



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELA DORNELAS MARQUES

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas*
aeruginosa PAO1 EM CULTIVOS SUBMERSOS
UTILIZANDO TORTA DE MILHO COMO SUBSTRATO
SÓLIDO**

Londrina
2019

GABRIELA DORNELAS MARQUES

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas*
aeruginosa PAO1 EM CULTIVOS SUBMERSOS
UTILIZANDO TORTA DE MILHO COMO SUBSTRATO
SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane A. Vignoli

Londrina
2019

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

MARQUES, GABRIELA DORNELAS .

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 EM CULTIVOS SUBMERSOS UTILIZANDO TORTA DE MILHO COMO SUBSTRATO SÓLIDO / GABRIELA DORNELAS MARQUES. - Londrina, 2019.
63 f.

Orientador: DOUMIT CAMILIOS NETO.

Coorientador: JOSIANE ALESSANDRA VIGNOLI.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Ramnolipídeos - Tese. 2. *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. 3. Biossurfactante - Tese. I. CAMILIOS NETO, DOUMIT . II. ALESSANDRA VIGNOLI, JOSIANE . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . IV. Título.

GABRIELA DORNELAS MARQUES

**PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa*
PAO1 EM CULTIVOS SUBMERSOS UTILIZANDO TORTA DE MILHO
COMO SUBSTRATO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Fabiana Guillen M. Gasparin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Laerte e Rosania, por todo amor, apoio, compreensão e incentivo. Ao meu irmão Rafael, por sempre me ajudar e apoiar, independente de quantos quilômetros nos separava. Se estou aqui foi por vocês estarem sempre comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Doumit Camilios Neto, pela oportunidade, apoio, ensinamentos, amizade e paciência. Por acreditar em mim e fazer parte da minha vida acadêmica.

A Prof^a. Dr^a. Josiane Vignoli, por me apresentar à Bioquímica e auxiliar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio e Prof^a. Dr^a. Fabiana Guillen M. Gasparin, por aceitarem contribuir com a melhoria deste trabalho e disponibilidade.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, por contribuir para minha formação acadêmica.

A minhas amigas, Kamila, Isadora, Karen, Monique e Mayara. Obrigada por toda ajuda, amizade e conversas, sem vocês o dia a dia no laboratório não seria o mesmo.

A minha amiga Sâmela Santos Rocha, por ouvir meus desabafos, aconselhar e tornar os momentos difíceis mais leves. Obrigada por sua amizade.

Ao técnico de laboratório, Nelson Janeiro, pelo auxílio durante a rotina do laboratório e por sempre estar disposto a ajudar.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho. Obrigada.

MARQUES, Gabriela Dornelas. **Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 em Cultivos Submersos Utilizando Torta de Milho como Substrato Sólido**. 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Biossurfactantes são tensoativos produzidos por microrganismos. Dentre os tensoativos mais importantes estão os ramnolipídeos produzidos pela bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Estes chamam a atenção devido a sua baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e excelentes propriedades tensoativas, podendo ser bons substitutos aos surfactantes de origem química. Ainda que apresentem grande potencial de aplicação, existem poucos processos de produção devido ao alto custo e aos problemas que a agitação e aeração forçada causam. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de produção de ramnolipídeos utilizando, um subproduto agroindustrial, torta de milho como suporte sólido em cultivos submersos. Nos cultivos realizados com diferentes concentrações de glicerol e óleo de soja, as melhores produções de ramnolipídeos foram obtidas com 6% (v/v) de glicerol, produzindo 21 g/L e 1% (m/v) de óleo de soja, juntamente com a presença do suporte sólido, produzindo 32 g/L do tensoativo. Já a melhor produção (36 g/L) foi obtida com suporte sólido de torta de milho a 5% (m/v), 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja, proporcionando um aumento de 10 vezes em relação a cultivos submersos clássicos (3 g/L). Nos estudos sobre a influência dos componentes da torta, foi identificado que outros nutrientes, além do carboidrato, influenciam positivamente na biossíntese do ramnolipídeo. Pela análise cromatográfica, constatou-se que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, sintetizou uma maior proporção de moléculas com duas porções de ramnose. Os resultados obtidos indicam que a produção de ramnolipídeos por cultivo submerso com suporte sólido de torta de milho é uma metodologia promissora para viabilizar a produção de biossurfactantes.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Ramnolipídeos. Suporte sólido. Torta de Milho.

MARQUES, Gabriela Dornelas. **Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Submerged Cultivation Using Corn Bran as Solid Substrate.** 2019. 63 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Biosurfactants are surface-active compounds produced by microorganism. Among them one of the most important are the rhamnolipids produced by the gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. These compounds call a lot of attention due to their low toxicity, high biodegradability and excellent surface-active properties, being good substitutes for chemical surfactants. Although presenting great potential of application, there are few commercial processes of production, mostly because of the high cost of the production and the problems that the agitation and forced aeration cause. Therefore, the present work aimed to develop a process of rhamnolipids production using, an agroindustrial byproduct, corn bran as solid substrate in submerged liquid cultivations. In the cultures with different concentrations of glycerol and soybean oil, the best yields of rhamnolipids were reached with 6 % (v/v) glycerol alone, yielding 21 g/L, and addition of 1 % (w/v) of soybean oil in the presence of the solid support, improve the yield to 32 g/L of the surfactant. The best yield (36 g/L) was obtained with 5% (w/v) of corn bran as solid support, 6% (v/v) of glycerol and 1% (w/v) of soybean oil providing a 10-fold increase over classical submerged cultures (3 g/L). The study of the influence of corn bran components suggest that besides the carbohydrate other nutrients positively influenced rhamnolipids biosynthesis. Chromatographic analysis showed that *Pseudomonas aeruginosa*, growing in submerged liquid cultivation with corn bran as solid substrate, synthesized a greater proportion of molecules with two portions of rhamnose. The present results indicate that the production of rhamnolipids by this fermentative technology (submerged liquid cultivation using corn bran as solid substrate) is a promising methodology to make biosurfactant production feasible.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipids. Solid support. Corn bran.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante	16
Figura 2 - Estrutura de alguns biossurfactantes	19
Figura 3 - Estrutura química dos ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 4 - Via metabólica de biossíntese de ramnolipídeo	23
Figura 5 - <i>Quorum sensing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figura 6 - Torta de milho (TM)	29
Figura 7 - Cromatograma de Cromatografia em Camada Delgada dos ramnolipídeos produzidos por Cultivos Submersos com Torta de Milho como substrato sólido	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores	18
Tabela 2 – Espécies de <i>Pseudomonas</i> produtoras de ramnolipídeos	22
Tabela 3 – Produção de ramnolipídeos por cepas de <i>Pseudomonas</i> em diferentes fontes de carbono	27
Tabela 4 – Composição centesimal da Torta de Milho.....	29
Tabela 5 – Materiais químicos utilizados nos experimentos	30
Tabela 6 – Produção de Ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em cultivo submerso estático, cultivo submerso, cultivo submerso estático com TM e cultivo submerso com TM	35

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito da concentração de glicerol em cultivos submersos com substrato sólido de torta de milho para a produção de ramnolipídeos por PAO1 37
- Gráfico 2** – Efeito da concentração de óleo de soja em cultivos submersos com substrato sólido de torta de milho para a produção de ramnolipídeos por PAO138
- Gráfico 3** – Efeito das diferentes concentrações de torta de milho e óleo de soja em cultivos submersos para a produção de ramnolipídeos por PAO140
- Gráfico 4** – Análise da diminuição da concentração de torta de milho em cultivos submersos com suporte sólido para a produção de ramnolipídeos por PAO1 42
- Gráfico 5** – Efeito do escalonamento sobre a produção de ramnolipídeos em cultivos submersos com torta de milho 44
- Gráfico 6** – Produção de ramnolipídeos por PAO1 em cultivos submersos com torta de milho (TM), Extrato de torta de milho (ExTM) e amido 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSb	Cultivo Submerso
CSbE	Cultivo Submerso Estático
CSbE – TM	Cultivo Submerso Estático com Suporte Sólido de Torta de Milho
CSb – TM	Cultivo Submerso com Suporte Sólido de Torta de Milho
CMC	Concentração Micelar Crítica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
ExTM	Extrato de Torta de Milho
OS	Óleo de soja
QS	Quorum sensing
RL1	Mono-ramnolipídeo
RL2	Di-ramnolipídeo
TM	Torta de Milho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	GERAL	15
2.2	ESPECÍFICO	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	SURFACTANTES	16
3.2	BIOSURFACTANTE	17
3.3	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES	18
3.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.5	RAMNOLIPÍDEOS	20
3.6	BIOSSÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3.7	INFLUÊNCIA DO QUORUM SENSING NA SÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.8	PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS	26
3.9	ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO	28
3.10	TORTA DE MILHO (TM)	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL	30
4.1.2	Microrganismo	31
4.2	PREPARO DO INÓCULO	31
4.3	CULTIVO SUBMERSO (CSB)	31
4.4	CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO (CSBE)	32
4.5	CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO COM SUPORTE SÓLIDO (CSBE – TM)	32
4.6	CULTIVO SUBMERSO COM SUPORTE SÓLIDO DE TORTA DE MILHO (CSB – TM)	32
4.6.1	Preparo do Extrato de Torta de Milho (ExTM)	33
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	33
4.7.1	Determinação do Crescimento Bacteriano do Inóculo	33

4.7.2	Extração do Ramnolipídeos.....	33
4.7.3	Quantificação dos Ramnolipídeos	33
4.7.3.1	Análise estatística.....	34
4.7.4	Precipitação de Ramnolipídeos em Meio ácido.....	34
4.7.5	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UTILIZANDO TORTA DE MILHO.....	35
5.2	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO.....	36
5.3	AValiação DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO	37
5.4	AValiação DA QUANTIDADE DE TORTA DE MILHO E CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA EM CULTIVOS SUBMERSOS	39
5.5	EFEITO DO ESCALONAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO	43
5.6	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DA TORTA DE MILHO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR PAO1 EM CULTIVOS SUBMERSOS	45
5.7	CROMATOGRAlIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO.....	47
6	CONCLUSÕES	49
7	EXPERIMENTOS FUTUROS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma porção polar, hidrofílica, e uma porção apolar hidrofóbica. A porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica enquanto a porção apolar é geralmente uma cadeia hidrocarbonada. A presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos proporciona a característica de diminuir a tensão superficial e interfacial (NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M., 2002).

A crescente preocupação com o meio ambiente tem levado à procura por surfactantes de origem natural. Dessa forma, os biossurfactantes, tensoativos produzidos por microrganismos, vêm ganhando ênfase devido a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, aceitabilidade ecológica e alta estabilidade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (ARAB, F.; MULLIGAN, C. N., 2014, KASKATEPE; YILDIZ, 2016). Os surfactantes de origem biológica têm potencial de aplicação em condições onde se faz necessária a dispersão de tensoativos no meio-ambiente, especificamente na limpeza de derramamentos de óleo e compostos hidrofóbicos e no aumento da recuperação de óleo de reservatórios. Nestas aplicações o uso de surfactantes de origem biológica é a opção mais adequada, visto que surfactantes químicos podem causar contaminações ambientais (CAMILIOS NETO et al., 2011).

Uma das classes de biossurfactantes mais relevantes são os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, pois estes exibem excelentes propriedades tensoativas, além de apresentarem ganhos no processo produtivo em decorrência das altas concentrações e a utilização de fontes de baixo custo de produção (WEI et al., 2005, MONTEIRO et al., 2007; LINHARDT et al., 1987; HOLMBERG, 2001). Eles apresentam alta atividade emulsificante e uma pequena atividade antibiótica, além de ficarem retidos em menor quantidade no solo do que os surfactantes químicos, servindo assim como uma excelente alternativa de tensoativo para aplicação em biorremediação (BORDAS; LAFRANCE; VILLEMUR, 2005; MULLIGAN, 2005, 2009).

