10-C10, Rha-C10-C10	WANG <i>et al.</i> , 2005

Mistura de RL: Rha-Rha-C10-C10, Rha-RhaC10-C12, Rha-C10-C10, Rha-Rha-C10-C12:1

Fonte: Adaptado de VATSA *et al.*, 2010.

Os RL aceleram o processo cicatrizante de feridas na pele, como também, auxiliam na redução da marca da cicatriz (TAWFEEEQ; YESSER, 2018). Stipcevic, Piljac & Piljac (2006) mostraram que o di-RL produzido por *Pseudomonas aeruginosa* apresentou funções antifibróticas, reduzindo o conteúdo de colágeno em queimaduras de ratos. Shen e colaboradores (2016) comprovaram um efeito antifibrótico potente contra a formação de cicatrizes hipertróficas na orelha de coelho, reduzindo o índice de elevação da cicatriz e distribuição de colágeno.

Também podem atuar como imunomoduladores para regular os sistemas imunológicos humoral e celular de mamíferos e plantas, podendo ativar as células imunes, resultam na secreção de citocinas pró-inflamatórias (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; MOHAMMAD ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIE, 2010; SAJID *et al.*, 2020).

3.5 REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, R. Rhamnolipids: diversity of structures microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323-1336- 2010.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223 p. 143–151, 2008.

AHUKA, K.; SINGH, S. **Biosurfactants market size by product (sophorolipids, rhamnolipids, alkyl polyglucosides [APG], methyl ethyl sulfonates [MES], sucrose esters, sorbitan esters, lipopeptides), by application (household detergents, personal care, industrial cleaners, food P. glob mark insights**. Accessed 17 September 2021 (2020).

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde - Cultivo celular**, v. v.2, n. Rio de Janeiro: EPSJV, p. 215–252, 2010.

ANDERSON, J. M., LANGONE, J.J. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. **J Control Release**, v. 57, n. 2, p. 107–13, 1999.

AZEVEDO, I. C; COSTA, R. K. S; JÚNIOR, M. A. F. Perfil da produção científica da enfermagem nacional sobre feridas. **Revista Cubana de Enfermería.**, v. 34, n. 1, p. 233-246, 2018.

BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71-19, 2016.

BARBANTI, S.; ZAVAGLIA, C.; DUEK, E. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15(1), pp. 13-21, 2005.

BARBOSA, F. de S. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**, 119f. Dissertação Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

BASMAJI, P; OLYVEIRA, G. M.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Novel Antimicrobial Peptides Bacterial Cellulose Obtained by Symbioses Culture Between Polyhexanide Biguanide (PHMB) and Green Tea. **Journal Of Biomaterials and Tissue Engineering, Valencia: Amer Scientific Publishers**, v. 4, n. 1, p. 59-64, 2014.

BATTAL, D.; ÇELİK, A.; AKTAS, A.; YILDIRIMCAN, S.; OCAKOGLU, K.; ÇÖMELEKOGLY, Ü. SiO₂ Nanoparticule-induced size-dependent genotoxicity- an *in vitro* study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet

- assay. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 196–204, 2015.
- BEDOYA, J. G. M. **Biomaterial a base de celulose bacteriana com aplicação na regeneração de tecido cutâneo**, Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista. Araraquara/SP, 79f, 2019.
- BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. On a metabolic product of *P. pyocyanea*, pyolipidic acid, active against *M. tuberculosis*. **Ark. Chem. Mineral Geol.**, v. 23(A), p. 1-12, 1946a.
- BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. Pyolipidic acid. A metabolic product of *P. pyocyanea*, active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 10, p. 165-166, 1946b.
- BERTI, F.; UNGARO, F.; QUAGLIA, F.; NETTI, P. A. Controlled drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 229-242, 2008.
- 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, p. 1–8, 2004
- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. **J. of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n.11: p. 3653-3680, 2015.
- BLANES, L.; FERREIRA, L. M. Prevenção e tratamento de úlcera por pressão. São Paulo: **Atheneu**, 2014.
- BODIN, A. **Bacterial Cellulose as Biomaterial**, v. 2, p. 505–511, 2017.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: and overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p.1-32, 2006.
- BROWN, A. J. Brown on acetic ferment. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, n. 432, p. 432–439, 1886.
- BROWN, S. J.; WEINSTEIN, M. I. A New Approach to Testing Asset Pricing Models: The Bilinear Paradigm. **The Journal of Finance**, v. 38, n. 3, p. 711–743, 1983.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p.262–266, 2004.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CAMPOS, P. M. B. G. M.; MERCÚRIO, D. G. Farmacologia e a pele. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 4, 2009.

CANALE-PAROLA; WOLFE. Synthesis of cellulose by. **Wolfe Biochim. Acta**, v. 82, n. 403, p. 5–7, 1964.

CANNON, R. E.; ANDERSON S. **Critical Reviews in Microbiology Biogenesis of Bacterial Cellulose Biogenesis of Bacterial Cellulose**, v. 17, n. 6, p. 435-447, 2008.

CASTRO, C.; CORDEIRO, N.; FARIA, M.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J. L.; FILIPPONEN, I.; VELEZ, L.; ROJAS, O.; J.; GAÑÁN, P. **In-situ glyoxalization during biosynthesis of bacterial cellulose**. v, 126, p. 32–39, 2015.

CHANG, J. S.; CHOU, C. L.; LIN, G. H.; SHEU, S. Y.; CHEN, W. M. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. **Syst. And Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 2, p. 137-144, 2005.

CHEN, Q.; FAN, Q.; ZHANG, Z.; MEI, Y.; WANG, H. Effective in situ harvest of microalgae with bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Algal Research**, v. 35, p. 349–354, 2018.

CHENG, Z.; YANG, R.; LIU, X. Production of Bacterial Cellulose by Acetobacter xylinum through Utilizing Acetic Acid Hydrolysate of Bagasse as Low-cost Carbon Source. **Bioresours**, v. 12, n. 1, p. 1190–1200, 2017.

CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, 26, 6565-6578, 2005.

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

CIECHAŃSKA, D. Multifunctional Bacterial Cellulose/Chitosan Composite Materials for Medical Applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, n. 4, 48, 2004.

CHOI, J. C.; PARK, S. J.; GU, B. K.; KIM, Y. J.; CHUNG, S.; KIM, C. H. Effect of the pore size in a 3D bioprinted gelatin scaffold on fibroblast proliferation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 388-395, 2018.

COSTA, S. G. V. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Bioch.**, v.41, p. 483-488, 2006.

COSTA, S. G. V. A.O.; NITSCHKE, M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochem.**, v. 45, p. 1511–1516, 2010.

- COSTA, A. F. S.; ALMEIDA, F. G.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–12, 2017.
- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145-151, 2006.
- CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN JR, M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, p. 403-411, 2004.
- CZSJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN JR, M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.
- DAI, L.; CHENG, T.; DUAN, C.; ZHAO, W.; ZHANG, W.; ZOU, X.; ASPLER, J.; NI, Y. 3D printing using plant-derived cellulose and its derivatives : A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 71–86, 2019.
- DAMIAO, A. O. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com rhamnolipídeos**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA. 74p., 2012.
- DAVEY, M.E.; CAIAZZA, N.C; O'TOOLE, G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 1027-1036, 2003.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R.; J. **Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1675, 2008.
- DEIDEMA, M. H.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Formation of Cellulose Fibrils by Gram-negative Bacteria and Their Role in Bacterial Flocculation. **Arch Mikrobial.**, v. 78, p. 42-51, 1971.
- DEMIR, E; AKÇA, H.; KAYA, B.; BURGUCU, D.; TOKGÜM, O.; TURNA, F.; AKSAKAL, S.; VALES, G.; CREUS, A.; MARCOS, R. Zinc oxide nanoparticles: Genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. **Journal of Hazardous Materials**, v. 264, p. 420–429, 2014.
- DONIO, M. B. S. *et al.* Isolation and characterization of halophilic Bacillus sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 11, p. 876-883, 2013.
- DRIESSEN, M. D.; MUES, S.; VENNEMANN, A.; HELLACK, B.; BANNUSCHER, A.; VIMALAKANTHAN; RIEBELING, C.; OSSIG, R.; WIEMANN, M.; SCHNEKENBURGER, J.; KUHNBUSCH, T. A. J.; RENARD, B.; LUCH, A.; HAASE, A. Proteomic analysis of protein carbonylation: A useful tool to unravel nanoparticle toxicity mechanisms. **Particle and Fibre Toxicology**, v.

12, n. 1, p. 1–18, 2015.

DUFRESNE, A. Nanocellulose : a new ageless bionanomaterial. **Materials Today**, v. 16, n. 6, p. 220–227, 2013.

DUNN, G. A.; ZICHA, D. Dynamics of fibroblast spreading. **Journal of cell science**, v. 108, p. 1239–49, 1995.

DURMAZ, E. N.; ÇULFAZ-EMECEN, P. Z. Cellulose-based membranes via phase inversion using [EMIM]OAc-DMSO mixtures as solvent. **Chemical Engineering Science**, v. 178, p. 93–103, 2018.

ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v. 36, p. 26-36, 2017.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, n. 1, p. 1-9, 1999.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 23, 2, p. 37-42, 2005.

ERTEN, E.; ARSLAN, Y. E. The Great Harmony in Translational Medicine: Biomaterials and Stem Cells. **Cell Biology and Translation Medicine**, 2018.

EVANS, S. J.; CLIFT, M. J. D.; SINGH, N.; MALLIA, J. O.; BURGUM, M.; WILLS, J. W.; WILKINSON, T. S.; JENKINS, G. J. S.; DOAK, S. H. Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 233–241, 2017.

FERREIRA, S. **Caracterização e avaliação da citotoxicidade do extrato hidroetanólico de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. em linhagens de células humanas.** Universidade Federal Do Pará Instituto De Ciências Da Saúde Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas. 2016.

FIECHTER, A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208-217, 1992

FORESTI, M. L.; VAZQUEZ, A.; BOURY, B. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide , metal sulfide and metal nanoparticles : A review of recent advances. **Carbohydrate Polymers**, 2016.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

- GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. J. **Appl Microbiol**, v. 114, p. 373–383, 2013.
- GDANIEC B. G.; BONINI, F.; PRODON, F.; BRASCHLER, T.; KÖHLER, T.; DELVEN, C. V. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid micelles deliver toxic metabolites and antibiotics into *Staphylococcus aureus*. **iScience**, v. 25, 2022.
- GIARDINELLO, F. E.; MCLIMANS, W. F. The Apparent Toxicity of Metallic Materials of Construction and Antifoam Agents for Mammalian Cell Lines. **ASM Journals**, v. 6, n. 1, p. 30–35, 1957.
- GIBRIL, M. E.; HUAN, L.; HAIFENG, L.; DA, L. X.; YUE, Z.; HAN, K.; MUHUO, Y. Reactive extrusion process for the preparation of a high concentration solution of cellulose in ionic liquid for in situ chemical modification. **RSC Advances**, v. 3, n. 4, p. 1021–1024, 2012.
- GODINHO, J. **Hidrogéis de Celulose Bacteriana Incorporados com Frações de Aloe vera**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2014.
- GOLBAMAKI, N.; RASULEV, B.; CASSANO, A.; MARCHESI, R. R.; BENFENATI, E.; LESZCZYNSKI, J.; CRONIN, M. T. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: Review of recent data and discussion of possible mechanisms. **Nanoscale**, v. 7, n. 6, p. 2154–2198, 2015.
- GREGORY, D. A.; TRIPATHI, L.; FRICKER A. T. T.; ASARE, E.; ORLANDO, I.; RAGHAVENDRAN V.; ROY, I. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 145, p. 100623, 2021.
- GUPTA, B. S. H. S. G. Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1823–1828, 2010.
- GUSTAFSSON S, HULTBERG M, FIGUEROA R, RENGEFORS K. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. **Harmful Algae**, v. 8, n. 6, p. 857-863, 2009.
- GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, n.15, p.314-321, 2008
- HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; INFANTE, M.R.; MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnol. Bioeng**, v. 81, p. 316–322, 2003.
- HÄNNINEN, A.; SARLIN, E.; LYYRA, I.; SALPAVAARA, T.; KELLOMÄKI, M.;

- TUUKKANEN, S. Nanocellulose and chitosan based films as low cost , green piezoelectric materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 418–424, 2018.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.
- HOSKOVÁ, M.; JEZDÍK, R.; SCHREIBEROVÁ, O.; CHUDOBA, J.; SÍR, M.; CEJKOVÁ, A.; MASÁKA, J.; JIRKU, V.; REZANKA, T. Structural and physiochemical characterization of rhamnolipids produced by *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 45–51, 2015.
- HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 2013.
- IRON, G. L. **Feridas: Novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ISO 10993-5, I. State-dependent peculiarities of cocaine-induced behavioral sensitization and their possible reasons. **International Journal of Neuroscience**, v. 67, n. 1–4, p. 93–103, 2009.
- JAMES, S. E.; BOOTH, S.; GILBERT, P.; JONES, I.; SHEVCHENKO, R. Clinical approaches to skin regeneration. In: SANTIN, M. (Ed.). *Strategies in regenerative medicine: integrating biology with materials design*. **New York: Springer**, 2009.
- JARVIS, F.G., JOHNSON, M.J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124–4126, 1949.
- JESUS SILVA, D.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel**, v. 70, n. 7, p. 34–52, 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica: texto e atlas*. 13.ed, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2017.
- JOZALA, A. F.; LENCASTRE-NOVAES, L. C.; LOPES, A. M. SANTO-EBINUMA, C.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA, A. J.; GROTTTO, D.; GERENUTTI, M.; CHAUD, M. V. Bacterial nanocellulose production and application. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 5, p. 2063-72, 2016.
- KAMOUN, E. A.; KENAWY, E. R. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced research*. v. 08, p. 217-233, 2017.

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

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Angewandte Chemie - **International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMMER, F.; HEBLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H. P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Polysaccharides II**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KLEMM, D.; SHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561- 1603, 2001.

KRIEGER, N; CAMILIOS NETO, D; MITCHELL DA. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: Ramkrishna Sen. (Org.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **Biosurfactants.**, New York: Springer Science Business media, LCC, Landes Bioscience, v. 672, p. 203-209, 2010.

KUMAR, R. *et al.* Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3948–3962, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Robbins & Cotran **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUNDU, R.; MAHADA P.; CHHIRANG, B.; DAS, B. Cellulose hydrogels: Green and sustainable soft biomaterials. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 100623, 2022.

KUO, C.; CHEN, J. H.; LIOU, B. K.; LEE, C. K.. Food Hydrocolloids Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Food hydrocolloids**, v. 53, p. 98–103, 2016.

LAI, C.; ZHANG, S. J.; WANG, L. Q.; SHENG, L.Y.; ZHOU, Q. Z.; XI, T. F. The relationship between microstructure and *in vivo* degradation of modified bacterial cellulose sponges. **Journal of Materials Chemistry B**. p. 9001–9010, 2015.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n 6, p. 347-351, 2017.

LAN, G. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. **Biochemical engineering journal**, v. 101, p. 44-54, 2015.

LANZA R., LANGER, R.; VACANTI, J. Ethical Issues. In: Lanza, R. Ed. *Principles of tissue engineering*, 3.ed. China, **Academic Press**, p. 1281-1287., 2007.

LEE, B.S.; KIM, E.K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639–647, 2004.

LEONIDA, D. M.; KUMAE, I. **Bionanomaterials for Skin Regeneration.**, SpringerBriefs in Bioengineering, 2016.

LI, M.; ZHAO, Y. Z.; HAO, H.; HAN, W.; FU, X. Theoretical and practical aspects of using fetal fibroblasts for skin regeneration. **Ageing Research Reviews**, v. 36, p. 32–41, 2017.

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, p. 2016.

LIU, J.; LI, Y.; RONG, X.; LIN, W.; ZHANG, T.; WANG, B.; LI, X. B.; JIANG, S.; ZHANG, Q. Application of Crystalline Cellulose Membrane (Veloderm®) on Split-Thickness Skin Graft Donor Sites in Burn or Reconstructive Plastic Surgery Patients. **Journal of Brun Care & Research.**, p. 176–182, 2013.

LIMA, H. L. S; NASCIMENTO, E. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; CASSALES, A. R.; MUNIZ, A. R.; SOUZA FILHO, S. M.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F. *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 using sisal juice - na agroindustry waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 03, p. 671–680, 2017.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN. W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1987.

LONG, X. L.; SHEN, C. S.; HE, N.; ZHANG, G.; MENG, Q. Enhanced rhamnolipids production via efficient foam-control using stop valve as a foam breaker. **Bioresource Technology**, v. p. 2016.

LOPES, M. F. V. S. **Biocompatibilidade de Dispositivos Médicos.** Dissertação Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Lisboa, 2017.

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

LU, Z.; ZHANG, Y.; CHI, Y. Effects of alcohols on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 186, p. 2281–2285, 2011.

MAGALHÃES; L; NITSCHKE, M; Antimicrobial activity of rhamnolipids against *listeria monocytogenes* and their synergistic interation with nisin. **Food Control**, v. 29, p; 137-142, 2013.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MARTSON, M.; VILJANTO, J.; HURME, T.; LAIPPALA, P.; SAUKKO, P. Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An *in vivo* subcutaneous study in the rat. **Biomaterials**, v. 20, p. 1989–1995, 1999.

MATEOS, S. B. Pele descartável. **Indústria brasileira**, v. 44, p. 38-41, 2004.

MATTHYSSE, A. N. N. G. Role of Bacterial Cellulose Fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* Infection. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 2, p. 906–915, 1983.

MELLO, A. P. Q. **Produção direcionada de di-rhamnolipídeo por cultivos de *Pseudomonas PAO1* e desenvolvimento de processo de purificação para obtenção de um único congêneres**. 66f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Londrina/PR, 2019.

MICERA, A.; VIGNETI, E.; PICKLOHLTZ, D.; REICH, R.; PAPPO, O.; BONINI, S.; MAQUART, F. X.; ALOE, L.; LEVI-SCHAFFER, L. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 11, 2001.

MOHAMMAD ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIE, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.

MONTEIRO, A. A. **Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. Tese (Doutorado em Química Orgânica). 118p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2007.

MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3.ed. Porto Alegre: Ed. da autora, p 229., 2016.

MORAES, P. **Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos**. p. 114, 2013.

MORDOR INTELLIGENCE. **Rhamnolipids market – growth trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021 - 2026)**. Mordor intell. (Accessed 17 September 2021 (2021)).

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ Pollut.**, v. 133, ed. 2, p. 183–198, 2005.

NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Hyaluronic acid and chitosan

based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Polímeros**. v. 26, n. 4, p. 360-370, 2016.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J. Bacteriol.**, v. 104, p. 313-322, 1970.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 47, n 4, p. 409-420, 2011.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; **Trends Food Sci. Technol.**, v. 18, p. 252, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 160, p. 2066–2074, 2010.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas-derived* molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 621-630, 2011.

OLIVEIRA, A. C. S. M. **Recuperação e purificação de Rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-HVIIA utilizando melão de cana como substrato.** 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2010.

ORTIZ, A., TERUEL, J. A., ESPUNY, M. J., MARQUÉS, A., MANRESA, A., & ARANDA, F. J. Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 99-107, 2006.

OSHIMA, T; TAGUCHI, S.; OHE, K.; BABA, Y. Phosphorylated bacterial cellulose for adsorption of proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 953-958, 2011.

PANDIT, H. *et al.* Surfactant protein D inhibits HIV-1 infection of target cells via interference with gp120-CD4 interaction and modulates pro-inflammatory cytokine production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

PENERARI, Â. C. D.; COSTA, H. O.; SOUZA, F. C. CASTRO, M.; SILVA, L.; SOUSA NETO, O. M. Avaliação da reposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 4. p. 512-22, 2008.

PANTAZAKI, A. A.; PAPANEOPHYTOU, C. P.; LAMBROPOULOU, D. A. Simultaneous polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids production by *Thermus thermophilus* HB8. **AMB Express**. v. 1, p. 1-13, 2011.

PENTTILÄ, P. A.; IMAI, T.; HEMMING, J.; WILLFÖR, S.; SUGIYAMA, J.

Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose–hemicellulose composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 95–102, 2018.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1277-1286, 2011.

PHANTHONG, P.; REUBROYCHAROEN, P.; HAO, X.; XU, G.; ABUDULA, A.; GUAN, G. Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 1, p. 32–43, 2018.

PIAIA, L. **Incorporação de Aloe vera em membranas de celulose bacteriana afeta a proliferação de fibroblastos e queratinócitos**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Florianópolis. 71f, 2014.

RAMIREZ, I. M.; VAZ, D. A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMAN, M. G. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 1-6, 2016.

RANDHAWA, K.K.S. AND RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid Biosurfactants—Past, Present, and Future Scenario of Global Market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.

RANI, M. U.; APPAIAH, A. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. **Ann Microbiol**, v. 61, p. 781–787, 2011.

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

REDDY, K. S., KHAN, M. Y., ARCHANA, K., REDDY, M. G., HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agente. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 291–299, 2016.

REINKE, J.M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **Eur Surg Res**, v. 49, p. 35-43, 2012.

REVIN, V., LIYASKINA, E.; NAZARKINA, M.; BOGATYREVA, A.; SHCHANKIN, M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–9, 2018.

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

RODRIGUES, A. I. GUDIÑA, E. J. TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their

antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12907, p. 1-9, 2007.

ROGNOLI, E.; WATT, F. M. Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 9, p. 709-722, 2018.

ROMLING, U.; GALPERIN, M. Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits products and functions. **HHS Public Access**, v. 23, n. 9, p. 545–557, 2015.

ROONEY, A. P.; PRICE, N. P. J.; KAREN, J.; RAY, K. J.; KUO, T. M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. **FEMS Microbiol Lett.** v. 295, p. 82-87, 2009.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, 55, n. 1, v. 55, p. 35–58, 1991.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 6.ed. p. 24, 104, 498, 2012.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SAJIDA, M.; Mohd Sajjad Ahmad KHANB, CAMEOTRAC, S. S.; AL-THUBIANI, A. S. Biosurfactants: Potential applications as immunomodulator drugs. **Immunology Letters**. v. 223, p. 71-77, 2020.

SÁNCHEZ, M., TERUEL, J. A., ESPUNY, M. J., MARQUÉS, A., ARANDA, F. J., MANRESA. Modulation of the physical properties of diel-aidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 142, p. 118-127, 2006.

SANTANA FILHO, A. P. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: estudos de produção e de variação da composição de homólogos**. 87p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2009.

SAXENA, I. M.; BROWN, M. R. Biochemistry and Molecular Biology of Cellulose Biosynthesis in Plants: Prospects for Genetic Engineering. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 135–160, 2008.

SERAFICA, G.; MORMINO, R.; OSTER, G.; LENTZ, K.; KOEHLER, K. **Microbial cellulose wound dressing for treating chronic wounds**, USA: US 7704523 B2, 2010.

SETYAWATI, M. I.; CHIEN, L. J.; LEE, C. K. Self-immobilized recombinant *Acetobacter xylinum* for biotransformation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 78–84, 2009.

SHAH, S. R.; AI-BARGI, A. Research Paradigms: Researcher's Worldviews,

Theoretical Frameworks, and Study Designs. **Arab World English Journal**, v. 4, p. 252-264, 2013.

SHARMA, A.; JANSEN, R.; NIMTZ, M.; JOHRI, B.N.; Wray, V. Rhamnolipids from the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. GRP(3) that reduces damping-off disease in Chilli and tomato nurseries. **J. Nat. Prod.** v. 70, p. 941–947, 2007.

SHEZAD, O.; KHAN S.; KHAN, T.; PARK, J. K. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v.82,p.173–180, 2010.

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

SHI, Q. S.; FENG, J.; LI, WEN-RU; ZHOU, G. Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by *gluconacetobacter intermedius* BC-41. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 47, n. 7–8, p. 503–508, 2013.

SHINODA, R.; SAITO, T.; OKITA, Y.; ISOGAI, A. Relationship between length and degree of polymerization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 842–849, 2012.

SHULGA, A.; SOTIROVA, A. V.; SPASOVA, D. I.; GALABOVA, D. N.; KARPENKO, E. Rhamnolipid – Biosurfactant Permeabilizing Effects on Gram-Positive and Gram Negative Bacterial Strains, **Curr Microbiol**, p. 639–644, 2008.

SINGHSA, P. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. **Cellulose**, 2018.

SIQUEIRA, V. L. **Avaliação da Atividade Cicatrizante do Extrato Etanólico da Croton Antisyphiliticus em feridas cutâneas de ratos**. 2019. 92f. Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

SIVASAMY, S.; GANESH, P. K.; SIVAGNANAM, A.; SUNDARASAMY, M.; YESU, B. S.; KARUTHA, P. S. Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production, **Journal of Proteomics**, v.145, p. 112-126, 2016.

SMANIOTTO, P. H. S.; FERREIRA, M. C.; ISAAC, C.; GALLI, R. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Rev. Bras. Cir. Plást.** v. 27 (4): p. 623-26, 2012.

SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE, F.; DÉZIEL., E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. S. SURFACTANTS: From Genes to Applications. **Microbiology monographs**, v. 20, p.2-216, 2011.

SOUZA, S. S; PORTO, L. M. System biology of bacterial cellulose production. **BMC Proceedings**, v. 8, n. 4, p. 7–8, 2014.

SRIPLAI, N.; MONGKOLTHANARUK, W.; EICHHORN, S. J.; PINITSOONTORN, S. Magnetically responsive and flexible bacterial cellulose membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 251–262, 2018.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogen. **Plant Dis.**, v. p. 81, 4–12, 1997.

STOCHERO, I. N.; TORNIEUX, A. A. B. (Org.). **Atualização em cirurgia plástica estética e reconstrutiva**. São Paulo: Santa Isabel. v. 1, p. 901-910, 2006.

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

STOCHERO, I. N.; TORNIEUX, A. A. B. (Org.). **Atualização em cirurgia plástica estética e reconstrutiva**. São Paulo: Santa Isabel. v. 1, p. 901-910, 2006.

SULAEVA, I. *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBURG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, p. 419-431, 2005.

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

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, n. 1, p. 37-46, 2017.

TORIBIO, J.; ESCALANTE, A.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. Rhamnolipid Productions in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Science Technology**, v. 112, p. 1082-1087, 2010.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, D. **Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, p. 5095-5108, 2010.

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.

VENKATARAJAN, S.; SUBBU, S.; ATHIJAYAMANI, A.; MYTHURAJA, R. Mechanical properties of natural cellulose fibers reinforced polymer composites - 2015-2020: A review. **Materialstoday: Proceedings**, v. 47, p. 1017-1024, 2021.

VIEIRA, D. C. M. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde**. Tese do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Fermentações, 2013.

VIRCHOW, R. L. K., *Cellular Pathology: As Based Upon Physiological and Pathological Histology*, 2 ed., London, **John Churchill**, 1860.

VOLOVA, T. G.; PRUDNIKOVA, S. V.; SUKOVATYI, A. G.; SHISHATSKAYA, E. I. Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7417-7428, 2018.

WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 433–443, 2005.

WANG, J. H.; GAO, C.; ZHANG, Y.; WAN, Y. Preparation, and *in vitro* characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 30, p. 214-218, 2010.

WAN, W. K; MILTON, L.; HUTTER, J. L.; GUHADOS, G. Bacterial cellulose and its nanocomposites for biomedical applications. **Cellulose Nanocomposites: Processing, Characterization, and Properties**, v. 938, p. 221-241, 2006.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. **Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery**, 2008.

