



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



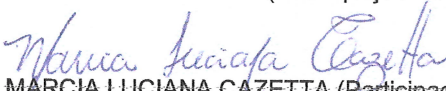
Documento assinado digitalmente

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 ramnolípídeo	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 ramnolípídeos.....	29
4.3.1 Produção em frascos.....	30
4.3.2 Extração de ramnolípídeo	30
4.3.2.1 Extração bruta do óleo residual	30
4.3.2.2 Extração de ramnolípídeo da amostra.....	31
4.3.2.3 Extração de ramnolípídeo 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</i> subsp. <i>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).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a capacidade de inibição do crescimento de cepas de bactérias do gênero *Xanthomonas spp.* através do uso de RL, utilizando para isso testes *in vitro* e *in vivo*. Ademais, o estudo trata sobre a produção de RL e como as diferentes condições influenciam na sua concentração.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Extração e caracterização do RL produzido;
- ✓ Verificar a concentração necessária do RL em solução para que ocorra a inibição do crescimento das bactérias, ou a concentração letal para esses microrganismos;
- ✓ Estudo *in vivo* das plantas cultivadas em estufa;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* foi observado primeiramente em 1881 por Wakker, após descobrir esses microrganismos em doenças comuns de jacintos. Logo após sua descoberta, inúmeros estudos de doenças que acometiam plantas começaram a ser realizados, aumentando o conhecimento sobre esse clado de microrganismos e culminando assim em sua classificação (STARR *et al.*, 1981).

Seu habitat natural é, especificamente, em lesões de plantas infectadas, e pode ser encontrada também em plantas próximas às doentes e que estejam assintomáticas. Outro local comum é em material residual de biomassa, sendo extremamente rara a ocorrência de grande quantidade desses microrganismos no solo (JACQUES *et al.*, 2016).

Por outro lado, a espécie *Xanthomonas campestris* é utilizada em larga escala na indústria para a produção de goma xantana, que é um exopolissacarídeo produzido por essa bactéria que tem propriedades espessantes, dessa forma sendo utilizada majoritariamente na indústria alimentícia (JACQUES *et al.*, 2016).

Atualmente não existe um meio eficaz no combate a esse microrganismo, sendo o controle geralmente realizado por meio da remoção física das partes acometidas da planta afetada, ou sua completa remoção junto com os indivíduos próximos a ela. Muitas vezes ocorre uma rápida e enorme disseminação desse patógeno, sendo necessária a remoção de grandes áreas cultivadas e sua subsequente incineração causando prejuízos enormes para agricultores e para os diversos setores envolvidos, tais como usinas de álcool e açúcar, manufaturas de suco de laranja bruto, e até mesmo cooperativas e de vendas de produtos alimentícios (LEYNS *et al.*, 1984).

3.1.1 *Xanthomonas euvesicatoria*

A espécie *X. euvesicatoria* é conhecida por causar doenças no tomate e na pimenta, causando perda de produção e aversão à compra do produto quando visualizado nas prateleiras. Sua patogenicidade está relacionada com a expressão do gene *hrp* quando a bactéria encontra o hospedeiro viável, sendo de difícil eliminação para os produtores, uma vez que os métodos normalmente utilizados não são eficazes no controle desse patógeno (ZHANG *et al.*, 2009). A seguir, figura 1 mostrando a doença causada pela *X. euvesicatoria* em folhas de tomateiro.

Figura 1: Características das lesões causadas pela bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* nas folhas do tomateiro.



Fonte: DA SILVA *et al.*, (2021).

Uma alternativa ao uso dos compostos normalmente utilizados na agricultura podem ser os biossurfactantes, pois estes apresentam propriedades de interação com membrana que podem ser exploradas para ser um possível antibiótico. O ramnolipídeo pode ser enquadrado nesse quesito, uma vez que, possui propriedades de membrana e é um biossurfactante. Dito isto, pode ser usado para o tratamento da *X. euvesicatoria* e possibilitar uma nova forma de manejo para os produtores (JIBRIN *et al.*, 2021).

3.1.2 *Xanthomonas albilineans*

A espécie *X. albilineans* é conhecida por causar doenças na cana-de-açúcar, acometendo todas as espécies do gênero *Saccharum spp.* e causando a escaldadura da folha, doença esta, que prejudica a produção da sacarose devido a menor capacidade fotossintética dos indivíduos acometidos por essa enfermidade, resultando em perdas substanciais para as regiões produtoras. Como boa parte da produção de cana-de-açúcar vem do mundo tropical, há pouca literatura relacionada a estudos que possam vir a desenvolver técnicas e tratamentos eficazes, principalmente devido ao fato de essa doença causar diferentes estragos em diferentes variedades de cana-de-açúcar (SILVA, BEDENDO, & CASAGRANDE, 2007). A seguir, figura 2 mostrando a doença causada pela bactéria.

Figura 2: Escaldadura da cana-de-açúcar, doença esta causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*. A: Planta no início dos sintomas; B: Planta com a doença desenvolvida.



Fonte: LIN, L. H *et al.*, (2019). Modificado pelo autor.

Atualmente, há diversos estudos que sugerem o tratamento da escaldadura da cana com o uso de nanopartículas de cobre contendo organosiliconados em seu interior. No entanto, não é possível controlar de forma satisfatória a doença em toda a área cultivada, uma vez que, a bactéria pode ficar por um período não mostrando sintomas, ou então, os sintomas característicos serem confundidos com deficiências de minerais ou estresse hídrico, resultando em um controle pouco eficaz da doença. Regiões produtoras de cana-de-açúcar, tais como o Brasil, China, Índia e alguns países da África, necessitam de encontrar uma forma de melhorar o manejo e uma das alternativas para isso é fazer o uso de biossurfactantes (ZHANG *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes são uma alternativa viável para a aplicação em cultivos agrícolas, pois estes mostram efeito antibiótico ou bacteriostático contra diversos microrganismos (SARAF, PANDYA & THAKKAR, 2014), apresentando assim um ótimo potencial contra a *Xanthomonas albilineans* e um possível método de controle para essa praga.

3.1.3 *Xanthomonas passiflorae*

A bactéria *Xanthomonas passiflorae* é conhecida por causar doença no maracujá, afetando diversas espécies do gênero *Passiflora spp.*, doença esta, nomeada de bacteriose. A *Xanthomonas passiflorae* é transmitida principalmente por meio de sementes infectadas, água de irrigação contaminada, insetos e ferramentas agrícolas contaminadas. Condições favoráveis, como alta umidade e temperatura, favorecem o desenvolvimento da doença. É conhecida por

causar lesões internas nas folhas da planta, bem como causar manchas escuras nos frutos, resultando em diminuição na produtividade e perda na qualidade final dos produtos. A seguir, figura 3 mostrando as lesões causadas pela bactéria (ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009).

Figura 3: Lesões provocadas pela bactéria *Xanthomonas passiflorae* nas folhas e no fruto do maracujá-azedo.



Sintomas da mancha-bacteriana em folhas de maracujazeiro-azedo.



Sintoma da mancha-bacteriana em fruto de maracujazeiro-azedo

Fonte: ISHIDA, & HALFELD-VIEIRA, (2009). Modificado pelo autor.

Atualmente, o controle é feito através do uso de defensivos agrícolas, tais como, o Mycoshield, que é produzido e comercializado pela Nufarm, empresa sediada nos Estados Unidos da América, que em tese é um fungicida, mas que pode ser utilizado para o controle da *Xanthomonas passiflorae* e a Agrimicina que é um antibiótico razoavelmente eficaz no tratamento. No entanto, existem estudos que relacionam esses defensivos com a bioacumulação do composto, fazendo-se necessário o descobrimento de novos produtos menos tóxicos que possam ser usados no controle desta bactéria (POLTRONIERI *et al.*, 2001).

As áreas de maior produção de maracujá são as que estão próximas à linha do equador, com enfoque para o Estado do Pará, que abrange quase que a totalidade da produção nacional (POLTRONIERI *et al.*, 2001). O problema dessa região é em relação às condições, estas que, apresentam temperatura e umidade elevadas durante todo o ano, criando um ambiente propício

para o desenvolvimento da bactéria, necessitando da busca de novos métodos de controle e eliminação da doença (ARRIFANO, 2019).

3.1.4 *Xanthomonas citri* subs. *citri*

A *Xac* é conhecida por causar o cancro cítrico, doença esta que causa lesões necróticas nas folhas, caule, raiz e fruto da laranjeira (*Citrus sinensis*), diminuindo a produtividade e causando grandes prejuízos aos produtores, bem como para a economia do país, uma vez que, o Brasil e em especial, o Estado de São Paulo são os maiores exportadores mundiais de cítricos e seus derivados (FAESP, 2022).

Atualmente, o único método de controle dessa doença é através da remoção mecânica das plantas infectadas e das ao entorno, e sua subsequente incineração, ocasionando grandes perdas para a agricultura. Os defensivos agrícolas normalmente utilizados não são eficazes em combater a *Xac*, sendo necessário o uso de novas metodologias e novos compostos que consigam impedir o desenvolvimento e remediar as plantas já doentes, com objetivo de controlar a doença. A seguir figura 4 mostrando as manchas necróticas nas folhas e fruto da laranjeira (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Figura 4: Lesões causadas pela *Xac* nas folhas e nos frutos da laranjeira.



Fonte: Fundecitrus, 2022.

3.2 Biossurfactantes

Os BS são compostos sintetizados por microrganismos com propriedades semelhantes aos surfactantes de origem química, no entanto, apresentam diversas vantagens em relação a esses, sendo substâncias que possuem biodegradabilidade, estabilidade térmica, baixa toxicidade quando descartados na natureza, eficiência em uma faixa ampla de pH e, por fim, são produzidos a partir de fontes renováveis, tais como óleos usados, glicerol residual (NITSCHKE, PASTORE, 2002). (MARKANDE, A. R., PATEL, D., & VARJANI, S, 2021).

Apesar de suas propriedades químicas garantirem uma vasta aplicação da substância, a mais explorada é seu caráter anfipático, o que garante a solubilização em soluções hidrofílica e hidrofóbicas. Devido a isso, existem diversas aplicações industriais para os BS, podendo ser utilizados em dispersão de fases, detergentes, produtos de beleza e higiene pessoal, biorremediação, síntese de nanopartículas e possivelmente como antibióticos de alguns tipos de microrganismos (MARCHANT & BANAT, 2012).

A ampla utilização desses compostos ainda não é possível devido ao seu elevado custo de produção em relação aos surfactantes químicos, os quais possuem um custo muitas vezes menor que o surfactante de origem microbiana. Devido a esse fato, a indústria e a ciência buscam atualmente maneiras de aumentar a produtividade de bactérias produtoras de BS com a finalidade de reduzir seu custo de produção. Outra abordagem para o problema é a utilização de substratos mais baratos, ou que sejam resíduos, dessa forma elevando o produto a patamares competitivos no mercado. Existem algumas outras estratégias, tais como: o aperfeiçoamento do método fermentativo e a produção de linhagens de bactérias recombinantes, mas que ainda se encontram em desenvolvimento, fazendo-se necessário mais estudos que auxiliem na elucidação de métodos de produção mais eficientes (MUKHERJEE, DAS, SEN, 2006).

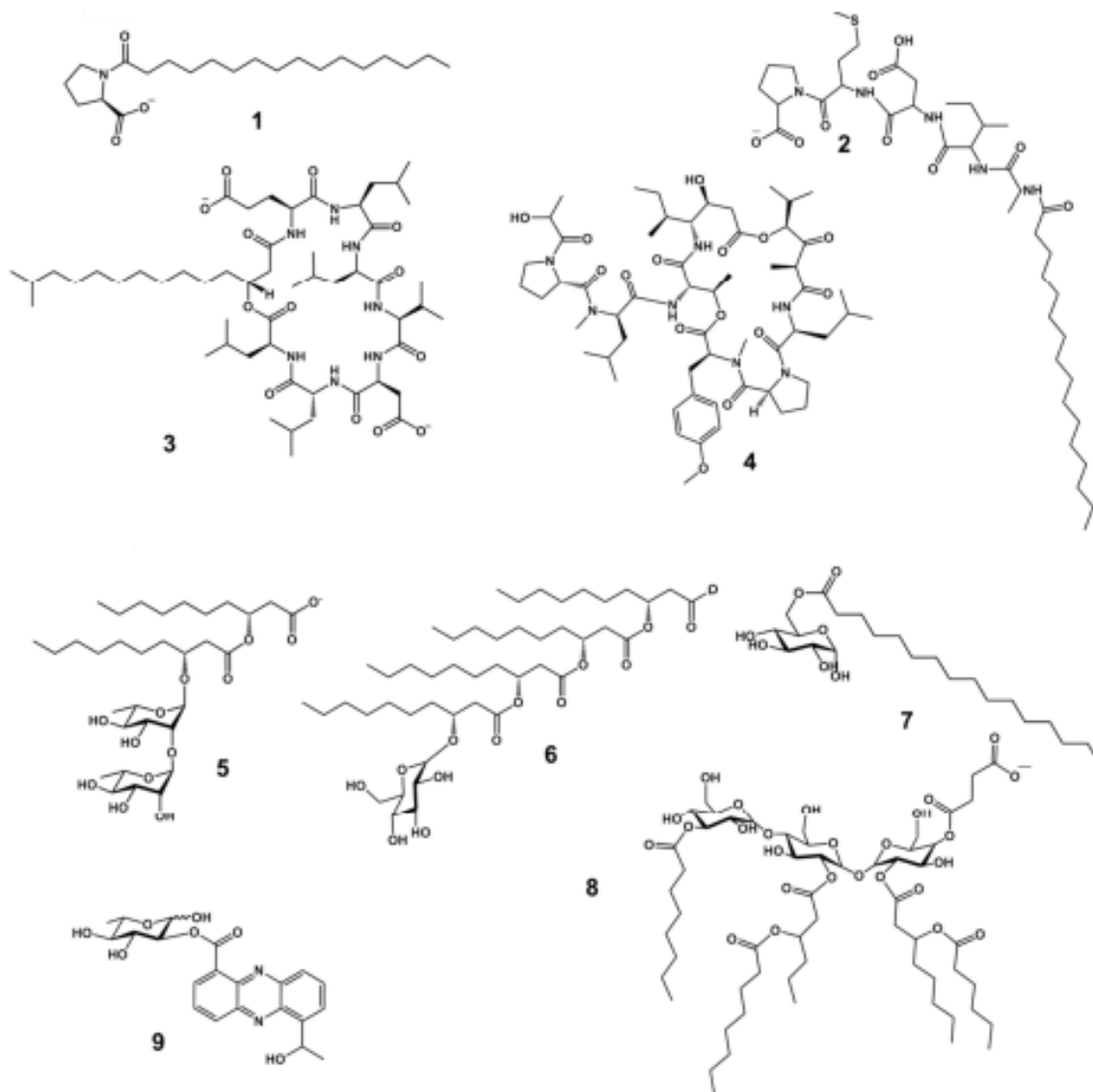
3.2.1 O ramnolípídeo

O RL é uma substância produzida por algumas bactérias, geralmente do gênero *Pseudomonas spp.*, sendo sua funcionalidade desconhecida, sendo que, alguns autores relacionam a produção do RL e demais BS, a um favorecimento na colonização de nichos ecológicos que estejam contaminados por hidrocarbonetos, tais como locais em que há derramamento de petróleo ou em ambientes bastante oligotróficos. Outra função importante, poderia estar relacionada com atividades antimicrobiana, o que poderia favorecer a eliminação dos competidores do local, sendo essa uma hipótese ainda pouco explorada (HENKEL *et al.*, 2012) (MOHANTY *et al.*, 2021).