Os ramnolipídeos são classificados como glicolipídeos, devido à presença de uma ou duas moléculas de ramnose em suas estruturas, sendo denominados mono ou di-ramnolipídeos, respectivamente. Em relação à porção hidrofóbica, esta é formada por duas moléculas de ácido β -hidroxialconoato (LANG,S.; WULLBRANDT,D. 1999).

Existem poucos processos industriais de produção desse tensoativo (MARCHANT; BANAT, 2012). A produção de ramnolipídeos por cultivos submersos, também conhecida como fermentação submersa apresenta dificuldades. Quando o biossurfactante começa a ser produzido, há formação de espuma, ocasionada pela agitação e aeração forçadas, resultando em acúmulo de células, produtos e nutrientes nessa espuma, acarretando em perda de rendimento e produtividade (LEE; KIM, 2004; YEH et al., 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Uma vez que a formação de espuma é um fator limitante para a produção de ramnolipídeos, duas estratégias têm sido utilizadas para evitar a formação da mesma. Uma química, com adição de compostos antiespumantes e outra mecânica utilizando aparelhos projetados para quebrar a espuma, mas esta última não é efetiva para grandes quantidades de espuma. Já a técnica química tem como desvantagem o fato de que o antiespumante pode ser considerado como um “contaminante químico” que deve ser separado do produto final, encarecendo o processo. Além disso, esses compostos também interferem na transferência de O₂ e CO₂ entre as fases líquida e gasosa, provocando reações inibitórias e efeitos tóxicos ao microrganismo (LEE; KIM, 2004; YEH et al., 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Uma estratégia alternativa para evitar a formação de espuma, é o uso de suporte sólido em cultivos submersos (CAMILIOS NETO et al., 2011). Portanto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia de produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em cultivos submersos com presença de substrato sólido, melhorando a produção e solucionando o problema de formação de espuma.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver processo de produção, extração e caracterização estrutural de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 obtidos por cultivo submerso utilizando substrato sólido.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar diferentes concentrações da fonte de carbono glicerol durante a produção de ramnolipídeos.

Avaliar diferentes concentrações do indutor e fonte de carbono óleo de soja na produção de ramnolipídeos.

Avaliar diferentes concentrações da fonte de carbono Torta de milho na produção de ramnolipídeos.

Avaliar a influência dos componentes da torta de milho na produção de ramnolipídeos.

Avaliar a relação entre mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos por Cromatografia em Camada Delgada.

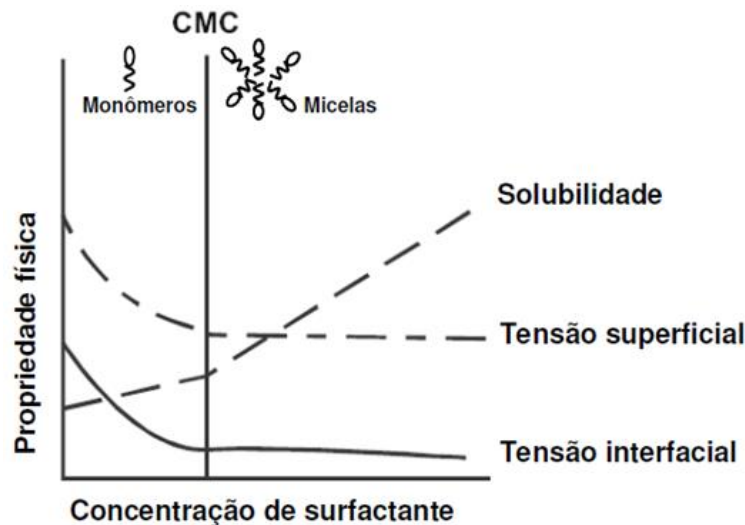
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos químicos anfífilicos derivados do petróleo, que devido à presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na mesma molécula tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade como nas misturas de óleo e água. Desse modo promovem a redução da tensão superficial, entre o ar e o líquido, e interfacial, entre duas substâncias químicas (NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M., 2002). A sua estrutura anfipática também confere excelentes propriedades de detergência, emulsificação, espuma e dispersão, sendo este um produto de grande versatilidade (DESAI E BANAT, 1997).

As tensões superficial e interfacial estão relacionadas com a concentração de surfactante que é adicionado ao meio até atingir a concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a concentração mínima necessária de surfactante para iniciar a formação de micelas, pois quando se adiciona surfactante acima da CMC ocorre associação das moléculas, formando micelas, sem alterar a tensão superficial e interfacial (Figura 1). A CMC é influenciada pelo pH, temperatura e força iônica (MULLIGAN, 2005; JARDIM PACHECO, 2013). Um surfactante eficiente possui uma concentração micelar crítica baixa.

Figura 1 - Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante.



Fonte: Adaptado de Mulligan, (2005)

3.2 BIOSSURFACTANTE

Biossurfactantes são surfactantes produzidos por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos, crescendo em diferentes fontes de carbono, principalmente em meio rico em hidrocarbonetos. Podem ser divididos em moléculas de baixo peso molecular, tais como glicolípídeos e lipopeptídeos, e moléculas de alto peso molecular, incluindo compostos poliméricos extracelulares constituídos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (RON E ROSENBERG, 2001).

Vários fatores são relatados como influenciadores da natureza química, propriedades físico-químicas e quantidade de biossurfactante produzida. Dentre esses fatores está o microrganismo utilizado, as fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, limitações nutricionais durante o crescimento e a agitação/aeração do meio (AMÉZCUA-VEGA et al., 2007; MUKHERJEE, S. et al., 2006).

Santos e seus colaboradores (2002) notaram que a proporção de mono-ramnolípídeos (RL1) para di-ramnolípídeos (RL2) produzidos por *P. aeruginosa* está relacionada com a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Quando glicerol e óleos vegetais foram utilizados, a razão RL1 e RL2 foi de 0,2 e 1,2, respectivamente. Essas proporções distintas dos diferentes congêneres de ramnolípídeos podem simbolizar uma importante mudança nas características do biossurfactante, afetando a CMC e tensão interfacial, que por sua vez irão alterar a disponibilidade de nutrientes para a bactéria.

Mesmo que a função fisiológica das moléculas biossurfactantes ainda não tenha sido completamente esclarecida, sabe-se que elas estão relacionadas com a sobrevivência do microrganismo; pois atuam na mobilidade, comunicação celular, acesso a nutrientes e competição célula-célula. Podem ser usados também como fonte de carbono para a produção de energia e como mecanismo protetor (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

Uma vez que os surfactantes de origem química são prejudiciais para o meio ambiente, pois não são biodegradáveis, os biossurfactantes apresentam grandes vantagens em relação a eles, pois são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade, são compatíveis com o meio ambiente, estáveis em extremos de temperatura, pH e salinidade, e podem ser sintetizados a partir de matéria-prima renovável (DESAI E

BANAT, 1997). Com isso, os biossurfactantes têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos (JOSEANE PEREZ, 2014).

Moléculas biossurfactantes detêm um potencial para serem usadas em vários setores industriais, como em produtos de beleza, farmacêuticos, conservantes de alimento e de detergentes. Mas, atualmente a produção dessas moléculas é cara devido ao uso de meios de cultura sintéticos. Dessa forma, têm se dado destaque para utilização de substratos agroindustriais, como óleos e resíduos vegetais, melão, soja e gordura animal; sendo estes de valor econômico baixo e disponíveis em grandes quantidades (JOSEANE PEREZ, 2014; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; WINTERBURN; MARTIN, 2012).

3.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES

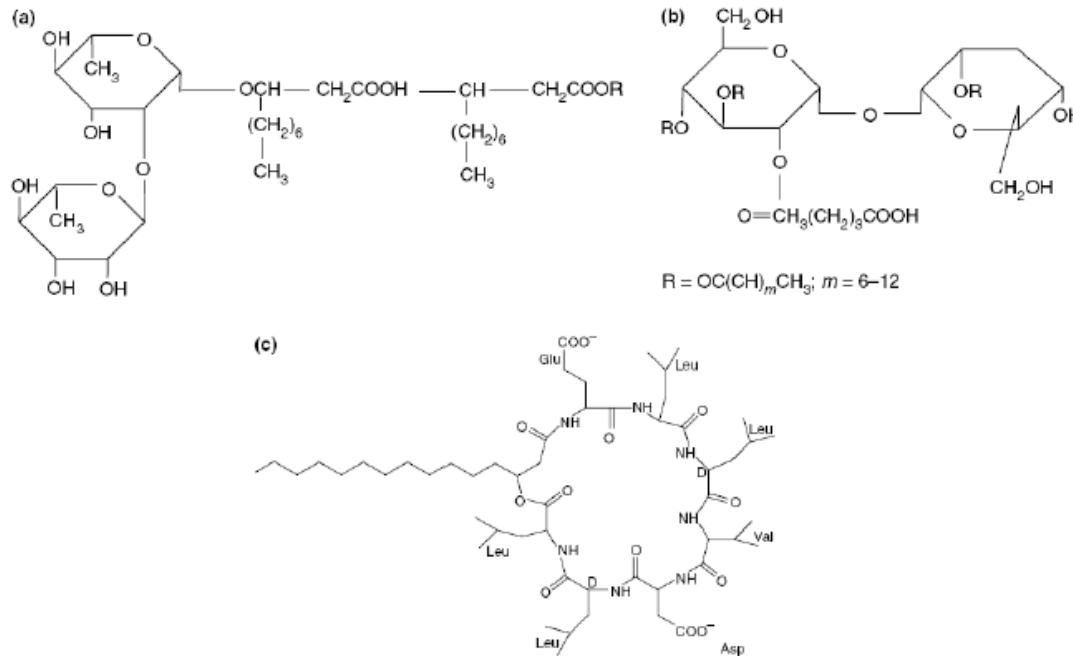
Como já mencionado, vários microrganismos são produtores de biossurfactantes. Na tabela 1 encontram-se alguns microrganismos capazes de produzir moléculas surfactantes e na figura 2 observa-se a estrutura de alguns desses biossurfactantes.

Tabela 1 - Exemplos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

Biossurfactante	Microrganismo
Trealolipídeos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i>
Soforolipídeo	<i>Candida apicola</i> <i>Candida bombicola</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i>

Fonte: Adaptado de Mulligan, (2005)

Figura 2 - Estrutura de alguns biossurfactantes: Ramnolípido (a); Trealolípido (b); Surfactina (c).



Fonte: SANTANA FILHO, ARQUIMEDES P. DE, (2009)

3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* destacam-se por sintetizar moléculas com propriedades surfactantes. Membros desse gênero pertencem à subclasse gama do grupo das Proteobactérias e são capazes de colonizar diversos ambientes. Devido à sua grande capacidade de degradação e biotransformação de poluentes, essas bactérias apresentam potencial para diferentes aplicações biotecnológicas, particularmente em áreas de biorremediação e biocatálise (LOH; CAO, 2008).

Dentro deste gênero encontra-se a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria gram-negativa, encapsulada e móvel. Apresenta grande versatilidade ambiental, podendo ser encontrada em habitats aquáticos, terrestres e formando biofilmes em superfícies úmidas, como rochas. Encontradas também nos tecidos de plantas e animais (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; STOVER et al., 2000).

Dentre as razões que possibilitam sua grande versatilidade estão a produção de vários fatores de virulência, incluindo ramnolipídeos; proteases extracelulares, como elastases e proteases alcalinas; exotoxina A; piocianina e alginato (LAMONT et al.; 2002).

