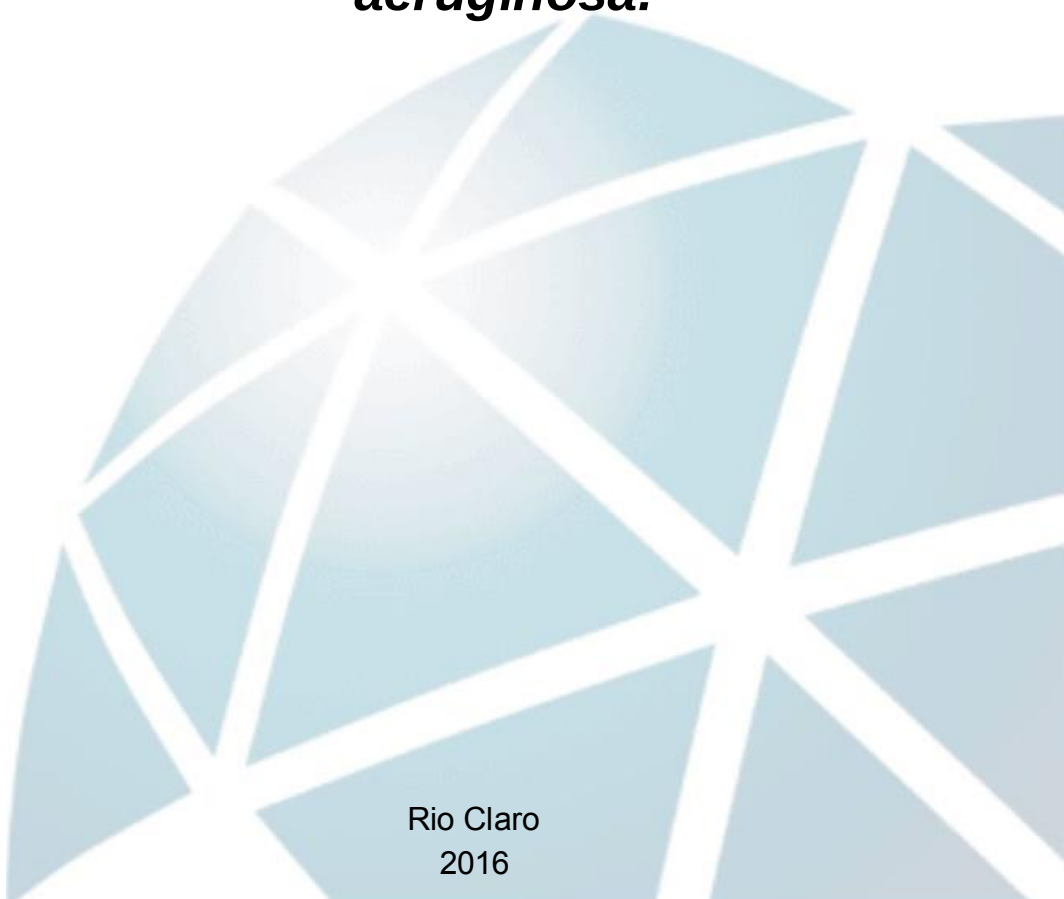

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIO TADAO HIRATA YOCHIKAWA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE anti-
Xanthomonas citri DE RAMNOLIPÍDIOS
PRODUZIDOS POR *Pseudomonas
aeruginosa*.**



Rio Claro
2016

JULIO TADAO HIRATA YOCHIKAWA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE anti-*Xanthomonas citri*
DE RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa*.

Orientador: HENRIQUE FERREIRA

Co-orientador: LÚCIA BONCI CAVALCA

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

Rio Claro

2016

576 Yochikawa, Julio Tadao Hirata
Y54a Avaliação da atividade anti-Xanthomonas citri de
ramnolipídios produzidos por Pseudomonas aeruginosa / Julio
Tadao Hirata Yochikawa. - Rio Claro, 2016
43 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira
Coorientadora: Lúcia Bonci Cavalca

1. Microorganismos. 2. Microbiologia agrícola. 3. REMA.
4. Cancro cítrico. I. Título.

Dedico este trabalho à minha família e amigos

"I've lived a life that's full, I traveled
each and every highway,
and more, much more than this.
I did it my way."

FRANK SINATRA, *My Way*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer todos que me acompanharam durante estes anos de graduação e que me motivaram a seguir nesta carreira incrível que é a do biólogo. Durante a minha vida, me deparei com diversas escolhas e opções que me levaram a trilhar este caminho que visa o conhecimento e a curiosidade sobre a vida e o mundo.

Gostaria de agradecer aos meus pais Luiz e Lucília e a minha irmã Laís por todo apoio e carinho que recebi durante minha vida. Agradeço por todos os conselhos que recebi para poder escolher as melhores decisões nos momentos difíceis e por todo o investimento em minha carreira. Obrigado por respeitarem minhas escolhas e por não me fazer desistir de todas as oportunidades que ocorreram durante estes longos anos. Seu retorno será imenso.

Além dos amigos da minha turma de graduação, também gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz na UNESP de Rio Claro. Para minha turma CBI 2011, agradeço por todos os momentos inesquecíveis, pelo companheirismo e, mais que tudo, pelas amizades que perpetuarão por muitos anos. Vocês foram muito importantes nessa jornada de estudos e trabalhos, tornando cada experiência, sendo em campo ou em sala de aula, aventuras que serão para sempre marcadas em minha vida. Obrigado pelas amizades, pelos risos, pelas brincadeiras e pelas loucuras que fizemos durante estes 5 anos!

Agradeço todos os integrantes da República Mojitos (pessoas e animais) pelos momentos divertidos e criativos, além da experiência de como morar e conviver em grupo. Tivemos bons e maus momentos, porém, são memórias que devem e serão contadas durante nossos encontros no futuro. Gostaria de agradecer a Franciele pela força e carinho. Você esteve ao meu lado nos momentos difíceis e de dúvidas durante os momentos finais da minha graduação. Sua presença me deu forças para a conclusão deste trabalho.

Este trabalho não poderia ser possível sem o apoio e a estrutura do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) e todos os seus integrantes. Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Ferreira e a minha co-orientadora Lúcia Bonci Cavalca por todo conhecimento dado e principalmente pela paciência durante todas as instruções e todos experimentos feitos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente, agradeço à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro, ao CNPq e ao PIBIC por todo o aprendizado e infra-estrutura para minha formação.

RESUMO

A bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é responsável por causar a doença conhecida como cancro cítrico. Tal doença gera lesões necróticas na forma de pequenas erupções na superfície das folhas, frutos e ramos de variadas espécies de Citrus. A escolha do ramnolipídio (biosurfactante) no combate ao cancro foi baseada nas suas propriedades antifúngicas e sua atividade lítica contra zoósporos de patógenos de plantas. Além disso, os ramnolipídios possuem baixa toxicidade, atraindo grande interesse na substituição à atual forma de contenção de Xac, que consiste na pulverização de formulações cúpricas nos pomares. Do ponto de vista de toxicidade e acúmulo de cobre no solo e frutos, a utilização de ramnolipídios como antimicrobiano para Xac garantiria a redução desses resíduos. A linhagem Xac 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) foi cultivada a 29 °C em meio NYG e o ramnolipídeo foi obtido por doação de nossos colaboradores a partir da produção do micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1. A técnica de REMA avaliou a atividade antimicrobiana do ramnolipídio comparado, também, a uma solução cúprica já comercializada (Difere), realizando-se microdiluições cuja maior concentração testada para o ramnolipídio foi de 2000 µg.mL⁻¹, enquanto que para o cobre foi de 1000 µg.mL⁻¹. Os testes de mínima concentração bactericida (MBC) verificaram se na concentração inibitória mínima (CIM) 90, determinada pelas análises quantitativas feitas através do REMA, há morte das bactérias ou se há crescimento bacteriano, nas determinadas concentrações. Os Testes de patogenicidade foram realizados por infiltração dos compostos nas folhas do hospedeiro laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). A maior concentração de ramnolipídeo (2000 µg mL⁻¹) atingiu a média de 98,6% de morte celular. Nos testes de MBC foi possível identificar que, na região destinada a esta concentração de biosurfactante, não ocorreu crescimento de bactérias durante o seu período de incubação (24 horas), possibilitando interpretar uma possível propriedade antibacteriana do ramnolipídeo nesta concentração, promovendo a morte celular. Nos testes de patogenicidade, inicialmente, as folhas com infiltração de Xac tratadas com ramnolipídeo na concentração de 2000 µg.mL⁻¹ não apresentaram sintomas de cancro, porém desenvolveram colônias 4 semanas após os testes.