3.2.2 Estrutura dos biossurfactantes

Usualmente os BS são classificados de acordo com seu grupo bioquímico, no entanto, estes também podem ser classificados através de sua massa molar, sendo os de menor tamanho representados pelos glicolipídeos, lipopeptídeos e flavolipídeos, enquanto os de maior tamanho retratados pelos polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (KUBICKI *et al.*, 2019). Essas características referentes a sua massa, garantem aos BS diferentes propriedades de interação com outras moléculas, sendo os de menor massa molar melhores em interações de superfície, enquanto os de alta massa molar melhores em atividades de emulsificação (SMYTH *et al.*, 2010).

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.



Fonte: KUBICKI *et al.*, (2019). Modificado pelo autor

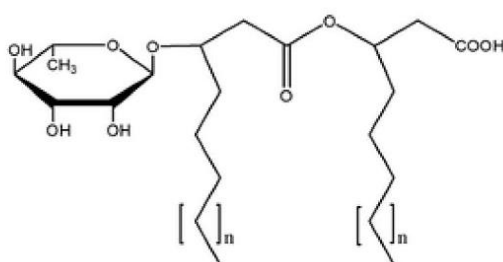
Diversos microrganismos produzem BS, no entanto os glicolipídeos são os que apresentam maior potencial financeiro e de utilização, sendo os mais pesquisados e patenteados atualmente. (MULLER *et al.*, 2012). Dentro dos glicolipídeos, os que mais se destacam são os RL, dessa forma a molécula apresenta boa compreensão por parte da comunidade científica e há registros de usos industriais atualmente. No entanto, ainda há necessidade de aumentar a quantidade produzida e de reduzir os custos de produção para que seja possível sua utilização em larga escala (MULLER *et al.*, 2012).

Os RL produzido por *Pseudomonas aeruginosa* podem ser encontrados de diversas maneiras, sendo quatro os congêneres mais estudados, representados pelas siglas RL1 (Rha2-C₁₀-C₁₀), RL2 (Rha-C₁₀-C₁₀), RL3 (Rha2-C₁₀) e RL4 (Rha-C₁₀) (LANG; WAGNER, 1987). As diferentes estruturas químicas das moléculas irão influenciar diretamente nas propriedades dos BS, sendo que, a concentração de cada um dos congêneres irá destacar o produto de alguma forma, podendo ser para emulsificação ou para a redução da tensão superficial, por exemplo. A quantidade produzida de cada congênere é influenciada pela cepa bacteriana, pelas condições de cultivo e pela composição do meio no qual os microrganismos foram inseridos (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIECHTER, 1984) (ESLAMI, P., HAJFARAJOLLAH, H., & BAZSEFIDPAR, S, 2021).

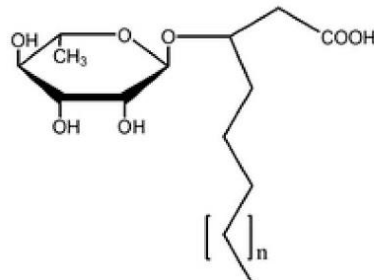
Figura 6: Congêneres de ramnolipídeos

Mono-rhamnolipids

Mono-rhamno-di-lipid

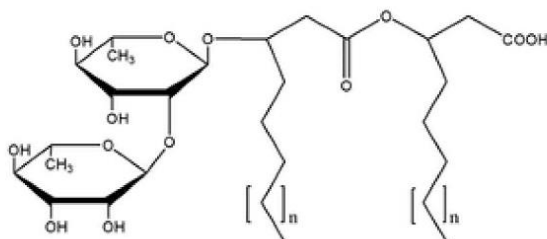


Mono-rhamno-mono-lipid

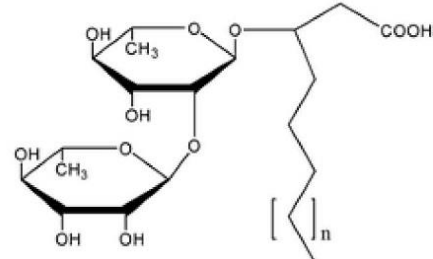


Di-rhamnolipids

Di-rhamno-di-lipid



Di-rhamno-mono-lipid



Fonte: ESLAMI, P., HAJFARAJOLLAH, H., & BAZSEFIDPAR, S, (2021).

3.2.3 O bioprocesso

O uso de materiais de baixo custo para a produção de BS se torna extremamente vantajoso do ponto de vista econômico e ambiental, devido a enorme quantidade de matéria prima residual existente na agroindústria e que de outra forma seria descartada na natureza ou envolveria um custo elevado para neutralização desse material. Os produtos de baixo custo mais utilizados para a fermentação são óleos de origem vegetal, seja limpo ou queimado, e glicerol bruto proveniente principalmente da produção de biodiesel (AMARAL *et al.*, 2009). No entanto, as fontes de carbono podem ser extremamente variáveis e versáteis, uma vez que a *P. aeruginosa* pode utilizar uma grande variedade de hidrocarbonetos de diferentes fontes (ARINO, MARCHAL & VANDECASTEELE, 1996).

A produção de RL é influenciada diretamente pelo pH, aeração, agitação, temperatura, limitações nutricionais, formação de espuma e pela fonte de carbono utilizada, onde as variações nessas condições são modelos de estudo para elevar-se a eficiência produtiva do processo. Em valores absolutos, a temperatura ótima para o crescimento da *P. aeruginosa* é de 37°C e o pH ótimo é de 6,5 com queda acentuada na produção quando esse se aproxima de 7,0 (GUERRA-SANTOS; KAPELLI; FIECHTER., 1984) (ZHU *et al.*, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia a ser descrita no presente trabalho é baseada nos estudos realizados por Lovaglio (2011), a qual desenvolveu uma série de etapas e processos relacionados à produção de RL que mostraram-se altamente eficaz, tanto nas etapas de produção e fermentação, quanto na de extração, purificação e caracterização. A metodologia utilizada para testes *in vitro* e *in vivo* foi retirada de diversos artigos e publicações disponíveis na literatura, sendo citados posteriormente nos tópicos específicos.

4.1 Microrganismo

O microrganismo produtor de RL utilizado foi a *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 obtido por Lovaglio e colaboradores (2011). A cepa encontrava-se armazenada em freezer -80°C e foi reativada e passou por processos fermentativos para a produção de RL. A reativação das bactérias ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20% de meio lisogênico e aproximadamente 100 µL da solução criogênica onde se encontrava estocada a bactéria. No presente estudo foram usadas diferentes espécies do gênero *Xanthomonas spp.* as quais foram cedidas pela Professora Doutora Daiane Cristina Sass, que coordena o Laboratório de Química e Biotecnologia Microbiana (LaQBiM), as quais estavam armazenadas em condições iguais às citadas para a *P. aeruginosa* LBI 2A1. Tais bactérias foram utilizadas para verificar a ação antimicrobiana do RL.

4.2 Meios de cultura

O meio de crescimento da *P. aeruginosa* é chamado de Luria–Bertani (LB) e é composto por 5 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g.L⁻¹ de cloreto de sódio (BERTANI *et al.*, 1951). É utilizado para reativação da bactéria e para crescimento de maneira geral.

O meio mineral com tampão fosfato (MTF) foi utilizado para o preparo do inóculo das fermentações, enquanto o meio mineral (MN) foi utilizado para a produção de ramnolipídeos. A composição dos meios é apresentada na tabela 2.

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; FeCl₃ 6H₂O – 0,28; ZnSO₄ 7H₂O – 0,87; CaCl₂ 6H₂O – 1,2; CuSO₄ 5H₂O – 1,2; MnSO₄ H₂O – 0,8.

<i>Composição</i>	<i>MTF</i>	<i>MN</i>
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
KCl	0,1 g.L ⁻¹	1,0 g.L ⁻¹
NaNO ₃	1,5 g.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	-	0,3 g.L ⁻¹
Elementos Traços*	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹
Fonte de Carbono	5 g.L ⁻¹	50 g.L ⁻¹

Fonte: LOVAGLIO *et al.* (2011).

4.2.1 Meios de cultivo para *Xanthomonas*

4.2.1.1 Meio de cultivo para *X. euvesicatoria*, *X. citri* e *X. passiflorae*

O meio de cultivo para as espécies *X. euvesicatoria*, *X. citri* e *X. passiflorae* é composto por 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica e 20 g.L⁻¹ de glicerol e é chamado de NYG (SCHULTE & BONES, 1992), sendo substâncias estas, relacionadas com a oferta de proteínas e carboidratos (glicerol).

4.2.1.2 Meio de cultivo para *X. albilineans*

O meio de cultivo para a espécie *X. albilineans* é chamado de YSG (BIRCH & PATIL, 1987) e é composto por 5 g.L⁻¹ de glucose de milho, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 0A seguir, tabela contendo a composição exata do meio.

4.3 Produção de ramnolipídeos

A produção de RL foi iniciada com a reativação da *Pseudomonas aeruginosa* em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 de meio LB que foi incubada em mesa agitadora por 24 horas com agitação de 200 RPM. Após o crescimento, foi transferido uma alíquota de 10% da quantidade final de meio MTF (90mL de MN e 10mL de caldo cultivado), deixando em crescimento por um período de 48h. Importante ressaltar que nessa etapa de passagem para o meio MTF há adição da fonte de carbono a ser usada na fermentação, sendo nesse caso o óleo de girassol à uma concentração de 20% do volume final do meio.

Por fim, foi transferido o meio MTF cultivado para o meio MN, sempre na proporção de 10%. O processo fermentativo ocorreu por 120 horas e houve extração de amostras a cada 24 horas.

De cada amostra foi extraído biomassa bacteriana, RL e óleo residual. Dito isso, o processo teve início com a retirada de alíquotas de 5 mL, os quais foram centrifugados para remoção da biomassa. Em seguida ao sobrenadante foi adicionado n-hexano 1:1(v/v) para remoção do óleo residual. Após a remoção, o restante do caldo foi processado para extração do RL, processo este, que teve início com adição de acetato de etila.

4.3.1 Produção em frascos

A produção ocorreu em Erlenmeyes de 1000 mL contendo aproximadamente 20 – 25% de meio de cultivo LB e foi realizada em 72 horas, pois como é descrito por Lovaglio *et al.* (2011), é o pico de produção, possibilitando maior concentração de RL. Os frascos ficaram em incubadora shaker com uma agitação de 200 RPM e temperatura de 37 °C.

4.3.2 Extração de ramnolipídeo

Em cada Erlenmeyer foi adicionado n-hexano no volume 1:1, seguido de agitação das amostras por 1 minuto e posterior centrifugação a 10000 RPM, temperatura de 4 °C por 10 minutos para que ocorresse a separação de fases.

Para a extração do biotensioativo foi utilizado acetato de etila na proporção 1:1,25 (v/v). O procedimento continua com a centrifugação a 10000 RPM, temperatura de 4°C durante 10 minutos. Por fim, após extração com acetato de etila, por duas vezes foi retirada a fase superior para evaporação do solvente e obtenção do ramnolipídeo. A evaporação ocorreu em estufa a vácuo, com uma temperatura máxima de 40 °C.

4.3.2.1 Extração bruta do óleo residual

O processo tem início com a adição de n-hexano na proporção 1:1(v/v), sendo utilizado 1000 mL de caldo fermentado livre de células e 1000 mL de n-hexano. Em seguida a mistura passou por agitação manual por 10 minutos com o objetivo de extrair completamente o óleo residual da amostra.

O processo ocorreu em funil de separação, onde há ocorrência de duas fases, sendo a inferior composta pelo caldo fermentado, que contém o RL e a superior composta por n-hexano e óleo de girassol residual.

4.3.2.2 Extração de ramnolipídeo da amostra

A fase inferior obtida na etapa anterior foi removida e separada para a extração final do RL do caldo fermentado, sendo esse processo realizado com a adição de acetato de etila na proporção de 1:1,25 (v/v). No presente estudo utilizou-se de 1000 mL de caldo fermentado e de 1250 mL de acetato de etila para a extração do RL.

A extração ocorreu por meio de agitação mecânica manual de um funil de separação contendo a mistura citada acima, por um período de aproximadamente 10 minutos. Por fim, a mistura foi mantida em repouso por três dias, com o objetivo de completa separação das fases e consequente migração do RL para a parte contendo o acetato de etila.

4.3.2.3 Extração de ramnolipídeo do acetato de etila

A solução presente no funil de separação mencionado na etapa anterior foi então dividida, sendo a parte inferior descartada e a superior armazenada para remoção total do RL. O processo ocorreu com o uso do rotaevaporador, calibrado para uma rotação mínima e em temperatura de 40 °C. O acetato de etila foi quase completamente evaporado, restando apenas o biossurfactante e uma quantidade mínima do solvente. A solução restante foi acondicionada em frasco para posterior secagem ao final do processo.

4.3.2.4 Secagem final do ramnolipídeos

Esta etapa constituiu em acondicionar o RL contendo resíduo de acetato de etila em recipiente próprio (Falcon, frasco âmbar, etc.) e deixar em estufa com temperatura ajustada para 40 °C com o objetivo de evaporar todo o acetato restante. O processo pode ser auxiliado com o uso de vácuo para redução do tempo de evaporação.