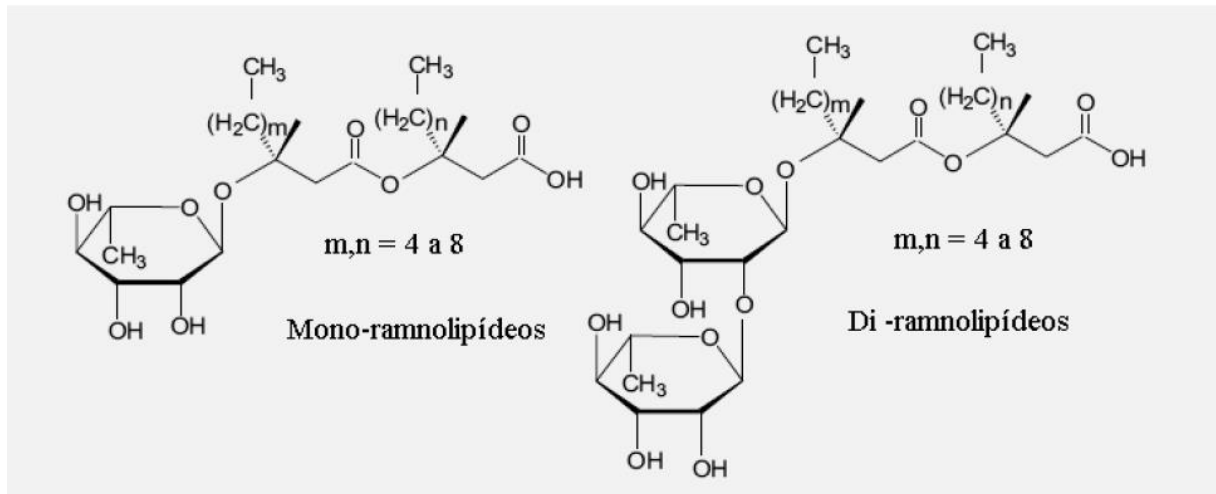
A diversidade de fatores de virulência produzidos contribui para que *P. aeruginosa* seja considerada um importante patógeno oportunista. Ela está associada com doenças pulmonares crônicas e eventualmente fatais em pacientes com fibrose cística. Devido à grande importância como patógeno, por possuir versatilidade ambiental e complexidade genética, diversos estudos já foram realizados com essa bactéria (BRENCIC et al., 2009).

3.5 RAMNOLIPÍDEOS

Dentre os vários biossurfactantes existentes, os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são os mais estudados, devido as suas propriedades tensoativas e por apresentarem baixa toxicidade (BORDAS et al., 2005; MULLIGAN, 2005, 2009). Estes compostos foram descritos pela primeira vez em 1949 por Jarvis e Johnson; demonstraram que os ramnolipídeos eram secretados pela bactéria para o meio durante a fase estacionária, após a exaustão de nitrogênio (NOH; SALLEH; YAHYA, 2014).

Sua estrutura é bem diversificada, sendo composta basicamente por uma ou duas moléculas de ramnose, mono ou di-ramnolipídeo, ligadas ao ácido graxo, que também pode variar no tamanho e quantidade de insaturação da cadeia carbônica (Figura 3) (JOHANN et al., 2016).

Figura 3 - Estrutura química dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: CAMILIOS NETO (2010)

Os ramnolipídeos também podem ser descritos como glicosídeos compostos por uma porção glicona, representada pela ramnose, e uma porção aglicona, pelo ácido graxo, ligadas por uma ligação glicosídica. Quando a molécula possui duas porções glicona, estas são ligadas entre si por ligação α -1,2-glicosídica e os ácidos graxos são ligados entre si por ligações do tipo éster (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

Pseudomonas aeruginosa é a principal espécie produtora de ramnolipídeos, no entanto, outras espécies do gênero *Pseudomonas* também têm sido relatadas como produtoras (Tabela 2).

Os ramnolipídeos oferecem vantagens especiais em comparação com outros biossurfactantes por causa da sua potente atividade emulsionante, elevada atividade tensoativa e por possuir baixa concentração micelar crítica (NOH; SALLEH; YAHYA, 2014). Devido às suas excelentes propriedades, os ramnolipídeos reduzem a tensão superficial da água de 72 mN.m^{-1} para próximo de 30 mN.m^{-1} e a tensão interfacial do sistema água/óleo de 43 mN.m^{-1} a cerca de 1 mN.m^{-1} . Em consequência disso podem ser aplicados na recuperação de petróleo, degradação de hidrocarbonetos e remoção de metais do solo (BORDOLOI; KONWAR, 2008; AMANI et al. 2010; DAS E CHANDRAN 2011; KASKATEPE, B.; YILDIZ, S., 2016). Além disso, por serem biodegradáveis e menos nocivos para o meio ambiente, os

ramnolipídeos, possuem potencial uso em aplicações farmacêuticas, cosméticas, pesticidas e antimicrobianas (SODAGARI; INVALLY; JU, 2018).

Tabela 2 - Espécies de *Pseudomonas* produtoras de ramnolipídeos.

Bactérias	Referência
<i>P. chlororaphis</i>	GUNTHER et al., 2005
<i>P. putida</i>	WITTGENS et al., 2011 NANGANURU AND KORROPATI., 2012
<i>P. fluorescens</i>	ABOUSEOUD et al., 2008 EL-AMINE BENDAHA et al., 2012
<i>P. nitroreducens</i>	ONWOSI AND ODIBO, 2012
<i>P. alcaligenes</i>	OLIVEIRA et al., 2009

Fonte: próprio autor

3.6 BIOSÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa*

Os ramnolipídeos são produzidos como metabólitos secundários por *Pseudomonas aeruginosa* e sua biossíntese coincide com a fase estacionária de crescimento (DÉZIEL et al., 1999; SANTA ANNA et al., 2001).

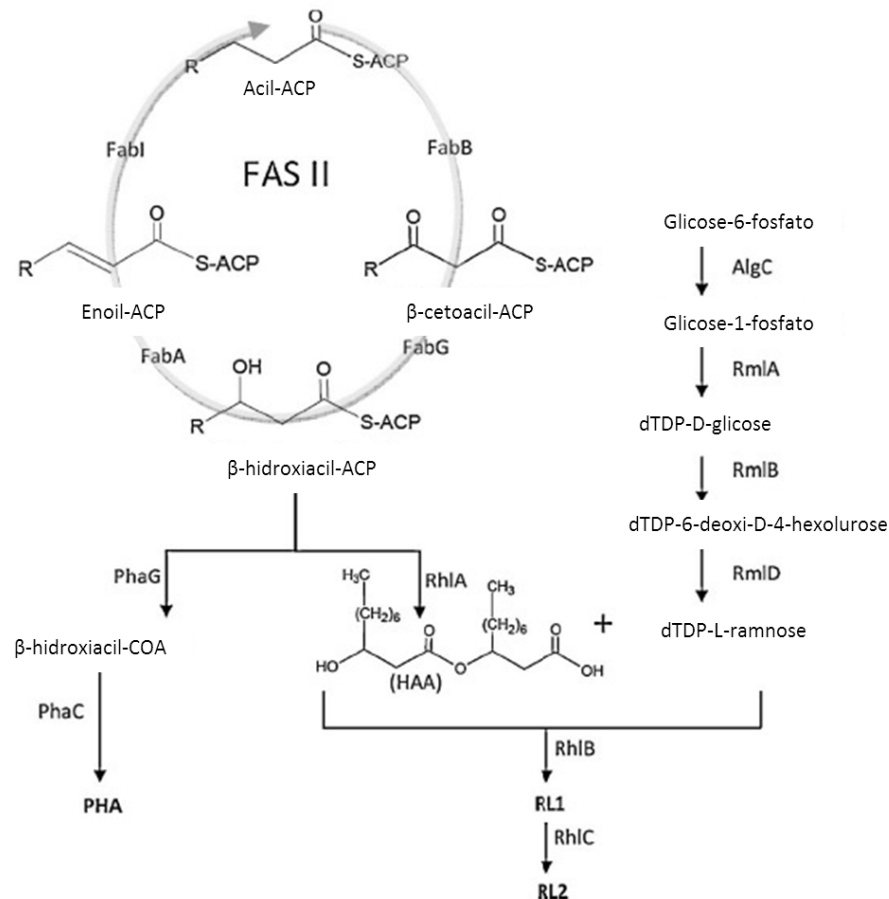
A biossíntese de ramnolipídeos é dada por reações sequenciais de transferência de grupos glicosil (ramnose). Cada reação é catalisada por uma enzima específica, sendo que a deoxi-timina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-ramnose) é a molécula doadora de ramnose e o β -Hidroxidecanoil- β -Hidroxidecanoato (HAA) é a molécula receptora (BURGER; GLASER; BURTON, 1963)

A biossíntese da porção hidrofóbica se dá por um desvio na síntese *de novo* de ácidos graxos. No qual, duas moléculas de β -hidroxiacil-ACP são convertidas em uma molécula de β -Hidroxidecanoil- β -Hidroxidecanoato (HAA) pela

enzima RhlA (ZHU; ROCK, 2008). Já a porção hidrofílica (ramnose) tem como precursor a glicose-1-fosfato, que através de reações catalisadas pelo operon *rmIBCAD* ocorre a formação da deoxi-timina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-ramnose) (SOBERÓN-CHAVÉZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Em *Pseudomonas aeruginosa*, bem como, em outras bactérias gram-negativas, L-ramnose é um componente comum dos lipopolissacarídeos de membrana (LPS) (SADOVSKAYA et al., 1998).

A biossíntese do ramnolipídeo (Figura 4) ocorre, então, pela união da ramnose à porção hidrofóbica (HAA) pelo complexo enzimático ramnosiltransferase I. Este complexo é composto pelas enzimas RhlA e RhlB (codificada pelo operon *rhIAB*), RhlB é responsável por adicionar a primeira ramnose, gerando moléculas de mono-ramnolipídeos (RL1) (OCHSNER; FIECHTER; REISER, 1994). Por meio de um segundo complexo enzimático, ramnosiltransferase II (RhlC), codificado pelo gene *rhIC*, adiciona-se o segundo grupo ramnosil, gerando moléculas de di-ramnolipídeos (RL2) (RAHIM et al., 2001)

Figura 4 - Via metabólica de biossíntese de ramnolipídeo.



