


---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**Raphaela Patini Lancellotti**

**Estudo do potencial antimicrobiano e do mecanismo de ação de compostos naturais em *Bacillus subtilis* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri***



Rio Claro  
2016

Raphaela Patini Lancellotti

Estudo do potencial antimicrobiano e do mecanismo de ação de compostos naturais em *Bacillus subtilis* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Orientador (a): Prof. Dr. Henrique Ferreira

Co-orientador (a): Msc. Luana Galvão Morão

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

Rio Claro  
2016

576 Lancellotti, Raphaela Patini  
L247e Estudo do potencial antimicrobiano e do mecanismo de ação de compostos naturais em *Bacillus subtilis* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Raphaela P. Lancellotti. - Rio Claro, 2016  
36 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Henrique Ferreira  
Coorientador: Luana Galvão Morão

1. Micro-organismos. 2. Antimicrobianos. 3. Microscopia. 4. Câncer cítrico. 5. Curcumina. I. Título.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, a todo apoio e dedicação da minha co-orientadora Luana Galvão Morão, que sempre esteve me ajudando do início ao fim desse projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Ferreira, pela confiança e orientação, assim como o apoio dos demais pesquisadores do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia.

A minha irmã de caminhada Laura, que me acompanha desde que entrei nessa instituição e cujo apoio foi essencial para chegar até aqui.

A minha família, que sempre esteve lá por mim com todo o apoio emocional, estabilidade e carinho quando precisei.

Ao conhecimento espiritual Xamânico obtido com Ayahuasca, guiando e me dando forças para superar os desafios.

A todos os outros amigos que me acompanharam na caminhada e que acrescentaram experiências que nunca irei esquecer.

## Resumo

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), é responsável por grandes perdas na citricultura, ao passo que danifica folhas e frutos e não possui cura eficaz. Sendo o Brasil um dos maiores exportadores de laranja do mundo, frutos danificados são impedidos de serem comercializados, causando inúmeros prejuízos na agricultura. Já a bactéria *Bacillus subtilis* é considerada uma bactéria modelo em microbiologia, sendo que os resultados obtidos em experimentos podem ser estimados para outras bactérias Gram-positivas. Devido a grande resistência das bactérias frente aos antibióticos atualmente disponíveis, novas substâncias têm sido sintetizadas e seu potencial antimicrobiano avaliado. A fim de aumentar a diversidade química e diversificar o mecanismo de ação de substâncias com potencial antimicrobiano, cada vez mais se tem buscado extratos e óleos essenciais como matéria prima para a síntese de compostos “naturais” para esse fim, como é o caso das nove substâncias naturais que foram avaliadas neste trabalho. Após diversas análises realizadas via método REMA foi possível observar quais as substâncias que apresentaram ação antimicrobiana para determinadas concentrações, bem como definir a ação bactericida ou bacteriostática para a concentração que apresentou 90% ou mais morte celular. Adicionalmente se avaliou o alvo atingido pelos compostos testados nas duas bactérias utilizadas, através de microscopia de contraste de fase e fluorescência, caracterizando-se o mecanismo de ação do composto.

Palavras-chave: antimicrobianos; microscopia; cancro cítrico; curcumina.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
2.1 A citricultura e o cancro cítrico.....	6
2.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> .....	8
2.3 <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
2.4 Antibióticos e mecanismo de ação .....	9
2.5 Compostos naturais .....	11
2.6 Proteínas Fts.....	12
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	14
3.1 Objetivo geral .....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
4.1 Linhagens celulares e condições de crescimento .....	15
4.2 Compostos naturais .....	15
4.3 Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA).....	16
4.4 Avaliação da Mínima Concentração Bactericida/Bacteriostática (MBC).....	17
4.5 Microscopia em contraste de fase .....	17
4.6 Microscopia de fluorescência .....	18
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	19
5.1 <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> .....	19
5.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	19
5.3 Avaliação da Mínima Concentração Bactericida/Bacteriostática (MBC).....	22
5.4 Microscopia com contraste de fase e de fluorescência.....	23
5.5 Discussão .....	29
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	32

## 1 Introdução

Este trabalho foi realizado como uma etapa inicial a descoberta de novos fármacos e complementa outros trabalhos sendo realizados globalmente no mesmo sentido nos últimos anos. Encontrar novos antimicrobianos é uma das prioridades em vários setores, desde o setor agrícola até o farmacêutico, devido à resistência bacteriana desenvolvida pelo uso exacerbado, muitas vezes, desnecessário e incorreto de defensivos e antimicrobianos já consolidados.

Nesse sentido, duas bactérias foram escolhidas para este trabalho, uma Gram-negativa e causadora do cancro cítrico em espécies do gênero *Citrus*, a *Xanthomonas citri* subsp *citri*, e outra bactéria, Gram-positiva, que é considerada organismo modelo na microbiologia, *Bacillus subtilis*.

A fim de diversificar a composição química e alterar a cadeia de algumas estruturas que já têm ação antimicrobiana conhecida, pesquisadores têm voltado a atenção a óleos e extratos naturais. Portanto foram utilizadas as seguintes plantas e seus compostos naturais, como alvo de avaliação de sua ação antimicrobiana: *Cinnamomum zeylanicum* (cinamaldeído), *Curcuma longa* (curcumina), extrato da família *Apiaceae* (umbeliferona), *Passiflora coerulea* (crisina), *Maclura pomifera* (morina), *Coffea arabica* (cafeína), vegetais folhosos e frutas cítricas (rutina), *Piperis nigri* (piperina) e maçãs e cebolas (quercetina).

O objetivo do trabalho consistiu em uma fase inicial de avaliação da ação antimicrobiana, onde se utilizou o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) descrito por Palomino et al. (2002). Após avaliação da eficácia dos compostos, por meio de estimativas de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) e porcentagem de células mortas, foram realizados cálculos para a obtenção dos valores da concentração mínima inibitória (MIC).

Contudo, para os compostos que apresentaram ação antimicrobiana, foi realizado um ensaio de avaliação da mínima concentração bactericida/bacteriostática (MBC) – em triplicatas - e, por fim, foram realizadas análises de microscopia de contraste de fase e de fluorescência para mutantes, no caso *Bacillus subtilis* FtsZ-GFP e *Xanthomonas citri* subsp *citri* GFP-ZapA para análise do mecanismo de ação dos compostos.

## **2 Revisão Bibliográfica**

### **2.1 A citricultura e o cancro cítrico**

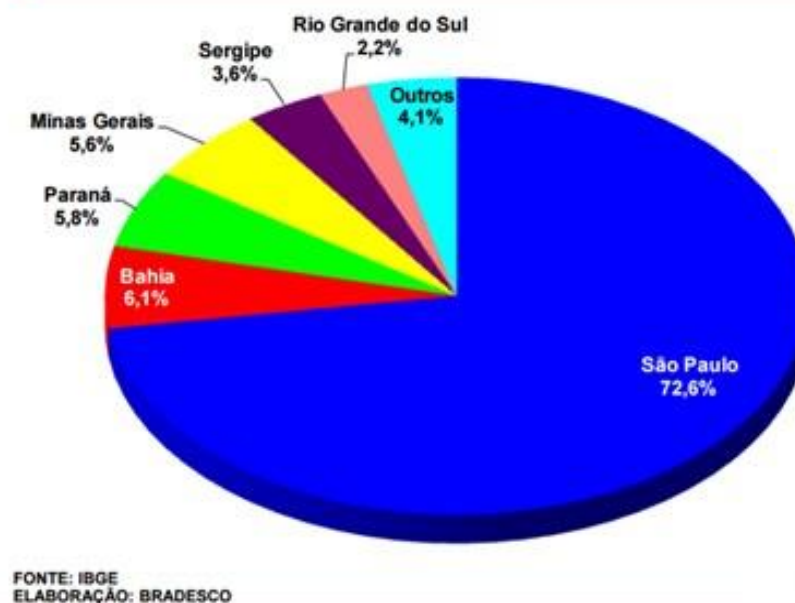
A agricultura é responsável por movimentar R\$ 251,2 bilhões no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, e um produto importante nessa balança comercial é a laranja, sendo que ela representa 21,7% do total nacional de frutas cultivadas, considerada uma das de maior valor nacional (IBGE, 2014).

O Brasil é um dos maiores exportadores de suco de laranja doce do mundo, respondendo por 60% do total produzido no mundo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016). A citricultura é, portanto, uma importante atividade agrícola que movimenta recursos econômicos e contribui para a geração de empregos, agregação do valor regional e interiorização do desenvolvimento. Quase toda a produção é exportada, principalmente para os Estados Unidos e Europa (NEVES, 2010).

Devido a ter um microclima privilegiado para o cultivo e apresentar as maiores inovações tecnológicas do setor no país (NEVES, 2010), o estado de São Paulo domina o setor de cultivo de *Citrus*. A Figura 1 ilustra a porcentagem de cada estado na Citricultura, sendo São Paulo responsável por mais de 70% do total nacional.



**Figura 1.** Produção de laranja/estado no Brasil (safra 2014/2015)



Fonte: DEPEC (2016).

