

## LA QUÍMICA ANALÍTICA EN LA SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RAMNOLÍPIDOS

### ANALYTICAL CHEMISTRY IN THE SEPARATION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF RAMNOLIPIDS

Arelis Abalos Rodríguez<sup>a,\*</sup> (0000-0002-0007-5825)  
Odalys Rodríguez Gámez<sup>a</sup> (0000-0001-6511-7064)  
Yaima Barrios San Martín<sup>b</sup> (0000-0002-8274-434X)

<sup>a</sup> Universidad de Oriente.

<sup>b</sup> Empresa Comercializadora de Combustibles.

\*aabalos@uo.edu.cu

Recibido: 23 de mayo de 2023;

Aceptado: 25 de agosto de 2023;

#### RESUMEN

El término ramnolípidos representa una mezcla de congéneres de composición y proporción muy diversa. Los homólogos contienen una (mono-ramnolípidos) o dos (di-ramnolípidos) unidades de ramnosa covalentemente enlazada a una o dos cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos. La diversidad estructural de estas moléculas determina que las técnicas analíticas utilizadas consideren reacciones químicas de equilibrios homogéneos y heterogéneos. Dentro del equilibrio homogéneo destaca la formación de complejos, mientras que la precipitación ácida, extracción con solventes y cromatografía son métodos que se basan en el equilibrio heterogéneo. Asimismo, el empleo de los métodos instrumentales espectrofotometría de absorción molecular, espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear, y la hibridación cromatografía líquida o gaseosa – espectrometría de masas permiten llegar a una caracterización completa de estos glicolípidos. En el presente trabajo se revisan y explican los diferentes métodos más utilizados en la determinación analítica de los ramnolípidos, especificando el análisis de los ramnolípidos AT10, ORA9 y Y3B1A. Los principales métodos de detección y caracterización físico-química también se mencionan. La espectrofotometría de absorción molecular y la hibridación HPLC – masas son los métodos analíticos de cuantificación y caracterización más aplicados; mientras que la precipitación ácida se elige como el método de separación.

**Palabras claves:** ramnolípidos, análisis químico, cuantificación analítica, *Pseudomonas aeruginosa*.

#### ABSTRACT

The term rhamnolipids represents a mixture of congeners of widely varying composition and ratio. The homologues contain one (mono-rhamnolipid) or two (di-rhamnolipid) rhamnose units covalently linked to one or two  $\beta$ -hydroxy acid chains. The structural diversity of these molecules determines that the analytical techniques used consider chemical reactions of homogeneous and heterogeneous equilibria. Within the homogeneous equilibrium, the formation of complexes stands out, while acid precipitation, solvent extraction and chromatography are methods based on the heterogeneous equilibrium. Likewise, the use of the instrumental methods molecular absorption spectrophotometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance, and liquid or gas chromatography-mass spectrometry hybridization allow reaching a complete characterization of these glycolipids. In the present work, the different methods most commonly used in the analytical determination of rhamnolipids are reviewed and explained, specifying the analysis of rhamnolipids AT10, ORA9 and Y3B1A. The main physicochemical detection and characterization methods are also mentioned. Molecular absorption spectrophotometry and HPLC-mass hybridization are the most applied analytical methods of quantification and characterization; while acid precipitation is chosen as the separation method.

**Keywords:** rhamnolipids, chemical analysis, analytical quantification, *Pseudomonas aeruginosa*.

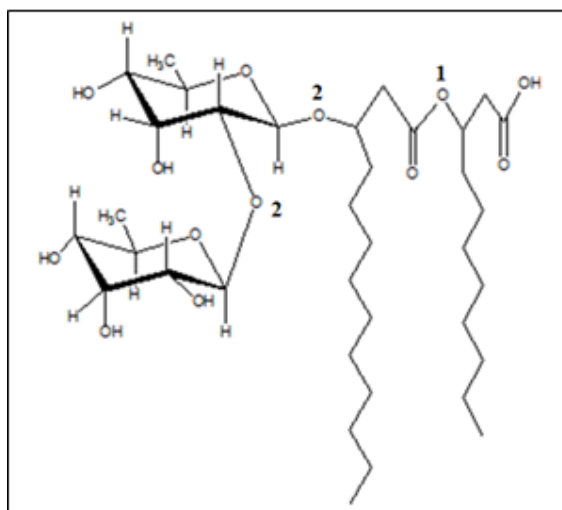
## INTRODUCCION

La Química Analítica es una ciencia interdisciplinaria, que desarrolla y aplica métodos analíticos para separar, identificar y determinar la composición cualitativa y cuantitativa de cualquier muestra material, independientemente de su naturaleza o procedencia.

La determinación de biosurfactantes microbianos depende de la aplicación de diferentes métodos analíticos de separación, purificación, caracterización y cuantificación de sustancias. Algunos, valen para la identificación, es decir, detectar si están o no presentes y otros consideran las fases en el equilibrio y la reacción química que tiene lugar. Esta siempre ocurre por vía húmeda, es decir en disolución.

Los ramnolípidos, factor de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (Badawy et al. 2020), son los biosurfactantes microbianos en los que mayor cantidad y variedad de métodos se ha aplicado para la determinación analítica. Su carácter anfifílico y las propiedades físico químicas y biológicas, ampliamente descritas, los convierten en un grupo interesante de biosurfactantes con potenciales aplicaciones ambientales (Thakur et al. 2021; Rodríguez et al. 2017; Kholghi et al. 2020; Elemba y Ijah, 2016, Barrios et al. 2021; Akbari et al. 2018; Vigneshwaran et al. 2016; Randhawa, et al. 2014), industriales (Magalhães y Nitschke, 2013; Vatsa et al. 2010, Chong y Li, 2017), médicas (Thakur et al. 2021; Magalhães y Nitschke 2013; Christova et al. 2013) y biotecnológicas (Varjani, 2017; Yan et al. 2012; Sajna et al. 2015).

El término ramnolípidos representa una mezcla de congéneres de composición y proporción muy diversa (Amrute y Singh 2014; Palleroni, 2010; Makkar et al. 2011; Abdel et al. 2010). Los homólogos contienen una (mono-ramnolípidos) o dos (di-ramnolípidos) unidades del monosacárido ramnosa ( $\alpha$ -L-ramnopiranosil) covalentemente enlazadas a una o dos cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos (configuración R) (Jarvis y Johnson, 1949). El anillo de  $\alpha$ -L-ramnopiranosil o glicona es la fracción estructural invariable. Otra particularidad de los congéneres ramnolipídicos son los dos enlaces: éster (1,3) que une las dos cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos y glicosídico entre las dos moléculas de ramnosa ( $\alpha$ -1,2) (Edwards y Hayashi, 1965) y entre el anillo de  $\alpha$ -L-ramnopiranosil (O-glicosídico) y el  $\beta$ -hidroxiácido (Figura 1).



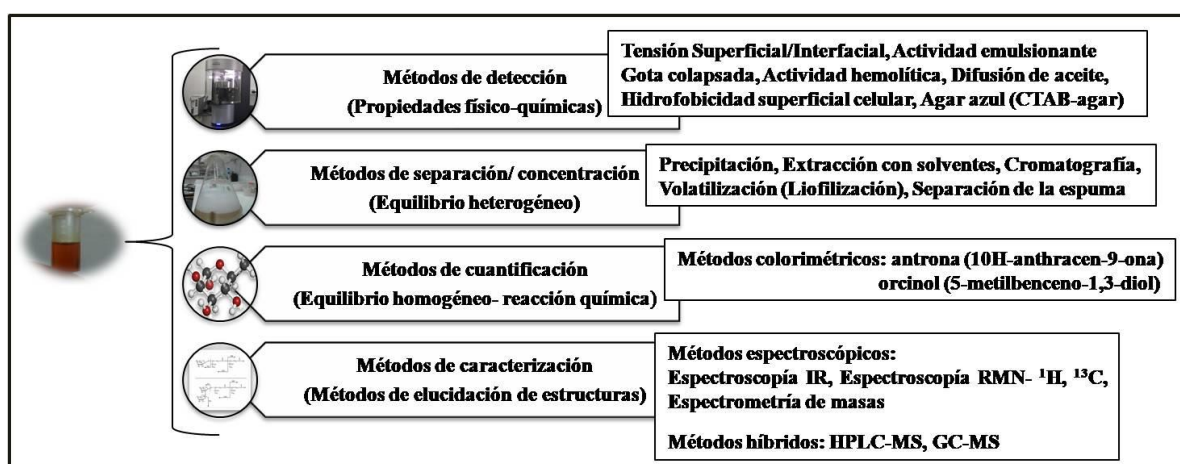
**Fig. 1.** Estructura química de un di-ramnolípido. Identificados los enlaces éster (1) y glicosídico (2).

La diversidad estructural de estos biosurfactantes condiciona que las técnicas analíticas de determinación consideren reacciones químicas en equilibrio homogéneo (formación de complejos) y heterogéneo (precipitación ácida, extracción con solventes, cromatografía), así como el empleo de métodos instrumentales (espectrofotometría de absorción molecular, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear), e híbridos (cromatografía líquida o gaseosa – espectrometría de masas) para llegar a una caracterización completa de estos glicolípidos (Figura 2).

En el presente trabajo se revisan y explican los diferentes métodos más utilizados en la determinación analítica de los ramnolípidos, utilizandolos análisis de los ramnolípidos AT10, ORA9 y Y3B1A. Los principales métodos de detección y caracterización físico-química también se mencionan.