WILLIAMS, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, v. 35, n. 38, p. 10009–10014, 2014.

WOEHL, M. A. **Membranas biocurativas obtidas a partir de celulose bacteriana incorporadas de hidrocoloides e nanopartículas de prata**. Tese. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Química. Curitiba. 147f, 2014.

WOLFF, K; JOHNSON, R. A. *Dermatologia de Fitzpatrick*. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 1113, 2011.

WOZNIAK-KARCZEWSKA, M.; MYSZKA, K.; SZNAJDROWSKA, A.; SZULC, A.; ZGOLA-GRZESKOWIAK A.; LAWNICZAK, L.; CORVINI, P. F. X.; CHRZANOWSKI, L. Isolation of rhamnolipids-producing cultures from faeces: Influence of interspecies communication on the yield of rhamnolipid congeners. **New Biotechnology**, v. 36, p. 17-25, 2017.

ZHAO, X.; ZHANG, X.; LIU, D. Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health. **Journal of Functional Foods**, p. 86, 2021.

YANG, X. Y.; HUANG, C.; GUO, H. J.; XIONG, L.; LUO, J.; WANG, B.; CHEN, X. F.; LIN, X. Q.; CHEN, X. D. Beneficial Effect of Acetic Acid on the Xylose Utilization and Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Indian J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 268–273, 2014.

ZANOTI, M. D. U. **Membranas de Celulose Bacteriana com anti-inflamatório Ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas**. Tese. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 123f, 2017.

ZHAO, H.; XIA, J.; WANG, J.; YAN, X.; WANG, C.; LEI, T.; XIAN, M.; ZHANG, H. Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources. **Taylor & Francis**. v. 32, n. 2, p. 350-356, 2018.

ZHONG, C.; ZHANG, G.; LIU, M. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Biotechnological Products and Process Engineering**, 2013.

ZHOU; C.; YANG, Z.; XUN, X.; MA, L.; CHEN, Z.; HU, X.; WU, X.; WAN, Y.; AO, H. De novo strategy with engineering a multifunctional bacterial cellulose-based dressing for rapid healing of infected wounds. **Bioactive Materials**, v. 13, p. 212-222, 2022.

4 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE BANCADA POR FERMENTAÇÃO ESTÁTICA EM SUPORTE DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS

Neste capítulo são apresentados resultados obtidos do desenvolvimento de um biorreator de bancada para produção de ramnolipídeos por fermentação estática em suporte de membrana de celulose bacteriana, que resultaram em um depósito de pedido de patente (Anexo A).

4.1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas tensoativas que tendem a diminuir a tensão das interfaces óleo/água e a tensão superficial ar/água, em função da presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos em suas estruturas. Por consequência dos efeitos ambientais tóxicos dos surfactantes de origem química, em sua maioria derivados de petróleo, existe uma grande tendência de substituição pelos surfactantes de origem biológica, os quais apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de alta seletividade e atividade tensoativa, mesmo em extremos de temperaturas e pH (LOVAGLIO, *et al.*, 2015).

Entre os biossurfactantes mais estudados e promissores estão os ramnolipídeos produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Este biossurfactante, além de apresentar excelentes propriedades tensoativas, pode ser obtido em elevadas concentrações e conseqüentemente apresentam alto potencial de exploração comercial. Seu caráter anfipático assegura grande aplicabilidade em quase todos os ramos da indústria moderna, desde a indústria farmacêutica, cosmética e de química fina, até as indústrias alimentícias, agroquímicas e de petróleo (KASKATEPE; YILDIZ, 2016). Embora os ramnolipídeos sejam surfactantes efetivos, o alto custo de produção ainda é um fator limitante para sua aplicação no mercado, dessa forma aumentar a produtividade, bem como a escala de produção para alcançar a área industrial é urgentemente desejado.

A produção clássica de biossurfactantes por fermentação submersa apresenta graves problemas, principalmente causados pela grande

formação de espumas durante as fermentações. A formação de espuma é causada pela presença dos biossurfactantes no meio de cultivo e agravada pelo método de aeração e agitação dos reatores de fermentação submersa. A formação de espuma é um grave problema, pois acarreta em perda de biomassa e nutrientes, diminuindo os índices de produção ou até mesmo inviabilizando o processo. Algumas alternativas para contenção da espuma podem ser aplicadas, como a adição de compostos químicos antiespumantes durante as fermentações. Contudo, estes agentes podem inibir o crescimento celular, diminuir a taxa de transferência de massa, provocar reações inibitórias e efeitos tóxicos ao microrganismo, adicionalmente, podem interferir na separação e purificação do biossurfactante. Outra opção para evitar a formação de espuma é o desenvolvimento de métodos físicos de contenção e recuperação da espuma formada; entretanto, esses métodos podem acarretar a diminuição da eficiência do processo, além de onerarem a produção do biossurfactante (GONG *et al.*, 2021; LEE; KIM, 2004; YEH *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Deste modo, estas estratégias (antiespumantes e métodos físicos de contenção e recuperação da espuma) apresentam um elevado custo e não são completamente eficientes, o que tem contribuído para falta de processos de produção em escala comercial e resulta em um baixíssimo número de processos industriais de obtenção de ramnolipídeos. Baseado nessas adversidades, métodos inovadores para produção de ramnolipídeos vem sendo estudados.

Como já relatado em trabalho anterior (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020) o grupo desenvolveu um processo fermentativo eficaz e bem caracterizado, utilizando um meio simples e com custo de produção baixo para produção de ramnolipídeos através da fermentação submersa estática em suporte de membrana de celulose bacteriana com a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A mistura de ramnolipídeos produzida apresentou boas propriedades físico-químicas, avaliadas pelo índice de emulsificação e concentração micelar crítica, assim como uma mistura de congêneres com uma quantidade maior de di-ramnolipídeos (mais de 95%). Também foi abordado a influência da variação da espessura da camada líquida durante a fermentação na produção de ramnolipídeos, onde volumes mais baixos de meio foram mais eficazes

provavelmente pela difusão de oxigênio. Outro fator que influenciou a elevação da produção de ramnolipídeos foi a adição de indutores como extrato aquoso de torta de milho.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protótipo de biorreator de bancada para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentações estáticas e com potencial de escalonamento. As membranas de celulose bacteriana são utilizadas como suporte para o crescimento da bactéria e a produção de tensoativo. Este processo traz vantagens como a ausência da formação de espumas e redução dos custos de produção, já que não há gastos excedente de energia para aeração e agitação dos cultivos. Outra vantagem é a menor complexidade para separação dos ramnolipídeos, já que não utiliza compostos hidrofóbicos, como antiespumantes a base de silicone e óleos vegetais. Por fim, existe ainda a possibilidade de reutilização da celulose bacteriana por diversas vezes. O atual capítulo também trata da validação do protótipo em processos de produção, extração, quantificação, caracterização das propriedades tensoativas e determinação estrutural dos ramnolipídeos produzidos pela referida tecnologia fermentativa. Os resultados obtidos apontam para sólida possibilidade de ampliação de escala por empilhamento e aumento de diâmetro das “unidades de cultivo”.

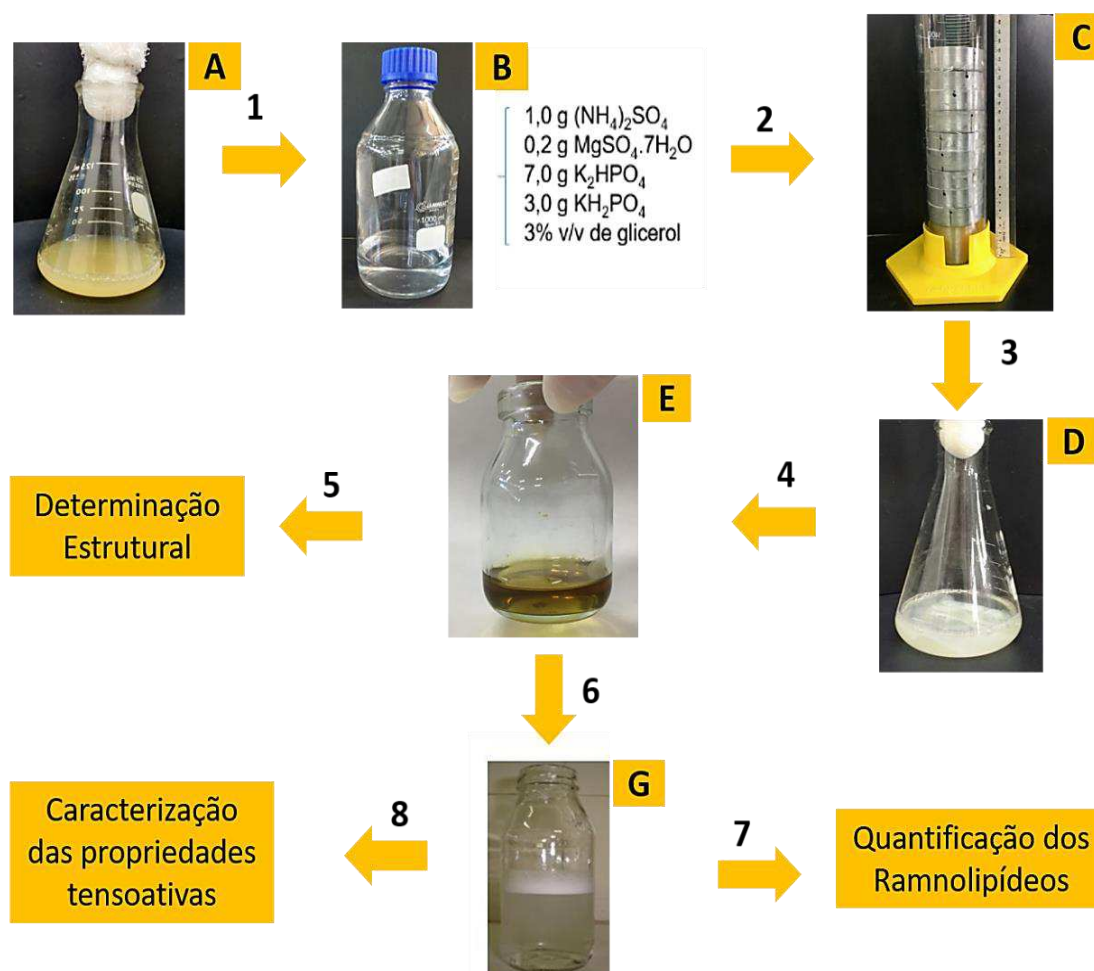
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico são apresentadas as metodologias empregadas, e descritas as técnicas utilizadas para a condução e acompanhamento dos experimentos, realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia, no Laboratório de Central Multiusuário e Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

A metodologia experimental está esquematizada no fluxograma da Figura 7. O processo 1 é caracterizado pelo inóculo do meio de cultivo (B) a partir do pré-inóculo (A). Na sequência, o meio de cultivo inoculado foi transferido para unidades de cultivo inseridas dentro de um tubo cilíndrico aberto na parte de cima (e coberta com tampa acrílica) (processo 2 – produto C). O produto C adicionado de meio de cultivo inoculado foi incubado. O processo (3) caracteriza-

se pela extração aquosa, seguida da retirada das células bacterianas por centrifugação, o que resulta no extrato aquoso, livre de células (D). D é submetido ao processo de extração orgânica (4). Os extratos orgânicos são recuperados em funil de separação, e em seguida submetidos a evaporador rotatório obtendo-se assim um extrato orgânico concentrado de ramnolipídeos (E). O produto E pode ser submetido a determinação estrutural e caracterização das misturas de congêneres de ramnolipídeos (5) ou a dissolução em água (6) obtendo-se (G). G pode ser utilizado para os processos (7) quantificação indireta dos ramnolipídeos e (8) caracterização das propriedades tensoativas.

Figura 7 - Fluxograma dos experimentos.



Fonte: O próprio autor.

4.2.1 Produção de Celulose Bacteriana (CB)

4.2.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a cepa de *Komagataeibacter xylinus* ATCC23760 de procedência da fundação André Toselho, Campinas, São Paulo (Brasil). A cepa foi estocada em glicerol 20% a - 80 °C em tubos de fundo cônico tipo eppendorf.

4.2.1.2 Preparo do pré-Inóculo

Os pré-inóculos foram realizados em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de meio Hestrin-Schramm's (Tabela 5), em uma proporção de 5% (v/v) da solução estoque de *Komagataeibacter xylinus* ATCC23760. Incubados em agitador orbital (Marconi, MA 420), a 28 °C por 48 h sob agitação de 110 rpm.

Tabela 5 - Composição do meio Hestrin-Schramm's (HS).

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)	Fabricantes
Extrato de Levedura	5,00	Reatec
Peptona Bacteriológica	5,00	Acumedia
Ácido cítrico	1,15	Synth
Fosfato de Sódio Monobásico	5,00	Neon
Glucose	20,00	Inlab

4.2.1.3 Inóculo

O pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 720 mL de meio Hestrin-Schramm's, homogeneizados e transferidos para bandejas. A produção de membranas de celulose bacteriana foi realizada em condições estáticas a 28 °C por 10 dias.

4.2.1.4 Obtenção da celulose bacteriana (CB)

Após o período de fermentação, as membranas de celulose bacteriana foram retiradas do meio com uma pinça, lavadas com NaOH 0,1 M à 90 °C por 1 hora, posteriormente lavadas com água destilada até pH 7 retirando possíveis resíduos de meio de cultivo e obtendo a membrana de celulose bacteriana pura.

4.2.2 Produção de Ramnolipídeos (RL)

4.2.2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, isolada originalmente na Austrália, a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, apresenta o genoma sequenciado, publicado (STOVER *et al.*, 2000) e muito bem anotado. A cepa foi mantida em meio líquido Luria-Bertani (Tabela 6).

Tabela 6 - Composição do meio Luria-Bertani (LB).

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)	Fabricantes
Cloreto de Sódio	10	Synth
Triptona	5	Acumedia
Extrato de Levedura	5	Reatec

4.2.2.2 Preparo do pré-Inóculo

Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculados com 3-5 colônias de PAO1 proveniente de placas de meio LA [LB adicionados de 1,5% (m/v) de ágar] e incubados por 12-16 h a 37 °C/200 rpm. Os inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB, inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2% (v/v) e incubados, em agitador orbital, a 37 °C

por 5-6 h sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (D.O. 600 nm), e utilizado como inóculo quando a D.O. 600 nm encontrar-se entre 0,6 e 0,8.

4.2.2.3 Fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana (FSbE-CB)

Os ensaios para FSbE-CB foram realizados em suportes cilíndricos de alumínio de 100 mm de diâmetro, suspensos de forma vertical e inseridos dentro de um tubo cilíndrico aberto na parte de cima e contendo um apoio de sustentação na base. Os 10 suportes cilíndricos de alumínio continham 1 membrana de celulose (CB) úmida (GOELZER *et al.*, 2009). Os suportes de celulose bacteriana foram esterilizados por 20 min, a 121 °C, resfriadas e inoculadas em uma proporção de 2% de volume de inóculo em volume de meio de cultivo. Neste meio de cultivo continha solução de sais (Tabela 7) adicionada de glicerol 3 a 6% (v/v).

Tabela 7 - Composição do meio de sais (MSM).

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)	Fabricantes
Fosfato de Potássio Monobásico	3,0	Nuclear
Fosfato de Potássio Dibásico	7,0	Nuclear
Sulfato de Magnésio	0,2	Synth
Sulfato de Amônio	1,0	Biotec

O volume total de meio de cultivo inoculado utilizado por suporte de celulose bacteriana foi de 5 mL, então o biorreator foi incubado em estufa bacteriológica a 37 °C.

4.2.2.4 Interrupção do cultivo

Os cultivos foram interrompidos após 9 dias, centrifugados a 4.500 rpm a 25 °C por 20 minutos, para remoção da biomassa e assim reservado o sobrenadante livre de células.

4.2.2.5 Quantificação dos ramnolipídeos

Uma amostra do sobrenadante livre de células foi submetida à extração com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:1) em rotaevaporador e assim obtidos os ramnolipídeos recuperados na fração orgânica. Os ramnolipídeos recuperados foram solubilizados em água destilada e a quantificação indireta dos ramnolipídeos foi feita pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) utilizando uma curva padrão com ramnose.

4.2.2.6 Preparado do extrato bruto de ramnolipídeos

Os sobrenadantes livres de células foram submetidos à precipitação ácida dos ramnolipídeos, acidificados com solução de HCl até pH 2 e incubados a 5 °C por 5 dias. Então submetidos a extração com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) e a fração orgânica evaporada a 60 °C em rotaevaporador, centrifugado a 4.500 rpm a 25 °C por 20 minutos. Os extratos orgânicos foram então solubilizados em água destilada, congelados e liofilizados, dando origem ao extrato bruto de ramnolipídeos. As soluções aquosas do extrato bruto tiveram o pH ajustado para 6 (com solução de NaOH) e foram então submetidas aos métodos de caracterização físico-química e estrutural.

4.2.3 Caracterizações das propriedades físico-químicas e estruturais dos Ramnolipídeos

4.2.3.1 Determinação do índice de emulsificação (E)

O índice de emulsificação (E) dos ramnolipídeos foi realizado a partir do extrato bruto obtido e solubilizado em água destilada (item 4.2.2.6). Foi

determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio com tampa de rosca, foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, tolueno, gasolina e diesel), posteriormente, foi adicionado 4 mL de solução aquosa de ramnolipídeos. Cada tubo foi então submetido à agitação em vórtex (rotação máxima) por 2 minutos. O índice (E) foi determinado de acordo com a equação abaixo. As medidas foram realizadas após 24 h e 720 h.

$$E = \text{altura da camada emulsionada (cm)} \times 100 / \text{altura total do líquido (cm)}$$

4.2.3.2 Determinação da tensão superficial (TS)

A medida da tensão superficial dos ramnolipídeos foi realizado a partir do extrato bruto obtido e solubilizado em água destilada (item 4.2.2.6), utilizando-se um tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12 (Hamburgo, Alemanha). As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força adicional exercida sobre o anel quando a lâmina do líquido se rompe dá a medida da tensão superficial (CAMILIOS NETO *et al.*, 2009). As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se a tensão superficial da água destilada.

4.2.3.3 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A determinação da CMC, segundo técnica descrita por Sheppard e Mulligan (1987). Foi realizada medindo-se a tensão superficial através de diluições sucessivas (com água destilada) dos ramnolipídeos foi realizado a partir do extrato bruto obtido e solubilizado em água destilada (item 4.2.2.6). Dessa forma, foi construído um gráfico plotando-se a tensão superficial medida contra a concentração de ramnolipídeos, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de tensão superficial foram

determinadas até que os valores obtidos se aproximassem da tensão superficial da água destilada (70-72 mN/m).

4.2.3.4 Cromatografia Líquida em Camada Delgada (CCD)

Os ramnolipídeos recuperados na fração orgânica solubilizada em metanol foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) sobre sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, 20x20cm), sendo o eluente composto por uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético (65:15:2). A presença dos ramnolipídeos foi identificada com a utilização de revelador específico para carboidrato, orcinol aquecido a 100 °C por 5 minutos (SKISPISKI, 1975).

4.2.3.5 Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana e espectrometria de massas

As amostras foram analisadas em Espectrômetro de Massas LC-QTOF, em modo negativo, marca Bruker modelo Compact. As amostras foram extraídas como descrito no item 4.2.2 e solubilizadas em metanol. As condições de análise foram: energia do capilar de 2,45 kV, e energia do cone de 43 V. Para aquisição dos espectros foi utilizada uma faixa de m/z de 200 a 800. As abundâncias relativas (%) da mistura de ramnolipídeos foram calculadas pela integração da intensidade relativa de seus correspondentes íons pseudomoleculares.

4.2.3.6 Análise estatística

As determinações das diferenças estatísticas foram realizadas por ANOVA simples (One-Way ANOVA) seguida de teste de Tukey (p <0,05) utilizando programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA-500.288, version 5.0).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Protótipo de Biorreator de Escala de Bancada para Produção de Ramnolipídeos

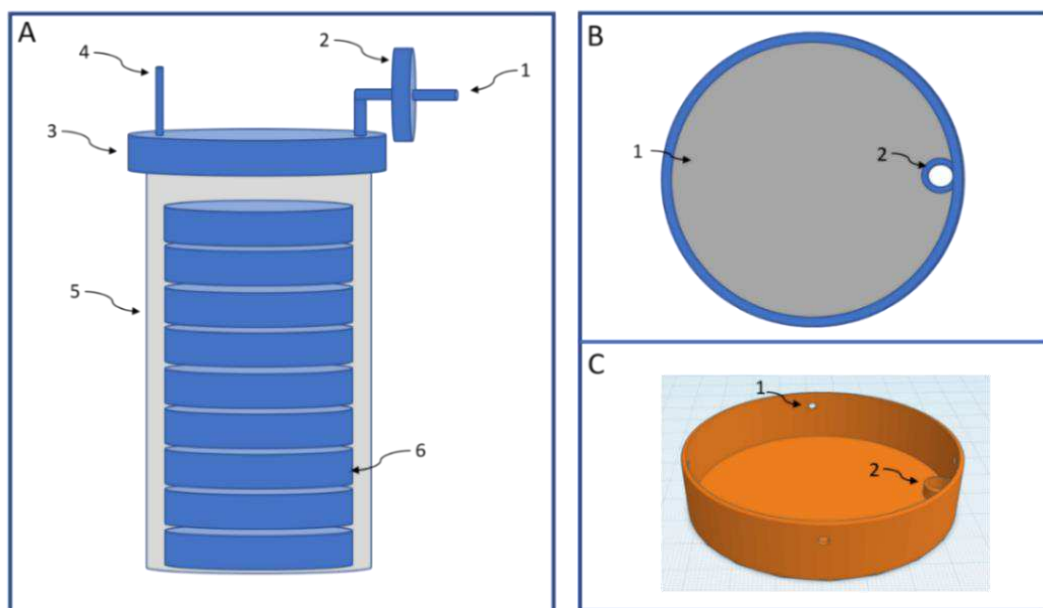
Em trabalho anterior foi apresentado um processo fermentativo alternativo e inovador para produção de ramnolipídeos com a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, através da fermentação submersa estática em suporte de membrana de celulose bacteriana. Estudos preliminares foram realizados utilizando *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 e PAO1, e ao comparar a produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estática utilizando membranas de celulose bacteriana (FSbE-MCB) apresentaram resultados muito promissores, quando comparados aos outros dois processos de produção de ramnolipídeos [i.e., fermentação submersa (FSb) e fermentação submersa estática (FSbE)], a utilização de membranas de celulose bacteriana apresentou valores de produção até 4 vezes superior, indicando a viabilidade do sistema para qualquer umas das cepas testadas. A membrana de celulose bacteriana mantém o cultivo constantemente úmido, e provavelmente auxilia na difusão dos nutrientes do meio para as células bacterianas melhorando a conversão do glicerol em ramnolipídeos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; 2020).

Embora os ramnolipídeos apresentem uma excelente aceitabilidade ecológica, sejam biodegradáveis, naturais e apresentem elevada performance tensoativa (ELSHIKH *et al.*, 2017; LONG *et al.*, 2016; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011), o alto custo de produção ainda é um fator limitante para aplicação no mercado, dessa forma aumentar a produtividade, bem como a escala de produção para alcançar a área industrial é urgentemente desejado (COSTA, 2010; LOVAGLIO, 2011; MOHANTY *et al.*, 2021; VARJANI *et al.*, 2021).

Deste modo, no presente trabalho desenvolveu-se um protótipo de biorreator de bancada para produção de ramnolipídeos por fermentações estáticas, este tipo de processo evita a formação de espumas, um problema dos biorreatores usuais quando utilizados para produção de biossurfactantes (CAMILIOS NETO *et al.*, 2008; GONG *et al.*, 2021; GUERRA-SANTOS; KAPPELI; FIECHTER, 1984; KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010;

KRONEMBERGER *et al.*, 2008; RAMÍREZ *et al.*, 2016). Apresentamos um processo alternativo para produção de ramnolipídeos que não requer agitação e aeração forçada. Este processo é potencialmente mais econômico, reduzindo a necessidade de energia e a formação de espuma. Foi baseado em cultivo estático utilizando membranas de celulose bacteriana como suporte, o cultivo foi executado em uma fina camada líquida de meio cobrindo a membrana de celulose bacteriana, que pode ser reutilizado várias vezes. O presente processo abre novas alternativas para estudos sobre produção de ramnolipídeos tornando-a mais viável. A Figura 8 mostra o modelo esquemático com unidades de cultivo cilíndricas empilhadas dentro do reator.

Figura 8 - Modelo esquemático de protótipo de biorreator de escala e bancada para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentações estáticas utilizando como suporte de celulose bacteriana.



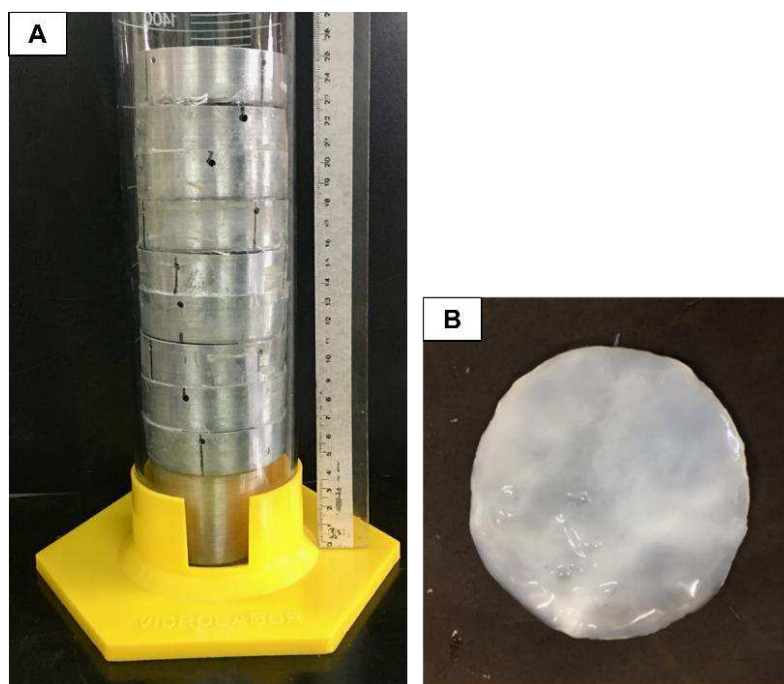
Fonte: O próprio autor.

Na Figura 8A pode ser visto o modelo esquemático desenvolvido do protótipo de biorreator, onde: (1) entrada para aeração forçada; (2) unidade filtrante para tornar o ar de entrada livre de microrganismos; (3) tampa do biorreator; (4) saída de ar; (5) cilindro externo do reator e (6) unidades de cultivo. Os detalhes das unidades de cultivo podem ser vistos: na Figura 8B - vista superior - (1) membrana de celulose bacteriana e (2) dreno com regulagem de

altura de leito de cultivo; e na Figura 8C - vista lateral inclinada – (1) orifício de fixação e (2) visão lateral do dreno.

A Figura 9A mostra o protótipo de biorreator de bancada, com unidades de cultivo cilíndricas de alumínio empilhadas dentro do cilindro de vidro aberto na parte superior e com uma base plástica na parte inferior. É possível ver uma membrana de celulose bacteriana utilizada para recobrir as unidades de cultivo (Figura 9B).

Figura 9 - Protótipo de biorreator de escala de bancada para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentações estáticas utilizando como suportes de celulose bacteriana.