Com ocorrência em mais de trinta países (GOTTWALD, 2000), o cancro cítrico é historicamente uma das doenças mais devastadoras. Ocorre em todas as espécies do gênero *Citrus*, e, de acordo com Neves (2010), é a mais antiga presente no país. A doença causa queda prematura das folhas, bem como lesões eruptivas castanho-amareladas, o que desfavorece a venda e consumo dos frutos produzidos. Os maiores importadores do recurso exigem uma série de restrições e medidas sanitárias que podem impedir a entrada do produto caso ele se apresente infectado. Inclusive, Neves (2010) afirma que a União europeia impede a compra de frutos que apresentem qualquer sinal de cancro cítrico ou pinta preta, outra doença que atinge *Citrus*.

Ainda não há uma cura eficaz contra o cancro cítrico, embora sejam adotadas algumas estratégias para controlar o avanço da doença em áreas não endêmicas, sendo estas: aplicação de rigoroso plano de erradicação das árvores infectadas (BELASQUE JR.; FERNANDES; MASSARI, 2009) e pulverização de formulações cúpricas, como por exemplo, o composto Difere (oxicloreto de cobre), já produzido e comercializado em grande escala. Para o estado de São Paulo, no segundo semestre de 2014, 34.340 plantas precisaram ser erradicadas (SECRETARIA DE CULTURA E ABASTECIMENTO, 2015).

O cobre é reconhecido como fungicida protetor, deve ser pulverizado antes de a doença aparecer, pois apenas auxilia na redução dos sintomas e não impede novas bactérias de

infectarem. Em 2008 ele ganhou atenção quando a Environmental Protection Agency (EPA) dos EUA registrou mais de 200 superfícies de cobre como antimicrobianas. Seu mecanismo de ação é por meio da morte por contato, apesar de ainda não estar completamente elucidado (GRASS et al., 2010). Zambolin et al. (1995) sugere que o mecanismo de ação seja por meio da penetração no interior dos organismos e a partir disso provocar reações químicas não específicas entre grupamentos presentes nas proteínas, sulfidrílicos (SH), amino (NH<sup>2</sup>) e hidroxílicos (OH), com ácidos nucleicos e seus precursores em rotas metabólicas, desestabilizando o metabolismo da bactéria, fungo ou vírus.

Muitos estudos sugerem ação antibacteriana do cobre: Faúndez et al. (2004) encontrou inibição do crescimento de *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* quando permaneceram em contato com superfícies de cobre. Outra pesquisa por Aguiar (2009) demonstra ação bactericida de nanopartículas de cobre em *Staphylococcus aureus* (houve até formação de um halo de inibição) e *Pseudomonas aeruginosa*.

Apesar disso, ainda faltam estudos concretos que comprovem sua ação antimicrobiana contra *Xac*, além de ser tóxico até em pequenas quantidades, com efeito cumulativo no solo, frutas e água. Halliwell e Gutteridge (1986) descobriram que o cobre pode entrar em contato com radicais hidroxila altamente reativos e causar danos ao DNA, o que pode causar mutações e câncer.

## **2.2 *Xanthomonas citri* subsp *citri***

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp *citri*. É uma bactéria com formato de bastão e apresenta flagelo polar, além de ser Gram-negativa e aeróbia obrigatória (SENASICA, 2013).

Devido à adoção da medida preventiva com formulações cúpricas, Behlau et al. (2011) identificou e caracterizou a existência de genes em *Xac* com resistência ao cobre, tornando ainda mais difícil a erradicação da bactéria e comprovando que há necessidade da busca por novos agentes antimicrobianos com eficácia contra *Xac*.

## **2.3 *Bacillus subtilis***

A bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* não é patogênica, sendo saprófita comum do solo e da água, e foi utilizada no projeto devido a sua relevância como micro-organismo

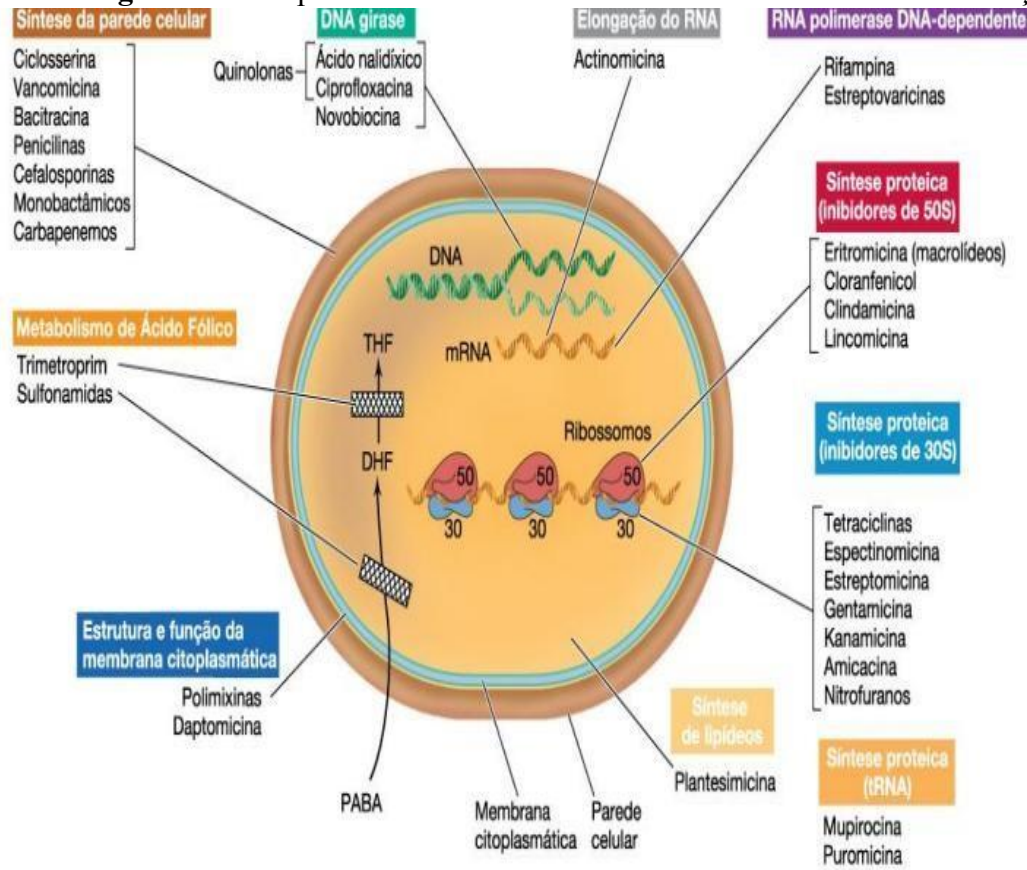
modelo de bactéria Gram-positiva (MOSZER et al., 2002) em Microbiologia, por ter tamanho relativamente grande e ser de fácil cultivo. Apresenta forma de bastonete, produz endósporos e tem algumas enzimas tóxicas. Bioensaios com *B. subtilis* são utilizados para analisar sua resposta mediante ao experimento e estimar se a mesma resposta seria válida para outras bactérias Gram-positivas.

#### **2.4 Antibióticos e mecanismo de ação**

A preocupação da descoberta de novos defensivos e antimicrobianos não é apenas no âmbito agrícola, mas também se estende para os demais setores que buscam assepsias, como por exemplo, indústrias farmacêuticas, cosméticas, área clínica-hospitalar, dentre outras. Desde a descoberta da penicilina nos anos de 1930 houve poucas inovações no setor, ao passo que as bactérias se adaptaram e se tornaram mais resistentes aos antibióticos existentes e, conseqüentemente, doenças que antes eram controladas estão cada vez mais difíceis de serem tratadas e têm aumentado a estatística de mortes. A partir de 1998, somente dois antibióticos aprovados pelo FDA tinham um mecanismo de ação diferente dos demais (MILLS, 2006).

A Figura 2 ilustra os principais antibióticos existentes e seu mecanismo de ação de acordo com as estruturas-alvo de uma célula bacteriana.

**Figura 2.** Principais antibióticos e estrutura-alvo de seu mecanismo de ação



Fonte: Madigan et al. (2010).

Um dos mecanismos mais utilizados pelos antibióticos existentes no mercado é o da inibição da síntese proteica bacteriana. Tetraciclina, estreptomina, canamicina, entre outros, estão compreendidos nessa classe, onde interagem com a porção 30S do ribossomo e interrompem a tradução. Também pode ocorrer interação com a porção 50S do ribossomo, como no caso do cloranfenicol e eritromicina. (MADIGAN et al., 2010).

Outra classe importante de antibióticos são os chamados antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, isso inclui as penicilinas e cefalosporinas. Possuem esse nome devido a um componente estrutural característico, o anel  $\beta$ -lactâmico, e são inibidores da síntese de parede celular por meio da sua ligação com enzimas transpeptidases, impedindo a transpeptidação de ocorrer (MADIGAN et al., 2010).

Estreptovaricinas e rifampina, por exemplo, possuem outro mecanismo, inibem a síntese de RNA ligando-se a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, impedindo-a de agir (MADIGAN et al., 2010). Como se pode perceber, é extremamente necessária a descoberta de substâncias antimicrobianas que atuem em alvos e estruturas celulares diferentes dos antibióticos já consolidados, pois a ideia é atingir a bactéria em estruturas que ela ainda não

adquiriu resistência. Além disso, é indicado que as estruturas alvo dos compostos com ação antimicrobiana sejam, evolutivamente, conservadas na maioria dos micro-organismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos.