Ao final do processo obteve-se uma substância oleosa e com odor característico de ácidos graxos que consiste basicamente em RL. No entanto, ainda podem haver algumas impurezas na substância, mas nada considerado significativo. Todavia, com o intuito de reduzir a quantidade de impurezas, o processo de extração do RL foi repetido, ou seja, adicionou-se novamente a quantidade de 1250 mL de acetato de etila e repetida esta mesma etapa.

4.4 Caracterização e quantificação do ramnolipídeo.

4.4.1 Derivatização

O processo de derivatização tem como propósito gerar um composto passível de detecção pelo Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC). Dessa forma, foi aplicada

a metodologia de Schenk e colaboradores (1995) para a correta identificação pelo detector de luz ultravioleta (UV) do HPLC.

Primeiramente, as amostras contendo o RL e acetato de etila foram evaporadas em estufa a uma temperatura de 40 °C. Em seguida foi feita a adição de 360 µL de acetonitrila e 40 µL de uma solução 1:1 (v/v) de brometo de 4-bromofenacil 40 mM e Trietilamina 20 mM, estes em solução de acetonitrila. Por fim, foi realizado o aquecimento e agitação em um Termomixer (Termomixer comfort, Eppendorf AG), com parâmetros de 1400 RPM, 60 °C por um período de 1,5 horas.

4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

As amostras derivatizadas (Item 4.4.1) foram analisadas em HPLC para determinação da quantidade de RL produzido. O equipamento utilizado foi o HPLC Shimadzu acoplado a um detector UV para a detecção do composto (MÜLLER et al., 2010).

Para as análises foi utilizada uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC18, Supelco - 150 mm x 4.6 mm, 5 µm sílica gel) a 30 °C. As fases móveis do sistema foram: Solução A, esta com 5% de metanol e Solução B esta com 95% de metanol, sendo que a porcentagem restante é de água ultrapura em ambas as soluções.

4.4.3 Quantificação por peso

Após a total evaporação do acetato de etila, o RL restante foi acondicionado em tubos Falcon de 50 mL e em seguida foi pesado para verificação total de massa, sendo essa análise uma outra forma de medição da quantidade total produzida do composto. Os tubos Falcon foram previamente pesados com o objetivo de aferir a sua massa sem a presença do RL.

4.5 Ramnolipídeo e inibição da *Xanthomonas spp.*

4.5.1 Atividade antimicrobiana do ramnolipídeo *in vitro*

A atividade antimicrobiana do RL foi testada primeiramente em placas de Petri contendo diferentes espécies de *Xanthomonas spp.* com o objetivo de averiguar a resposta inibitória do crescimento dessas bactérias quando expostas ao biossurfactante (YOCHIKAWA, 2016). Foram aplicadas diferentes concentrações do RL e as que obtiveram melhores resultados inibitórios, foram usada posteriormente em etapas *in vivo*.

4.5.1.1 Preparo das soluções com ramnolípídeo

O preparo das soluções se deu através da pesagem do RL bruto para atingir as concentrações desejadas para o experimento. Foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) para aumentar o potencial hidrogeniônico (pH) da solução objetivando auxiliar na dissolução do RL em água com maior facilidade. Posterior à dissolução, o pH foi novamente ajustado para 6,8 para obter-se potencial semelhante ao meio de cultivo sem a adição de nenhuma outra substância.

4.5.1.1 Concentrações de ramnolípídeo aplicadas

No presente estudo, foram aplicadas diferentes concentrações de RL com o objetivo de verificar a inibição do crescimento das bactérias do gênero *Xanthomonas spp.* sendo necessário adaptações às condições impostas pelas bactérias ao longo do trabalho. As principais concentrações utilizadas foram de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1 mg.L^{-1} , 2 mg.L^{-1} e 2 g.L^{-1} de RL em meio de cultivo. As três primeiras concentrações foram estudadas por Yochikawa (2016). Já a última concentração (2 g.L^{-1}) foi escolhida por ser 1000x mais concentrada que a máxima utilizada por Yochukawa. Foi decidido usar 400 mg.L^{-1} , 600 mg.L^{-1} , 700 mg.L^{-1} e 800 mg.L^{-1} , com base nos resultados obtidos após os primeiros testes de inibição.

4.5.2 Atividade antimicrobiana do ramnolípídeo *in vivo*

Os testes ocorreram em espécimes germinados de *Citrus sinensis* (laranja-pêra) , os quais foram contaminados com Xac, através do borrifamento de meio cultivado com Xac, sendo avaliada a capacidade de controle microbiano do RL, este que, foi aplicado também através de borrifamento nas concentrações definidas nos testes *in vitro*. O teste ocorreu com plantas contaminadas e tratadas com o BS, e por fim, houve o controle, sendo um contaminado e outro não contaminado (SHALINI *et al.*, 2017).

4.6 Teste de hidrofobicidade de Rosenberg

O teste de hidrofobicidade de Rosenberg consiste em analisar a interação das membranas celulares e o meio que está ao entorno da mesma, sendo eficiente para aferir a capacidade de uma membrana em se ligar com algum outro determinado composto (ROSENBERG, M., GUTNICK, D., & ROSENBERG, E, 1980). Dessa forma foi utilizado a metodologia para verificar a capacidade de ligação do RL à membrana da Xac, no entanto esta teve adaptações para a metodologia descrita por Ceresa e colaboradores (2021), no qual, os

autores desenvolveram uma fórmula capaz de relacionar a quantidade de composto que teve interação com a hidrofobicidade.

O processo tem início com o preparo do meio NYG líquido para o crescimento da Xac, este é adicionado em Erlenmeyer de 125 mL e incubado em mesa agitadora por um período de 48 horas, com 30°C de temperatura e uma agitação de 200 RPM. São então preparados tubos Falcon de 50 mL e adicionado à essa solução PBS (tampão fosfato-salino). Em seguida, ocorre a adição de meio NYG cultivado até atingir um patamar de densidade óptica (D.O) de 0,5 à 600 nm de espectro de onda. Nos Falcons de teste é adicionado RL para atingir uma concentração de 0,7 g.L⁻¹ e também são mantidos frascos sem adição do BS para servir de controle.

Após esse processo, os Falcons contendo RL são incubados por 1 hora em uma agitação de 150 RPM. Amostras são retiradas antes da incubação para teste controle. Após a agitação, ocorre a centrifugação (150 RPM e 15 minutos) para coleta de células bacterianas. As células são ressuspensas em tampão PUM, sendo a composição do tampão citada na tabela a seguir.

Tabela 2: Composição do tampão PUM, segundo Ceresa e colaboradores (2021).

<i>COMPOSTO</i>	<i>YSG</i>
K₂HPO₄.3H₂O	22,2 g.L ⁻¹
KH₂PO₄	7,26 g.L ⁻¹
MgSO₄.7H₂O	0,2 g.L ⁻¹
Ureia	1,8 g.L ⁻¹

Fonte: Ceresa *et al.*, (2021). Modificado pelo autor.

Após esse processo, adiciona-se 1 mL de hexadecano à 4 mL da suspensão de células, agita-se em vortex por 2 minutos e permanece em repouso por 10 minutos. Por fim, a D.O é feita a partir da suspensão inicial de células e da fase aquosa formada após a adição do hexadecano. Utiliza-se a seguinte fórmula para calcular a porcentagem de adesão à membrana celular:

$$\left(1 - \frac{D.O \text{ Fase Aquosa}}{D.O \text{ Suspensão Inicial de Célula}}\right) \times 100$$

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram realizadas leituras em microscópio eletrônico de varredura (MEV), com objetivo de visualizar a membrana celular e se havia alguma modificação em sua estrutura. Para tal, foi utilizado o MEV pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura - Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) na cidade de Piracicaba-SP.

O procedimento ocorreu inicialmente realizando inóculos em meio NYG com ágar, com a presença de RL na concentração inibitória mínima de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e na ausência do composto, depositado em cima de uma lamínula de vidro de 12 mm de diâmetro. Após o período de crescimento da Xac (aproximadamente 48 horas), as lamínulas foram submetidas à uma deposição de ósmio, com o objetivo de fixar as células para fazer a leitura. Após o procedimento, foi realizada a secagem em pote vedado contendo sílica em gel e por fim, a desidratação foi concluída em estufa com uma temperatura de 40°C .

Após estes procedimentos, as amostras foram submetidas à metalização por deposição de ouro, criando uma camada de aproximadamente 20 nm de ouro, recobrimdo toda a superfície de contato. As amostras então foram analisadas no MEV, configurado com 20 KV e uma corrente de 150 pA. As imagens obtidas foram de diferentes aumentos.

Foi realizado outro método de desidratação com etanol. O procedimento consiste em imergir as lamínulas com as amostras em concentrações crescentes de etanol por um período de 14 minutos, sendo as referidas concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, esta última sendo utilizada duas vezes para promover uma desidratação completa das amostras. Após esse procedimento foi utilizado o Ponto Crítico, que consiste em fazer uma desidratação profunda utilizando para isso CO_2 líquido à altíssima pressão (aproximadamente 100 PSI).

Por fim, foram realizadas novas análises no MEV, no entanto, dessa vez foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESPetro - Centro de Pesquisa em Ciências Naturais Aplicadas, vinculado aos Instituto de Geociências e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro - SP. Dessa vez a desidratação das amostras foi realizada através do calor, fixando as bactérias e o biofilme nas lamínulas de maneira semelhante à fixação para realização de técnica de Gram.

A deposição de ouro ocorreu em metalizador Leica, modelo EM ACE200, aplicando uma camada de aproximadamente 5 nm de ouro, em um período de 5 minutos, sendo o metalizador inicialmente operado à vácuo e depois preenchido com argônio. Após a metalização, foi utilizado um MEV de alto vácuo, preenchido com nitrogênio, sendo o

equipamento do modelo Zeiss EVO MA15. Foram utilizados uma tensão de 20 quilovolt (kV) e uma corrente de 25 pA para visualização mais precisa em relação à camada de ouro aplicada.

4.8 Análises estatísticas

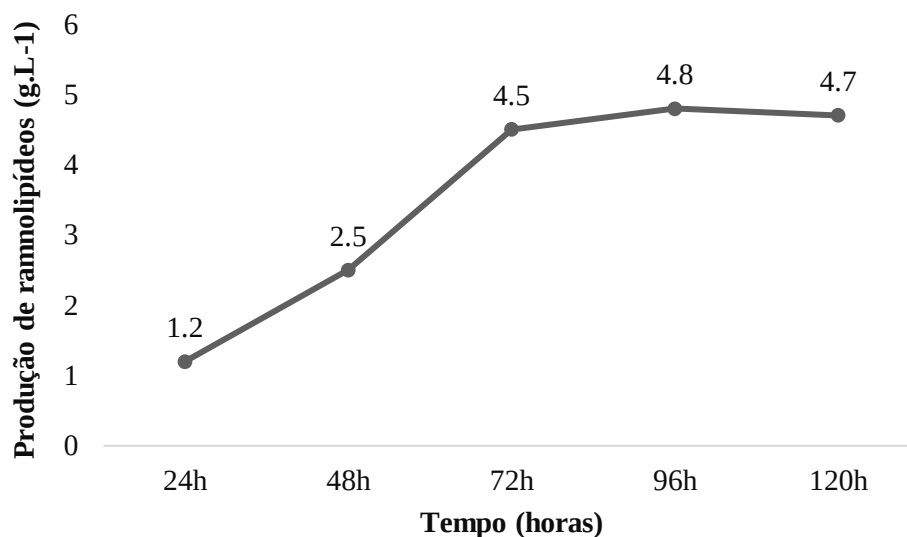
Os dados numéricos foram analisados para normalidade dos dados, média, mediana e desvio padrão utilizando o programa Microsoft Office Excel 2013.

5. RESULTADOS

5.1 Produção de ramnolipídeos

A produção de RL foi realizada em frascos Erlenmeyer de 1000 mL e obteve-se a totalidade de 1,2 g.L⁻¹ em 24 horas de fermentação, 2,5 g.L⁻¹ em 48 horas, 4,5 g.L⁻¹ em 72 horas, 4,8 g.L⁻¹ em 96 horas e 4,7 g.L⁻¹ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata. O gráfico a seguir (figura 7) representa os dias de fermentação em relação à quantidade total de RL.

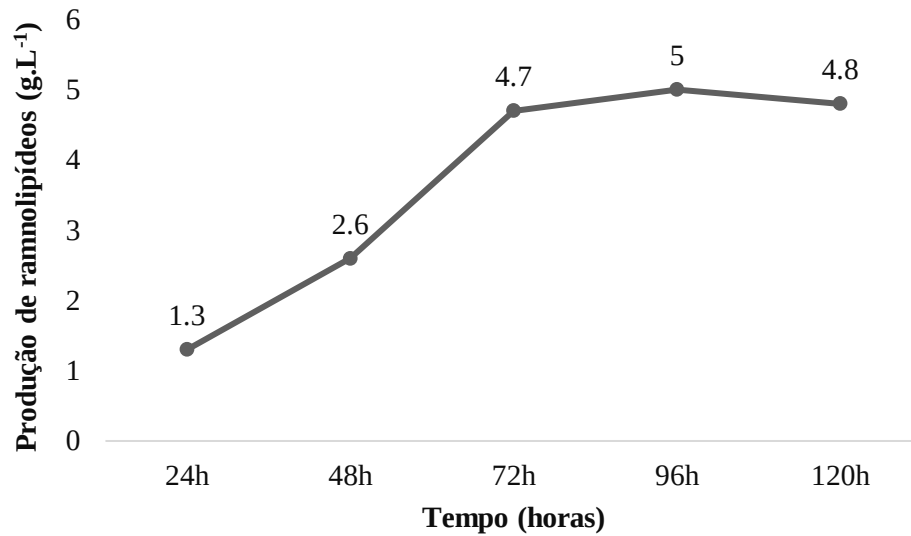
Figura 7: Produção de RL aferida por peso bruto em fermentação aeróbica em frascos Erlenmeyer de 1000 mL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A mesma fermentação passou por análise de HPLC com o objetivo de verificar a quantidade de RL produzido em relação à pesagem bruta do composto e com isso obter uma relação estatística do processo. Dessa forma, o HPLC evidenciou uma produção de 1,3 g.L⁻¹ em 24 horas de fermentação, 2,6 g.L⁻¹ em 48 horas, 4,7 g.L⁻¹ em 72 horas, 5 g.L⁻¹ em 96 horas e 4,8 g.L⁻¹ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata. O gráfico (figura 8) a seguir representa a quantidade de RL aferido pelo HPLC, produzido nos dias de fermentação.

Figura 8: Quantificação de RL com aferição realizada por HPLC.