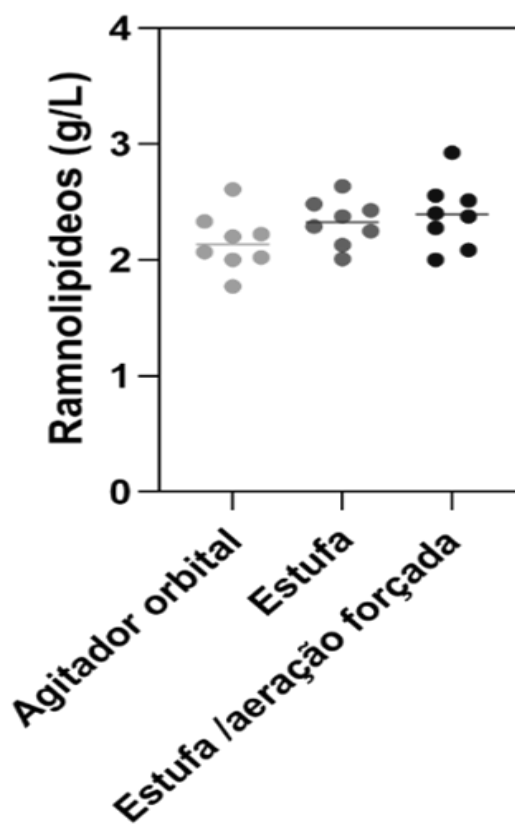
Fonte: O próprio autor.

4.3.2 Produção de Ramnolipídeos em Diferentes Processos de Incubação

Após o desenvolvimento do protótipo de biorreator, este foi submetido à experimentos de produção de ramnolipídeos, onde avaliou-se três diferentes sistemas de incubação (Figura 10): (1) cultivo em agitador orbital (utilizado sem agitação) com controle de temperatura e circulação de ar; (2) cultivo em estufa bacteriológica (sem circulação de ar); (3) cultivo em estufa

bacteriológica com sistema de aeração forçada no biorreator 1 hora por dia durante o período de fermentação (vazão $8 \pm 0,5$ L/min/Inalar Compact).

Figura 10 - Produção de ramnolipídeos em biorreator em três diferentes sistemas de incubação.



Comparação da produção de ramnolipídeos em protótipo de biorreator por diferentes incubações. Cada círculo representa a média de replicatas técnicas de diferentes unidades de cultivo. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. A análise de ANOVA seguida de teste de Tukey indicou que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sistemas avaliados.

A comparação da produção de ramnolipídeos utilizando diferentes sistemas de incubação não apresentou diferença estatística em biorreator através do empilhamento das unidades de cultivo. Dessa forma, os experimentos indicaram que não há necessidade da utilização de sistema de aeração forçada ou agitação durante o processo, o que diminui consideravelmente os custos obtidos na forma clássica de produção (ASSHIFA *et al.*, 2017; BENINCASA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2020), tornando o processo ainda mais viável.

O presente processo de cultivo evita a formação de espuma durante a produção, uma dificuldade reconhecida ao aumentar a escala de produção do biossurfactante (CAMILIOS NETO *et al.*, 2008; CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; KRIEGER *et al.*, 2010) e apresenta ainda a vantagem de reduzir os gastos com aeração e agitação forçada (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020; GEORGE; JAYACHANDRAN, 2013; GUNTHER *et al.*, 2005; RANDHAWA; RAHMAN, 2014;).

4.3.3 Utilização de Indutor para Produção de Ramnolipídeos em Diferentes Processos de Incubação

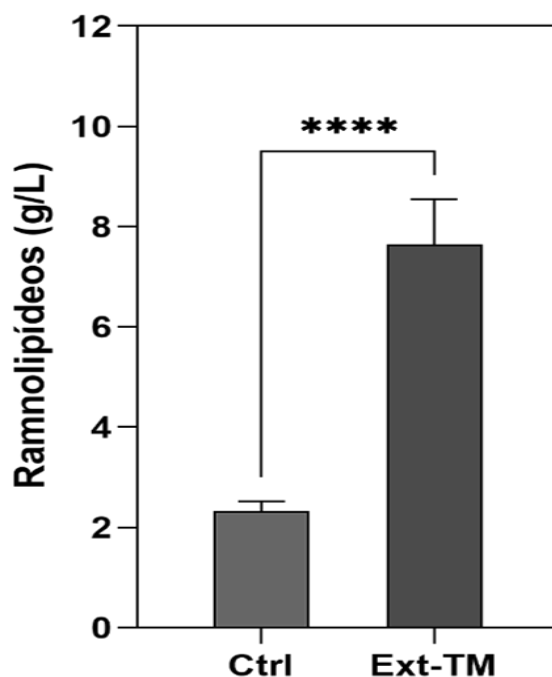
A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS *et al.*, 2016), geralmente a produção por *Pseudomonas aeruginosa* é induzida por óleos vegetais (BENINCASA, *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2006; LINHARDT *et al.*, 1989; WEI *et al.*, 2005) e hidrocarbonetos (ITOH *et al.*, 1971; RASHEDI *et al.*, 2005; SANTA ANNA *et al.*, 2002; WU & JU, 1998), porém as características inerentes ao óleo tornam os processos de separação mais difíceis e onerosos, adicionando mais etapas e dificuldades na extração e purificação dos ramnolipídeos do meio de cultivo, o que motiva a produção a partir de substratos solúveis em água e o desenvolvimento de novas técnicas para auxiliar no aumento da produção.

Dadas as desvantagens de substratos hidrofóbicos e com intuito de se aumentar a produção de ramnolipídeos optou-se pela utilização de um extrato aquoso de torta de milho como indutor da produção de ramnolipídeos (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; CONCEIÇÃO *et al.*, 2020). A torta de milho, além de ser utilizada como fonte de carbono, também pode servir como fonte de nitrogênio (Anexo B – composição centesimal da torta de milho). A extração aquosa a quente da torta de milho resulta em extrato aquoso rico em nutrientes que se assemelha à milhocina ou água de maceração de milho (do inglês, *corn steep liquor*). A milhocina é um subproduto do milho, um resíduo gerado pela indústria de beneficiamento de milho, que contém grande quantidade de matéria orgânica, nitrogênio, aminoácidos entre outros (ABIMILHO, 2018).

A Figura 11 mostra o efeito da suplementação do meio de cultivo com extrato aquoso de torta de milho (na proporção de 1:1 v/v, extrato aquoso

de torta de milho:meio de sais), como suplemento indutor de produção, essa adição promoveu um incremento significativo de 4 vezes na produção de ramnolipídeos. Assim, quando utilizado no processo este indutor pode trazer vantagens no processo de produção.

Figura 11 - Produção de ramnolipídeos com a utilização de extrato aquoso de torta de milho como suplemento indutor.



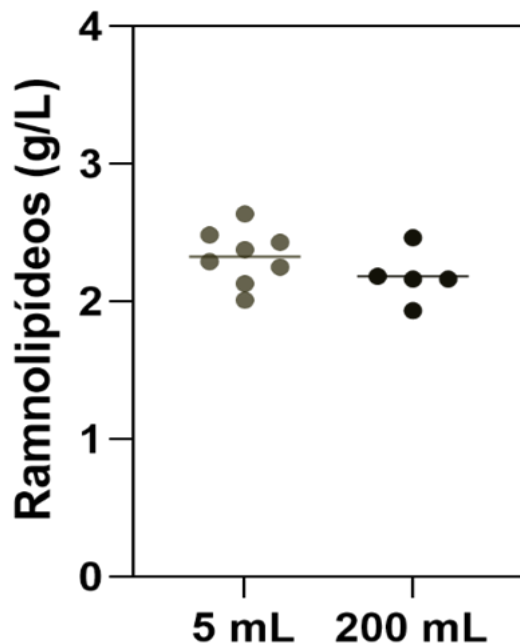
Ctrl, cultivos controles sem adição de extrato aquoso de torta de milho. Ext-TM cultivos com adição de suplemento indutor de extrato aquoso de torta de milho. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. **** Diferença estatística em teste de Tukey, p-valor $<0,001$.

4.3.4 Ampliação da Escala de Produção de Ramnolipídeos

Foram exploradas alterações na escala de produção de ramnolipídeos em biorreator, assim foi testada verticalmente (empilhamento das unidades de cultivo) e horizontalmente (aumento da área de base das unidades de cultivo e consequente aumento de volume de meio). A Figura 12 mostra que a produção de ramnolipídeos não sofreu variação significativa, quando o volume de meio foi aumentado 40 vezes, de 5 mL por unidade de cultivo para 200 mL utilizando bandejas. Dessa forma, os resultados obtidos apontam para sólida

possibilidade de ampliação de escala por empilhamento, assim como pelo aumento de diâmetro das “unidades de cultivo”.

Figura 12 - Produção de ramnolipídeos em biorreator com 5 mL e 200 mL por unidade de cultivo.



Comparação da produção de ramnolipídeos com escalonamento. Cada círculo representa a média de replicatas técnicas de diferentes unidades de cultivo. Os resultados são apresentados como médias de pelo menos triplicatas \pm desvio padrão. Teste de Tukey indicou que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sistemas avaliados.

Os principais modelos desenvolvidos e descritos na literatura de reatores para a produção do biossurfactante, são baseados em fermentação submersa (ASSHIFA *et al.*, 2017; BENINCASA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2020), e enfrentam problema severo com a formação de espuma, em que os processos são conduzidos com agitação e aeração forçada, assim, quando o biossurfactante começa a ser produzido, grandes quantidades de espuma são formadas, e há uma tendência das células do microrganismo produtor acumularem-se nesta espuma. Assim, se a formação da espuma não for controlada, a fermentação fica altamente prejudicada, pois junto com a espuma, que sai do reator, há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, reduzindo a produtividade, ou até mesmo inviabilizando a fermentação (CAMILIOS NETO *et al.*, 2008; KRIEGER; CAMILIOS-NETO;

MITCHELL, 2010; RAMÍREZ *et al.*, 2016). Com isso, a eficiência da estratégia de controle de espuma é essencial para garantir a viabilidade do processo, além de gerar dificuldades operacionais (KRIEGER; CAMILIOS-NETO; MITCHELL, 2010).

4.3.5 Caracterização das Propriedades Físico-químicas e Estruturais dos Ramnolipídeos (RL)

Para avaliar as propriedades físico-químicas do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, foi utilizado solução aquosa do extrato bruto orgânico de ramnolipídeos (item 4.2.2.6) e foram definidos a concentração micelar crítica (CMC) e o índice de emulsificação (E), e realizado a determinação estrutural.

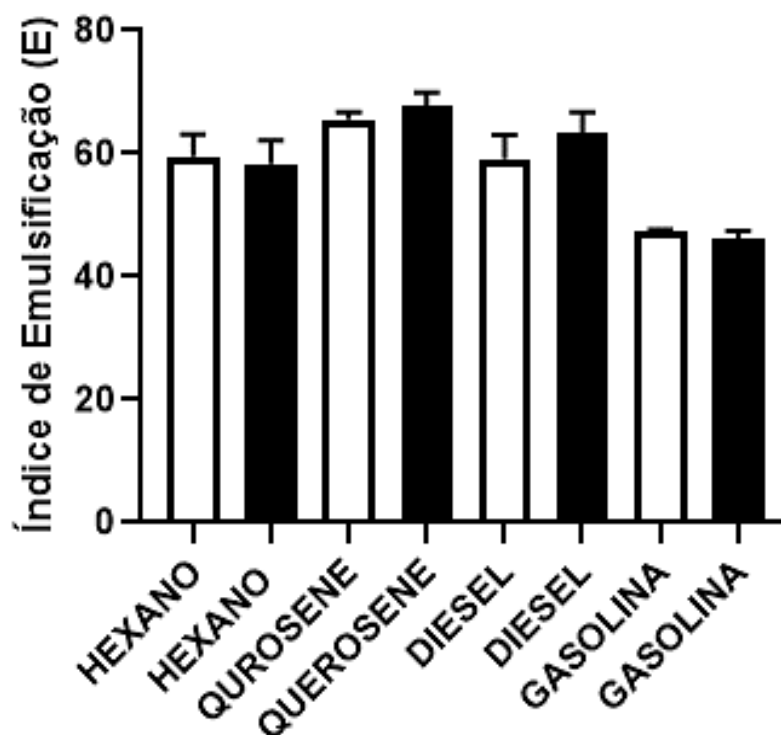
4.3.5.1 Índice de emulsificação (E)

O índice de emulsificação (E) é uma das formas utilizadas para caracterizar o poder emulsificante de um surfactante, avaliam a capacidade dos biossurfactantes produzidos em emulsificar compostos insolúveis, quanto maior o índice de emulsificação, maior a atividade (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008; SOUZA, 2007). Um critério obedecido para ser considerado como bom emulsificante, é a capacidade de formar emulsão com o hidrocarboneto e essa se manter acima de 50% por 24 horas ou mais (BATISTA *et al.*, 2006; COOPER; GOLDENBERG, 1987; WILLUMSEN; KARLON, 1997).

A Figura 13 mostra soluções aquosas da mistura de ramnolipídeos, com concentrações de 0,1 e 0,5 g/%, avaliadas em 24 horas (E_{24}). Na Figura 14 observa-se que todas as amostras foram capazes de manter a emulsão após 24 horas, confirmando a boa ação emulsificante dos ramnolipídeos produzidos. O E_{24} foi melhor tanto para o querosene em ambas as concentrações quanto para o óleo diesel na maior concentração, sendo superior a 65% e com uma leve diminuição do E_{24} para o óleo diesel foi observada na concentração de ramnolipídeos de 0,1 g/%. Seguido para hexano que ficou um pouco mais de 60% para ambas as concentrações do biossurfactante. Enquanto os menores E_{24} obtidos foram para gasolina, próximo

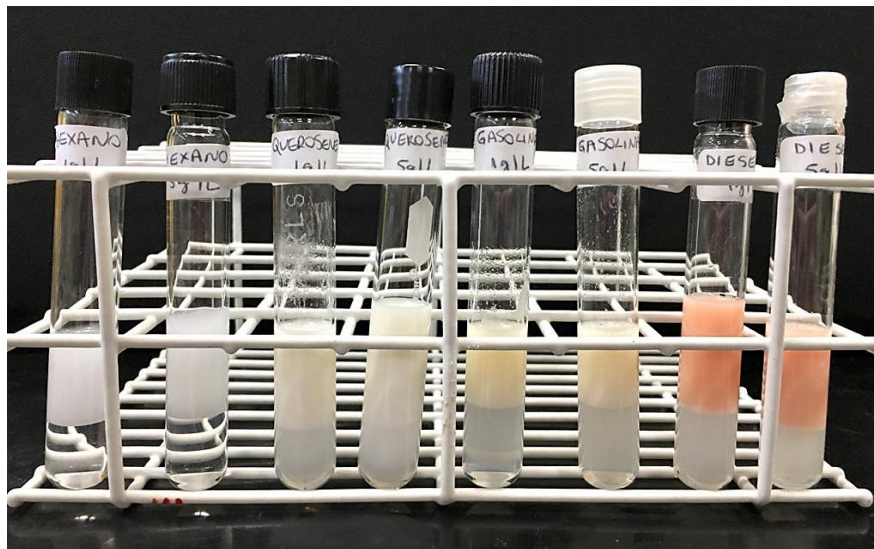
de 50% para a concentração de 0,1 g/% e aproximadamente 45% para a concentração de 0,5 g/%.

Figura 13 - Índice de emulsificação (E) frente a diferentes hidrocarbonetos, de ramnolipídeos por cultivo estático com suporte de celulose bacteriana em reator.



Barras brancas concentração de ramnolipídeos 0,1 g/% e barras pretas concentração de ramnolipídeos 0,5 g%. Valores de médias obtidas a partir de triplicatas \pm desvio padrão.

Figura 14 - Teste de emulsificação frente a diferentes hidrocarbonetos.



Teste para hexano, querosene, gasolina e diesel, nas concentrações de 0,1g/% e 0,5 g/%, respectivamente.

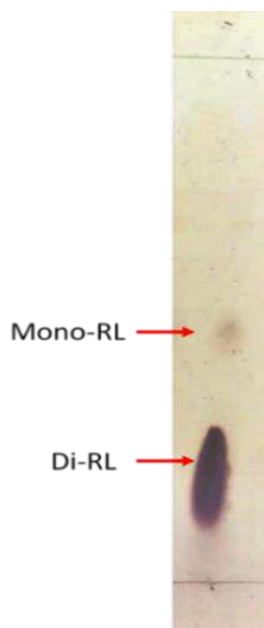
Vários estudos abordam a capacidade dos biossurfactantes formarem emulsões estáveis por 24 horas. Misturas de ramnolipídeos produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 apresentaram resultados semelhantes com E_{24} de 83% para gasolina, 73% para óleo diesel e 44% para querosene, por cultivos em estado sólido (CAMILIOS NETO *et al.*, 2009; MEIRA 2007) e cultivos submersos (MONTEIRO *et al.*, 2007), ambos utilizando glicerol como fonte de carbono. Índices de emulsificação (E) entre 65% para o querosene com ramnolipídeos produzidos de ramnolipídeos obtidos por cultivos submersos utilizando glicerol como fonte de carbono (SOUSA *et al.*, 2014). A mistura de ramnolipídeos obtidas por fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana apresentou bom poder emulsificante e encontra-se dentro da média dos resultados obtidos na literatura. O presente resultado sugere que os ramnolipídeos obtidos por esta tecnologia fermentativa podem substituir os obtidos pelos processos usuais sem nenhuma perda da propriedade tensoativa.

4.3.5.2 Determinação da tensão superficial (TS) e concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) é outro parâmetro importante para avaliação da eficiência de surfactantes. Quanto mais eficiente for este, menor será a CMC. A CMC dos ramnolipídeos obtidos pelo presente processo foi determinada em função da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas de solução aquosa do extrato orgânico concentrado de ramnolipídeos. Construindo-se um gráfico da tensão superficial medida contra a concentração de ramnolipídeos, obteve-se a CMC, que corresponde ao ponto central de inflexão da curva (CAMILIOS NETO, 2010; COOPER, 1986; HERYANI, PUTRA, 2017).

Observa-se que a tensão superficial da água diminuiu de 72 mN/m para aproximadamente 32 mN/m quando se empregou uma concentração de ramnolipídeos de 41,16 mg/L (Figura 15), valor semelhante a valores encontrados por outros autores (CAMILIOS NETO, 2010; RADZUAN *et al.* 2017, 2018). Sousa *et al.* (2014) mostraram que *P. aeruginosa* MSIC02 cultivada em meio com glicerol bruto que reduziu a tensão superficial para 29,2 mN/m, Ma e colaboradores (2016) constataram que o ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* DN1 reduziu a tensão para 25,88 mN/m. Ao comparar os resultados obtidos com o surfactante de origem química mais utilizado na indústria, o dodecil-sulfato de sódio (SDS) possui o CMC em torno de 2033-2890 mg/L e redução de 72 mN/m para 37 mN/m (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013), demonstram que os ramnolipídeos produzidos apresentam maior eficiência nesses parâmetros. Em linhas gerais, a mistura de ramnolipídeos obtidas no presente processo apresentou uma CMC que se enquadra com os melhores resultados de CMC para ramnolipídeos encontrados na literatura.

Figura 16 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos ramnolipídeos produzidos por cultivo estático com suporte de celulose bacteriana em reator.



Extrato bruto contendo ramnolipídeos de cultivos submerso. RL1, mono-ramnolipídeos e RL2 di-ramnolipídeos.

4.3.5.4 Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por espectrometria de massas

Através da espectrometria de massas foi determinado quais os homólogos produzidos no presente processo e foi possível determinar a quantificação da abundância relativa de cada congêneres presente na mistura de ramnolipídeos.

O processo permitiu a produção de congêneres de ramnolipídeos com duas moléculas de ramnose, com 98,4% de di-ramnolipídeos (Tabela 8), o que pode ser uma grande vantagem na obtenção de estrutura única de maior abundância, neste caso Rha-Rha-C₁₀-C₁₀. A literatura menciona diferentes proporções na obtenção dos congêneres, com relatos de di-ramnolipídeos para 64,7% utilizando *P. aeruginosa* PA1 (KRONENBERGER, 2007), 34,32% utilizando *B. kururiensis* LMM21 e 86,51% utilizando *P. aeruginosa* PAO1 (MARIANO, 2012). A Figura 17 mostra as estruturas dos

principais congêneres obtidos com o presente processo de produção com o reator.

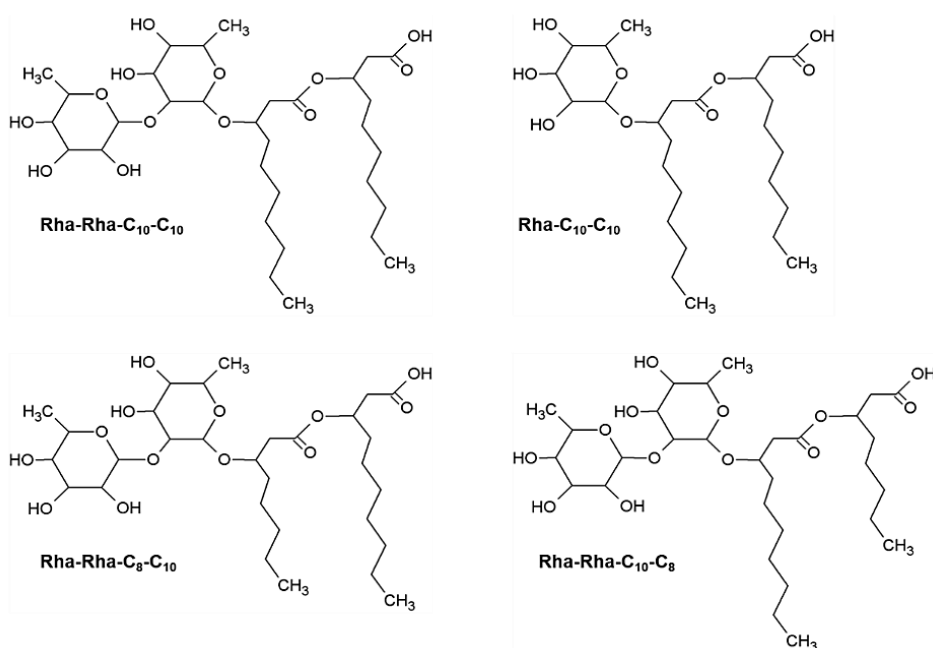
Tabela 8 - Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos com biorreator por fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana.

Homólogos	[M-H] ^a	Massa Molar	Porcentagem m Relativa	Porcentagem Total
Mono-ramnolipídeos				1,6
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	503.2974	504	1,6	
Di-ramnolipídeos				98,4
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	649.3483		74,4	
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	621.3225 ^b	622	15	
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈				
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	675.3584 ^b	676	4	
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}				
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	677.3778 ^b	678	4,8	
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂				

^a Aduto

^b Isômeros

Figura 17 - Principais congêneres de ramnolipídeos produzidos com biorreator por fermentação submersa estática em suporte de membranas de celulose bacteriana.



Estruturas Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-Rha-C₈-C₁₀ e Rha-Rha-C₁₀-C₈.

A predominância de di-ramnolipídeos tem sido apresentada por diversos autores a partir de diferentes linhagens de *Pseudomonas* sp. O conteúdo di-RL apresentado aqui é superior aos relatos anteriores, *P. aeruginosa* YM4 (85,7%) (LI *et al.*, 2019) e *P. aeruginosa* KT1115 (88,5%) (ZHOU *et al.*, 2019) ambos recentemente descritos como cepas de alto rendimento di-RL. A obtenção de uma molécula única é requerida para aplicações mais refinadas como, por exemplo, o uso como potencial no campo biomédico, a alta abundância de di-RL é uma vantagem industrial, uma vez que ramnolipídeos com duas moléculas de ramnose são reportados como mais eficazes nas aplicações, como estimulação da imunidade em plantas e animais (ANDRÄ *et al.*, 2006; BAUER *et al.*, 2006; HOWE *et al.*, 2006; MELLO, 2019; VARNIER *et al.*, 2009), cicatrização de feridas (BAUER *et al.*, 2006), terapia de tratamento de queloides (SHEN *et al.*, 2016), e atividade antifúngica (BORAH *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2007). Estes resultados demonstram o potencial em apresentar importantes propriedades de aplicabilidade industrial.

4.4 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido um protótipo de biorreator de fermentação estática de bancada. A avaliação do protótipo indicou potencial de escalonamento, por empilhamento e ampliação horizontal das unidades de cultivo, assim como a não necessidade de aeração forçada e circulação de ar. Adicionalmente, a utilização de indutor promoveu um aumento de 4x na produção de ramnolipídeos, o que torna o processo mais viável.

Assim, as já reportadas vantagens da fermentação submersa estática, em suporte de membrana de celulose bacteriana, para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aruginosa* se somam à possibilidade de desenvolvimento de biorreatores para produção deste biossurfactante em um processo simples e de baixo custo operacional.

4.5 REFERÊNCIAS

ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias de Milho**. 2018.

ANDRÄ, J.; RADEMANN, J.; HOWE, J.; KOCH, M. H. J.; HEINE, H.; ZÄHRINGER, U.; BRANDENBURG, K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burklolderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 301-310, 2006.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

ASSHIFA, M.N.; ZAMBRY, N. S.; SALWA, M. S.; Yahya; A. R. The influence of agitation on oil substrate dispersion and oxygen transfer in *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 fermentation producing rhamnolipid in a stirred tank bioreactor. **Biotech.**, v. 7 n. 3, p.189., 2017.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, n.6, p.868–875, 2006.

BAUER, J.; BRANDENBURG, K.; ZÄHRINGER, U.; RADEMANN J, Chemical synthesis of a glycolipid library by a solid-phase strategy allows elucidation of the structural specificity of immunostimulation by rhamnolipids. **Chem Eur J.**, v. 12, p. 7116–7124, 2006

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

BORAH, S. N., DEKA, S.; SARMA, H. K. First report of *Fusarium verticillioides* causing stalk rot of maize in Assam, India. **Plant Dis.**, v. 100, p. 1501, 2016.

CAMILIOS NETO, D; MEIRA JA, ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, p. 441-448, 2008.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P.P.; BUGAY, C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 748-755, 2009.

CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido**. 157f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2010.

CAMILIOS-NETO, D.; BUGAY, C.; SANTANA-FILHO, A. P.; JOSLIN, T.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1395-1403, 2011.

CONCEIÇÃO, K. S. **Produção de ramnolipídeos por cultivos submersos estáticos em suporte de membranas de celulose bacteriana**. 101f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2018.

CONCEIÇÃO, K. S.; ALMEIDA, M. A.; SAWONIUK, I. C.; MARQUES, G. D.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A.; VIGNOLI, J. A.; CAMILIOS-NETO, D. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* grown on membranes of bacterial cellulose supplemented with corn bran water extract. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p.30222-30231, 2020.

COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiological Science**, v. 3, p.145-149, 1986.

COOPER D.G. e GOLDENBERG, B.G. Surface-Active agents from two Bacillus species **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.

COSTA, S.G.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, N.M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: ramnolipídeos e polihidroxicanoatos**. 138f. Tese (Microbiologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2010.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S., VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 145-152, 2000.

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

ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v. 36, p. 26-36, 2017.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. J. **Appl Microbiol.**, v. 114, p. 373–383, 2013.

GOELZER, F.D.E; FARIA-TISCHER, P.C.S; VITORINO, J. C; SIERAKOWSKI, M. R.; TISCHER C. A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 546–551, 2009.