Um antibiótico pode ser considerado bactericida quando causa a morte da bactéria, ou bacteriostático, quando promove a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003). Pela definição de Gallo et al. (1995), também podemos entender que “um antibiótico é definido como bacteriostático quando a inibição da sua atividade é reversível; e definido como bactericida quando a inibição é irreversível em concentrações ligeiramente maiores que a MIC.”

## 2.5 Compostos naturais

A fim de diversificar a composição química de antibióticos, tem-se voltado muita atenção para a síntese de novos compostos a partir de extratos ou óleos essenciais de plantas, podendo modificar alguns grupamentos R da cadeia de compostos naturais que já apresentaram alguma eficácia frente aos micro-organismos, buscando acentuar sua ação, podendo ainda unir duas estruturas via hibridação molecular para aumentar o potencial antimicrobiano ou finalmente estudar a atuação dos compostos em sinergismo.

Sendo assim, no presente trabalho, foram utilizados os compostos: cinamaldeído, curcumina, umbeliferona, crisina, morina, cafeína, rutina, piperina e quercetina.

O cinamaldeído (3-fenil-2-propenal), isolado da planta *Cinnamomum zeylanicum*, tem mostrado potencial antimicrobiano contra bactérias, leveduras e mofo filamentoso devido a sua ação de inibição da ATPase, inibição da biosíntese de parede celular e alterações na forma e integridade da membrana. (SHREAZ et al., 2016).

A crisina (5,7-diidroxiflavona), isolada de *Passiflora coerulea*, mostrou grande potencial anti-viral nos trabalhos de Wang et al. (2014) e Song et al. (2015) desenvolvidos com enterovírus. Foi demonstrado que ela age suprimindo a protease viral 3C.

A curcumina ((1E,6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona) é um dos compostos mais promissores e com mais estudos encontrados. É extraída do rizoma de *Curcuma longa* e sua atividade antimicrobiana foi atestada com *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* por Gunes et al. (2013), sugerindo ação bacteriostática. Rai et al. (2008) também realizaram estudos da ação da curcumina em *B. subtilis*, confirmando sua ação

antimicrobiana e demonstrando seu mecanismo de ação na formação do anel Z que participa da divisão celular bacteriana. Outro estudo de Moghadamtousi et al. (2014) atesta propriedades antimicrobianas da curcumina com *Helicobacter pylori* e até ação antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis*.

Extraída de *Piperis nigri*, a piperina (1-[5-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2,4-pentadienil]piperidina) mostrou ação potenciadora do antibiótico Ciprofloxacino quando utilizado em sinergismo contra *Staphylococcus aureus* (Khan et al., 2006). Também apresentou importante atividade inibitória de angiogênese em algumas células de câncer (DOUCETTE et al., 2012).

Isolada da planta *Coffea arabica*, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), além de ser considerada um alcaloide estimulante, apresentou ação de inativação da formação de miofibroblastos em células de câncer de mama na pesquisa desenvolvida por Al-Ansari et al. (2014).

A umbeliferona (7-hidroxycumarina) pode ser encontrada em extratos de plantas da família Apiaceae, e apresentou eficácia na redução de *Enterococcus faecalis* e formação de biofilme em cateteres urinários, de acordo com pesquisa por Cai et al. (2016).

Presente, em grandes concentrações, em maçãs, cebolas e outras plantas, a quercetina (3,5,7,3',4'-Pentahidroxi flavonona) é um flavonoide natural com atestada eficácia de inibição de 96% do crescimento bacteriano em *Streptococcus mutans* (PATRA et al., 2014). Outra pesquisa por Siriwong et al. (2016) atesta que a quercetina tem efeito sinérgico com o antibiótico Ampicilina, ampliando seu efeito contra *Staphylococcus epidermis* resistentes a antibióticos da classe de penicilinas.

Uma das formas glicosiladas da quercetina é a rutina (quercetin-3-O-rutinoside), ou vitamina P, também encontrada em vegetais folhosos. Um estudo por Amin et al. (2015) atestou atividade antibiótica tanto da quercetina sozinha quanto da junção de rutina e morina contra *Staphylococcus aureus*.

A morina (2',3,4',5,7-Pentahidroxi flavonona), ou flavononol, pode ser isolada de *Maclura pomifera*, *Maclura tinctoria*, folhas de *Psidium guajava*, entre outros. Dixon et al. (2015) atesta eficácia da morina em suprimir potenciais moléculas reparadoras de DNA com papel em muitas doenças humanas. Também foi considerado o mais potente flavonoide inibidor da ácido graxo sintase (TIAN, 2006).

## 2.6 Proteínas Fts

Em bactérias com formato de bastonete, como *B. subtilis*, a divisão celular ocorre com a formação de um septo de divisão (WEISS, 2004), organizado por meio das chamadas proteínas Fts (filamentous temperature sensitive). A organização da parte citoplasmática na divisão celular é composta por cinco componentes: proteínas FtsZ, FtsA, ZapA e os domínios ZipA e FtsK. Vicente et al. (2006) descrevem que a proteína de divisão mais abundante nas células é a proteína FtsZ, um homólogo estrutural da tubulina em eucariotos (OLIVA et al., 2004), e sua localização é considerada o primeiro evento conhecido na formação do anel de divisão.

Margolin (2010) afirma que a proteína FtsZ está presente na maioria dos procariotos reconhecidos até o momento e foi descoberto que bactérias em formato de bastonete suprimidas de moléculas FtsZ falham na divisão celular e produzem longas células filamentosas sem septo (BEAL E LUTKENHAUS, 1991; DAI E LUTKENHAUS, 1991). Isso ocorre porque a síntese lateral continua, fazendo com que a célula se alongue, enquanto previne o septo e a divisão de ocorrerem (PINHO E ERRINGTON, 2003).

As moléculas de FtsZ são um alvo a ser explorado para novos antibióticos (RUIZ-AVILLA et al., 2013), já que sua perturbação inibe o crescimento bacteriano, além de ser um alvo ainda não explorado por demais antibióticos. Pinho e Errington (2003) demonstraram que células de *Staphylococcus aureus* suprimidas de FtsZ aumentam de tamanho e sofrem lise.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi analisar o possível efeito antimicrobiano de nove compostos naturais (curcumina, cinamaldeído, cafeína, rutina, umbeliferona, morina, crisina, piperina e quercetina) frente à bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e à bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinação das Mínimas concentrações inibitórias (MIC's);
- Determinação das Mínimas concentrações bacteriostática/bactericida (MBC) para compostos que apresentaram ação;
- Microscopia em contraste de fase para verificar tamanho e formato celular;
- Microscopia de fluorescência para análise de mecanismo de ação.



## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Linhagens celulares e condições de crescimento

As linhagens bacterianas de *Xanthomonas citri* subsp *citri* e *B. subtilis* que foram utilizadas no presente trabalho encontram-se disponíveis em nosso laboratório e são denominadas *Xac* WT e *Bacillus subtilis* 168. As células foram cultivadas a 29 °C em meio NYG (N), para *Xac* e Luria Bertani (LB), para *B. subtilis*, sólido e líquido sob rotação de 200 rpm. O antibiótico utilizado como controle para os ensaios foi a canamicina (20 µg.mL<sup>-1</sup>).

### 4.2 Compostos naturais

Para facilitar a designação de cada composto no método de REMA, eles foram codificados de 116 a 123 conforme mostra o Quadro 1.

**Quadro 1.** Código e identificação dos compostos avaliados

<b>CÓDIGO</b>	<b>COMPOSTO</b>
<b>C</b>	<b>Cinamaldeído</b>
<b>116</b>	<b>Cafeína</b>
<b>117</b>	<b>Rutina</b>
<b>118</b>	<b>Curcumina</b>
<b>119</b>	<b>Umbeliferona</b>
<b>120</b>	<b>Morina</b>
<b>121</b>	<b>Crisina</b>
<b>122</b>	<b>Piperina</b>
<b>123</b>	<b>Quercetina</b>

Fonte: Elaborado pela autora (2016).

### 4.3 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). As bactérias em teste foram resgatadas/reactivadas do freezer -80 °C em meio sólido LB (*B. subtilis*) e/ou N (*Xac*) a 29 °C. Após crescimento, foram inoculadas em 20 mL dos respectivos meios líquidos (4 a 5 colônias isoladas) e cultivadas por 18 horas (overnight) a 29 °C.

**Culturas em placas “multiwell” de 96 poços:** para o Rema o inóculo foi realizado de forma a obter  $10^5$  células/poço em volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Posterior a isso foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada substância que foi testada, obtendo a concentração maior inicial de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguindo a microdiluição. As soluções estoque das substâncias foram diluídas em 100% de DMSO, obtendo concentração final de 10  $\text{mg.mL}^{-1}$ . As concentrações utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir da diluição dos estoques onde considerou-se que a maior concentração utilizada apresentasse no máximo 1% de DMSO (concentração não prejudicial para a viabilidade celular, averiguada em testes preliminares). Os controles negativo, positivo e de veículo foram constituídos por 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, canamicina 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e solução de DMSO 1%, respectivamente. Em seguida, a placa multiwell de 96 poços foi submetida à incubação a 29 °C, por 8 horas.