Palavras-chave: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, cancro cítrico, ramnolipídio, REMA

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 08
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 10
2.1	A citricultura no Brasil 10
2.2	Histórico do Cancro 11
2.3	<i>Xanthomonas citri subsp. citri</i> 12
2.4	Sintomas do cancro 13
2.5	Erradicação 14
2.6	Surfactantes Sintéticos 16
2.7	Biosurfactantes..... 17
2.8	Ramnolipídeos 18
3	MATERIAL E MÉTODOS 20
3.1	<i>Xanthomonas citri subsp. Citri</i> 20
3.2	Oxicloreto de cobre..... 20
3.3	Ramnolipídeo 20
3.4	Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) 21
3.5	Avaliação da Mínima Concentração Bactericida/Bacteriostática (MBC) 23
3.6	Teste de Patogenicidade 23
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES 26
5	CONCLUSÃO 34
6	REFERÊNCIAS 35

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas cítricas, sendo o Estado de São Paulo o responsável pela maioria da produção nacional com mais de 600 mil hectares de área devotada a esta produção (NEVES *et al.*, 2010). O país detém atualmente um terço da produção mundial de suco de laranja exportando 70% desta produção (USDA, 2016). Esta fatia da economia brasileira gerou valores na ordem de US\$ 2 milhões ao ano em exportação (NEVES *et al.* 2010).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é um fitopatógeno responsável pelo cancro cítrico, uma doença que atinge todas as principais variedades cultivadas de citros causando danos extensos nos pomares, sendo que a severidade da infecção varia de acordo com a espécie e condições climáticas (DAS, 2003). Essas bactérias causam lesões necróticas envoltas por um halo clorótico em frutos, folhas e ramos de variedades de citros, diminuindo a qualidade e quantidade da produção (FUNDECITRUS, 2008). Tais sintomas, além de comprometer os pomares, resultam em danos significativos na economia pois torna o fruto inaceitável para a venda e diminuem as exportações (DAS, 2003).

O estado de São Paulo, o qual é responsável pela produção de 75% das laranjas no Brasil, teve seu primeiro caso de Xac detectado em 1957 (BITANCOURT, 1957). Em vista da proliferação do patógeno nas zonas rurais brasileiras, medidas rigorosas foram adotadas no estado de São Paulo, as quais obrigavam o produtor rural a eliminar todas as plantas nos pomares que apresentassem incidência de cancro e as adjacentes em um raio de 30 metros (SÃO PAULO, 1999). Posteriormente, a partir da metade de 2009, a legislação foi amenizada. Como consequência, ocorreu aumento do número de caso de cancro cítrico no estado, tornando-o endêmico em diversas regiões paulistanas (SANCHES *et al.*, 2014).

No sul do Brasil, o combate ao cancro se dá por medidas de manejo integrado como o cultivo de exemplares de citros genotipicamente mais resistentes, plantio de quebra-ventos e uso de formulação cúpricas nos pomares (BELASQUE Jr.; BEHLAU, 2011). Estas práticas acarretam no aumento dos custos de produção e não são tão efetivas na prevenção da disseminação da bactéria. Além disso, a pulverização de cobre é conhecida por deixar resíduos cúpricos no solo e também por induzir resistência dos micro-organismos fitopatógenos através do uso frequente

da aplicação de solução cúprica no campo (CANTEROS, 1999). Dessa forma, a necessidade de desenvolver alternativas menos agressivas e danosas para os pomares é de grande importância para a citricultura brasileira. As pesquisas nos biossurfactantes, especialmente o ramnolipídeo, para combater a Xac, a fim de prevenir a disseminação da doença, pode indicar um possível substituto ao oxiclreto de cobre e também impedir o acúmulo de compostos tóxicos no solo.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1. A citricultura no Brasil

A laranja, originária do sudeste asiático, foi trazida ao Brasil logo no início da colonização e se desenvolveu inicialmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. No país, sua adaptação ocorreu rapidamente devido as condições do solo e clima favorável para o seu cultivo, expandindo-se por todo o território nacional e gerando um forte concorrente internacional na agroindústria. A eficiência da cadeia citrícola brasileira já é muito conhecida pela variedade e qualidade de produtos cítricos, do cuidado com os pomares e até a excelente distribuição para os mercados europeus, norte americanos e asiáticos, gerando, desde o começo da indústria da laranja, quase 60 bilhões de dólares ao Brasil (NEVES, 2010).

Atualmente a produção mundial de laranja é de aproximadamente 45,8 milhões de toneladas por ano e cobrem milhões de hectares no mundo (USDA, 2016). O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de laranja, gerando em média 17 milhões de toneladas de laranjas ao ano e atualmente produz 1,573 milhão de toneladas de suco concentrado (FCOJ, sigla em inglês) para o mercado internacional (FAO, 2015). Os Estados Unidos também é um dos gigantes no setor da citricultura, responsável por 5,4 milhões de toneladas de laranja anualmente, sendo o estado da Flórida o maior contribuinte dessa produção. Juntos, os dois países concentram quase metade da produção mundial (USDA 2016).

O cinturão citrícola brasileiro concentra-se entre o estado de São Paulo, Triângulo Mineiro e Sudeste de Minas Gerais, produzindo ao todo 300 milhões de caixas das principais variedades de laranja no Brasil (PES, 2016). Somente no Estado de São Paulo é responsável por 73% da produção nacional (IBGE, 2014). Segundo o Inventário de Árvores do Cinturão Citrícola, realizado pela Fundecitrus (2015), a área total de pomares de citros chega a ser 482.591 hectares espalhadas entre seus 349 municípios. Em São Paulo, a laranja é a fruta cítrica com maior área plantada, com mais de 444 mil hectares plantados, seguida por limas ácidas e limões com quase 28 mil hectares e por tangerinas com 10 mil hectares espalhados.

Entretanto, a produção de frutas cítricas, tanto da produção nacional quanto a internacional, vem sofrendo o aumento de problemas fitopatógenos que causam

graves prejuízos para a agroindústria, diminuem a qualidade e influencia negativamente nas exportações do suco de laranja para os mercados externos. Por estas razões, foi investido massivamente em tecnologias e pesquisas na citricultura brasileira na última década a fim de manter a rentabilidade e diminuir os impactos provocados por pragas e doenças no campo, como o cancro cítrico (*Xanthomonas citri*).

2.2. Histórico do Cancro

A origem geográfica do cancro cítrico ainda é incerta, mas acredita-se que a doença surgiu nas áreas tropicais do sudeste da Ásia, como o sul da China, Indonésia e Índia (DAS, 2003), locais presumidamente considerados o centro de origem dos citros. O primeiro relato do cancro foi realizado na Inglaterra em exemplares herborizados de *Citrus medica*, mantidas no Royal Botanic Gardens, coletados entre 1827 a 1831 no Noroeste da Índia (BITANCOURT, 1957; FAWCETT; JENKINS, 1933). Porém, a primeira descrição da doença foi feita nos Estados Unidos, nos estados do Golfo, por volta de 1910, em mudas de citros provenientes do Japão (STALL; SEYMOUR, 1983).

O cancro foi disseminado através da Ásia, centro e sul da África, Oriente médio, Austrália, Nova Zelândia, Ilhas do Pacífico, América do Sul e sudeste dos Estados Unidos (CABI/CMI 1996; SCUBERT *et al.* 2001; GOTTWALD *et al.* 2002). Entretanto, a doença é registrada como eliminada nas regiões da África do Sul e Austrália, bem como nos estados do Golfo, resultado obtido através de programas de monitoramento, inspeção de pomares, quarentena e até mesmo a queima de plantas contaminadas (GOTTWALD, 2000).

No Brasil, a primeira ocorrência de cancro foi registrada em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (BITANCOURT, 1957), muito provavelmente provindo de materiais importados da Ásia. Apesar dos esforços adotados naquele mesmo período, incluindo uma campanha rigorosa de erradicação do cancro cítrico, a doença acabou se espalhando para os estados do Mato Grosso do Sul e Paraná (AMARAL, 1957) devido ao comércio de mudas cítricas infectadas.

Tal campanha também encontrou grande resistência por parte dos citricultores e alguns setores governamentais que contestaram o seu rigor e forma de aplicação (BELASQUE Jr. *et al.*, 2009). Apesar de apresentar incidência

relativamente baixa no Estado de São Paulo, o cancro cítrico se encontra estabelecido endemicamente em algumas regiões do país e sua presença foi recentemente registrada em novas áreas do território nacional e da América do Sul (BARBOSA *et al.*, 2001; BRAITHWAITE *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2003). Atualmente, apenas o Estado de São Paulo e a Austrália adotam programas de erradicação do cancro cítrico pela eliminação de plantas em áreas infestadas pelo patógeno (ADRIAANSEN, 2005; SÃO PAULO, 1999). Desta forma, torna-se prioritária a avaliação de métodos alternativos de manejo desta doença.

2.3. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xac) é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia obrigatória, com formato de bastonete medindo entre 1,5 - 2,0 µm de comprimento por 0,5 - 0,75 µm de largura. Sua motilidade é proporcionada por um único flagelo na posição polar (BEDENDO, 1995; GALLI, 1980). Seu desenvolvimento ocorre em torno de 29,5 e 39 °C, com a formação de colônias de aspecto mucóide semelhante a uma goma de tonalidade amarela, devido a produção de pigmento chamado xanthomonadina (BEDENDO, 1995).

Existem atualmente várias doenças de citros relacionadas ao cancro que se distinguem, principalmente, pela patogenicidade e sintomatologia. Entretanto, características genótípicas e fenotípicas são de extrema importância para a identificação acurada de cada *Xanthomonas* spp. (GABRIEL *et al.*, 1989). Cancro cítrico asiático ou cancrose A, tem como a Xac o seu principal agente causador, além de outros patógenos (*Sin. X. axonopodis* pv. *citri* ; *Xanthomonas citri*; *Xanthomonas campestris* pv. *citri*). Este tipo de cancro é o mais disseminado pelo globo, sendo encontrado em diversas regiões da Ásia, África, Oceania e nas Américas, além de afetar todas as variedades de citros (BEDENDO, 1995; CIVEROLO, 1985). Os outros tipos de cancro, como cancro B e C, ambos representados pelo *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* como agente etiológico (SCHAAD *et al.*, 2006), são restritos somente a algumas regiões das Américas e são limitadas a algumas espécies de lima (BEDENDO, 1995).