GONG, Z.; YANG, G.; CHE, C.; LIU, J.; SI, M.; HE, Q. Foaming of rhamnolipids fermentation: impact factors and fermentation strategies. **Microbial Cell Factories**. v. 20, p. 77, 2021.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, **Appl. Environ. Microbiol.** v. 48, p. 301–305, 1984.

GUNTHER, N. W.; NUÑEZ, A.; FORTIS, L.; SOLAIMAN, D. K. Y. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* stain NRRL B-30761. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 33, p. 914-920, 2006.

HABA, R., ESPUNY, M. J. BUSQUETS, M. MANRESA, A Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HERYANI, H.; PUTRA, M. D.; Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 49-54, 2017.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T.H.; NUSSER, M.; KIRSCHÖFER, F.; BRENNERWEISS, G.; FRANZREB, M.; BERENSMEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 1579, 2008.

HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Gen. Microbiol.**, 13, 572, 1955.

HOWE, J.; BAUER, J.; ANDRA, J.; SCHROMM, A. B.; ERNST, M.; ROSSLE, M.; ZHRINGER, U.; RADEMANN, J.; BRANDENBURG, K. Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids. **Febs Journal**, v. 273, p. 5101–5112, 2006.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. **The Journal of Antibiotics**, v. 12, p. 855-859, 1971.

KASKATEPE, B.; YILDIZ, S. Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* Species. **Biological and Applied Sciences, Braz. arch. biol. technol.**, v. 59, 2016

KRIEGER, N; CAMILIOS NETO, D; MITCHELL DA. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: Ramkrishna Sen. (Org.). Advances in Experimental Medicine and Biology. **Biosurfactants**. New York: Springer Science+Business media, LCC, Landes Bioscience, v. 672, p. 203-209, 2010.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RG, 2007.

KRONEMBERGER, F. D. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; FERNANDES, A. C. L. B.; DE MENEZES, R. R.; BORGES, C. P.; FREIRE, D. M. G. Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor, **Appl. Biochem. Biotechnol.** v, 147, p. 33–45, 2008.

LEE, K. M., HWANG, S-H., HA, S. D. JANG, J-H, LIM, D.-J., KONG, J.-Y., Rhamnolipid production in bath and fed-bath fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, n. 4, p.267-273, 2004.

LEE, B.S.; KIM, E.K. Lipopeptide production from *Bacillus sp.* GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639-647, 2004.

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, p. 1433, 2019.

LINHARDT, R. J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1989.

LONG, X. L.; SHEN, C. S.; HE, N.; ZHANG, G.; MENG, Q. Enhanced rhamnolipids production via efficient foam-control using stop valve as a foam breaker. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 536-543, 2016.

LOVAGLIO, R. B. *et al.* Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p.301-305, 2011.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology advances**, v. 33; p. 1715-1726, 2015.

MA, Kuang-Yi; SUN, Meng-Yan; DONG, Wen; HE, Chun-Qiu; CHEN, Fu-Lin; MA, YanLing. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p.144–151, 2016.

MARIANO, D. C. O. **Caracterização estrutural e físico-química dos biossurfactantes produzidos por uma cepa de *Burkholderia kururiensis* obtida por engenharia metabólica**. 65f. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ, 2012.

MEIRA, J. A. **Produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). 94p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2007.

MELLO, Ana P. Q. **Produção direcionada de di-rhamnolipídeo por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e desenvolvimento de processo de purificação para obtenção de um único congêneres**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

MOHANTY, S. S. *et al.* A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2021.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas-derived* molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 621-630, 2011.

PORNSUNTHORNTAWEE, O., WONGPANIT, P., CHAVADEJ, S., ABE, M. AND RUJIRAVANIT, R., Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p.1589, 2008.

RADZUAN, M.; BANAT, I.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste, **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99-105, 2016.

RAMIREZ, I. M.; VAZ, D. A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMAN, M. G. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 1-6, 2016.

RANDHAWA, K.K.S. AND RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid Biosurfactants—Past, Present, and Future Scenario of Global Market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.

RASHEDI, H.; JAMSHIDI, E.; ASSADI, M.M.; BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2005.

RODRIGUES, A. I. GUDIÑA, E. J. TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12907, p. 1-9, 2007.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas* CAPÍTULO III 47 *aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

SANTOS, D. RUFINO, R. LUNA, J. SANTOS, V. SARUBBO, L. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.

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

SHEPPARD, J.D., MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987.

SKIPSKI, V.P. Thin-layer chromatography of neutral glycolipids. **Methods Enzymol.**, v.35, p.396-425. 1975.

SIM, L., WARD, O. P., LI, Z-Y. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p. 232-236, 1997.

SOUZA, F.L.C. **Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicone e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo e água para uso externo de uso mais comum em manipulação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Quim. Nova**, v.37, p.431-441, 2014.

VARNIER, A.L. *et al.* Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell Environ.**, v. 32, p. 178-193, 2009.

WU, J.; JU, L. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p.193- 202,1998.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p.146-154, 2005.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p.415-423. 1997.

XU, N; LIU, S; XU, L; ZHOU, J; XIN, F; ZHANG, W; QIAN, X; NEW, M. L.; DONG, W.; JIANG, M. Enhanced rhamnolipids production using a novel bioreactor system based on integrated foam-control and repeated fed-batch fermentation strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 80 2020.

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

ZHOU, J.; XUE, R.; LIU, S.; XU, N.; XIN, F.; ZHANG, W.; JIANG, M.; DONG, W. High Di-rhamnolipid Production Using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, Separation of Mono/Di-rhamnolipids, and Evaluation of Their Properties. **Front Bioeng Biotechnol.**, v. 7, p. 245, 2019.

5 CAPÍTULO III – PROTÓTIPO DE CURATIVO BIOCAMPATÍVEL E BIOFUNCIONAL COM INCORPORAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS A MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA

5.1 INTRODUÇÃO

O termo biomaterial compreende substâncias puras ou compostas, podendo ser materiais sintéticos ou naturais, que devem estar em contato na interface e interagir com sistemas biológicos. São materiais destinados a aplicações médicas, utilizados temporária ou definitivamente para avaliar, melhorar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, parcial ou totalmente (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016). Os polímeros naturais tem se destacado, ao considerar o custo e facilidade de obtenção desses materiais, já sintetizados com estruturas altamente organizadas, além do favorecer o desenvolvimento sustentável e preservação ambiental (PENTTILÃ *et al.*, 2018; WILLIAMS, 2014).

A celulose bacteriana possui características que tornam promissora sua utilização, principalmente, nas áreas biomédicas e biotecnológicas (GODINHO, 2014; KLEMM *et al.*, 2005; PENTTILÃ *et al.*, 2018). Este polímero apresenta propriedades, como: biocompatibilidade; elevada resistência mecânica; biodegradabilidade; elevada pureza; atoxicidade e as vantagens de fornecer umidade ideal para feridas secas, absorver exsudatos, fornecer eficaz barreira física contra infecção e não ser aderente à superfície das feridas, o que evita danos ao tecido durante remoção até que ocorra a cicatrização completa (MATEOS, 2004; STOCHERO; TORNIEUX., 2006).

Estudos de cicatrização de feridas, *in vivo*, demonstram que materiais à base de celulose bacteriana apresentam epitelização e regeneração mais rápidas do que outros produtos comercialmente disponíveis. No entanto, se não estiver associada a outros compostos, a CB não possui efetivamente atividade antibacteriana, vale ainda ressaltar, que infecções bacterianas são recorrentes em feridas difíceis de curar (FU; ZHANG; YANG, 2013; LIU *et al.*, 2013; SERAFICA *et al.*, 2010). Dessa forma, a funcionalização de celulose bacteriana com agentes antibacterianos, através de interações físicas ou de ligações químicas, tem despertado bastante interesse (NEVES *et al.*, 2011).

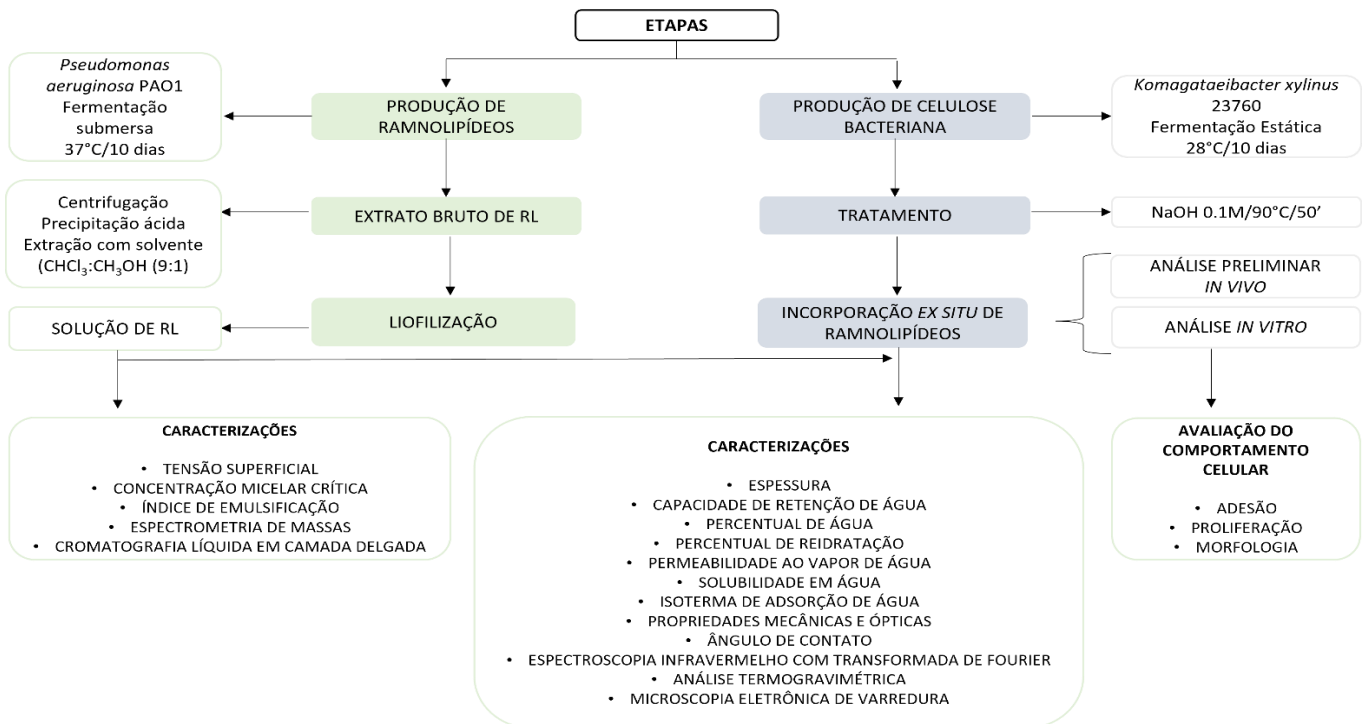
Os ramnolipídeos são biossurfactantes microbianos de alta performance, biodegradáveis, atóxicos, não mutagênicos e com grande potencial de aplicação nas áreas biomédica e biotecnológica (ELSHIKH *et al.*, 2017; LONG *et al.*, 2016; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011). São aprovados pelas Agências Americanas de Proteção Ambiental e de Regulamentação de Alimentos e Medicamentos para uso, respectivamente, ambiental e em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos. Apresentam atividade antimicrobiana sobre diversos microrganismos incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras (GUSTAFSSON *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016; RANDHAWA; RAHMAN, 2014; REDDY *et al.*, 2016; VARJANI; UPASANI, 2017). Adicionalmente, apresentam-se como alternativa terapêutica no processo cicatrizante de feridas na pele e na inibição da formação de cicatrizes fibróticas (SHEN *et al.*, 2016; STIPCEVIC *et al.*, 2006; TAWFEEEQ; YESSER, 2018).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um curativo biocompatível e biofuncional com a incorporação de ramnolipídeos na membrana de celulose bacteriana (CB-RL), preservando as propriedades da membrana de celulose bacteriana e agregando a biofuncionalidade dos ramnolipídeos. Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, a aplicação do biocurativo na regeneração tecidual e assim, finalmente aumentar o espectro de atividades da celulose bacteriana por meio da incorporação dos ramnolipídeos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico são apresentadas as metodologias empregadas, e descritas as técnicas utilizadas para a condução e acompanhamento dos experimentos, realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia, no Laboratório de Central Multiusuário, Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise e Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL. A metodologia experimental está esquematizada no fluxograma da Figura 18.

Figura 18 - Fluxograma da metodologia experimental.



Fonte: O próprio autor.

5.2.1 Produção e caracterização das propriedades da Celulose Bacteriana (CB)

5.2.1.1 Microrganismo

Vide item 4.2.1.1.

5.2.1.2 Preparo do pré-Inóculo

Vide item 4.2.1.2.

5.2.1.3 Inóculo

Vide item 4.2.1.3.

5.2.1.4 Obtenção da celulose bacteriana (CB)

Vide item 4.2.1.4.

5.2.1.5 Espessura

A espessura de cada membrana de celulose foi determinada em micrômetro digital Digimess com escala de 0,001mm, realizadas medições em três pontos distintos.

5.2.1.6 Capacidade de retenção de água (CRA), percentual de água (PA) e percentual de reidratação (PR) das membranas de celulose bacteriana

Para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) da CB, utilizou-se membrana nunca seca, chamada na literatura de “never dried”, que estava imersa em água deionizada após sua síntese e purificação. A amostra foi retirada com uma pinça e seca em papel absorvente para retirada do excesso de água superficial com uma pressão manual constante por 10 s. Após esse tempo, a massa foi determinada pesando-a (m úmida). Em seguida, a CB foi seca em estufa a 45 °C por 2 h e, então, determinou-se sua massa seca (m seca). Esse ensaio foi realizado em 5 amostras. Para calcular o percentual de água de cada uma, usou-se a Equação 1 (SHEZAD *et al.*, 2010).

$$\text{CRA} = (m \text{ úmida} - m \text{ seca})/m \text{ seca} \quad (1)$$

O valor obtido na análise de CRA pode ser convertido facilmente no percentual de água (PA) contido na membrana aplicando a Equação 2 para o cálculo:

$$\text{PA} = (m \text{ úmida} - m \text{ seca})/m \text{ úmida} \times 100\% \quad (2)$$

A partir das mesmas amostras utilizadas no ensaio de CRA e PA, avaliou-se, também, o percentual de reidratação (PR) da CB. Para isso, as membranas secas foram imersas em água deionizada em tempo suficiente até que a massa da amostra reidratada permanecesse constante, por 1 h. Após esse tempo, retirou-se o excesso de água superficial, com uma pressão manual constante, e pesou-se, obtendo a massa após sua reidratação (m reidratada). O percentual de reidratação da CB em relação a sua massa inicial (m seca), após

a secagem em estufa, foi determinada de acordo com a Equação 3 (HUANG *et al.*, 2010).

$$PR = (m \text{ reidratada} - m \text{ seca}) / (m \text{ úmida} - m \text{ seca}) \times 100\% \quad (3)$$

5.2.2 Produção e Caracterização das Propriedades dos Ramnolipídeos (RL)

5.2.2.1 Microrganismo

Vide item 4.2.2.1.

5.2.2.2 Preparo do pré-Inóculo

Vide item 4.2.2.2.

5.2.2.3 Fermentação submersa (FSb)

Os ensaios de FSb foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio cultivo, composto de sais (Tabela 9) acrescentado de glicerol (3% v/v). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121 °C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo em uma proporção de 2 % v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital a 37 °C/200 rpm.

Tabela 9 - Composição do meio de sais (MSM).

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)	Fabricantes
Fosfato de Potássio Monobásico	3,0	Nuclear
Fosfato de Potássio Dibásico	7,0	Nuclear
Sulfato de Magnésio	0,2	Synth
Sulfato de Amônio	1,0	Biotec

5.2.2.4 Interrupção do cultivo

Vide item 4.2.2.4.

5.2.2.5 Quantificação dos ramnolipídeos

Vide item 4.2.2.5.

5.2.2.6 Precipitação ácida

A precipitação ácida dos ramnolipídeos foi feita a partir do sobrenadante livre de células, ajustado o pH para 2 com ácido clorídrico, incubado 5 dias a 5 °C e em seguida realizada a centrifugação utilizando 4.500 rpm a 25 °C por 20 minutos. Em seguida descartado o sobrenadante e reservado a fração precipitada.

5.2.2.7 Extração com solvente

Vide item 4.2.2.6.

5.2.2.8 Determinação do índice de emulsificação (E)

Vide item 4.2.3.1.

5.2.2.9 Determinação da tensão superficial (TS)

Vide item 4.2.3.2.

5.2.2.10 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

Vide item 4.2.3.3.

5.2.2.11 Cromatografia líquida em camada delgada (CCD)

Vide item 4.2.3.4.

5.2.2.12 Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por submerso estático em suporte de membrana de celulose bacteriana e espectrometria de massas

Vide item 4.2.3.5.

5.2.2.13 Análise estatística

Vide item 4.2.3.6.

5.2.3 Produção de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos (CB-RL)

O protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL foi confeccionado a partir da incorporação de extrato de ramnolipídeos – RL (RL90/95 – 90% de pureza e 95% de moléculas de di-RL), obtido e caracterizado como descrito no item 5.2.2. As membranas de celulose bacteriana (98% de umidade e 2 mm de espessura) foram produzidas e caracterizadas conforme item 5.2.1, seguindo a metodologia desenvolvida por Goelzer & col. (2009), em reatores de bandejas com proporções de 30 x 15 cm. Para a incorporação *ex situ* de ramnolipídeos nas membranas de celulose bacteriana, estas foram submetidas à retirada do excesso de água superficial com pressão manual constante por 10 s com o auxílio de papel filtro e então levadas para estufa de secagem com circulação de ar por 24 h a 35 °C. Após esse período, foi realizado um teste de absorção por área da membrana e incorporada a solução de RL (5 g/L / 22 μ L por cm^2 de área de membrana de CB), concentração baseada na literatura (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2018), seguido de secagem à temperatura ambiente por 2 horas. Por fim o protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL foi embalado em envelope de grau cirúrgico e autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

5.2.3.1 Estudo de liberação de ramnolipídeos de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana

Para o estudo de liberação, o protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL, produzido conforme item 5.2.3, foi colocado em solução de tampão fosfato em pH 7,2. Retirou-se alíquotas de 2 mL nos tempos de 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 12; 24; 36 horas, que foram submetidas a quantificação indireta de ramnolipídeos, item 5.2.2.5, pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) utilizando uma curva padrão com ramnose. Os ensaios foram realizados em 6 réplicas e, após cada coleta, o volume do meio foi repostado e utilizados nos cálculos, as medições foram realizadas até liberação total dos ramnolipídeos.

5.2.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR)

Para a espectroscopia de absorção na região do infravermelho foram realizadas análises diretamente dos filmes. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Bomem, modelo MB com uma resolução de 4 cm^{-1} no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} , no Laboratório de Central Multiusuário de Pesquisa da UEL.

5.2.3.3 Ângulo de contato (AC)

A mensuração de ângulo de contato foi realizada utilizando um equipamento Ossila Contact Angle Goniometer, operado em temperatura ambiente, foi utilizada uma gota ($1\mu\text{L}$) de água deionizada (DI) pingada sobre a superfície da amostra e com o software "Ossila Contact Angle" foi possível calcular o ângulo de contato da água para cada amostra, todas as amostras foram analisadas nos mesmos intervalos de tempo e o experimento foi reproduzido cinco vezes para cada amostra.

5.2.3.4 Propriedades ópticas: transparência e opacidade

A transparência e a opacidade foram determinadas empregando-se um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão). Os valores de transmitância em 600 nm e os valores de absorbância em 500 nm foram usados para calcular os valores de transparência (Equação 4) e opacidade (Equação 5), de acordo com Gontard e Guilbert (1994) e Han e Floros (1997), respectivamente.

$$\text{Transparência \%} = \log \%T_{600}/x \quad (4)$$

$$\text{Opacidade} = \text{Abs}_{500}/x \quad (5)$$

onde $\%T_{600}$ é a transmitância percentual média a 600 nm, Abs_{500} é a absorbância média a 500 nm e x é a espessura do filme (mm). Os testes foram realizados em triplicata.

5.2.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi obtida utilizando uma termobalança Shimadzu TGA 50 (Japão), no laboratório de espectroscopia da central multiusuários de laboratórios de pesquisa da UEL. As amostras foram aquecidas de 25 °C a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e para a análise dos dados foi utilizado o software OriginPro 8.

5.2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das membranas de celulose bacteriana foram obtidas por microscópio eletrônico FEI Quanta 200 (Holanda). Foram montados em suporte de alumínio com fita de carbono dupla face, pulverizadas com um filme de ouro (40 – 50 nm) (BALTEC SDC 050, Alemanha) e observadas em microscópio eletrônico de varredura. As eletromicrografias foram elevadas em modo topográfico (elétrons secundários) a 20 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) na UEL.

5.2.3.7 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada gravimetricamente de acordo com o método ASTM E96-95 (1996). As amostras foram seladas com parafina em células de permeação de alumínio (60 mm de diâmetro) contendo cloreto de cálcio anidro. A selagem foi feita para garantir que toda migração ocorresse através do filme. As células foram acondicionadas em dessecadores com umidade relativa de 75% (solução saturada de NaCl) em incubadora tipo a 25 °C. Pesagens foram realizadas a cada 2 h durante 48 h. Mudanças no peso da célula de permeação foram registradas e o ganho de peso (g) foi plotado em função do tempo (s) e, da reta obtida por regressão linear foi determinado o coeficiente angular e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA), conforme Equação 1:

$$TPVA = \frac{g}{t.A} \quad (1)$$

onde, g/t é o coeficiente angular da reta obtida por regressão linear, e A é a área de permeação (m²). Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada (g/msPa) utilizando-se a Equação 2 a seguir:

$$PVA = \frac{TPVA \cdot x}{\Delta P} \quad (2)$$

onde, x é a espessura média da membrana (m), ΔP é a pressão de saturação do vapor de água (Pa) no gradiente de umidade relativa (UR) empregado para o ensaio, ou seja, cloreto de cálcio anidro (0% de UR) e solução saturada de NaCl (75% de UR).

5.2.3.8 Solubilidade em água

As amostras (3 x 3 cm) foram secas em estufa com circulação e renovação de ar a 60 °C por 24 h e pesadas (peso inicial em base seca). Foram então mergulhadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, fechados com folha de alumínio e agitados lentamente por 24 h a 25

°C em incubadora orbital. Após este período, as amostras foram removidas e secas em estufa com circulação e renovação de ar (60 °C por 24 h) para determinar a massa do material que não foi solubilizado (peso final). A solubilidade foi expressa pela porcentagem de material seco solubilizado. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.3.9 Isoterma de adsorção de água

As amostras (aproximadamente 0,2500 g) foram acondicionadas em dessecador com cloreto de cálcio (UR ~ 0%) por 48 h e, em seguida, colocadas no equipamento Aqua Sorp Isotherm Generator (Decagon Devices, Pullman, WA, EUA). O teor de umidade das amostras em equilíbrio foi expresso em g de água por 100 g de matéria seca. A análise foi realizada em triplicata e as curvas de adsorção foram ajustadas ao modelo de Brunauer, Emmett e Teller (BET). O modelo isotérmico de BET (Bizot, 1983) pode ser expresso conforme Equação 3:

$$M = (C_b m_0 a_w) / (1 - a_w) (1 + (C_b - 1) a_w) \quad (3)$$

onde M é a umidade de equilíbrio (g água/100 g sólidos), a_w é a atividade de água, m_0 é o valor da monocamada (g água/100 g de sólidos) e C_b é a constante BET. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.2.3.10 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de tração foram determinadas em um texturômetro Stable Micro Systems (modelo TA-XT Plus, Inglaterra), seguindo as normas da *American Society for Testing and Material* (ASTM D-882-02, 2002) com modificações. Corpos de prova (50 x 25 mm) foram condicionados sob umidade relativa de 58% por 48 h a 25 °C. Foram analisados 5 corpos de prova de cada amostra, que foram ajustados às garras de tração do equipamento a uma distância inicial de 25 mm e tracionadas com uma velocidade de 0,8 mm/s. As propriedades determinadas foram resistência máxima à tração na ruptura (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de Young (MPa).

5.2.4 Estudo *In Vitro* de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos (CB-RL)

A linhagem de fibroblastos L929 foi cultivada em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM High Glucose, Sigma Chemical Company, suplementado com 10% de soro bovino fetal (HyClone), 2 mM L-glutamina, 4,5 gl^{-1} de glicose, 1,5 gl^{-1} de bicarbonato de sódio, 1% penicilina/estreptomicina (HyClone), em uma atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C, em Frascos T75 (Thermo Scientific). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, e a passagem das células utilizada, número de vezes que essa cultura foi subcultivada, foi a P9. Assim, para realização dos testes foram obtidas suspensões celulares por tripsinização (solução tripsina/EDTA - 0,25%, Cultilab).

5.2.4.1 Proliferação celular

A proliferação celular foi realizada após o cultivo das membranas com uma densidade de 2×10^4 de células, em cada intervalo analisada por contagem de células em três pontos pré-definidos nos suportes de celulose bacteriana pura, celulose bacteriana com ramnolipídeos e controles de poliestireno, sempre nos mesmos poços, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. O protocolo utilizado para análise da proliferação foi o mesmo dos ensaios de adesão (MIN *et al*, 2004).

5.2.4.2 Adesão celular

A adesão das células foi analisada por coloração de hematoxilina e eosina (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), nos intervalos de 0, 4, 8, 24 e 48 e 72 horas. Para este ensaio foi adaptado o modelo de análise de adesão celular descrito por Min e colaboradores (2004).

As membranas foram cultivadas com uma densidade de 2×10^4 de células, em cada intervalo, foram lavadas com 1 ml de PBS (Na_2HPO_4 1,42 gl^{-1} , KH_2PO_4 0,24 gl^{-1} , KCl 0,2 gl^{-1} , NaCl 0,8 gl^{-1}), fixadas com 100 μl de solução álcool:acetona (1:1 em volume) e, após a secagem, adicionou-se 50 μl de hematoxilina por 1 min. Os suportes foram imersos em 4 ml de água milliQ

durante 2,5 min, a água aspirada e foram adicionados 50 µl de eosina por um minuto. O procedimento de lavagem foi mais uma vez repetido para realizar a contagem, o mesmo procedimento foi feito com o controle, analisados sob microscópio óptico, e contados cinco pontos aleatórios com área de 0,41 mm² cada, na membrana.

5.2.4.3 Morfologia celular

Foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV, Philips, Quanta 200). Para os estudos de MEV, as células fixas no substrato foram lavadas duas vezes com PBS, e fixadas com 100 µl de solução álcool:acetona (1:1) por 5 min. Depois de lavadas com PBS, a desidratação foi feita através de troca lenta de água usando uma série de soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 90%) por 15 min com desidratação final em etanol absoluto por 30 min, permitindo que as amostras secassem à temperatura ambiente e sob vácuo.

5.2.3 Estudo *In Vivo* de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos (CB-RL)

Foi realizado inicialmente um teste piloto em um cão e um gato (Figuras 39 e 40). A seguir foi iniciado um projeto de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em 10/08/2021 (Anexo C), para uso em cães na rotina de atendimento cirúrgico do Hospital Veterinário da UEL, por 12 meses entre os meses de agosto de 2021 e 2022.

O protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL embalado em envelope (PackGC Zermatt 150 x 250 mm) foi utilizado em feridas traumáticas laceradas de cães que não puderam ser suturadas imediatamente devido à presença de contaminação e/ou infecção, localizadas em pele de algumas regiões, como tronco, dorso, membros e abdômen, locais sem comunicação com cavidades. A ferida foi considerada contaminada quando apresentada 6-12 horas após a ocorrência da lesão,

e infectada quando tinha mais de 12 horas de duração com presença de tecido desvitalizado e secreção purulenta (DERNELL, 2006).

Após anestesia geral realizou-se tricotomia, antissepsia, colocação de compressas e então a ferida foi lavada com soro fisiológico em jato e o tecido necrótico foi desbridado. Por fim o curativo foi aplicado, deixando cerca de 1 cm do curativo ultrapassar a borda e o excesso foi recortado. O procedimento de troca do curativo foi realizado apenas em caso de perda do curativo antes do dia da troca. Patronizou-se realizar a troca de curativo 5 dias após o primeiro curativo. Neste dia foi realizado a mensuração da área da ferida, coletado material da ferida para cultura e antibiograma, e para a análise histológica. O tempo de ocorrência da lesão e os aspectos macroscópicos da ferida foram usados para análises.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização das Propriedades da Celulose Bacteriana (CB)

Referente às caracterizações físicas das membranas de celulose bacteriana (CB), foram realizados ensaios de espessura, CRA, PA e PR. Os valores obtidos em cada ensaio com a média estão mostrados na Tabela 10. As membranas de CB obtidas após a síntese, tratamento e neutralização apresentaram cor branca translúcida e eram úmidas (Figura 19).

5.3.1.1 Espessura e capacidade de retenção de água (CRA), percentual de água (PA) e percentual de reidratação (PR) das membranas de celulose bacteriana

A Figura 19 mostra as membranas de CB em seu estado úmido e após seca. A membrana no seu estado hidratado se apresenta como uma matriz celulósica resistente, transparente, homogênea, densa, moldável e formada por uma rede entrelaçada de longas nanofibras celulósicas. Diferentes aplicações exigem diferentes propriedades mecânicas no biomaterial. A porosidade e o tamanho do poro pode variar dependendo do grau de interligação entre as microfibrilas, tornando a malha de fibras mais ou menos densa. As

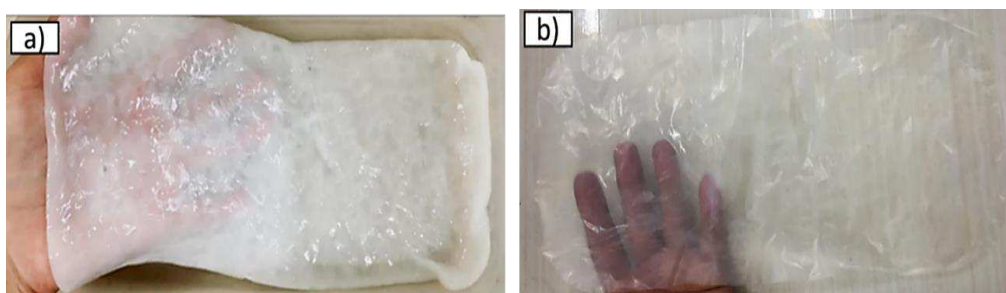
propriedades mecânicas dos biomateriais se tornam importantes na escolha de qual material utilizar na aplicação médica desejada (KLEMM *et al.*, 2005; PENTTILÄ *et al.*, 2018).

Tabela 10 - Valores obtidos a partir dos ensaios de percentual de água (PA), capacidade de retenção de água (CRA) e percentual de reidratação (PR) da membrana de celulose bacteriana e seus respectivos desvios padrão (DP).

Replicata	Espessura úmida (mm)	Espessura seca (mm)	CRA (g H ₂ O g/g)	PA (%)	PR (%)
1	2,21	0,058	79,54	98,75	3,33
2	2,12	0,055	78,52	98,74	2,53
3	2,09	0,051	76,79	98,71	2,58
4	2,32	0,061	80,84	98,77	2,37
5	2,11	0,053	78,05	98,73	3,1
6	2,2	0,057	79,54	98,75	2,5
Média ±	2,175±	0,055±	78,88±	98,74±	2,73±
DP	0,068	0,002	1,093	0,015	0,32

Valores de médias obtidas a partir de sextuplicatas ± desvio padrão.

Figura 19 - Membrana de celulose bacteriana a) úmida e b) seca.



Fonte: O próprio autor.

Foi observado espessura média de 2,17 mm nas membranas de CB úmidas e após secas apresentaram uma redução de aproximadamente 97,46% obtendo uma média de 0,055 mm. Pelo estudo de percentual de água (PA) foi constatado uma média de 98,74% de água integrada na membrana de CB úmida (PECORARO *et al.*, 2008). Esse resultado condiz com a literatura, em

que relatam 98% de umidade, sendo água ligada aos 2% de fibras de celulose (PECORARO *et al.*, 2008).

Alguns fatores influenciam diretamente o valor da capacidade de retenção de água (CRA) da membrana como sua porosidade, a área superficial e ao tamanho das suas fibras, quanto maior a área superficial da CB e maior for os poros maior será a CRA da amostra (GUO; CATCHMARK, 2012; MORITA; OZAKI, 2006; WATANABE; YAMANAKA, 1998). Um fator responsável pela hidrofiliabilidade da membrana de CB é a sua grande área de superfície interna, as moléculas de água ficam fisicamente presas na superfície e no interior da matriz de CB constituída por fibras reticuladas e, se há muitos espaços vazios entre as fibras mais água pode sair ou penetrar e ser absorvida pelo material (OKIYAMA *et al.*, 1992). Os valores obtidos a partir do ensaio de percentual de água foram convertidos em g/g, representando a capacidade de retenção de água, e o valor encontrado para a CB foi de 78,88 vezes a sua massa seca.

O percentual de reidratação (PR) teve uma média de 2,73%, o PR, como apresentado na Tabela 10, o que significa que, da quantidade de água que a membrana de CB possuía originalmente, apenas 2,73% de água conseguiu ser absorvida novamente após sua secagem. Esse percentual sofre interferência conforme o modo que a membrana de CB foi seca, em estufa, as fibras da celulose se colapsam devido à rápida evaporação da água, fazendo com que as moléculas de água, ao reidratá-las, não consigam vencer as forças intermoleculares formadas e voltar a estrutura original sendo provável que a porosidade do material reduza significativamente durante o processo de secagem.

5.3.2 Caracterização das Propriedades Físico-químicas e Estruturais dos Ramnolipídeos (RL)

Para avaliar as propriedades físico-químicas do biossurfactante foi utilizada solução aquosa do extrato bruto orgânico de RL (Figura 20), produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, foram definidos a concentração micelar crítica (CMC) e o índice de emulsificação (E%), realizado a determinação estrutural através da cromatografia em camada delgada (CCD) e determinação da mistura de congêneres de RL produzidos por espectrometria de massas.

Figura 20 - Extrato bruto orgânico de ramnolipídeos.

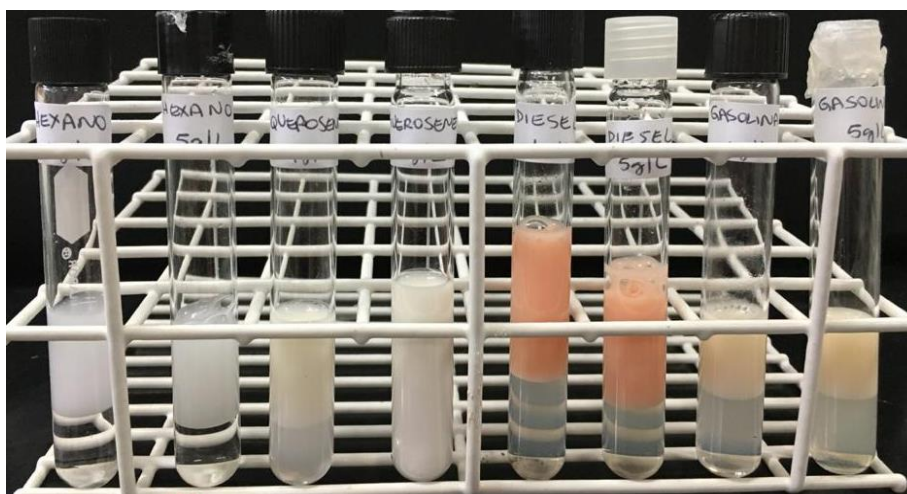


Fonte: O próprio autor.

5.3.2.1 Índice de emulsificação (E)

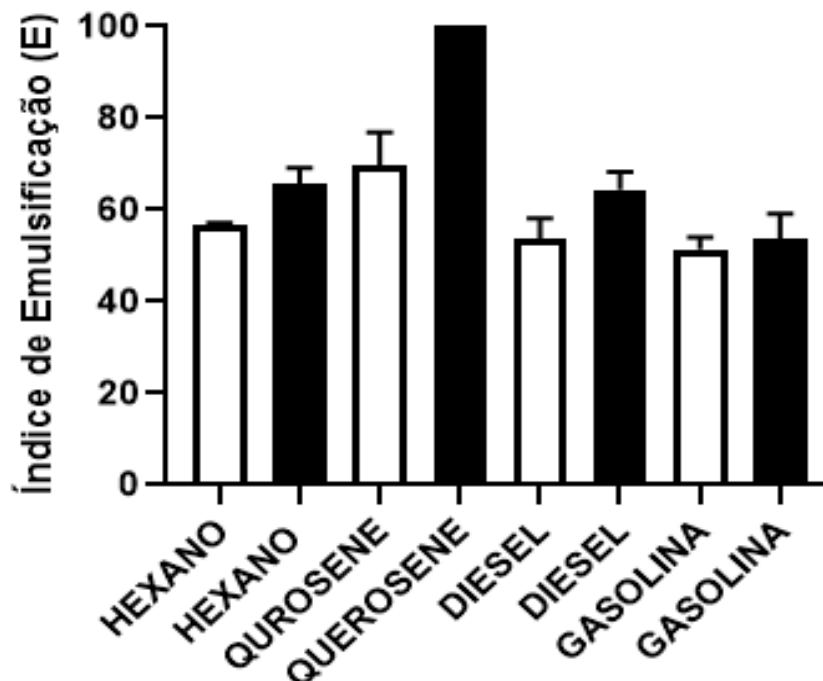
O índice de emulsificação (E) expressa a capacidade dos biossurfactantes emulsificarem compostos hidrofóbicos, classificando-se como uma das formas utilizadas para caracterizar o poder emulsificante de um surfactante. Um critério respeitado para ser considerado como bom emulsificante é a capacidade de formar emulsão com o hidrocarboneto e essa se manter acima de 50% por 24 horas ou mais (WILLUMSEN; KARLON, 1997). Soluções aquosas da mistura de RL, com concentrações de 0,1 e 0,5 g/%, foram utilizadas para avaliação do E de 24 horas (E_{24}) (Figura 21 e 22).

Figura 21 - Teste de emulsificação frente a diferentes hidrocarbonetos.



Teste para hexano, querosene, gasolina e diesel, nas concentrações de 0,1g/% e 0,5 g/%, respectivamente.

Figura 22 - Índice de emulsificação (E) frente a diferentes hidrocarbonetos, de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso.



Barras brancas concentração de ramnolipídeos 0,1 g% e barras pretas concentração de ramnolipídeos 0,5 g%. Valores de médias obtidas a partir de triplicatas \pm desvio padrão.

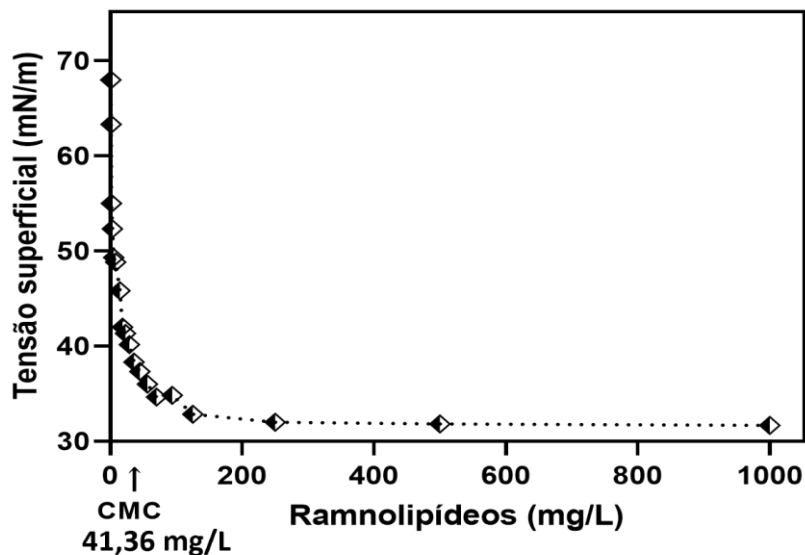
Os ensaios apresentaram um excelente poder de emulsificação, em que a mistura de RL, obtida neste processo de produção, mostrou maior poder emulsificante para o querosene. O E_{24} para o querosene foi de 100% para a concentração de 0,5 g%, com uma diminuição para 70% do E_{24} foi observada na concentração de RL de 0,1 g%. O E_{24} para óleo diesel foi de aproximadamente 65%, para a solução mais concentrada, enquanto a solução menos concentrada foi de 54%. O E_{24} para hexano ficou um aparentemente em 65% para a concentração de 0,5 g% e 53% para 0,1 g% do biossurfactante. Enquanto os menores E_{24} foram para gasolina, próximo de 52% para ambas as concentrações. Diferentes cepas de *Pseudomonas* produzem misturas de RL que apresentaram índice de emulsificação entre 12 e 64%. A mistura de RL apresentou bom poder emulsificante e encontra-se dentro a média dos resultados assim como mostrado na literatura (HABA *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2007) produzidos por fermentação submersa.

5.3.2.2 Determinação da tensão superficial (TS) e concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) é definida como a concentração mínima de surfactante em solução necessária para formação de micelas, é um importante parâmetro para avaliação da eficiência de surfactantes, quanto mais eficiente for este, menor será a CMC. A mistura de RL obtidas no presente processo apresentou uma CMC que se está entre os melhores resultados de CMC para RL encontrados na literatura científica. Em que os RL são capazes de reduzir a tensão superficial da água a valores entre 25 a 30 mN, apresentando sua CMC entre 10 e 200 mg/L, dependendo das 50 diferentes fontes microbianas, das condições de pH e da salinidade do meio. Os RL se destacam por apresentarem alta atividade emulsificante e uma pequena atividade antimicrobiana (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011; MULLIGAN, 2005).

A CMC dos RL obtidos pelo presente processo foi determinada em função da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas de solução aquosa do extrato orgânico concentrado de RL (Figura 23). Construindo-se um gráfico de tensão superficial medida contra a concentração de RL, obteve-se graficamente a CMC, que corresponde ao ponto central de inflexão da curva. Maiores concentrações de biossurfactante não apresentaram grande influência na variação da tensão superficial do meio, dessa forma observa-se que a tensão superficial da água diminuiu de 72 mN/m para aproximadamente 32 mN/m quando se empregou uma concentração de biossurfactante de 41,36 mg/L (Figura 23). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (ARAUJO, 2018; CAMILIOS NETO, 2010; SOBERÓN-CHAVEZ *et al.*, 2005) utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos mostraram propriedades satisfatórias que caracterizam o potencial do biossurfactante.

Figura 23 - Determinação da concentração micelar crítica (CMC) a partir de diluições seriais de solução aquosa de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso.

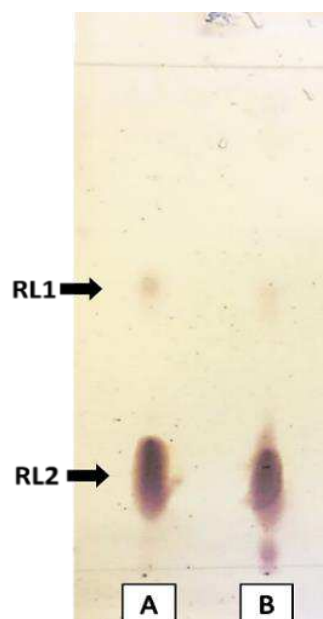


Valores de médias obtidas a partir de triplicatas.

5.3.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Através da cromatografia em camada delgada observou-se a presença dos dois componentes majoritários, mono-ramnolipídeos (RL1) e di-ramnolipídeos (RL2) (Figura 24) produzidos através de cultivo submerso. O extrato bruto de misturas de RL obtido pela fermentação pode ser visualizado através da intensidade dos spots obtidos na CCD. Foi obtido uma maior proporção de RL2 (spots mais próximos da linha de aplicação) e foi confirmada através da espectrometria de massa (Figura 24 e Tabela 11).

Figura 24 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso.



(A) Extrato bruto contendo mistura de mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos. (B) extrato bruto contendo ramnolipídeos de cultivos submerso. RL1, mono-ramnolipídeos e RL2 di-ramnolipídeos

5.3.2.4 Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por espectrometria de massas

A *Pseudomonas aeruginosa* produz uma mistura de homólogos de mono-ramnolipídeos e de di-ramnolipídeos de RL, a espectrometria de massa foi utilizada com a finalidade de determinar quais os homólogos são produzidos no presente processo e realizar a determinação estrutural e a quantificação da abundância relativa de cada congêneres.

Foi obtido uma maior obtenção de congêneres de RL com duas moléculas de ramnose, com 95,8% de di-ramnolipídeos (Tabela 11), com relatos na literatura de obtenção de di-ramnolipídeos utilizando *P. aeruginosa* PA1 (64,7%) (KRONENBERGER, 2007), *B. kururiensis* LMM21 (34,32) e *P. aeruginosa* PAO1 (86,51) (MARIANO, 2012), *P. aeruginosa* YM4 (85,7%) (LI *et al.*, 2019) e *P. aeruginosa* KT1115 (88,5%) (ZHOU *et al.*, 2019).

A obtenção de estrutura única de maior abundância pode ser um benefício, neste caso Rha-Rha-C10-C10 (Figuras 24 e 25 e Tabela 11), pois obtenção de uma molécula única é requerida para aplicações mais refinadas

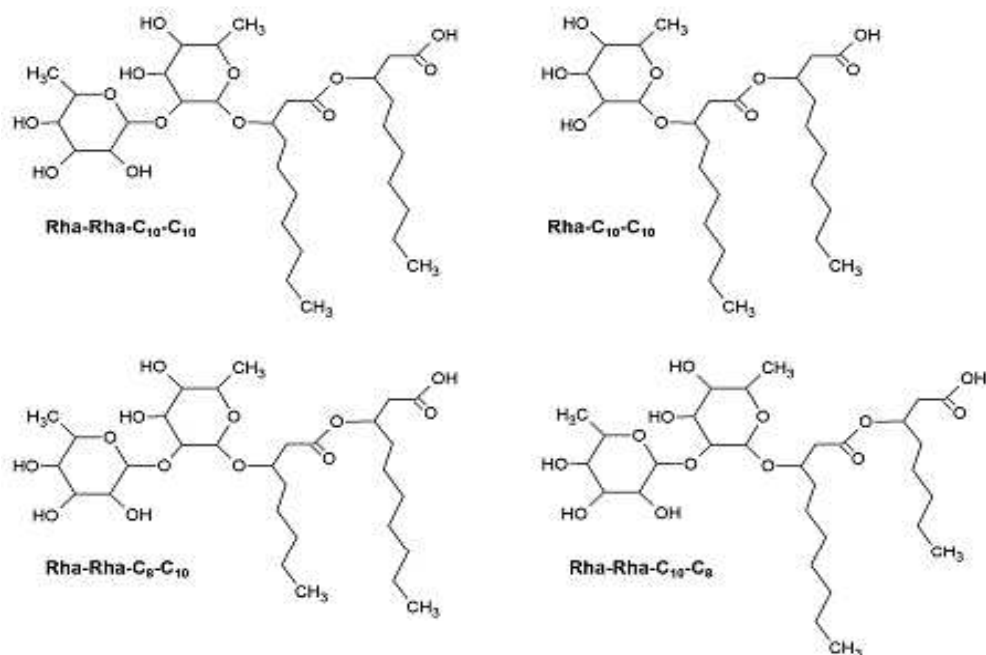
como, por exemplo, o uso como potencial no campo biomédico, como potencial como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunomoduladores, antioxidantes e algicidas (DONIO *et al.*, 2013; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; PANDIT *et al.*, 2014; VARJANI; UPASANI, 2017).

Tabela 11 - Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos por cultivo submerso estático em suporte de membranas.

Homólogos	[M-H] ^{-a}	Porcentagem Relativa	Porcentagem Total
Mono-ramnolipídeos			
Rha-C ₁₀ C ₁₀	503.2974	4,2	4,2
Di-ramnolipídeos			95,8
Rha-Rha-C ₁₀ C ₈	621.3225 ^b	9,3	
Rha-Rha-C ₈ C ₁₀			
Rha-Rha-C ₁₀ C ₁₀	649.3483	72,9	
Rha-Rha-C ₁₀ C ₁₂	677.3778 ^b	6,6	
Rha-Rha-C ₁₂ C ₁₀			
Rha-Rha-C ₁₀ C _{12:1}	675.3584 ^b	7	
Rha-Rha-C _{12:1} C ₁₀			

^a Aduto ^b Isômeros

Figura 25 – Principais congêneres de ramnolipídeos produzidos.



Estruturas Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-Rha-C₈-C₁₀ e Rha-Rha-C₁₀-C₈.

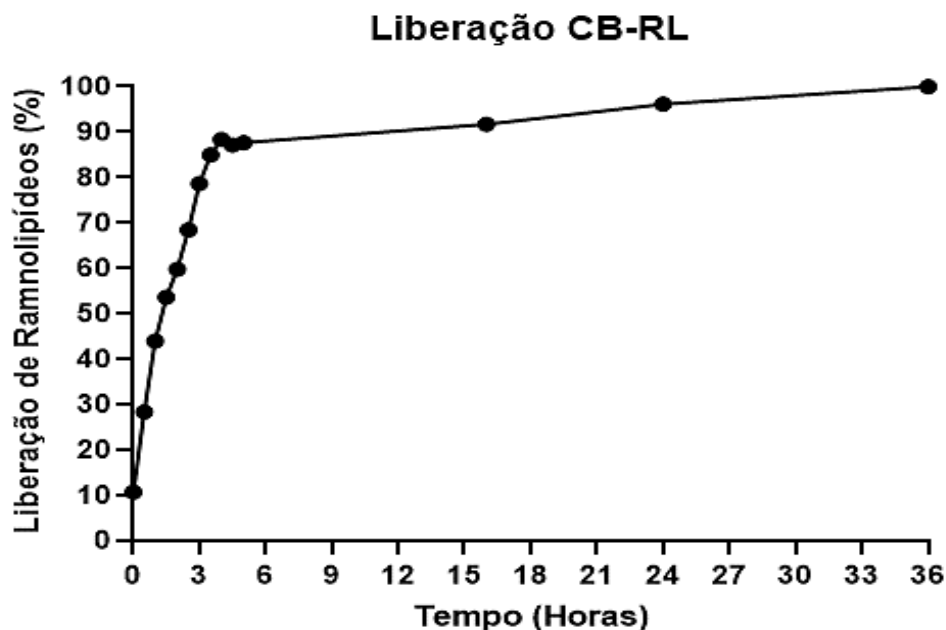
5.3.3 Caracterização de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos

5.3.3.1 Liberação de ramnolipídeos em protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana

A absorvância da análise de liberação de RL a partir de membranas de CB foi medida por quantificação indireta dos RL pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) utilizando uma curva padrão com ramnose (CAMILIOS NETO *et al.*, 2008). O perfil de liberação de RL a partir de membranas das CB é apresentado na Tabela 12 e Figura 26, em que mostram o percentual de liberação em função do tempo em horas e minutos.

O perfil de liberação dos RL a partir das membranas é apresentado na Figura 26 e mostra o percentual de liberação em função do tempo, em horas, para todos os grupos avaliados.

Figura 26 - Perfil de liberação de ramnolipídeos a partir de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos.



Valores de médias obtidas a partir de triplicatas \pm desvio padrão.

A partir da Figura 26 foi calculada a taxa de liberação de RL, demonstrado na Tabela 12, a partir do momento de adição da membrana de CB na solução (tempo 0) até total liberação (36 horas).

Tabela 12 - Velocidade de liberação de ramnolipídeos a partir de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos.

(continua)

Tempo (h)	Liberação (%)
0	10,722
0,5	28,366
1	43,986
1,5	53,612
2	59,785
2,5	68,418
3	78,620

Tabela 12 - Velocidade de liberação de ramnolipídeos a partir de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos.

(conclusão)	
Tempo (h)	Liberação (%)
3,5	84,951
4	87,095
4,5	87,325
5	87,650
12	91,660
24	96,100
36	100

Valores de médias obtidas a partir de triplicatas \pm desvio padrão.

Foi observado uma situação denominada “burst effect”, demonstrado na Figura 26, em que a liberação dos RL existe na superfície do sistema matricial e ocorre a liberação de significativas quantidades de RL rapidamente no início do ensaio ao comparar com o final (LIMA *et al.*, 2021; ZULI *et al.*, 2010). A rápida liberação inicial ocorreu pela solubilização das moléculas de RL que estavam fracamente unidas a estrutura da membrana de CB, após essa liberação inicial ocorre a liberação das moléculas aprisionadas na rede de celulose, em que a velocidade de liberação depende de fatores difusionais. Pode-se observar que houve liberação de 100% dos RL adicionados a membrana de CB até 36 horas.

Antes de avaliar a liberação dos RL na membrana de CB, foi feito o teste na membrana de CB pura, e constatada nenhuma liberação, em outras palavras não há nenhum tipo de interferente que possa, eventualmente, superestimar a liberação dos RL. Os resultados mostraram que 87% do total de RL, incorporado à membrana, foi liberado nas primeiras 4 horas (Figura 26 e Tabela 12), seguido de um período de liberação mais lenta, atingindo a completa liberação com 36 horas.

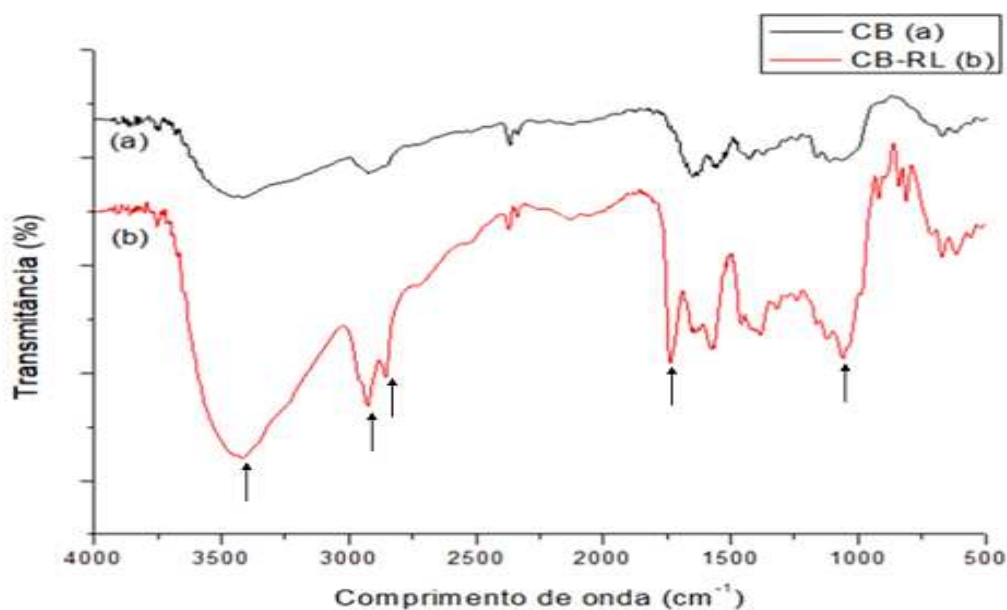
A incorporação dos RL de forma física proporcionou uma liberação rápida, comportamento ideal para o tratamento de condições agudas.