Após esse período foi adicionada uma solução de resazurina na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em água destilada estéril, que reagiu por 2 horas. O teste que se baseia na redução da resazurina por meio da desidrogenase microbiana mostra que a resazurina atua como um acceptor 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 micro-organismo 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 micro-organismos. Esta mudança de cor é detectada em scanner de fluorescência SYNERGY microplate reader H1 (Biotek), 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:

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

(UAF: Unidades arbitrárias de fluorescência, obtida por meio do scanner de fluorescência).

#### 4.4 Avaliação da Mínima Concentração Bactericida/Bacteriostática (MBC)

O teste de MBC consistiu em “carimbar” as placas (três testes independentes) de REMA, numa placa de Petri de 15 cm de diâmetro, de forma a serem colocadas numa incubadora B.O.D na temperatura de crescimento da bactéria, já descrita acima, por 2 dias. Foi observado se houve ou não crescimento microbiano para cada poço da placa de REMA demarcada na placa de Petri.

#### 4.5 Microscopia em contraste de fase

A microscopia em contraste de fase para bactérias foi utilizada para a observação de alterações grosseiras na forma dos bastonetes, filimentação, aumento do tamanho celular e indícios de parada de divisão celular (SILVA, et al., 2013). As linhagens foram cultivadas a 29 °C num overnight e observadas na densidade ótica adequada (D.O<sub>600nm</sub>) para bactéria, bem como as devidas diluições similares as realizadas no REMA, para obtenção de 10<sup>5</sup> células, uma vez que é necessário reproduzir o mesmo ensaio do REMA para não alterar a dose-resposta do composto em função do número de células presentes. Após estes ajustes, uma alíquota da suspensão foi imobilizada em lâminas contendo agarose 1 %, em PBS 1 X ou salina 0,9%, e foram observadas.

**Preparação das lâminas:** cerca de 1 mL da solução de agarose foi depositada em lâminas de microscopia óptica e sobre estas colocou-se outra lâmina para que o gel de agarose

formasse um filme fino e de altura homogênea. As lâminas foram secas na bancada, à temperatura ambiente, por aproximadamente 40 minutos e abertas somente no momento do uso, quando 5-10  $\mu$ L da suspensão de células foram depositadas no centro destas e cobertos com lamínula. As células foram visualizadas utilizando-se o microscópio óptico BX-61 (Olympus) tanto em DIC 40 quanto em contraste de fase (PH 100).

#### **4.6 Microscopia de fluorescência**

Foi utilizada a microscopia de fluorescência para a observação de indícios de desestruturação do anel Z mediante observação da localização de GFP-ZapA em *Xanthomonas citri* e FtsZ- GFP em *Bacillus subtilis*, dentre outras alterações relacionadas à formação do septo divisional (SILVA et al., 2013). As linhagens foram cultivadas e imobilizadas em lâminas com agarose da mesma forma que foi procedido para a microscopia de contraste de fase.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 *Xanthomonas citri* subsp *citri*

Os testes de REMA feitos com *Xac* não apontaram eficácia significativa de nenhum dos possíveis compostos antimicrobianos testados. Cálculos feitos por meio das unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) permitiram calcular a porcentagem de células mortas, conforme apresenta a Tabela 1, para cada concentração testada, partindo de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e seguindo a microdiluição.

**Tabela 1. Porcentagem de células mortas (*Xac*) em função das concentrações testadas de cada composto**

Concentração do composto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Porcentagem (%) de células mortas								
	116	117	118	119	120	121	122	123	C
100	0	17,83%	0	0	0	0	46,28%	1,812%	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,125	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,5625	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,78125	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Elaborado pela autora (2016).

### 5.2 *Bacillus subtilis*

Como já demonstrado em um projeto de iniciação científica desenvolvido em 2015 no mesmo departamento, a bactéria *B. subtilis* apresentou morte significativa (acima de 90% de células mortas) com apenas um composto dos nove testados: a curcumina.

Os cálculos de porcentagem de células mortas foram feitos para *B. subtilis*, os quais estão apresentados na Tabela 2 comprovando apenas a eficácia da curcumina.

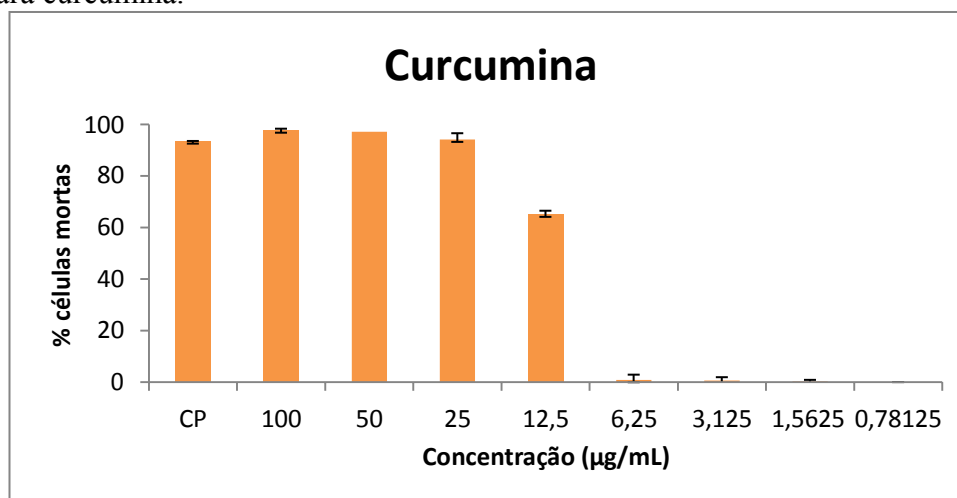
**Tabela 2. Porcentagem de células mortas (*B. subtilis*) em função das concentrações testadas de cada composto**

Concentração do composto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Porcentagem (%) de células mortas								
	116	117	118	119	120	121	122	123	C
100	8,00%	6,66%	97,85%	12,18%	7,89%	26,36%	0	68,43%	75,48%
50	2,22%	5,42%	96,92%	0,79%	6,07%	17,59%	0	39,09%	22,93%
25	0,20%	4,73%	92,77%	0	5,74%	7,37%	0	1,99%	2,11%
12,5	0	4,21%	35,05%	0	0	9,46%	0	0	1,55%
6,25	0	1,85%	0	0	0	8,47%	0	0	0
3,125	0	0	0	0	0	7,06%	0	0	0
1,5625	0	0	0	0	0	6,55%	0	0	0
0,78125	0	0	0	0	0	1,81%	0	0	0

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Ao observar a Figura 3 é possível comparar a ação do controle positivo (CP), Canamicina, com a curcumina em concentrações gradativas da microdiluição, registrando a porcentagem de células mortas para cada concentração testada.

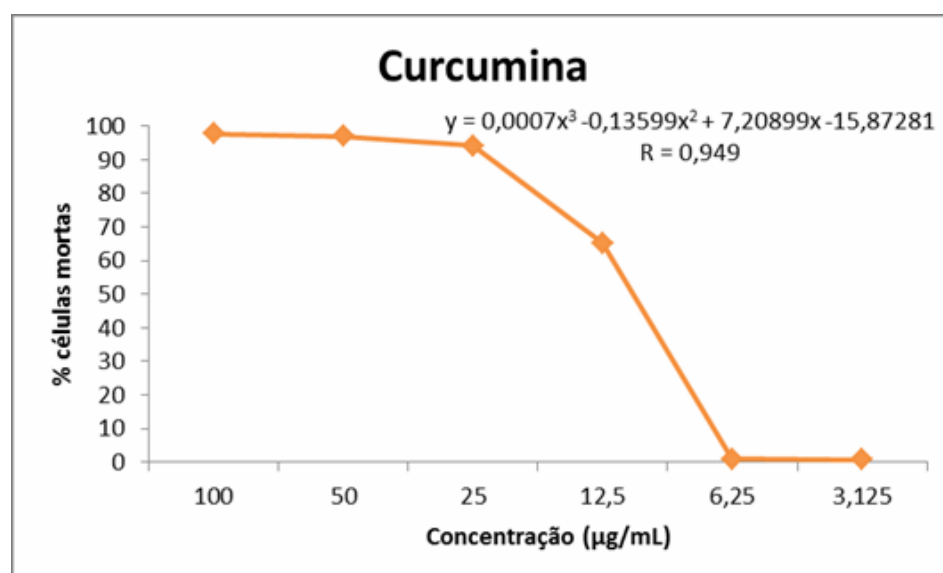
**Figura 3.** Porcentagem de células mortas de *Bacillus subtilis* observadas no REMA para curcumina.



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Contudo, foi estimada a regressão exponencial do teste, como mostra a Figura 4, ao calcular a média aritmética dos REMAS realizados em dias independentes e a partir daí, foi possível determinar as MIC's 50 e 90 para o composto testado através da equação da regressão gerada.