2.4. Sintomas do cancro

Os sintomas causados pelo cancro aparecem na superfície das folhas, ramos e frutos em todas as espécies de citros, na forma de lesões necróticas. Tais lesões têm o aspecto eruptivo, formando um halo clorótico em volta da região entumecida que podem variar entre 2 a 12 mm de diâmetro, dependendo da região afetada (ROSSETTI, 2001). Segundo a Fundecitrus (2008), nas folhas, os primeiros sintomas visíveis são em forma de manchas circulares amareladas de poucos milímetros até progredirem para manchas maiores de tonalidade marrom, de maneira saliente nas duas faces da folha (figura 1.a). Nas frutas, surgem pequenas manchas amareladas, circulares e salientes que, gradativamente, crescem e tornam-se marrons (figura 1.b). Os ramos afetados também apresentam lesões salientes, na forma de crostas pardas (figura 1.c).

Figura 1: (a) folhas de laranjeira com lesões de cancro envolvidas por halos cloróticos (Fundecitrus, 2008) (legenda em cima)



(b) lesões de cancro na laranja (Fundecitrus, 2008)



Figura 1.c: lesões de cancro no ramo de laranja doce (Fundecitrus, 2008)



As lesões de cancro são histologicamente caracterizadas pela grande proliferação de células hipertróficas e pequeno número de células hiperplásicas. Nos primeiros estágios da infecção, suas células aumentam de tamanho e o núcleo e nucleoides escurecem mais facilmente. No entanto, essas células hipertrofiadas não procedem com a divisão celular, sendo este processo apenas detectado nas áreas periféricas da lesão (GOTO, 1992).

O patógeno é incidente em regiões tropicais e subtropicais onde a umidade e temperatura são propícias para o desenvolvimento da doença em citros. A disseminação de *Xac* com infecção de novos órgãos ocorre em decorrência da exsudação da bactéria quando estas são umedecidas pelo orvalho, chuva ou irrigação, penetrando nos tecidos das plantas através de aberturas naturais como os estômatos e hidatódios, bem como em regiões submetidas a ferimentos mecânicos.

O vento também favorece a sua dispersão em grandes distâncias (BOCK *et al.*, 2005), dificultando ainda mais a contenção da doença. Além disso, a infecção bacteriana pode ser facilitada através das injúrias provocadas pelos estágios iniciais da larva minadora de citros *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariida) (BELASQUE Jr.; MASSARI, 2006), formando galerias abaixo da epiderme das folhas que deixam o tecido da planta mais vulnerável (CHAGAS *et al.*, 2001).

Embora o cancro provoque majoritariamente manchas e lesões nas espécies de citros, em condições severas da doença, é possível presenciar desfoliamento e queda prematura de frutos, afetando a produtividade. Geralmente, a qualidade interna dos frutos não é afetada pelo cancro cítrico, porém lesões podem penetrar profundamente na casca, expondo o interior do fruto, tornando-o suscetível a infecções de patógenos secundários (GOTTWALD, 2000).

2.5. Erradicação

Durante os anos de 1999 até 2009, os produtores paulistas enfrentaram uma campanha de erradicação rigorosa que ainda permanece nos dias atuais (BELASQUE Jr., 2009). Foi imposto, na época, pela legislação do Estado de São Paulo, a eliminação obrigatória por queimada de todas as plantas sintomáticas de cancro nos pomares e todas plantas adjacentes em um raio de 30 metros a partir destas (BRASIL, 1999). Em 2009, o governo paulista foi pressionado a alterar a legislação e amenizar as imposições sobre o manejo do cancro cítrico, sendo apenas necessário erradicar todas as plantas dos talhões que apresentassem mais que 0,5% de plantas infectadas e as demais contidas num raio de 30 metros (Resolução SAA n. 43, de 25/06/2009). Como consequência, segundo o levantamento de 2012 da Fundecitrus, ocorreu uma incidência de 1,39% de talhões (pomares cítricos comerciais) com pelo menos uma planta com sintomas do cancro cítrico, registrando a doença como endêmica em algumas partes do estado (SANCHES *et al.*, 2014). O índice de talhões contaminados com a doença apresentou aumento expressivo de 893% em todo o estado após três anos da aprovação da legislação (FUNDECITRUS, 2016). Mais recentemente (Resolução SAA - 147, de 31-10-2013), houve nova alteração de legislação, na qual não é mais obrigatório fazer a erradicação das plantas que estiverem em um raio de 30 metros de uma planta contaminada com cancro cítrico.

Por outro lado, em outras regiões do Brasil, as medidas de erradicação da doença são menos drásticas e não é obrigatória a eliminação das plantas infectadas, adotando demais estratégias de contenção da bactéria (BELASQUE Jr.; BEHLAU, 2011). No Paraná, por exemplo, o cancro já se encontra endêmico em suas plantações. Nesta região, assim como na Argentina, os produtores utilizam medidas de manejo integrado como o cultivo de plantas com genótipos menos susceptíveis, plantio de quebra-ventos como barreira contra o espalhamento da doença e pulverização de formulações cúpricas (BELASQUE Jr.; BEHLAU, 2011).

Os quebra-ventos arbóreos são considerados uma das formas naturais de contenção da doença por reduzir a severidade da infecção em situações endêmicas. A redução da velocidade do vento diminui a probabilidade do Xac de penetrar diretamente nas folhas a partir da abertura estomática e dos ferimentos. Na Argentina, o número de lesões provocadas pelo cancro foi dez vezes maior no lado das laranjeiras expostas a ventos constantes do que no lado protegido por outras plantas de eucalipto, com três metros de altura acima do nível do solo, como suporte de cortinas quebra-vento instaladas um metro e meio acima das copas das laranjeiras, reduzindo em 20% a velocidade do vento (TIMMER *et al.* 2006).

Outra medida adotada, principalmente no Brasil e nos Estados Unidos (Flórida), é a aplicação de formulação cúprica nos pomares como controle químico da bactéria. Segundo Amaral (2003), esta medida é de caráter curativo, ou seja, o controle é realizado após constatação de que a planta já foi infectada pela *Xanthomonas*. Entretanto, Behlau *et al.* (2010), afirmaram que os bactericidas a base de cobre são de caráter exclusivamente preventivo com nenhuma propriedade curativa. Nas folhas, o cobre aplicado é predominantemente insolúvel e, uma vez aplicado, as partículas de cobre se aderem a superfície das folhas formando um barreira protetiva (MENKISSOGLU; LINDOW, 1991). Frutas são mais fáceis de proteger, pois possuem um crescimento lento e são apenas suscetíveis a infecções após a abertura estomática (TIMMER, 2006) quando estas crescem de 2 a 6 milímetros de diâmetro em um período de 90 a 120 dias, dependendo da espécie de citros (GRAHAM; GOTTWALD, 2003).

Os bactericidas de formulação cúprica mais utilizados para o combate ao cancro são à base de oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso (MANUAL FUNDECITRUS). Entretanto, a contenção da doença por estes compostos depende de vários fatores: suscetibilidade dos cultivares de citros; idade

das plantas; as condições ambientais; e a adoção de outras medidas de controle (GOTTWALD *et al.*, 2002). Dependendo do tipo de contenção adotada e da sua forma de manejo, pode induzir a um aumento significativo da pulverização de cobre sobre os pomares.

Práticas de proteção agrícola aumentam o custo da produção de laranja e sua efetividade pode se tornar questionável na erradicação e prevenção de novas infecções ou tentativas na luta contra a disseminação de Xac. O uso contínuo de compostos a base de cobre nos pomares levam à contaminação do solo na medida que a pulverização acumula resíduos sobre as frutas e solo, podendo induzir o surgimento de cepas mais resistentes (CANTEROS, 1999) diminuindo sua eficácia. Diante desses problemas na erradicação do cancro na citricultura, o desenvolvimento de novos compostos ecologicamente corretos para o combate de Xac se faz urgentemente necessário para, não somente prevenir a disseminação da doença, como também impedir o acúmulo de compostos tóxicos no solo.

2.6. Surfactantes sintéticos

Os surfactantes ou tensoativos, constituem uma importante classe de compostos químicos que podem ser utilizados em diversas aplicações industriais como na detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT, *et al.*, 2000). São moléculas anfifílicas que possuem regiões com polaridades distintas. A parte apolar da molécula é comumente constituída por uma cadeia carbonada enquanto a parte polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (atuando tanto como um ácido ou como uma base) (NITCSHKE; PASTORE, 2002).

A característica anfifílica da molécula faz com que os surfactantes tendam a espalhar preferencialmente na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, tais como água/óleo e vice-versa (LOVAGLIO, 2011). Essas moléculas compõem um filme molecular nas interfaces que são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial. A sua eficácia como surfactante é medida a partir da energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior para a superfície (ROSEN, 1978, apud MULLIGAN, 2005).