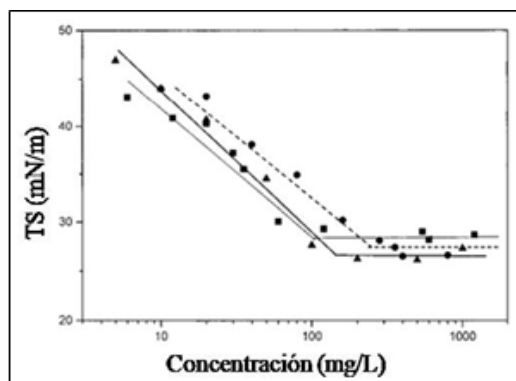
### Métodos de detección de ramnolípidos

Los métodos frecuentemente utilizados para la detección de ramnolípidos por cepas productoras, son métodos indirectos basados en la medición o evaluación de sus propiedades físico-químicas (Eslami, 2020; Varjan y Upasami, 2017; Vigneshwaran et al., 2016; Satpute et al., 2010). Es por ello que también se describen en la caracterización físico química de estos compuestos. La tensión superficial, gota colapsada, difusión del aceite, actividad emulsionante, reacción con azul de metileno y con bromuro de cetiltrimetilamonio son los métodos establecidos para la determinación cualitativa de ramnolípidos.



**Fig. 2.** Métodos analíticos para la detección, separación, cuantificación y caracterización de los ramnolípidos de *Pseudomonasa aeruginosa*.

**Determinación de la tensión superficial:** Se fundamenta en la disminución de la tensión superficial por la capacidad que tienen las moléculas anfifílicas de acumularse en la interfase de dos medios diferentes hasta alcanzar la concentración micelar crítica (CMC) (Figura 3). Los ramnolípidos AT10, ORA9 y Y3B1A reducen la tensión superficial desde 72 mN/m hasta valores de 26,8 (Abalos et al. 2001); 39 (Rodríguez et al. 2017) y 39,6 mN/m (Barrios et al. 2022), respectivamente.



**Fig. 3.** Variación de la tensión superficial (TS) en función de la concentración de los diferentes congéneres de ramnolípidos AT10. Fuente: Abalos et al. 2001.

Gota colapsada y difusión del aceite: La gota colapsada es la desestabilización de una gota de solución de ramnolípidos al depositarse sobre una película muy delgada de aceite. (Rodríguez et al. 2017; Almansooriet al. 2014; Femi-Ola et al. 2015; Ahmad et al. 2016; Nordin et al. 2013; Eslami et al. 2020). La técnica de difusión del aceite que también es un método analítico cualitativo muy utilizado en la detección de ramnolípidos (El-Housseiny et al. 2020; Rodríguez et al. 2017; Almansooriet al. 2014; Shueb et al. 2015; Marajan et al. 2015; Nordin et al. 2013; Zhao et al. 2016) se basa en la difusión o extensión de una capa de aceite, sobre una superficie de vidrio, por la acción de una gota de ramnolípidos. La aparición de una zona clara es evidencia positiva de la presencia de estos compuestos.

Actividad emulsionante: El poder de emulsionante de los biosurfactantes, así como el tipo de emulsión formada depende de la estructura química, la concentración y la composición de las fases (Abalos et al. 2001). La actividad emulsionante se determina por el índice de emulsificación a las 24 h (% E<sub>24</sub>). Es uno de los métodos indirectos más importantes y prácticos en la caracterización físico-química de biosurfactantes (Vigneshwaran et al. 2016; Shahaliyan et al., 2015; Rodríguez et al. 2017; Barrios et al. 2022; Loureiro et al. 2019; He et al. 2017; Gargouri 2017; Abdel-Mawgoud et al. 2010; Marchant et al. 2015; El-Amine et al. 2012; Nalini y Parthasarathi 2014). El procedimiento analítico se fundamenta en la formación de una emulsión por acción de los ramnolípidos. La emulsión se forma cuando la fase dispersa (compuesto hidrófobo) se disgrega dentro de la fase continua (agua). El índice de emulsificación se calcula por la ecuación 1:

$$E_{24} = \frac{\text{Altura de la emulsión}}{\text{Altura total columna líquida}} \times 100 \quad (1)$$

Los ramnolípidos AT10, ORA9 y Y3B1A muestran un E<sub>24</sub> entre 50-77 % (Tabla 1). Un buen emulsionante, induce la formación de la emulsión y una vez formada, la estabiliza. Los dos procesos son independientes. En el caso de los ramnolípidos la actividad emulsionante es mayor a valores de pH alcalinos (Barrios et al. 2022; Lovaglio et al. 2011), lo cual se corresponde con una alta densidad electrónica sobre el carboxilato (forma aniónica del grupo carboxilo) y que disminuye al ser ácidos debido a la conversión de carboxilato (COO<sup>-</sup>) en carboxilo (COOH).

La afinidad relativa de un tensoactivo por las fases continua y dispersa se conoce como valor HLB (Hydrophilic- Lipophilic Balance). Es una escala arbitraria (Pasquali et al. 2009; Nollet et al. 2019) de 0 a 20 en orden creciente de menos lipofílico (0) a más hidrofílico (20). Se calcula según la ecuación 2 (Nollet et al. 2019).

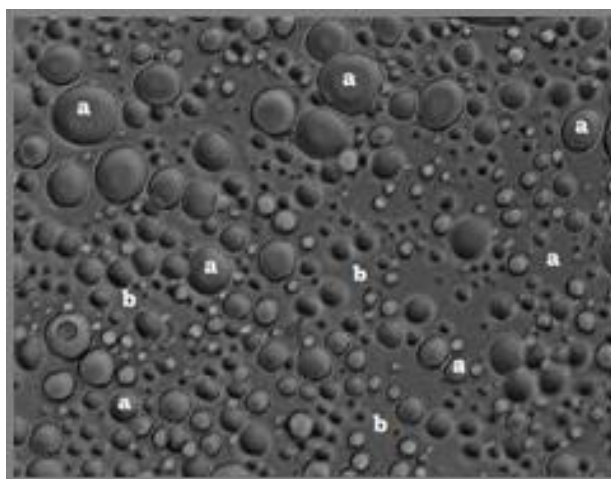
$$HLB = 7 + \sum (HLB_{\text{grupos hidrofílicos}}) - \sum (HLB_{\text{grupos hidrofóbicos}}) \quad (2)$$

El grupo carboxilo y el anillo de ramnosa determinan el carácter hidrofílico de los ramnolípidos, mientras que el β-hidroxiácido aporta el carácter hidrófobo. El grupo carboxilo (COOH) aporta 2.1; los anillos glicosídicos 0.5 y los radicales alquílicos -0.47 (Adamson y Gast, 1997). El valor HLB para los ramnolípidos es 10 aproximadamente, valor que los clasifica como emulsionantes aceite/agua (o/w) (Figura 4), y explica los índices de emulsificación observados en los ramnolípidos AT10, ORA9 y Y3B1A (Tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad emulsionante ( $E_{24}$ ) de los ramnolípidos producidos por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, ORA9 y Y3B1A frente a diferentes sustratos hidrofóbicos

| Ramnolípidos | Sustrato         | % $E_{24}$ | Referencia            |
|--------------|------------------|------------|-----------------------|
| AT10         | Petróleo         | 60         | Abalos et al. 2004    |
|              | Aceite de linaza | 70         |                       |
|              | n-alcanos        | 75         |                       |
|              | Tolueno          | 77         |                       |
|              | Aceite de ricino | 50         |                       |
|              | Benceno          | -          |                       |
| ORA9         | Queroseno        | 60         | Rodríguez et al. 2017 |
|              | Queroseno        | 11         |                       |
|              | Diésel           | 75         |                       |
| Y3B1A        | Queroseno        | 62         | Barrios et al. 2022   |
|              | Diésel           | 61         |                       |
|              | Petróleo         | 60,6       |                       |
|              | Aceite de soya   | 70         |                       |

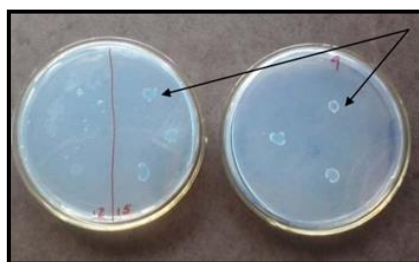
*Fuente: Elaboración propia*



**Fig. 4.** Emulsión aceite en agua (o/w) formada por los ramnolípidos AT10. Fase continua: agua (b); fase dispersa: petróleo (a).

**Reacción con azul de metileno:** Es un método analítico que se basa en una reacción química en un sistema homogéneo y posterior establecimiento de un sistema heterogéneo por distribución del complejo formado en una segunda fase que se añade al sistema. El azul de metileno es una amina terciaria, posee carácter básico; mientras que el ramnolípidos aporta el carácter ácido con el grupo carboxilo. El producto de la reacción es una asociación molecular complejaramnolípidos-azul de metileno donde están presentes grupos amino, hidroxilo, éter, éster, carboxilo. El complejo se extrae fácilmente en cloroformo y la intensidad de color es proporcional a la concentración de ramnolípidos a 638 nm (Pinzon 2009). Otra reacción química con azul de metileno y los ramnolípidos, es utilizar la sal cuaternaria bromuro de cetiltrimetilamonio. Frecuentemente la reacción se lleva a cabo en un medio agarizado. La respuesta positiva es un halo azul oscuro, que indica la formación del complejo cetiltrimetilamonio – ramnolípidos – azul de metileno. Los ramnolípidos AT10 y ORA9 fueron detectados con esta técnica (Figura 5).