**Figura 4.** Regressão exponencial e obtenção da equação da regressão



Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Finalmente, foi possível calcular as MIC's para a curcumina, as quais estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3. Obtenção das MIC's para a curcumina**

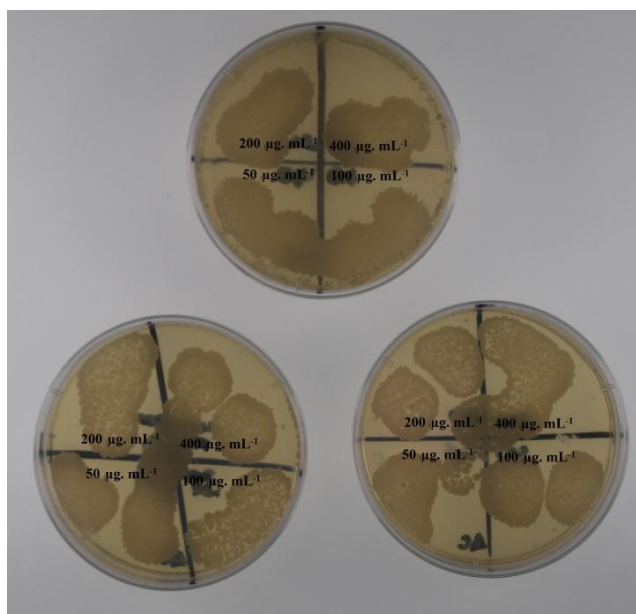
<b>MIC 90</b>	<b>24,83 <math>\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}</math></b>
<b>MIC 70</b>	16,75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
<b>MIC 50</b>	11,47 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

### 5.3 Avaliação da Mínima Concentração Bactericida/Bacteriostática (MBC)

A curcumina apresentou ação bacteriostática de acordo com a definição de Walsh (2003), já que age inibindo a divisão celular e reprodução da bactéria. De acordo com o teste de MBC obtivemos que a curcumina mantém sua atividade bacteriostática em concentrações de até 400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , conforme mostra o teste realizado e registrado pela Figura 5.

**Figura 5.** MBC para *B. subtilis* (concentração de 400, 200, 100 e 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de curcumina)



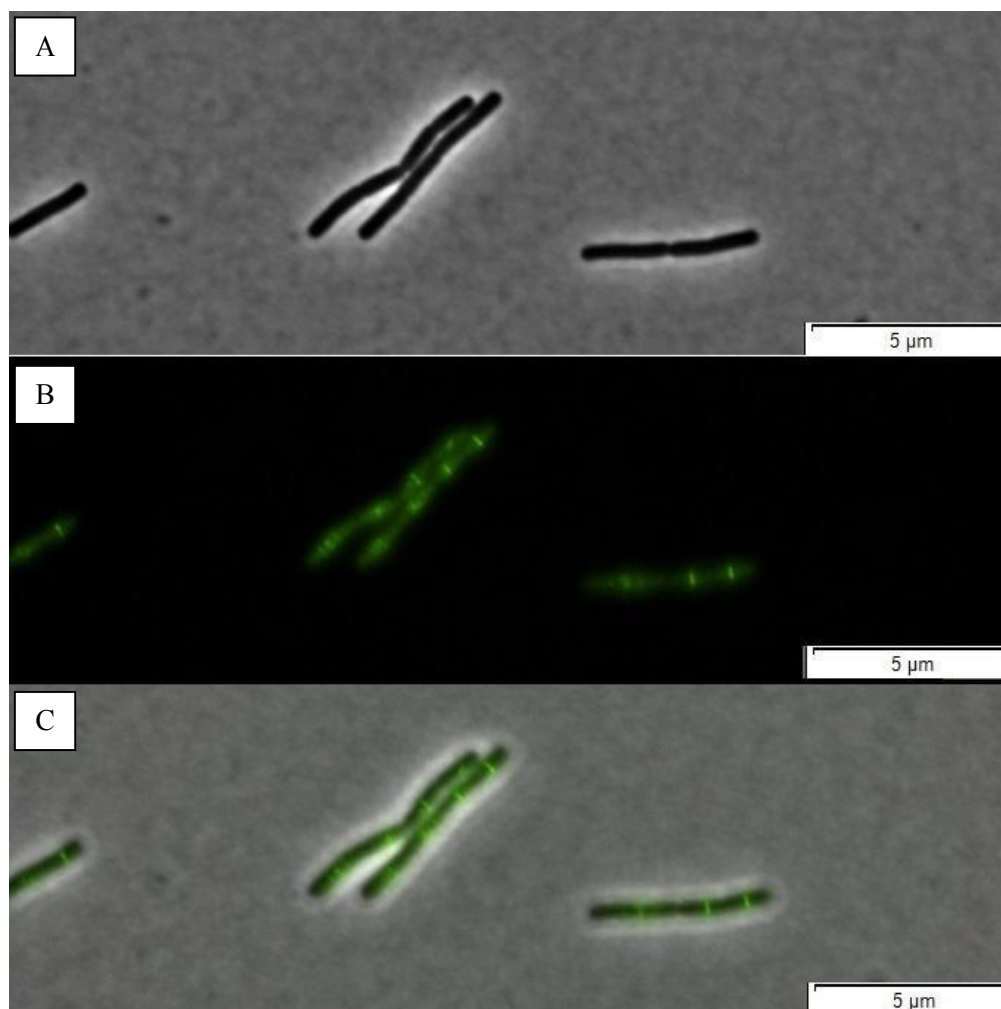
Fonte: Elaborada pela autora (2016).



#### 5.4 Microscopia com contraste de fase e de fluorescência

A partir dos resultados obtidos com curcumina e *B. subtilis*, foram feitas análises por meio de microscopia de fase e de fluorescência para observação do mecanismo de ação da curcumina na bactéria. As Figuras 6 e 7 apresentam fotos registradas de *B. subtilis* apenas em meio de cultura LB, caracterizado como Controle Negativo.

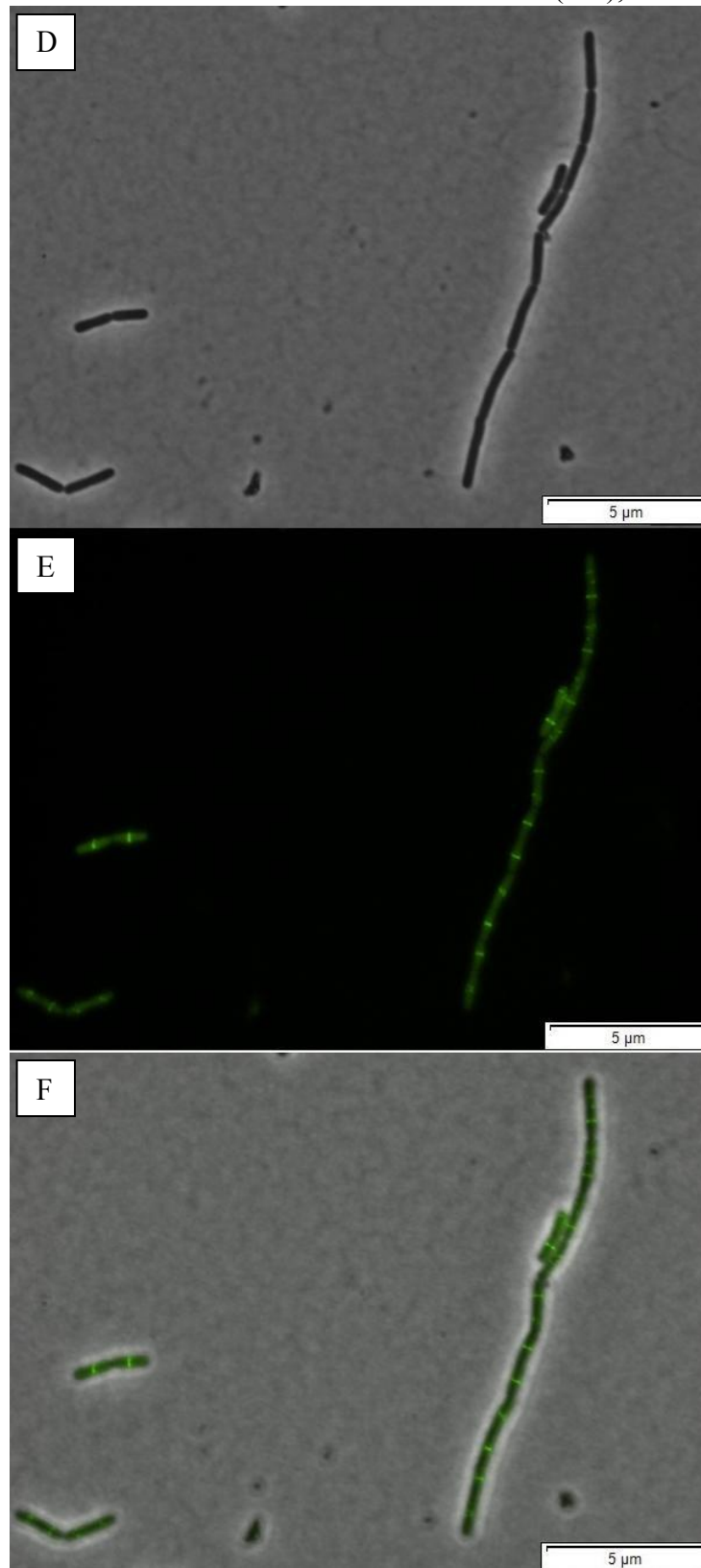
**Figura 6.** *B. subtilis* antes do tratamento de curcumina (CN), no aumento de 100x