Assim, se apresentando como um excelente biomaterial para ser aplicado diretamente no local do tecido lesado (SASKA, 2011; TROVATTI *et al.*, 2012).

5.3.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A análise por FT-IR possui a capacidade de identificar grupos funcionais pertencentes a uma substância, a técnica evidencia ligações entre átomos que dão origem a bandas ou picos que ocorrem em determinadas frequências revelando informações detalhadas sobre a estrutura química presentes nas amostras (FAN; LI, 2012; KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2002; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; WATANABE *et al.*, 2007). A análise teve como objetivo identificar mudanças que sugerem a presença da incorporação de RL, comparando as membranas CB pura e protótipo de biocurativo de membrana de CB com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) (Figura 27). A análise abrangeu a janela espectral entre os picos correspondentes de 4000 a 500 cm^{-1} , a janela espectral corresponde às bandas ou picos de grupos funcionais que caracterizam as membranas estudadas.

Figura 27 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho de membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).



Fonte: O próprio autor.

A Figura 27 mostra a comparação de CB e CB-RL, observa-se que além das bandas características da CB, houve diferenças na forma e intensidade de algumas bandas presentes em CB-RL. A membrana de CB apresenta um perfil característico do polímero reportado na literatura (AMORIM, 2020; DUARTE, 2014; FRANKIEVICZ, 2014; GEA *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2013; PECORARO *et al.*, 2008; WATANABE; MORITA; OZAKI, 2006; 2007) a banda de absorção por volta de $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ resultante de associações poliméricas correspondente ao estiramento vibracional das hidroxilas (OH) presentes na membrana de CB. Além desta, as principais atribuições que caracterizam o polímero são: estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico por volta de $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$; deformação $\text{CH}_2\text{-OH}$ em $1680\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$; deformação C-OH e CH em $1430\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$; estiramento C-O(-C-O-C) em $1160\text{-}1146\text{ cm}^{-1}$. Outra banda interessante, localizada ao redor de $400\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$, é característica da deformação dos grupos OH.

Na literatura, diversos autores obtiveram um espectro semelhante com as estruturas químicas para caracterizar a presença de RL na amostra (BHARALI; KONWAR, 2011; CHANDANKERE *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2009; HOSKOVÁ *et al.*, 2015; KHADEMOLHOSSEINI *et al.*, 2019; MOUSSA; MOHAMED; SAMAK, 2014; PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008). Esse espectro possui semelhanças com os compostos localizados por volta de $3430\text{-}3380\text{ cm}^{-1}$ representando o alongamento modo do grupo OH, o que pode ser devido à interação de interação de hidrogênio entre os grupos do surfactante; $2928\text{-}2857\text{ cm}^{-1}$ representando o $-\text{CH}$ estiramento de grupos CH_2 e CH_3 de cadeias alifáticas; a presença de compostos ésteres foi confirmada pela pico característico observado em $1743\text{-}1716\text{ cm}^{-1}$, em conformidade com $-\text{C}=\text{O}$ vibrações de alongamento de grupos carbonila e $1150\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C alongamento na ramnose) indicam que todos possuem estruturas químicas e presença do ligações formadas entre átomos de carbono e grupos hidroxila no estruturas químicas que são compostos por anéis de ramnose e longas cadeias de hidrocarbonetos.

Ainda na Figura 27, observa-se (setas) que o protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL apresenta importantes bandas de adsorção do biosurfactante glicolípídico composta por anéis de ramnose e longas cadeias de hidrocarbonetos localizadas em $3416, 2922, 2853, 1740$ e 1052 cm^{-1}

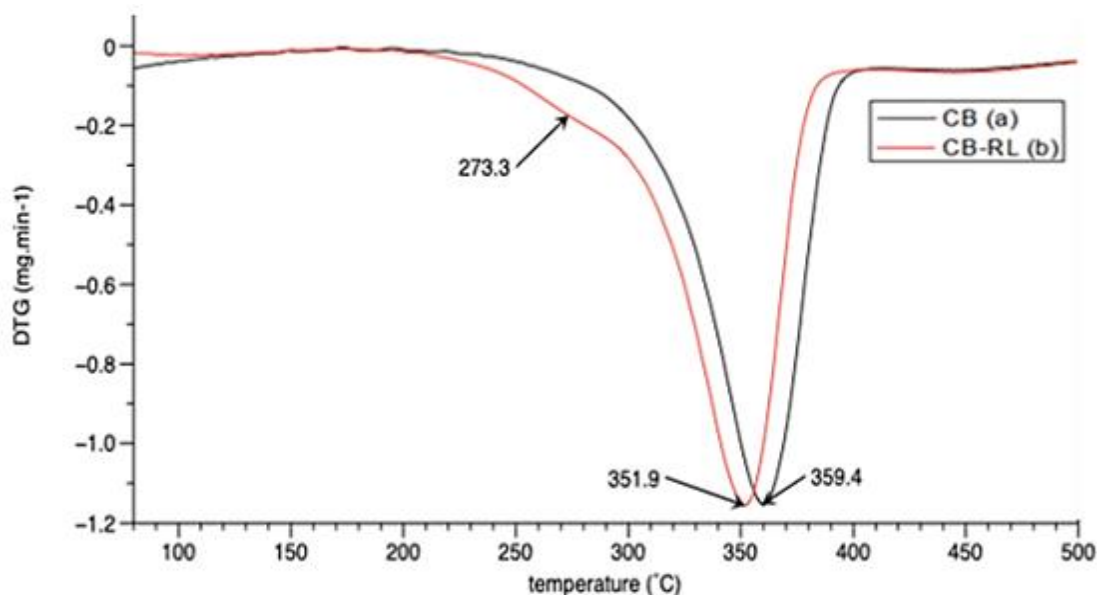
indicando a presença de estruturas químicas idênticas às dos RL, sendo possível sugerir que o RL foi incorporado à membrana de CB.

5.3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Para fins de comparação das propriedades físico-químicas das membranas de CB pura e CB-RL foi realizado a análise termogravimétrica (TGA). A Figura 28 mostra que as duas membranas apresentaram perfis de degradação semelhantes.

Na análise termogravimétrica, a variação da massa de uma amostra em atmosfera controlada é continuamente acompanhada em função do tempo ou temperatura. A figura de peso ou porcentagem em peso em função do tempo é chamado de curva termogravimétrica (WENDLAND, 1986). A amostra é aquecida a uma temperatura constante até que haja uma variação da massa. Então, a temperatura para de aumentar até que haja estabilização da massa. Com isso, a temperatura volta a aumentar até a próxima mudança da massa.

Figura 28 – Termogravimetria da membrana de celulose bacteriana pura (CB) e pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).



Fonte: O próprio autor.

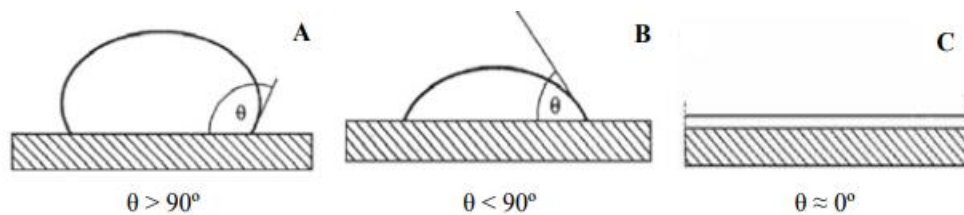
Analisando as curvas, pode-se perceber que a adição de RL não alterou significativamente a temperatura máxima de decomposição, observada para o padrão correspondente (T_{dm}). Na curva de CB sem RL há uma perda de massa com maior grau de perda em 359,4 °C (T_{dm} = 359,4 °C) característica da decomposição térmica da celulose, que apresenta os processos de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, seguida da formação de resíduos de carbono (BARDU *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2012; SASKA *et al.*, 2011). Este valor é compatível com encontrado por outros autores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2018).

Já o protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL apresenta duas temperaturas em que há uma maior razão de perda de massa, 273,3 °C: a literatura indica que a T_{dm} de RL se dá em 260 °C (ABBASI *et al.*, 2012), deste modo, esse valor pode se atribuir ao ramnolípido e 351,9 °C é o valor ligeiramente menor do que o observado para a CB sem RL. Contudo considerando a presença do glicolípido agregado à estrutura tridimensional da rede nanoestruturada, é de se esperar uma diminuição da proximidade das cadeias de polímero com conseqüente diminuição de T_{dm}. Dessa forma a incorporação ocorreu sem alterar a estabilidade térmica da CB.

5.3.3.4 Ângulo de contato (AC)

A determinação do ângulo de contato se dá pela propriedade de molhabilidade do material, determinando a hidrofobicidade e o grau de afinidade com água (HIETALA *et al.*, 2018). Uma gota de água deionizada é dispensada sobre o sólido, variando entre 0 e 180, esse ângulo formado entre superfícies designa a propriedade de molhamento do material. Quando há formação de um ângulo acima de 90° o material é considerado hidrofóbico, não havendo o molhamento do sólido pelo líquido, pois o líquido não se espalha (Figura 29A). Quando o ângulo é menor que 90°, o líquido se espalha sobre a superfície sólida e há o molhamento, o material é caracterizado como hidrofílico (Figura 29B). O ângulo de aproximadamente 0° é atribuído ao material com molhabilidade total, pelo espalhamento completo do líquido (Figura 29C) (GLEMBOTSKII *et al.*, 1972; SHAW, 1975).

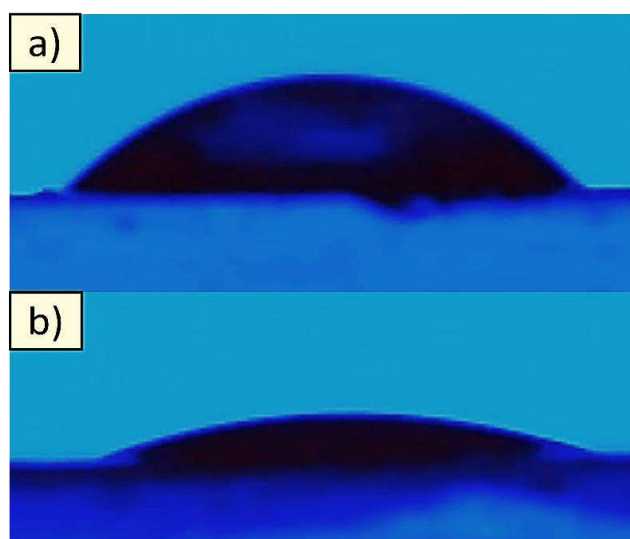
Figura 29 - Representação do ângulo de contato.



Fonte: LUZ; RIBEIRO; PANDOLFELLI (2008).

Os ângulos de contato obtidos para as amostras [membrana de CB pura (Figura 30a) e CB-RL (Figura 30b)] foram obtidos a partir de imagens capturadas por câmera acoplada na interface líquido-superfície. As imagens foram obtidas imediatamente após a dispensação de uma gota de água deionizada. A celulose é essencialmente hidrofílica devido à presença de grupos hidroxila livres na superfície, o que faz com que seja um material útil para na adesão e proliferação celular (KALASKAR, *et al.*, 2008). Esta propriedade de superfície propicia uma melhor interação com as células, e é forte indicativo de um material adequado para o crescimento celular e uso biomédico.

Figura 30 - Molhabilidade de uma gota de água deionizada sobre a superfície de a) membrana de celulose bacteriana pura e b) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).



Fonte: O próprio autor.

Os ângulos de contato das membranas de CB pura (Figura 30a) e CB-RL (Figura 30b) foram de 36,32° e 21,97°, respectivamente (Tabela 13), valores semelhantes referentes a CB pura foram encontrados (BEDOYA, 2019; SILVA JUNIOR, 2020). As amostras podem ser caracterizadas como hidrofílicas segundo os parâmetros designados no ensaio de ângulo de contato, visto que apresentaram $\theta < 90^\circ$. Estudos anteriores (WEI *et al.*, 2009) já demonstraram que esta propriedade de superfície propicia na adesão e proliferação celular (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

Tabela 13 - Resultados do ensaio de ângulo de contato para as amostras de celulose bacteriana (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).

Amostra	Ângulo de contato (°)
CB	36,32 ± 6,21
CB-RL	21,97 ± 3,47

Valores de médias obtidas a partir de triplicatas ± desvio padrão.

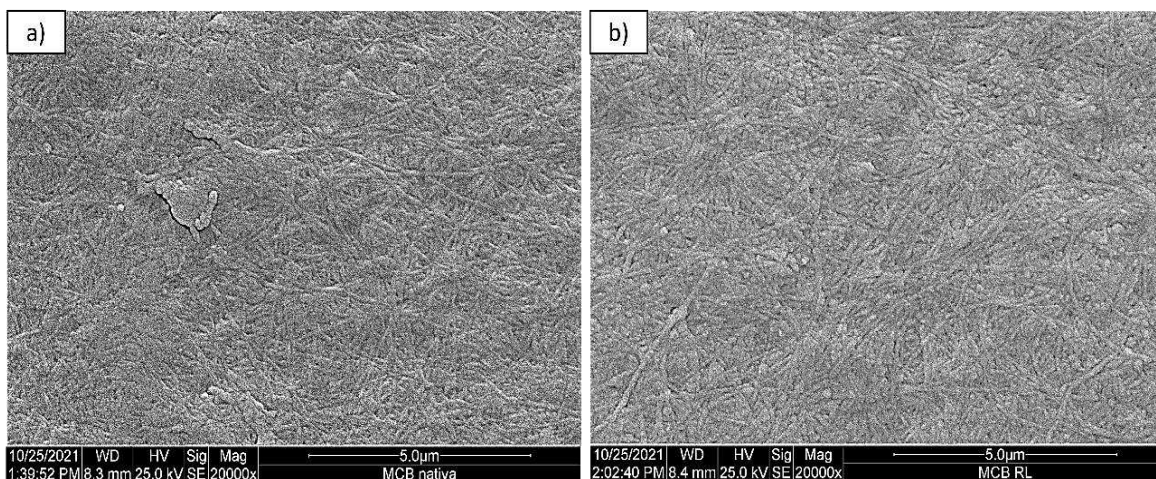
Os resultados indicam que o ângulo de contato sobre a superfície da membrana de CB pura diminui com a adição de RL, ou seja, a inclusão do RL afeta o grau de afinidade das membranas com a água, aumentando o caráter hidrofílico. Assim, o protótipo de biocurativo de membrana CB-RL apresentou-se ligeiramente mais hidrofílica sugerindo melhoria na permeação da água, na adesão, proliferação e diferenciação celular (CHANG; WANG, 2011), reforçando a indicação deste biomaterial para aplicações biomédicas (CZAJA *et al.*, 2006).

5.3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das membranas foi analisada utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Na Figura 31 observa-se membranas de CB, na forma pura (a) e com incorporação de RL (b), após submetidas ao mesmo tratamento (i.e., esterilização por 20 min, a 121 °C e 1 ATM). As estruturas são formadas por uma rede de nanofibras que possui uma maior abertura entre as. As longas fibras são entrelaçadas e dispostas

homogeneamente, características que permitem a utilização da membrana como biocurativo. Pode-se observar que a incorporação dos RL na membrana de CB não influenciou sua estrutura.

Figura 31 - Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da superfície de membranas de celulose bacterianas pura.



(a) Celulose bacteriana pura (aumento de 2000x) e (b) celulose bacteriana ramnolipídeos. Fibras de celulose de uma membrana de celulose bacteriana submetida à esterilização por 20 min, a 121°C e 1ATM.

A organização e distribuição da rede de nanofibras estão de acordo com o estudo descrito (CASTRO *et al.*, 2012; SASKA *et al.*, 2011), para membranas de CB produzidas em modo estático, cujas microestruturas foram consideradas promissoras no desenvolvimento de estudos para a utilização como biomaterial.

As propriedades mecânicas dos biomateriais são importantes na escolha de qual material utilizar na aplicação médica desejada. A celulose bacteriana é um biopolímero excretado na forma cristalizada. A morfologia da fibra pode ser definida a partir da utilização de diferentes fontes de carbono e assim, as membranas podem ser direcionadas para diferentes aplicações. A utilização da glicose gera uma maior abertura entre as fibras visando uma maior migração de células para o seu interior e favorecendo maior aderência ao material (OLIVEIRA, 2015). O tamanho e o grau de interconexão entre as fibras são pré-requisitos para permitir a invasão celular e vascular, assim como a capacidade de depósitos da matriz. Desta forma, a rede de fibras que constitui a

membrana de CB influencia significativamente a conexão de células cultivadas sobre elas, afetando o processo de viabilidade, migração, proliferação e produção de matriz extracelular (BERTI *et al.*, 2013).

5.3.3.6 Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água

A permeabilidade ao vapor de água refere-se ao transporte de moléculas de água através do material (AZEREDO *et al.*, 2017; MERCI *et al.*, 2015). Pode ser definida como a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área de um material delgado, de espessura conhecida, introduzida por uma diferença de pressão entre duas superfícies, sob condições de temperatura e umidade relativa especificadas (ASTM, 1989). A permeabilidade depende de alguns fatores, tais como: a integridade do material, a relação entre as regiões cristalinas e amorfas, a proporção hidrofílica-hidrofóbica e a mobilidade de cadeia polimérica (MULLER, 2008).

Os resultados da permeabilidade ao vapor e solubilidade em água das membranas de celulose bacteriana estão expressos na Tabela 14, essas propriedades não foram consideravelmente afetadas com a adição dos RL. A presença de grupos polares ou sítios ativos no polissacarídeo leva a uma constante interação com a umidade do ambiente, ganhando ou perdendo moléculas de água até atingir o teor de umidade de equilíbrio (MALI *et al.*, 2004), e as mudanças na estrutura podem ter efeitos importantes nas propriedades de difusão das moléculas de água ao longo do filme (AGUIRRE-LOREDO *et al.*, 2016; BERTUZZI *et al.*, 2007; MUKURUBIRA *et al.*, 2017). Neste trabalho a incorporação dos RL não alterou propriedades importantes da celulose, como a permeabilidade ao vapor de água. De acordo com Sulaeva *et al.* (2015), a permeabilidade a gases e vapor de água são benefícios que se destacam em utilizar a CB com a função de curativo.

Tabela 14 - Permeabilidade ao vapor de água e solubilidade em água para as amostras de celulose bacteriana (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).

Amostras	Permeabilidade ao vapor de água (g/msPa)	Solubilidade em água a 25 °C (%)
CB	$3,15 \pm 0,10 \times 10^{-11}$ ^a	$5,82 \pm 0,02$ ^b
CB-RL	$3,45 \pm 0,12 \times 10^{-11}$ ^a	$9,08 \pm 0,06$ ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Cazón e colaboradores (2020) encontraram resultados de permeabilidade ao vapor de água semelhantes utilizando a celulose bacteriana, com valores de $2,44 \times 10^{-11}$ g/msPa em condições de armazenamento e umidade relativa (UR) similares às empregadas neste trabalho.

O protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL apresentou solubilidade significativamente maior que a da membrana de CB pura (Tabela 14), o que pode ser justificado em parte pela fração solúvel da molécula do RL, pois a solubilidade está diretamente relacionada à afinidade por água dos componentes da membrana. Barud (2010), Almeida e colaboradores (2013) e Martins e colaboradores (2009) relataram que matrizes poliméricas com maiores proporções de celulose bacteriana resultam em materiais menos solúveis em água. Esses resultados podem estar relacionados com a alta cristalinidade da CB, que devido ao diâmetro menor das suas microfibrilas apresenta elevada capacidade de retenção e absorção de água, e baixa capacidade de solubilização (CHÁVEZ-PACHECO *et al.*, 2004; PHISALAPHONG; JATUPAIBOON, 2008).

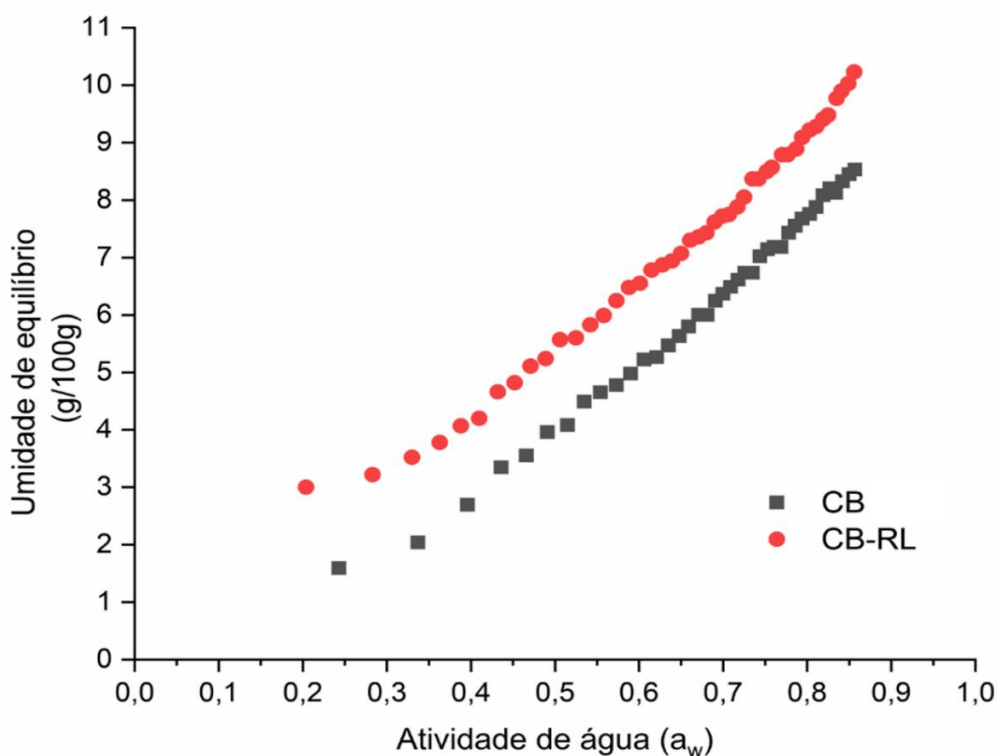
5.3.3.7 Isoterma de adsorção de água

A adsorção é um fenômeno físico-químico onde se tem a adesão das moléculas de um fluido (adsorbato) em uma superfície sólida (adsorvente). O estudo de um processo de adsorção mostra a capacidade de ligação de água presente no material em determinada umidade relativa e requer conhecimento

dos dados de equilíbrio e da velocidade com que esta é alcançada (VILLALOBOS *et al.*, 2006).

Na Figura 32 estão apresentadas as isotermas de adsorção de água das membranas de CB com e sem a adição de RL, onde está plotada a umidade de equilíbrio das amostras em função da atividade de água das amostras. Esse estudo possibilita prever o comportamento do material quando exposto a um ambiente com umidade relativa conhecida, sendo possível conhecer a estabilidade deste material durante sua estocagem (ALMEIDA, 2010). Observou-se que as umidades de equilíbrio aumentaram com o acréscimo da atividade de água em ambas as membranas, em especial em valores de a_w acima de 0,50 (Figura 32), comportamento este característico de materiais hidrofílicos. De forma similar Cazón *et al.* (2020) relataram o mesmo comportamento para filmes de CB, que apresentaram grande incremento nas suas umidades de equilíbrio em a_w acima de 0,55.

Figura 32 – Isotermas de adsorção de água da membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).



Fonte: O próprio autor.

O modelo de BET - Brunauer-Emmett-Teller foi utilizado para representar às isotermas de sorção a água forneceu altos coeficientes de correlação, com R^2 variando de 0,97 a 0,98, entre os tratamentos, indicando significativa representação dos dados (Tabela 15). O valor da água de monocamada (m_0) não foi afetado de forma importante com a adição de ramnolipideos, ou seja, a sua adição não afetou a higroscopicidade das membranas. De acordo com Cazón *et al.* (2020), a água de monocamada indica a quantidade de moléculas de água adsorvidas em uma única camada por grama de filme seco, sendo um parâmetro relacionado ao número de sítios de adsorção livres. Estes autores relataram valores na faixa de 3,82% para membranas de celulose bacteriana, bastante próximo aos valores obtidos neste trabalho.

Tabela 15 – Parâmetro de ajuste do modelo BET para as isotermas de adsorção a água em membrana de celulose bacteriana pura e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) e seus coeficientes de determinação (R^2).

Amostra	m_0	C_b	R^2
CB	2,964	2,9252	0,98
CB-RL	2,851	12,9872	0,97

$M = (C_b m_0 a_w) / (1 - a_w) (1 + (C_b - 1)a_w)$, M é a umidade de equilíbrio (g de água/100 g de sólidos), a_w é a atividade de água, m_0 é o valor da monocamada (g de água /100 g de sólidos), e C_b é a constante BET.

5.3.8 Propriedades Mecânicas e Ópticas

As propriedades mecânicas expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento quando submetidos às forças de tração. A norma D 882-91 da ASTM (1996) diz que um modo de controlar a qualidade da membrana está ligado as propriedades de tração podendo variar conforme a espessura da amostra, método de preparação, velocidade de ensaio, tipo de aperto usado e forma de medir extensão. As propriedades mecânicas das amostras estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Propriedades mecânicas de tração da membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).

Amostra	Resistência máxima à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Módulo de Young (MPa)
CB	136,91 ± 47,58 ^a	3,55 ± 0,72 ^a	3193,31 ± 458,20 ^a
CB-RL	149,89 ± 31,90 ^a	3,67 ± 1,25 ^a	2829,53 ± 105,14 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De forma geral, quando comparadas as membranas de CB pura e CB-RL não foram observadas diferenças significativas nas propriedades mecânicas analisadas, indicando que a concentração de RL adicionada não foi suficiente para afetar as propriedades mecânicas da membrana de CB.

O fato da resistência à tração ter se mantido praticamente inalterada com a adição dos RL fornece um indicativo de que houveram poucas descontinuidades na matriz, garantindo assim a transferência adequada (SANTOS *et al.*, 2010). Os valores de resistência máxima à tração e módulo de Young foram superiores aos relatados por Cazón *et al.* (2020), que relataram valores entre 15 e 23 MPa para a resistência, e entre 609 e 1426 MPa para o módulo de Young.

Barud (2010) relatou o estudo de novos materiais baseados em CB, e apresentou resultados de alongamento entre 1,5 - 2,0%, valores inferiores aos encontrados no presente trabalho, que foram de 3,55% para CB e 3,67% para CB-RL (Tabela 16). Cazón *et al.* (2020) relataram valores de alongamento entre 1,36 e 3,71% para filmes de CB.

A Tabela 17 mostra os resultados de transparência e opacidade obtidos para as amostras de CB com e sem a adição de RL.

Tabela 17 – Transparência e opacidade da membrana de celulose bacteriana pura (CB) e de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL).