Fonte: adaptado de NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, (2011)

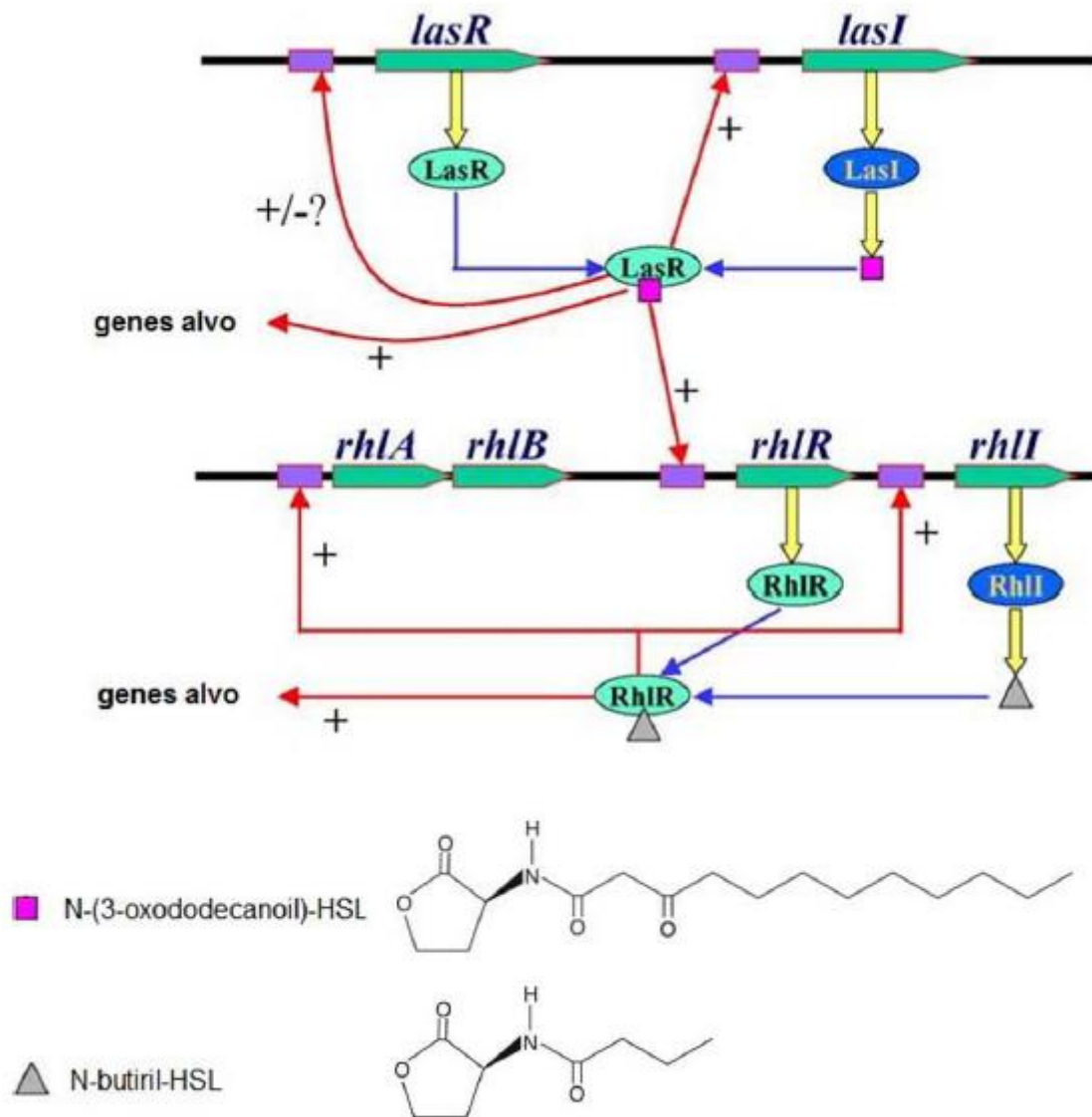
3.7 INFLUÊNCIA DO QUORUM SENSING NA SÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias se comunicam através da produção e detecção de moléculas sinalizadoras secretadas. Esse sistema de comunicação célula – célula recebe o nome de *quorum sensing* (BASSLER, 2016). No sistema *quorum sensing* (QS) as bactérias produzem e liberam moléculas sinalizadoras difusíveis que coordenam o comportamento de grupo, desse modo o QS permite que as bactérias percebam a densidade populacional e com essas informações, possam regular a expressão de vários genes (SANDOZ; MITZIMBERG; SCHUSTER, 2007).

Dentre os genes controlados por esse sistema em *Pseudomonas aeruginosa* estão os responsáveis por diversos fatores de virulência, como a produção de ramnolipídeos (SOBERÓN-CHÁVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; SANDOZ; MITZIMBERG; SCHUSTER, 2007). No QS de *P. aeruginosa* existem duas moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL e N-butilil-HSL, produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente (Figura 5). As moléculas de acil-HSL ligam-se aos referentes fatores de transcrição (LasR e RhIR), ativando a expressão dos genes alvos. Os dois circuitos são arranjados hierarquicamente, assim LasI-LasR controla positivamente a expressão de RhII-RhIR (Figura 5) (SANDOZ; MITZIMBERG; SCHUSTER, 2007; REIS et. al., 2011).

O locus *rhl* no cromossomo de *Pseudomonas aeruginosa* contém o operon *rhlAB* que codifica a enzima responsável pela formação dos mono-ramnolipídeos, ramnosiltransferase I (Figura 5) (RAHIM et al., 2001; CAMILIOS NETO, 2010) e *rhlI-rhIR*, que compõe um dos circuitos do sistema *quorum sensing* (QS) (Figura 5). Estes genes são transcritos na mesma direção, mas com *rhlAB* sendo transcrito independentemente de *rhlI* e *rhIR*. O operon *rhlAB* é estritamente regulado por QS, enquanto *rhlC*, que tem como produto de sua expressão a ramnosiltransferase II, enzima responsável pela formação de di-ramnolipídeos, tem sua transcrição coordenadamente regulada com *rhlAB* pelo mesmo sistema (REIS et. al., 2011; RAHIM et al., 2001).

Figura 5 – Quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: CAMILIOS NETO, 2010.

3.8 PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS

Os biossurfactantes são secretados extracelularmente ou permanecem vinculados às células. Um papel fisiológico da produção dos biossurfactantes é favorecer o crescimento de microrganismos em substratos imiscíveis em água. Também apresentam função de reserva energética, na regulação do transporte de metais pesados, na regulação do acoplamento/desacoplamento do microrganismo em superfícies, como fator de virulência e como agente antimicrobiano. A produção máxima de ramnolipídeos é normalmente conferida no fim da fase exponencial de crescimento e não está associada ao crescimento (KRONENBERGER, 2007; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

Alguns fatores podem influenciar a produtividade de ramnolipídeos, como a relação carbono-nitrogênio (C/N). Valores de relação C/N de 18 (GUERRA-SANTOS et al., 1984), 10 (ABOUSEOUD et al., 2008), 20 (RAZA et al., 2007) e 55 (MONTEIRO, 2007) são reportados na literatura. Alguns autores dizem que há uma linearidade entre o aumento da relação C/N e a produção de ramnolipídeos, enquanto outros citam a existência de uma relação inversa, ou seja, o aumento da produtividade de ramnolipídeos com a diminuição da relação C/N (ARINO et al., 1996; GUERRA-SANTOS et al., 1984). A natureza da fonte de nitrogênio e de carbono também pode influenciar. Na literatura é relatada a utilização de fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e nitratos), pois são reportadas como melhores do que as fontes orgânicas como extrato de levedura (WU et al., 2008; GUERRA-SANTOS et al., 1984).

Em relação às fontes de carbono, estas são divididas em lipídicas e glicídicas, sendo que cada um dos tipos irá influenciar na quantidade de ramnolipídeo produzida e na mistura de congêneres produzidos pelo microrganismo (NITSCHKE et al., 2005).

A produção de ramnolipídeos por *P.aeruginosa* está sujeita ainda a outros fatores como o mecanismo de resposta *Quorum Sensing* (QS), fatores de estresse, tais como a falta de nutrientes, alterações no padrão de salinidade, temperatura, entre outros (HONNA, 2013; SIVASAMY et al., 2016).

A tabela 3 traz alguns estudos de produção de ramnolipídeos por bactérias de gênero *Pseudomonas*.

Tabela 3 - Produção de ramnolipídeos por cepas de *Pseudomonas* em diferentes fontes de carbono.

Cepa	Fonte de carbono	Ramnolipídeo (g/L)	Referência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM1	Glicose	8,6	WU et al., 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	Glicerol	12,4	MONTEIRO et al., 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL1	Glicerol	17,9	ARINO et al., 1996
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Óleo de palma	0,39-0,43	RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2016
<i>P. aeruginosa</i> DR1	Óleo de semente de manga	1,8	REDDY et al., 2016
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Óleo de azeite	0,299	RAMÍREZ et al., 2016
<i>Pseudomonas</i> SWP-4	Resíduos de óleo de cozinha	13,93	LAN et al., 2015
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	Glicerol	15,9	SANTANA FILHO, 2009
<i>Pseudomonas sp.</i> DSM 2874	Óleo de canola	45	TRUMMLER; EFFENBERGER; SYLDATK , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E03-40	Glicerol e óleo de soja	Glicerol: 9,5 Óleo de soja: 21	SODAGARI; INVALLY; JU, 2018

Fonte: próprio autor

3.9 ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO

A maioria dos trabalhos de produção de ramnolipídeos são conduzidos em cultivos submersos, mas esta metodologia apresenta algumas limitações, pois a produção do tensoativo resulta em formação de espuma, uma vez que os cultivos são mantidos em agitação e aeração forçada. Dessa forma, as células do microrganismo, nutrientes e produtos ficam retidos na espuma, acarretando em perda de produtividade (LEE; KIM, 2004; YEH et al., 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Com o propósito de reprimir a formação de espuma, tem-se utilizado compostos químicos, denominados anti-espumantes, e aparelhos mecânicos para quebrar a espuma, entretanto estas estratégias possuem um elevado custo e não são integralmente eficientes, o que tem contribuído para falta de processos de produção em escala comercial de ramnolipídeos (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Conseqüentemente, o principal obstáculo na produção em grande escala de biossurfactantes é o custo elevado quando comparado com tensoativos de origem química (GONG; PENG; WANG, 2015). Dessa forma, métodos alternativos para a produção de ramnolipídeos vem sendo estudados.

Uma estratégia é a utilização de cultivos com suporte sólido para evitar a formação de espuma (CAMILIOS NETO et al., 2008; 2009; 2011). O substrato utilizado pode ser de origem agroindustrial, incluindo resíduos do mesmo, dessa forma o custo da produção é diminuído (JOSEANE PEREZ, 2014; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; WINTERBURN; MARTIN, 2012).

3.10 TORTA DE MILHO (TM)

A utilização de suportes sólidos de origem agroindustrial, para a produção de tensoativos de origem biológica é uma opção. Assim sendo, para este trabalho, utilizou-se a torta de milho (TM), gentilmente cedida pela Caramuru (Caramuru Alimentos, Unidade Apucarana, Apucarana, Paraná), como substrato sólido.

Torta de milho (TM) (Figura 6) é o resultante industrial da extração do óleo de milho. Na tabela 4 está retratada a sua composição centesimal.

Figura 6 – Torta de milho (TM)



Fonte: próprio autor

Provável processo de obtenção da torta: A extração de óleos vegetais é feita de forma mecânica, nas chamadas prensas contínuas. Ao final do processo de prensagem são obtidos dois materiais: a chamada torta, que é a porção sólida resultante da prensagem e o óleo bruto que pode conter partículas sólidas. O óleo segue para um processo de filtragem, enquanto a torta pode sofrer um segundo processo de extração com utilização de solventes (RAMALHO; SUAREZ, 2012).

Tabela 4 – Composição centesimal da Torta de Milho

	Torta de Milho (%)
Carboidratos	55,0
Umidade	13,0
Proteínas	12,5
Fibras	4,0
Resíduo mineral	4,0
Lipídeos	0,7

Fonte: Caramuru – comunicação pessoal (www.caramuru.com)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentados os materiais e metodologias utilizadas no decorrer deste trabalho. O mesmo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.1 MATERIAL

A tabela 5 apresenta os principais materiais químicos utilizados.

Tabela 5 – Materiais químicos utilizados nos experimentos.

Item utilizado	Fabricante
Triptona	Acumedia
Extrato de levedura	Reatec
NaCl	Synth
Ágar	Himedia
KH ₂ PO ₄	Nuclear
K ₂ HPO ₄	Nuclear
MgSO ₄ •7H ₂ O	Nuclear
(NH ₄) ₂ SO ₄	Biotec
Glicerol	Vetec
Clorofórmio	Synth
Metanol	Synth
KCl	Synth
Ácido sulfúrico	Anidrol
Orcinol	Reagen

Fonte: Próprio autor

4.1.2 Microrganismo

A cepa bacteriana utilizada foi a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Isolada originalmente na Austrália (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa de *P. aeruginosa* mundialmente mais utilizada em estudos laboratoriais, apresenta o genoma sequenciado e publicado (STOVER et al., 2000). Esta cepa PAO1 foi mantida em meio líquido Luria-Bertani (LB) (composição por litro: 10 g tripton, 5 g extrato de levedura e 10 g de NaCl) adicionado de glicerol (20%, v/v) e estocada a -80°C.