**Figura 6. A** – CF de *B. subtilis* FtsZ-GFP sem tratamento com curcumina; **Figura 6. B** – microscopia de fluorescência (filtro GFP) de *B. subtilis* FtsZ-GFP sem tratamento com curcumina; **Figura 6. C** – overlay da microscopia de fase e fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

**Figura 7.** *B. subtilis* antes do tratamento de curcumina (CN), no aumento de 100x

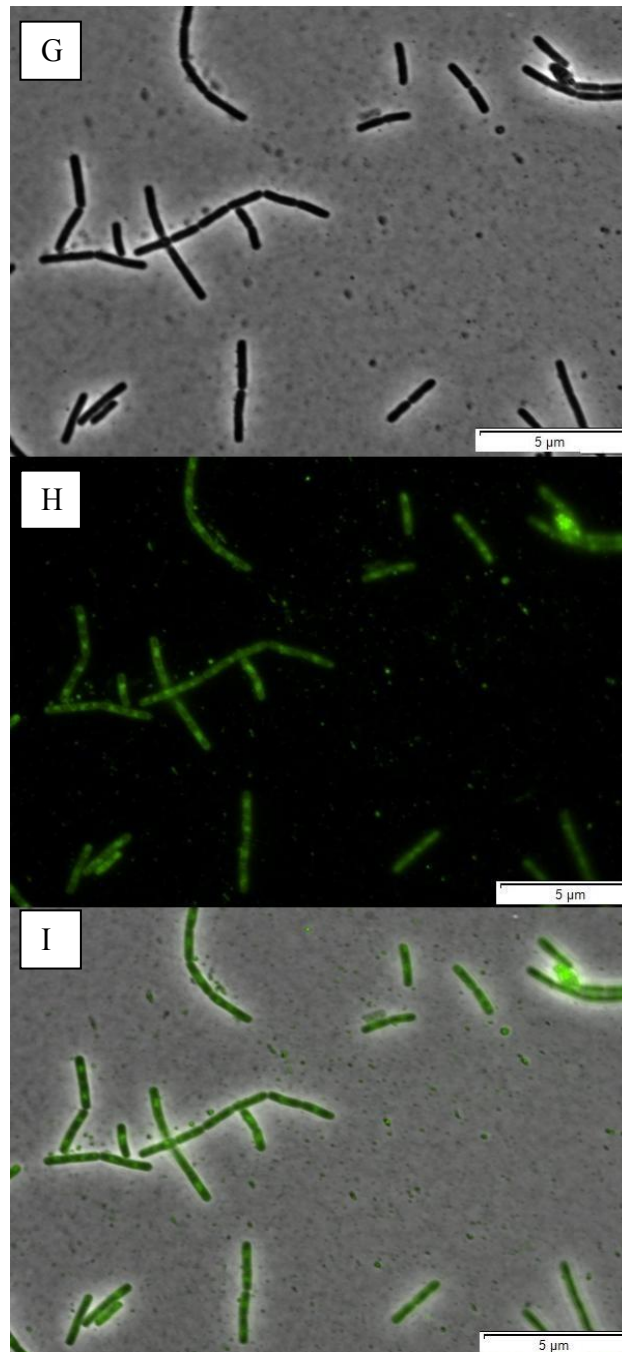


**Figura 7. D** – CF de *B. subtilis* FtsZ-GFP sem tratamento com curcumina; **Figura 7. E** – microscopia de fluorescência (filtro GFP) de *B. subtilis* FtsZ-GFP sem tratamento com curcumina; **Figura 7. F** – overlay da microscopia de fase fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

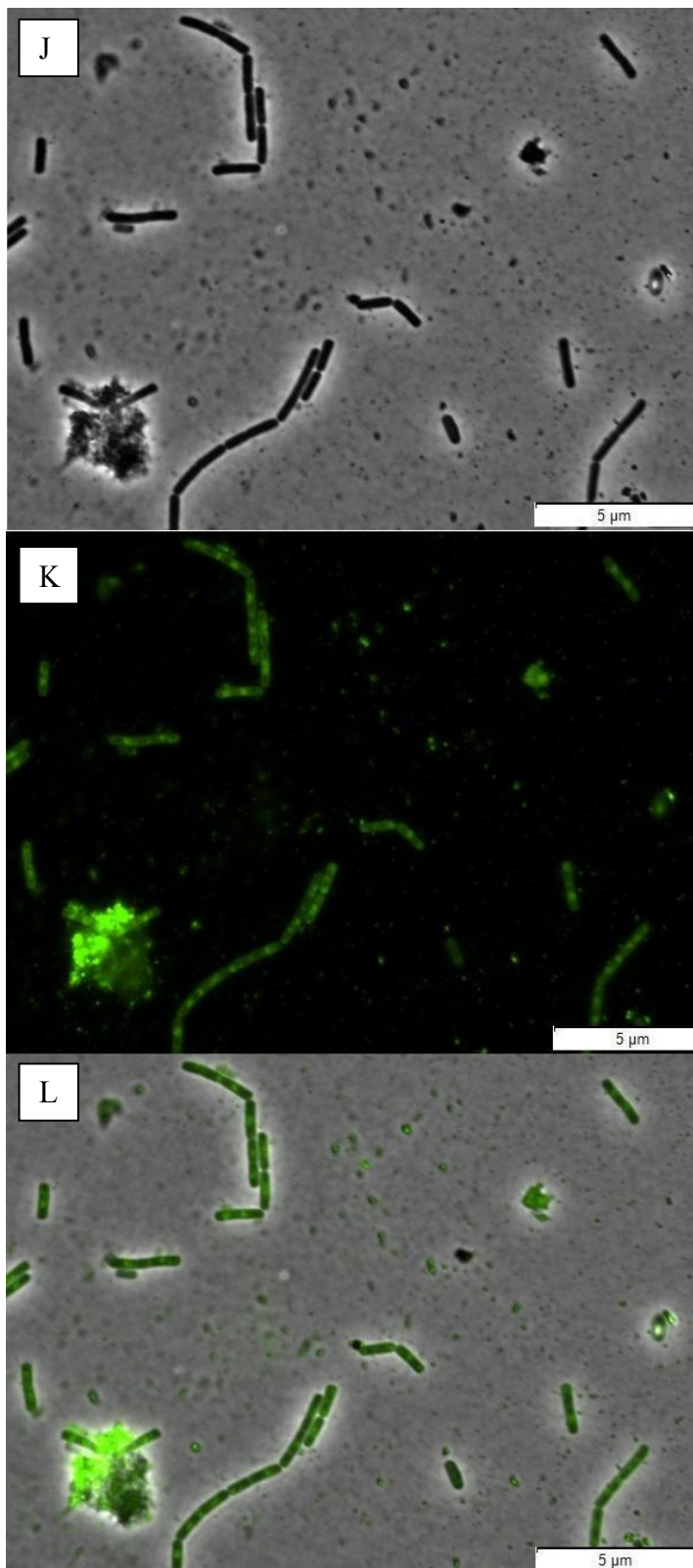
Já as Figuras 8 e 9 apresentam microscopias realizadas após o contato da curcumina com *B. subtilis*, durante 30 minutos. Foi possível observar início de ruptura do septo divisional, que anteriormente ao tratamento com curcumina, apresentava-se intacto e bem definido.

**Figura 8.** *B. subtilis* após 30 minutos de tratamento com curcumina, no aumento de 100x



**Figura 8. G** – CF de *B. subtilis* FtsZ-GFP após 30 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 8. H** – microscopia de fluorescência de *B. subtilis* mutante após 30 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 8. I** – overlay da microscopia de fase e fluorescência.  
Fonte: Elaborada pela autora (2016).