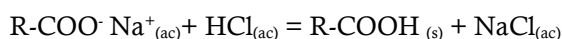
*Fig. 5. Detección de ramnolípidos ORA9 por reacción con bromuro de cetiltrimetilamonio en presencia de azul de metileno. Las flechas indican el halo por la formación del complejo.*

## MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE RAMNOLÍPIDOS

En las determinaciones analíticas, existen muy pocos métodos de análisis químico, específicos para una especie. Como mucho, los métodos analíticos son selectivos para unos pocos analitos o un tipo determinado de ellos. Consecuentemente, la separación de los analitos es de vital importancia en todo procedimiento analítico.

La separación analítica es la manera de eliminar o reducir la influencia negativa de uno o varios componentes de la muestra sobre el analito. Por su parte la concentración analítica es el aislamiento del analito del resto de los componentes del sistema. La determinación analítica de los ramnolípidos para su cuantificación y caracterización estructural está precedida de diferentes métodos de separación y concentración basados en el equilibrio heterogéneo. Los más utilizados son precipitación ácida, extracción con solventes y cromatografía (Mat'átková et al. 2022; Firdose et al. 2021; Eslami et al. 2020; Hassan-Shaha et al. 2016; Varjani y Upasani 2016; Banat et al. 2010). La liofilización y el fraccionamiento de la espuma son menos frecuentes (Díaz et al. 2016; Anicet et al. 2018; Gong 2021). No obstante, la centrifugación (15-30 min a 5000-1000 rpm) es el primer paso de la separación analítica (Abalos et al. 2001; Rodríguez et al. 2017; Barrios et al. 2022; Hassan-Shaha et al. 2016; El-Housseiny et al. 2020). En el sobrenadante se recuperan los ramnolípidos.

**Precipitación ácida:** La precipitación es un método analítico de separación y concentración de ramnolípidos, muy utilizado en química analítica (Bertrand 2018). El método se fundamenta en la precipitación de los ramnolípidos por la acción del HCl (Hassan-Shaha et al. 2016; Loiseau et al. 2018; Ramya et al. 2019; Rekadwad et al. 2019) o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Abalos et al. 2001; Rodríguez et al. 2017; Barrios et al. 2021; Thio et al. 2022) como agente precipitante. La precipitación ocurre por el carboxilo (COOH) de los ramnolípidos (Figura 1), el cual se encuentra solubilizado como carboxilato (COO<sup>-</sup>) debido al pH alcalino del medio extracelular y en presencia de un ácido fuerte se regenera.



R representa la molécula de ramnolípido

El precipitado de los ramnolípidos AT10 (Abalos et al. 2001), ORA9 (Rodríguez et al. 2017) y Y3B1A (Barrios et al. 2021) se presenta como un sólido amorfo y pastoso de coloración oscura. La precipitación salina produce un sólido de coloración variable, según el agente precipitante: blanco con sulfato de amonio y marrón con el sulfato de zinc (Hassan-Shah et al. 2016). El catión influye en la coloración del precipitado, pero no en la cantidad.

**Extracción con solventes:** Es un método de separación y concentración basado en el equilibrio heterogéneo líquido-líquido que se establece entre el agua y el solvente orgánico o la mezcla de solventes y la diferencia de solubilidad de los ramnolípidos en esas dos fases no miscibles. Solventes como diclorometano (CHCl<sub>2</sub>), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), metanol (CH<sub>3</sub>OH), acetato de etilo (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) y éter dietílico (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O), se utilizan para la extracción de biosurfactantes (Vigneshwaran et al. 2016; Zhou et al. 2020; Çakmak et al. 2017; Moussa et al. 2014). La mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v) es el extrayente más empleado (Varjani y Upasani 2016; Hassan-Shaha et al. 2016; Eslami et al. 2020; Chebbiet et al. 2021; Thio et al. 2022; Rekadwad et al. 2019). El acetato de etilo es un solvente de mediana polaridad que con frecuencia también se utiliza como solvente de extracción de ramnolípidos (Invally et al. 2019; Loiseau et al. 2018; Ramya et al. 2019; El-Housseiny et al. 2020). El rendimiento de extracción se incrementa al acidificar previamente la muestra, ya que disminuye la solubilidad en agua de los ramnolípidos por la regeneración del ión carboxilo desde el carboxilato.

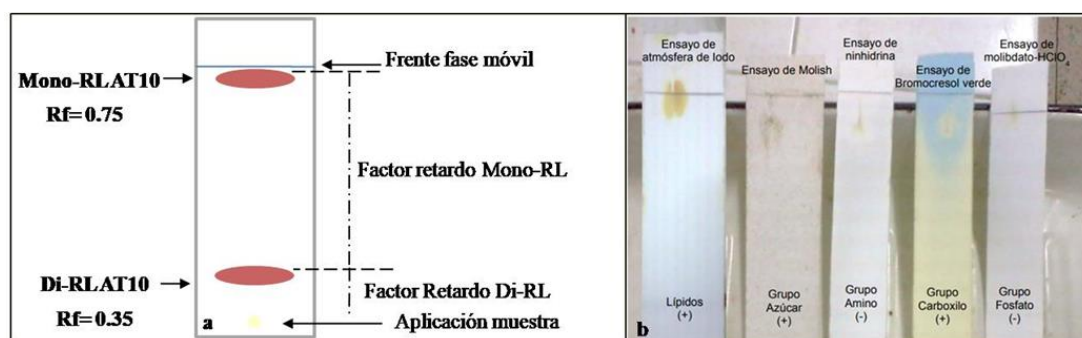
La cromatografía como método analítico clasifica dentro de las aplicaciones del equilibrio heterogéneo entre fases diferentes. La separación tiene lugar por el desplazamiento del analito en una fase móvil (líquido, gas o fluido súper crítico) a través de una fase estacionaria (sólido o líquido adsorbido en la superficie de un sólido) en la que es inmisible. La clasificación más frecuente para los diferentes métodos cromatográficos se basa en: 1. la forma en que se ponen en contacto las dos fases: cromatografía en columna y cromatografía plana y 2. Por el tipo de fase móvil: líquida, gaseosa o fluidos supercríticos (Tabla 2). Algunos textos clasifican los métodos por el tipo de equilibrio heterogéneo que tiene lugar: adsorción (líquido-sólido), partición o distribución (líquido-líquido) y exclusión (afinidad o diferencias entre los pesos moleculares) (Coskun 2016).

**Tabla 2.** Clasificación general de los métodos cromatográficos

| Forma de contacto FM-FE          |  |                                   |                             |
|----------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------|
| <b>Cromatografía Plana</b>       |  | <b>Cromatografía en Columna</b>   |                             |
| Papel                            |  | Gases                             |                             |
| Placa                            |  | Líquido                           |                             |
|                                  |  | Fluido Supercrítico               |                             |
| <b>Tipo de fase móvil</b>        |  |                                   |                             |
| <b>Cromatografía Líquida</b>     |  | <b>Cromatografía Gaseosa</b>      | <b>Cromatografía Fluido</b> |
| Adsorción                        |  | Adsorción (Gas-Sólido)            | <b>Supercrítico</b>         |
| Intercambio Iónico               |  | Partición o Reparto (Gas-Líquido) |                             |
| Exclusión (Filtración sobre Gel) |  |                                   |                             |
| Reparto (HPLC)                   |  |                                   |                             |
| Afinidad                         |  |                                   |                             |

FM: fase móvil FE: fase estacionaria.

La separación y purificación cromatográfica de los ramnolípidos ocurre tanto en plano, para pequeños volúmenes; como en columna, cuando se trata de grandes cantidades. En el caso particular de los ramnolípidos se utiliza la cromatografía en placa o capa fina TLC (Thin Layer Chromatography) para la identificación de los grupos funcionales y determinación del tipo de biosurfactante (Thio et al. 2022, El-Housseiny et al. 2020; Rekadwad et al. 2019; Shreve y Makula 2019). El procedimiento analítico consiste en hacer pasar la mezcla cloroformo: metanol: ácido acético (fase móvil) a través de la capa adsorbente de sílica gel (fase estacionaria) adherida a una placa de vidrio. Los di-ramnolípidos son más polares que los mono-ramnolípidos, por tanto, son más retenidos por la fase móvil y tienen menor factor de retardo ( $R_f$ ) que los mono-ramnolípidos (Figura 6a). Los factores de retardo suelen estar entre 0,5 y 0,8 para di y mono- ramnolípidos respectivamente. La variabilidad en los valores de  $R_f$  depende de los diferentes congéneres en la muestra. Los ramnolípidos ORA9 (Rodríguez et al. 2017), fueron identificados por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel con cloroformo: metanol: agua (65:15:2, v/v), y en la identificación de los ramnolípidos AT10 (Abalos et al. 2001) y Y3B1A (Barrios et al. 2021) se utilizó ácido acético en vez de agua en la misma proporción. En atmósfera de Iodo se detectó la fracción lipídica, mientras que con el reactivo de Molish ( $\alpha$ -naftol/ $H_2SO_4$ ) y el bromocresol verde se identificaron la ramnosa y el grupo carboxilo correspondientemente (Figura 6b). En ocasiones el revelado de las placas no favorece la cuantificación y por ello este método se utiliza más con fines cualitativos.



**Fig. 6.** Detección de mono y di-ramnolípidos AT10 (a) e identificación de grupos funcionales de ramnolípidos ORA9 (b) mediante cromatografía en capa fina (TLC). Fase móvil: cloroformo: metanol: agua (65:15:2, v/v).

Algunos autores utilizan la cromatografía líquida de intercambio iónico como alternativa para la separación analítica de los ramnolípidos, una vez realizada la precipitación ácida (Gudiña et al. 2015; Costa et al. 2010). La técnica se basa en el equilibrio de intercambio entre los iones de los ramnolípidos en solución y los iones de igual signo en la superficie del sólido que es la fase estacionaria. El método permitió la separación analítica y, a la vez, la concentración-purificación del 70 % de los ramnolípidos AT10 utilizando una columna de Amberlita XAD2 (Abalos et al. 2001). El poliestireno como fase estacionaria de intercambio iónico, también puede ser utilizado (Jadhav et al. 2018).