Amostra	Espessura (mm)	Transparência (%)	Opacidade
CB	0,051 ± 0,001 ^a	35,19 ^a	7,74 ^a
CB-RL	0,050 ± 0,002 ^a	36,74 ^a	4,70 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As membranas de CB pura e com RL apresentaram espessuras similares, sem diferença significativa entre si, com transparência de 35,19 e 36,74 (%), e opacidade de 7,74 e 4,70, respectivamente. Cazón e colaboradores (2020) apresentaram valores de transparência menores que os observados neste trabalho, com valores variando de 21,34 a 27,42 e valores de opacidade de 18,33 a 28,65 com espessuras entre 0,030 e 0,040 mm. Ao contrário, Silva e colaboradores (2017) relataram transparência de 74% para membrana de celulose bacteriana pura e opacidade entre 2,16 a 4,88.

Filmes transparentes são caracterizados por baixos valores de opacidade, e estes parâmetros são fortemente afetados pela espessura do filme. Por esta razão, é importante incluir ambos os valores na análise, comparando o parâmetro transparência/opacidade em função dos valores de transmitância e absorvância (GARCÍA *et al.*, 2015; SANTACRUZ, RIVADENEIRA, CASTRO, 2015). A medida da transmitância é muito útil para se avaliar a transparência dos filmes, podendo ser um indicativo da miscibilidade entre os componentes de um filme (COIMBRA, 2016).

5.3.4 Estudo *In Vitro* de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos

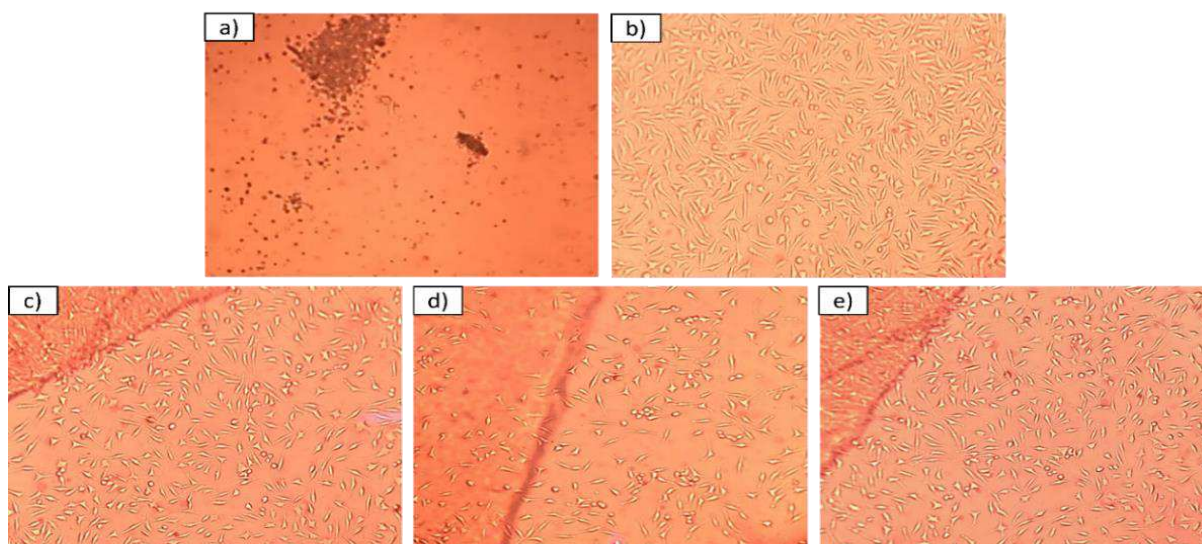
5.3.4.1 Proliferação celular

A interação das células com a superfície de biomateriais é um parâmetro muito importante. Assim, o conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e dos processos a nível celular, durante a

proliferação e adesão, podem colaborar para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (KUMARI *et al.*, 2002). A molhabilidade do biomaterial é um fator que influencia a adesão e a proliferação celular, uma vez que, um biomaterial hidrofóbico dificulta a transferência de sinalização de proteínas entre o substrato e o interior da célula (GROTH; ALTANKOV, 1996).

A proliferação das células de mamíferos pode ser definida como um aumento no número de células resultante da finalização do ciclo de divisão celular em resposta a sinais extracelulares. Neste trabalho, a proliferação celular foi realizada até a confluência das células, que ocorreu em um período de 72 h de cultivo. A confluência pode ser observada tanto no controle negativo, como na membrana de CB comercial, CB pura e CB-RL (Figura 33).

Figura 33 - Microscopia óptica da proliferação de fibroblastos após 72 h.



Aumento de 10x em: a) controle positivo com látex, b) controle negativo com as células cultivadas diretamente sobre as placas de poliestireno, c) celulose bacteriana comercial d) celulose bacteriana pura, e) celulose bacteriana com ramnolipídeos.

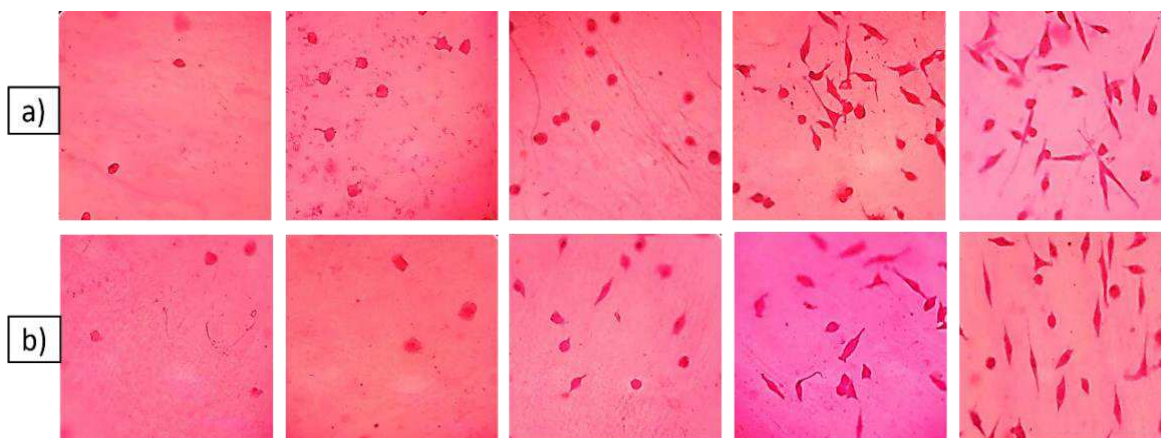
Após um período de 24 h observou-se significativa proliferação celular, tanto no controle positivo com látex, controle negativo com as células cultivadas diretamente sobre as placas de poliestireno, na membrana de CB comercial, na CB pura e na CB com RL, obtendo a proliferação total medido em 72 horas (Figura 33). Os resultados de proliferação celular obtidos neste trabalho, em média, apresentam um incremento de aproximadamente 500% em relação a resultados previamente reportados (BACKDAHL *et al.*, 2006). A adição

de RL não apresentou nenhum efeito sobre a proliferação celular, assim tanto membrana de CB pura como CB-RL mostraram-se como promissor biomaterial para a proliferação celular.

5.3.4.2 Adesão celular

Após período de cultura de 4, 8, 24 e 72 horas, observou-se que os padrões de distribuição celular entre as células na membrana de CB pura e na CB-RL foram semelhantes, como pode ser observado nas imagens de microscopia óptica (Figura 34). As medidas de adesão foram realizadas em curtos períodos de cultura, pois após a semeadura dos fibroblastos praticamente todas as células aderiram nas membranas, as células mostraram uma distribuição mais homogênea na superfície das membranas, mas também apresentaram agrupamentos. Houve a aderência de fibroblastos e rápidas mudanças morfológicas com mudanças de formatos arredondados a formatos alongados, depois de cerca 1 hora de cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados em superfícies de diferentes materiais (CHO *et al.*, 1996), onde a velocidade de aderência das células no biomaterial está relacionada com características físico-químicas deste (GOTOH; TAMADA, 2005; KUMARI *et al.*, 2002).

Figura 34 - Microscopia óptica da adesão de fibroblastos após 4, 8, 24, 48 e 72h em membranas de CB e CB-RL.

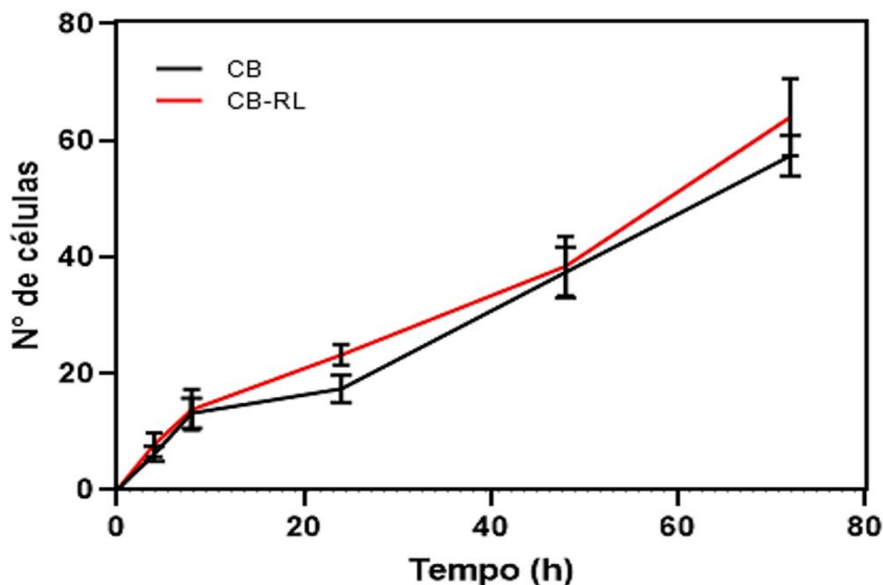


Adesão de fibroblastos respectivamente (esquerda para direita) nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72h; a) em celulose bacteriana pura b) celulose bacteriana com ramnolipídeos.

Nas primeiras 24 h de cultivo as células na membrana de CB pura (controle) e CB-RL mantiveram uma forma arredondada (Figuras 34a e 34b), e tiveram tendência a se agrupar. Após esse tempo passaram a apresentar forma alongada, típica de fibroblastos, e atingiram confluência em 72 h. O agrupamento de células que ocorreu pode ser explicado pela maior força de adesão entre os próprios fibroblastos, em comparação com a adesão entre os fibroblastos e a membrana. Adicionalmente, fibroblastos interconectados apresentam natureza contrátil. Então, se a força de contração entre a rede interconectada das células for mais intensa do que a força de adesão entre os fibroblastos e a membrana, grupos de células serão formados (SANCHAVANAKIT *et al.*, 2006).

A Figura 35 mostra as curvas de adesão dos fibroblastos nas membranas em uma área de 0,425 mm². A menor detecção de fibroblastos aderidos encontrados neste teste de adesão, em relação às contagens de proliferação, pode ter sido influenciada pelas diversas etapas de lavagem durante o procedimento de coloração das células, como relatado por Groth e Altankov (GROTH; ALTANKOV, 1996). Outros fatores também podem interferir neste tipo de ensaio de adesão, como o número da passagem celular e a distribuição homogênea ou não das células sobre o material.

Na comparação entre a taxa de adesão das células nas membranas houve um aumento de fibroblastos aderidos medido em 72 h, que corresponde a cerca de 820% para membrana de CB pura e 925% para CB-RL. Na comparação entre o número de células aderidas (Figura 35) a membrana de CB-RL mostrou-se um biomaterial mais aderente já que apresentou um maior número de células aderidas, porém as curvas de adesão seguem o mesmo comportamento.

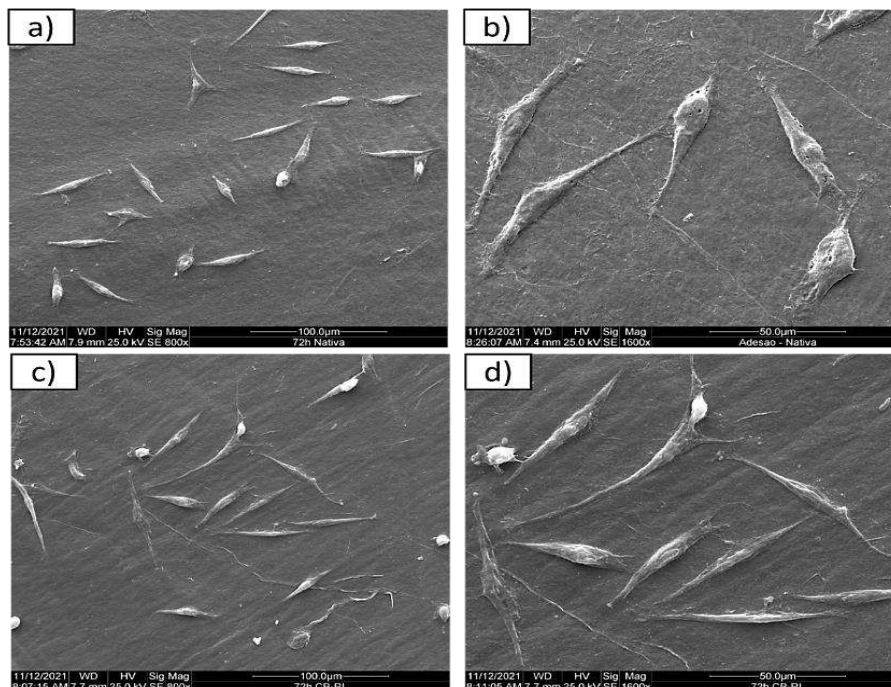
Figura 35 - Contagem de células aderidas até 72h

Contagem de células aderidas em membrana de celulose bacteriana pura e membrana de celulose bacteriana com ramnolipídeos, em uma área de 0,425 mm².

5.3.4.2 Morfologia celular

A Figura 36 apresenta micrografias de MEV da adesão das células sobre as membranas CB pura e CB-RL em diferentes magnitudes de aumento. As células aderidas à superfície, após 72h, apresentam-se distribuídas pelas membranas com formatos alongados, típico do comportamento de fibroblastos. As Figuras 36a e 36b mostram com detalhes a adesão sobre as membranas de CB pura e as Figuras 37c e 37d sobre CB-RL. As protuberâncias formadas pelos fibroblastos interagem com as nanofibras celulósicas da membrana, conferindo adesão a essas células. Pode-se afirmar que os fibroblastos aderem e proliferam nas membranas de CB e que a presença do RL não interfere, estando de acordo com os resultados obtidos na adesão e proliferação celular.

Figura 36 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de fibroblastos L929 aderidos a celulose bacteriana pura e celulose bacteriana incorporada com ramnolipídeos após 72 h.



(a) Cultura de fibroblastos aderidos a celulose bacteriana pura (aumento de 8000x); (b) Cultura de fibroblastos aderidos a celulose bacteriana pura (aumento de 1600x) (c) Cultura de fibroblastos aderidos a celulose bacteriana com ramnolipídeos (aumento de 8000x); (d) Cultura de fibroblastos aderidos a celulose bacteriana modificada incorporada com ramnolipídeos (aumento de 1600x).

5.3.5 Estudo *In Vivo* de Protótipo de Biocurativo de Membrana de Celulose Bacteriana com Incorporação de Ramnolipídeos

Foram realizados testes *in vivo* nos atendimentos de rotina cirúrgica do Hospital Veterinário da UEL, com a disposição do protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) embalados em envelopes de grau cirúrgico e autoclavados a 121 °C por 20 minutos (Figura 37).

A Figura 38 demonstra a utilização de protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL cobrindo ferida em face medial da coxa de cão ultrapassando cerca de 1 cm ultrapassar a borda . Os testes foram inicialmente analisados macroscopicamente com perspectivas futuras para novas análises (Item 7).

Figura 37 – Envelope com protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) estéril.



Fonte: O próprio autor.

Figura 38 – Aplicação de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos (CB-RL) sobre ferida em face medial da coxa de cão em diferentes ângulos.



Fonte: O próprio autor.

A Figura 39a mostra uma ferida contaminada em primeiro dígito de membro torácico com avulsão elíptica da pele ao redor do dígito, com bordas irregulares e exposição do tecido subcutâneo e musculatura. A Figura 39b mostra a mesma ferida em fase final de cicatrização após 8 dias, notando-se

contração quase que total e havendo somente a presença de tecido de granulação de aproximadamente 0,3 cm de diâmetro, não se observa mais sinais de contaminação. Por fim a ferida foi fechada por aproximação.

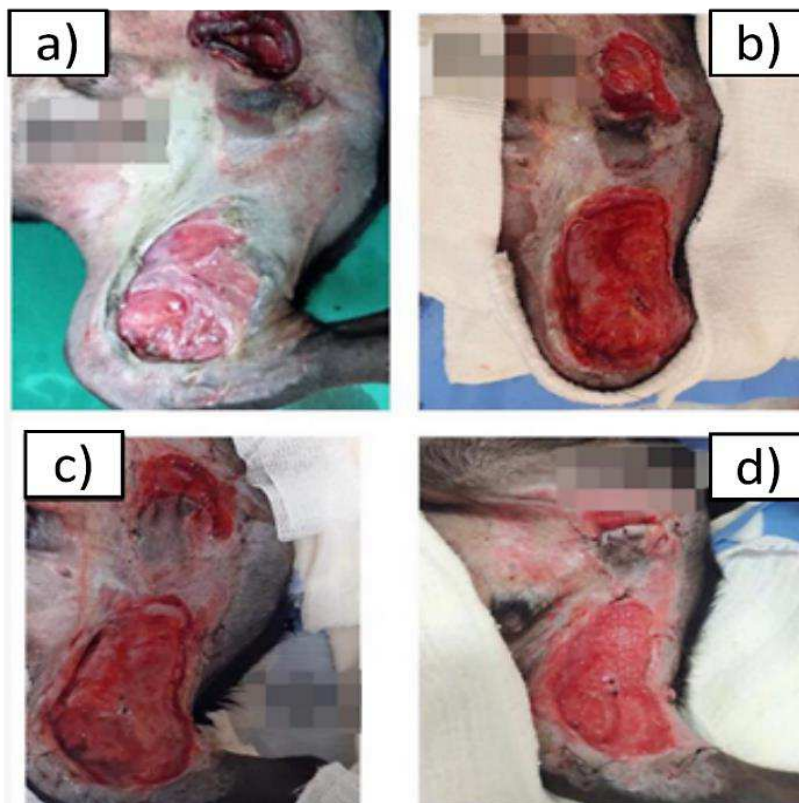
Figura 39 - Ferida em primeiro dígito de membro torácico em gato.



Fonte: O próprio autor.

A Figura 40a apresenta feridas contaminadas por avulsão da pele em face medial da coxa de cão, com exposição de tecido subcutâneo e musculatura, com presença de áreas de necrose e outra ferida na região da bolsa escrotal. Após 5 dias (Figura 40b) a figura mostra o início de formação de tecido de granulação, as bordas das feridas estão regulares, e não há mais tecido necrótico. As Figuras 40c e 40d mostram a ferida após 7 e 10 dias, respectivamente, podendo observar uma diminuição da área da ferida e maior preenchimento por tecido de granulação, não havendo mais sinais de contaminação e nota-se que o tecido está mais rosado. Por fim, as feridas foram fechadas por meio de cirurgia.

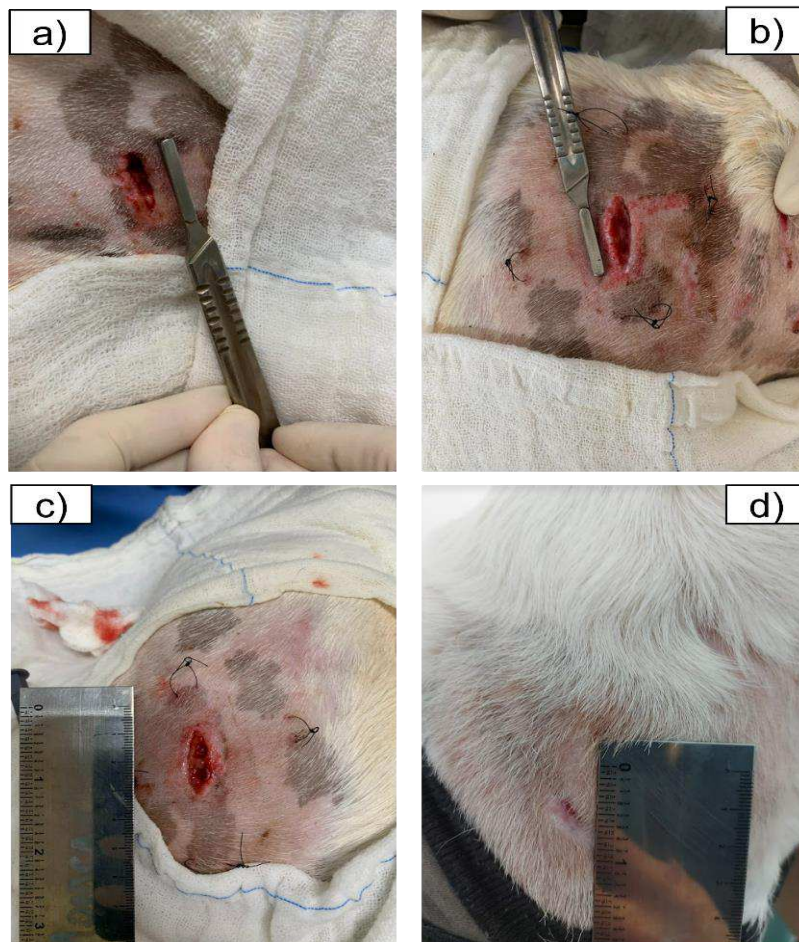
Figura 40 - Ferida em face medial da coxa em cão.



Fonte: O próprio autor.

A Figura 41a mostra ferida contaminada, penetrante e lacerativa, em região escapular de membro torácico direito de cão, com aspecto profundo. Após 3 dias (Figura 41b) apresenta bordas mais regulares e elevadas, início de epitelização, e início de formação do tecido de granulação. Há 4 pontos simples ao redor da ferida para a realização de bandagem do tipo Tie-Over. A Figura 41c mostra a ferida após 5 dias, podendo ser observado um tecido de granulação bem instituído, ferida com aspecto mais superficial, com coloração rosada. Pontos simples para realização da bandagem. E após 12 dias (Figura 41d) a ferida quase completamente fechada após cicatrização por segunda intenção.

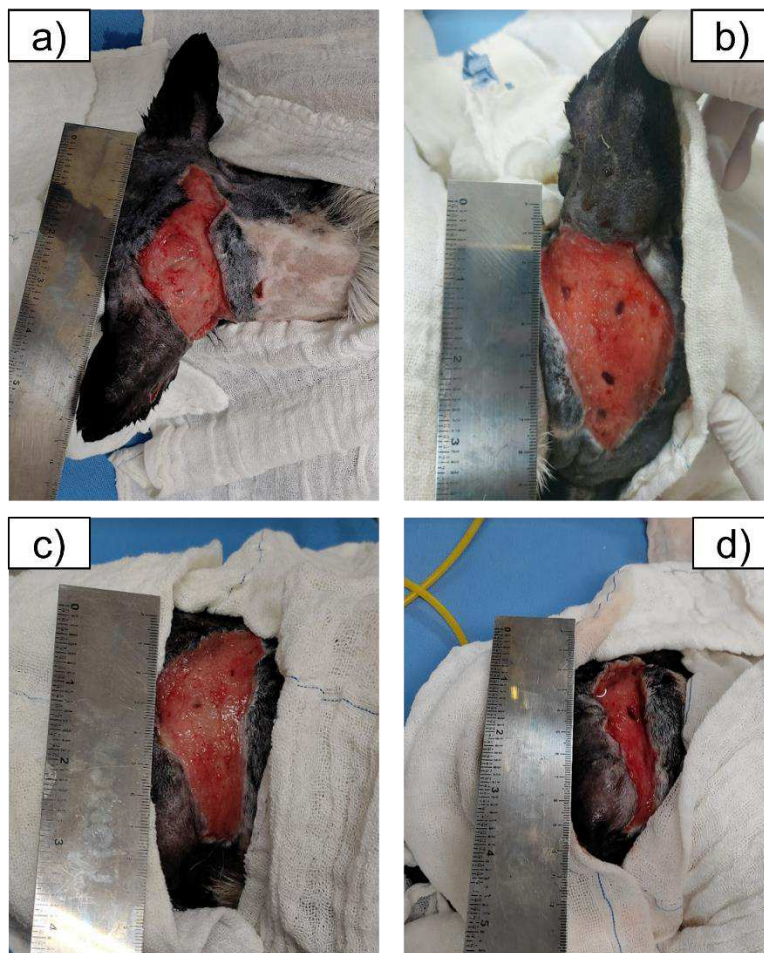
Figura 41 - Ferida em região escapular de membro torácico direito em cão.



Fonte: O próprio autor.

A Figura 42a mostra ferida contaminada, lacerativa, extensa, em região occipital de cão. Apresenta bordas irregulares. Após 3 dias (Figura 42b) há áreas com início de formação de tecido de granulação, coloração mais rosada e homogênea, início de epitelização, e bordas com aspectos mais regulares. Ferida aparenta menor extensão. Em 5 dias (Figura 42c) o tecido de granulação presente quase na totalidade da área de ferida. Houve maior avanço das bordas, e a coloração se apresenta mais clara e rosada. Não há áreas de tecido necrótico. E em 8 dias (Figura 42d) a ferida com tecido de granulação bem instituído, bordas epitelizadas bem aproximadas, diminuição evidente de área da ferida.

Figura 42 - Ferida em região occipital em cão.



Fonte: O próprio autor.

5.4 CONCLUSÃO

O protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL foi preparado e então caracterizado por métodos físico-químicos. Foi verificada a presença de estruturas químicas idênticas às dos RL nas membranas modificadas, apresentando um perfil de liberação inicial rápido e liberação total em até 36 horas. Análises térmicas, mecânicas e morfológicas mostraram que a incorporação ocorreu sem afetar sua estrutura, assim como não alterou uma importante característica, principalmente para seu uso como curativo, que é a permeabilidade ao vapor de água. Análises como a molhabilidade e a solubilidade mostraram que a membrana de CB-RL se apresentou ligeiramente

mais hidrofílica. Resultado que pode ser justificado em parte pela fração solúvel da molécula do RL.

Na etapa *in vitro* pôde-se observar comportamentos similares entre a membrana de CB pura e CB-RL, mostrando que a presença do RL não interfere nas boas características já apresentadas pela CB. Observou-se significativa proliferação de fibroblastos após um período de 24 horas e proliferação total em 72 horas, com um maior número de células aderidas a CB-RL, porém com o mesmo comportamento nas curvas de adesão, sugerindo ausência de efeito citotóxico.

A aplicação *in vivo* do protótipo de biocurativo de membrana de CB-RL foi representada pela utilização em 4 pacientes com 5 feridas constatando redução da área do ferimento, ausência de sinais de contaminação e preenchimento por tecido de granulação. As membranas de CB-RL apresentaram fácil manuseio e mantiveram-se íntegras durante o período de aplicação. As membranas de CB mostraram excelente capacidade carreadora de RL e o conjunto de resultados sugere efeitos sinérgicos entre CB e RL. O protótipo de biocurativo desenvolvido mostrou-se potencialmente efetivo, biocompatível e como uma possível alternativa de biomaterial para a área biomédica.

5.5 REFERÊNCIAS

ABBASI, H., HAMED, M. M., LOTFABAD, T. B., ZAHIRI, H. S., SHARAFI, H., MASOOMI, F., MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A., ORTIZ, A., AMANLOU, M., & NOGHABI, K. A. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 211-219, 2012.

AGUIRRE-LOREDO, R. Y., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I., MORALES-SÁNCHEZ, E., GÓMEZ-ALDAPA, C. A., VELAZQUEZ, G. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. **Food Chemistry**, v.196, p.560–566, 2016.