4.2 PREPARO DO INÓCULO

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/200rpm. O inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de 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.600nm), sendo utilizado quando a absorbância estivesse entre 0,6 – 0,8 (CAMILIOS NETO, 2010).

4.3 CULTIVO SUBMERSO (CSB)

Os ensaios de CSb foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL contendo 25 mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O e 1,0 g (NH₄)₂SO₄) acrescentado de glicerol 3% (v/v) ou 6% (v/v) e amido. Os meios foram esterilizados por 20 min, a 121°C, resfriados e inoculados em uma proporção de 4% v/v. Os meios inoculados foram incubados em agitador orbital a 37°C/200rpm por nove dias.

4.4 CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO (CSbE)

Os ensaios de CSbE foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL contendo 25 mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) acrescentado de glicerol 3% (v/v). Os cultivos foram inoculados com 4% (v/v) de inóculo e incubados a 37°C por nove dias.

4.5 CULTIVO SUBMERSO ESTÁTICO COM SUPORTE SÓLIDO DE TORTA DE MILHO (CSbE - TM)

Os ensaios de CSbE - TM foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL contendo 25 mL de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e como suporte sólido, 10% (m/v) de torta de milho (TM), gentilmente cedida pela Caramuru Alimentos, acrescentado de glicerol (3% v/v). Os cultivos foram inoculados com 4% (v/v) de inóculo e incubados a 37°C por nove dias.

4.6 CULTIVO SUBMERSO COM SUPORTE SÓLIDO DE TORTA DE MILHO (CSb - TM)

Os ensaios para CSb - TM foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL, 250 mL e 1L contendo, como suporte sólido, de 2,5% (m/v) a 20% (m/v) de torta de milho (TM), na presença ou ausência de extrato de TM e/ou amido, em 25 mL, 100 mL e 400 mL (respectivamente aos volumes dos frascos) de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) acrescentado de glicerol 3 a 10% (v/v) e óleo de soja 1 a 6% (m/v). Os meios foram esterilizados por 20 min a 121°C, resfriados e inoculados com 4% de inóculo em volume de meio de cultivo. Os cultivos foram incubados a 37°C/200 rpm por nove dias.

4.6.1 Preparo do Extrato de Torta de Milho (ExTM)

O extrato foi preparado em tubos de centrifugação de 50 mL (tipo Falcon), no qual foi adicionado 30 mL de água destilada em 2,5g de torta de milho moída (20 mesh) e submetidos à autoclave por 20 min a 121°C. Em seguida foram centrifugados e o sobrenadante foi utilizado para os cultivos.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação do Crescimento Bacteriano do Inóculo

O crescimento bacteriano foi determinado por turbidimetria a 600 nm.

4.7.2 Extração dos Ramnolipídeos

Os ensaios de CSbE-TM e CSb-TM foram interrompidos com nove dias de cultivo e submetidos à extração com água destilada em agitador orbital (200 rpm) por 10 minutos. Os extratos resultantes, assim como o CSb e CSbE, foram centrifugados a 4.500 rpm, por 15 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes livres de células foram submetidos à extração com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:1) e os ramnolipídeos recuperados na fração orgânica. Os ramnolipídeos recuperados foram solubilizados em água destilada.

4.7.3 Quantificação dos Ramnolipídeos

A partir da fração orgânica solubilizada em água (item 4.7.2) foi realizada a determinação dos açúcares redutores totais, pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se uma curva padrão de ramnose, que possibilita a quantificação indireta dos ramnolipídeos.

4.7.3.1 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).

4.7.4 Precipitação de Ramnolipídeos em Meio Ácido

O sobrenadante livre de células (item 4.7.2) foi acidificado com ácido clorídrico (37%) até pH 2 e mantido em câmara fria por, pelo menos, 5 dias para precipitação dos ramnolipídeos. Em seguida, o meio foi centrifugado e o *pellet* foi submetido à extração com clorofórmio-metanol (9:1). Após a extração, a amostra foi liofilizada.

4.7.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os ramnolipídeos liofilizados (item 4.7.4) foram solubilizados em clorofórmio e submetidos a análise por cromatografia em camada delgada (CCD) sobre sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄). A fase móvel era composta por uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético (65, 7,5 e 2 mL respectivamente). A presença dos ramnolipídeos foi identificada com a utilização de revelador específico para carboidratos (orcinol) e também por uma mistura de metanol e ácido sulfúrico, aquecidos a 100°C por 5 min (SKISPISKI, 1975).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO TORTA DE MILHO.

Experimentos iniciais apontaram que os cultivos submersos com suporte sólido de torta de milho (CSb – TM), quando comparado aos outros métodos de produção (cultivo submerso e cultivo submerso estático), obtiveram resultados promissores, chegando a um aumento de 4 vezes na produção de ramnolipídeos (Tabela 6). TM é um subproduto sólido da extração do óleo de milho, que pode servir como um ótimo substrato, tanto para a produção de ramnolipídeos, oferecendo nutrientes para o crescimento bacteriano e biossíntese do composto, como para a adesão da bactéria (CAMILIOS-NETO et. al., 2011).

Tabela 6 – Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em cultivo submerso estático, cultivo submerso, cultivo submerso estático com TM e cultivo submerso com TM.

Sigla	Descrição do cultivo	Cepa	Condição de cultivo	Ramnolipídeos (g/L)*
CSbE	Cultivo submerso estático, 3% glicerol	PAO1	37°C, 9 dias,	2,3 ± 0,32
CSb	Cultivo submerso, 3% glicerol	PAO1	37°C, 9 dias, 200 rpm	3 ± 0,14
CSbE - TM	Cultivo submerso estático com TM, 3% glicerol e 10%TM	PAO1	37°C, 9 dias,	4,2 ± 0,51
CSb - TM	Cultivo submerso com TM, 3% glicerol e 10% TM	PAO1	37°C, 9 dias, 200 rpm	13,1 ± 0,71

Fonte: Próprio autor

*Concentrações de ramnolipídeos são médias de triplicatas ± desvio padrão

Uma vez que os estudos iniciais indicaram que os cultivos submersos com suporte sólido de torta de milho (CSb – TM) foram os mais promissores, esses foram os escolhidos para seguir com os demais experimentos.

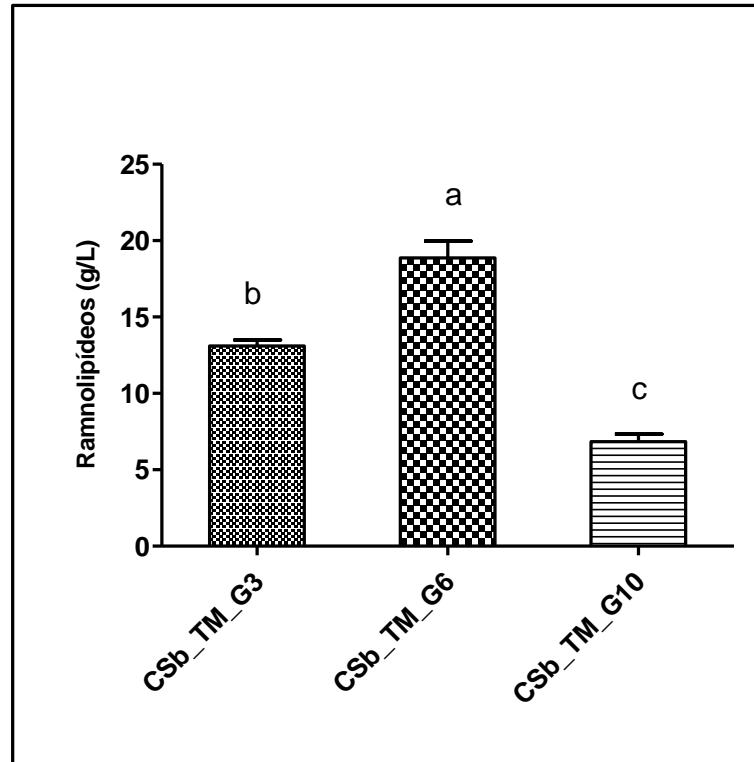
5.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO.

Glicerol, conhecido comercialmente como glicerina, um composto orgânico pertencente à função álcool, de fórmula molecular $C_3H_8O_3$, pode ser uma boa fonte de carbono para a produção de biossurfactante. Autores como Monteiro et. al. (2007), Arino et. al. (1996), Santana Filho (2009) e Sodagari; Invally; Ju, (2018), utilizaram em suas pesquisas.

Neste trabalho foi avaliado o efeito da concentração do glicerol de 3%, 6% e 10% (v/v) sobre a produção do biossurfactante (Gráfico 1). Ao comparar as várias concentrações de glicerol, notam-se diferenças significativas na produção dos ramnolipídeos. Quando aumentado, de 3% para 6% (v/v) a quantidade de glicerol nos cultivos, observa-se um incremento na produção de ramnolipídeos, de $13,1 \text{ g/L} \pm 0,7$ para $18,8 \text{ g/L} \pm 1,91$ (Gráfico 1 – médias de triplicatas \pm desvio padrão). Entretanto, ao adicionar 10% (v/v) de glicerol, a produção do tensoativo caiu significativamente, produzindo apenas $6,8 \text{ g/L} \pm 0,87$. O excesso de glicerol adicionado ao meio pode ter gerado problemas de osmorregulação/absorção de nutrientes pela bactéria, levando a diminuição da produção. Dessa forma, as condições de cultivo com 3% e 10% (v/v) de glicerol foram descartadas para os próximos experimentos.

Em análises de produção de ramnolipídeos feito por Ehinmitola, Aransiola e Adeagbo (2018), as maiores concentrações alcançadas do biossurfactante foram de 4 g/L, utilizando 20 g/L de glicose e 0,5 g/L utilizando 2 % (m/v) de glicerol. Estes resultados também foram abaixo do alcançado no presente trabalho.

Gráfico 1 – Efeito da concentração de glicerol em cultivos submersos com substrato sólido de torta de milho para a produção de ramnolipídeos por PAO1.



Fonte: Próprio autor

CSb_TM_G3: Cultivo Submerso com 10% (m/v) de TM e 3% (v/v) de glicerol.

CSb_TM_G6: Cultivo Submerso com 10% (m/v) de TM e 6% (v/v) de glicerol.

CSb_TM_G10: Cultivo Submerso com 10% (m/v) de TM e 10% (v/v) de glicerol.

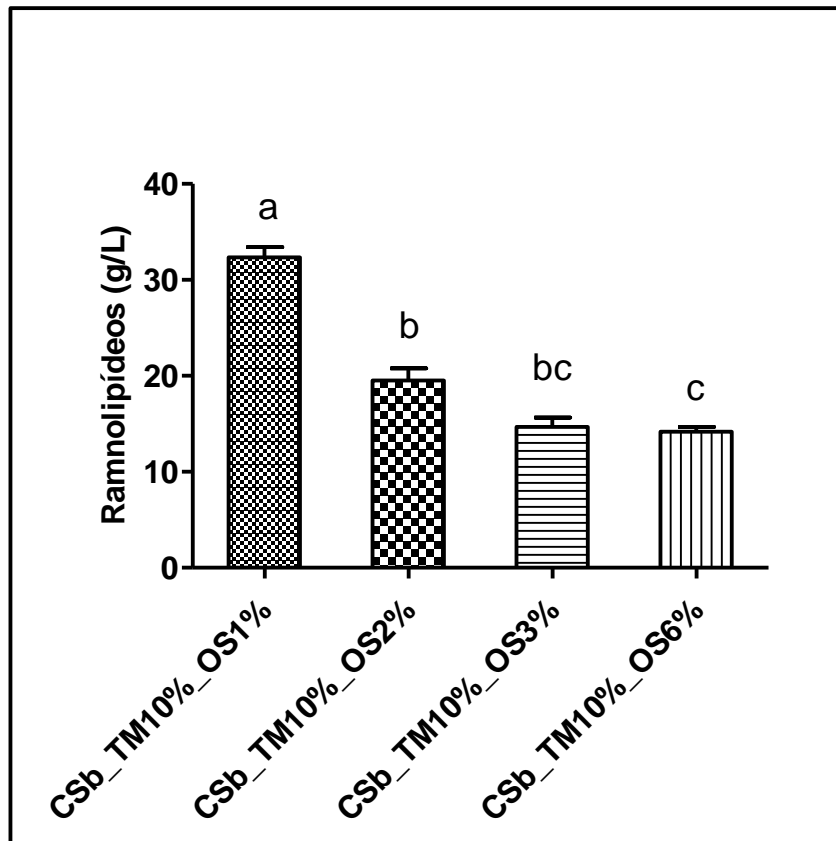
As letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor < 0,05.