Ya que los ramnolípidos constituyen una mezcla de homólogos, la separación y purificación analítica de los diferentes congéneres, no se logra ni con la cromatografía en capa fina ni con la cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de gases y la líquida de alta resolución o HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permiten una separación total e identificación de los congéneres ramnolipídicos presentes. Al acoplar un detector a la salida del cromatógrafo se logra la cuantificación de cada homólogo.

La cromatografía de gases es un método analítico basado en un equilibrio heterogéneo. Se fundamenta en la separación de los componentes de la mezcla según su coeficiente de distribución o reparto entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria (sólida o líquida). El gas portador o fase móvil comúnmente utilizado es el helio; mientras que en la fase estacionaria suelen emplearse soportes de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) o alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) como fases sólidas y siloxano ( $\text{RnSiOH}$ ) como fase líquida. El detector más común es el de ionización a la llama (FID). La literatura refiere este método como GC-FID o gases – FID (Coskun, 2016).

La determinación analítica de los ramnolípidos por cromatografía gaseosa, es precedida de una hidrólisis ácida para separar las unidades deramnosa de los  $\beta$ -hidroxiácidos (Rodríguez et al. 2017). Los  $\beta$ -hidroxiácidos tienen un punto de ebullición muy alto y es mayor en la medida que la cadena incrementa los átomos de carbono. Es por ello que las cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos (Figura 1) de los diferentes congéneres son derivatizadas para lograr una muestra más volátil y que sea transportada por la fase móvil. El procedimiento analítico más utilizado es la esterificación con  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$  para proteger el grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ) y la sililación con triclorometilsilano ( $\text{CH}_3\text{SiCl}_3$ ) para proteger el  $\beta$ -hidroxilo ( $3\text{-OH}$ ) de las cadenas de ácidos grasos (Arino et al. 1996).

El análisis de los ramnolípidos ORA9, previa derivatización con propanol ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ ), reveló que el 87 % de las cadenas de ácidos grasos se corresponden con el  $\beta$ -hidroxidecanoato y, en menor proporción, los hidroxiácidos de 8 y 12 átomos de carbonos (Rodríguez et al. 2017). Esta cadena de 10 átomos de carbono también se cuantificó como mayoritaria (41 %) en los ramnolípidos AT10. Sin embargo, en esta mezcla de congéneres fueron detectados  $\beta$ -hidroxiácidos insaturados con cadenas de 8 y 12 átomos de carbono y sus respectivas combinaciones (Abalos 2010). Por su parte, en los ramnolípidos Y3B1A, aunque también hay predominio del  $\beta$ -hidroxidecanoato, los congéneres de cadenas de 8, 12 y 14 carbonos fueron cuantificados (Barrios et al. 2022). No es posible determinar la posición de las insaturaciones y la combinación de cadenas mediante cromatografía gaseosa.

Las moléculas de ramnosa (Figura 1) contienen hidrógenos activos ( $\text{OH}$ ) que convierten los ramnolípidos en compuestos polares, hidrofílicos y poco volátiles. Por esta razón, su determinación analítica por cromatografía de gases involucra también una reacción de derivatización para incrementar su volatilidad. Las reacciones más frecuentes para la transformación de azúcares se presentan en la Figura 7. Las reacciones más usadas son la formación de los ésteres de trimetilsilano ( $\text{CH}_3\text{SiCl}_3$ ) y trimetilsililoximas (Arino et al. 1996; Ghayth 2021).

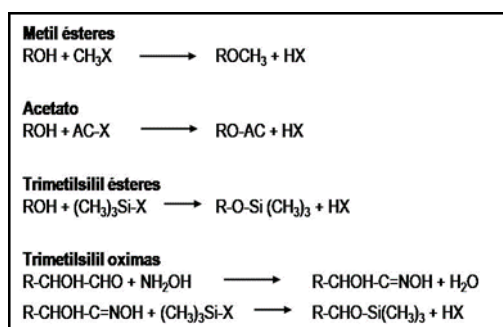


Fig. 7. Reacciones de derivatización de azúcares utilizadas en cromatografía gaseosa.



La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica analítica de separación más popular. Su amplia utilización en las determinaciones cuantitativas se basa, fundamentalmente, en su aplicabilidad a una ilimitada cantidad de sustancias importantes para la industria, la ciencia y la sociedad en general. Otro aspecto a considerar es la versatilidad de sistemas de detección que pueden acoplarse al cromatógrafo.

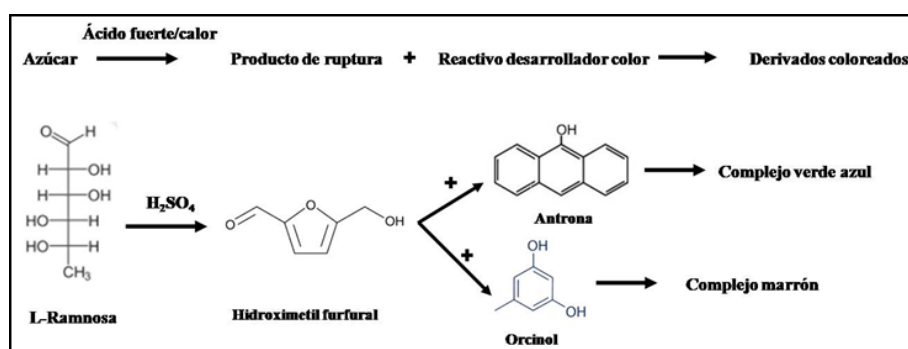
La determinación analítica de los ramnolípidos por HPLC, a diferencia de la determinación por cromatografía gaseosa, tiene la ventaja de que no es necesaria la derivatización previa (Li et al. 2022). El modo más común de separación de los ramnolípidos mediante HPLC es en fase reversa (Loiseau et al. 2018; Jeck et al. 2020; Wittgens et al. 2017; Li et al. 2019; Li et al. 2022), lo cual significa que la fase estacionaria es de naturaleza apolar ( $C_8$ , octilsililo:  $Si-CH_2-(CH)_6-CH_3$  o  $C_{18}$ , octadecilsililo:  $Si-CH_2-(CH_2)_{16}-CH_3$ ) y la fase móvil es un solvente polar o mezclas de estos (acetonitrilo, metanol y agua son los más usados). A la fase móvil se le adiciona un ácido débil para favorecer la elución de los ramnolípidos en su forma no iónica (COOH). Este procedimiento analítico se conoce como supresión iónica.

En HPLC-fase reversa, los congéneres más polares (di-ramnolípidos) eluyen con menor tiempo de retención que los homólogos de menor polaridad (mono-ramnolípidos) (Li et al. 2022; Abalos 2013). Si la cadena carbonada posee insaturaciones, el tiempo de retención del ramnolípido aumenta como resultado del incremento de la hidrofobicidad (Li 2019), no obstante, el tiempo de retención en sentido general oscila entre los 10-15 min (Loiseau et al. 2018; Li 2022; Abalos 2013). Los detectores de absorción UV-Vis, índice de refracción, dispersión de luz (light scattering) y masas son los más frecuentes en HPLC. En los ramnolípidos ORA9 se identificaron mediante HPLC-índice de refracción los clásicos congéneres  $Ra_2C_{10}C_{10}$  y  $RaC_{10}C_{10}$  (George y Jayachandran 2012; Sabturani et al. 2016; Lotfabad et al. 2017; Chen et al. 2017; El-Amine et al. 2012; He et al. 2017; Li et al. 2022) y el par isomérico  $RaC_{10}C_8/RaC_8C_{10}$  (Rodríguez et al. 2017). Los ramnolípidos AT10, contienen 51,5 % de di-ramnolípidos con cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos 10 y 12 carbonos. De los cinco mono-ramnolípidos identificados, tres poseen insaturaciones, uno de ellos se identifica por primera vez como di-insaturado ( $RaC_{8,2}$ ). La determinación analítica se realizó mediante HPLC-masas (Abalos 2010).

## MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE RAMNOLÍPIDOS

Es muy frecuente la cuantificación de ramnolípidos por espectrofotometría de absorción molecular, método espectroscópico ampliamente utilizado en laboratorios químicos, clínicos, ambientales y forenses. El método analítico se fundamenta en la absorción de la radiación electromagnética y su dependencia lineal con la concentración.

La molécula de ramnosa, en presencia de ácido sulfúrico se deshidrata dando lugar al hidroximetilfurfural; el cual reacciona con determinados compuestos aromáticos para dar complejos coloreados. La antrona y el orcinol (Figura 8) son los más comunes (Xin 2022; Rodríguez et al. 2013; Shreve y Makula 2019; Zhao et al. 2016; Chen et al. 2017). El producto de reacción es un cromóforo capaz de absorber energía en la región UV-visible. La reacción general se representa en la figura 8.



**Fig. 8.** Reacción general de determinación analítica de ramnolípidos por espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis con antrona y orcinol como desarrolladores de color.

En el caso específico de los ramnolípidos la cuantificación se realiza por el método de los patrones (ramnosa) externos con curva de calibración para el cálculo. Para determinar la concentración real de ramnolípidos se utiliza un factor de corrección experimental que oscila entre 2,22 y 3,4 (de Santana et al. 2015; Chen et al. 2017; Cherif et al. 2015; Barrios et al. 2021; Abalos et al. 2001; Rodríguez et al. 2013). En base a estos criterios los ramnolípidos ORA9 se cuantificaron por el método de la antrona y un factor de corrección de 3,4 (Rodríguez et al. 2013), mientras que la determinación analítica de los ramnolípidos

AT10 se realizó con orcinol como reactivo desarrollador de color y factor de corrección 3 (Abalos et al. 2001).