Os surfactantes possuem várias propriedades funcionais conhecidas e exploradas em diversos setores industriais e também são requeridos dentro da área

agrícola (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013), entretanto, estes compostos podem gerar prejuízos ambientais significativos nas suas aplicações. Segundo Sachdev e Cameotra (2013), 0,2 milhões de toneladas de surfactantes eram empregados na proteção da lavoura e na formulação de agrotóxicos. Outro ponto negativo é relacionado a sua matéria prima. A grande maioria dos surfactantes são obtidos a partir de derivados de petróleo, exigindo a busca de novas alternativas para a produção de surfactantes naturais e menos danosos para o meio ambiente.

2.7. Biosurfactantes

Os biosurfactantes ou biotensoativos, são compostos naturais de origem microbiana que possuem características similares aos surfactantes sintéticos. São sintetizados a partir de subprodutos dos sistemas metabólicos dos microorganismos mais bem estudados, tais quais os fungos filamentosos, leveduras e bactérias são seus principais produtores, utilizando diferentes fontes de carbono (BANAT *et al.*, 2000; DESAI; BANAT, 1997).

A classificação dos biosurfactantes é diferente dos surfactantes sintéticos, que se baseiam de acordo com o seu grupo polar. Estes compostos naturais obtidos por microorganismos podem ser categorizados dependendo de sua natureza bioquímica (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993). Estes também podem ser divididos a partir de sua massa molecular em: biosurfactantes de baixa massa molecular incluindo glicolipídeos, fosfolipídeos e lipopeptídeos; e biosurfactantes de alta massa molecular incluindo polissacarídeos anfifílicos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas de biopolímeros (PALUSINSKA-SZYSZ *et al.*, 2011).

Os biosurfactantes possuem diversas vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos. Eles podem ser produzidos a partir de fontes renováveis e resíduos industriais, possuem baixa ou nenhuma toxicidade, alta especificidade, são efetivos em condições extremas, tais como de alta salinidade e ampla faixa de pH, possuem grande diversidade estrutural e alta biodegradabilidade (BENINCASA *et al.*, 2008; LOVAGLIO *et al.*, 2011; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Devido à estas características, as indústrias farmacêuticas, químicas, cosméticos, de alimentos e

agrícolas têm grande interesse em investir nestes compostos, com o intuito de oferecerem para o mercado produtos naturais e mais apropriados para a preservação do meio ambiente (LIN, 1996).

2.8. Ramnolipídeos

Dentre as diversas classes de surfactantes naturais, o biossurfactante do tipo glicolipídeo denominado ramnolipídeo vem se destacando nos últimos anos. Produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, sua porção hidrofílica é composta por moléculas de ramnose e sua porção hidrofóbica é constituída por ácidos 3-hidroxiálcanóicos, assim descrito por Jarvis e Johnson em 1949. Estes biotensoativos produzidos pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* podem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m^{-1} para 25 a 30 mN m^{-1} (PARRA *et al.*, 1989).

O grande interesse das indústrias em desenvolver as propriedades dos ramnolipídeos está ameaçando cada vez mais a produção de surfactantes sintéticos. Possui aplicações na remoção de petróleo em áreas contaminadas (COSTA *et al.*, 2010), na composição de detergentes e outros produtos de limpeza devido a sua excelente propriedade de emulsificação. Nas indústrias farmacêuticas e terapêuticas os seus interesses geram em torno de sua atividade antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos (*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), assim descrito por Magalhães e Nitschke, 2013. Outra aplicação do ramnolipídeo é o seu uso como tratamento de pele pelas indústrias de cosméticos (PILJAC; PILJAC, 2007).

Em relação à agroindústria, os biotensoativos também têm atraído atenção por demonstrarem atividade contra diversos patógenos agrícolas e possuírem uma baixa toxicidade, o que permite seu uso frente a microrganismos fitopatógenos. Possui atividade antibiótica contra bactérias Gram-negativas como a *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumonia*, e Gram-positivas como *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. (ARINO *et al.*, 1998; VASILEVA-TONKOVA *et al.*, 2011), muito possivelmente por conta de sua interação com a parte ativa da fosfatidiletanolamina das membranas celulares (SANCHEZ *et al.*, 2006; STIPCEVIC *et al.*, 2006). Segundo Sotirova (2008), esses surfactantes naturais podem intercalar dentro das

membranas celulares e destruí-las pelo seu poder de permeabilização. De acordo com Kim *et al.* (2000), soforolipídios e ramnolipídios, foram utilizados para combater os fungos causadores de manchas cinzas e moles em tomates e maçãs.

Há relatos de que os ramnolipídios podem ser utilizados para a proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinerea*, pois inibem a germinação de esporos, bem como o crescimento do micélio (VARNIER *et al.*, 2009). Vatsa *et al.* (2010) relataram em sua revisão a atividade antifúngica dos ramnolipídios, contra diversos microorganismos patógenos de plantas, tais como *Botrytis* sp, *Rhizoctonia* sp, *Pythium* sp, *Phytophthora* sp. e *Plasmopara* sp. Os ramnolipídios também demonstraram atividade lítica contra zoósporos de outros fitopatogênicos (VARNIER *et al.*, 2009). Nestes casos, promoveram a lise através da interação do ramnolipídio com a membrana plasmática dos zoósporos, o que leva à morte por extravasamento celular. Ainda relacionado à proteção de plantas contra seus patógenos, recentemente foi relatado que os ramnolipídios podem ativar o sistema imunológico de *Arabidopsis thaliana*. Quando em contato com esse biossurfactante a planta acumulou moléculas sinalizadoras e ativou os genes de defesa. Essa resposta participa da resistência contra bactérias hemibiotróficas e também fungos biotróficos, tais como *Pseudomonas syringae* e *Botrytis cinerea*, respectivamente (SANCHEZ *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que os ramnolipídios podem ser utilizados como fungicidas em plantas, tanto na forma pura como misturados ao caldo fermentado livre de células. A aplicação do produto não purificado atualmente vem sendo explorada pelas indústrias, pois leva a uma redução nos custos da produção do tensoativo, tornando-o mais competitivo em relação aos antifúngicos comerciais sintéticos (SHA *et al.*, 2012). Outra alternativa mais economicamente viável é a utilização de subprodutos para a produção dos biossurfactantes. Os resíduos gerados por monoculturas ou pelas indústrias de óleos e gorduras, por exemplo, podem ser aproveitados como nutrientes para estes microorganismos produtores de biotensoativos (LOVAGLIO, 2011). Em testes realizados por Costa *et al.* (2008), demonstraram que a borra de soja e o óleo de soja podem ser usados como substratos alternativos para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* sp. Tais alternativas podem ser, não somente uma vantagem econômica, mas também ambiental, pelo reaproveitamento de resíduos, que são descartados por diversas indústrias, reduzindo a poluição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

A linhagem Xac 306 (WT – wild type ou linhagem selvagem) proveniente do Laboratório de Genética Bacteriana, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Unesp Rio Claro, utilizada no presente estudo foi sequenciada (da SILVA *et al.*, 2002). Para a preservação do microorganismo, seu estoque foi guardado a -80 °C. As bactérias em teste foram resgatadas em meio contendo uma combinação de glicerol (20mL/L), extrato de levedura (3g/L) e peptona (5g/L) (NYG, sigla em inglês) com ágar e incubadas por 48 horas a 29 °C. Após o crescimento, a linhagem foi inoculada em 20 mL de meio NYG sob agitação de 200 rpm, a 29 °C, por um período de 20 horas.

3.2. Oxicloreto de cobre

O fungicida oxicloreto de cobre ($[\text{CuCl}_2 \cdot 3 \text{Cu}(\text{OH})_2]$) foi utilizado na sua forma comercial Difere. A concentração inicial utilizada foi de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de meio NYG.

3.3. Ramnolipídeo

O biossurfactante ramnolipídeo foi obtido por doação de nossos colaboradores a partir da produção do micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, o qual é proveniente de um banco de mutantes randômicos do Laboratório de Microbiologia Industrial, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Unesp Rio Claro.

Foram usadas para o experimento concentrações de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e suas respectivas microdiluições.

3.4. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA)

A avaliação da inibição de crescimento bacteriano foi realizada utilizando-se o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) descrito por Palomino *et al.* (2002) com algumas modificações (SILVA *et al.*, 2013).

Cada solução foi previamente preparada e colocada diretamente na placa 96 multiwell no volume inicial de 190 μ L na fileira A. Os controles negativo e positivo foram constituídos, respectivamente, por 90 μ L de meio de cultura livre de células e canamicina 20 μ g.mL⁻¹. As colunas laterais foram preenchidas com água a fim de evitar a evaporação. Nos poços restantes, estes foram preenchidos com 90 μ L de meio de cultura NYG. Tal disposição dos compostos e dos controles são representados seguindo a figura abaixo (figura 2). A seguir, foi realizada a microdiluição dos compostos. Tal passo reduz pela metade as suas concentrações nas fileiras subsequentes.

Figura 2: Esquema da placa multiwell de 96 poços contendo as soluções para o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H2O 100 μ L	Ramno (2000 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Ramno (2000 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Ramno (1000 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Ramno (1000 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Ramno (500 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Ramno (500 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Difere (1000 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	Difere (1000 μ g mL ⁻¹) 190 μ L	CP Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	CN NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
B	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
C	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
D	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
E	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
F	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
G	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L
H	H2O 100 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	NYG 90 μ L	Cana (20 μ g mL ⁻¹) 90 μ L	NYG 90 μ L	H2O 100 μ L

Após as microdiluições, foi adicionado 10 μ L do inóculo em cada poço da placa. Este foi realizado de forma a obter 10⁵ células/ poço em volume final de 100 μ L de meio de cultura. Em seguida, a placa multiwell de 96 poços foi submetida à incubação a 29 °C, por 15 horas.