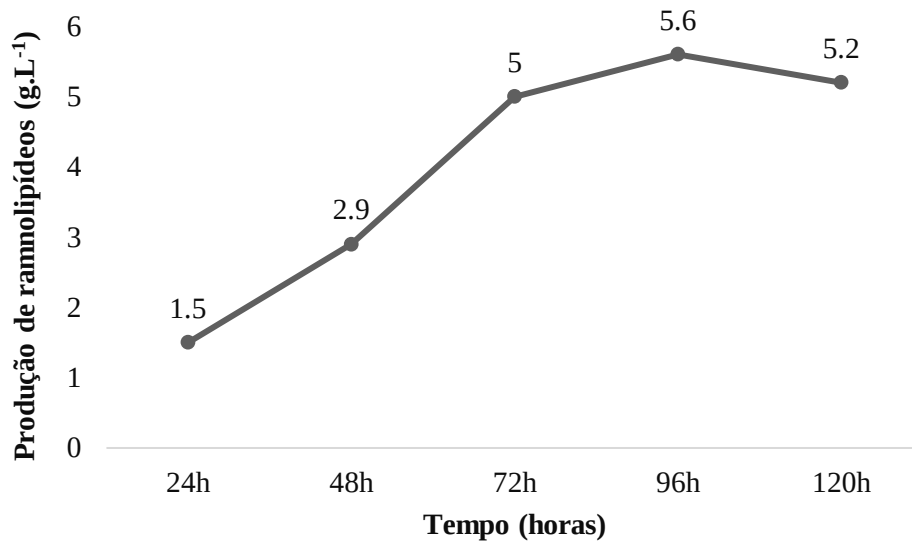
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.1 Produção de ramnolipídeo com suplementação de elementos traços

Na literatura há evidências de que a suplementação de elementos traços possa trazer benefícios ao processo fermentativo, auxiliando a bactéria no seu desenvolvimento e consequentemente na produção do composto desejado, sendo nesse caso o RL. Dessa forma foi aplicado a metodologia de suplementação em horário determinado, sendo adicionado com 20 horas, 40 horas, 60 horas, 80 horas e 120 horas de fermentação.

A produção de RL foi aferida utilizando a massa total do composto, pesando em balança analítica dessa forma obtendo valores maiores em relação à fermentação não suplementada com elementos traços. Dessa forma, obtivemos 1,5 g.L⁻¹ em 24 horas de fermentação, 2,9 g.L⁻¹ em 48 horas, 5,0 g.L⁻¹ em 72 horas, 5,6 g.L⁻¹ em 96 horas e 5,2 g.L⁻¹ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata. O gráfico a seguir (Figura 9) mostra a produção em relação ao tempo de fermentação.

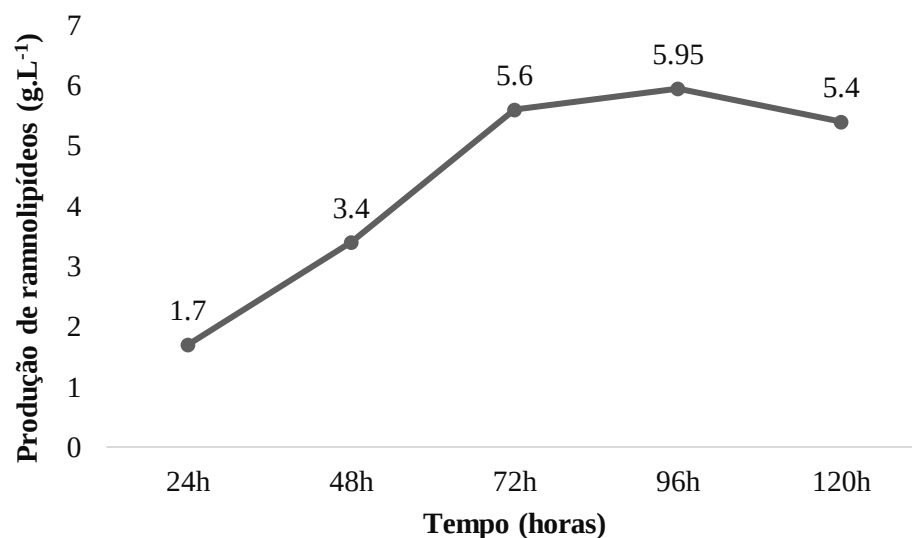
Figura 9: Produção de RL em peso bruto com suplementação de elementos traços.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Da mesma forma como foi realizada na fermentação não suplementada, a verificação da produção de RL também foi testada em HPLC, com o objetivo de obter uma segunda fonte de dados para solidez dos resultados obtidos. Nas análises de HPLC obteve-se 1,7 g.L⁻¹ em 24 horas de fermentação, 3,4 g.L⁻¹ em 48 horas, 5,6 g.L⁻¹ em 72 horas, 5,95 g.L⁻¹ em 96 horas e 5,4 g.L⁻¹ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata. O gráfico a seguir (figura 10) mostra a produção de RL no decorrer dos dias de fermentação.

Figura 10: Produção de RL verificada por HPLC, com suplementação de elementos traços em 20, 40, 60, 80 e 120 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

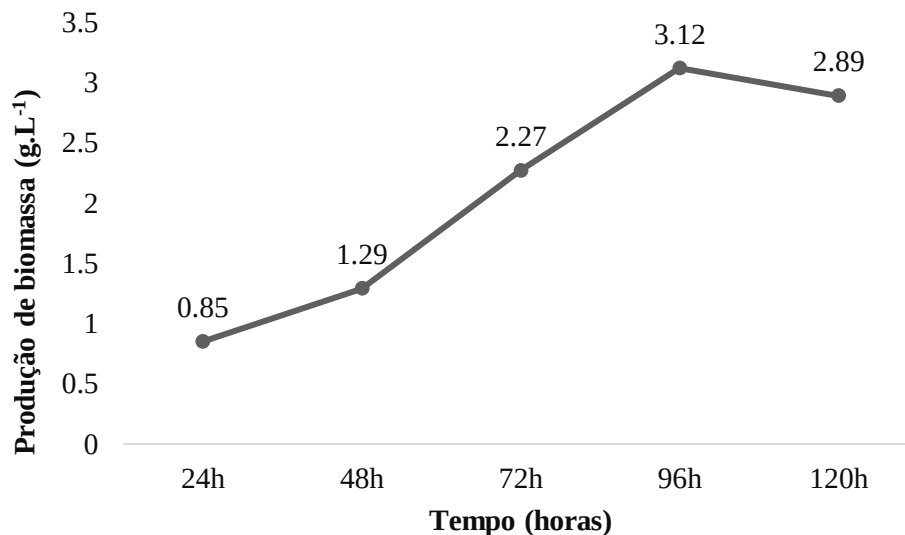
5.2 Produção de biomassa

5.2.1 Produção de biomassa sem suplementação de elementos traços

A produção de biomassa bacteriana foi testada por pesagem total do caldo fermentado centrifugado e com coleta do *pellet* de células remanescente, evidenciando um aumento contínuo durante o decorrer do processo fermentativo, atingindo pico de produção em 96 horas e caindo em 120 horas.

Durante a fermentação obteve-se 0,85 g.L⁻¹ de biomassa bacteriana em 24 horas de fermentação, 1,29 g.L⁻¹ em 48 horas, 2,27 g.L⁻¹ em 72 horas, 3,12 g.L⁻¹ em 96 h e 2,89 g.L⁻¹ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata. O gráfico a seguir (Figura 11) mostra a produção de biomassa em relação ao tempo de fermentação, evidenciando os dados descritos acima.

Figura 11: Produção de biomassa bacteriana em relação ao tempo de fermentação, sem suplementação de elementos traços.



Fonte: Elaborado pelo autor.

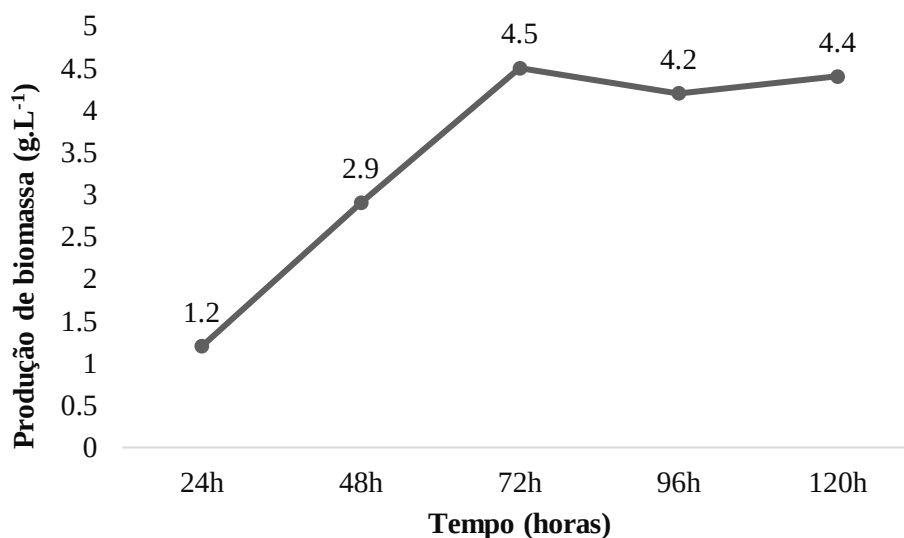
5.2.2 Produção de biomassa com suplementação de elementos traços

A suplementação de elementos traços ocorreu em 20 horas, 40 horas, 60 horas, 80 horas e 100 horas observando a metodologia de Lovaglio (2011) e foi possível observar um aumento considerável e estatisticamente relevante em relação ao processo não suplementado com elementos traços. Dessa forma, durante o processo fermentativo suplementado obteve-se 1,2

g.L^{-1} de biomassa bacteriana em 24 horas de fermentação, $2,9 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas, $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 horas, $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas e $4,4 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata.

Durante o processo fermentativo ocorreu um processo de maior formação de biomassa próximo ao final da fermentação, não relacionado entretanto com maior produção de RL, pois o mesmo teve pico em torno de 96 horas no processo. O gráfico a seguir (figura 12) evidencia a produção de biomassa em relação ao tempo de fermentação.

Figura 12: Produção de biomassa bacteriana em relação ao tempo de fermentação, com suplementação de elementos traços.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Consumo da fonte de carbono

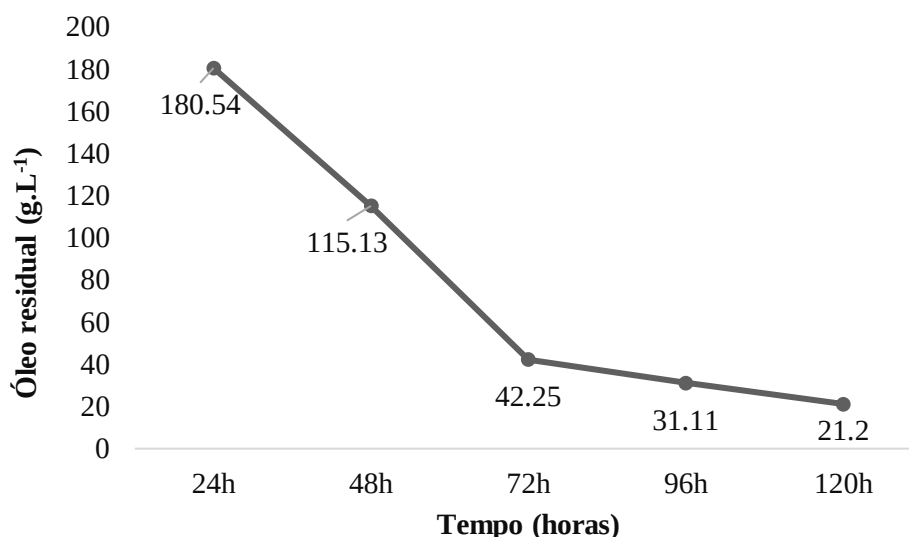
5.3.1 Consumo da fonte de carbono sem suplementação de elementos traços

O consumo da fonte de carbono foi mensurado utilizando o peso bruto pós evaporação do hexano utilizado para a separação do óleo de girassol do restante do caldo fermentado. O processo foi realizado com o auxílio do rotaevaporador, este que, removeu o hexano residual através da evaporação do mesmo.

Importante ressaltar que o consumo do óleo residual é o resultado de uma subtração do total de óleo adicionado no meio de fermentação no início do processo com o total de óleo obtido nas amostragens ocorridas durante o processo. Dessa forma, obteve-se uma quantidade de óleo residual de $180,54 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 horas de fermentação, $115,13 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas, $42,25$

g.L^{-1} em 72 horas, $31,11 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas e $21,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 horas, sendo esses resultados média da triplicata. O Gráfico a seguir (figura 13) mostra a quantidade de óleo residual em relação ao tempo de fermentação.

Figura 13: Quantidade de óleo residual em relação ao tempo de fermentação sem adição de elementos traços.



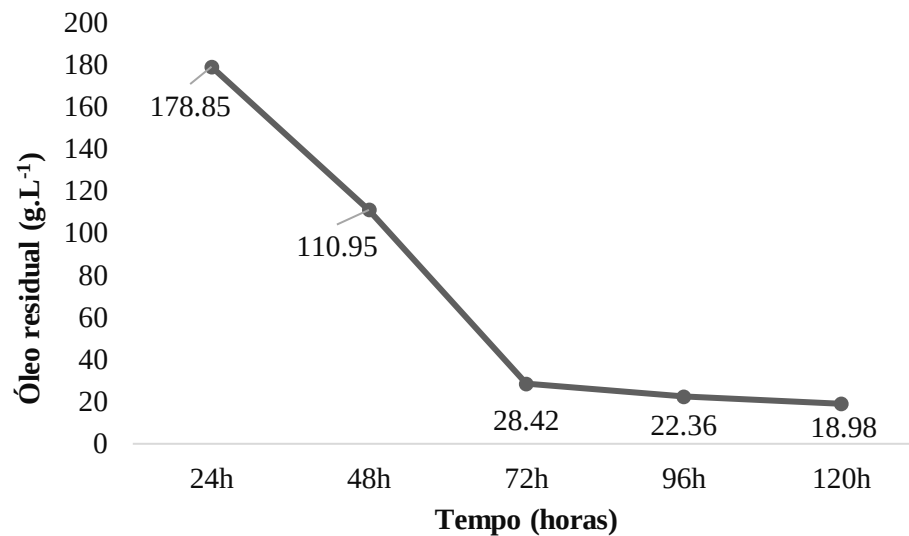
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Consumo da fonte de carbono com suplementação de elementos traços

O consumo de óleo utilizado durante o processo fermentativo foi aferido da mesma maneira realizada na fermentação sem elementos traços, sendo pesado após a evaporação do hexano residual com o auxílio do rotaevaporador. No entanto, nesse processo fermentativo foi realizado a suplementação de elementos traços nos tempos de 20 horas, 40 horas, 60 horas, 80 horas e 100 horas.