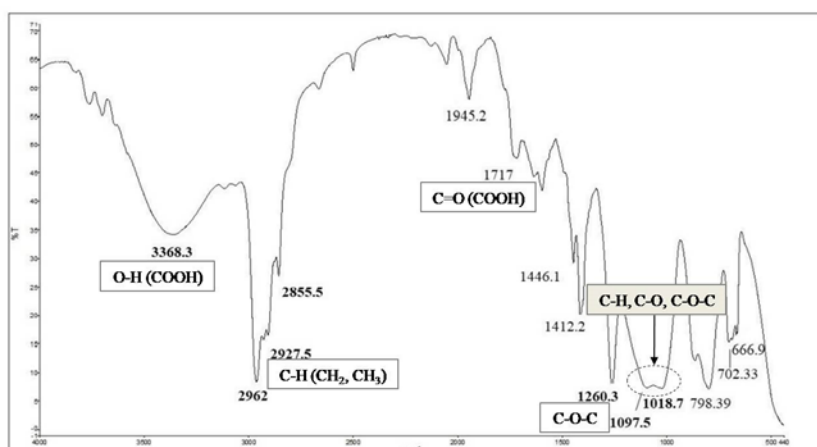
## MÉTODOS DE ELUCIDACIÓN DE ESTRUCTURAS

La espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis, como método espectroscópico, sirve para la identificación de los grupos funcionales (OH, COOH, R-O-R', C-O) de los ramnolípidos debido a que los electrones que se excitan al absorber radiación electromagnética son los electrones enlazantes, pudiéndose correlacionar el pico de absorción con el tipo de enlace presente. Sin embargo, considerando que los ramnolípidos son una mezcla muy heterogénea de congéneres con  $\beta$ -hidroxiácidos de cadena variable y que la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas del espectro UV-Vis genera bandas anchas; el método no es útil en la elucidación estructural de los diferentes homólogos ramnolipídicos.

El desarrollo de técnicas analíticas de mayor precisión para la identificación de los ramnolípidos conduce invariablemente al incremento de la cantidad de congéneres conocidos. La variabilidad en la cadena de ácidos grasos condiciona la diversidad de moléculas detectadas (Abdel-Mawgoud et al. 2010), tanto por la cantidad de carbonos del  $\beta$ -hidroxiácido como por la combinación del par isomérico, cuando las cadenas de ácidos grasos tienen diferente longitud. En la elucidación estructural de los diferentes ramnolípidos son más efectivas las espectroscopías de absorción infrarroja (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) (El-Housseiny et al. 2020; Eslami et al. 2020; Heyd et al. 2008).

La **espectroscopía infrarroja (IR)** como técnica analítica se basa en la absorción de la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético por las moléculas. Esta absorción, que se convierte en una vibración molecular, depende del tipo de enlace químico del analito. Como cada enlace es característico, en el espectro IR se registra una "huella molecular" de la vibración entre dos átomos de la molécula que sirve para la identificación. En los ramnolípidos, la espectroscopia IR tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo (Sabatani et al. 2016; Irerere et al. 2017; Kiefer et al. 2017; Potapov et al. 2023). En la Figura 9 se presenta el espectro IR de los ramnolípidos Y3B1A. Se observan las bandas de la vibración de tensión o estiramiento O-H asociada al carboxilo. Es una banda intensa y ancha debido a los enlaces por puente de hidrógeno que se establecen el COOH. La banda del grupo carbonilo (C=O) y la vibración C-O también se aprecian. Otras bandas son la vibración de estiramiento y flexión C-H de los grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ) y metileno ( $\text{CH}_2$ ) de las cadenas de los  $\beta$ -hidroxiácidos, así como bandas relacionadas con el estiramiento de enlace C-O, balanceo C-H y estiramiento/balanceo C-O-C típico de los azúcares; en este caso ramnosas.

El método analítico de determinación estructural más potente para moléculas orgánicas es la espectroscopía de **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**. Se fundamenta en la absorción de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias. A diferencia de las espectroscopías UV-Vis e IR los núcleos de los átomos son los que participan en el proceso de absorción en vez de los electrones de valencia. El analito se coloca en un campo magnético intenso para que los núcleos puedan absorber la energía. Los núcleos más utilizados son el hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y el carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), átomos imprescindibles en la estructura molecular. El espectrómetro de RMN registra las señales como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.



**Fig. 9.** Espectro IR de los ramnolípidos Y3B1A en el que se observan las bandas características de los grupos funcionales de estos compuestos.

El espectro de resonancia  $^1\text{H}$  de los ramnolípidos muestra singletes, dobletes y multipletes entre 0,8 y 5,5 ppm que se corresponden con las señales de los hidrógenos en grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), metileno ( $\text{CH}_2$ ) y metino ( $\text{CH}$ ) presentes en las cadenas de  $\beta$ -hidroxidácidos y los anillos de ramnosa. Por su parte en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , se distinguen tres grupos de señales que se registran entre 10,0 y 40,0 ppm asignadas a grupos alifáticos; entre 68 y 80 ppm a los carbonos de la ramnosa, mientras que los grupos carbonilo se registran entre 170–175 ppm (El-Housseiny et al. 2020; Twigg et al. 2018; Potapov et al. 2023; Moussa et al. 2014).

**La espectrometría de masas** es un método instrumental del análisis químico muy generalizado en la determinación de estructuras orgánicas ya sea como técnica independiente o combinada. No puede considerarse como un método espectroscópico porque su fundamento se basa en procesos químicos y no en la emisión o absorción de radiación electromagnética. La identificación y cuantificación analítica tiene lugar por la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones formados por la fragmentación. Como la molécula es fragmentada, es una técnica destructiva. Los iones se generan por impacto electrónico o ionización química con metano y el ión metonio formado ( $\text{CH}_5^+$ ) (Feucherolles, et al. 2019). En el caso de los ramnolípidos y considerando su baja volatilidad, frecuentemente se emplean métodos de ionización en superficie, siendo el método MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) el más utilizado. Con este método los mono- y los di- ramnolípidos se distinguen fácilmente por sus iones aductos moleculares característicos,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  y  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  (Sharma et al. 2019; Mondalet al. 2017; Nawrathet al. 2020). Los ramnolípidos Y3B1A fueron analizados por espectrometría de masas con ionización MALDI-TOF, determinándose analíticamente que la mezcla contiene 14 congéneres diferentes. El 64,3 % son mono-ramnolípidos con una o dos cadenas de ácidos grasos entre 8 y 14 átomos de carbono. Todos los  $\beta$ -hidroxiácidos son saturados (Barrios et al. 2021).

#### Acoplamiento instrumental. Métodos híbridos

Los métodos espectroscópicos IR y RMN no siempre permiten precisar la estructura de cada molécula de ramnolípido, ya que la mezcla de homólogos es muy heterogénea (Abdel-Mawgoud et al. 2010; El-Housseiny et al. 2020). Es por ello que, frecuentemente, la determinación estructural se realiza combinando el tiempo de retención de la separación cromatográfica con la señal espectral de masas. Este acoplamiento directo de las técnicas cromatografía líquida-espectrometría de masas, analíticamente se conoce como método híbrido o acoplamiento instrumental de análisis.

El acoplamiento instrumental es la combinación de dos técnicas analíticas independientes a través de una interfase. La información generada de la composición de la muestra es única, integral y más completa que la obtenida por cada técnica separada (Valcárcel y Gómez 2019). El acoplamiento más frecuente en química analítica es cromatografía - espectrometría de masas; tanto para cromatografía gaseosa (GC-MS) como cromatografía líquida (HPLC-MS). Este último es el habitual en las determinaciones analíticas de los ramnolípidos (El-Housseiny et al. 2020; Behrens et al. 2016; Abdel-Mawgoud et al. 2014; Jian et al. 2020; Twigg et al. 2022; Tripathi et al. 2019), donde se combina el poder de separación de la cromatografía con el poder de discriminación de la espectrometría de masas en base a la relación masa/carga de los iones. De este modo, la baja seguridad de la cromatografía en la identificación de ramnolípidos en mezclas muy heterogéneas se potencia con el alto poder de identificación de la espectroscopía de masas, método que requiere niveles de pureza de los ramnolípidos como analito; aspecto innecesario en cromatografía.

La Tabla 3 muestra la composición ramnolípida de tres mezclas utilizando el acoplamiento directo HPLC (fase reversa)-interfase - MS. Para los ramnolípidos con cadenas de diferente longitud, el análisis estructural implica la evaluación de los diferentes fragmentos. En la mezcla AT10, por ejemplo, los di-ramnolípidos  $\text{R}_2\text{C}_{10}\text{C}_{12}$  y  $\text{R}_2\text{C}_{10}\text{C}_{12:1}$  pueden existir en sus isoformas  $\text{R}_2\text{C}_{10}\text{C}_{12}$  /  $\text{R}_2\text{C}_{12}\text{C}_{10}$  y  $\text{R}_2\text{C}_{10}\text{C}_{12:1}$  /  $\text{R}_2\text{C}_{12:1}\text{C}_{10}$ . Situación similar se observó con los mono-ramnolípidos  $\text{R}_1\text{C}_{12}\text{C}_{10}$  y  $\text{R}_1\text{C}_{10}\text{C}_{12:1}$  y sus respectivas isoformas. Las fragmentaciones visualizadas en la determinación analítica de los ramnolípidos AT10 confirmaron que la isoforma del mono y di-ramnolípido en la mezcla es aquella en la que el  $\beta$ -hidroxiácido de cadena más corta está unido a la ramnosa (Tabla 3). La estructura espacial de los isómeros puede influir en la separación de estos, aunque se ha sugerido que en pares isoméricos de diferente longitud de cadena, predomina la isoforma que posee el  $\beta$ -hidroxiácido de cadena más corta unido a la ramnosa (Behrens et al. 2016).