5.3 AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO

Nos experimentos realizados com diferentes concentrações de glicerol (Gráfico 1) o melhor resultado obtido foi utilizando 6% (v/v). Para melhorar a produção do ramnolipídeo e evitar a formação de espuma, a concentração de 6% (v/v) de glicerol foi mantida e adicionalmente foi avaliado o acréscimo de óleo de

soja (OS) nos cultivos em diferentes concentrações (Gráfico 2), pois este também pode ser doador de carbono para a síntese do composto surfactante.

Gráfico 2 - Efeito da concentração de óleo de soja em cultivos submersos com substrato sólido de torta de milho para a produção de ramnolipídeos por PAO1.



Fonte: Próprio autor

CSb_TM10%_OS1%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM10%_OS2%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 2% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM10%_OS3%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 3% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM10%_OS6%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 6% (m/v) de óleo de soja.

As letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor < 0,05.

Ao adicionar 1% (m/v) de óleo de soja nos cultivos submersos com torta de milho, notou-se um aumento na produção dos ramnolipídeos, chegando a uma média de produção de $32,35 \pm 2,11$ g/L (Gráfico 2 - CSb_TM10%_OS1%). No entanto, o aumento da concentração de óleo de soja (2%, 3% e 6% m/v), diminuiu a produção do composto surfactante ($19,5 \pm 1,83$; $14,7 \pm 1,67$ e $14,2 \pm 0,85$, respectivamente). Não houve diferença estatística em utilizar 2 % ou 3 % (m/v) de OS, assim como adicionar 3% ou 6% (m/v) de OS. Em contrapartida quando comparamos a utilização de 2% e 6% (m/v) de OS, observamos que há diferença na produção, uma vez que a condição de 2% (m/v) é superior a 6% (m/v) de óleo.

Radzuan, Banat e Winteburn (2018) em seus estudos de produção de ramnolipídeos por PAO1 utilizando destilado de ácido graxo de palma (PFAD) e éster metílico de ácido graxo (FAME) como fonte de carbono (10 g/L), alcançaram uma concentração máxima de ramnolipídeo de 3,4 g/L e 3 g/L, respectivamente, após 84 h, sendo inferior ao atingido neste trabalho.

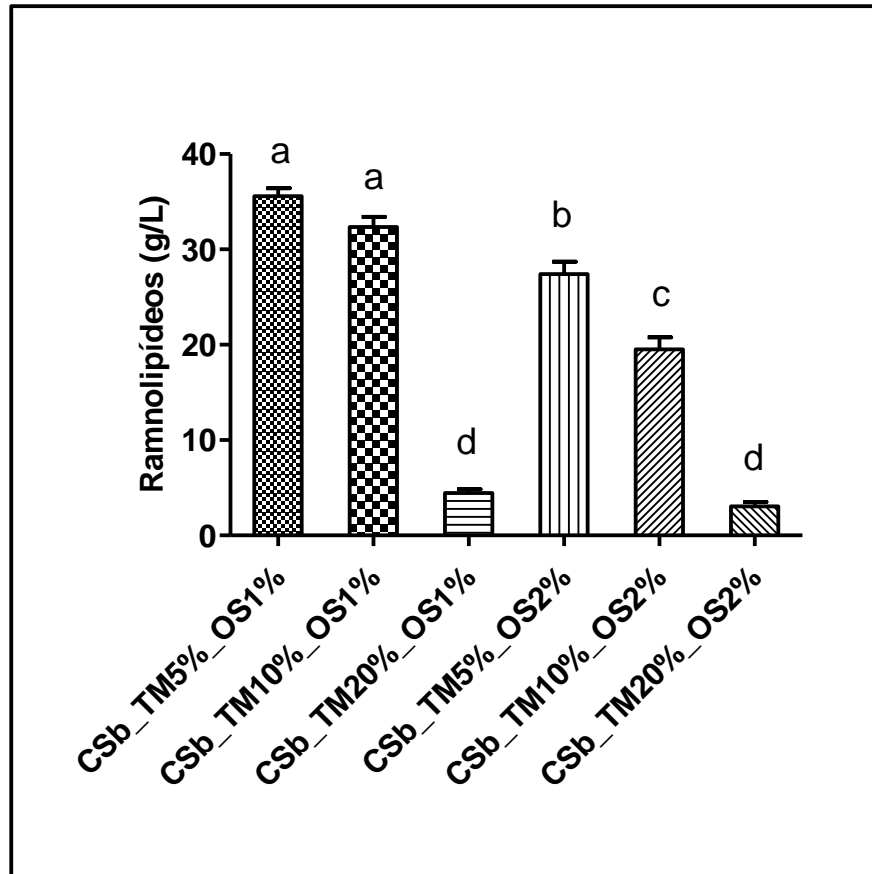
5.4 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE TORTA DE MILHO E CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA EM CULTIVOS SUBMERSOS.

Posto que em experimentos anteriores, as melhores concentrações de glicerol e óleo de soja foram encontradas, o próximo experimento foi conduzido com 6% (v/v) de glicerol, 1% e 2% (m/v) de óleo de soja (Gráfico 2).

Simultaneamente, várias concentrações de torta de milho (TM) nos cultivos submersos foram avaliadas, com o objetivo de atingir a quantidade em que se obtém a máxima produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* (Gráfico 3).

A concentração de 2% (m/v) de óleo de soja, identificada como não promissora nos testes anteriores (Gráfico 2), foi novamente testada, devido à diminuição da concentração de TM, a fim de se atingir a melhor combinação para a produção.

Gráfico 3 – Efeito das diferentes concentrações de torta de milho e óleo de soja em cultivos submersos para a produção de ramnolipídeos por PAO1.



Fonte: Próprio autor

CSb_TM5%_OS1%: Cultivo submerso com 5% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM10%_OS1%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM20%_OS1%: Cultivo submerso com 20% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM5%_OS2%: Cultivo submerso com 5% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 2% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM10%_OS2%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 2% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM20%_OS2%: Cultivo submerso com 20% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 2% (m/v) de óleo de soja.

As letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor < 0,05.

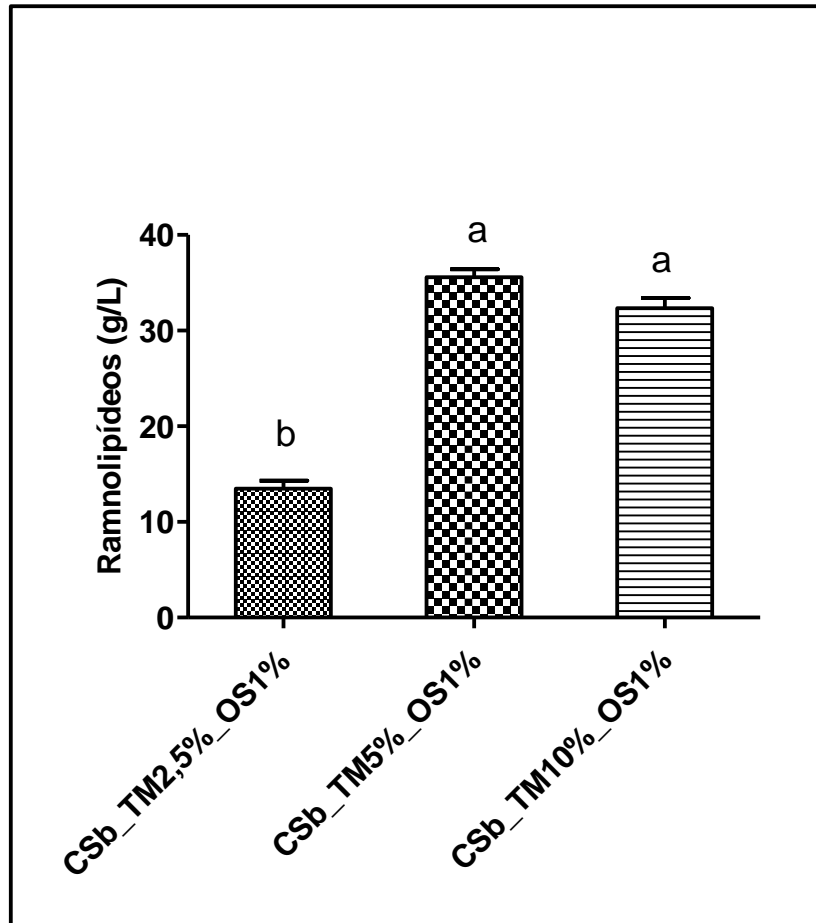
De acordo com os resultados encontrados e em concordância com os resultados anteriores (Gráfico 2), a utilização de 2 % (m/v) de óleo de soja, provoca a diminuição da produção de ramnolipídeos pela bactéria PAO1 (Gráfico 3, CSb_TM5%_OS2%, CSb_TM10%_OS2%, CSb_TM20%_OS2%).

Quando os cultivos foram conduzidos com 20 % (m/v) de TM, houve um decréscimo da produção do tensoativo e não houve diferença estatística em utilizar 1% ou 2% de OS. Nesses experimentos as produções médias foram de 4,45 g/L \pm 0,82 e 3,06 g/L \pm 0,75 respectivamente (Gráfico 3). A presença de nutrientes em excesso, devido a maior quantidade de torta de milho, pode ter inibido o crescimento das células bacterianas, dessa forma, tendo menor quantidade de células viáveis a produção de ramnolipídeos teria diminuído.

A adição de 1% (m/v) de óleo de soja foi a melhor condição para a produção de ramnolipídeos (Gráfico 3). Como a concentração de 5% e 10% (m/v) de torta de milho não apresentou diferença estatística significativa na produção de ramnolipídeos, o uso de menos substrato sólido é interessante, pois pode acarretar economia para o processo de produção. Individualmente essas condições produziram 36,4 g/L e 35,5 g/L de ramnolipídeos respectivamente, sendo a primeira condição (5% m/v) mais vantajosa.

Para avaliar se uma quantidade menor que 5 % (m/v) de torta de milho como suporte sólido resultasse numa melhor produção do composto tensoativo, foi testada a concentração de 2,5% de TM nos cultivos. No gráfico 4, encontram-se os resultados obtidos. Comparando com as melhores condições de cultivo encontradas, observa-se que na concentração testada, a produção de ramnolipídeos foi diminuída quase 2,5 vezes (de 36,4 para 14,71 g/L), provavelmente por apresentar quantidade inferior de nutrientes disponíveis para a bactéria crescer e sintetizar a molécula surfactante.

Gráfico 4 – Análise da diminuição da concentração de torta de milho em cultivos submersos com suporte sólido para a produção de ramnolipídeos por PAO1.