**Figura 9.** *B. subtilis* após 30 minutos de tratamento com curcumina, no aumento de 100x

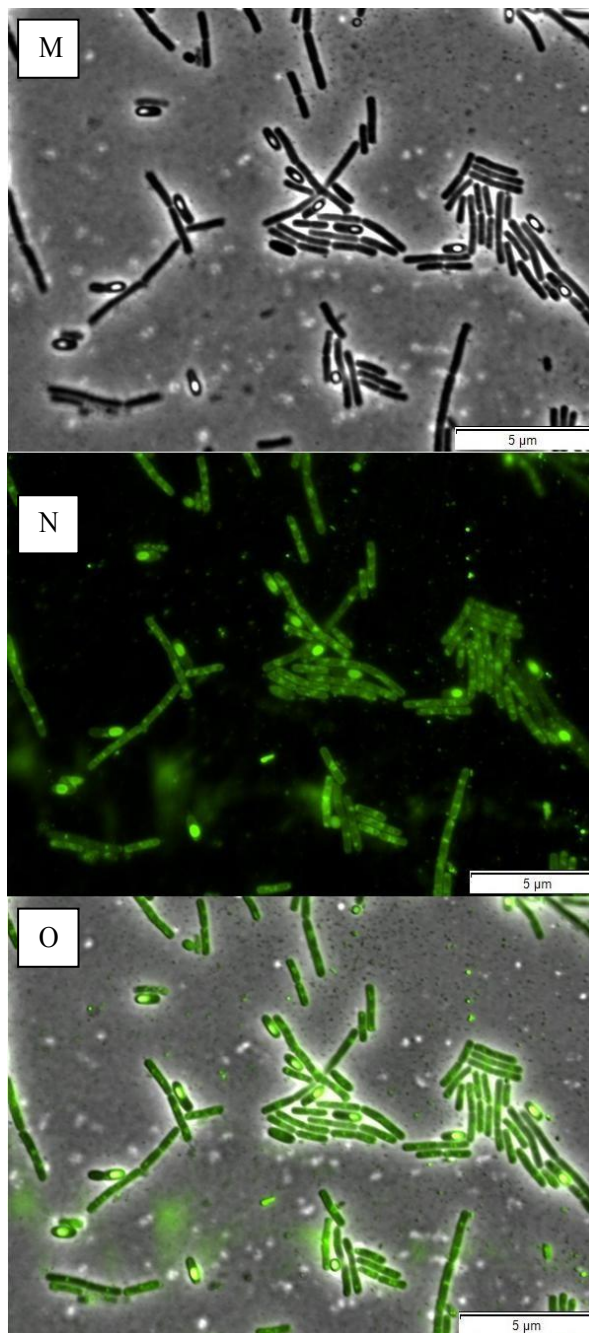


**Figura 9. J** – CF de *B. subtilis* mutante após 30 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 9. K** – microscopia de fluorescência de *B. subtilis* mutante após 30 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 9. L** – overlay da microscopia de fase e fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora (2016).

Após 60 minutos de contato entre curcumina e *B. subtilis*, as Figuras 10 e 11 registraram um grande avanço na disrupção do septo divisional, sendo este observado apenas como pontos fluorescentes mais fortes espalhados por todo bastonete.

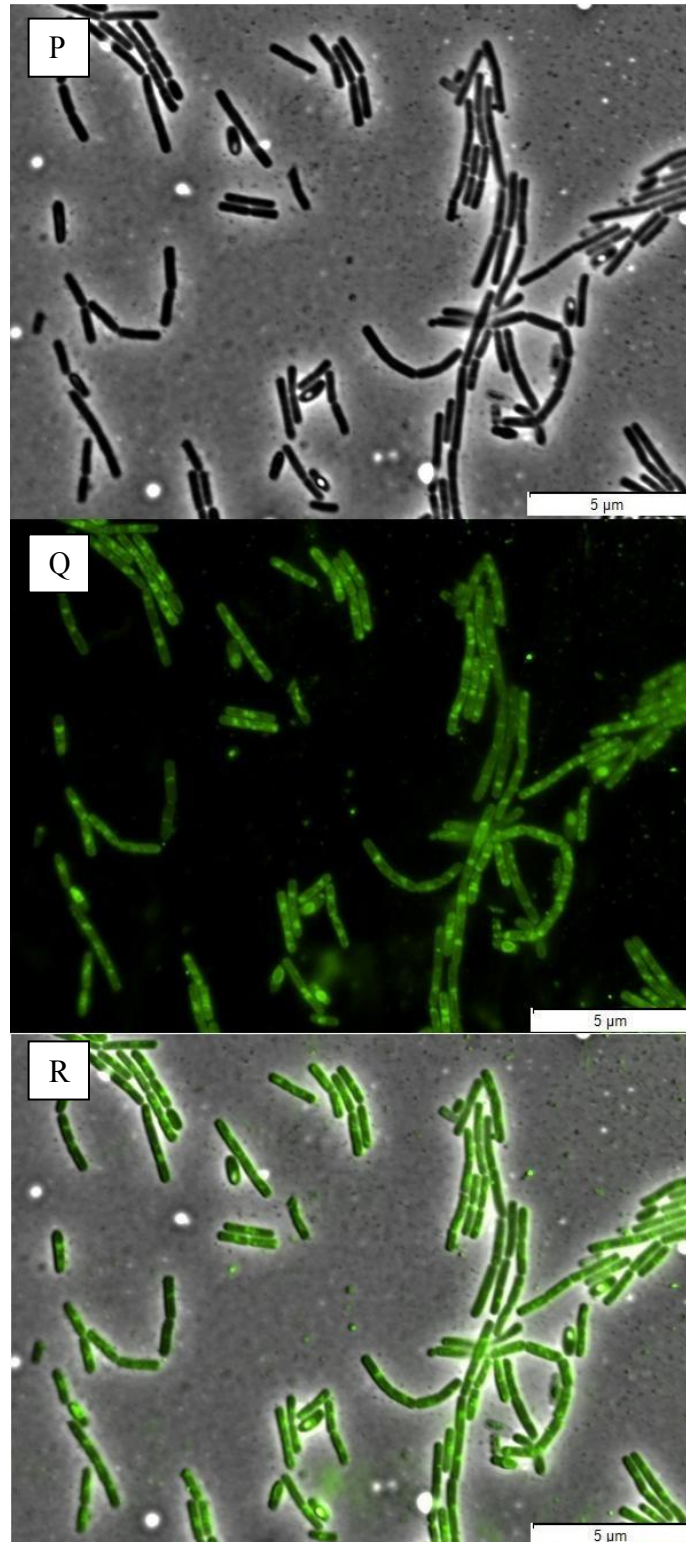
**Figura 10.** *B. subtilis* após 60 minutos de tratamento com curcumina, no aumento de 100x



**Figura 10. M** – CF de *B. subtilis* mutante após 60 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 10. N** – microscopia de fluorescência de *B. subtilis* mutante após 60 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 10. O** – overlay da microscopia de fase e fluorescência.  
Fonte: Elaborada pela autora (2016).



**Figura 11.** *B. subtilis* após 60 minutos de tratamento com curcumina, no aumento de 100x



**Figura 11. P** – CF de *B. subtilis* mutante após 60 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 11. Q** – microscopia de fluorescência de *B. subtilis* mutante após 60 minutos de tratamento com curcumina; **Figura 11. R** – overlay da microscopia de fase e de fluorescência.  
Fonte: Elaborada pela autora (2016).

## 5.5 Discussão

“Em células bacilares, a formação do divisomo é iniciada pela ligação das moléculas de FtsZ, originando um anel precisamente ao redor do centro da célula.” (MADIGAN et al., 2010). O que se pode ver nitidamente nas Figuras 6 e 7, imagens B e E, é o anel formado por moléculas de FtsZ, e que irá, posteriormente, tornar-se o plano de divisão celular. No controle negativo ele permanece intacto e bem definido, portanto a bactéria tem possibilidade de reprodução.

Já nas lâminas tratadas com curcumina, observou-se, que com o passar do tempo, o septo apresentou-se cada vez mais disperso por toda célula ou ainda formando várias pontuações verdes fluorescentes dentro do bastonete. Muitas vezes o septo até desaparece. Nas imagens H e K das Figuras 8 e 9 nota-se dificuldade em observar o septo de modo que ele aparece com certa disrupção e em formas pontuais. Já nas imagens N e Q das Figuras 10 e 11, o septo está completamente disperso pelo bastonete em pontuações de coloração verde mais brilhante, onde se infere que não houve polimerização do anel Z e recrutamento correto de todas as proteínas para formação do divisomo, impossibilitando que a bactéria realize divisão celular e, conseqüentemente, inibindo seu crescimento populacional.

Portanto, fica evidente que a curcumina possui ação antimicrobiana bacteriostática, assim como os antibióticos já conhecidos e comercializados azitromicina, macrolídeos, tetraciclina. Além disso, fica evidente que o mecanismo de ação da curcumina é através da desestabilização das moléculas de FtsZ que formam o anel do divisomo.

Rai et al. (2008) já haviam demonstrado a ação da curcumina como uma molécula inibidora da atividade de GTPase e da montagem e agrupamento dos protofilamentos de FtsZ, mas seu trabalho foi muito vago para determinar concentrações inibitórias, pois se baseia apenas na leitura da densidade ótica no decorrer do tempo e em função do aumento gradual da concentração de curcumina em contato com a bactéria. O artigo ainda infere que a determinação da MIC era feito por plaqueamento dos inúmeros testes com as mais variadas concentrações de curcumina, e que a MIC (mínima concentração inibitória) era determinada onde o plaqueamento não apresentava crescimento bacteriano. Sabe-se que este não é o conceito correto de determinação de MIC, uma vez que a MIC é a concentração de composto necessária para atingir um percentual de morte determinado. Em outras palavras, a MIC 90 é a concentração necessária para que haja 90% de morte celular bacteriana. O conceito de morte

bacteriana ou não é chamado de MBC onde se determina se o composto é bactericida ou bacteriostático, ainda levando em conta a concentração de composto testado.