Após esse período, foram adicionados 15 µl de uma solução de resazurina na concentração de 100 µg mL⁻¹ em água destilada estéril, que reagiu por menos de 2 horas. Este experimento foi realizado em triplicatas. O teste que se baseia na redução da resazurina por meio da desidrogenase microbiana mostra que a resazurina atua como um aceptor de elétrons e, dessa forma, muda de cor na presença da enzima desidrogenase ativa, que é proveniente da cultura de bactérias em crescimento. Essa reação de redução só ocorre se houver um sistema de transporte de elétrons microbiano, através da enzima desidrogenase microbiana, ou seja, pode-se utilizar tal reação para quantificar atividades metabólicas de respiração e crescimento de uma cultura bacteriana pura. Se o microrganismo está morto, a desidrogenase microbiana não estará ativa, logo a redução de resazurina não ocorrerá e a placa de REMA permanece azul, no espectro visível. Enquanto que, quando o microrganismo está vivo e mantendo suas reações metabólicas, há presença da enzima desidrogenase e ocorrerá a redução da resazurina em resofurina, assumindo a cor rosa, numa placa de REMA. Portanto, a resazurina possui potencial redox com mudança colorimétrica e um indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo dos microrganismos. Esta mudança de cor é detectada em scanner Synergy H1 microplate reader (Biotek) que detecta a fluorescência utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm, respectivamente.

O potencial inibitório de cada tratamento foi expresso pela porcentagem de morte celular, calculada em relação ao controle negativo segundo a fórmula:

Células Mortas(%) =	$\frac{\text{UAF}^1 \text{ do controle negativo} - \text{UAF do teste}}{\text{UAF do controle negativo}}$	* 100
----------------------------	---	--------------

¹UAF: Unidades Arbitrárias de Fluorescência

3.5. Avaliação da Mínima Concentração Bactericida/Bacteriostática (MBC)

O teste de MBC consiste em “carimbar” as *Xanthomonas* tratadas na placa de REMA numa placa de Petri de 15 cm de diâmetro contendo meio NYG com ágar utilizando um replicador de microplaca. Após incubar em B.O.D. a 29 °C, por 24 horas, avaliou-se se houve ou não crescimento microbiano para cada poço da placa de REMA demarcado na placa. O teste de MBC foi realizado em triplicatas.

Ao assimilar o teste REMA com o MBC é possível verificar se na concentração inibitória mínima (CIM) 90, determinada pelas análises quantitativas feitas através do REMA, há morte das bactérias ou se há crescimento bacteriano, naquela determinada concentração. Portanto, é possível afirmar se o composto testado apresenta ação bactericida ou bacteriostática para as concentrações determinadas e estudadas.

3.6. Teste de Patogenicidade

Os testes de patogenicidade realizados utilizaram como hospedeiro a laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação no Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, construída com recursos FAPESP do **processo 2013/14013-7**.

O teste foi realizado por infiltração, no qual utilizou-se Xac selvagem, cultivada em meio NYG até que atingisse a D.O_{600nm} ~ 0,4. Em seguida, a suspensão de células foi diluída 100 vezes na ordem de 10⁶ UFC/ mL no mesmo tipo de meio de cultura e tratadas com as substâncias na faixa de CIM90 pelo período de 15 horas a 29° C sob rotação de 200 rpm. Foram separadas dez plantas para realizar o teste e selecionadas 5 folhas por planta para serem tratadas tanto com o composto a ser testado (região esquerda da folha) e o inóculo tratado com o devido composto (lado direito da folha) (figura 3).

Figura 3: exemplo de folha de laranja doce para o teste de infiltração



Aproximadamente 100 μL da suspensão de células foram infiltrados na superfície abaxial das folhas próximas às nervuras com o auxílio de seringas hipodérmicas, sem agulha. Assim, a disposição das plantas encontra-se nos seguintes tratamentos (figura 4):

- a) Plantas sem tratamento (controle).
- b) Plantas contendo linhagem selvagem da bactéria diluída em meio NYG.
- c) Plantas tratadas com Difere na concentração de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- d) Plantas tratadas com ramnolipídio na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- e) Plantas tratadas com ramnolipídio na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

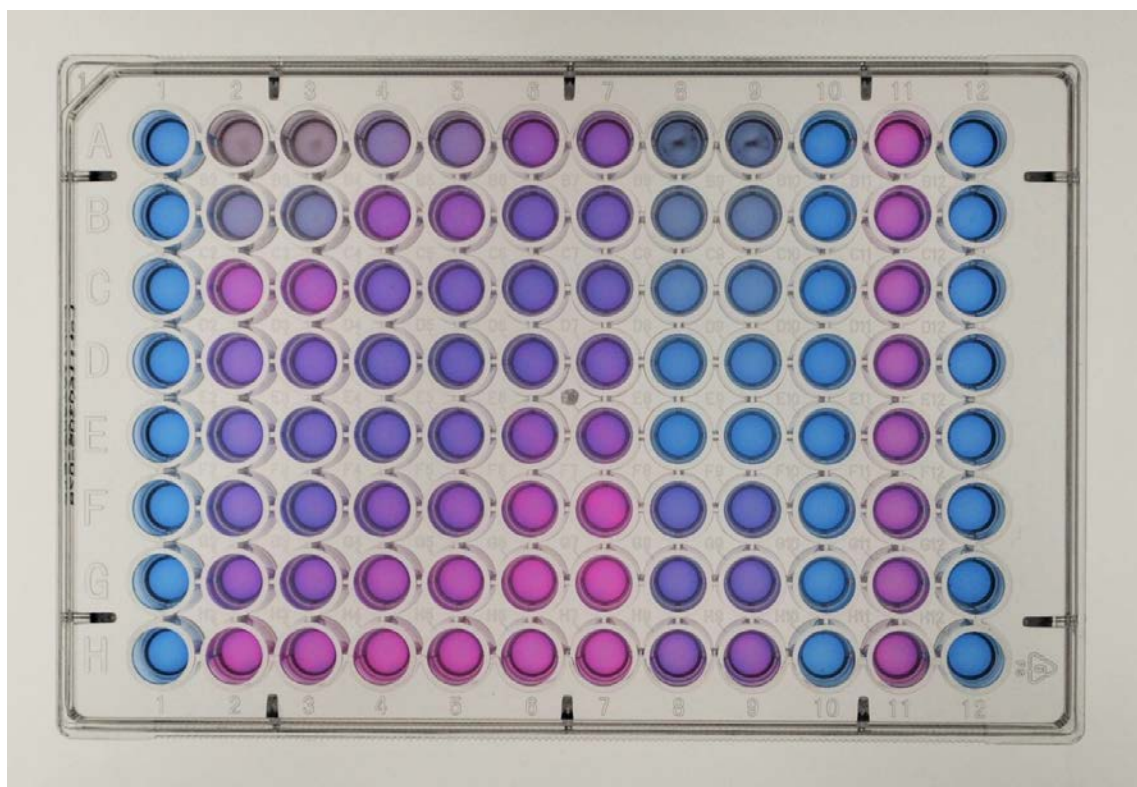
Figura 4: Disposição das mudas de laranja doce para o teste de patogenicidade. Da esquerda para a direita: mudas de plantas sem tratamento, mudas de plantas contendo infiltração de cultura de Xac diluída em meio NYG, mudas infiltradas com cultura de Xac e Difere, mudas de plantas infiltradas com cultura de Xac e ramnolípídeo na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e mudas de plantas infiltradas com cultura de Xac e ramnolípídeo na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise da placa 96 multiwell do método de REMA (figura 5), pode-se observar que a maior concentração utilizada de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (colunas 2 e 3) obteve uma resposta positiva ao apresentar uma coloração de tonalidade menos rosada em comparação às outras concentrações de ramnolípídeo (colunas 4 a 7). Por outro lado, na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aparenta ter uma tonalidade mais rosada, demonstrando que esta concentração não seja a ideal para o controle de Xac.

Figura 5: placa de REMA após 2 horas da aplicação da resazurina.



Tal resultado pode ser melhor analisado pelo exemplo de tabela de fluorescência (tabela 1) proporcionado pelo scanner, no qual a fluorescência emitida na maior concentração de ramnolípídeo (média de 561 UAF) pode ser equiparável a fluorescência de Difer a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média de 507 UAF). Nas concentrações de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as duplicatas não apresentaram resultados semelhantes entre si, variando a fluorescência emitida, chegando a intervalos muito grandes entre aproximadamente, 7200 à 17000 UAF.