Fonte: Próprio autor

CSb_TM2,5%_OS1%: Cultivo submerso com 2,5% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM5%_OS1%: Cultivo submerso com 5% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

CSb_TM10%_OS1%: Cultivo submerso com 10% (m/v) de TM, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja.

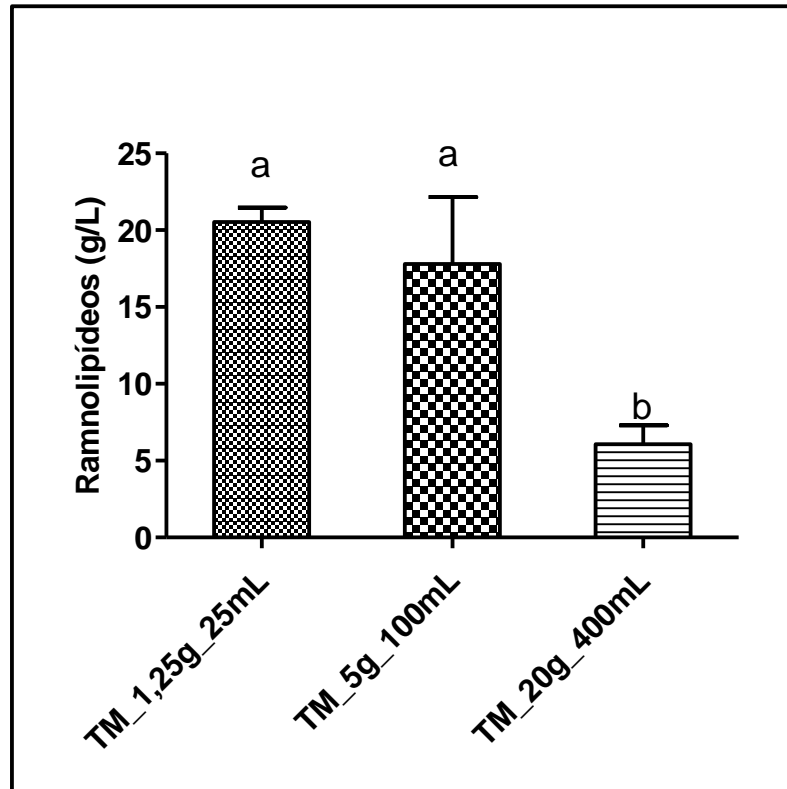
As letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor < 0,05.

5.5 EFEITO DO ESCALONAMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO.

Após determinação da melhor condição de cultivo para a produção de ramnolipídeos por PAO1 [Cultivo submerso com 5% (m/v) de Torta de milho, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) óleo de soja], novos experimentos com volumes maiores foram realizados, mantendo a proporção de TM, glicerol e óleo de soja.

De acordo com os valores de ramnolipídeos produzidos (Gráfico 5), ao aumentar quatro vezes (Gráfico 5 - TM_5g_100mL) o volume de cultivo em relação ao controle (Gráfico 5 - TM_1,25g_25mL), não houve diferença estatística significativa (Gráfico 5). Contudo, quando aumentamos o volume 16 vezes (Gráfico 5 - TM_20g_400mL) em relação ao controle e quatro vezes em relação ao primeiro teste (Gráfico 5 - TM_5g_100mL), não obtivemos bons resultados. Uma vez que a produção de ramnolipídeos por PAO1 caiu significativamente (de 22,15 g/L para 8,42 g/L). Essa queda brusca da produção pode ser devido ao aumento do volume de cultivo, dificultando as trocas gasosas e conseqüentemente afetando negativamente o crescimento bacteriano.

Gráfico 5 – Efeito do escalonamento sobre a produção de ramnolipídeos em cultivos submersos com torta de milho.



Fonte: Próprio autor

TM_1,25g_25mL: Cultivo submerso com 1,25g (5% m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol e 1% (m/v) óleo de soja. Volume final de 25 mL.

TM_5g_100mL: Cultivo submerso com 5g (5% m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol e 1% (m/v) óleo de soja. Volume final de 100 mL.

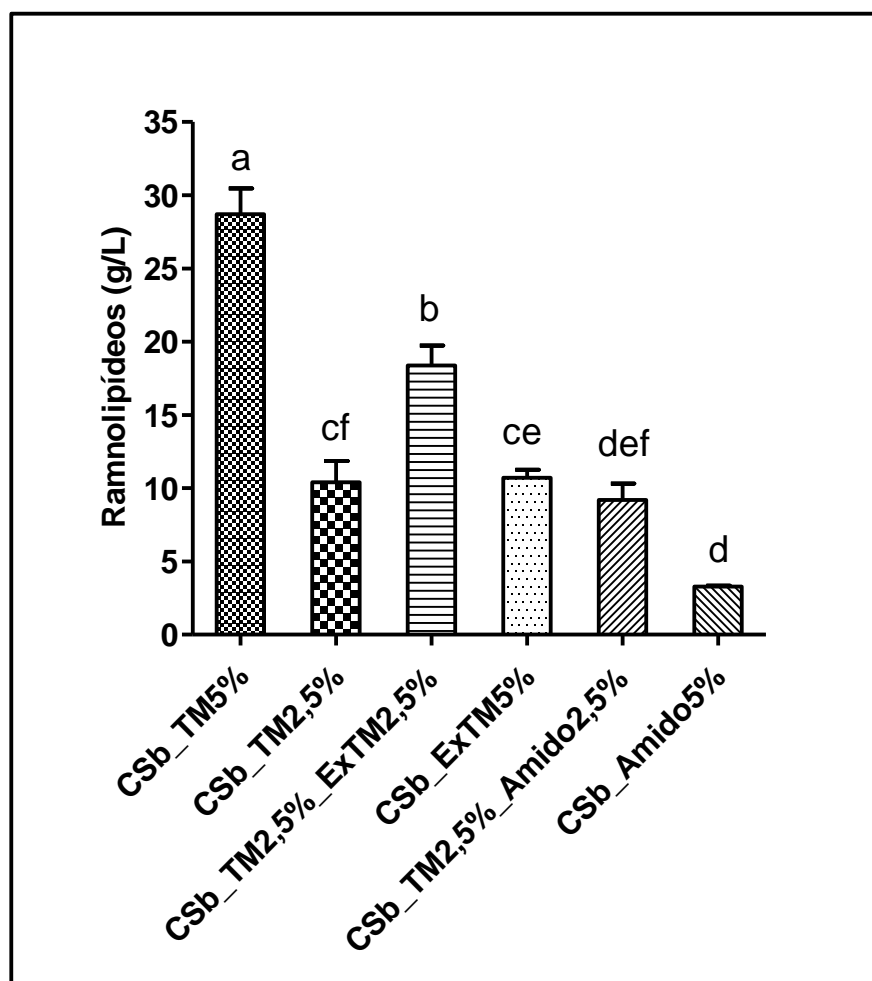
TM_20g_400mL: Cultivo submerso com 20g (5% m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol e 1% (m/v) óleo de soja. Volume final de 400 mL.

As letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor < 0,05.

5.6 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DA TORTA DE MILHO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR PAO1 EM CULTIVOS SUBMERSOS.

Com propósito de compreender os efeitos da torta de milho na produção de ramnolípídeos como substrato e suporte sólido, testes substituindo total e parcialmente a TM foram realizados (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Produção de ramnolípídeos por PAO1 em cultivos submersos com torta de milho (TM), Extrato de torta de milho (ExTM) e amido.



Fonte: Próprio autor

CSb_TM5%: Cultivo submerso com 5% (m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol e 1% (m/v) óleo de soja.*

CSb_TM2,5%: Cultivo submerso com 2,5% (m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol e 1% (m/v) óleo de soja.*

CSb_TM2,5%_ExTM2,5%: Cultivo submerso com 2,5% (m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol, 1% (m/v) óleo de soja e Extrato de torta de milho (2,5% v/v).*

CSb_ExTM5%: Cultivo submerso sem torta de milho, 6% (v/v) glicerol, 1% (m/v) óleo de soja e Extrato de torta de milho (5%).*

CSb_TM2,5%_Amido2,5%: Cultivo submerso com 2,5% (m/v) de torta de milho, 6% (v/v) glicerol, 1% (m/v) óleo de soja e 2,5% (m/v) amido.*

CSb_Amido5%: Cultivo submerso com 5% (m/v) amido, 6% (v/v) glicerol e 1% (m/v) óleo de soja. *

As letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatisticamente significativa em teste de Tukey, p-valor < 0,05. *Volume final de 25 mL.

Com os resultados encontrados, nota-se que a presença de um substrato e suporte sólido faz diferença na produção de ramnolipídeos, pois quando o substrato/suporte sólido foi retirado do cultivo, a produção diminuiu consideravelmente (Gráfico 6 - CSb_ExTM5% e CSb_Amido5%).

Em concordância com experimentos anteriores (Gráfico 4), quando diminuimos a concentração de TM para 2,5% (m/v) nos cultivos, ocorre um decréscimo da produção do tensoativo (Gráfico 6 - CSb_TM2,5%). Mas quando comparamos essa condição com um cultivo utilizando apenas o extrato de torta de milho (CSb_ExTM5%) não há diferença estatística. Isto é, independente de utilizar o suporte sólido (2,5% m/v) ou apenas um meio líquido de extrato de torta de milho 5% (v/v) (correspondente a utilizar 5% m/v de TM), teremos a mesma produção de ramnolipídeos. Dessa forma, o resultado sugere que o extrato de TM 5% (v/v) corresponde ao que 2,5% (m/v) de TM sólida oferece ao microrganismo para a síntese do tensoativo.

Visto que, ao reduzir a quantidade de TM, a produção do tensoativo diminuiu, tentou-se compensar a redução do suporte sólido adicionando extrato de torta de milho (ExTM) ou amido. Nos cultivos substituídos com amido (Gráfico 6 – CSb_TM2,5%_Amido2,5%) a produção continuou baixa e estatisticamente semelhante à utilização de apenas 2,5% (m/v) de TM (Gráfico 6). Assim como utilizar apenas extrato de torta de milho é estatisticamente semelhante à produção com TM e amido. Mas quando usado o extrato de torta de milho como substituinte a produção de ramnolipídeos volta a aumentar (Gráfico 6 – CSb_TM2,5%_ExTM2,5%).

Ao utilizar ExTM, comprovou-se que este é um substituto mais eficiente para a TM do que o amido, entretanto a melhor condição para a produção de ramnolipídeos foi quando o substrato/suporte sólido estava presente a 5 % (m/v) e sem

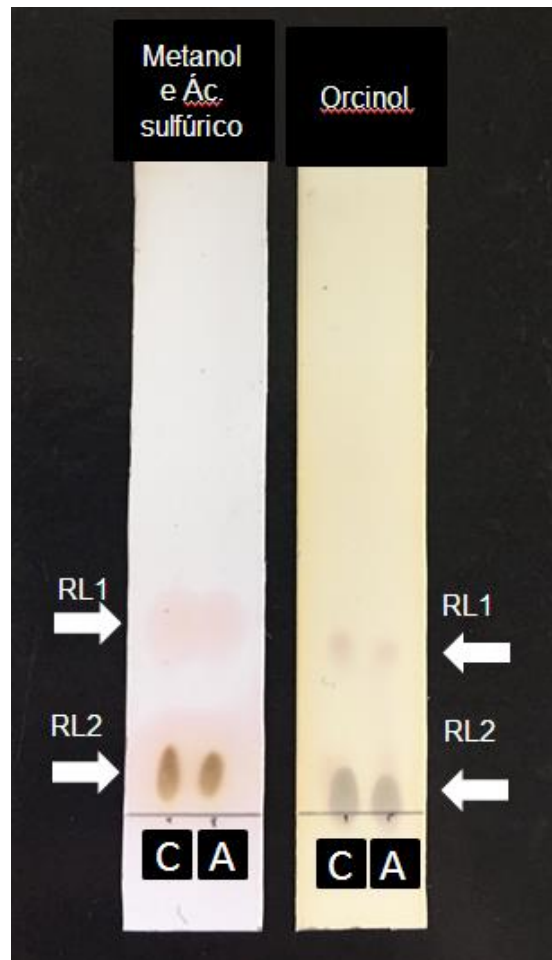
a presença de um substituinte (Gráfico 6). O presente resultado sugere que a presença do sólido (TM) é indispensável para os altos níveis de produção de ramnolipídeos e também que os componentes solúveis da torta de milho que promovem a indução da produção de ramnolipídeos são outros que não o amido.