Além disso, as pesquisas de Rai et al. (2008) ainda sugerem que a curcumina não tenha ação sobre a membrana da célula, embora já seja confirmado por outras pesquisas. Reddy et al. (2015) encontraram que a curcumina inibe duas enzimas cruciais para a síntese da parede celular, GlnS e GlnU. Além de se ter encontrado indução da proteína LiaH, uma proteína marcadora específica para quando a membrana da célula está sob estresse (WENZEL et al., 2012).

Tyagi et al. (2015) testaram o efeito da curcumina em membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e observaram que as bactérias tratadas com curcumina apresentaram membranas mais permeáveis, permitindo maior entrada e saída de componentes, o que pode ser utilizado para aumentar a eficácia de absorção de alguns antibióticos. Apesar dessas afirmativas, o teste para membrana não foi realizado a fim de se confirmar se há perturbação ou não da membrana plasmática.



## 6 Conclusão

Podemos concluir que, apesar de nenhum dos nove compostos terem ação antimicrobiana contra *Xac*, compostos naturais são uma fonte promissora nas pesquisas de antibióticos. A eficácia da curcumina contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* demonstra que eles podem ser mais eficazes até que antibióticos já utilizados, apresentando maior mortalidade e baixa concentração mínima inibitória (MIC), de  $24,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , além de um mecanismo de ação antibiótica ainda não explorado, ou seja, isento de resistência bacteriana.

Esses resultados podem indicar que a curcumina é um antibiótico eficaz contra bactérias Gram-positivas em geral, e desperta interesse em estudar detalhadamente a sua estrutura para verificar alterações de grupos radicais e abrir a possibilidade de criação de análogos para otimizar sua eficácia antimicrobiana.

## 7 Referências

- AGUIAR, S. C. **Análise da ação bactericida *in vitro* de nanopartículas de cobre**. 2009. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Fisioterapia, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, 2009. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/000042/0000421B.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2016.
- AL-ANSARI, M. M.; ABOUSSEKHRA, A. Caffeine Mediates Sustained Inactivation of Breast Cancer-Associated Myofibroblasts via Up-Regulation of Tumor Suppressor Genes. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 3, mar. 2014. Public Library of Science (PLoS).
- AMARAL, E. S. **Revisão da Legislação do Cancro Cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri***. Coordenação Geral de Proteção de Plantas, Departamento de Sanidade Vegetal, Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), [s. d.].
- AMIN, M. et al. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 1, 2015.
- BEAL, B; LUTKENHAUS, J. FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation. **Genes & Development**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.447-455, 1 mar. 1991. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BEHLAU, F. et al. Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 12, p.4089-4096, 22 abr. 2011. American Society for Microbiology.
- BELASQUE JR., J.; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. The Success of eradication campaign os Citrus Canker in São Paulo States, Brazil. **Summa Phytopathol**, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.
- BROUWER, H. Testing for Chemical Toxicity Using Bacteria. **Journal of Chemical Education**, v. 68, p. 695-697, 1991.
- CAI, T. et al. The Efficacy of Umbelliferone, Arbutin, and N-Acetylcysteine to Prevent Microbial Colonization and Biofilm Development on Urinary Catheter Surface: Results from a Preliminary Study. **Journal Of Pathogens**, [s.l.], v. 2016, p.1-6, 2016.
- CAIERÃO, J; ANTUNES, A. G.; STEFENS, M. et al. **Novos Antimicrobianos: realidade e perspectivas**. Newslab Ed 66. Porto Alegre, p. 80-90. out. 2004.
- CANCRO cítrico. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

A CITRICULTURA do Estado de São Paulo (dados atualizados). Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/noticias/index.php?action=integra&cod=906>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

CITRUS. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

DAI, K; LUTKENHAUS, J. FtsZ is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** 1991.

DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Economicos. **Suco de Laranja:** Junho de 2016. Elaborada por Bradesco. Disponível em: <[http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset\\_suco\\_de\\_laranja.pdf](http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_suco_de_laranja.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2016.

DOUCETTE, C. D. et al. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.231-239, jan. 2013. Elsevier BV.

EPA - Environmental Protection Agency. **EPA registers copper-containing alloy products.** Washington: EPA, 2008. [Internet].

FAÚNDEZ, G. et al. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 4, n. 1, 2004. Springer Nature.

GALLO, G. G.; LANCINI, G.; PARENTI, F. **Antibiotics: A Multidisciplinary Approach.** 2. ed. EUA: Springer, 1995.

GOTTWALD, T. R.. **Citrus canker.** Phi, [s.l.] 2000. Scientific Societies

GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M.. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 5, p.1541-1547, 30 dez. 2010. American Society for Microbiology.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000300035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035)>. Acesso em: 12 jul. 2016.

GUNES, H. et al. Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. **Toxicology And Industrial Health**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 246-250, 4 out. 2013. SAGE Publications

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys.** Acta 1986, n. 1271, p. 501–514.

IBGE. **Produção agrícola municipal:** Culturas temporárias e permanentes. 41. ed. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2014. 95 p. Disponível em:

<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2014\\_v41\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2014_v41_br.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2016.

KHAN, I. A. et al. Piperine, a Phytochemical Potentiator of Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 50, n. 2, p. 810-812, 25 jan. 2006. American Society for Microbiology.

MADIGAN, M. T.; et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MILLS, S. D. When will the genomics investment pay off for antibacterial discovery? **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 71, n. 7, p.1096-1102, mar. 2006. Elsevier BV

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-12, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

MOSZER, I., et al. SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. **Nucleic Acids Res** v. 30, p. 62–65, 2002.

NEVES, M. F. et al. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 136 p. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o\\_retrato\\_da\\_citricultura\\_brasileira\\_baixa.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2016.

OLIVA, M.; CORDELL, S. C; LÖWE, J. Structural insights into FtsZ protofilament formation. **Nat Struct Mol Biol**, [s.l.], v. 11, n. 12, p.1243-1250, 21 nov. 2004. Nature Publishing Group.

ORHAN, D. D. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 165, n. 6, p. 496-504, ago. 2010

PALOMINO, J. C.; et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 2720–2722, 2002.

PATRA, J. K. et al. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 1, 20 set. 2014. Springer Nature.

PINHO, M. G.; ERRINGTON, J. Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.871-881, 26 set. 2003.

RAI, D. et al. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **Biochem. J.**, [s.l.], v. 410, n. 1, p.147-155, 15 fev. 2008. Portland Press Ltd.11.

RAMU, R. et al. Assessment of In Vivo Antidiabetic Properties of Umbelliferone and Lupeol Constituents of Banana (*Musa sp.* var. Nanjangud Rasa Bale) Flower in Hyperglycaemic Rodent Model. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 3, 22 mar. 2016. Public Library of Science (PLoS).

REDDY, P.J.; et al. Comprehensive Analysis of Temporal Alterations in Cellular Proteome of *Bacillus subtilis* under Curcumin Treatment. **PLoS ONE**, 2015.

RUIZ-AVILA, L. B. et al. Synthetic Inhibitors of Bacterial Cell Division Targeting the GTP-Binding Site of FtsZ. **ACS Chem. Biol.**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 2072-2083, 20 set. 2013. American Chemical Society (ACS).

SANCHES, A. L. et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.549-566, 2014. FapUNIFESP (SciELO).

SENASICA, LANREF-CP. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria. **Cancro de los cítricos: *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 33. ed. Coyoacán: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), 2013. 28 p. Disponível em: <<http://www.cesaveson.com/files/adb43d82a141b2f4a407da371c47afa5.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 112, p.116-131, jul. 2016. Elsevier BV.

SILVA, I. C. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri subsp. citri*. **J Bacteriol**, v. 195, n. 1, p. 85-94.

SIRIWONG, S. et al. The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Bmc Pharmacology And Toxicology**, [s.l.], v. 17, n. 1, 4 ago. 2016

SONG, J. et al. Antiviral Activity of Chrysin Derivatives against Coxsackievirus B3 in vitro and in vivo. **Biomolecules & Therapeutics**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.465-470, 30 set. 2015. The Korean Society of Applied Pharmacology.

TIAN, W. Inhibition of Fatty Acid Synthase by Polyphenols. **Cmc**, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 967-977, 1 abr. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.

TYAGI, P et al. Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 3, 26 mar. 2015. Public Library of Science (PLoS).

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. Washington: ASM Press, 2003.

WANG, J., et al. Anti-enterovirus 71 effects of chrysin and its phosphate ester. **PLoS One**. n. 9, e89668, 2014.

WEISS, D S.. Bacterial cell division and the septal ring. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.588-597, 14 set. 2004. Wiley-Blackwell.

WENZEL, M. et al. Proteomic Response of Bacillus subtilis to Lantibiotics Reflects Differences in Interaction with the Cytoplasmic Membrane. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 56, n. 11, p.5749-5757, 27 ago. 2012. American Society for Microbiology.

ZAMBOLIM, L. et al. **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 1997. p.83-180.

ZELENSKY, A. N. et al. Caffeine suppresses homologous recombination through interference with RAD51-mediated joint molecule formation. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 13, p. 6475-6489, 10 maio 2013. Oxford University Press (OUP).

---

Aluna: Raphaela Patini Lancellotti

---

Co-orientadora: Msc. Luana Galvão Morão

---

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira