
Ciências Biológicas Integral

João Vitor Alves Balieiro

**Caracterização dos Bacteriófagos líticos
XacP157 e P26 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Rio Claro - SP
2025

João Vitor Alves Balieiro

**Caracterização dos Bacteriófagos líticos XacP157 e P26 de
Xanthomonas citri subsp. *citri***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel e licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Henrique Ferreira

Coorientador(a): Dr. Caio Felipe Cavicchia Zamunér

Rio Claro - SP
2025

B186c Balieiro, João Vitor Alves

Caracterização dos Bacteriófagos líticos XacP157 e P26 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. / João Vitor Alves Balieiro. -- Rio Claro, 2025

33 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Henrique Ferreira

Coorientador: Caio Felipe Cavicchia Zamunér

1. Cancro cítrico. 2. Bacteriófagos. 3. Controle biológico. I. Título.

João Vitor Alves Balieiro

Caracterização dos Bacteriófagos líticos XacP157 e P26 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel e licenciado em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Caio Felipe Cavicchia Zamunér

Dr. Giovane Böerner Hypolito

Me. Mario Nicolas Caccalano

Aprovado em: 10 de novembro de 2025

gov.br Documento assinado digitalmente
JOAO VITOR ALVES BALIEIRO
Data: 25/11/2025 16:35:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

gov.br Documento assinado digitalmente
HENRIQUE FERREIRA
Data: 27/11/2025 08:08:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do discente

gov.br Documento assinado digitalmente
CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNER
Data: 26/11/2025 08:39:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) orientador(a)

Assinatura do(a) coorientador(a)

*“Para minha mãe Janaina e minha avó Vera Lúcia que, sob
muito sol, fizeram-me chegar até aqui pela sombra”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao amor incondicional da minha mãe e minha avó Vera Lucia. Ao meu avô Jarbas e a minha tia Mirella, a Mariana, ao Lucas e ao meu pai pelo apoio e amor.

Aos meus amigos Ana Carolina, Gabriel e Ana Clara por serem os meus irmãos, meu apoio em momentos difíceis e meu alicerce para toda vida. Ao Caio e Mavi pelo amor, pelas risadas e pela companhia em todos os momentos. Levo vocês cinco para a vida, onde quer que eu esteja.

Ao André, Catharina, Livia, Tito e Victor pela amizade construída ao longo desses anos. Vocês fizeram da minha graduação um período feliz e inesquecível.

A Lara, Luna e Maria Clara por estarem comigo desde a infância e adolescência. Vocês são fundamentais para mim.

Ao professor Henrique por me acolher em seu laboratório e pela orientação ao longo dos anos. As oportunidades oferecidas pelo senhor foram extremamente importantes para minha formação pessoal e profissional.

Ao Caio e ao Igor pelas conversas, pelos direcionamentos e por toda ajuda. As suas disposições em ensinar e em orientar foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional, sou eternamente grato pela paciência. Sem vocês, a realização desse trabalho não seria possível.

A toda equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos pela disposição em ensinar e pelas oportunidades oferecidas ao longo desses anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2023/13202-2. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

O cancro cítrico é uma fitopatologia causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Durante os últimos setenta anos, a doença se disseminou de maneira expressiva nos pomares brasileiros de cítricos e, por consequência disso, o cancro representa uma problemática persistente para a citricultura brasileira. A principal estratégia para o controle dessa fitopatologia reside na utilização de compostos cúpricos em plantações contaminadas. Entretanto, as formulações de cobre estão associadas à contaminação de corpos de água e de organismos presentes nas áreas de utilização, posto que esses compostos podem ser bioacumulativos e citotóxicos em altas concentrações. Ademais, existem relatos de isolamento de linhagens de *X. citri* resistentes ao cobre. Dessa maneira, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos menos tóxicos e mais eficientes de manejo. Os bacteriófagos são vírus capazes de infectar bactérias e são explorados como um método alternativo de controle de diferentes doenças bacterianas. Isso porque as interações entre os bacteriófagos e seus hospedeiros são extremamente específicas e, como consequência disso, a utilização de bacteriófagos representa um método de manejo de baixo risco à saúde humana. Essas características tornam esses vírus uma alternativa promissora ao manejo de doenças como, por exemplo, o cancro cítrico. O presente trabalho caracterizou a estabilidade físico-química dos bacteriófagos líticos XacP157 e P26 de *X. citri* e, em decorrência disso, torna-se possível afirmar que os bacteriófagos demonstram resistência a pH entre 4,0 e 9,0 e temperaturas entre -80 °C e 50 °C. Entretanto, a exposição à radiação ultravioleta resultou na inativação integral das partículas virais em 160 segundos, ressaltando a importância da utilização de fotoprotetores em futuras formulações agrícolas com esses bacteriófagos. A Curva de Crescimento em uma Etapa de XacP157 indica que o tempo de crescimento do vírus é de 240 minutos com um período de latência de 90 minutos. O período de *burst size* (extrusão de novos bacteriófagos) está contido entre os tempos 90 e 240 da curva. Essas características são imprescindíveis no estabelecimento de XacP157 e P26 como possíveis princípios ativos em defensivos agrícolas alternativos ou auxiliares ao cobre. Ademais, a descrição desses parâmetros permite um entendimento integral sobre o funcionamento da biologia viral.

Palavras-chave: Cancro cítrico; Resistência ao Cobre; Controle Alternativo; Formulações Fágicas.

ABSTRACT

Citrus canker is a phytopathology caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Over the last seventy years, the disease has spread significantly across Brazilian citrus orchards and, as a consequence of that, canker has become a persistent problem for Brazilian citriculture. The main strategy for controlling this phytopathology relies on the use of copper-based compounds in contaminated plantations. However, copper formulations are associated with the contamination of water bodies and organisms present in citrus growing areas, since these compounds can be bioaccumulative and cytotoxic at high concentrations. Furthermore, there are reports of the isolation of copper-resistant strains of *X. citri*. Therefore, the development of less toxic and more effective management methods becomes essential. Bacteriophages are viruses capable of infecting bacteria and are explored as an alternative method for controlling different bacterial diseases. This is because interactions between bacteriophages and their hosts are highly specific and thus the use of bacteriophages represents a management method with low risk to human health. These characteristics make these viruses a promising alternative for the management of diseases such as citrus canker. The present study characterized the physicochemical stability of the lytic bacteriophages XacP157 and P26 of *X. citri* and, as a result, it is possible to state that the bacteriophages demonstrate resistance to pH between 4.0 and 9.0 and temperatures between -80 °C and 50 °C. However, exposure to ultraviolet radiation resulted in the complete inactivation of viral particles within 160 seconds, highlighting the importance of using photoprotective agents in future agricultural formulations with these bacteriophages. The One-Step Growth Curve of XacP157 indicates that the viral growth time is 240 minutes with a latency period of 90 minutes. The burst size period (release of new bacteriophages) is between 90 and 240 minutes. These characteristics are essential for the establishment of XacP157 and P26 as possible active ingredients in agricultural pesticides, either as alternatives or auxiliaries to copper compounds. Furthermore, the description of these parameters allows a comprehensive understanding of viral biology.

Keywords: Citrus canker; Copper resistance; Alternative control; Phage formulations.

Title in english: Characterization of lytic bacteriophages XacP157 and Xac P26 infecting *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Bacteriófagos, Fagoterapia e suas utilizações contemporâneas.....	10
1.2 Cancro cítrico e <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	11
1.3 Caracterização de bacteriófagos de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	13
1.4 Objetivo geral.....	13
1.5 Objetivos específicos.....	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 Condições de crescimento da linhagem bacteriana e das partículas virais.....	15
2.2 Caracterização físico-química dos bacteriófagos XacP157 e P26.....	15
2.2.1 Avaliação da estabilidade em diferentes pH.....	15
2.2.2 Avaliação da estabilidade em diferentes temperaturas.....	16
2.2.3 Avaliação da estabilidade em luz ultravioleta.....	16
2.3 Cinética de infecção do bacteriófago.....	17
2.3.1 Curva de Crescimento em uma Etapa.....	17
3 RESULTADOS.....	18
3.1 Caracterização físico-química dos bacteriófagos XacP157 e P26.....	18
3. 2 Cinética de infecção do bacteriófago.....	19
4 DISCUSSÃO.....	21
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bacteriófagos, Fagoterapia e suas utilizações contemporâneas

Os bacteriófagos, também denominados de fagos, são vírus cujas células hospedeiras são as bactérias. A estruturação geral desses vírus é caracterizada pela cabeça icosaédrica proteica na qual está inserido o material genético representado, geralmente, por DNA de dupla fita, existindo poucas exceções em que a cabeça é filamentosa (Cuervo; Carroscá, 2012). A maioria dos bacteriófagos também é composta pela presença de uma cauda proteica (contrátil ou não-contrátil/longa ou curta) relacionada ao reconhecimento da célula hospedeira e à inserção do material genético na célula parasitada (Nobrega *et al.*, 2018). Por intermédio da inserção do material genético viral na bactéria hospedeira, os bacteriófagos realizam o ciclo lítico ou o ciclo lisogênico. Durante a transcorrência do ciclo lítico, o metabolismo celular é direcionado para a produção de novas partículas virais, o que determina a lise da célula no período de extrusão dos novos bacteriófagos (Bragg *et al.*, 2014).

Os bacteriófagos foram primariamente descritos por Twort e d'Herelle durante a década de 1910 (Maura; Debarbieux, 2011). Em decorrência do descobrimento, o potencial de lise de células bacterianas pelos bacteriófagos também se tornou conhecido. Em continuidade aos seus estudos, d'Herelle administrou suspensões de bacteriófagos em humanos para analisar os efeitos dessas partículas virais sobre a cólera e a disenteria bacilar, o que caracterizou o início da fagoterapia (utilização de bacteriófagos ou de suas proteínas para o combate de doenças) (Cisek *et al.*, 2017).

Contemporaneamente, os bacteriófagos líticos são extensivamente estudados como um método alternativo de controle do crescimento bacteriano (Nir-paz *et al.*, 2019), e a fagoterapia representa uma área em desenvolvimento para o tratamento de doenças humanas e agrônômicas. Isso porque diversas populações de bactérias patogênicas apresentam um aumento contínuo da resistência aos tratamentos tradicionais. Nesses cenários, os bacteriófagos líticos são utilizados como alternativas para o combate dessas bactérias, enquanto também há a possibilidade de empregar essas partículas virais em conjunção com antibióticos tradicionais para potencializar a redução de determinada população bacteriana (Valério *et al.*, 2017).

Em contextos fitossanitários, os tratamentos fundamentados na utilização de bacteriófagos líticos podem representar novos métodos de manejo e de controle de fitopatologias bacterianas como o cancro cítrico. Geralmente, em campos de cultura, as formulações de bacteriófagos são aplicadas no solo ou diretamente nos organismos vegetais para que seja possível a ação desses vírus sobre as bactérias. Entretanto, o emprego de bacteriófagos é preconizado como um tratamento auxiliar e, por consequência disso, é fundamental a continuidade da utilização de práticas adequadas de cultivo e de outros métodos de controle (como eliminação de organismos e materiais contaminados).

1.2 Cancro cítrico e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são fitopatógenos de grande importância econômica, posto que as espécies do grupo causam diversas doenças (Gottwald; Graham; Schubert, 2002). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) é uma bactéria Gram-negativa (Schaad *et al.*, 2006) e agente etiológico do cancro cítrico. A dispersão dessa bactéria é realizada por chuvas, ventos, insetos e pela utilização de equipamentos contaminados nas áreas de cultivo de cítricos. A infecção dos tecidos vegetais deriva da entrada do fitopatógeno pelos estômatos ou aberturas acidentais produzidas por manipulação e maquinário agrícola (Gottwald; Graham; Schubert, 2002). A patogenicidade é determinada pela expressão de fatores moleculares, os quais são representados pela produção de exopolissacarídeos (EPS, responsável pela adesão da célula bacteriana e pela produção de biofilme), enzimas degradadoras da parede celular vegetal e, principalmente, pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS) (Zhao *et al.*, 2025). Esse sistema está relacionado à transferência de proteínas efetoras da infecção (PthA) para as células vegetais hospedeiras, nas quais atuam no núcleo como reguladores transcricionais (Li *et al.*, 2014). Nos campos de cultivo, fatores abióticos, como elevação da umidade, ventos persistentes e temperaturas médias, podem beneficiar a instalação da doença em organismos de citros.

O principal sintoma do cancro cítrico é a formação de lesões eruptivas superficiais nos órgãos vegetativos (majoritariamente nas folhas) e nos frutos. Também torna-se perceptível a desfolhação e a queda de frutos como consequências de infecções severas (Naqvi *et al.*, 2022). Em decorrência desses

sintomas, a manifestação da doença representa uma problemática expressiva nas regiões de cultivo devido à redução da produtividade nas áreas contaminadas, à perda de safras e de qualidade dos frutos (Gerum *et al.*, 2018). Ademais, a garantia de eliminação de árvores infectadas, de limpeza de equipamentos e de compra de defensivos agrícolas com cobre representa um processo financeiramente dispendioso e ressalta a necessidade do desenvolvimento de controles alternativos para o cancro.

Sob a perspectiva da produção brasileira de cítricos, o cancro foi documentado primariamente no estado de São Paulo em 1957 (Behlau, 2021). Contudo, segundo prospecção do Ministério da Agricultura e Pecuária, a abrangência contemporânea dessa doença compreende 13 estados brasileiros (Brasil, 2021). Por consequência disso, a citricultura brasileira (maior produtora de laranja doce do mundo) (Vidal, 2024) está diretamente ameaçada pela disseminação do cancro e de outras doenças de cítricos como o greening/HLB, que é atualmente a doença mais destrutiva das culturas de cítricos do mundo (Li *et al.*, 2020).

As principais estratégias de manejo da doença estão relacionadas à remoção de organismos infectados da área cultivada, à utilização de linhagens de cítricos mais resistentes à infecção e à aplicação de compostos cúpricos (como, por exemplo, o óxido cuproso) (FERENCE *et al.*, 2018). Contudo, atualmente, a resistência aos compostos de cobre foi constatada em linhagens de *X. citri* e de outras espécies do gênero *Xanthomonas* (como *X. alfalfae*). Essa característica deriva da existência dos grupamentos gênicos *copLAB* e *copABCD*, cujas presenças estão conservadas entre os organismos resistentes (Behlau *et al.*, 2020). Os genes de resistência são expressados em proteínas constituintes de bombas de efluxo de íons de cobre, resultando na supressão da atividade bactericida desses compostos. A utilização de substâncias compostas por cobre também contamina os solos, os recursos hídricos e os organismos presentes nas regiões de aplicação. As consequências resultantes do excesso de cobre nos tecidos vegetais são, por exemplo, a clorose das folhas, a alteração do crescimento vegetal e a promoção de citotoxicidade (Kumar *et al.*, 2021).

A conjunção desses fatores torna imprescindível o desenvolvimento de métodos alternativos de combate à bactéria *X. citri*, uma vez que a doença está presente nas principais regiões produtoras do país e infecta todas as espécies de

cítricos cultivados nessas localidades, conforme exposto pelo Fundo de Defesa da Citricultura.

1.3 Caracterização de bacteriófagos de *Xanthomonas citri subsp. citri*

Os bacteriófagos reconhecem e infectam linhagens específicas de determinadas bactérias, o que produz uma limitação da abrangência de hospedeiros existentes para cada linhagem de bacteriófago (Singh *et al.*, 2020). Atualmente, a diversidade de fagos infectantes de bactérias fitopatogênicas, como as integrantes do gênero *Xanthomonas*, é muito inexpressiva, com apenas poucos estudos relacionados à temática (Yoshikawa *et al.*, 2018; Nakayinga *et al.*, 2021; Marquioni *et al.*, 2022).

Apesar disso, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e agências internacionais de vigilância sanitária (como FDA) já têm emitido aprovações para a utilização de produtos fundamentados na fagoterapia para o controle de doenças bacterianas de gado e de plantações (Housby; Mann, 2009). Nesse contexto, o desenvolvimento de *cocktails* de fagos (conjunção de dois ou mais bacteriófagos distintos) também pode ser utilizado para garantir que a especificidade de infecção seja superada, reduzindo a proliferação de cepas resistentes. Isso demonstra a importância sanitária e econômica da identificação e da caracterização da diversidade de bacteriófagos. De maneira geral, o processo de caracterização está relacionado à descrição genética, morfológica e bioquímica ou ao estudo dos parâmetros de resistência físico-química e de padrões de infecção de hospedeiros

Em vista disso, o presente trabalho pretende caracterizar os bacteriófagos XacP157 e P26 de *Xanthomonas citri subsp. citri* para que seja descrita a viabilidade desses vírus em futuras formulações de defensivos agrícolas.

1.4 Objetivo geral

Avaliar a estabilidade físico-química e a cinética de infecção dos bacteriófagos líticos XacP157 e P26 (Autographiviridae) de *Xanthomonas citri subsp. citri* da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências - Unesp Rio Claro).

1.5 Objetivos específicos

- a) Caracterizar a estabilidade em diferentes valores de pH e de temperatura e em exposição à luz ultravioleta;
- b) Realizar o experimento de Curva de Crescimento em uma Etapa para caracterização do ciclo de reprodução lítico de XacP157;
- c) Avaliar a viabilidade dos fagos XacP157 e P26 por intermédio da contagem de Unidades Formadoras de Lise (PFU) por mL para determinação da Viabilidade Relativa (%) em cada tratamento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições de crescimento da linhagem bacteriana e das partículas virais

Durante a transcorrência dos experimentos de caracterização, a linhagem de *Xanthomonas citri* FDC 102 (Ragupathy *et al.*, 2023) foi utilizada. Como meio de cultura para o crescimento, foi utilizado NYG (peptona 5 g/L; extrato de levedura 3 g/L; glicerol 20 g/L) com ou sem adição de ágar (15 g/L). O crescimento foi realizado a 29 °C com ou sem agitação (200 rpm).

Para a propagação dos bacteriófagos XacP157 e P26, 100 µL de uma suspensão de bacteriófagos purificados foram misturados com 100 µL de uma cultura de *X. citri* em $D.O_{600nm} = 0,4$. A essa suspensão, foram adicionados 5 mL de NYG soft-ágar (5 g/L de peptona; 3 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de glicerol e 0,65% de ágar), o qual foi vertido em uma placa com um pequeno filme de NYG sólido com 1,5% de ágar. O crescimento foi feito a 29°C por 24 horas. Após a verificação da formação de placas de lise, foram adicionados 5 mL de Tampão-SM (100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 0,01% ágar), e as placas foram incubadas a 12°C por 24 horas.

Em seguida, essa solução foi filtrada em filtro 0,45 µm para a retirada de quaisquer contaminantes e, em sequência, foi realizada uma quantificação por meio de uma diluição seriada para o cálculo da PFU/mL (Unidades Formadoras de Lise por mL). Os lisados fágicos foram mantidos a 12 °C e as propagações foram feitas de maneira contínua para a perpetuação da viabilidade dos bacteriófagos.

2.2 Caracterização físico-química dos bacteriófagos XacP157 e P26

2.2.1 Avaliação da estabilidade em diferentes pH

A avaliação da estabilidade em diferentes pH foi conduzida conforme Santos-junior (2020), com modificações. Para esse processo, sete suspensões de bacteriófagos foram preparadas em Tampão-SM (sem adição de ágar), cujos valores de pH variaram entre 2,5 e 11. Para ajuste do pH das soluções, foram utilizadas soluções concentradas de ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

Os tratamentos foram incubados por uma hora a 29 °C. Após cada tratamento, 200 µL de cada solução foram adicionados a 200 µL de uma suspensão

de *X. citri* ($D.O_{600nm} = 0,4$). Essa suspensão foi adicionada sobre uma placa de Petri contendo NYG-ágar. Posteriormente, foram vertidos 5 mL de NYG soft-ágar às placas. As placas foram incubadas por 24 horas a 29 °C e a formação de Unidades Formadoras de Lise foi avaliada (método *food plate*). A viabilidade relativa foi calculada em comparação com o número de PFU/mL obtido nos tratamentos em pH 7,4 conforme demonstra a fórmula:

$$\text{Viabilidade Relativa (\%)} = \{(\text{Média PFU/mL em pH 7,4} - \text{Média PFU/mL tratamentos}) / \text{Média PFU/mL em pH 7,4}\} \times 100$$

2.2.2 Avaliação da estabilidade em diferentes temperaturas

Os ensaios de estabilidade térmica foram estabelecidos conforme Marquioni *et al.* (2022), com modificações. As suspensões de bacteriófagos em uma concentração de 1×10^3 PFU/mL foram mantidas em pH 7,4 e foram expostas a temperaturas, variando entre -80 °C a 60 °C por uma hora. Após os tratamentos, as amostras foram plaqueadas pelo método *food plate* (conforme descrição exposta no item 2.2.1).

A viabilidade relativa foi obtida pela comparação de PFU/mL nos tratamentos em relação ao número de PFU/mL dos lisados fágicos mantidos a 29 °C:

$$\text{Viabilidade Relativa (\%)} = \{(\text{Média PFU/mL a 29 °C} - \text{Média PFU/mL tratamentos}) / \text{Média PFU/mL a 29 °C}\} \times 100$$

2.2.3 Avaliação da estabilidade em luz ultravioleta

A estabilidade dos bacteriófagos em luz UV foi determinada conforme Marquioni *et al.* (2022), com modificações. Para o experimento, suspensões de 100 µl de bacteriófagos foram expostas à luz UV (254 nm) de uma cabine de biossegurança por 0, 20, 40, 80 e 160 s a uma distância de 60 cm da fonte de luz. Após a exposição, as suspensões foram plaqueadas pelo método *food plate* (descrito em 2.2.1) para avaliação da formação de placas de lise.

A concentração final de cada tratamento em PFU/mL foi calculada para avaliar a viabilidade dos bacteriófagos tratados:

$$\text{Viabilidade Relativa (\%)} = \{(\text{Média PFU/mL em 0s} - \text{Média PFU/mL tratamentos}) / \text{Média PFU/mL em 0s}\} \times 100$$

2.3 Cinética de infecção do bacteriófago

2.3.1 Curva de Crescimento em uma Etapa

A Curva de Crescimento em uma Etapa foi realizada conforme Clokie *et al.* (2018), com modificações. Inicialmente, 1 mL de suspensão do bacteriófago XacP157 (título de partículas virais entre 1 a $3 \cdot 10^4$ PFU/ml) foi adicionado a um pré-inóculo líquido de *X. citri* D.O._{600nm} = 0,5 (10^9 células por mL). Posteriormente, a suspensão integrada por bacteriófagos e bactérias foi mantida em 29 °C por 5 minutos (agitação a 200 rpm), permitindo que os bacteriófagos adsorvam às células bacterianas. Para remoção de bacteriófagos não-adsorvidos, o conteúdo foi centrifugado e a suspensão sobrenadante foi descartada, enquanto o *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL de meio NYG líquido.

As alíquotas da cultura de célula foram coletadas em intervalos de 30 min por um período de 120 minutos. Entretanto, em coletas posteriores, o intervalo de tempo estabelecido foi de 15 minutos e o tempo máximo de coleta foi 270 minutos. O cálculo da PFU/mL foi feito pela contagem de Unidades Formadoras de Lise em cada uma das coletas, as quais foram crescidas em placas pelo método *food plate*.

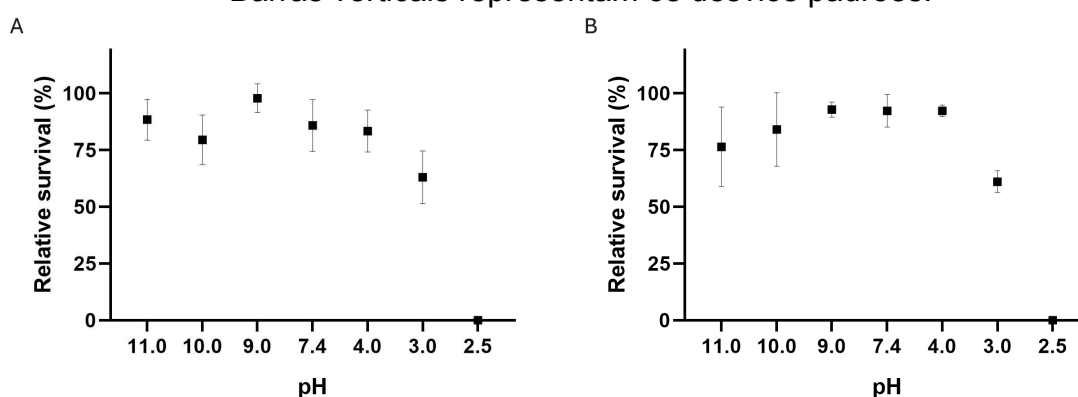
3 RESULTADOS

3.1 Caracterização físico-química dos bacteriófagos XacP157 e P26

Por intermédio da caracterização de estabilidade em pH, torna-se notável que o potencial lítico dos bacteriófagos XacP157 e P26 é reduzido em pHs altamente ácidos, posto que há uma redução de 37% da viabilidade (SD = 10) em pH 3,0 para XacP157 e são integralmente inviáveis em pH 2,5.

Para os valores de pH levemente ácidos (pH 4), neutros e alcalinos, os bacteriófagos permanecem viáveis: 75% dos vírions se mantêm ativos a partir do pH 4,0 até o pH 11,0 (**Figura 1**). Entretanto, para P26, há uma pequena redução em situações de alta alcalinidade, com uma queda de 23,55% (SD = 17,41) na viabilidade em pH 11,0. Em vista disso, os pH ótimos para estabilidade das partículas virais foram considerados entre 4,0 e 9,0.

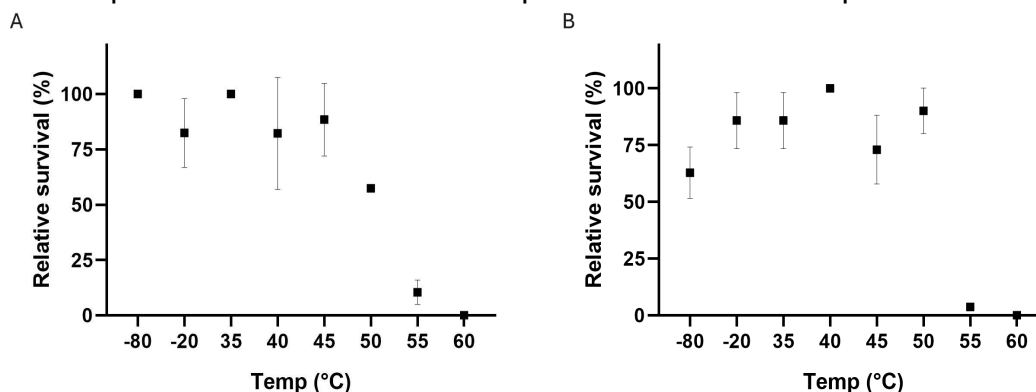
Figura 1 - Sobrevivência relativa dos fagos XacP157 (A) e P26 (B) em diferentes pH. Barras verticais representam os desvios padrões.



Fonte: Dados da Pesquisa

Os bacteriófagos são caracterizados por uma resistência térmica contida no intervalo de temperatura de -80 °C e 55 °C e, em contraposição, são completamente inativos em 60 °C. Entretanto, a viabilidade relativa é alterada em exposição a temperaturas equivalentes ou maiores que 50 °C para XacP157 e iguais ou maiores que 55 °C para P26 (**Figura 2**). Nesse contexto, existe uma redução de 89,54% (SD = 5,4) da estabilidade em 55 °C para o XacP157, enquanto há quase inativação integral de P26 em 55 °C.

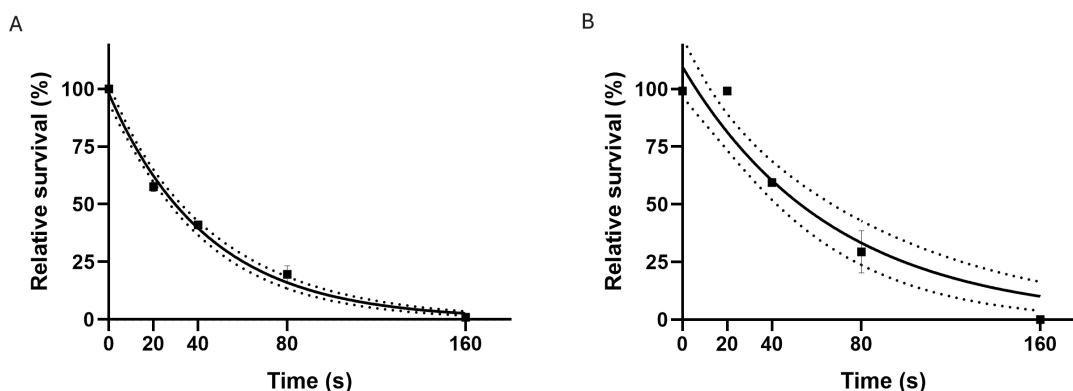
Figura 2 - Sobrevivência relativa dos fagos XacP157 (A) e P26 (B) em diferentes temperaturas. Barras verticais representam os desvios padrões.



Fonte: Dados da Pesquisa

A exposição à luz ultravioleta resultou na inativação de mais de 50% dos bacteriófagos em exposições equivalentes ou superiores a 40 segundos para XacP157. A inativação integral das partículas virais é constatada em um período de 160 segundos de exposição, conforme exposto na **Figura 3**.

Figura 3 - Sobrevivência relativa dos fagos XacP157 (A) e P26 (B) após exposição a luz UV. Barras verticais representam desvios padrões. As linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança de 95% da regressão não-linear adequada à curva de estabilidade.



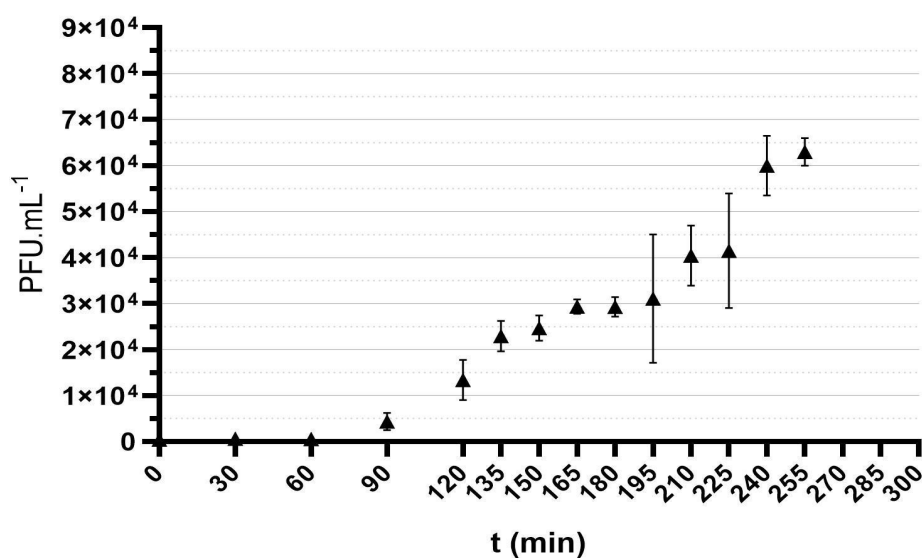
Fonte: Dados da Pesquisa

3. 2 Cinética de infecção do bacteriófago

Em curvas de crescimento em uma etapa, o período de latência configura-se como o momento no qual as partículas virais estão adsorvendo às células hospedeiras e estão realizando o ciclo lítico no ambiente intracelular. Para o bacteriófago XacP157, esse período está contido entre 0 a 90 minutos (**Figura 4**). A finalização desse período representa o momento de *burst size* no qual as partículas

virais, adsorvidas às células hospedeiras, completam o ciclo lítico e ocorre a extrusão de novos fagos e, para XacP157, esse momento é observado entre 90 e 240 minutos. Para além disso, o *burst size* também é representado pelo número de bacteriófagos produzidos para cada célula bacteriana lisada. A curva estabelecida permite inferir que esse número é próximo de 27 bacteriófagos para cada célula infectada. O ciclo de reprodução lítico é finalizado em cerca de 240 min e, nesse sentido, o crescimento é reduzido em tempos de coleta superiores a 225 min, o que caracteriza um período de estabilização da curva e a finalização da extrusão de novos bacteriófagos, os quais infectarão outras células disponíveis.

Figura 4 - Curva de crescimento em uma etapa de XacP157. Barras verticais representam os desvios padrões.



Fonte: Dados da Pesquisa

4 DISCUSSÃO

A determinação da estabilidade em diferentes valores de pH configura-se como uma métrica importante na avaliação da viabilidade de bacteriófagos em diferentes ambientes. Os solos de cultivo de citros e o citoplasma de *X. citri* são exemplificações de espaços com variações de pH nos quais os bacteriófagos deverão ser ativos. Sob essa perspectiva, é desejável que os princípios ativos de formulações agrícolas sejam resistentes a variações de pH. A condução dos experimentos de estabilidade de XacP157 e P26 permite concluir que os valores de pH levemente alcalinos (pH entre 7,0 e 7,5) devem ser utilizados em soluções de estoque (como o Tampão-SM) ou em possíveis formulações. Intervalos de pH levemente alcalinos são ideais para manutenção íntegra de diversos bacteriófagos de famílias distintas. Nesse sentido, torna-se cabível mencionar que esses valores também são descritos como intervalos adequados para a perpetuação de ZC01 (Siphoviridae) e ZC03 (Podoviridae) de *Pseudomonas aeruginosa* e vB_XciM_LucasX (Myoviridae) de *X. citri* (Santos-junior, 2020; Marquioni *et al.*, 2022).

A perpetuação da estabilidade em pH próximo do neutro é previsível, posto que o citoplasma de *X. citri*, ambiente no qual a replicação viral acontece, possui pH próximo de 7,0. Para além disso, o ciclo de vida de *X. citri* ocorre de maneira ideal entre os valores de pH de 6,0 a 8,0. Consequentemente, é compreensível que esses vírus sejam estáveis e funcionais nesse intervalo. Também é fundamental destacar que os métodos utilizados consideram sobrevivências relativas, utilizando pH 7,4 como referência para o cálculo comparativo, o que resulta em um viés para valores ótimos nesse intervalo. Contudo, os valores brutos de PFU/mL estabelecidos corroboram a tendência observada e indicam que o intervalo no qual a viabilidade é mantida está entre pH 4 e 11. Ademais, esse resultado está condizente com parâmetros de outros bacteriófagos de *Xanthomonas* os quais são, geralmente, estáveis no intervalo de pH de 5 a 11 com diversos exemplares resistentes a pH 4 (Nakayinga *et al.*, 2021).

Em contraposição, condições de acidez extrema devem ser evitadas para a manutenção dos fagos XacP157 e P26 devido à redução expressiva das suas estabilidades em valores de pH menores ou iguais a 2,9 (menos de 50% de bacteriófagos viáveis). A perda de atividade lítica em valores de pH altamente ácidos

(menores que 4) também são perceptíveis nos bacteriófagos ZC01, ZC03 e vB_XciM_LucasX de *X. citri* (Santos-junior, 2020; Marquioni *et al.*, 2022). Para o fago vB_EcoM_XAM237 de *Escherichia coli*, valores de pH menores ou iguais a 2 resultam na perda de atividade lítica, ressaltando a perda de viabilidade em condições extremamente ácidas entre bacteriófagos distintos (Chai *et al.*, 2025). Em condições de acidez extrema, há a danificação de estruturas essenciais (como o capsídeo proteico e a cauda proteica) e de outros componentes (como a destruição do material genético e de lipídios) (Raza *et al.*, 2023; Yuan *et al.*, 2017; Moyer; Nemerow, 2011). O capsídeo fágico é integrado por uma conjunção de proteínas ligadas por diferentes interações moleculares. Em contextos de redução do pH, pode ocorrer a degradação dessas estruturas por intermédio da ionização de resíduos de aminoácidos, por exemplo. Para 12 fagos de *Acinetobacter baumannii* (patógeno oportunista causador de infecções supurativas em humanos), a atividade lítica foi expressivamente reduzida em valores de pH entre 3 e 4 devido à provável degradação de proteínas essenciais (Bagińska *et al.*, 2024).

A análise dos intervalos de resistência térmica é empregada com o propósito de delimitar os intervalos ideais de estocagem e de aplicação nas condições de temperatura do campo. Para os bacteriófagos XacP157 e P26, a atividade lítica é perpetuada em temperaturas entre -80 °C e 55 °C. Todavia, a resistência térmica é reduzida em temperaturas superiores a 55 °C, resultando na supressão integral de unidades líticas em 60 °C. Esse parâmetro representa uma característica altamente variável entre bacteriófagos distintos. Para *Xanthomonas*, existem fagos de *X. phaseoli* que permanecem ativos entre 2 e 28 °C, fagos de *X. pruni* e *X. oryzae* ativos entre 20 e 50 °C e fagos de *X. euvesicatoria* com atividade entre 35 e 70 °C (Nakayinga *et al.*, 2021). Da mesma maneira que os valores de pH extremamente ácidos resultam na inativação, temperaturas elevadas são responsáveis pela desnaturação de proteínas essenciais e de estruturas essenciais. Para RSJ2 de *Ralstonia solanacearum*, exposição a 40 °C por períodos prolongados (5 horas e 10 horas) resultou em inativação devido ao provável extravasamento do material genético durante a desagregação entre cauda e capsídeo (evento observado por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia de Força Atômica) (Sae-ueng *et al.*, 2024). Entretanto, os fagos XacP157 e P26 são caracterizados por um intervalo abrangente de resistência térmica, característica a qual possibilita sua manutenção em condições variáveis. A perpetuação dos bacteriófagos em baixas

temperaturas permite, por exemplo, que os estoques sejam mantidos em ultracongeladores (também utilizados para estoques de bactérias). Em caso de utilização para a produção de formulações, a estocagem dos produtos poderá ser realizada em temperatura ambiente (cerca de 25 °C a 30 °C) sem o risco de inativação do bacteriófago.

Para o cenário da fagoterapia como método alternativo de controle de doenças bacterianas agronômicas, é imprescindível que o potencial lítico seja mensurado em relação à exposição à radiação UV. Isso porque, em campos de cultura, a incidência de raios solares representa um risco de inativação das partículas virais por esse tipo de radiação. Para XacP157 e P26, a radiação ultravioleta representa um fator altamente inativador, posto que a incidência direta dos raios UV resultou em inativação integral em exposição igual ou superior a 160 segundos. Existem diversas características da biologia viral as quais podem estar relacionadas a esse comportamento. Como exemplificação, a ausência de um envelope lipídico pode representar uma das causas de alta inativação por exposição à luz ultravioleta devido à ausência dessa proteção de lipídeos. Os principais mecanismos de degradação gerados pela radiação residem na destruição ou na mutação do material genético (Vechtomova *et al.*, 2021) e, portanto, é compreensível que a exposição à luz UV resulte na perda de atividade lítica.

Devido à sensibilidade expressiva dos bacteriófagos caracterizados, é necessário que uma aplicação futura em campo esteja conciliada com um método de atenuação da incidência de radiação ultravioleta. Para que isso seja possível, a utilização de fotoprotetores é altamente recomendada na produção de formulações. Compostos orgânicos, como extratos de Aloe vera, são atualmente estudados como fatores de proteção à radiação ultravioleta em contextos distintos (em produtos farmacêuticos e cosméticos, por exemplo) (Misawa *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2022; Reis-mansur *et al.*, 2023). Os extratos de *A. vera* são integrados por diversos polissacarídeos (acemanana, aloe-emodina, aloína e aloesina, por exemplo) com funções distintas de imunorreguladores, antioxidantes, anti-inflamatórios e fotoprotetores (Kumar *et al.*, 2024; Heś *et al.*, 2019). Ademais, devido aos baixos riscos que esses compostos apresentam à saúde humana e ambiental, o seu emprego desponta como uma promessa para a proteção contra a radiação ultravioleta em formulações agrícolas contendo XacP157 e P26. A utilização de outros extratos naturais derivados de cenoura, pimentão-vermelho e beterraba

também garantem fotoproteção aos bacteriófagos de *Erwinia amylovora* (agente etiológico do fogo bacteriano) (Born *et al.*, 2015)

Os resultados derivados da caracterização físico-química deste trabalho são congruentes com os parâmetros de tolerância de outros bacteriófagos de *X. citri* da nossa coleção. Como exemplificação, P27 e XacP77 permanecem estáveis em exposição a valores de pH entre 4 e 11 e em temperaturas entre -80 °C e 50 °C e são altamente sensíveis à exposição em ultravioleta. (Zamunér, 2024).

A curva de crescimento em uma etapa é semelhante à curva do fago CP2 de *X. citri*, cuja composição genética é cerca de 95% idêntica aos fagos XacP157 e P26 (Ahmad *et al.*, 2014; Zamunér, 2024). Conforme mencionado previamente, o período de latência possui 90 minutos de duração. Esse padrão temporal também é notado na curva de crescimento do fago CP2 (Ahmad *et al.*, 2014). Entretanto, as curvas de crescimento em uma etapa são bastante distintas para diferentes bacteriófagos e representam diferentes padrões de replicação viral. Para XacP157, o número de novas partículas virais liberadas para cada célula lisada é próximo de 27, porém esse padrão pode ser alterado por alguns fatores como, por exemplo, a linhagem utilizada como hospedeira, a composição e as condições do ambiente de cultura (Hadas *et al.*, 1997).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência do desenvolvimento expressivo da fagoterapia, agências internacionais de vigilância sanitária, como o FDA (Food and Drug Administration), e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), por exemplo, têm emitido pareceres favoráveis à utilização de produtos baseados em bacteriófagos na agricultura. Diversas empresas (AdaptivePhage, BigDNA, Ellis Day Skin Sciences, Hexal Genentech, entre muitas outras) têm utilizado os bacteriófagos integralmente ou parcialmente na produção de vacinas ou produtos comerciais para contextos veterinários e clínicos com a aprovação da FDA (KARN *et al.*, 2023). A BioPhage Pharma Inc. possui uma patente relativa à produção de uma vacina fundamentada na expressão de proteínas imunizantes por bacteriófagos (MARCH *et al.*, 2002). Para o cancro cítrico, a AgriPhage desenvolveu uma formulação cuja manutenção pode ocorrer em temperatura de 4 °C e em um intervalo de pH entre 6,0 e 8,5 (AGRIPHAGE, 2022). Sob essa perspectiva, os bacteriófagos despontam como uma alternativa viável para a elaboração de novas formulações agrícolas para manejo e controle de fitopatologias. Todavia, o conhecimento prévio sobre a dinâmica de infecção do bacteriófago e sobre os seus intervalos de resistência físico-química são requeridos para a produção desses produtos. A caracterização estabelecida nesse trabalho é, portanto, imprescindível para a elucidação da estabilidade dos bacteriófagos em diferentes condições. Os parâmetros de resistência físico-química também são determinantes para estocagem correta e para avaliação das condições necessárias de aplicação dos fagos em testes de manejo em campo.

A caracterização da resistência físico-química realizada para XacP157 e P26 nesse trabalho estabelece diretrizes e parâmetros condizentes com outros bacteriófagos avaliados dentro do contexto da fagoterapia contemporânea. XacP157 e P26 são, portanto, viáveis em intervalos de pH e temperatura utilizados em formulações existentes, contudo a avaliação da resistência à luz ultravioleta demonstra a necessidade de fotoproteção para a aplicação em campos de cultivo.

Ademais, o estudo da cinética de infecção permite conhecer o tempo no qual o bacteriófago completa seu ciclo de reprodução lítico. O conhecimento dessa característica é fundamental para estabelecer parâmetros de tratamento como, por exemplo, o tempo necessário para a lise da célula hospedeira e o número de novos bacteriófagos produzidos por ciclo. Os tempos de ciclo descritos para XacP157 são

importantes para que o tempo de tratamento em campo possa ser delineado, garantindo uma eficiência maior em futuras aplicações. Como continuidade ao trabalho realizado, torna-se possível a realização da curva de crescimento em uma etapa de P26 e de outros bacteriófagos integrantes da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos. Entretanto, as curvas de outros bacteriófagos, como XacP157, P27 e XacP77, ressaltam que os padrões de reprodução dos bacteriófagos da coleção são muito similares e os tempos de ciclo podem ser extrapolados em futuras utilizações.

Em síntese, é necessária a continuidade do estudo das características virais propostas neste trabalho para que exista uma avaliação da longevidade dos estoques em exposição a diferentes temperaturas e valores de pH por longos períodos de tempo e a diferentes níveis de radiação ultravioleta. A avaliação contínua desses parâmetros em diferentes condições também é requerida para uma compreensão integral sobre a biologia dos bacteriófagos. Para além disso, a descrição da abrangência de hospedeiros para os bacteriófagos (parâmetro estabelecido para XacP157 e P26 com linhagens de *X. citri* presentes na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos) deve ser continuamente testada para novas cepas de *X. citri*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. A.; *et al.* Characterization of bacteriophages Cp1 and Cp2, the strain-typing agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 1, p. 77-85, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02310-13>. Acesso: 23 de jan. de 2025.
- BAGIŃSKA, N.; *et al.* Stability study in selected conditions and biofilm-reducing activity of phages active against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 4285, 21 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54469-z>. Acesso: 23 de jan. de 2025.
- BEHLAU, F.. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>. Acesso em: 20 de jun. de 2025.
- BEHLAU, F.; *et al.* Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 200-212, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00340-1>. Acesso em: 20 de jun. de 2025.
- BORN, Y. *et al.* Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 81, n. 15, p. 5361-5369, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01155-15>. Acesso: 28 de jan. de 2025.
- BRAGG, R. *et al.* Bacteriophages as potential treatment option for antibiotic resistant bacteria. In: Infectious Diseases and Nanomedicine I, **Springer** India, Kathmandu, Nepal, First International Conference (ICIDN–2012), p. 97-110. 2014. Disponível em: [10.1007/978-81-322-1777-0_7](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1777-0_7). Acesso em 20 de jun. de 2025.
- BRASIL. Governo Federal. Ministério da Agricultura e Pecuária, 2021. Prevenção, Controle e Erradicação do Cancro Cítrico. Disponível em: [gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/cancro %20citrico](http://gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/cancro%20citrico). Acesso em: 09 de fev. de 2023.
- CHAI, J.; *et al.* Isolation, characterization, and application of the novel polyvalent bacteriophage vB_EcoM_XAM237 against pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 56, p. 90, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01514-y>. Acesso: 28 de jan. de 2025.
- CISEK, A. A. *et al.* Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. **Current microbiology**, v. 74, p. 277-283, 2017. Disponível em: [10.1007/s00284-016-1166-x](https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x). Acesso: 05 de fev. de 2025.
- CLOKIE M.R.J.; *et al.* Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 3, **Methods in Molecular Biology**, Springer Science+Business Media LLC, vol. 1681, 2018. Disponível em: doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_5. Acesso: 05 de fev. de 2025.

CUERVO, A.; CARRASCOSA, J. L. Bacteriophages: structure. **eLS**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024053>.

REFERENCE, C. M.; et al. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 19, n. 6, p. 1302-1318, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12638>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29105297/>. Acesso em: 29 ago. 2025.

FUNDECITRUS: Ciência e Sustentabilidade para a Citricultura. **Cancro Cítrico**. Disponível em: fundecitrus.com.br/doencas/cancro. Acesso em: 08 de fev. de 2023.

GERUM, Á. P. D. et al. Importância econômica das doenças de fruteiras tropicais. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2018. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 232). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1109012/1/Documento232AureaGerumAinfo.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2025.

GOTTWALD, T.R., GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: The pathogen and its impact. **Online Plant Health Progress**, 2002. Disponível em: 101094/PHP-2002-0812-01-RV. Acesso: 05 de fev. de 2025.

HADAS, H.; et al. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 179-185, 1997. Disponível em: 10.1099/00221287-143-1-179. Acesso: 05 de ago. de 2025.

HEŞ, M.; et al. Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 3, p. 255–265, set. 2019. Disponível em: 10.1007/s11130-019-00747-5. Acesso: 05 de ago. de 2025.

HOUSBY, J. N.; MANN, N. H. Phage therapy. **Drug discovery today**, v. 14, n. 11-12, p. 536-540, 2009. Disponível em: 10.1016/j.drudis.2009.03.006. Acesso: 05 de fev. de 2025.

KARN, S. L.; et al. Phage therapy: a revolutionary shift in the management of bacterial infections, pioneering new horizons in clinical practice, and reimagining the arsenal against microbial pathogens. **Frontiers in Medicine** (Lausanne), [s. l.], v. 10, p. 1209782, 19 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1209782>. Acesso: 08 de ago. de 2025.

KUMAR, V. et al. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, p. 127810, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>. Acesso: 05 de ago. de 2025.

KUMAR, S.; et al. Recent advances in therapeutic and biological activities of Aloe vera. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 57, p. 103084, abr. 2024. Disponível em: 10.1016/j.bcab.2024.103084. Acesso: 05 de ago. de 2025.

LI, N.; *et al.* The relationship between PthA expression and the pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Biology Reports*, v. 41, n. 2, p. 967-975, fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2941-4>

LI, S. *et al.* Citrus greening: Management strategies and their economic impact. **HortScience**, v. 55, n. 5, p. 604-612, 2020. Disponível em: 10.21273/HORTSCI14696-19. Acesso: 05 de ago. de 2025.

MARCH, J. B.; *et al.* Bacteriophage-mediated immunisation. **BigDNA Ltd.** AU2002251192A1, 2002. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/AU2002251192A1/en>. Acesso em: 28 ago. 2025.

MARQUIONI, V. *et al.* Isolation and characterization of vB_XciM_LucasX, a new jumbo phage that infects *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas fuscans*. **Plos one**, v. 17, n. 4, p. e0266891, 2022. Disponível em: 10.1371/journal.pone.0266891. Acesso: 08 de ago. de 2025.

MAURA, D.; DEBARBIEUX, L.. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, p. 851-859, 2011. Disponível em: 10.1007/s00253-011-3227-1. Acesso: 08 de ago. de 2025.

MISAWA, E.; *et al.* Protective effects of Aloe sterols against UVB-induced photoaging in hairless mice. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 33, n. 2, p. 101-111, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/phpp.12286>. Acesso: 19 de ago. de 2025.

MOYER, C. L.; NEMEROW, G. R. Viral weapons of membrane destruction: variable modes of membrane penetration by non-enveloped viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 1, p. 44-49, jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.05.002>. Acesso: 08 de ago. de 2025.

NAKAYINGA, R.; *et al.* *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. **BMC Microbiology**, v. 21, p. 291, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7>. Acesso: 14 de ago. de 2025.

NAQVI, S. A. H. *et al.* Citrus Canker—Distribution, Taxonomy, Epidemiology, Disease Cycle, Pathogen Biology, Detection, and Management: A Critical Review and Future Research Agenda. **Agronomy**, v. 12, n. 5, p. 1075, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy12051075>. Acesso: 09 de ago. de 2025.

NIR-PAZ, R.; *et al.* Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 11, p. 2015-2018, 13 nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciz222>. Acesso: 08 de ago. de 2025.

NOBREGA, F. L.; *et al.* Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 760-773, 2018. Disponível em: 10.1038/s41579-018-0070-8. Acesso: 08 de ago. de 2025.

RAGUPATHY, R.; *et al.* C. Core-genome multilocus sequence typing for epidemiological and evolutionary analyses of phytopathogenic *Xanthomonas citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 89, e02101-22, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02101-22>. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.02101-22> 29 de ago. de 2025.

RAZA, S.; *et al.* An overview of diverse strategies to inactivate Enterobacteriaceae-targeting bacteriophages. **EcoSal Plus**, v. 11, n. 1, eesp00192022, p. 1-19, 12 dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0019-2022>. Acesso: 08 de ago. de 2025.

REIS-MANSUR, M. C. P. P.; *et al.* Nanotechnology as a tool for optimizing topical photoprotective formulations containing buriti oil (*Mauritia flexuosa*) and dry Aloe vera extracts: stability and cytotoxicity evaluations. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 16, n. 2, p. 292, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph16020292>. Acesso: 08 de ago. de 2025.

RESENDE, D. I. S. P.; *et al.* Up-to-date overview of the use of natural ingredients in sunscreens. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 15, n. 3, p. 372, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15030372>. Acesso: 25 de ago. de 2025.

SAE-UENG, U.; *et al.* Nanomechanical resilience and thermal stability of RSJ2 phage. **Scientific Reports**, v. 14, p. 19389, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70056-8>. Acesso: 08 de ago. de 2025.

SANTOS-JUNIOR, A. **Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

SCHAAD, N.W., *et al.* Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and applied microbiology** vol. 29, p. 690-695, 2006. Disponível em: 10.1016/j.syapm.2006.08.001. Acesso em: 20 de jul. de 2025.

SINGH, S.; *et al.* An insight in bacteriophage-based biosensors with focus on their detection methods and recent advancements. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, p. 101081, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101081>. Acesso em: 20 de jul. de 2025.

VALÉRIO, N. *et al.* Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. **Virus research**, v. 240, p. 8-17, 2017.

VECHTOMOVA, Y. L. *et al.* UV Radiation in DNA Damage and Repair Involving DNA-Photolyases and Cryptochromes. **Biomedicines**, v. 9, n. 11, p. 1564, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111564>. Acesso em: 20 de jul. de 2025.

VIDAL, M. F. Citricultura: Laranja. **Caderno Setorial ETENE**, Banco do Nordeste.v. 9, n. 328, março, 2024.

YOSHIKAWA, G.; *et al.* *Xanthomonas citri* jumbo phage XacN1 exhibits a wide host range and high complement of tRNA genes. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 4486, 2018.

YUAN, H.; *et al.* The pH stability of foot-and-mouth disease virus. **Virology Journal**, v. 14, n. 233, p. 1-10, 28 nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0897-z>. Acesso em: 23 de ago. de 2025.

ZAMUNER, C.F.C. **Xanthomonas citri** subsp. **Citri**: population genomic structure in the State of São Paulo and citrus canker biocontrol potential of novel bacteriophages. 2024. Tese (Doutorado em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro, 2024.

ZHAO, X. *et al.* A three-component signaling system plays multiple roles in the pathogenicity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology Research**, v. 7, p. 35, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42483-025-00320-w>. Acesso em: 20 de jul. de 2025.