Tabela 1: Exemplo do esquema de placa de REMA demonstrando a emissão de fluorescência dos compostos testados nas suas respectivas concentrações. Quanto mais forte a tonalidade de azul, maior a quantidade de UFA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	H ₂ O	Ramno 2000	Ramno 2000	Ramno 1000	Ramno 1000	Ramno 500	Ramno 500	Difere 1000	Difere 1000	CP	CN	H ₂ O	
A	1710	584	582	14892	17731	34798	31696	232	248	1835	42667	1582	530.59
B	1619	7286	7653	38913	37708	31236	31288	546	555	1943	40064	1503	530.59
C	1664	39629	40849	31340	31247	33494	33106	819	860	1834	39477	1581	530.59
D	1654	30167	31414	33249	33439	36978	38262	1094	1063	2269	39919	1593	530.59
E	1631	29902	31399	32897	36854	43529	43448	1245	1195	1846	38238	1594	530.59
F	1690	30663	31341	37593	41439	42015	42270	18013	18978	1834	37508	1586	530.59
G	1530	35305	37277	39310	40367	40867	40523	24149	25624	2024	36479	1648	530.59
H	1584	39435	39364	39451	40886	40984	41077	34964	39364	1733	39171	1556	530.59

Em relação a porcentagem de morte celular (tabela 2), a maior concentração de ramnolipídeo atingiu a média de 98,6% de morte celular, demonstrando uma possível ação antibacteriana. As concentrações de 1000 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹ apresentaram resposta no intervalo de 60 a 70% de morte celular.

Tabela 2: média de porcentagem de morte celular das triplicatas do teste de REMA.

%	Rema 1	Rema 2	Rema 3	Média
CP	95.658	96.04	95.114	95.604
Difere	99.415	99.415	99.387	99.40567
2000	98.735	98.739	98.512	98.662
1000	67.123	60.318	69.659	65.7
500	39.354	23.411	4.911	22.55867
250	55.171	40.135	20.604	38.63667
125	60.164	50.476	17.246	42.62867
62.5	57.9	53.119	11.973	40.99733
31.25	39.279	31.936	0	35.6075
15.625	14.476	10.264	0	12.37
7.8	9.93	5.43	0	7.68
3.9	7.72	3.771	0	5.7455

Entretanto, questionamos a veracidade de alguns resultados obtidos do teste já que na maioria dos testes realizados, as concentrações de ramnolipídeo apresentavam resultados inesperados das nossas suposições. A concentração de 500 µg mL⁻¹, por exemplo, apresentava taxas de fluorescência maiores do que em concentrações menores do que esta. Além disso, a concentração de 1000 µg mL⁻¹ raramente apresentava a mesma taxa de fluorescência entre as duplicatas.

Realizado outro REMA, porém sem a presença do inóculo e somente com os compostos, nos mesmos padrões, foi possível perceber que, após um período de 24 horas, os poços contendo todas as concentrações de ramnolipídio apresentaram-se de coloração rosa. Este resultado indica que a resazurina utilizada para avaliar a fluorescência reage com o ramnolipídio, resultando em falsos negativos (figura 6). Outros trabalhos têm relatado o uso de diferentes concentrações de resazurina significativamente mais altas que o presente estudo (ELSHIKH *et al.*, 2016). Quando altas concentrações do corante foram testadas, com bactérias não tratadas por outros compostos, resultados falsos negativos foram obtidos, os quais podem ser atribuídos à falta de habilidade da bactéria de metabolizar a resazurina nessas condições altas (SINGH *et al.*, 2014). Nos experimentos de Singh *et al.* (2014), utilizou-se nos testes de viabilidade celular 6,7 mg mL⁻¹ de resazurina, concentração que resultou em elevado efeito antibacteriano contra os patógenos testados.

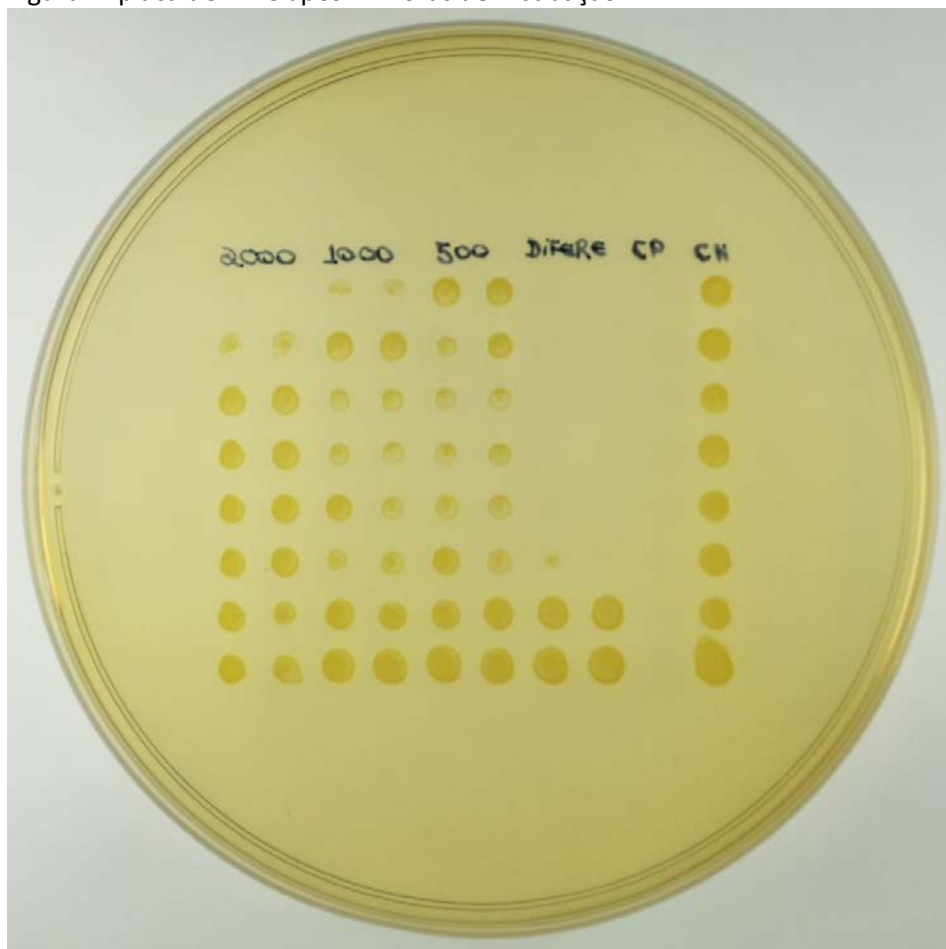
Figura 6: Placa de REMA sem inóculo 24 horas após a aplicação da resazurina. Os poços com coloração rosa contém ramnolipídeo nas concentrações de 2000 µg mL⁻¹, 1000 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹.



Apesar dos testes de quantificação de células viáveis estarem comprometidos, os testes de MBC demonstraram resultados consideráveis (figura

7). Na região da placa destinada a maior concentração de ramnolipídio (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), não ocorreu crescimento de bactérias durante o período de incubação (24 horas). É possível interpretar que, nesta concentração, o ramnolipídeo pode ter propriedades antibacterianas, promovendo a morte celular. Comparando os efeitos de todas as concentrações de ramnolipídeo sobre a Xac, com os efeitos do oxiclreto de cobre, a maior concentração do biossurfactante possui resultados semelhantes à concentração de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Meneguim *et al.* (2007), realizaram testes de sensibilidade de Xac utilizando sulfeto de cobre e constatou que ocorreu 13,4% de crescimento bacteriano nos pomares em 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cobre, porém estes não receberam pulverizações regulares do bactericida. Em contrapartida, as culturas de bactérias que receberam aplicações frequentes do produto apresentaram 45% de crescimento bacteriano.

Figura 7: placa de MBC após 24 horas de incubação.

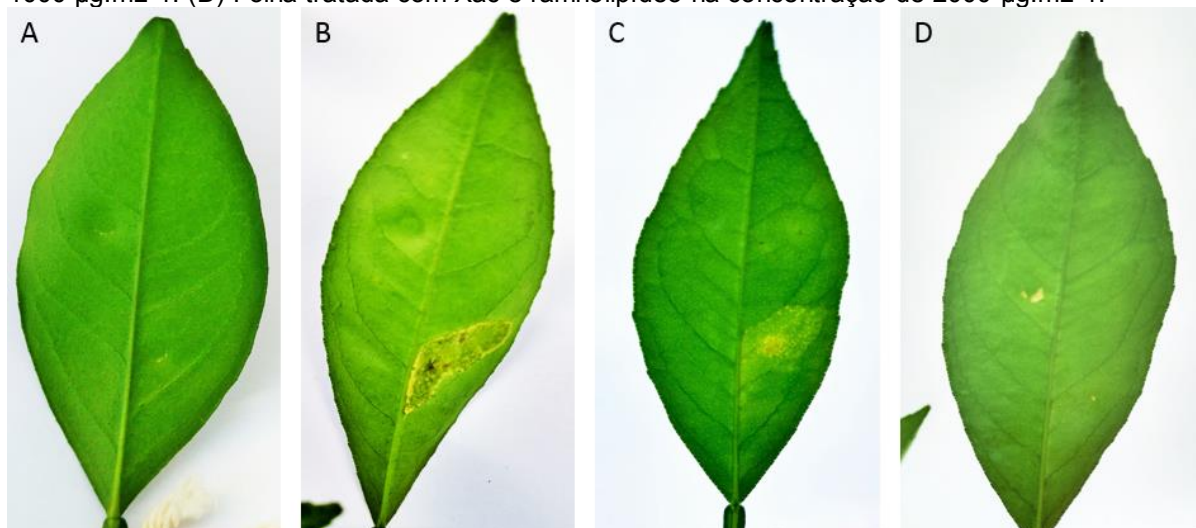


A aplicação contínua de cobre nos pomares pode induzir resistência em populações de *Xanthomonas* e selecionar linhagens de Xac com maior tolerância ao

bactericida. O cobre induz mudanças metabólicas em várias outras bactérias associadas a plantas como *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e *Erwinia amylovora*, sendo possivelmente uma estratégia de sobrevivência destes microorganismos (PALMIERI *et al.*, 2010). *X. axonopodis* pv. *citri*, por exemplo, contém homólogos a genes (*copA*, *copB*, *cutC* e *dsbD*) que podem ser associados à resistência contra níveis tóxicos de cobre, também encontrados em algumas *Pseudomonas* (LEE *et al.*, 1994; MELLANO; COOKSEY, 1988). Outro ponto negativo das soluções cúpricas é que a ação protetiva do cobre diminui quando ventos e a chuva retiram o composto das folhas e frutos de laranjeiras e, além disso, não evitam a contaminação da bactéria para outras plantas (GRAHAM; LEITE, 2004).

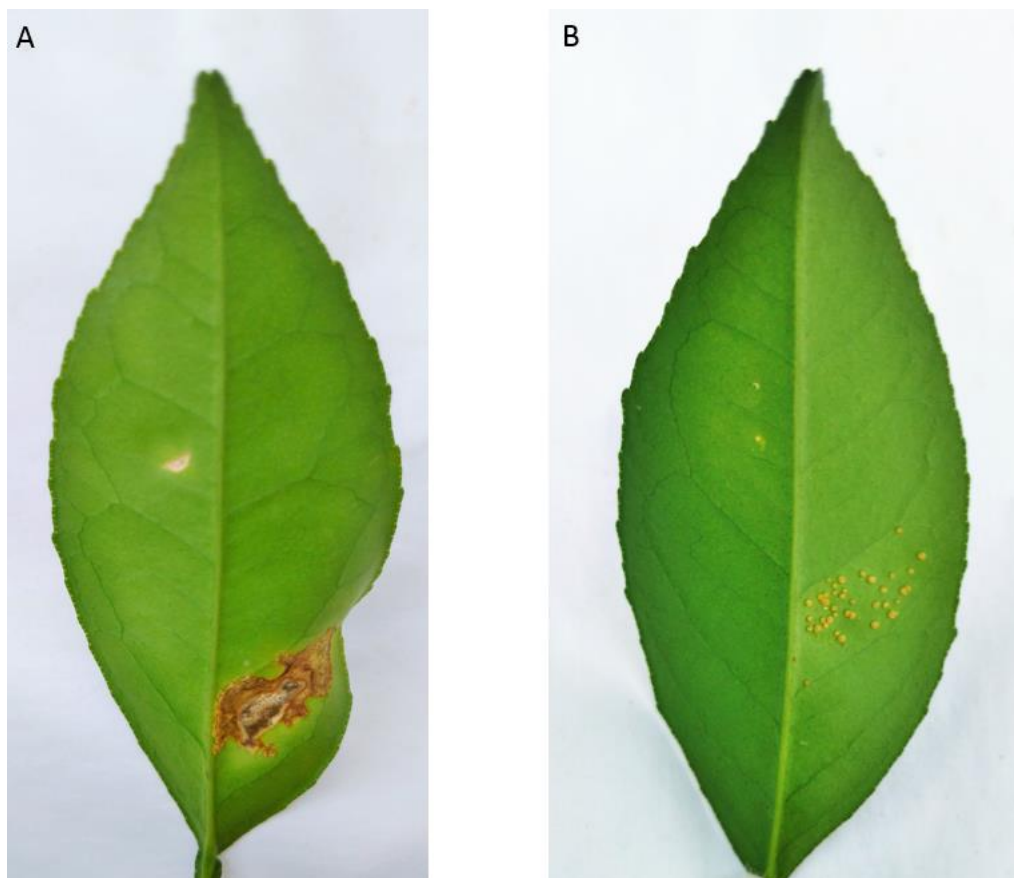
No teste de patogenicidade, ocorreram algumas alterações em relação ao tempo de crescimento e formação de colônias nos experimentos por conta das condições ambientais em que foram realizados, já que em climas mais amenos e baixa umidade a infecção do cancro nas plantas é afetado negativamente, sendo a temperatura ótima da infiltração do cancro entre 25 a 30 °C (GOTTWALD; GRAHAM *et al.* 1992). Os resultados surgiram duas semanas após o processo de infiltração (Figura 8). A infiltração de Xac foi realizada na região abaxial das folhas pois a infecção desenvolve-se mais facilmente devido a densidade maior de estômatos nesta área do que na região adaxial (McLEAN, 1921; GRAHAM *et al.*, 1992).

Figura 8: Teste de patogenicidade em folhas de laranja doce. (A) folha não tratada (controle). (B) folha tratada com Xac e meio NYG. (C) Folha tratada com Xac e ramnolipídeo na concentração de 1000 µg.mL⁻¹. (D) Folha tratada com Xac e ramnolipídeo na concentração de 2000 µg.mL⁻¹.



Nas folhas tratadas com Xac e meio NYG, foi possível notar alguns sintomas clássicos de cancro, como o aparecimento de hiperplasia e hipertrofia na região infiltrada, aparecimento de halo clorótico e algumas manchas necrosadas. Nas folhas infiltradas com Xac e ramnolipídeo a 1000 µg mL⁻¹, ocorreram em sua maioria o aparecimento de região clorótica onde se foi infiltrado o tratamento e pequenas pontuações de caráter eruptivo, demonstrando a formação inicial de colônias. Nos tratamentos realizados com Xac e ramnolipídeo a 2000 µg mL⁻¹, não ocorreu o aparecimento ou evidências de qualquer sintoma de cancro nas folhas selecionadas para o experimento, muito menos qualquer modificação nestas folhas, reproduzindo os mesmos resultados obtidos pelo teste de MBC nas primeiras duas semanas de experimento. No trabalho realizado por Magalhães e Nitscheke (2013), demonstrou que o biosurfactante têm potencial antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*, pois sua CIM de 2500 µg mL⁻¹, registrou pouco mais de 90% da cultura de bactérias sensíveis ao ramnolipídeo. Entretanto, após um período de 4 semanas, foi possível identificar estágio inicial de cancro nas folhas infiltradas com Xac e ramnolipídeo na concentração mais alta, indicando que o composto não induziu morte celular com eficácia, mas retardou os sintomas do patógeno comparado com as folhas infiltradas com o inóculo e o meio de cultura (figura 9).

Figura 9: Teste de patogenicidade em folhas de laranja doce após 4 semanas. (A) Folha infiltrada com Xac e meio NYG. (B) Folha infiltrada com Xac e ramnolipídeo na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Apesar dos testes de REMA não apresentarem resultados com exatidão, ainda assim é possível identificar que o ramnolipídeo pode causar danos no fitopatógeno, que desacelerou a colonização da Xac nas folhas testadas, pois este composto pode aumentar a permeabilidade de sua membrana plasmática (SORTIROVA *et al.*, 2008). Segundo Al-Tahhan *et al.* (2000), existem dois mecanismos que os biossurfactantes aumentem a biodegradação de componentes orgânicos. O primeiro é que os biossurfactantes podem solubilizar compostos hidrofóbicos dentro de estrutura micelares, como polissacarídeos, e o segundo é referente ao poder com que as superfícies das células se tornem mais hidrofóbicas, aumentando a associação da célula com o substrato solúvel. Sanches *et al.* (2010), reportou que diramnolipídeos (glicolipídeo contendo duas moléculas de ramnose) podem alterar as propriedades físico-químicas das membranas celulares, infiltrando-se entre a bicamada fosfolipídica e afetando sua função.

A necessidade do mercado faz com que a busca e o desenvolvimento de novos compostos menos danosos para o meio ambiente sejam intensificados para que estes possam servir de substitutos para os compostos sintéticos. Biossurfactantes têm atraído a atenção de diversas indústrias, incluindo a agroindústria, por serem compostos biodegradáveis e de baixa toxicidade. O ramnolípídeo é um surfactante natural que pode ser utilizado como agente bactericida nas zonas agrícolas e substituir agrotóxicos contendo formulações pesadas para o solo e para as plantas. Apesar do seu alto custo de produção, novos testes estão sendo realizados para que a produção deste biossurfactante seja feita a partir de substratos de baixo custo, como os resíduos da indústrias de alimentos e agroindústria (NITSCHKE *et al.*, 2005), reduzindo também os custos com o tratamento destes descartes.

5 CONCLUSÃO

O uso do teste de viabilidade celular REMA não é o mais adequado para quantificar os efeitos do ramnolipídeo contra a *Xanthomonas citri*, ou outros tipos de patógenos, pois, aparentemente, o composto produzido pela *P. aeruginosa* reduz a rezasurina em resofurina, resultando em falsos negativos, independente da concentração testada. Apesar do teste de viabilidade celular nos impossibilitar a quantificação de células mortas com exatidão, o teste de MBC demonstrou que o ramnolipídeo pode interferir no desenvolvimento da colônia e até mesmo induzir a morte celular da bactéria em concentrações entre 2000 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, equiparando aos mesmos resultados obtidos ao oxicleto de cobre na concentração de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pode-se observar que no teste com folhas infiltradas com Xac e ramnolipídeo na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as quais não retardaram o desenvolvimento das colônias em comparação ao oxicleto de cobre.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p.1323–1336, 2010.
- ADRIAANSEN, C. Current status of citrus canker control programs in Queensland, Australia. In: International citrus canker and huanglongbing research workshop, 2., 2005, Orlando, FL. **Proceedings**, p. 90, 2005.
- AL-TAHHAN, R. A.; SANDRIN, T. R.; BODOUR, A. A; MAIER, R. M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3262–3268, 2000.
- AMARAL, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico 86**, ISSN 0102-0099, 2003.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 769–776, 1998.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial application of microbial surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 30-35. 2001.
- BEDENDO, I. Manchas Foliares In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia. **Agrônômica Ceres**, v. 1, p. 848-858, 1995.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; GRAHAM, J.; LEITE, R. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, p. 300-305, 2010.
- BELASQUE Jr. J.; BEHLAU, F. Current status of citrus canker control in São Paulo state, Brazil: A new chapter in a 50-year book? In: International workshop on *Xanthomonas citri*/citrus canker, 2011, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ferreira H, Belasque Jr. J (Eds), Ribeirão Preto, 2011, p. 13-15. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/wxc/download/workshop_Xanthomonas.pdf> UNESP/FUNDECITRUS>
- BELASQUE Jr. J.; JESUS Jr. W. C. Inoculum concentration and type of inoculation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Laranja**, v. 27, p. 263-272, 2006.

BELASQUE Jr. J.; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. The Success of eradication campaign of Citrus Canker in São Paulo States, Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, R. A. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3843-3849, 2008.

BERGAMIN, F.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Agronômica Ceres. São Paulo, v. 2, 1980.

BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **Biologico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOCK, C. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 71-80, 2005.

BRAITHWAITE, M.; LEITE JUNIOR, R. P.; SMITH, J. J.; BOA, E.; SADDLER, G. S. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia. **Plant Pathology**, v. 51, p. 383, 2002.

Brasil. Diário Oficial da Portaria da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA). **Lei nº 10.212, de 8 de agosto de 1999**. Permite a queimada de restos de culturas cítricas. São Paulo, SP, 1999. Disponível em: <<http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=306>>. Acesso em: 5, Jul. 2016.

CANTEROS, B. I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In *Plant pathogenic bacteria. Proceedings of the International Society of Bacteriology Centre for Advanced Study in Botany*, Mahadevan A. (ed.), Chennai, India: University of Madras, p. 455-459, 1999.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO, P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, v. 37, p. 127-146, 1984.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38, 2008.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LEPIE, F.; DEZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1511-1516, 2010.

COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX INTERNATIONAL - INTERNATIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE (CABI / IMI). **Distribution maps of**

plant diseases, *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Map No. 11. Edition 6. p. 2, 1996.

DAS, A. K. Citrus canker - a review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

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

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of Biosurfactants. In: Kosaric, N. Biosurfactants: production, properties, applications. **Marcel Dekker**, New York, p. 65-97, 1993.

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES (FAO). **Citrus Fruit Statistics 2015**. Available from: <<http://www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>>. Access on: 10, June. 2016.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/incidencia-de-cancro-citrico-aumenta-39-no-estado-de-sao-paulo/13>>. Acesso em: 5 jul. 2016.

FUNDO DA DEFESA DA AGRICULTURA (FUNDECITRUS). **Cancro Cítrico: manual técnico**. p. 3, 2008.

FUNDO DA DEFESA DA AGRICULTURA (FUNDECITRUS). **Manual cancro cítrico medidas essenciais de controle**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/manuais/cancro_essenciais_6.pdf>. Acesso em: 28 maio 2016.

FUNDO DA DEFESA DA AGRICULTURA (FUNDECITRUS). **Fundo da Defesa da Citricultura. Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro – retrato dos pomares em março/2015**. Araraquara, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 5 jul. 2016.

FAWCETT; H. S., JENKINS, A. E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, v. 23, p. 820-824, 1933.

GABRIEL, D. W.; KINGSLEY, M. T.; HUNTER, J. E.; GOTTWALD T. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 14-22, 1989.

GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.; SALGASO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, 2ª Ed. Vol. 2. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

GOTO, M. Citrus canker. In: Kumer J, Chaube HS, Singh US, Mukhopadhyay AN, eds. *Plant Diseases of International Importance*, Vol. III, **Diseases of Fruit Crops**. New Jersey, p. 170-208, 1992.

GOTTWALD, T. R. **Citrus canker**. The Plant Health Instructor, 2000. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, v. 82, p. 930–935, 1992.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**, 2002. Available from: <<http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/>>. Access on: 5, Jul. 2016.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, p. 1319–1325, 1992.

GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P., Jr. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. **Plant Disease**, v.88, p. 745-750, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, v.41, p.44-46, 2014.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v.71, p. 4124–4126, 1949. KIM, B. S.; LEE, J. Y.; HWANG, B. K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. **Pest Management Science**, v.56, p.1029–1035, 2000.

LEE, Y. A.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N. J.; SCHROTH, M. N. Molecular-cloning, chromosomal mapping, and sequence-analysis of copper-resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* : Homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 173–188, 1994.

LIN, S. -C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109–120, 1996.

LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JUNIOR, M. J.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 301-305, 2011.

LOVAGLIO, R. B. **Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2011. 149 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, p. 138–142, 2013.

MASSARI, C. A.; BELASQUE Jr., J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo – Situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja**, v. 27, p. 41-55, 2006.

McLEAN, F. T. A study of the structure of stomata of two species of citrus in relation to citrus canker. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 48, p. 101-106, 1921.

MELLANO, M. A.; COOKSEY, D. A. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4399–4401, 1988.

MENEGUIM, L.; RINALDI, D. A. M. F.; SANTOS, A. C. A.; RODRIGUES, L. S.; SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri ao cobre e mancozeb. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 247-252, 2007.

MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. **Phytopathology**, v. 81, p. 1263–1270, 1991.

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

NASCIMENTO, J.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M.; ARAÚJO, A. E. S. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 81-82, 2003.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1ª ed., Ribeirão Preto, 2010.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593–1600, 2005.

PALMIERI, A. C.; do AMARAL, A. M.; HOMEM, R. A.; MACHADO, M. A. Differential expression of pathogenicity- and virulence-related genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri under copper stress. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 348-353, 2010.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PALUSINSKA-SZYSZ, M.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B.; MAK, P.; CYTRYNSKA, M. Anti-*Legionelladumoffii* activity of *Galleria mellonella* defensin and apolipoprotein III. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 17048–17064, 2012.

PARRA, J. L.; GUINEA, J.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; COMELLES, F.; BOSCH, M. P. Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, *Chicago*, v. 66, p. 141–145, 1989.

PILJAC, T.; PILJAC, G. **Use of Rhamnolipids as Cosmetics**, 2007. Patent no. EP 1056462 B1.

ROSSETTI, V. **Manual Ilustrado de Doenças dos Citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, p. 207, 2001.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97 p. 1005–1016, 2013.

SANCHES, A. L. R. ; MIRANDA, S. H. G. ; Belasque Jr., J. ; BASSANEZI, R. B. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, p. 549-566, 2014.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 2, p. 240-247, 2010.

SÁNCHEZ, M.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; ARANDA, F. J.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a lipopeptide biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 142, p. 118–127, 2006.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and applied microbiology**, v. 28, p. 494-518, 2005.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, p. 690-695, 2006.

SCHUBERT, T. S.; RIZV, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. **Plant Disease**, v. 85, p. 340-356, 2001.

SHA, R.; JIANG, L.; MENG, Q.; ZHANG G.; SONG, Z. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost effective fungicide against plant pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 458-466, 2012.

SILVA, I. C.; FERREIRA, H. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. **Bio-protocol**, v. 3, n. 16: e861, 2013.

SINGH, C. R.; KATHIRESAN, K.; ANANDHAN, S.; SUGANTHI, K. Antioxidant and antibacterial activity of field grown and tissue culture root callus of mangrove species. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p. 723–742, 2014.

SOTIROVA, A. V.; SPASOVA, D. I.; GALABOVA, D. N.; KARPENKO, E.; SHULGA, A. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, v. 56, p. 639–644, 2008.

STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, v. 67, n. 5, p. 581-585, 1983.

STIPCEVIC, T.; PIJAC, A.; PIJAC, G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. **Burns**, v. 32, p. 24–34, 2006.

TIMMER, L. W.; GRAHAM, J. H.; CHAMBERLAIN, H. L. Fundamentals of Citrus Canker Management. **Citrus Industry**, v. 87, n. 6, p. 12–15, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Citrus: World Markets and Trade**, 2016. Available from: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Access on 04, April. 2016.

VARNIER, A. L.; SANCHEZ, L.; VATSA, P.; BOUDESOCQUE, L.; GARCIA-BRUGGER, A.; RABENOELINA, F.; SOROKIN, A.; RENAULT, J. H.; KAUFFMANN, S.; PUGIN, A.; CLEMENT, C.; BAILLIEU, F.; DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 2, p. 178-193, 2009.

VASILEVA-TONKOVA, E.; SOTIRIVA, A.; GALABOVA, D. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 427-433, 2010.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n. 12, p. 5095-5108, 2010.

Julio Tadao Hirata Yochikawa

-Aluno -

Lúcia Bonci Cavalca

-Co-orientadora-

Prof. Dr. Henrique Ferreira

- Orientador -