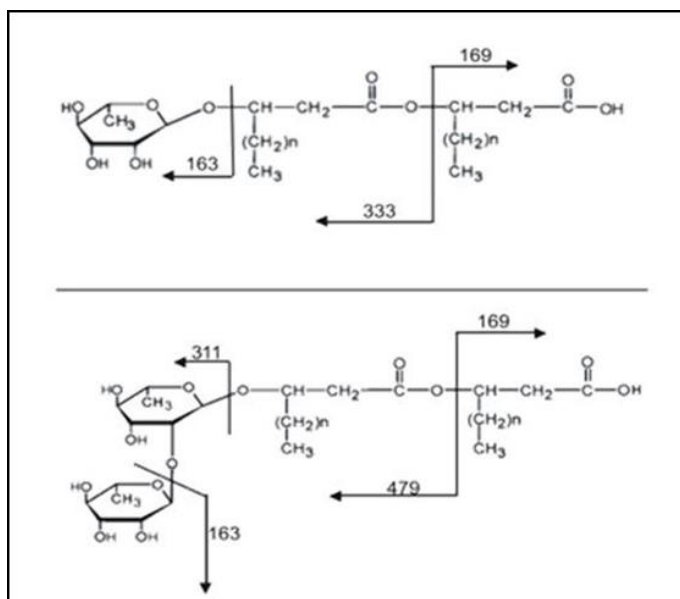
En general, se plantea que si bien los congéneres más frecuentes son los ramnolípidos  $\text{R}_1\text{C}_{10}\text{C}_{10}$  (Masa Molecular: 504) y  $\text{R}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$  (Masa Molecular: 650), el tipo de ramnolípido presente en una mezcla depende de varios factores: la cepa productora, la fuente de carbono y las condiciones de cultivo (Mishra et al. 2021; Zhang et al. 2022).

Las rupturas características de los ramnolípidos se muestran en la Figura 10. El fragmento  $m/z = 169$  es característico de la ruptura heterolítica del  $\beta$ -hidroxiácido C10 (Jeck et al. 2020; Rodríguez et al. 2017). Esta fragmentación ocurre debido a la electronegatividad del oxígeno, y tiene lugar por el O del hidroxilo del enlace éster ya que la ruptura sobre el carbonilo ( $C=O$ ) es muy difícil. El fragmento  $m/z = 163$  equivale a una unidad de ramnosa (Pereira et al. 2012; Tripathi et al. 2019), la cual se forma por el mismo mecanismo heterolítico del  $\beta$ -hidroxiácido.

**Tabla 3.** Determinación analítica de la composición de los ramnolípidos AT10, MCTG107b y PAO1 utilizando acoplamiento directo HPLC fase reversa - interfase - MS tipo cuadrupolo

| Ramnolípido                                                                                                                      | tr min<br>(HPLC) | Abundancia<br>Relativa (%) | Masa<br>Molecular | Ión Molecular<br>[M-H] <sup>+</sup> | Fragmentaciones                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>AT10</b> (Abalos 2010)                                                                                                        |                  |                            |                   |                                     |                                        |
| R <sub>1</sub> C <sub>8:2</sub>                                                                                                  | 12,2             | 6,8                        | 302               | 301                                 | No visualizadas                        |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>                                                                                   | 13,0             | 31,9                       | 650               | 649                                 | 649,479,339, 311, 169, 163             |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>                                                                                 | 14,2             | 6,7                        | 676               | 675                                 | 675, 479, 195, 169, 311, 119, 103      |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>                                                                                   | 14,8             | 25,2                       | 504               | 503                                 | 503, 333, 339, 169, 163, 119, 103      |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12</sub>                                                                                   | 15,4             | 12,9                       | 678               | 677                                 | 677, 311, 197, 479, 169                |
| R <sub>1</sub> C <sub>12:2</sub>                                                                                                 | 16,0             | 6,4                        | 358               | 357                                 | No visualizadas                        |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>                                                                                 | 16,0             | 7,1                        | 530               | 529                                 | 529, 365, 333, 169, 195, 163, 119, 103 |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12</sub>                                                                                   | 17,2             | 2, 8                       | 532               | 531                                 | 531, 333, 197, 169                     |
| <b>MCTG107b</b> (Tripathi et al. 2019)                                                                                           |                  |                            |                   |                                     |                                        |
| R <sub>1</sub> C <sub>14:2</sub>                                                                                                 | 14,8             | 3,18                       | 387,22            | 386,m48                             | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12</sub> /R <sub>1</sub> C <sub>12</sub> C <sub>10</sub>                                   | 21,5             | 0,22                       | 533,46            | 532,71                              | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> /R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10:1</sub>                                 | 24,2             | 0,27                       | 503,47            | 502,64                              | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>12</sub> C <sub>12</sub> /R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>14</sub>                                   | 26,9             | 0,94                       | 561,52            | 560,76                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>8</sub>                                                                                                    | 4,6              | 1,91                       | 453,27            | 452,49                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub>                                                                                                   | 12,7             | 5,13                       | 480,39            | 480,55                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>14</sub>                                                                                                   | 22,1             | 0,21                       | 537,45            | 536,65                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10:1</sub> / R <sub>2</sub> C <sub>10:1</sub> C <sub>10</sub>                              | 31,0             | 2,85                       | 649,71            | 648,74                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>                                                                                   | 32,1             | 52,45                      | 651,73            | 650,79                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>                                                                                 | 32,8             | 1,06                       | 677,77            | 676,83                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>                                                                   | 33               | 23,07                      | 665,77            | 664,82                              | No referidas                           |
| Decenoyl-R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> -C <sub>10:1</sub>                                                                       | 34,5             | 0,40                       | 803,54            | 801,,01                             | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12</sub> / R <sub>2</sub> C <sub>12</sub> C <sub>10</sub>                                  | 35,1             | 5,01                       | 679,78            | 678,84                              | No referidas                           |
| R <sub>2</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12</sub> -CH <sub>3</sub> /R <sub>2</sub> C <sub>12</sub> C <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub> | 37,2             | 3,26                       | 693,90            | 6922,80                             | No referidas                           |
| <b>PAO1</b> (Twigg et al. 2022)                                                                                                  |                  |                            |                   |                                     |                                        |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub>                                                                                                   | 20,93            | 1,07                       | 334               | 333                                 | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>12:2</sub>                                                                                                 | 24,37            | 0,76                       | 358               | 356,8                               | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>8</sub>                                                                                    | 17,62            | 5,60                       | 476               | 475                                 | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub>                                                                                   | 20,78            | 74,59                      | 504               | 503                                 | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12:1</sub>                                                                                 | 22,47            | 5,89                       | 530               | 529                                 | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>12</sub>                                                                                   | 23,87            | 7,62                       | 532               | 531                                 | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>14:1</sub>                                                                                 | 24,37            | 0,27                       | 558               | 557                                 | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>12</sub> C <sub>12</sub>                                                                                   | 26,09            | 0,22                       | 560               | 559,1                               | No referidas                           |
| R <sub>1</sub> C <sub>10</sub> C <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub>                                                                  | 21,97            | 0,59                       | 518               | 517                                 | No referidas                           |





**Fig. 10.** Rupturas heterolíticas características de los ramnolípidos. Fuente: Abalos 2010

## CONCLUSIONES

La determinación analítica de ramnolípidos, biosurfactantes microbianos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, se realiza a través de diferentes métodos de separación, purificación, caracterización y cuantificación de sustancias. El término ramnolípidos representa una mezcla de congéneres de composición y proporción muy diversa en los que se distinguen tres enlaces covalentes: enlace glicosídico ( $\alpha$ -1,2) ramnosa - ramnosa, enlace O-glicosídico ramnosa -  $\beta$ -hidroxiácido y enlace éster (1,3)  $\beta$ -hidroxiácido -  $\beta$ -hidroxiácido. La diversidad estructural de los ramnolípidos condiciona que las técnicas analíticas de determinación consideren reacciones químicas en equilibrio homogéneo y heterogéneo, así como el empleo de métodos instrumentales simples e híbridos para la determinación y caracterización completa de estos glicolípidos. Los métodos de detección de los ramnolípidos se basan en sus propiedades físico - químicas, siendo la tensión superficial uno de los más importantes. Los ácidos clorhídrico y sulfúrico son los agentes precipitantes más empleados, mientras que los métodos de la antrona y el orcinol destacan en la cuantificación por colorimetría. La hibridación HPLC - masas es la técnica por excelencia para la elucidación estructural de los diferentes homólogos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalos, A. (2010). Caracterización química de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a partir de residuos de aceite de soja mediante HPLC-EM. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 41, 155-159.
- Abalos, A. (2013). *Cromatografía - masas. Ramnolípidos y PHAs de P. aeruginosa AT10*. Académica Española.
- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, R., Casals, M., García, F. y Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 17, 1367-1371.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F. y Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86, 1323-1336
- Abdel-Mawgoud, A., M., Lépine, F. y Déziel, E. (2014). Liquid chromatography/mass spectrometry for the identification and quantification of rhamnolipids. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 359-73. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0\_30. PMID: 24818920.
- Adamson, A. y Gast, A. (1997). *Physical Chemistry of surfaces*. (6<sup>th</sup> ed.). Wiley-Interscience.
- Ahmad, Z., Arshad, M., Asghar, H.N., Sheikh, M.A. y Crowley, D. (2016). Isolation, screening and functional characterization of biosurfactant producing bacteria isolated from crude oil contaminated site. *International Journal of Agriculture and Biology*. 18, 542-548.
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., y Alara, O. R. (2018). Biosurfactants - a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2, 81-90.