Dessa forma obteve-se $178,85 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 horas de fermentação, $110,95 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas, $28,42 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 horas, $22,36 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas e $18,98 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 horas, sendo esses resultados, a média da triplicata. O gráfico a seguir (figura 14) mostra a quantidade de óleo residual em relação ao tempo de fermentação.

Figura 14: Quantidade de óleo residual no caldo fermentado em relação ao tempo de fermentação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Inibição do crescimento bacteriano de *Xanthomonas spp.* testado *in vitro*

5.4.1 Inibição da espécie *Xanthomonas euvesicatoria*

Inicialmente a espécie *Xanthomonas euvesicatoria* foi submetida a crescimento em meio líquido com o objetivo de haver carga microbiana viável suficiente para testes *in vitro* em relação à capacidade de inibição do RL. A princípio os testes foram conduzidos com uma concentração de 2 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹ e 500 µg.L⁻¹ do composto adicionados em placas de Petri, sendo que, para a correta concentração foi utilizado a formula de diluição de concentrações $C1.V1 = C2V2$.

A solução concentrada de RL foi de 40 g.L⁻¹ e foi feita a partir do composto purificado obtido através do processo fermentativo previamente realizado, sendo nesse caso, usado o RL da fermentação suplementada com elementos traços.

O caldo cultivado contendo a bactéria passou por diluição seriada, sendo diluído até 10⁻⁴, para obter quantidade capaz de visualização de colônias e concomitantemente ser suficiente para a produção de carga bacteriana, sendo obtido uma DO de 0,6 Å à 600nm. Previamente foi testado a diluição de 10⁻⁶, mas esta mostrou-se insuficiente para a visualização correta das colônias.

Os testes com a concentração de 2 mg.L^{-1} de RL nas placas de Petri foram insuficiente para matar e inibir o crescimento da bactéria, sendo que, o teste controle (sem RL) e as placas com RL mostraram resultado semelhante de crescimento, sendo encontradas 41 colônias na placa controle, 39 colônias, 45 colônias e 42 colônias na triplicata contendo o RL.

Os testes com concentração de 1 mg.L^{-1} e $500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram resultados semelhantes ao supracitado, evidenciando a incapacidade de inibição do RL nas referidas proporções, apresentando médias semelhantes de crescimento em placa de Petri.

Em seguida foi decidido aumentar em mil vezes a concentração de RL para haver uma redução substancial da quantidade de colônias de *X. euvesicatoria* nas placas de Petri. Dessa forma, obteve-se resultados promissores, sendo que a placa controle apresentou um crescimento de 28 colônias, enquanto a triplicata contendo o RL não apresentou crescimento de nenhuma colônia.

Posteriormente a esses testes, foram realizadas novas análises envolvendo concentrações diferentes de RL, com o objetivo de atingir uma menor quantidade necessária para inibição das bactérias desse gênero. Dessa forma foram feitos testes com 1 g.L^{-1} e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ do composto, evidenciando não haver efeito perceptível na quantidade de colônias e na morfologia das mesmas, não apresentando resultado prático satisfatório nesses testes.

A concentração de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ apresentou uma pequena diminuição no número de colônias viáveis, mas nada relevante para este estudo. Já a concentração de $1,0 \text{ g/L}$ se mostrou totalmente ineficaz, não apresentando nenhuma modificação em relação aos testes controle realizados na ausência de RL (tabela 3). Dessa forma, foi decidido não continuar os testes com essa cepa, uma vez que a quantidade necessária de produto para uma correta inibição é muito elevada, evidenciando o problema de custos de produção associados ao RL. A seguir, temos a tabela 6 mostrando os resultados obtidos com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 3: Resultados obtidos com a adição de RL em uma concentração de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e seus respectivos testes controle. É possível observar uma diminuição sucinta no teste de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$.

<i>Teste</i>	<i>Concentração (g.L^{-1})</i>	
	$1,5 \text{ g.L}^{-1}$	$1,0 \text{ g.L}^{-1}$
Controle	38	38
	39	46
	45	47
RL	28	37
	32	42
	33	46

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.2 Inibição da espécie *Xanthomonas passiflorae*

A bactéria *Xanthomonas passiflorae* passou por crescimento em meio de cultivo NYG (especificado na metodologia) com o objetivo de obter quantidade de células suficientes para os testes em placas de Petri. O cultivo foi realizado por um período de três dias para apresentar densidade óptica suficiente para correto crescimento.

Após o crescimento as bactérias passaram por diluição seriada em solução salina 0,8% para preservar a integridade da membrana celular, sendo submetidas a diluição de 10^{-4} , para obter quantidade satisfatória de colônias no crescimento em placa. A princípio a primeira diluição realizada foi de 10^{-6} , no entanto, esta evidenciou pouco crescimento, não sendo possível uma visualização ideal das colônias.

Para os testes de inibição, foram utilizados concentrações de 2 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 2 g.L^{-1} de RL, sendo estas provenientes da diluição de uma solução concentrada de 40 g.L^{-1} , com volumes ajustados através da equação $C1.V1 = C2.V2$. Estas quantidades de RL não foram suficientes para diminuir ou inibir o crescimento da bactéria, sendo encontradas quantidades praticamente iguais de colônias desenvolvidas tanto nas placas de Petri controle (sem RL), como nas placas contendo o composto, evidenciando a incapacidade de inibição nessas condições.

Foi realizado outro teste de crescimento, desta vez utilizando uma concentração de 2 g.L⁻¹, ou seja, substancialmente superior em relação a previamente testada. Os resultados atingidos por essa concentração evidenciaram a incapacidade de desenvolvimento da bactéria nessas condições, apresentando morte celular generalizada na triplicata contendo RL.

A bactéria *Xanthomonas passiflorae* foi então submetida a novos testes com concentrações diferentes de RL, submetendo essas cepas a concentrações de 1,5 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ do composto. O teste com 1,5 g.L⁻¹ mostrou-se razoavelmente eficaz no combate à bactéria, no entanto não apresentou morte generalizada assim como o teste de 2,0 g.L⁻¹.

O teste com 1,0 g.L⁻¹ mostrou-se totalmente ineficaz para o combate a *Xanthomonas passiflorae* não apresentando nenhuma influência em seu crescimento e na morfologia das colônias crescidas na placa, evidenciando dessa forma, que essa concentração é ineficaz para a inibição do crescimento dessa cepa. Devido a esses testes serem com uma concentração relativamente elevada do produto para aplicação final no campo, foi decidido não conduzir mais testes com essa cepa e interromper a parte prática, no entanto, fica definido que a quantidade de 2 g.L⁻¹ é totalmente eficaz no combate a essa bactéria, havendo possibilidade de estudos para uma concentração de 1,5 g.L⁻¹ devido ao caráter inibitório que causou nessa cepa.

Foram então realizados estudos envolvendo 1,5 g.L⁻¹, os quais obtiveram uma redução pouco significativa em relação ao controle, sendo encontradas 48, 52 e 56 colônias na ausência de RL e 42, 48 e 52 colônias na presença de RL. Com 1,0 g.L⁻¹ o resultado foi ainda menos significativo, ficando com 51, 53 e 59 colônias nos testes sem RL e com 50, 54 e 57 colônias nos testes com a presença do RL, sendo considerado totalmente ineficaz para continuidade dos testes. A seguir, tabela 4 mostrando os resultados obtidos.

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.

<i>Teste</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>	
	1,5 g.L⁻¹	1,0 g.L⁻¹
Controle	48	51
	52	53
	56	59
RL	42	50
	48	54
	52	57

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.3 Inibição da espécie *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

A espécie *X. citri* subsp. *Citri* passou por crescimento em meio de cultivo NYG, descrito na metodologia, por um período de três dias com o objetivo de obter maior concentração celular e possibilitar um melhor desenvolvimento em placa de Petri. O caldo cultivado passou por um processo de diluição seriada para redução da carga microbiana no meio, passando por diluição de 10⁻⁴ e 10⁻⁶.

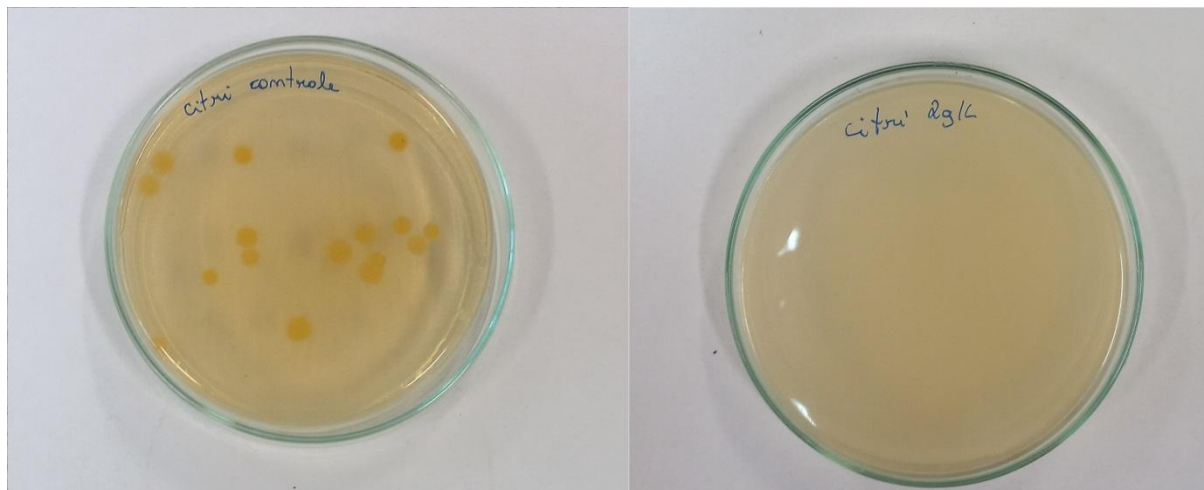
A diluição de 10⁻⁴ apresentou um crescimento muito expressivo, cultivando a totalidade da placa de Petri e impossibilitando a correta visualização das colônias e consequentemente impedindo a utilização dessa metodologia. No entanto, a diluição de 10⁻⁶, foi significativamente mais acurada em visualização de colônias isoladas, possibilitando a análise das mesmas.

Foram utilizadas quatro concentrações de RL para o crescimento das bactérias, sendo a primeira realizada com 2 mg.L⁻¹ do composto, a segunda com 1 mg.L⁻¹, a terceira com 500 µg.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹. Para as três primeiras concentrações não houve redução na quantidade de colônias, sendo que o teste sem RL e a triplicata com RL não apresentaram diferença na quantidade de colônias desenvolvidas, não inibindo o crescimento da bactéria.

No entanto, com o aumento da concentração de RL para 2g.L⁻¹, os resultados foram diferentes, sendo evidenciado a inibição total do crescimento bacteriano nas placas, com a triplicata contendo RL não apresentando nenhuma colônia em todas as placas de Petri. O teste

controle apresentou 20 colônias. A imagem a seguir (figura 15) mostra o teste controle e o 2 g.L⁻¹.

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.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente foram realizados testes com 1,5 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ de RL no meio de cultivo, que resultou em morte celular generalizada em ambas, evidenciando a capacidade bactericida do composto quando aplicado nas concentrações acima citadas, dessa forma foi decidido continuar os experimentos com a Xac em detrimento das demais que não apresentaram diminuição significativa com esses dois testes.

Foram então, realizados testes com o objetivo de descobrir a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), conduzindo-se assim, experimentos com 0,4 g.L⁻¹ e 0,8 g.L⁻¹ com o objetivo de alcançar um intervalo válido para testes futuros com outras concentrações de RL. O teste com 0,4 g.L⁻¹ mostrou-se eficaz em inibir o crescimento da Xac, mas não houve morte celular generalizada, sendo que, os testes controle em triplicata apresentaram crescimento de 122 colônias na média, enquanto os testes com a presença do RL apresentaram em média 89 colônias, evidenciando uma diminuição média de 20,9% do teste com RL em relação ao controle.

O teste com 0,8 g.L⁻¹ foi satisfatório ao eliminar completamente a bactéria do meio de cultivo, representando uma quantidade ainda bactericida do composto. Os testes controle em triplicata apresentaram 132 colônias em média, enquanto que, os testes com RL apresentaram nenhuma atividade bacteriana, com total ausência de células. Apesar dos testes terem sido realizados em triplicata, foi feita uma nova testagem para averiguar a veracidade dos fatos

encontrados, e novamente obteve-se resultados iguais aos do teste anterior, evidenciando que nessa concentração não há desenvolvimento bacteriano.

Foram então realizados testes com 700 mg.L^{-1} com o objetivo de alcançar uma concentração que fosse inferior à testada, mas que ainda obtivesse inibição do crescimento da Xac. Os resultados foram promissores, e observou-se uma diminuição significativa na quantidade de colônias viáveis no meio de cultivo, além de alteração visível na morfologia das colônias, passando esta, a ser menor e com contorno ligeiramente diferente ao teste controle.