5.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DE RAMNOLIPÍDEOS PRODUZIDOS EM CULTIVOS SUBMERSOS COM TORTA DE MILHO.

A presença de mono-ramnolipídeos (RL1) e di-ramnolipídeos (RL2), produzidos por cultivos submersos com torta de milho como substrato sólido, na melhor condição encontrada, foram visualizados por cromatografia em camada delgada. A maior proporção de RL2 é notada pela intensidade das bandas reveladas pelo orcinol (Figura 7).

O resultado encontrado, maior proporção de RL2, está de acordo com os resultados alcançados por Sodagari, Invally e Ju (2018). Uma vez que estes autores em experimentos conduzidos com glicerol como fonte de carbono, obtiveram 64 % de di-ramnolipídeos e 36 % de mono-ramnolipídeos. No entanto, os resultados vistos na figura 7, provavelmente indiquem uma relação superior a 90 % de RL2, haja vista que o extrato bruto controle (Figura 7 - C) analisado por espectrometria de massas apresentou uma relação RL2/RL1 superior a 9, sugerindo uma relação de 90% de RL2. Além disso, a produção aeróbica de ramnolipídeos favorece a síntese de moléculas RL2. Enquanto, a produção anaeróbica favorece a obtenção de RL1. Isso se deve a regulação negativa sobre o gene *rhIC*, quando em anaerobiose, assim com menos RhIC (ramnosiltransferase II) haverá menor produção de RL2 (ZHAO, et. al., 2018)

Figura 7 – Cromatograma de Cromatografia em Camada Delgada dos ramnolipídeos produzidos em Cultivos Submersos com Torta de Milho como substrato sólido.



Fonte: Próprio autor

CCD revelada com metanol + ácido sulfúrico e orcinol. (C) Extrato bruto controle contendo mistura de mono-ramnolipídeos e di-ramnolipídeos. (A) Extrato bruto contendo ramnolipídeos produzidos em cultivos submersos com torta de milho como suporte sólido.

6 CONCLUSÕES

- A adição de um suporte sólido de torta de milho ao cultivo aumentou significativamente a produção de ramnolipídeos por PAO1, sendo uma estratégia promissora para a produção de biossurfactantes.
- A utilização de 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja melhora a produção de ramnolipídeos por PAO1 em cultivo submerso com torta de milho.
- A quantidade ideal de torta de milho para a produção de ramnolipídeos é de 5 % (m/v).
- Por meio de estudos sobre a influência dos componentes da torta de milho, constatou-se que a característica física (suporte sólido) da torta auxilia na síntese do ramnolipídeo. Constatou-se ainda que nutrientes solúveis dessa torta, além do amido, também influencia positivamente a síntese de ramnolipídeos.
- Através da análise cromatográfica, identificou-se maior síntese de moléculas com duas porções de ramnose (di-ramnolipídeo).
- A maior produção de ramnolipídeos (36 g/L) foi alcançada em cultivo submerso com 5% (m/v) de torta de milho, 6% (v/v) de glicerol e 1% (m/v) de óleo de soja, durante 9 dias à 37°C.

7 EXPERIMENTOS FUTUROS

- Determinação da mistura de congêneres de ramnolipídeos produzidos por cultivos submersos com suporte sólido, e a pureza destes, por ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.
- Purificação do extrato bruto de ramnolipídeos obtido com intuito de se obter uma molécula única de ramnolipídeo, para fim de aplicação farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, Ahmad Mohammad; LÉPINE, François; DÉZIEL, Eric. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology Biotechnology**, [s. L.], v. 5, n. 86, p.1323-1336, 25 mar. 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.

AL-TAHHAN, R.A.; SANDRIN, T.R.; BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied Environmental Microbiology**. 66 (8), 3262–3268, 2000

AMANI, H.; SARRAFZADEH, M.H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M.R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 2010, vol.75, pp.209–214.

AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H.M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 237-240, 2007.

ARAB, F.; MULLIGAN, C. N. Rhamnolipids: Characteristics, Production, Applications, and Analysis. In: MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Biosurfactants Research Trends and Applications**, New York: CRC Press, 2014. p. 49-104.

ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 162-168, 1996.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante; QUADROS, Cedenir Pereira de; PASTORE, Gláucia Maria. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p.979-984, dez. 2008.

BASSLER, Bonnie L.. Quorum Sensing And Its Control. **The FASEB Journal**, Rockville Pike Bethesda, v. 30, n. 1, p.96.1-96.1, 1 abr. 2016. Disponível em: <https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.30.1_supplement.96.1>. Acesso em: 02 fev. 2018.

BORDAS, F.; LAFRANCE, P.; VILLEMUR, R. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 69-76, 2005.

BORDOLOI N.K.; KONWAR, B.K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2008; 63(1):73–82.

BRENCIC, A.; MCFARLAND, K.A.; MCMANUS, H.R.; CASTANG, S.; MOGNO, I.; DOVE, S.L.; LORY, S. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. **Molecular Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 434-45, Aug 2009.

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

CARAMURU ALIMENTOS: www.caramuru.com

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.

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

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 21 1999.

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.

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

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O.A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1440, n. 2-3, p. 244-52, Sep 22 1999.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbiol degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, 2011, doi:10.4061/2011/941810

EHINMITOLA, Emmanuel Olufemi; ARANSIOLA, Elizabeth Funmilayo; ADEAGBO, Oluwaseyi Peter. Comparative study of various carbon sources on rhamnolipid production. **South African Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 26, p.42-48, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajce.2018.09.001>

EL-AMINE BENDAHA, M.; MEBREK, S.; NAIMI, M.; TIFRIT, A.; BELAOUNI, H.A.; ABBOUNI, B. Isolation and Comparison of Rhamnolipids Production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10. **Open Access Scientific Reports**, 2012;1: 544.

GONG, Z.; PENG, Y.; WANG, Q. 2015. Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by *Pseudomonas aeruginosa* with plant oils. *Biotechnology Letters*, 37, 2033–2038.

GUNTHER, N.W.; NUÑEZ, A.; FETT, W.; SOLAIMAN, D.K.Y. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005; 71(5): 2288–2293.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 301-305, 1984.

HOLMBERG, K. Natural Surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148-159, 2001.

HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of General Microbiology**, 13, 572, 1955.

HONNA, C. Y. **Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2013.

JARDIM PACHECO, Graziela. **EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PROTEOMA DE *Pseudomonas aeruginosa* PA1 DURANTE A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS EM BIORREADOR ACOPLADO A CONTACTORES DE MEMBRANA**. 2013. 125 p. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

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.

JOHANN, S.; SEILER, T.B.; TISO, T.; BLUHM, K.; BLANK, L.M.; HOLLERT, H. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 548-549, p.155-163, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.066>.

JOSEANE PEREZ, Karla. **CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E SURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp. ISOLADOS DE PUBA**. 2014. 215 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia)- Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL D.A. 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.

KASKATEPE, Banu.; YILDIZ, Sulhiye. Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* Species. **Brazilian archives biology technology**, Curitiba , v. 59, e16160786, 2016.

KRONEMBERGER, F. A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. 160p. Tese (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ. 2007.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LAN, G.; FAN, Q.; LIU, Y.; CHEN, C.; LI, G.; LIU, Y.; YIN, X. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 44-54, 2015.

LAMONT, I. L.; BEARE, P.A.; OCHSNER, U.; VASIL, A.I.; VASIL, M.L. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 7072-7077, 2002.

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.

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.

LOH, K. C.; CAO, B. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*-A review of proteomics studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 1, p. 1-12, 2008.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, 30, 558-565, 2012.

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.

MONTEIRO, S. A. **Caracterização molecular e estrutural de biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

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

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-15, Nov 2006.

NANGANURU, H.Y.; KORRAPATI, N. Studies on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas putida*. **International Journal of Research in Computer Science**, 2012. 2(4); 19-21.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedade e Aplicações. **Química Nova**, Campinas - SP, v. 25, n. 5, p. 772-776, mar. 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L.A.G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

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.

NOH, N.A.; SALLEH, S M.; YAHYA, A.R. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 via fed-batch cultivation based on maximum substrate uptake rate. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 58, n. 6, p.617-623, 14 mar. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12236>.

OCHSNER, U. A.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19787-95, Aug 5 1994.

OLIVEIRA, F.J.S.; VAZQUEZ, L.; CAMPOS, N.P.; FRANÇA, F.P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, 2009;44(4): 383-389.

ONWOSI, C.O.; ODIBO, F.J.C. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2012; 28: 937–942.

RADZUAN, M.; BANAT, I.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology** (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.052>

RADZUAN, M.; BANAT, I.; WINTERBURN, J. Biorefining palm oil agricultural refinery waste for added value rhamnolipid production via fermentation. **Industrial Crops & Products**, [s.l.], v. 116, p.64-72, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.045>.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z.. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.2 15, 9 nov. 2012. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130002>.

RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 708-18, May 2001.

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

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.

REIS, R. S.; PEREIRA, A. G.; NEVES, B. C., FREIRE, D. M. G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 6377–6384, 2011.

RON, E.Z. and ROSENBERG, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, 3, 229–236.

SADOVSKAYA, I.; BRISSON, J.R.; LAM, J.S.; RICHARDS, J.C.; ALTMAN, E. Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. **European Journal of Biochemistry**, v. 255, n. 3, p. 673-84, Aug 1 1998.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, GEBJ-29, 2011.

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

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A.P.; VASQUEZ, G.S.; SANTA ANNA, L.M.; PEREIRA, N. JR.; FREIRE, D.M. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 98-100, p. 1025-1035, 2002.

SANTANA FILHO, ARQUIMEDES P. DE. **RAMNOLÍPÍDEOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: ESTUDOS DE PRODUÇÃO E DE VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE HOMÓLOGOS**. 2009. 87 p. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SANTA ANNA, L. M. M.; SEBASTIAN, G.V.; PEREIRA, N. JR.; ALVES, T.L.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 91-93, p. 459-467, 2001.

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** (2016), doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.019

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 Enzymology**, v.35, p.396-425. 1975.

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

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

SODAGARI, Maysam; INVALLY, Krutika; JU, Lu-kwang. Maximize rhamnolipid production with low foaming and high yield. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 110, p.79-86, mar. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.10.004>.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S. L.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, K. S.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S.; OLSON, M.V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959-964, 2000.

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

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

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

WITTGENS, A.; TISO, T.; ARNDT, T.T.; WENK, P.; HEMMERICH, J.; MÜLLER, C.; WICHMANN, R.; KÜPPER, B.; ZWICK, M.; WILHELM, S.; HAUSMANN, R.; SYLDATK, C.; ROSENAU, F.; BLANK, L.M. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Cell Factories**, 2011; 10: 80.

WINTERBURN, J. B.; MARTIN, P. J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 187–195, 2012.

WU, J.Y.; YEH, K.L.; LU, W.B.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1157-1164, 2008.

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.

ZHAO, F.; SHI, R.; MA, F.; HAN, S.; ZHANG, Y. Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Cell Factories**, v.17, n. 1, p. 327-345, 2018

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