ALMEIDA, C. B.. **Características estruturais e funcionais de biofilmes produzidos com zeína e óleos vegetais comestíveis**. 91 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010.

ALMEIDA, DENISE M.; WOICIECHOWSKI, ADENISE L.; WOSIACKI, GILVAN; PRESTES, ROSILENE A.; PINHEIRO, LUÍS A. Propriedades Físicas, Químicas e de Barreira em Filme Formados por Blenda de Celulose Bacteriana e Fécula de Batata. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 4, p. 538-546, 2013.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL ASTM. Standard Test Method for Permeability of Rocks by Flowing Air. In **Annual Book of ASTM Standards**, Philadelphia: American Society for testing and Materials, 1989.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL (ASTM). Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95. **Annual book of ASTM. Philadelphia (USA): ASTM**, 1996.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting – D882-02. **Annual Book of ASTM Standards**: Philadelphia: ASTM, 2002.

AMORIM, J. D. P. **Obtenção de celulose bacteriana aditivada com extrato de própolis para aplicação em cosméticos**. 109f. Dissertação (Ciência de Materiais). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

APARNA, A; SRINIKETHAN, G; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p.23-29, 2012.

ARAUJO, J. S. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA usando glicose como substrato e aplicações**. 93f. Dissertação (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL (ASTM). Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95. In **Annual book of ASTM**. Philadelphia (USA): ASTM, 1996.

AZEREDO, H. M. C.; ROSA, M. F.; HENRIQUE, L.; MATTOSO, C. Nanocellulose in biobased food packaging applications. **Industrial Crops & Products**, v. 97, p. 664–671, 2017.

BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.

BARUD, H. S. **Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 172 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2010.

BEDOYA, J. G. M. **Biomaterial a base de celulose bacteriana com aplicação na regeneração de tecido cutâneo**. 79f. Dissertação (Ciência de Materiais). Universidade Estadual Paulista, 2019.

BERTUZZI, M. A., CASTRO VIDAURRE, E. F., ARMADA, M., GOTTIFREDI, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v.80, n.3, p.972–978, 2007.

BHARALI, P.; KONWAR, B. K. Production and Physico-chemical Characterization of a Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* OBP1 Isolated from Petroleum Sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v, 164, p. 1444–1460, 2011.

BERTI, F. V.; RAMBO, C. R.; DIAS, P. F. e PORTO, L. M. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4684-4691. 2013.

CAMILIOS NETO, D; MEIRA JA, ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, p. 441-448, 2008.

CAMILIOS NETO, D. **Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido**. Tese (Doutorado em Bioquímica). 157f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2010.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J. L.; GAÑÁN, P. F. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

- CAZÓN, P.; VELÁZQUEZ, G.; VÁZQUEZ, M. Bacterial cellulose films: Evaluation of the water interaction, **Food Packaging and Shelf Life**, v. 25, p. 100526, 2020.
- CHANDANKERE, R.; RAVIKUMAR, Y.; ZABED, H. M.; SABAPATHY, P. C.; YUN, J.; ZHANG, G.; QI, X. Conversion of Agroindustrial Wastes to Rhamnolipid by *Enterobacter* sp. UJS-RC and Its Role against Biofilm-Forming Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68-52, p. 15478-15489, 2020.
- CHANG, H.; WANG, Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In: EBERLI, D. (Ed.). **Regenerative medicine and tissue engineering: cells and biomaterials**, p. 569-588, 2011.
- CHÁVEZ-PACHECO, J.L.; YEE, S.M.; ZENTELLA, M. C.; MARVÁN, E. E. Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y Aplicaciones. **Rev Esp Cienc Quim Biol**, v.7, p.18-25, 2004.
- CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, 26, 6565-6578, 2005.
- CHO, C. S.; KOBAYASHI, A.; GOTO, M.; PARK, K. H.; AKAIKE, T. Difference in adhesion and proliferation of fibroblast between Langmuir-Blodgett films and cast surfaces of poly(γ -benzyl L-glutamate)/poly(ethylene oxide) diblock copolymer. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.32, n.3, p.425-432, 1996.
- COIMBRA, C. G. O. **Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis**, 138 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145-151, 2006.
- DE OLIVEIRA, S. A., DA SILVA, B. C., RIEGEL-VIDOTTI, I. C., URBANO, A., DE SOUSA FARIA-TISCHER, P. C., & TISCHER, C. A. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.97, p.642-653, 2017.
- DERNELL, W. S. Initial wound management. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v. 36, n. 4, p. 713-2006.
- DONIO, M. B. S. *et al.* Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 11, p. 876-883, 2013.
- DUARTE, E.B. **Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e**

hidroxiapatita como rota para valorização de resíduos agroindustriais.

Tese doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

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

ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New Biotechnology**, v. 36, p. 26-36, 2017.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, n. 1, p. 1-9, 1999.

FAN, J., LI, Y. Maximising the yield of nanocrystalline cellulose from cotton pulp fiber. **Carbohydr. Polym**, v. 88, p. 1184–1188, 2012.

FRANKIEVICZ, R. **Propriedades reológicas, térmicas e mecânicas de misturas de celulose bacteriana e polipropileno.** Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). 90p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2014.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

GARCÍA, M. A.; PÉREZ, L.; DE LA PAZ; N., GONZÁLEZ, J.; RAPADO, M.; CASARIEGO, A. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on chitosan film properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 174–180, 2015.

GEA, S., REYNOLDS, T.C., ROOHPUR, N., *et al.*, “Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behavior of bacterial cellulose after a two-step purification process”, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9105-9110, 2011.

GLEMBOTSKII, V. A.; KLASSEN, V. I.; PLAKSIN, I. N. **Flotation. Translated by Hammond, R. E.** (editor). Metally, T. (editor in American translation). New York, 1972.

GUO, J.; CATCHMARK, J. M. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v.87, n.2, p. 1026–1037, 2012.

GUO, Y. P., HU, Y. Y., GU, R. R. AND LIN, H., Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by

Pseudomonas aeruginosa mutant MIG-N146. **J. Colloid Interface Sci.**, p. 331, 356, 2009.

GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 698-725, 2007.

GODINHO, J. **Hidrogéis de Celulose Bacteriana Incorporados com Frações de Aloe vera**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

GOELZER, F.D.E; FARIA-TISCHER, P.C.S; VITORINO, J. C; SIERAKOWSKI, M. R.; TISCHER C. A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 546–551, 2009.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Food packaging and preservation**, p. 159–181, 1994.

GOTOH, Y.; TAMADA, Y. *In vitro* study of initial cell attachment to the surfaces coated with conjugates consisting of silk fibroin and chitooligosaccharides. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v.74, n.2, p.39-45. 2005.

GROTH, T.; ALTANKOV, G. Studies on cell-biomaterial interaction role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. **Biomaterials**, v.17, n.12, p.1227-1234. 1996.

GUSTAFSSON S, HULTBERG M, FIGUEROA R, RENGEFORS K. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. **Harmful Algae**, v. 8. n. 6. p. 857-863, 2009.

HABA, E; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS; M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.379–387, 2000.

HAN, J. H.; FLOROS, J. D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. **J. Plast. Film Sheeting**, v. 13, p. 287-298, 1997.

HIETALA, M., VARRIO, K., BERGLUND, L., SOINI, J., OKSMAN, K. Potencial de resíduos sólidos urbanos de papel como matéria-prima para produção de nanofibras de celulose. **J. Waste Manag**, v. 80, p. 319-326, 2018.

HOSKOVÁ, M.; JEZDÍK, R.; SCHREIBEROVÁ, O.; CHUDOBA, J.; SÍR, M.; CEJKOVÁ, A.; MASÁKA, J.; JIRKU, V.; REZANKA, T. Structural and physicochemical characterization of rhamnolipids produced by *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 45–51, 2015.

- HUANG, H.-C.; CHEN, L.-C.; LIN, S.-B.; HSU, C.-P.; CHEN, H.-H. In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. **Bioresource Technology**, v.101, n.15, p.6084–6091, 2010.
- KAČURÁKOVÁ, M.; SMITH, A. C.; GIDLEY, M. J. e WILSON, R. H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145-1153. 2002.
- KALASKAR, D. M.; GOUGH, J. E.; ULIJN, R. V.; SAMPSON, W. W.; SCURR, D. J.; RUTTEN, F. J.; ALEXANDER, M. R.; MERRY, C. L. R.; EICHHORN, S. L. Controlling cell morphology on amino acid-modified cellulose. **Soft Matter**, v. 4, n. 5, p. 1059-1065, 2008.
- KHADEMOLHOSSEINI, R.; JAFARI, A.; MOUSAVI, S. M.; HAJFARAJOLLAHB, H.; NOGHABIC, K. A.; MANTEGHIANA, M. Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. **RSC Adv.**, 2019, 9, 7932-7947, 2019.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Angewandte Chemie. **International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.
- KRONEMBERGER, F. A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RG, 2007.
- KUMARI, T. V.; VASUDEV, U.; KUMAR, A.; MENON, B. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends in biomaterials and artificial organs**, v.15, n.2, p.37-41. 2002,
- 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, p. 1433, 2019.
- LIMA, A. F.; PEGORIN, G. S.; MIRANDA, M. C. R.; CACHANESKI-LOPES, J. P.; SILVA, W. M.; BORGES, F. A.; GUERRA, N. B.; HERCULANO, R. D.; BETAGIN-NETO, A. Ibuprofen-loaded biocompatible látex membrane for drug release: Characterization and molecular modeling. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 19, p. 1-13, 2021.
- LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H.-J.; YU, C. M. e HSU, S. H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603-611. 2013.
- LIU, J.; LI, Y.; RONG, X.; LIN, W.; ZHANG, T.; WANG, B.; LI, X. B.; JIANG, S.; ZHANG, Q. Application of Crystalline Cellulose Membrane (Veloderm ®) on Split-Thickness Skin Graft Donor Sites in Burn or Reconstructive Plastic

Surgery Patients. **Journal of Brun Care & Research.**, p. 176–182, 2013.

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, p. 2016.

LONG, X. L.; SHEN, C. S.; HE, N.; ZHANG, G.; MENG, Q. Enhanced rhamnolipids production via efficient foam-control using stop valve as a foam breaker. **Bioresource Technology**, v. p. 2016.

LÖNROTH, E. C. & DAHL, S. E. Citotoxicity of liquidas and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazolium and neutral red tests. **Acta Scandinavica**, v. 61, p. 52-6, 2003.

MARIANO, D. C. O. **Caracterização estrutural e físico-química dos biossurfactantes produzidos por uma cepa de *Burkholderia kururiensis* obtida por engenharia metabólica.** 65f. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ, 2012.

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., GARCÍA, M. A., MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v.56, p.129-135, 2004.

MARTINS, I. M. G.; MAGINA, S. P.; OLIVEIRA, L.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL-NETO, C.; GANDINI, A.; **New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose. Compos. Sci. Technol.** 2009, n. 17, v. 69, p. 2163, 2009.

MATEOS, S. B. Pele descartável. **Indústria brasileira**, v. 44, p. 38-41, 2004.

MERCI, A; URBANO, A; GROSSMANN, M. V. E.; TISCHER, C. A.; MALI, S. Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. **Food Res Int.** v.73, p.38–43, 2015.

MOLINA-RAMÍREZ, C., CASTRO, C., ZULUAGA, R., & GAÑÁN, P. Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks. **Journal of Polymers and the Environment**, v.26, n.2, p. 830–837, 2018.

MONTEIRO, A. A. **Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.** Tese (Doutorado em Química Orgânica). 118p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR. 2007.

MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; DE SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614 **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.

MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF DI-RHAMNOLIPID PRODUCED BY *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 04, p. 867 - 880, 2014.

MUKURUBIRA, A. R.; MELLEM, J. M.; AMONSOU, E. O. Effects of amadumbe starch nanocrystals on the physicochemical properties of starch biocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 142–148, 1 jun. 2017.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymer**, v. 72, n. 1, p. 82-87, 2008.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactantes. **Environ Pollut.**, v. 133, ed. 2, p. 183–198, 2005.

NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Hyaluronic acid and chitosan based hydrogels for cartilage tissue engeneering. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360-370, 2016.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 47, n 4, p. 409-420, 2011.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas-derived* molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 621-630, 2011.

OKIYAMA, A. *et al.* Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter acetii*. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n.5, p.471–477, 1992.

OLIVEIRA, M. **Produção de celulose bacteriana em cultura estática utilizando diferentes fontes de carbono**. TCC(graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico de Joinville. Bacharelado em Ciência e Tecnologia, 2015.

PANDIT, H. *et al.* Surfactant protein D inhibits HIV-1 infection of target cells via interference with gp120-CD4 interaction and modulates pro-inflammatory cytokine production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.). **Monomers, polymers and comp. from renewable resources**, Amsterdã: Elsevier, p. 369-383, 2008.

- PENTTILÄ, P. A.; IMAI, T.; HEMMING, J.; WILLFÖR, S.; SUGIYAMA, J. Enzymatic hydrolysis of biomimetic bacterial cellulose–hemicellulose composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 95–102, 2018.
- PHISALAPHONG, M. & JATUPAIBOON, N. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 482-488, 2008.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O., WONGPANIT, P., CHAVADEJ, S., ABE, M. AND RUJIRAVANIT, R., Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p.1589, 2008.
- RANDHAWA, K.K.S. AND RAHMAN, P.K.S.M. Rhamnolipid Biosurfactants-Past, Present, and Future Scenario of Global Market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2014.
- REDDY, K. S., KHAN, M. Y., ARCHANA, K., REDDY, M. G., HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agente. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 291–299, 2016.
- RODRIGUES, A. I. GUDIÑA, E. J. TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12907, p. 1-9, 2007.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Testes *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Reserach.**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGROJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial celulose film. **Biotechnol Progr.**, v. 22, n. 4, p. 1194-1199, 2006.
- SANA, S.; SRIPARNA, D.; BISWAS, D.; AUDDY, B.; GUPTA, CHATTOPADHYAY. Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp., **Wound Medicine**, v. 23, p. 47-52, 2018.
- SANTACRUZ, S.; RIVADENEIRA, C.; CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 89–94, 2015.
- SANTOS, E.F. *et al.* Extrusão de Compósitos de PP com Fibras Curtas de Coco: Efeitos da Temperatura e Agentes de Acoplamento, **Polímeros**, v. 20, p. 215-220, 2010.
- SASKA, S. **Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e**

OGP [10-14], para regeneração óssea, 222 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Internation Journal of Biomaterials**, 2011.

SERAFICA, G.; MORMINO, R.; OSTER, G.; LENTZ, K.; KOEHLER, K. **Microbial cellulose wound dressing for treating chronic wounds**, USA: US 7704523 B2, 2010.

SHAW, Duncan J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher; Edusp, 1975.

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

SHEZAD, O.; KHAN S.; KHAN, T.; PARK, J. K. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v.82,p.173–180, 2010.

SILVA, J. K. **Filmes comestíveis à base de celulose bacteriana e glicerol**. Trabalho de conclusão de curso - Farmácia da Bacharelado em Faculdade ASCES, Caruaru – PE, 2017.

SILVA JUNIOR, C. J. **Avaliação do potencial da celulose bacteriana no tratamento de águas oleosas**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais). 103f. Universidade Católica de Pernambuco, Recife/PE, 2020.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. **Bookman**, v. 5, 2002.

SLETTEN, G.B. & DAHL, J.E. Cytotoxicity effects of extracts of compomers. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 57, p. 316-22, 1999.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 718-725, 2005.

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

STOCHERO, I. N.; TORNIEUX, A. A. B. (Org.). **Atualização em cirurgia plástica estética e reconstrutiva**. São Paulo: Santa Isabel. v. 1, p. 901-910, 2006.

SULAEVA, I. *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

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

TROVATTI, E.; C. S. R. FREIRE; P. C. PINTO; I. F. ALMEIDA; P. COSTA; A. J. D. SILVESTRE; C. PASCOAL NETO; C. ROSADO. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: *in vitro* diffusion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, p. 83- 87, 2012.

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.

VILLALOBOS, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CHIRALT, A.. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 502-509, 2006.

WATANABE, A.; MORITA, S.; OZAKI, Y. Study on temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I_{beta} by infrared spectroscopy with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3164-3170. 2006.

WATANABE, A.; MORITA, S.; OZAKI, Y. Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I_{alpha} studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose beta. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 9, p. 2969-2975. 2007.

WEI, J.; IGARASHI, T.; OKUMORI, N.; MAETANI, T.; LIU, B. S.; YOSHINARI, M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. **Biomedical Materials**, v. 4, 045002, 2009.

WENDLANDT, W. W. Thermal analysis. 3ed. New York: **John Wiley & Sons**, Inc, 1986.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegr.**, v. 7, p. 415-423, 1997.

WILLIAMS, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, v. 35, n. 38, p. 10009–10014, 2014.

YAMANAKA, S. *et al.* Production, property, and application of bacterial cellulose. **Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for**

Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, v. 72, p. 1039-1044, 1998.

ZHOU, J.; XUE, R.; LIU, S.; XU, N.; XIN, F.; ZHANG, W.; JIANG, M.; DONG, W. High Di-rhamnolipid Production Using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, Separation of Mono/Di-rhamnolipids, and Evaluation of Their Properties. **Front Bioeng Biotechnol.**, v. 7, p. 245, 2019.

ZULLI, G.; LOPES, P. S.; VELASCO, M. V. R.; ALCANTARA, M. T. S.; ROGERO, S. O.; LUGAO, A. B.; MATHOR, M. B. Influence of gamma radiation onto polymeric matrix with papain. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, p. 286-299, 2010.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- i) Protótipo de biorreator de bancada para produção de ramnolipídeos por fermentação estática em suporte de membrana de celulose bacteriana

O protótipo de biorreator de bancada desenvolvido sugere um potencial de ampliação de escala, para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentações estáticas utilizando celulose bacteriana como suporte para o crescimento da bactéria e a produção de tensoativo.

- Os experimentos indicaram que não há necessidade de sistema de aeração forçada, o que diminui consideravelmente os custos de produção;
- A produção de ramnolipídeos não sofreu variação significativa quando ampliado o sistema, o volume de meio foi aumentado 40 vezes;
- A utilização do indutor promoveu um incremento de 4 vezes na produção, assim, este indutor utilizado no processo pode tornar este ainda mais viável;
- Os resultados obtidos apontam para sólida possibilidade de ampliação de escala verticalmente por empilhamento e horizontalmente por aumento de diâmetro das “unidades de cultivo”.

O protótipo foi testado em processos de produção e a mistura de ramnolipídeos submetida a caracterização das propriedades físico-químicas e estruturais dos ramnolipídeos:

- O índice de emulsificação 24h foi melhor tanto para o querosene em ambas as concentrações (0,1 g/% e 0,5 g/%) com 65,55% e 67,86%, respectivamente, quanto para o óleo diesel com na maior concentração, 66,18% e com os menores índices para gasolina, 45,82% e 48,87%;
- A tensão superficial da água diminuiu de 72 mN/m para aproximadamente 32 mN/m gerando uma concentração micelar crítica de 41,16 mg/L;
- Através da cromatografia em camada delgada foi observado, pela intensidade dos spots, a presença de dois componentes majoritários,

sendo eles uma mistura de homólogos de mono-ramnolipídeos (RL1) e homólogos de di-ramnolipídeos (RL2) no extrato bruto;

- O processo permitiu a produção de congêneres de ramnolipídeos com duas moléculas de ramnose, com 98,4% de di-ramnolipídeos com principais congêneres Estruturas Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-Rha-C₈-C₁₀ e Rha-Rha-C₁₀-C₈.

Somadas essas vantagens, este processo em biorreator pode viabilizar a obtenção biotecnológica de biossurfactantes.

- ii) Protótipo de curativo biocompatível e biofuncional com incorporação de ramnolipídeos a membrana de celulose bacteriana

O presente trabalho buscou avaliar as membranas de celulose bacteriana tanto como carreadoras de ramnolipídeos como a efetividade desse bioativo para uso médico como curativo. Para tanto foram realizados experimentos de caracterizações físico-químicas, estruturais, *in vitro* e *in vivo* verificando a resposta biológica gerada.

- Caracterização das propriedades da celulose bacteriana: as membranas de CB apresentaram percentual de água (PA) de 98,74% e espessura de 2,17 mm e após secas de 0,055 mm, uma capacidade de retenção de água (CRA) de 78,88 e um percentual de reidratação (PR) de 2,73%;
- Caracterização das propriedades físico-químicas e estruturais dos ramnolipídeos: o índice de emulsificação mostrou maior poder emulsificante para o querosene em ambas as concentrações (0,1g/% e 0,5g/%) com 100% e 70%, respectivamente, e menor para a gasolina com 52% em ambas as concentrações;
- A tensão superficial da água diminuiu de 72 mN/m para aproximadamente 32 mN/m gerando uma concentração micelar crítica de 41,36 mg/L;
- Através da cromatografia em camada delgada foi observado, pela intensidade dos spots, a presença de dois componentes majoritários, sendo eles uma mistura de homólogos de mono-ramnolipídeos (RL1) e homólogos de di-ramnolipídeos (RL2) no extrato bruto;

- O processo permitiu a produção de congêneres de ramnolipídeos com duas moléculas de ramnose, com 95,8% de di-ramnolipídeos com principais congêneres estruturas Rha-C10-C10; Rha-C10-C10; Rha-Rha-C8-C10 e Rha-Rha-C10-C8;
- Caracterização das membranas de celulose bacteriana com incorporação *ex situ* de ramnolipídeos: os resultados mostraram que 87% do total de RL, incorporado à membrana, foi liberado nas primeiras 4 horas, seguido de um período de liberação mais lenta, atingindo a completa liberação com 36 horas.
- A análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier apresentou bandas importantes da presença de estruturas químicas idênticas às dos ramnolipídeos, sendo possível sugerir que o ramnolipídeo foi incorporado à membrana de CB;
- A análise termogravimétrica mostrou que a incorporação do ramnolipídeo não alterou a estabilidade térmica da CB;
- A morfologia das membranas de CB pura e CB-RL não apresentou diferenças quando analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- A partir da medição do ângulo de contato a membrana CB-RL obteve-se um ângulo menor, em que as amostras foram caracterizadas como hidrofílicas segundo os parâmetros designados no ensaio de ângulo de contato, visto que apresentaram $\theta < 90^\circ$;
- Ao comparar propriedades da membrana de celulose bacteriana pura e com incorporação *ex situ* ramnolipídeos: a permeabilidade ao vapor de água não apresentou diferença significativa, com $3,15 \times 10^{-11}$ g/msPa para CB e $3,45 \times 10^{-11}$ g/msPa para CB-RL. A solubilidade em água a 25 °C apresentou-se significativamente maior para CB-RL com 9,08 % e para CB de 5,82%.
- A análise de isoterma de adsorção de água mostrou que as umidades de equilíbrio aumentaram com o acréscimo da atividade de água em ambas as membranas, em especial em valores de a_w acima de 0,50, comportamento este característico de materiais hidrofílicos.
- As propriedades mecânicas apontaram uma resistência máxima a tração de 136,91 MPa para CB e 149,89 MPa para CB-RL, alongamento na

ruptura de 3,55% para CB e 3,67% para CB-RL e módulo de Young de 3193,31 MPa para CB e 2829,53 MPa para CB-RL.

- As propriedades ópticas mostraram que a CB teve em média 35,19% de transparência e 7,74 de opacidade, e a CB-RL 36,74% de transparência e 4,70 de opacidade.
- Estudo *in vitro* de protótipo de biocurativo de membranas de celulose bacteriana com incorporação *ex situ* de ramnolipídeos utilizando fibroblastos L929: a proliferação celular foi alcançada em 72 horas e não houve mudança com a adição do RL na CB;
- A membrana de CB-RL se mostrou um material mais aderente, já que apresentou um maior número de células aderidas, porém as curvas de adesão seguiram o mesmo padrão de comportamento para ambas.
- A morfologia celular da adesão mostrou os fibroblastos aderidos, na membrana de CB pura e CB-RL, com formato alongado típico e distribuído pela superfície das membranas;
- Estudo *in vivo* de protótipo de biocurativo de membranas de celulose bacteriana com incorporação *ex situ* de ramnolipídeos: análises preliminares foram realizadas de forma macroscópica de lesões contaminadas nos membros e tronco de coxas de cães e gato, mostrando que entre 7 e 10 dias houve uma evolução com a diminuição da área da ferida e maior preenchimento por tecido de granulação, sem sinais de contaminação.

Desse modo, seguindo dinâmicas de interação com fibroblastos L929 e dados preliminares em animais, o conjunto de resultados sugere efeitos sinérgicos entre CB e RL. O biocurativo desenvolvido mostrou-se biocompatível, efetivo e uma possível alternativa de biomaterial para a área médica e veterinária.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A seguir são apontadas perspectivas para prosseguir com os experimentos *in vivo* futuros nessa linha de pesquisa com a utilização de protótipo de biocurativo de membrana de celulose bacteriana com incorporação de ramnolipídeos:

- Realização de cultura e antibiograma do tecido coletado em profundidade da ferida;
- Análise histológica em tecido epitelial.
- Avaliação com os curativos comerciais Aquacel AG + Extra 10 x 10 cm e Hidrocolóide DuoDerm Convatec Extra Thin Estéril 10 x 10 cm.

8 ANEXOS**ANEXO A**

Pedido de patente obtido com a presente tese

CAMILIOS-NETO, D.; CONCEICAO, K. S.; TISCHER, C.A.; VIGNOLI, J.A.;
Protótipo de biorreator para produção de ramnolipídeos por fermentação submersa estativa em suporte de membrana de celulose bacteriana, 2021.
Patente de Invenção. Número de registro: BR 10 2021 024765 7. Data de depósito: 08/12/21.



08/12/2021

870210113976
00-11

29409161942732758

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 024765 7

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

ANEXO B
Composição centesimal da torta de milho

Composição centesimal da torta de milho:

	Torta de milho*
Lipídeos	0,7
Proteína	12,5
Carboidratos	55,0
Fibras	4,0
Resíduo Mineral	4,0
Umidade	13,0

* Fonte: Caramuru-comunicação pessoal.

ANEXO C

Protocolo do Comitê de Ética



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 074/2021

Londrina, 12 de agosto de 2021.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: “Uso de Biocurativos de Celulose Bacteriana e Rannolipídeos na Cicatrização de Feridas Traumáticas Contaminadas ou Infectadas em Cães” protocolo CEUA n° 030.2021 sob a responsabilidade de Cesar Augusto Tischer que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em 10/08/2021.

Este projeto tem por objetivo desenvolver e avaliar a aplicação de biocurativos de celulose bacteriana incorporada com rannolipídeos na cicatrização de feridas traumáticas contaminadas ou infectadas em cães. Grau de invasividade: G2.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	13/08/2021 a 13/08/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Cão
N° de animais	10
Peso/ Idade	Acima de 6 meses/ acima de 1kg
Sexo	Machos ou Fêmeas
Origem	Hospital Veterinário da UEL
Amostras a serem coletadas	Fragmento de ferida

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Prof.ª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora do Comitê de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
Telefone: (51) 3371-5054

Maria Fernanda Rodrigues Graciano

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Imo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Cesar Augusto Tischer

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefe do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE

C/C para a Direção do Centro de Ciências Exatas/CCE

C/C para o Hospital Veterinário da UEL/CCA

Campus Universitário: Rodovia Colombo CM (PR 445), km 380 - Fone (51) 3371-4000 FAX - Fax 3320-4440 - Caixa Postal 56.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL