

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 17/07/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**UTILIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS NA INIBIÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS
PELO GÊNERO *XANTHOMONAS SPP.* EM CULTIVOS AGRÍCOLAS.**

RAPHAEL CULIM NEVES

Rio Claro – SP

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**UTILIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS NA INIBIÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS
PELO GÊNERO *XANTHOMONAS SPP.* EM CULTIVOS AGRÍCOLAS.**

RAPHAEL CULIM NEVES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Rio Claro - SP

2023

N518u Neves, Raphael Culim
Utilização de ramnolipídeos na inibição de doenças causadas pelo
gênero *Xanthomonas* spp. em cultivos agrícolas / Raphael Culim
Neves. -- Rio Claro, 2023
75 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero

1. Biofilme. 2. Microscopia eletrônica de varredura. 3. Doenças
agrícolas. 4. Ramnolipídeo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS NA INIBIÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS PELO GÊNERO XANTHOMONAS SPP. EM CULTIVOS AGRÍCOLAS.

AUTOR: RAPHAEL CULIM NEVES

ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



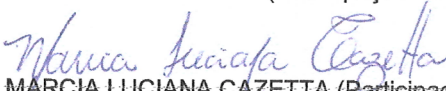
Documento assinado digitalmente

VINICIUS LUIZ DA SILVA

Data: 19/07/2023 22:46:24-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. VINICIUS LUIZ DA SILVA (Participação Virtual)



Profa. Dra. MARCIA LUCIANA CAZETTA (Participação Virtual)
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Rio Claro, 17 de julho de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter concedido saúde e sabedoria durante toda a minha vida, em especial, durante a realização do mestrado e por sempre estar me guiando nessa caminhada.

Agradeço à minha namorada, Mariana, por todo o apoio incondicional que me deu durante esses anos, em especial nos últimos dois que foram de muito aprendizado e muita luta. Mesmo quando tudo ia contra, você estava lá. Você me incentiva a ser uma pessoa melhor a cada dia, sou eternamente grato por tudo!

À minha família, em especial aos meus pais, Paulo e Suzi, que nunca negaram absolutamente nada durante minha jornada, pelas suas palavras de incentivo, por todo apoio emocional e financeiro, e por tudo que fizeram e fazem por mim! Vocês são minha fortaleza!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero por todo o apoio, atenção e dedicação que teve não somente durante a realização do mestrado, mas de toda a minha vida acadêmica. Seu conhecimento e empenho são exemplares, foi e sempre será um enorme prazer trabalhar ao seu lado.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) e do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) por todos os momentos que passamos juntos, pelos cafezinhos que sempre rendiam boas conversas e por todo o apoio que me deram! Em especial ao Lucas Prado, ao Mateus Rocha, ao Matheus Lacôrte, à Larissa Cavicchioli, à Ingrid Yoshimura, ao Joneclei Barreto, à Larissa Provasi, à Graciely Correa, à Rayane Vale, à Fernanda Batista e à Odunayo Adedeji. Vocês fizeram parte de todo esse processo e nosso convívio foi excepcional para o aprendizado profissional e pessoal, meu muito obrigado!

À Profa. Dra. Daiane Cristina Sass por ter cedido os microrganismos utilizados nesse estudo e ao Vitor Marin por ter auxiliado com os experimentos.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e à Escola Superior de Agricultura – Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) e ao técnico Renato Barbosa Salaroli por terem auxiliado e executado as imagens de microscopia eletrônica de varredura, ambos vinculados ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia.

Ao Técnico Hermes Dias Brito, por ter realizado as análises de microscopia eletrônicas de varredura e à UNESPetro, sediada na UNESP de Rio Claro, por ter cedido o equipamento. À técnica Naiara David de Souza, vinculada ao Departamento de Biodiversidade da UNESP de Rio Claro, por ter auxiliado nos testes *in vivo* desse trabalho, seu conhecimento e dedicação foram essenciais!

Agradeço também à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Campus Rio Claro pela disponibilização de recursos financeiros e materiais, bem como pelo excelente acolhimento que proporcionou durante a realização do meu mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A grandeza das ações humanas é proporcional à inspiração que as produz. Feliz é aquele que traz dentro de si um Deus, um ideal de beleza a que obedece: ideal de arte, ideal de ciência, ideal de pátria, ideal de virtudes evangélicas. São essas as fontes vivas dos grandes pensamentos e das grandes ações. Todas elas refletem a luz do infinito.

Louis Pasteur

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos, ou seja, apresentam propriedades polares e apolares e são produzidos por uma diversidade de microrganismos através de seu metabolismo, utilizando para isso fontes de carbono de diferentes origens, apresentando uma série de vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como maior degradabilidade no meio ambiente, baixa toxicidade e estabilidade química. Dentre os biossurfactantes, podemos destacar os ramnolipídeos, substância produzida pela bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* e que apresenta grande potencial de uso comercial, tendo como desvantagem seu custo de produção e purificação do composto. Uma alternativa para justificar a utilização desse composto é descobrir usos nobres que são exclusivos ou que apresentem grande vantagem em relação às substâncias comumente utilizadas. O presente trabalho estudou formas de melhorar a produção do ramnolipídeo e a aplicação para combater doenças agrícolas, especificamente àquelas causadas pelo gênero *Xanthomonas spp.*. Obteve-se melhor produção de ramnolipídeo quando houve a suplementação com elementos traços no meio de fermentação, apresentando máxima produção de 5,95 g.L⁻¹, com 96 horas de experimento. A maior produção de biomassa bacteriana ocorreu em 72 horas e produção de 4,5 g.L⁻¹. Os testes de inibição do crescimento de *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas passiflorae* obtiveram resultados completos de inibição com a adição de 1,5 g.L⁻¹, no entanto não houve inibição da bactéria com menor concentração do ramnolipídeo. Para a *Xanthomonas citri subs. citri*, os resultados obtidos mostraram completa inibição da bactéria com 0,8 g.L⁻¹ do composto e inibiram metade das colônias com 0,5 g.L⁻¹. Os teste *in vivo* não apresentaram infecção pela bactéria *Xanthomonas citri subs. citri*, não apresentando as lesões características relacionadas ao cancro cítrico (doença causada pela bactéria), sendo esse resultado, provavelmente relacionado com as condições climáticas presentes durante a realização dos experimentos. As análises de microscopia eletrônica de varredura, revelaram uma ação forte contra o biofilme formado pela bactéria, gerando lacunas e buracos na sua estrutura, sugerindo que este pode ser o mecanismo de ação contra esta bactéria fitopatogênica.

Palavras-chave: Biofilme, microscopia eletrônica de varredura, doenças agrícolas, ramnolipídeo

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic compounds, that is, they have polar and non-polar properties and are produced by a variety of microorganisms through their metabolism, using carbon sources from different sources, presenting a series of advantages in relation to surfactants of chemical origin, such as greater degradability in the environment, low toxicity and chemical stability. Among the biosurfactants, we can highlight rhamnolipids, a substance produced by the gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and which has great potential for commercial use, currently being barred by the cost of production and purification of the compound. An alternative to justify the use of this compound is to discover noble uses that are exclusive or that have a great advantage in relation to commonly used substances. The present work studied ways of better production of rhamnolipid and application to combat agricultural diseases, specifically those caused by the genus *Xanthomonas* spp.. Better rhamnolipid production was obtained when there is supplementation of trace elements in the fermentation medium, with a maximum production of 5, 95 g.L⁻¹, with 96 hours of experiment, with greater production of bacterial biomass in 72 hours and production of 4.5 g.L⁻¹. The growth inhibition tests for *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas passiflorae* obtained complete inhibition results with the addition of 1.5 g.L⁻¹, however there was no inhibition of the bacteria with the lowest concentration of rhamnolipid. For *Xanthomonas citri* subs. *citri*, the results obtained showed complete inhibition of the bacteria with 0.8 g.L⁻¹ of the compound and inhibited half of the colonies with 0.5 g.L⁻¹. The in vivo tests showed no infection by the bacterium *Xanthomonas citri* subs. *citri*, not presenting the characteristic lesions related to citrus canker (a disease caused by the bacteria), and this result is probably related to the climatic conditions present during the experiments. Scanning electron microscopy analyzes were carried out, which revealed a strong action against the biofilm formed by the bacteria, generating gaps and holes in its structure, being the field of future studies.

Keywords: Biofilm, scanning electron microscopy, agricultural diseases, rhamnolipid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características das lesões causadas pela bactéria <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> nas folhas do tomateiro.	20
Figura 2: Escaldadura da cana-de-açúcar, doença esta causada pela bactéria <i>Xanthomonas albilineans</i> . A: Planta no início dos sintomas; B: Planta com a doença desenvolvida.	21
Figura 3: Lesões provocadas pela bactéria <i>Xanthomonas passiflorae</i> nas folhas e no fruto do maracujá-azedo.	22
Figura 4: Lesões causadas pela Xac nas folhas e nos frutos da laranjeira.	23
Figura 5: Tipos de biossurfactantes: "1" prolina lipídica; "2" rodofatina; "3" surfactina; "4" didemnina B; "5" di-ramnolipídeos ; "6" glicose lipídica; "7" palmitato de glucosil; "8" triglicose-tetraéster; "9" 2-L-quinovose - éster de fenazina.....	25
Figura 6: Congêneres de ramnolipídeos	26
Figura 7: Produção de RL aferida por peso bruto em fermentação aeróbica em frascos Erlenmeyer de 1000 mL.....	37
Figura 8: Quantificação de RL com aferição realizada por HPLC.	38
Figura 9: Produção de RL em peso bruto com suplementação de elementos traços.....	39
Figura 10: Produção de RL verificada por HPLC, com suplementação de elementos traços em 20, 40, 60, 80 e 120 horas.....	39
Figura 11: Produção de biomassa bacteriana em relação ao tempo de fermentação, sem suplementação de elementos traços.	40
Figura 12: Produção de biomassa bacteriana em relação ao tempo de fermentação, com suplementação de elementos traços.	41
Figura 13: Quantidade de óleo residual em relação ao tempo de fermentação sem adição de elementos traços.....	42
Figura 14: Quantidade de óleo residual no caldo fermentado em relação ao tempo de fermentação.	43
Figura 15: Imagem mostrando a capacidade de inibição do RL a uma concentração de 2 g.L^{-1} , e o teste controle, onde não há presença do composto.	48
Figura 16: Imagem mostrando os efeitos causados na Xac pela ação do RL e seu respectivo teste controle. A placa à esquerda apresenta a concentração de 700 mg.L^{-1} e a placa à direita é o controle.	50
Figura 17: Efeitos causados pelo RL na Xac, conteúdo na imagem o teste controle, 400 mg.L^{-1} , 600 mg.L^{-1} e 800 mg.L^{-1}	51

Figura 18: Folhas de <i>Citrus sinensis</i> (laranja-pêra) removidas das plantas teste (esquerda) e controle (direita).	54
Figura 19: Imagem feita por MEV, com aumento de 278x, 20 kV e aproximadamente 10 pA. As estruturas redondas e parecidas com bastões são as células bacterianas da Xac, mostradas pelas setas brancas. O biofilme é a estrutura cinza-escuro e é apontado pelas setas vermelhas. O método de fixação da imagem foi feito através da desidratação por calor.....	55
Figura 20: Imagem feita por MEV, com aumento de 279x, 20 kV de tensão e uma corrente de 146 pA. As estruturas redondas, indicadas pelas setas brancas são as células bacterianas. O espaço em cinza é o BF formado, indicados aqui pelas setas vermelhas. Já as setas laranjas são as alterações morfológicas presentes no BF quando esse é submetido à ação do RL.	56
Figura 21: Fotografia de MEV mostrando os limites de uma colônia de Xac na ausência de ramnolipídeos, fixadas com ósmio. Tensão de 20 kV e aumento de 85x. A seta branca indica o limite da colônia (a esquerda) de Xac.	57
Figura 22: Fotografia de MEV, evidenciando os limites de uma colônia de Xac, na presença de ramnolipídeo. Tensão de 20 kV e aumento de 270x. A seta branca indica os limites da colônia (a direita) de Xac.	58
Figura 23: Imagem mostrando as alterações morfológicas na membrana celular, causadas pela presença de RL no meio de cultivo. Em “À”, imagem de uma célula de Xac sem RL, com um aumento de 4700x, corrente de 10 pA e tensão de 20 kV. Em “B”, uma célula de Xac tratada com 0,5 g.L ⁻¹ de RL, com um aumento de 11840x, corrente de 21 pA e tensão de 20 kV.....	59
Figura 24: Mapa fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia evidenciando a anomalia de precipitação no trimestre de janeiro, fevereiro e março.	63
Figura 25: Mapa fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia evidenciando a anomalia de temperatura no mês de janeiro de 2023.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos Meios MTF e MN. Composição dos meios MTF e MN. *Solução de elementos traços (g.L ⁻¹): citrato de sódio dihidratado – 2,0; FeCl ₃ 6H ₂ O – 0,28; ZnSO ₄ 7H ₂ O – 0,87; CaCl ₂ 6H ₂ O – 1,2; CuSO ₄ 5H ₂ O – 1,2; MnSO ₄ H ₂ O – 0,8.....	29
Tabela 2: Composição do tampão PUM, segundo Ceresa e colaboradores (2021).....	34
Tabela 3: Resultados obtidos com a adição de RL em uma concentração de 1,5 g.L ⁻¹ e 1,0 g.L ⁻¹ e seus respectivos testes controle. É possível observar uma diminuição sucinta no teste de 1,5 g.L ⁻¹	45
Tabela 4: Resultados obtidos na presença de RL nas concentrações de 1,5 g.L ⁻¹ e 1,0 g.L ⁻¹ e seus respectivos testes controle.	47
Tabela 5: Resultados obtidos com 700 mg.L ⁻¹ de RL e seu respectivo teste de controle.	49
Tabela 6: Resultados obtidos com concentrações de 500 mg.L ⁻¹ e 600 mg.L ⁻¹ e seus respectivos controles.	51
Tabela 7: Resultados obtidos para a presença de 1,5 g.L ⁻¹ e 1,0 g.L ⁻¹ de RL em meio de cultivo e seus respectivos testes controle.	53
Tabela 8: Resultados obtidos utilizando o teste de hidrofobicidade Rosenberg.	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BS	Biossurfactantes
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio bibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L	Litro
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani
MN	Meio mineral
MTF	Meio mineral com tampão fosfato
µL	Microlitro
MO	Microrganismo
mL	Mililitro
NaNO ₃	Nitrato de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RL	Ramnoflipídeos
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos gerais	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 O gênero <i>Xanthomonas</i>	19
3.1.1 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	19
3.1.2 <i>Xanthomonas albilineans</i>	20
3.1.3 <i>Xanthomonas passiflorae</i>	21
3.1.4 <i>Xanthomonas citri</i> subs. <i>citri</i>	23
3.2 Biossurfactantes.....	24
3.2.1 O ramnolipídeo	24
3.2.2 Estrutura dos biossurfactantes	25
3.2.3 O bioprocesso	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Microrganismo	28
4.2 Meios de cultura	28
4.2.1 Meios de cultivo para <i>Xanthomonas</i>	29
4.2.1.1 Meio de cultivo para <i>X. euvesicatoria</i> , <i>X. citri</i> e <i>X. passiflorae</i>	29
4.2.1.2 Meio de cultivo para <i>X. albilineans</i>	29
4.3 Produção de ramnolipídeos.....	29
4.3.1 Produção em frascos.....	30
4.3.2 Extração de ramnolipídeo	30
4.3.2.1 Extração bruta do óleo residual	30
4.3.2.2 Extração de ramnolipídeo da amostra.....	31
4.3.2.3 Extração de ramnolipídeo do acetato de etila.....	31

4.3.2.4 Secagem final do ramnolipídeos	31
4.4 Caracterização e quantificação do ramnolipídeo.....	31
4.4.1 Derivatização	31
4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	32
4.4.3 Quantificação por peso	32
4.5 Ramnolipídeo e inibição da <i>Xanthomonas spp.</i>	32
4.5.1 Atividade antimicrobiana do ramnolipídeo <i>in vitro</i>	32
4.5.1.1 Preparo das soluções com ramnolipídeo	33
4.5.1.1 Concentrações de ramnolipídeo aplicadas	33
4.5.2 Atividade antimicrobiana do ramnolipídeo <i>in vivo</i>	33
4.6 Teste de hidrofobicidade de Rosenberg	33
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
4.8 Análises estatísticas	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Produção de ramnolipídeos	37
5.1.1 Produção de ramnolipídeo com suplementação de elementos traços	38
5.2 Produção de biomassa.....	40
5.2.1 Produção de biomassa sem suplementação de elementos traços	40
5.2.2 Produção de biomassa com suplementação de elementos traços.....	40
5.3 Consumo da fonte de carbono	41
5.3.1 Consumo da fonte de carbono sem suplementação de elementos traços	41
5.3.2 Consumo da fonte de carbono com suplementação de elementos traços.....	42
5.4 Inibição do crescimento bacteriano de <i>Xanthomonas spp.</i> testado <i>in vitro</i>	43
5.4.1 Inibição da espécie <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	43
5.4.2 Inibição da espécie <i>Xanthomonas passiflorae</i>	45
5.4.3 Inibição da espécie <i>Xanthomonas citri subsp. Citri</i>	47
5.4.4 Inibição da espécie <i>Xanthomonas albilineans</i>	52

5.5 Teste de contaminação <i>in vivo</i>	53
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
5.7 Teste de hidrofobicidade de Rosenberg.....	59
6. DISCUSSÃO	60
6.1 Produção de ramnolipídeos.....	60
6.2 Teste de inibição do gênero <i>Xanthomonas spp.</i>	61
6.2.1 Inibição da <i>Xanthomonas citri subs. citri</i>	61
6.2.2.1 Inibição da <i>Xanthomonas citri subs. citri, in vivo</i>	62
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	64
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

As doenças de cultivos agrícolas são responsáveis por grandes perdas econômicas em todo o território nacional, gerando prejuízos enormes para todo o setor. O método atual de combate a essas doenças é através do uso de defensivos agrícolas, os quais estão relacionados com diversos efeitos não desejáveis, causando contaminação do solo, da água, do ar e do próprio alimento cultivado. Outro problema relacionado ao uso dessas substâncias é o impacto direto nos polinizadores, que acabam morrendo sem completar seu ciclo, prejudicando todo o equilíbrio biológico (RISTAINO *et al.*, 2021). Portanto, há necessidade de se desenvolver meios alternativos aos atuais que gerem menores impactos ambientais e que consigam atingir o controle de pragas e doenças agrícolas, aumentando dessa forma a produtividade, sem custos para a natureza. (DEVELTER & LAURYSEN, 2010; MAKAR *et al.*, 2011).

O gênero *Xanthomonas* spp. é amplamente conhecido por causar diversas doenças em diferentes tipos de culturas, afetando a produção de cítricos, cana-de-açúcar, tomate, maracujá e pimentão principalmente. O combate a esse gênero de bactéria geralmente é realizado através da erradicação da planta doente e da suas circundantes, não havendo no momento um antibiótico ou defensivo agrícola eficaz contra esse microrganismo (TIMILSINA *et al.*, 2020).

A bactéria da espécie *Xanthomonas citri* subs. *citri* (Xac) é conhecida por causar o cancro cítrico nas laranjeiras, doença, que causa manchas necróticas nas folhas, frutos e caule das plantas afetadas, prejudicando a estética da planta e por vezes, a produtividade do fruto. Outro problema relacionado com essa doença, são as barreiras sanitárias impostas por diversos países, que impedem a entrada do fruto ou de seus derivados (concentrados e sucos *in natura*) no seu território, prejudicando as exportações brasileiras desses produtos (MASSARI & JUNIOR, 2020).

As dificuldades fitossanitárias, representam aproximadamente 80% das queixas em relação aos processos de plantio e colheita das laranjas, sendo considerado de extrema importância o controle dessas pragas para uma maior e melhor colheita. Atualmente, das queixas acima citadas, 70% são em relação ao huanglongbing (HLB), *ex-greening*, doença causada também por uma bactéria, a *Candidatus Liberibacter* spp., que provoca amarelamento das folhas e consequentemente perda na produção. Os outros 30% são queixas relacionadas a outros patógenos, sendo de maior destaque o cancro cítrico, com um total de 20% dos queixas, considerado então, o segundo maior problema fitossanitário da laranja (NETO & FIGUEIRA, 2021).

Devido ao problema em se controlar o cancro cítrico de maneira convencional, ou seja, com o uso de antibióticos e/ou defensivos agrícolas, a única maneira eficaz atual de realizar tal processo, é através da remoção mecânica do indivíduo contaminado e de seus adjacentes, seguido da incineração de todas as plantas removidas durante o processo. Devido a esse processo gerar alta remoção de plantas que em teoria estavam saudáveis, as perdas econômicas são representativas, ocasionando um problema socioambiental para as regiões produtoras de laranja. Sendo assim, é importante encontrar alternativas para o controle ou erradicação da doença, se possível, metodologias ambientalmente seguras, como é caso dos biossurfactantes (BS) (JIANG *et al.*, 2020).

O Estado de São Paulo é o maior produtor de cítricos do Brasil e faz o país ser um dos maiores exportadores de laranja e seus derivados do mundo, abrangendo mercados como os Estados Unidos da América, Europa e Ásia, sendo importante fonte geradora de receita para as regiões produtoras. Segundo a Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de São Paulo (FAESP), o Estado se destaca em primeiro lugar no *ranking* nacional com 13,7 milhões de toneladas de laranja no ano de 2020, ficando muito à frente de Minas Gerais que é o segundo colocado com 1,1 milhão de tonelada produzida, evidenciando a importância desse cultivo para a região (FAESP, 2022).

Os BS são compostos químicos derivados do metabolismo secundário ou primário de algumas espécies de microrganismos, e apresentam características anfipáticas, garantindo a interação entre regiões hidrofílicas e hidrofóbicas em um sistema ou meio (MARCHANT & BANAT, 2012). Devido a essas características, os BS apresentam algumas propriedades de interesse, podendo citar, a capacidade de reduzir a tensão superficial da água, auxiliar na emulsificação de determinados compostos e, uso como detergentes além de, possivelmente apresentar algumas propriedades antibióticas, cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (HENKEL *et al.*, 2012).

Os ramnolipídeos (RL) são BS glicolipídicos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, composto pela ligação de uma ou duas moléculas de ramnose com β -hidroxiácidos. Esses compostos são produzidos através da fermentação de diversas fontes de carbono podendo ser extraídos do meio de cultivo para seu uso como composto puro. (SOBERÓN-CHAVEZ & MAIER, 2011).

A maior dificuldade para uso em larga escala do RL é seu elevado custo de produção, uma vez que envolve diversas etapas na sua recuperação do meio, utilizando-se de muitos solventes orgânicos, que são dispendiosos para uso rotineiro. Dessa forma, há duas grandes vertentes atuais na academia, sendo a primeira baseada no melhoramento da produção do RL,

seja através do uso de materiais menos nobres como fonte de carbono, seja no aprimoramento das condições de cultivo ou através do desenvolvimento de novas metodologias de purificação do composto. Já a segunda vertente, consiste em desenvolver novas aplicações, principalmente aquelas mais nobres, as quais não há substituto viável para o composto, ou aquelas em que o uso do RL é mais eficiente e menos agressivo para o ambiente no qual está sendo disposto (HEYD *et al.*, 2008).

Atualmente o mercado internacional desses compostos está em desenvolvimento, apresentando algumas indústrias que estão focadas em produzir ou aprimorar o uso do RL, sendo algumas plantas instaladas na Índia, China, Reino Unido e Estados Unidos da América. É de suma importância a produção do RL por indústrias, pois isto diminui os custos e aumenta a visibilidade, sobretudo dos leigos em relação ao composto (BISELLI *et al.*, 2020).

O mercado de BS está em crescimento acelerado, com tendência de alcançar níveis relevantes no comércio internacional. No entanto, especificamente para o RL não é esperado um aumento substancial no futuro próximo, uma vez que ainda existe a entrava do elevado custo de produção do composto. Atualmente, diversos pesquisadores, seja do setor privado ou da academia, estão buscando novos usos para os BS no geral e também para o RL, o que gera um mercado novo voltado para elucidar todos os processos impeditores atuais, bem como criar novos caminhos para o uso dessas substância (BISELLI *et al.*, 2020).

Atualmente, o mercado internacional de RL é concentrado na América do Norte e no sudeste da Ásia, apresentando uma participação de U\$8.45 bilhões, com base na análise de dados de 2018 e 2022. É esperado um aumento anual no mercado de BS de aproximadamente 5% até o ano de 2032, com ênfase no sudeste da Ásia, principalmente China, a qual planeja investir no uso de RL e outros BS nas áreas farmacológicas, cosméticas e na agricultura. O valor projetado para o mercado de BS é de U\$14.3 bilhões até o ano de 2032, com a Evonik Industries AG, sendo a principal empresa do ramo e com maior participação de mercado (*market share*). A seguir, figura exemplificando os dados citados acima (Global Markets Insight, 2023).

As projeções apontam para um mercado aquecido tanto para BS como para o de RL, dessa forma fazem-se necessários estudos que viabilizem a produção o comércio dessas substâncias em larga escala, removendo os problemas relacionados com os custos de produção e purificação. Outro ponto importante é a necessidade de amplo conhecimento por conta da indústria, esta que, muitas vezes acaba desconhecendo o produto ou não vê interesse sólido devido aos fatos já citados. Dessa forma é de suma importância uma ação conjunta em diversas áreas da academia e da indústria para viabilizar o uso de BS (JIANG *et al.*, 2020).

7. CONCLUSÃO

- A produção de ramnolípídeo, bem como todo o processo fermentativo ficaram mais eficientes quando há adição de elementos traços no meio.
- Os testes de inibição mostraram que houve eficácia em 2 g.L^{-1} de RL, eliminando totalmente as bactérias inoculadas nas placas de Petri. No entanto, quando adiciona-se 2 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} ou $500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de RL o efeito inibitório é nulo, não influenciando o crescimento e desenvolvimento das quatro diferentes espécies testadas no presente estudo.
- Apenas a Xac obteve resultados positivos para uma menor quantidade de RL.
- Os testes *in vivo* com essas concentrações não foram conclusivos.
- O teste de hidrofobicidade de Rosenberg mostrou que houve boa adesão do RL à membrana celular.
- As análises de MEV evidenciaram que houve alterações morfológicas na célula e no BF formado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-MAWGOUD, A. M., LÉPINE, F., & DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86, 1323-1336, 2010.
2. AL-GELAWI, M. H., & AL-MAKADCI, O. A. Genetic improvement of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa*. **Arab Gulf Journal of Scientific Research** (1989), 25(1-2), 16-22, 2007.
3. AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.
4. ARGYRAKI, A., MARKVART, M., BJØRNDAL, L., BJARNSHOLT, T., & PETERSEN, P. M. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after ultraviolet light-emitting diode treatment: a comparative study between ultraviolet C and ultraviolet B. **Journal of Biomedical Optics**, 22(6), 065004-065004, 2017.
5. ARINO, S., MARCHAL, R., & VANDECASTEELE, J. P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 45(1), 162-168, 1996.
6. ARRIFANO, J. R. Y. Avaliação de resistência de híbrido e linhagens de maracujazeiro à bacteriose, sob cultivo protegido, 2019.
7. BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 283-288, 2002.
8. BERTANI, G. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, 62(3), 293-300, 1951.
9. BISELLI, A., WILLENBRINK, A. L., LEIPNITZ, M., & JUPKE, A.. Development, evaluation, and optimisation of downstream process concepts for rhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoxy) alkanolic acids. **Separation and Purification Technology**, 250, 117031, 2020.
10. BIRCH, R. G., & PATIL, S. S. (1987). Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 30(2), 199-206.
11. CAMARGO, M. B. P. D., ORTOLANI, A. A., JÚNIOR, P., JOSÉ, M., & ROSA, S. Modelo agrometeorológico de estimativa de produtividade para o cultivar de laranja Valência. **Bragantia**, 58, 171-178, 1999.
12. CERESA, C., RINALDI, M., TESSAROLO, F., MANIGLIO, D., FEDELI, E., TAMBONE, E., ... & FRACCHIA, L.. Inhibitory effects of lipopeptides and glycolipids

- on *C. albicans*–*Staphylococcus* spp. Dual-Species Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, 11, 545654, 2021.
13. Biosurfactants Market - By Product (Sophorolipids, Rhamnolipids, Alkyl Polyglucosides, Sucrose Esters, Lipopeptides, Phospholipids), By Application (Personal Care, Industrial Cleaners, Food Processing, Textiles, Pharma, Bioremediation), & Forecast, 2023 - 2032. Global Markets Insight, 2023. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report>>. Acesso em: 05 de maio de 2023.
 14. DA SILVA, A. P. S., OLIVARES, F. L., SUDRÉ, C. P., PERES, L. E. P., CANELLAS, N. A., DA SILVA, R. M., ... & CANELLAS, L. P. Attenuations of bacterial spot disease *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato plants treated with biostimulants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 8, 1-9, 2021.
 15. DE ARAUJO, L. V., GUIMARÃES, C. R., DA SILVA MARQUITA, R. L., SANTIAGO, V. M., DE SOUZA, M. P., NITSCHKE, M., & FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, 63, 171-178, 2016.
 16. DE OLIVEIRA, R. P., UENO, B., SCIVITTARO, W. B., KOLLER, O. C., & DA ROCHA, P. S. G. Cancro cítrico: epidemiologia e controle, 2008.
 17. DEVELTER, D. W.; LAURYSEN, L. M. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European journal of lipid science and technology**, v.112, p. 628-638, 2010.
 18. EDWARDS, J. R.; HAYASHI, J. A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 111(2), 415-421, 1965.
 19. ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; McGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1016-1019, 2016.
 20. EL-HOUSSEINY, G. S. et al. Isolation, screening and improvement of rhamnolipid production by *Pseudomonas* isolates. 2017.
 21. ERAQUI, W. A.; YASSIN, A. S.; ALI, A. E.; AMIN, M. A. Utilization of crude glycerol as a substrate for the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotech. Res. Int.**, 2016.
 22. ESLAMI, P., HAJFARAJOLLAH, H., & BAZSEFIDPAR, S. (2020). Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. **RSC Advances**, 10(56), 34014-34032, 2020.

23. FAQRI, AM ALSHAIKH; HAYDER, N. H.; HASHIM, A. J. induction of rhamnolipid production by pseudomonas aeruginosa a3 using chemical and physical mutagenic factors. **The Iraqi Journal of Agricultural Science**, v. 50, n. 3, p. 1174-1185, 2019.
24. GONZALEZ, M. R., DUCRET, V., LEONI, S., & PERRON, K. (2019). Pseudomonas aeruginosa zinc homeostasis: Key issues for an opportunistic pathogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 1862(7), 722-733, 2019
25. GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O., & FIECHTER, A. Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and environmental microbiology**, 48(2), 301-305, 1984
26. GUERRA-SANTOS, L. H., KÄPPELI, O., & FIECHTER, A. (1986). Dependence of Pseudomonas aeruginosa continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 24(6), 443-448.
27. HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.
28. HEYD, M., KOHNERT, A., TAN, T. H., NUSSER, M., KIRSCHHÖFER, F., BRENNER-WEISS, G., ... & BERENSMEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 391, 1579-1590, 2008.
29. IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of Pseudomonas aeruginosa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176-179, 1995.
30. ISHIDA, A. K. N., & HALFELD-VIEIRA, B. D. A. Mancha-bacteriana do maracujazeiro (Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae): etiologia e estratégias de controle, 2009
31. ITOH, S., HONDA, H., TOMITA, F., & SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). **The Journal of antibiotics**, 24(12), 855-859, 1971.
32. JIANG, J., ZU, Y., LI, X., MENG, Q., & LONG, X. Recent progress towards industrial rhamnolipids fermentation: process optimization and foam control. **Bioresource technology**, 298, 122394, 2020.
33. JIBRIN, M. O., LIU, Q., JONES, J. B., & ZHANG, S. Surfactants in plant disease management: A brief review and case studies. **Plant Pathology**, 70(3), 495-510, 2021.
34. JACQUES, M. A., ARLAT, M., BOULANGER, A., BOUREAU, T., CARRÈRE, S., CESBRON, S & VERNIÈRE, C. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in Xanthomonas. **Annual review of phytopathology**, 54, 163-187, 2016.

35. KAWASAKI, H., SHIMANOUCI, T., & KIMURA, Y. Recent development of optimization of lyophilization process. **Journal of chemistry**, 2019.
36. KEMPNER, T. Análise funcional das ORFs XAC2361 e XAC3898 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* agente causal do cancro cítrico, 2018. Tese. Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal
37. KOCH, A. K.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 13, p. 4212-4219, 1991.
38. KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731-1737, 1992.
39. KUBICKI, S., BOLLINGER, A., KATZKE, N., JAEGER, K. E., LOESCHCKE, A., & THIES, S. Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. **Marine drugs**, 17(7), 408, 2019
40. LEGRAS, J. L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J. M.; KARST, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular ecology**, 16(10), 2091-2102, 2007.
41. LEYNS, F., DE CLEENE, M., SWINGS, J. G., & DE LEY, J. (1984). The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, 50(3), 308-356.
42. Li, Z., ZHANG, Y., LIN, J., WANG, W., & LI, S. High-yield di-rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its potential application in MEOR. **Molecules**, 24(7), 1433, 2019.
43. LIN, L. H., NTAMBO, M. S., ROTT, P. C., WANG, Q. N., LIN, Y. H., FU, H. Y., & GAO, S. J. (2018). Molecular detection and prevalence of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, in China. **Crop Protection**, 109, 17-23, 2018.
44. LOVAGLIO, R. B. Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista –UNESP. Rio Claro, 2011.
45. LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J; JAFELICCI Jr, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011.
46. LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology advances**, v. 33; p. 1715-1726, 2015.
47. LOVAGLIO, R.; SILVA, V.; CAPELINI, T.; EBERLIN, M.; HAUSMANN, R.; HENKEL, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipids Production by a *Pseudomonas aeruginosa*

- LBI Mutant: Solutions and Homologs Characterization. **Tenside Surf. Det.**, v. 51, p. 397-405, 2014.
48. MAIER, RAINA MARGARET; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2000.
 49. MAKKAR, RANDHIR S.; CAMEOTRA, SWARANJIT S.; BANAT, IBRAHIM M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.
 50. MARCHANT, R.; BANAT I. M. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology letters**, v. 34, p. 1597-1605, 2012.
 51. MARKANDE, A. R., PATEL, D., & VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, 330, 124963, 2021.
 52. MASSARI, C. A., & JÚNIOR, J. B. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo—Situação atual e contaminação em viveiros. **Citrus Research & Technology**, 27(1), 0-0, 2020.
 53. MILLER, JEFFREY H. Mutagenic specificity of ultraviolet light. **Journal of molecular biology**, v. 182, n. 1, p. 45-65, 1985.
 54. MOHANTY, S. S., KOUL, Y., VARJANI, S., PANDEY, A., NGO, H. H., CHANG, J. S., & BUI, X. T. (2021). A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial cell factories**, 20(1), 1-13, 2021.
 55. MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN. R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.**, v. 24, p. 509-515, 2006.
 56. MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids – next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 366–380, 2012.
 57. MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ. Pollution, Barking**, v. 133, p. 183-198, 2005.
 58. NETO, G. G., & FIGUEIRA, S. R. F. (2021). Maior dificuldade fitossanitária à produção da laranja no principal cinturão citrícola brasileiro-safras de 2017 a 2019. **Citrus Research & Technology**, 42, 1-10, 2021.
 59. NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Química nova, 25, 772-776, 2002.
 60. O cancro cítrico. Fundecitrus, 2022. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>. Acesso em: 15 de maio de 2023.

61. OCHSNER, U. A.; HEMBACH, T.; FIECHTER, A. Production of rhamnolipid biosurfactants. In **Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids** (pp. 89-118). Springer, Berlin, Heidelberg, 1995.
62. OCHSNER, U. A., KOCH, A. K., FIECHTER, A., & REISER, J. (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 176(7), 2044-2054, 1994.
63. Panorama da fruticultura no Estado de São Paulo. Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de São Paulo (FAESP), 2022. Disponível em: <<https://faespsenar.com.br/panorama-da-fruticultura-no-estado-de-sao-paulo/>>. Acesso em: 15 de maio de 2023.
64. PLATEL, R., LUCAU-DANILA, A., BALTENWECK, R., MAIA-GRONDARD, A., CHAVERIAT, L., MAGNIN-ROBERT, M., ... & SIAH, A. (2022). Bioinspired Rhamnolipid Protects Wheat Against *Zymoseptoria tritici* Through Mainly Direct Antifungal Activity and Without Major Impact on Leaf Physiology. **Frontiers in plant science**, 13, 2022.
65. POLTRONIERI, L. S., TRINDADE, D. R., DE ALBUQUERQUE, F. C., DUARTE, M., & POLTRONIERI, M. C. Doenças do maracujazeiro no Estado do Pará. **Revista Embrapa**, 2001.
66. RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis.** **Molecular. Microbiology.**, v. 40, p. 708–718, 2001.
67. RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; McCLEAN, S. Rhamnolipid biosurfactants production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. **Biotechnonology Progress**, v. 18, p.1277-1281, 2002.
68. RAYA, A., SODAGARI, M., PINZON, N. M., HE, X., ZHANG NEWBY, B. M., & JU, L. K. Effects of rhamnolipids and shear on initial attachment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in glass flow chambers. **Environmental Science and Pollution Research**, 17, 1529-1538, 2010.
69. REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L. H., HIRT, R.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 51(5), 985-989, 1986.
70. RISTAINO, J. B., ANDERSON, P. K., BEBBER, D. P., BRAUMAN, K. A., CUNNIFFE, N. J., FEDOROFF, N. V., ... & WEI, Q. (2021). The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 118(23), e2022239118, 2021.
71. ROBERT, M., MERCADE, M. E., BOSCH, M. P., PARRA, J. L., ESPUNY, M. J., MANRESA, M. A., & GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant

- production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, 11, 871-874, 1989.
72. ROSENBERG, M., GUTNICK, D., & ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS microbiology letters**, 9(1), 29-33, 1980.
 73. SALIBE, A. A., TEÓFILO SOBRINHO, J., & MÜLLER, G. W. Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra'. *Laranja*, 23(1), 231-245, 2002.
 74. SANTA ANNA, L. M. et al. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.
 75. SARAF, M., PANDYA, U., & THAKKAR, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological research**, 169(1), 18-29, 2014.
 76. SCHAAD, N. W., POSTNIKOVA, E., LACY, G., SECHLER, A., AGARKOVA, I. V., STROMBERG, P. E., ... & VIDAVER, A. M. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Papers in Plant Pathology*, 96, 2006.
 77. SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High Performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography**, v.693, p.7-13, 1995.
 78. SCHULTE, R. A. L. F., & BONAS, U. L. L. A. (1992). Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **Journal of Bacteriology**, 174(3), 815-823.
 79. SHALINI, D., BENSON, A., GOMATHI, R., HENRY, A. J., JERRITTA, S., & JOE, M. M. (2017). Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter* sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 11, 252-258, 2017.
 80. SIEGMUND, I; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Techniques**, v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.
 81. SILVA, M. D. S., BEDENDO, I. P., & CASAGRANDE, M. V. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, 33, 341-347, 2007.
 82. SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

83. SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology** (Timmis, K.N., ed.), p. 3705–3723, Springer–Verlag, 2010.
84. SOTIROVA, A., AVRAMOVA, T., STOITSOVA, S., LAZARKEVICH, I., LUBENETS, V., KARPENKO, E., & GALABOVA, D. The importance of rhamnolipid-biosurfactant-induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. **Current microbiology**, 65, 534–541, 2012.
85. STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of fermentation technology. **Elsevier**, 2013.
86. STARR, M. P. The genus *Xanthomonas*. In *The prokaryotes* (pp. 742–763). **Springer**, Berlin, Heidelberg, 1981.
87. SUN, H., WANG, L., NIE, H., DIWU, Z., NIE, M., & ZHANG, B. (2021). Optimization and characterization of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* NY3 using waste frying oil as the sole carbon. **Biotechnology Progress**, 37(4), e3155, 2021.
88. TAHZIBI, A.; KAMAL, F; MAZAHARI, ASADI, M. **Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant**. 2004.
89. TIMILSINA, S., POTNIS, N., NEWBERRY, E. A., LIYANAPATHIRANAGE, P., IRUEGAS-BOCARD, F., WHITE, F. F., ... & JONES, J. B. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, 18(8), 415–427, 2020.
90. VAN GENNIP, Maria et al. Inactivation of the *rhIA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. **Apmis**, v. 117, n. 7, p. 537–546, 2009.
91. YOCHIKAWA, J. T. H. Avaliação da atividade anti-*Xanthomonas citri* de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro.
92. ZHANG, Q.; JU, L.K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of β -glucosidase from cellulase enzyme mixture. **Enzyme Microbial Technology**, v. 48, p. 175–80, 2011.
93. ZHANG, M. Y., HONG, D. K., CHEN, Y. H., GAO, S. J., FU, H. Y., ZHENG, H. K., ... & WANG, J. D. Synergistic Effects of Organosilicon and Cu (OH) 2 in Controlling Sugarcane Leaf Scald Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(21), 13532, 2022.
94. ZHANG, Y., CALLAWAY, E. M., JONES, J. B., & WILSON, M. (2009). Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. **European journal of plant pathology**, 124, 379–390, 2009.

95. ZHU, L., YANG, X., XUE, C., CHEN, Y., QU, L., & LU, W. Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. **Bioresource technology**, 117, 208-213, 2012.