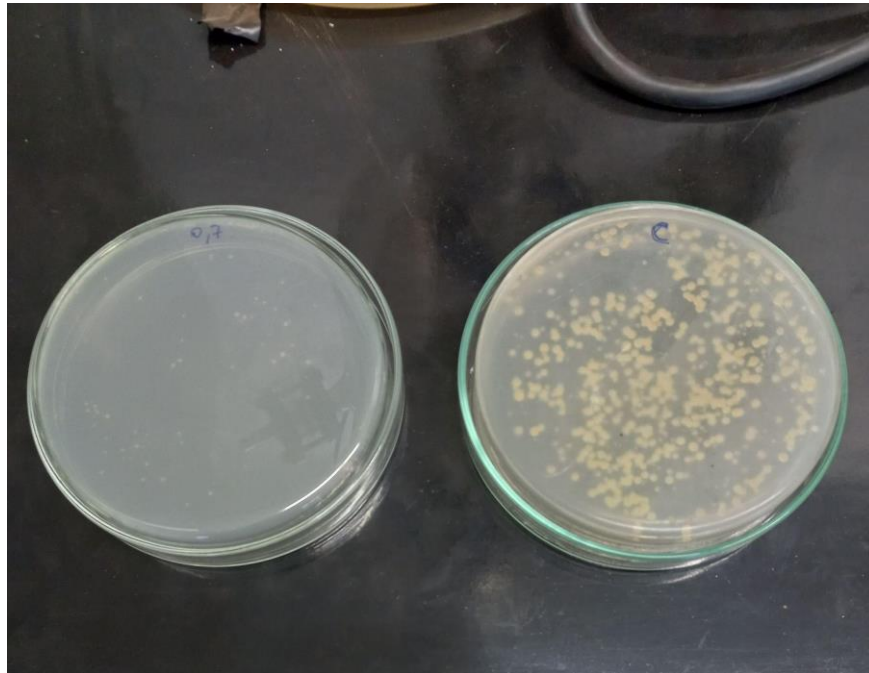
Obteve-se esse resultado mediante espalhamento homogêneo do RL no ágar com total disseminação do composto por toda a superfície de contato da placa de Petri, apresentando turvamento do meio devido à adição do composto e por este estar em uma concentração elevada em uma solução previamente preparada com 40 g.L^{-1} , sendo ajustado o volume necessário com a fórmula de diluições de concentrações específicas $C1V1 = C2V2$. A seguir, tabela 5 e figura 16 mostrando os resultados obtidos com 700 mg.L^{-1} .

Tabela 5: Resultados obtidos com 700 mg.L^{-1} de RL e seu respectivo teste de controle.

	<i>Concentração (mg.L^{-1})</i>
<i>Teste</i>	700 mg.L^{-1}
Controle	95
	115
	128
RL	11
	14
	19

Fonte: Elaborada pelo autor.

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.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida foram realizados testes com 600 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ de RL com o objetivo de diminuir a concentração e averiguar a capacidade do composto nessas condições. Os resultados da concentração de 500 mg.L⁻¹ foram semelhantes ao 400 mg.L⁻¹ e foi possível notar uma excelente inibição do crescimento bacteriano, mas ainda havia presença de colônias viáveis no meio de cultivo, sendo que esse valor foi o suficiente para impedir o crescimento de metade das colônias.

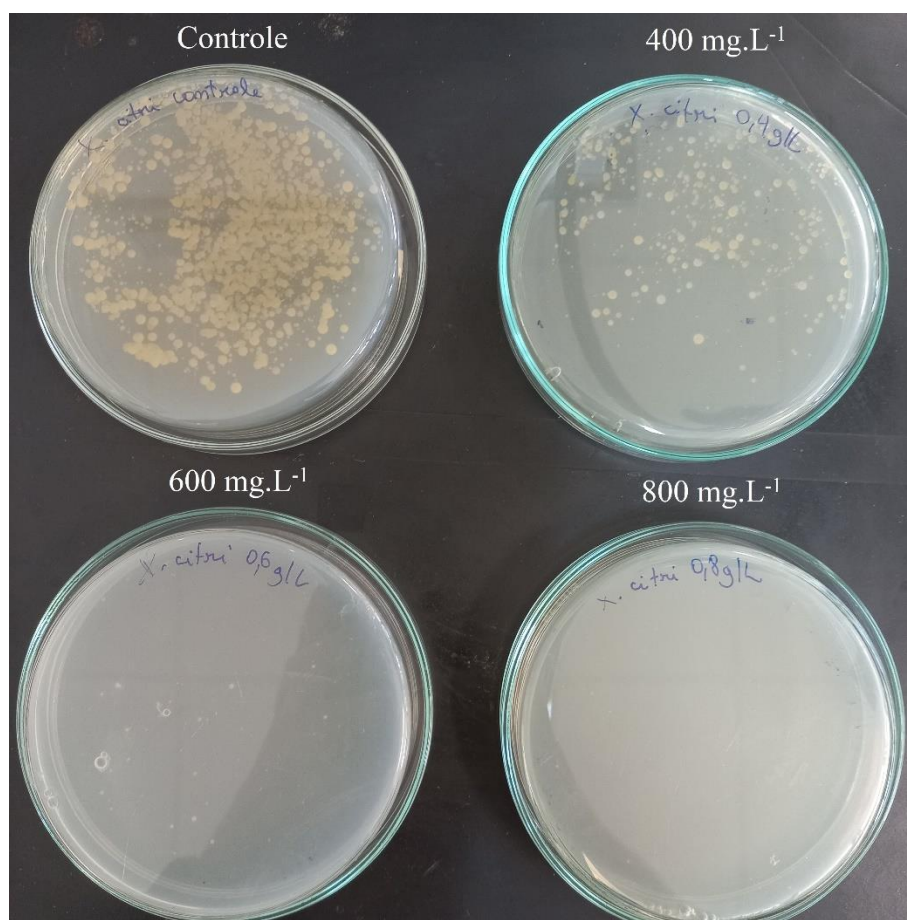
Já a concentração de 600 mg.L⁻¹ de RL foi suficiente para conduzir uma resposta bactericida satisfatória, mas não foi suficiente para dizimar a totalidade das colônias, como já era esperado frente aos resultados obtidos com 700 mg.L⁻¹. No entanto, a diminuição sendo significativa, mostrou-se objeto de estudos futuros em relação à essa quantidade de RL na amostra. A seguir, tabela 6 mostrando os resultados obtidos com 500 e 600 mg.L⁻¹ de RL.

Tabela 6: Resultados obtidos com concentrações de 500 mg.L⁻¹ e 600 mg.L⁻¹ e seus respectivos controles.

<i>Teste</i>	<i>Concentração (mg.L⁻¹)</i>	
	500 mg.L ⁻¹	600 mg.L ⁻¹
Controle	34	38
	38	45
	39	46
RL	25	17
	28	25
	30	25

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17: Efeitos causados pelo RL na Xac, contento na imagem o teste controle, 400 mg.L⁻¹, 600 mg.L⁻¹ e 800 mg.L⁻¹



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.4 Inibição da espécie *Xanthomonas albilineans*

Os testes com essa espécie foram semelhantes aos realizados com as outras cepas, no entanto, aqui foi utilizado um meio de cultivo diferente, sendo o YSG o mais adequado para a bactéria. A composição exata do meio está demonstrada na metodologia.

Inicialmente a bactéria passou por crescimento em meio líquido por um período de cinco dias para obter uma maior carga microbiana, visto que o desenvolvimento desta cepa é mais demorado que as demais do presente estudo. Terminado o crescimento, foi realizada uma diluição seriada para reduzir a carga microbiana e facilitar a visualização das colônias em placa. Dessa forma foi realizado uma diluição de 10^{-4} , que demonstrou ser insuficiente para a formação de colônias, não havendo crescimento em placas de Petri.

Em seguida foi realizado uma diluição menor, desta vez sendo de 10^{-2} , o que viabilizou o crescimento correto e a visualização de colônias bem formadas nas placas de Petri. Foram utilizadas quatro concentrações de RL para o crescimento, sendo de 2 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , $500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e de 2 g.L^{-1} .

As concentrações 2 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , $500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ não apresentaram resultados satisfatórios para inibição do crescimento da bactéria, demonstrando capacidade de desenvolvimento pleno nessa concentração. Os testes controle (sem RL) e os testes com o composto não apresentaram diferenças na quantidade de colônias, evidenciando a ausência de inibição.

No entanto, a concentração de 2 g.L^{-1} foi suficiente para inibir totalmente o crescimento da *X. albilineans*. Dessa forma, o teste controle em triplicata apresentou 41, 42 e 44 colônias respectivamente, e as placas de Petri com RL não apresentaram o desenvolvimento de nenhuma colônia, evidenciando a capacidade de inibição das mesmas pelo composto em questão.

Posteriormente foram realizados testes para diminuir a quantidade de RL necessária para inibição da *Xanthomonas albilineans* e duas concentrações foram testadas, sendo $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ do composto. Quando temos $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ observa-se uma inibição sutil, mas ainda presente, reduzindo a quantidade de colônias nas placas, sendo que o teste controle apresentou 34, 38 e 39 colônias e o teste controle apresentou 25, 28 e 30 colônias. No entanto, com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ o teste controle apresentou 38, 45 e 46 colônias, enquanto o teste com a presença do RL apresentou 34, 42 e 43 colônias, evidenciando que essa concentração não obteve nenhum efeito significativo em inibir o crescimento ou desenvolvimento da bactéria, dessa forma, foi decidido deixar de utilizar essa cepa no presente estudo, uma vez que a quantidade necessária é muito superior ao que é viável economicamente.

Apesar dos resultados com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ não evidenciarem uma inibição significativa da bactéria, ainda ocorreu alguma interação, sendo objeto de estudos mais detalhados nessa concentração para averiguar se há ou não possibilidade de trabalho com essas condições frente a essa cepa. A seguir, tabela 7 mostrando os resultados obtidos frente às duas concentrações testadas.

Tabela 7: Resultados obtidos para a presença de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de RL em meio de cultivo e seus respectivos testes controle.

<i>Teste</i>	<i>Concentração (g.L^{-1})</i>	
	$1,5 \text{ g.L}^{-1}$	$1,0 \text{ g.L}^{-1}$
Controle	34	38
	38	45
	39	46
RL	25	34
	28	42
	30	43

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Teste de contaminação *in vivo*

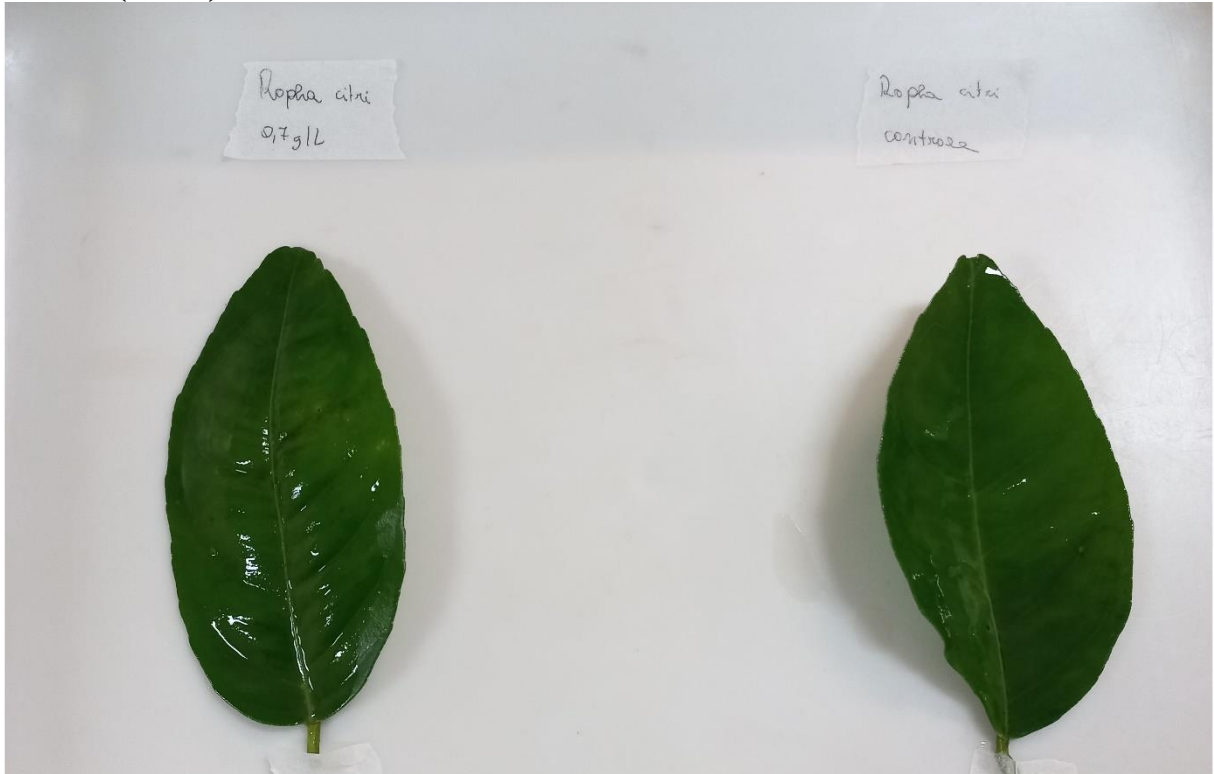
Os testes de contaminação e aplicação do RL ocorreram com espécimes vivas de *Citrus sinensis*, popularmente conhecido como laranja-pêra, utilizando dez exemplares, tanto na planta completa (plantada e em vasos), como nas folhas de ramos removidos dos indivíduos vivos, testes estes conduzidos em laboratório.

Ambos os experimentos apresentaram resultados semelhantes, não apresentando infecção e consequentemente não ocorreu o surgimento das lesões características do cancro cítrico, não podendo ser usado como parâmetro para estudos das folhas ou indivíduos contaminados.

Os testes foram então repetidos com auxílio de uma incubadora disponibilizada pelo Jardim Experimental do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, com objetivo de conseguir maior controle das condições impostas às bactérias. Apesar de haver maior qualidade

no experimento, o mesmo não apresentou lesões significativas nas folhas contaminadas com Xac e nenhuma lesão nas folhas tratadas com RL, como mostrado na figura 18.

Figura 18: Folhas de *Citrus sinensis* (laranja-pêra) removidas das plantas teste (esquerda) e controle (direita).



Fonte: Elaborada pelo autor

Dessa forma, os testes *in vivo* não foram suficientes para verificação dos resultados obtidos em laboratório, necessitando, provavelmente, da aplicação no campo, ou seja, nas condições reais nas quais a doença se desenvolve e ocorre. No entanto, podemos verificar com esses testes que há necessidade novas análises nos indivíduos que previamente estão causando problema nas lavouras.

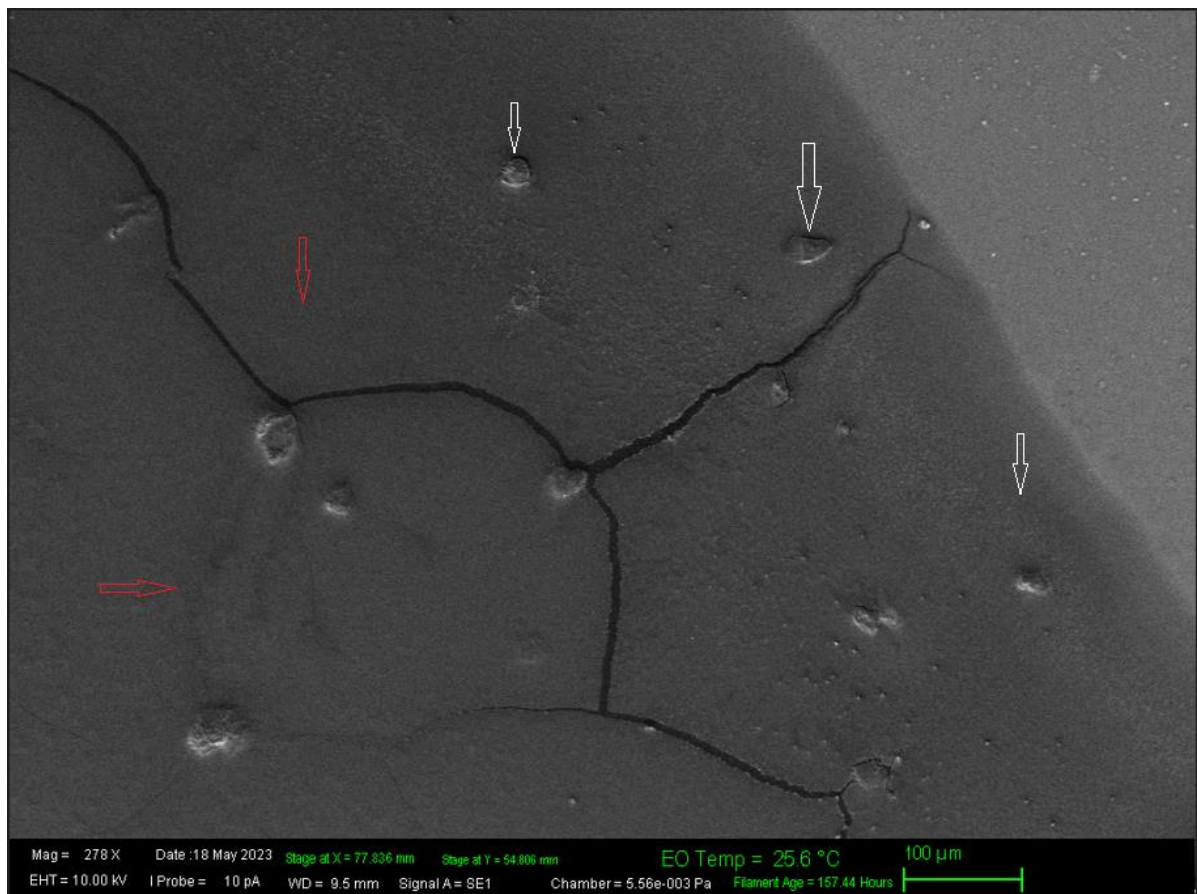
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.

A microscopia de eletrônica de varredura revelou resultados que corroboram com a hipótese de que há interação entre o RL e a bactéria, em especial, interação entre o composto e a membrana celular da mesma, evidenciando deformação na morfologia e diminuição substancial na quantidade de células presentes nas amostras.

Outro aspecto importante para se considerar, é a interação entre o biofilme bacteriano formado e o RL, este que, apresentou degradação na presença do composto, aparentando ter

ocorrido a formação de vesículas e uma estrutura mais frágil e quebradiça, e que não teve nenhum problema em se formar e estabelecer nos testes controle, não apresentando deformações ou diminuição estrutural. A figura 20, mostra o biofilme com a presença de algumas bactérias.

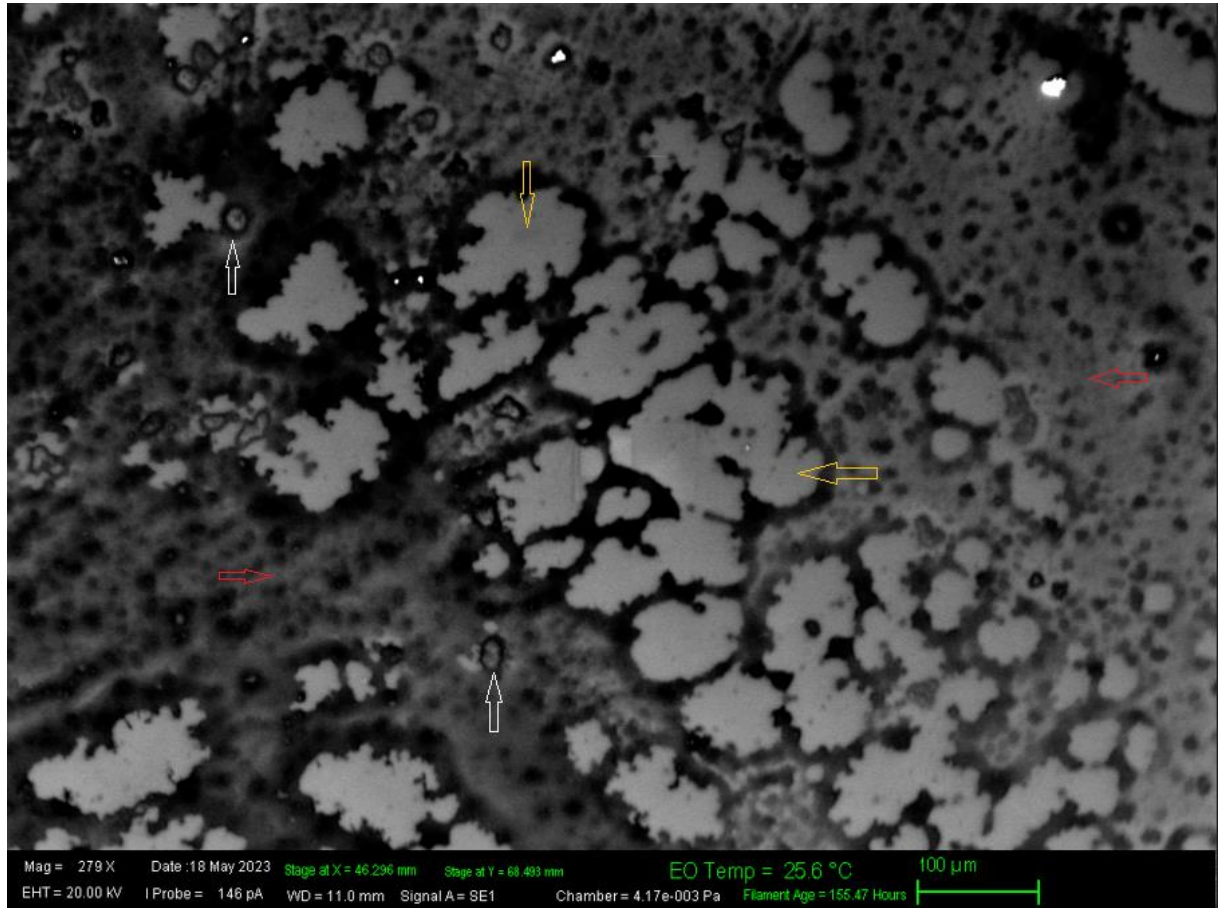
Figura 19: Imagem feita por MEV, com aumento de 278x, 20 kV e aproximadamente 10 pA. As estruturas redondas e parecidas com bastões são as células bacterianas da Xac, mostradas pelas setas brancas. O biofilme é a estrutura cinza-escuro e é apontado pelas setas vermelhas. O método de fixação da imagem foi feito através da desidratação por calor.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos testes de controle, tais como o mostrado acima, é possível ver claramente a conformação das bactérias e a estrutura do biofilme formado, apresentando uma conformação uniforme e coesa de toda a estrutura. Este fato será alterado com a presença do RL, este que causa uma desestruturação do biofilme onde a bactéria se encontra. A imagem a seguir (figura 21) evidencia os fatos mencionados e nela é possível identificar a deformação no BF.

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.

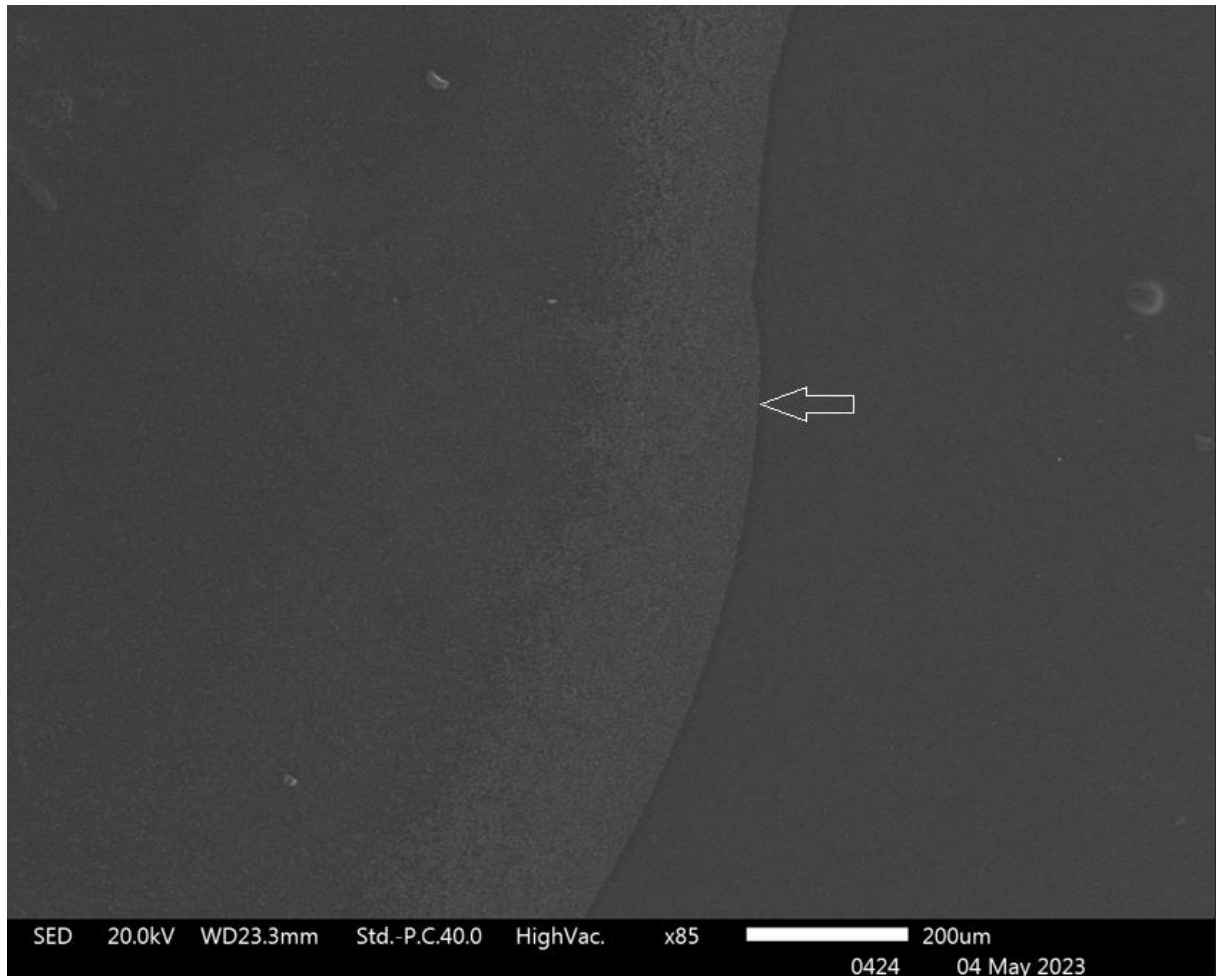


Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram feitas amostras utilizando o método de inoculação da bactéria em ágar com o auxílio de um palito de dente para a formação de uma colônia isolada. Foram feitas lamínulas e utilizou-se o meio NYG com RL e sem o composto. Essas amostras foram então fixadas utilizando vapor de ósmio e metalizadas com 20 nm de ouro.

As amostras foram então analisadas e os resultados mostram que quando há adição de RL no meio de cultivo, observa-se uma quantidade muito menor de bactérias na colônia e uma alteração nas bordas da colônia, apresentando uma estrutura menos inteiriça e menos coesa em relação ao controle. A imagem a seguir (figura 22) evidencia as bordas da colônia na ausência de RL.

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.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, ocorreram os testes submetendo as bactérias ao RL, em uma concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, onde é possível observar a quantidade reduzida de indivíduos formando a colônia, bem como uma aparente desestruturação da superfície onde houve o crescimento. Na imagem é possível visualizar pontos na área à esquerda, no entanto, estes não são células e sim deposição de ósmio na lamínula, sendo que, o mesmo ocorre na área interna na colônia. A seguir, imagem 23 evidenciando os dados citados.

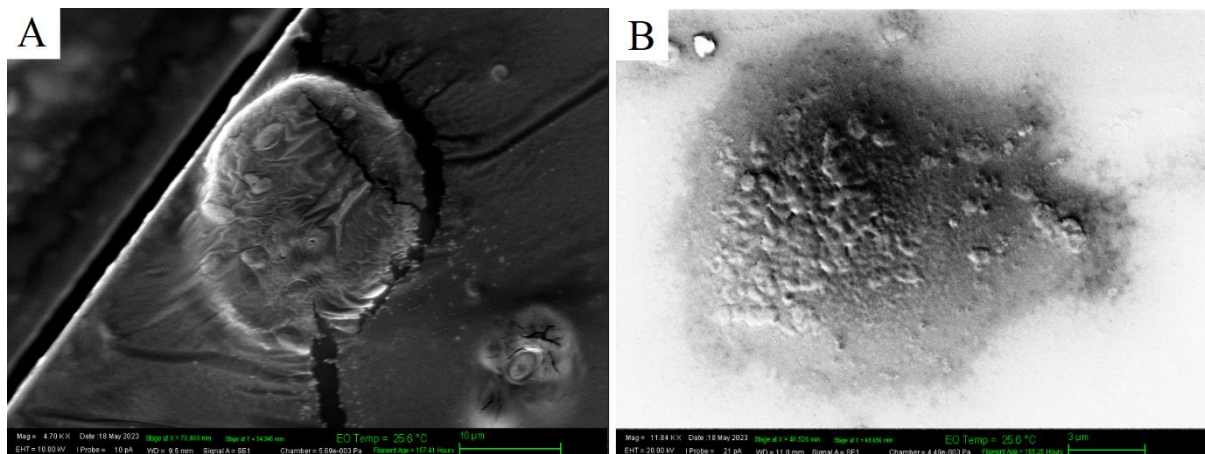
Figura 22: Fotografia de MEV, evidenciando os limites de uma colônia de Xac, na presença de ramnolipídeo. Tensão de 20 kV e aumento de 270x. A seta branca indica os limites da colônia (a direita) de Xac.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram realizadas fotos mostrando células de Xac sozinhas, com objetivo de verificar a morfologia das mesmas, sendo na presença do RL em uma concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e na ausência total do BS. As imagens demonstraram uma alteração na morfologia da célula quando esta é exposta ao RL, ao passo que, a célula das amostras sem RL não sofreram alterações aparentes em sua morfologia. A seguir, figura 24 mostrando as células de Xac tratada e não tratada com RL.