- Almansoori, F., Idris, M., Abdullah, S. y Anuar, N. (2014). Screening for potential biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-degrading isolates. *Advances in Environmental. Biology.* 8, 639-647
- Amrute, N. y Singh, M. (2014). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from waste soybean oil as biosurfactants which enhances biodegradation of industrial waste with special reference to Kosmi Dam, Betul District, (M.P.). *International Journal of Advanced Research.* 2, 778-783.
- Anic, I., Apolonia, I., Franco, P. y Wichmann, R. (2018). Production of rhamnolipids by integrated foam adsorption in a bioreactor system. *AMB Express* 8, 122. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0651>.
- Arino, S., Marchal, R., y Vandecasteele, J., P. (1996). Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 45, 162-168.
- Badawy, M. S. E., Riad, O. K. M., Taher, F. A., y Zaki, S. A. (2020). Chitosan and chitosan-zinc oxide nanocomposite inhibit expression of LasI and RhlII genes and quorum sensing dependent virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules.* 149, 1109-1117.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. y Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 87, 427-444.
- Barrios, Y., Toledo, H., Ábalos, A., Marqués, A. M. y Sánchez, M.I. (2021) Rhamnolipids application for the removal of vanadium from contaminated sediment. *Current Microbiology* 78, 1949-1960.
- Barrios-San Martín, Y., Toledo-León, H. F.; Abalos-Rodríguez, A.; Acosta-Díaz, S. L. y Sánchez-López, M. I. (2022). Aplicación de ramnolipidos de *Pseudomonas sp.* Y3-B1A en la biodegradación de hidrocarburos a diferentes escalas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 373-387.
- Behrens, B., Engelen, J., Tiso, T., Blank, L. y Hayen, H. (2016). Characterization of rhamnolipids by liquid chromatography/mass spectrometry after solidphase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 408, 2505-2514.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Sarela, N., Morales-Guzmán, D. y Trejo-Hernández, M. (2018). Statistical design, a powerful tool for optimizing biosurfactant production: A review. *Colloids Interfaces.* 2, 2-18.
- Çakmak, H., Güngörmedi, G., Dikmen, G., Çelik, P. A. y Çabuk, A. (2017). The true methodology for rhamnolipid: Various solvents affect rhamnolipid characteristics. *European Journal of Lipid Science and Tecnology.* 119. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700002>.
- Chebbi, A., Tazzari, M., Rizzi, C., Gomez, F., H., Villa, S., Sbaiffoni, S., Vaccari, M. y Franzetti, A. *Burkholderia thailandensis* E264 as a promising safe rhamnolipids' producer towards a sustainable valorization of grape marcs and olive mill pomace. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 105, 3825-3842.
- Cheng, T., Liang, J., He, J., Hu, X., Ge, Z., & Liu, J. (2017). A novel rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. *AMB Express.* 7, 120. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0418-x>
- Cherif, N., Tifrit, A., Larbi-Daouadji, K., Mezouari, S., Chama, Z. y Abbouni, B. (2015). Effect of carbon and nitrogen source on the microbial production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *Der Pharmacia Lettre.* 7, 42-48.
- Chong, H. y Li, Q. (2017). Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Cell Fact*, 16, 2-12.
- Christova, N., Tuleva, B., Kril, A., Georgieva, M., Konstantinov, S., y Terziyski, I. (2013). Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. *Applied Biochemistry Biotechnology.* 3, 676-89.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul.* 3, 156-60.
- Costa, S., Nitschke, M., Lépine, F., Déziel, E. y Contiero, J. (2010). Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochemistry.* 45, 1511-1516
- de Santana-Filho, A. P., Camilios-Neto, D., de Souza, L. M., Sassaki, G. L., Mitchell, D. A. y Krieger, N. (2015). Evaluation of the structural composition and surface properties of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in different cultivation periods. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 175, 988-995.
- Díaz, M.A., Kamalanathan, I. D. y Martin, P.J. (2016). Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry.* 51, 820-827.
- Edwards, J. R. y Hayashi, J.A. (1965). Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 111, 415-421.

- El-Amine, B., Mebrek, S., Naimi, M., Tifrit, A. y Belaouni, H. (2012). Isolation and comparison of rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* PB: 2 and *Pseudomonas fluorescens* PV: 10. *Scientific Reports*. 1, 544. doi:10.4172/scientificreports.544.
- Elemba, M. y Ijah, U. J. J. (2016). Removal of lead and chromium from soil using biosurfactants produced by bacterial isolates from spent lubricating oil contaminated soil. *International Journal of Advanced Research*. 4, 201-211.
- El-Housseiny, G., Aboshanab, K. M., Aboulwafa, M. M. y Hassouna, N. A. (2020). Structural and physicochemical characterization of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* P6. *AMB Express*. 10, 201-13.
- Eslami, P., Hajfarajollah, H. y Bazsefidpar, S. (2020). Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*. 10, 34014–34032.
- Femi-Ola, T. O., Oluwole, O. A., Olowomofe, T. O. y Yakubu, H. (2015). Isolation and screening of biosurfactant-producing bacteria from soil contaminated with domestic waste water. *British Journal of Environmental Sciences*. 3, 58-63.
- Feucherolles, M., Poppert, S., Utzinger, J., y Becker, S., L. (2019). MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasites & Vectors*. 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3493-9245>.
- Firdose, A., Msarah, M. J., Hazrin-Chong, N. H. y Syaidatul W. (2021). Extraction and antimicrobial activity of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14. *Malaysian Journal of Microbiology*. 17, 103-112.
- Gargouri, B., Contreras, M., Ammar, S., Segura-Carretero, A. y Bouaziz, M. (2017). Biosurfactant production by the crude oil degrading *Stenotrophomonas* sp. B2: chemical characterization, biological activities and environmental applications. *Environmental Sciences and Pollution Resources*. 24, 3769–3779.
- George, S. y Jayachandran, K. (2012). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*. 114, 373-383.
- Ghayth, G., M. (2021). Application of GC in the analysis of carbohydrates. *Academic Journal of Research and Scientific Publishing*. 2, 57-74.
- Gong, Z., Yang, G., Che, C., Liu, J. Si, M. y He, Q. (2021). Foaming of rhamnolipids fermentation: impact factors and fermentation strategies. *Microbial Cell Factories*. 20, 77-89
- Gudiña, E., J., Rodrigues, A., I., Alves, E., Domingues, M., R., Teixeira, J., A., y Rodrigues, L., R. (2015). Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresource Technology*. 177, 87-93.
- Hassan-Shaha, M. U, Sivapragasamb, M., Moniruzzamana, M. y Yusupa, S.B. (2016). A comparison of recovery methods of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Procedia Engineering*. 148, 494-500
- He, N., Wu, T., Jiang, J., Long, X., Shao, B. y Meng, Q. (2017). Toward high efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids and Surfaces B*. 157, 317-324.
- He, N., Wu, T., Jiang, J., Long, X., Shao, B. y Meng, Q. (2017). Toward high efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids and Surfaces B*, 157, 317-324.
- Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Franzreb, M. y Berensmeier, S. (2008). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391, 1579-1590.
- Invally, K., Sancheti, A. y Ju, L. K. (2019). A new approach for downstream purification of rhamnolipid biosurfactants. *Foods and Bioproducts Processing*. 114, 122-131.
- Irorere, V., U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S. y Banat, I., M. (2017). Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101, 3941-3951.
- Jadhav, J., Dutta, S., Kale, S. y Pratap, A. (2018): Fermentative production of rhamnolipid and purification by adsorption chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 48, 234-241.
- Jarvis, F. G. y Johnson, M.J. (1949). A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of American Chemical Society*. 71, 4124–4126.
- Jeck, V., Froning, M., Tiso, T., Blank, L. M. y Hayen, H. (2020). Double bond localization in unsaturated rhamnolipid precursors 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids by liquid chromatography–mass spectrometry applying online Paternò–Büchi reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 412, 5601–5613.

- Jiang, J., Jin, M., Li, X. (2020). Recent progress and trends in the analysis and identification of rhamnolipids. *Applied Microbiology Biotechnology*. 104, 8171-8186. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10841-3>.
- Kholghi, N., Amani, H., Malekmahmoodi, S. y Amiri, A. (2020). Investigation on heavy metal removal from a crude oil contaminated soil using rhamnolipid biosurfactant as a new eco-friendly method. *Tenside Surfactants Detergents*. 57, 515-520.
- Kiefer, J., Radzuan, M., N. y Winterburn, J. (2017). Infrared spectroscopy for studying structure and aging effects in rhamnolipid biosurfactants. *Applied Sciences*. 7, 533. <https://doi.org/10.3390/app7050533>.
- Li, D., Tao, W., Yu, D. y Li, S. (2022). Emulsifying properties of rhamnolipids and their in vitro antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Molecules*. 27, 7746. <https://doi.org/10.3390/molecules27227746>.
- Li, Z., Zhang, Y., Lin, J., Wang, W. y Li, S. (2019). High-yield di-rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its potential application in MEOR. *Molecules*. 24, 1433. <https://doi.org/10.3390/molecules24071433>.
- Loiseau, C., Portier, E., Corre, M.H., Schlusshuber, M., Depayras, S., Berjeaud, J.M. y Verdon, J. (2018). Highlighting the potency of biosurfactants produced by *Pseudomonas* strains as anti-*Legionella* agents. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2018/8194368>.
- Lotfabad, T., Ebadipour, N., Roostaazad, R., Partovia, M. y Bahmaei, M. (2017). Two schemes for production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Applying residues from soybean oil industry and silica sol-gel immobilized cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 152, 159-168.
- Loureiro, D., Olivera, C., Herrero, M. S., Salvatierra, L. y Pérez, L. (2019). Estudio de la degradación de diésel comercial empleando *Pseudomonas* spp. aisladas de lodos facultativos provenientes de una planta productora de biogás. *Energía*. 1, 46-54.
- Lovalaglio, R. B., dos Santos, F. J., Jafelicci, M. Jr. y Contiero, J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85, 301-305.
- Magalhães, L. y Nitschke, M. (2013). Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control*, 29, 138-142.
- Makkar, R., Cameotra, S. y Banat, I. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 1, 2-19.
- Marajan, C., MohdZaki, Z., Ramasamy, K. y Abdul-Talib, S. (2015). Identification and screening characterisation of potential biosurfactant producing bacteria isolated from palm oil mill effluent. *Journal of Engineering Science and Technology*, Special Issue on ACEE 2015 Conference August, 94 – 102.
- Marchant, R., Funston, S., Uzoigwe, C., Rahman, P. y Banat, I. M. (2015). Production of biosurfactants from nonpathogenic bacteria. En N. Kosaric y FV Sukan (Eds). *Biosurfactants: Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics*. (pp. 73-82), CRC Press
- Mat'átková, O., Michailidu, J., Ježdík, R. y Kolouchová, I., J. (2022). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3774: response surface methodology approach. *Microorganisms*. 10, 1272-1286
- Mishra, N., Rana, K., Seelam, S., D., Kumar, R., Pandey, V., Salimath, B., P. y Aghar, D. (2021). Characterization and cytotoxicity of *Pseudomonas* mediated rhamnolipids against breast cancer MDA-MB-231 cell line. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.761266>.
- Mondal, M. H., Sarkar, A., Maiti, T. K. y Saha, B. (2017). Microbial assisted (*Pseudomonas* sp.) production of novel bio-surfactant rhamnolipids and its characterisation by different spectral studies. *Journal of Molecular Liquids*, 242, 873-878. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.089>.
- Moussa, T., A., Mohamed, M. S. y Samak, N. (2014). Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 31, 867-880. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140314s00002473>.
- Nalini, S. y Parthasarathi, R. (2014). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresource Technology*. 173, 231-238.
- Nawrath, M., M., Ottenheim, C., Wu, J. C. y Zimmermann W. (2020). *Pantoeasp*. P37 as a novel nonpathogenic host for the heterologous production of rhamnolipids. *Microbiology Open*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1019>.
- Nollet, M., Boulghobra, H., Calligaro, E. y Rodier, J. D. (2019). An efficient method to determine the Hydrophile-Lipophile Balance of surfactants using the phase inversion temperature deviation of CiEj/n-octane/water emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*. 41, 99-108



- Nordin, N., Zakaria, M. R., Halmi, M. I., Ariff, A. B., Zawawi, R. M. y Wasoh, H. (2013). Isolation and screening of high efficiency biosurfactante producing bacteria *Pseudomonas sp.* *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology.* 1, 25-31.
- Palleroni, N.J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology.* 12, 1377-83.
- Pasquali, R. C., Sacco, N. y Bregn, I. C. (2009). The Studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty Years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009). *Latin American Journal of Pharmacy.* 28, 313-317
- Pereira, J., Gudiña E., J., Dória, M., L., Domingues, M., R., Rodrigues, L., R., Texeira, J., A., y Coutinho, J. A. (2012). Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil.
- Pinzon, N. M. y Ju, L. K. (2009). Analysis of rhamnolipids biosurfactants by methylene blue complexation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 82, 975-981.
- Potapov, K., Gordeev, A., Biktasheva, L., Rudakova, M. y Alexandrov, A. (2023). Effects of natural rhamnolipid mixture on dioleoylphosphatidylcholine model membrane depending on method of preparation and sterol content. *Membranes* 13, 112. <https://doi.org/10.3390/membranes13010112>
- Ramya, K., C., Lakshmi, R., Vajiravelu, S. y Vasudevan, V. (2019). Structure elucidation and proposed de novo synthesis of an unusual mono-rhamnolipid by *Pseudomonas guguanensis* from Chennai Port area. *Scientific Reports.* 9:5992-6003 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42045-9>
- Randhawa, K.K., Rahman, P.K. (2014). Rhamnolipid biosurfactants - past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology.* 5, 1-7.
- Rekadwad, B., Maske, V., Khobragade, C., N. y Kasbe, P., S. (2019). Production and evaluation of mono- and di-rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* VM011. *Data in brief.* 24, 103890-5.
- Rodríguez, O., Abalos, A., Vilasó, J. y Cabrera, J. G. (2017). Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from contaminated soils with oily wastes. *Journal of Environmental Treatment Techniques.* 5, 5-11.
- Rodríguez, O., Vilasó, J. E., Aguilera, I. Pérez, R., M. y Abalos, A. (2013). Validación por verificación del método colorimétrico de la antrona para la cuantificación de ramnolípidos. *Revista Cubana de Química.* XXV, 287-294.
- Sabturani, N., Latif, J., Radiman, S., Hamzah, A. (2016). Spectroscopic analysis of rhamnolipid produced by produced by *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T. *Malaysian Journal of Analytical Sciences.* 20, 31-43.
- Sajna, K.V., Sukumaran, R.K., Gottumukkala, L.D. y Pandey, A., (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma sp.* NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology.* 191, 133-139
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M. y Chopade, B.A., (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 30, 127-144.
- Shahaliyan, F., Safahieh, A., Abyar, H. (2015). Evaluation of emulsification index in marine bacteria *Pseudomonas sp.* and *Bacillus sp.* *Arabian Journal for Science and Engineering.* 40, 1849-1854.
- Sharma, S., Datta, P. y Kumar, B. (2019). Production of novel rhamnolipids via biodegradation of waste cooking oil using *Pseudomonas aeruginosa* MTCC7815. *Biodegradation.* 30, 301-312. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09874-x>.
- Shoeb, E., Ahmed, N., Akhter, J. y Badar, U. (2015). Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. *Turkish Journal of Biology.* 39, 210-216.
- Shreve, G., S. y Makula, R. (2019). Characterization of a new rhamnolipid biosurfactant complex from *Pseudomonas* isolate DYNA 270. *Biomolecules.* 9, 885. <https://doi.org/10.3390/biom9120885>.
- Thakur, P., Saini, N. K., Thakur, V. K., Gupta, V., K. Saini, R., V. y Saini, A. K. (2021). Rhamnolipid the glycolipid biosurfactant: emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. *Microbial Cell Factories.* 20, 1-15.
- Thio, C., W., Lim, W., H., Md. Shah, M., K. y Phang, L., Y. (2022). Palm kernel fatty acid distillate as substrate for rhamnolipids production using *Pseudomonas sp.* LM19. *Green Chemistry Letters and Reviews.* 15, 83-92.
- Tripathi, L., Twigg, M., S., Zompra, A., Salek, K., Irorere, V., U., Gutierrez, T., Spyroulias, G., A., Marchant, R. y Banat, I., M. (2019). Biosynthesis of rhamnolipid by a *Marinobacter* species expands the paradigm of biosurfactant synthesis to a new genus of the marine microflora. *Microbial Cell Factories.* 18:164 <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1216-8>.
- Twigg, M., Tripathi, L., Zompra, A., Salek, K., Irorere, V., U., Gutierrez, T., Spyroulias, T., A., Marchant, R. y Banat, I., M. (2018). Identification and characterisation of short chain rhamnolipid



production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102, 8537-8549.

Valcárcel, M. y Gómez, A. (2019). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté SA.

Varjani, S. J. y Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*. 232, 389-397.

Varjani, S. J. y Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*. 232, 389-397.

Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F. y Dorey, S. (2010). Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 5095-5108.

Vigneshwaran, C., Jerold, M., Vasantharaj, K. y Sivasubramanian V. (2016). A review on biosurfactants and its environmental applications. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 10, 152-160.

Wittgens, A., Kovacic, F., Müller, M. M., Gerlitzki M., Santiago-Schübel, B., Hofmann, D. y Tiso, T. (2017). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101, 2865-2878.

Xing, S., Yan, Z., Song, C., Tian, H. y Wang, S. (2022). Limited role of rhamnolipids on cadmium resistance for an endogenous-secretion bacterium. *International Journal Environmental Research Public Health*. 19, 12555. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912555>.

Yan, P., Lu, M., Yang, Q., Zhang, H., Zhang, Z. y Chen, R., (2012). Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. *Bioresource Technology*. 116, 24-28.

Zhang, Y., Placek, T., L., Jahan, R., Alexandridis, P. y Tsianou, M. (2022). Rhamnolipid micellization and adsorption properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 11090. <https://doi.org/10.3390/ijms231911090>.

Zhao, F., Liang, X., Ban, Y., Han, S., Zhang, S., Zhang, Y. y Ma, F. (2016). Comparison of methods to quantify rhamnolipid and optimization of oil spreading method. *Tenside, Surfactants, Detergents*. 53, 243-248.

Zhou, C., Sha, R., Long, X. y Meng, Q. (2020). Extraction separation of rhamnolipids by n-hexane via forming reverse micelles. *Journal of Surfactants and Detergents*. 23, 883-889.

*Este artículo no presenta conflicto de intereses*