Figura 23: Imagem mostrando as alterações morfológicas na membrana celular, causadas pela presença de RL no meio de cultivo. Em “A”, 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.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.7 Teste de hidrofobicidade de Rosenberg.

O teste de hidrofobicidade de Rosenberg, com modificações baseadas no artigo de Cereza e colaboradores (2021) mostrou que houve boa adesão do RL na célula, com 66% de adesão na média. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados se encontram na tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos utilizando o teste de hidrofobicidade Rosenberg.

<i>DO Inicial</i>	<i>DO Final (após hexadecano)</i>
0,416	0,14
0,413	0,137
0,417	0,125

Fonte: Elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

6.1 Produção de ramnolipídeos

Os RL são BS produzidos naturalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* podendo ser utilizados em diversos setores econômicos, tais como a indústria de cosméticos, detergentes, farmacêutica e no setor agroindustrial. No entanto, seu principal problema em relação aos surfactantes de origem química é o preço, que acaba inviabilizando o uso em larga escala do composto (ESLAMI, HAJFARAJOLLAH, & BAZSEFIDPAR, 2020)

Enquanto existem estudos voltados para melhora da produção do composto e ampla utilização do mesmo, uma alternativa viável seria encontrar usos nobres para o RL, utilizando-o em setores que necessitem de uma substância atóxica e não poluente. Devido a suas características antimicrobianas, o RL pode ser utilizado para inibição de diversas doenças causadas principalmente por bactérias sensíveis ao composto. Visto isso, sua utilização do RL para controle de doenças agrícolas torna-se uma alternativa viável em relação aos métodos atualmente usados (PLATEL *et al.*, 2022).

Primeiramente, há necessidade de produção do RL para a utilização do mesmo nas suas diversas aplicações. Dessa forma, no presente estudo foram realizadas fermentações com a bactéria *P. aeruginosa* LBI 2A1 obtida por Lovaglio e colaboradores em 2011 a partir da inserção de um gene relacionado com as rotas metabólicas associadas ao RL.

O processo fermentativo foi realizado de duas maneiras distintas, sendo a primeira, com suplementação de elementos traços e a segunda sem a adição desses compostos. Nos resultados é possível observar um melhor desenvolvimento da bactéria quando há suplementação de elementos traços, demonstrando um aumento na quantidade de biomassa e de RL produzida. Provavelmente a necessidade desses compostos está relacionada com etapas metabólicas que necessitam de enzimas e/ou coenzimas que levam em sua composição algum micronutriente ou elemento específico (Li *et al.*, 2019).

Durante a suplementação com elementos traços é possível observar um aumento significativo da quantidade de biomassa algumas horas após adição dos mesmos. Podemos verificar que a maior disponibilidade desses compostos influencia também na produção de células no meio de fermentação, podendo sua ausência ser considerada um limitante para o bioprocessamento, evidenciando assim sua importância (SUN *et al.*, 2020).

Outro ponto importante a discutir é em relação ao pico de produção de RL, que ocorre aproximadamente em 96 horas de fermentação, sendo um pouco depois do estabelecido por Lovaglio e colaboradores em 2011, que geralmente ocorre em 72 horas de fermentação. No

entanto é possível que a retirada de amostras em períodos de 24 possa ter não mostrado o pico de produção que provavelmente ocorreu entre 72–96 horas, ademais, a diferença entre os pontos de coleta mencionados não apresenta grandes diferenças.

6.2 Teste de inibição do gênero *Xanthomonas* spp.

Em relação aos testes de inibição do crescimento das bactérias do gênero *Xanthomonas* spp. podemos discutir sobre a quantidade necessária de RL para ocorrer um processo completo de morte celular e podemos também, discorrer sobre a não inibição do crescimento, apresentado nos resultados.

Dito isso, a inibição crescimento bacteriano das espécies estudadas no atual trabalho é descrita como satisfatória quando utilizadas 2 g.L⁻¹ de RL no meio de cultivo apresentando completa morte celular, inviabilizando o desenvolvimento de colônias. Diferentemente do que encontrado por Yochikawa em 2016, o qual obteve uma inibição do crescimento da *X. citri* subsp *citri* com 2 mg.L⁻¹, o presente estudo não conseguiu dados que corroboram com esse resultado, evidenciando inclusive, crescimento da bactéria em concentração dez vezes superior de RL. A provável causa do resultado alcançado por Yochikawa é um falso positivo proveniente da reação entre a resazurina e o RL, que evidenciou falsa morte celular em 2 mg.L⁻¹ do composto (ELSHIKH *et al.*, 2016).

6.2.1 Inibição da *Xanthomonas citri* subs. *citri*

Os testes de inibição do crescimento da Xac foram então conduzidos para uma menor quantidade de RL, sendo a princípio testadas as quatro cepas com concentração de 1,0. Os resultados obtidos só foram satisfatórios para a Xac, a qual teve completa inibição do crescimento, não apresentando colônias viáveis em placa de Petri, diferentemente das outras cepas que apresentaram crescimento nessa concentração. Esse resultado pode estar relacionado com a semelhança genética das cepas, nas quais, a *Xanthomonas passiflorae*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas albilineans* apresentam grande proximidade, inclusive sendo previamente denominadas de *Pseudomonas* spp. (SCHAAD, N. W. *et al.*, 2006) o que provavelmente garante uma resistência ao RL que é oriundo do metabolismo secundário da *Pseudomonas aeruginosa*.

Os testes tiveram continuidade apenas com a Xac, a qual apresentou completa inibição do crescimento, inclusive com quantidades menores de RL. A concentração de 0,7 g.L⁻¹ foi

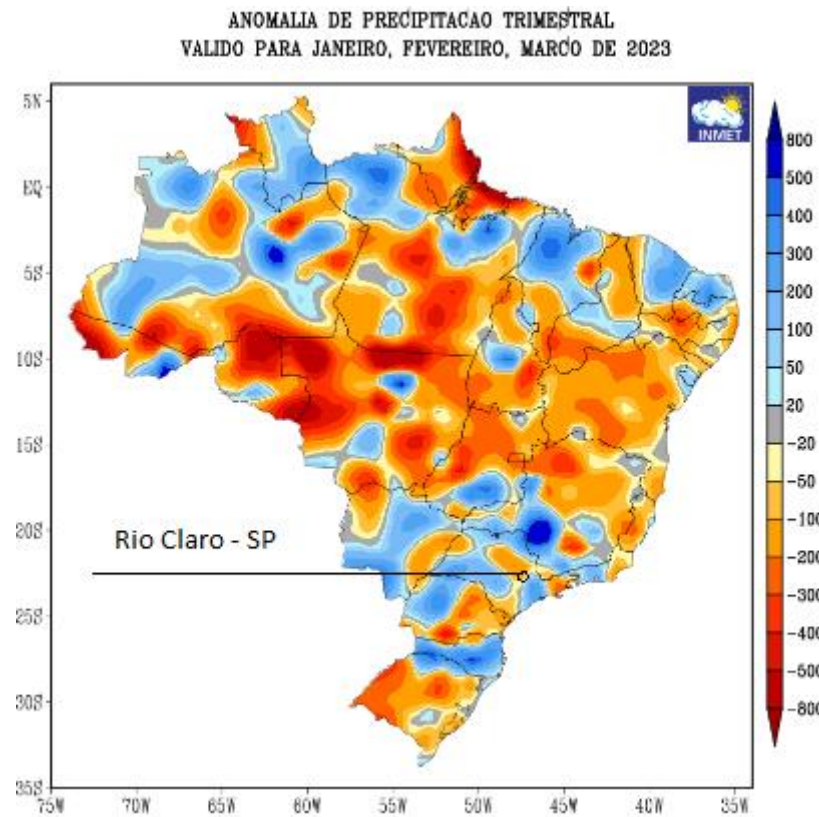
considerada eficiente para a inibição da Xac, enquanto que a concentração de 0,8 g.L⁻¹ foi considerada a que completamente elimina a bactéria do meio de cultivo. A concentração de 0,5 g.L⁻¹ foi considerada então a concentração inibitória mínima, na qual a metade das colônias não se desenvolveram.

6.2.2.1 Inibição da *Xanthomonas citri* subs. *citri*, in vivo

A concentração bactericida mínima de 0,8 g.L⁻¹ foi escolhida para conduzir os testes *in vivo*, pois o objetivo é eliminar completamente a doença em campo. Os resultados alcançados nos testes *in vivo* não foram satisfatórios, uma vez que o desenvolvimento das lesões características não ocorreram, tanto nos indivíduos inoculados com a Xac e tratados com RL, quanto nos indivíduos que apenas foram inoculados sem tratamento com BS.

O fator predominante para esses resultados provavelmente foi em relação ao clima, uma vez que a Xac necessita de tempo chuvoso e quente para seu correto desenvolvimento. Dito isso, podemos discutir em relação às condições que simulamos em laboratório e aquelas que encontramos na natureza, especificamente nas áreas agrícolas. É conhecido que o clima tropical típico, encontrado nas regiões mais centrais do Brasil é desfavorável para o cultivo de cítricos, sendo o clima tropical de altitude ou o clima equatorial de monção os mais indicados para o cultivo dessas plantas (CAMARGO, M. B. P. D *et al.*, 1999). Dito isso, é importante salientar que no trimestre de janeiro, fevereiro e março de 2023, período este, em que os testes foram executados, tivemos uma estação ligeiramente mais seca que o comum na região de Rio Claro - SP, como mostrado na figura 25.

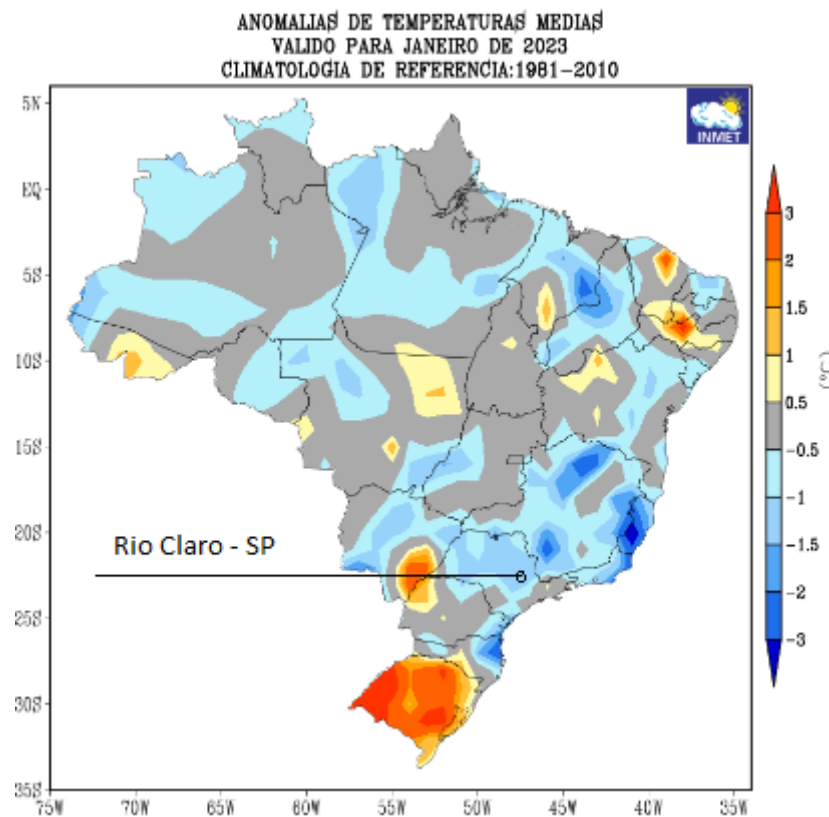
Figura 24: Mapa fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia evidenciando a anomalia de precipitação no trimestre de janeiro, fevereiro e março.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Outro fator importante para o desenvolvimento da laranja é a temperatura, esta que, ficou abaixo da média histórica justamente no período de crescimento das mudas e consequentemente no período de contágio por Xac, realizado pelo autor nas folhas das plantas. Quanto maior é a temperatura da região, maior os cuidados que agricultores devem ter em relação às pragas cítricas, em especial o cancro e o *greening*. (SALIBE, A. A., TEÓFILO SOBRINHO, J., & MÜLLER, G. W, 2002). Na imagem a seguir (figura 26) é possível verificar a anomalia de temperatura média para o mês de janeiro de 2023.

Figura 25: Mapa fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia evidenciando a anomalia de temperatura no mês de janeiro de 2023.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura mostrou alterações estruturais nas membranas celulares e no BF formado pela Xac. Essas alterações foram mais significativas em relação ao BF, do que em relação à membrana celular, sendo um elemento de estudo futuro.

Morfologicamente, podemos verificar que as alterações do BF provavelmente foram formadas pela ação do RL, uma vez que, na ausência do composto, não temos essas alterações evidentes, garantindo a solidez dos resultados encontrados no MEV. As alterações encontradas com a ação do RL podem ser relacionadas à uma interação entre o BS e peptidase M23, proteína essa que é responsável por manter a estabilidade da membrana celular juntamente com o peptidoglicano, causando alguma instabilidade nessa relação, além de obviamente uma interação direta entre o RL e a membrana celular e/ou o peptidoglicano (KEMPNER, 2018).

As alterações provocadas na membrana celular ficam evidentes na figura x, mostrando uma célula com morfologia totalmente modificada quando exposta ao RL e uma morfologia padrão quando as células não são expostas. Esse fato pode ser relacionado com as propriedades

anfipáticas do RL, uma vez que o composto pode se ligar na bicamada lipídica e causar modificações nas ligações dos fosfolipídios que compõem a membrana (SOTIROVA, A *et al.*, 2012).

Observa-se também, uma maior dispersão das células quando tratadas com RL, em relação às não tratadas, como fica evidente na figura 20, que não recebeu tratamento e na figura 21, que recebeu tratamento com RL. Essa conformação pode ser um indício que de a interação entre o RL, o BF e as células, fazendo com que as células da Xac fiquem mais esparsas, resultado do aumento da hidrofobicidade da célula causada pela liberação de lipopolissacarídeos da superfície celular (RAYA, A *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÃO

- A produção de ramnolipídeo, 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.