RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/06/2017.

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ABIGAIL SAVIETTO

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

Março - 2016

ABIGAIL SAVIETTO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira[1]
Coorientadora: Dra. Isabel Cristiane da Silva[2]

[1]Departamento de Bioquímica e Microbiologia - Instituto de Biociências de Rio Claro *Universidade Estadual Paulista, UNESP-Rio Claro.*

[2]Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara *Universidade Estadual Paulista, UNESP-Araraquara.*

Rio Claro
2016

576 Savietto, Abigail
S267a Atividade antibacteriana de Galatos de Alquila acetilados sobre Xanthomonas citri subsp. citri / Abigail Savietto. - Rio Claro, 2016
78 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira
Coorientadora: Isabel Cristiane da Silva

1. Microorganismos. 2. Cancro cítrico. 3. Xanthomonas citri. 4. Divisão celular. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ABIGAIL SAVIETTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS.

Aos 23 dias do mês de junho do ano de 2016, às 09:00 horas, no(a) Sala 15 - Bloco Didático I - IB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA - Orientador(a) do(a) Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro, Profa. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA do(a) Instituto Agronômico de Campinas / Cordeiropolis/SP, Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA do(a) Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ABIGAIL SAVIETTO, intitulada **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE Xanthomonas citri subsp. citri**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Profa. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Dedico este trabalho
à minha família de sangue
e à que a vida escolheu para mim.

AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEGMENTS

Agradeço ao Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), da Universidade Estadual Paulista, UNESP (Rio Claro) por oferecer todo o material e equipamentos necessários para a condução deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento deste projeto (processos FAPESP nº 2014/11402-5 e BEPE-FAPESP nº 2015/04130-1) e concessão da bolsa de estudos.

À CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelos primeiros meses de bolsa de estudos no Mestrado.

Ao Laboratório de Química Verde e Medicinal (LQVM) do Departamento de Química e Ciências Ambientais da UNESP (Rio Preto), em especial ao Dr. Luis Octávio Regasini e ao MSc. Carlos Polaquini pela colaboração e síntese das moléculas caracterizadas neste trabalho.

Ao Professor Dr. Henrique Ferreira, minha gratidão por ter me dado a oportunidade de pesquisar junto ao seu grupo. Henrique, eu aprecio todos os esforços que você também colocou neste projeto e por você sempre ter tido tempo para minhas dúvidas. Eu também sou muito grata por sua confiança em mim e pelo seu apoio à minha ida ao exterior para concluir uma importante parte desta pesquisa.

À minha coorientadora Dra. Isabel Cristiane da Silva, Isa, meu profundo agradecimento por todos os ensinamentos, discussões de resultados, pelo companheirismo e constante supervisão durante os experimentos em Araraquara. Obrigada por ter sido tão paciente e sempre aberta às minhas dúvidas além de me motivar diante de resultados negativos.

I also would like to thank the University of Groningen (the Netherlands) and the Department of Molecular Microbiology for providing all the necessary facilities I used during my stay there.

I am grateful to Professor Dr. Dirk-Jan Scheffers for the collaboration in the project, for hosting me in his lab in Groningen, for all the contributions during the weekly discussions about my work and for the evaluation of my report to FAPESP.

To Dr. Malgorzata Kopacz, Gosia, you were much more than a supervisor! Thank you for your motivation and involvement to my project. You knew how to build a perfect environment to training me. Thank you to always pushing me forward and for the commitment to my learning. I learned from you even when you were not training me.

To all those who made my stay in Netherlands the best adventure of my life until now. Anabela S. Borges, Ewa Król, Danae Morales, and André S. G. Lorenzoni, thank you for the funny lunch times, dinners, beers, borrels, talks and for the friendly and collaborative environment at the lab.

To Annelot van Hemert and Robin Mills for hosting me at my first month in Groningen and for teaching me how this lovely city works. Berber van Haren, Ellen Bosna, Nicole Switzer and Irene Schoonbeek, thank you for sharing the house with me and for providing a friendly and peaceful environment to live. I will always remember that night with pizza and wine!

Hans, Gertraud and family. I am glad to be received in your home as another daughter. You all were an unconditional support in all these month in Netherlands.

Gostaria de agradecer também à minha família rio-clarense, sem a qual toda a minha estada nestes 7 anos em Rio Claro não seria a mesma. Aos amigos da família CBI09, não há palavras que possam expressar o tamanho do amor que tenho por vocês, do orgulho que sinto por nós e por quem nos tornamos. Sou muito grata por poder dividir a minha história com vocês. Sem nenhuma distinção, desejo a todos vocês muita coragem, ânimo, perseverança e sucesso na caminhada. Estaremos sempre aqui uns pelos outros, não importa a distância.

Aos meus pais, Márcia e Téo, eu agradeço por vocês se amarem. Obrigada por saberem como e quando dizer sim e não. Obrigada por todas as velinhas acesas quando só quem poderia olhar por mim era Deus. Obrigada por serem positivos, realizadores, por sempre incentivarem o diálogo honesto e a empatia em nossa família. Obrigada por criarem a mim e a meus irmãos com liberdade.

Aos meus irmãos Natan, Davi e Tobias, obrigada por cada detalhe e cuidado comigo. Aquele pacotinho rosa que o pai e a mãe trouxeram do hospital hoje está concretizando mais um sonho, e vocês foram muito importantes para a realização dele. Obrigada pelos três diferentes jeitos de amar. Bárbara, obrigada por preencher um espaço muito especial na nossa família!

Und Justus, mein Liebling, Danke schön! Vielen Dank für deine Liebe, deinen Respekt. Danke dass du mir die Freiheit gibst, all meine Lebensträume zu verwirklichen.

"Eles usam a Biologia como uma conveniente justificativa [...] dizendo que, como a natureza se baseia em uma luta pela vida, devemos construir a nossa sociedade em torno do egoísmo e da competição. Eles leem o que querem na natureza e sinto que é meu dever mostrar que eles entenderam tudo errado.

Há muitos animais que sobrevivem graças à cooperação. E nossa espécie em particular provém de uma longa linhagem de ancestrais que dependiam uns dos outros. Empatia e solidariedade estão incutidas em nós, o projeto de nossa sociedade deve refletir esse lado da espécie humana também".

(Frans de Waal, The Age of Empathy: Nature's Lessons for a Kinder Society)

RESUMO

O agente etiológico do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X.citri*), infecta todas as variedades de citros de interesse econômico ao redor do mundo. Sem controle químico eficaz, a única forma aconselhada de se evitar a propagação da doença é a erradicação de plantas. Essa prática, porém, não é aceita pelos citricultores e demanda grandes investimentos em inspeção de pomares por pessoal treinado no reconhecimento da doença. Nos últimos anos, a legislação para controle do cancro cítrico tem sofrido afrouxamentos que resultaram em um progressivo aumento da doença no maior produtor mundial de laranja, o estado de São Paulo. Esta pesquisa teve como objetivo estender um projeto que vem sendo realizado em nosso grupo que é o desenvolvimento de substâncias inibidoras de crescimento de *X. citri* (galatos de alquila). No presente trabalho, quatro novas moléculas, originadas a partir de galatos de alquila – galatos de alquila acetilados – demonstraram inibir o crescimento de *X.citri* de modo similar ao da canamicina (controle positivo), observado pelo ensaio *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA). Em observações com microscopia de fluorescência e utilizando-se uma linhagem de *X.citri* com septo marcado, a localização da proteína GFP-ZapA foi rapidamente perturbada após o tratamento, sugerindo que as substâncias poderiam ter a maquinaria de divisão celular como alvo. Entretanto, em ensaios bioquímicos com FtsZ purificada de *X. citri* na presença dos galatos de alquila acetilados, verificou-se que essas drogas têm pouca ou nenhuma ação na sedimentação e na inibição da atividade GTPásica de FtsZ, e provavelmente atuem dissipando o potencial de membrana.

Palavras chave: Cancro cítrico, atividade antibacteriana, FtsZ, galatos de alquila, divisão celular.

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X.citri*) is the etiological agent of citrus canker, a disease that affects all the varieties of citrus of economic importance around the world. Currently, eradication of infected trees constitutes the only effective practice to control the spread of *X. citri*. This disease has enormous social and economic impact in the orange juice production industry, especially concerning the difficulties to inspect plantations and to persuade growers to eliminate foci of the disease. Regarding this, recent relaxations in the policies of eradication within the state of São Paulo, the main orange producer in the world, indicate that citrus canker may become endemic in this area. The current proposal aims to extend the work that is being done in our research group, developing inhibitors of *X. citri* growth (alkyl gallates). In this study, four new molecules originated from alkyl gallates – acetylated alkyl gallates – were able to inhibit the *X.citri* growth, similarly to kanamycin (positive control), assessed by Resazurin Microtiter Plate Assay (REMA). In fluorescent microscopy assay, using a mutant strain of *X. citri* labeled with green fluorescent protein (GFP) in ZapA, the drugs were able to disrupt the location of septa, suggesting that the substances may have the cell division machinery as a target. However, in biochemical assays using FtsZ purified from *X. citri* in the presence of the drugs, the drugs showed low or no effect on the sedimentation or GTPase activity of FtsZ. Instead of this, they showed reasonable effect on membrane permeability and probably these drugs acts by dissipating the membrane potential.

Key words: Citrus canker, antibacterial activity, FtsZ, alkyl gallates, cell division.

LISTA DE FIGURAS

Figura Descrição Página

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Produção de Laranjas no Brasil. 17
Figura 2 – Distribuição mundial do cancro cítrico. 20
Figura 3 – Lesões típicas do cancro cítrico. 22
Figura 4 – Ciclo de vida do cancro cítrico. 24
Figura 5 – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* próximo da abertura estomatal 25
Figura 6 - Medidas de controle do cancro cítrico.....26
Figura 7 – Série histórica do Índice de talhões contaminados (%) por cancro cítrico no estado de São Paulo (2000-2012). 26
Figura 8 - Divisomo formado pelo anel Z e outras proteínas associadas.....29
Figura 9 - Formação do septo e divisão celular bacteriana.....30

CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Figura 10 – Reação de esterificação do ácido gálico 34
Figura 11 – Reação de síntese de galatos de alquila acetilados. 35
Figura 12 – Galatos de alquila acetilados. 35
Figura 13 – Esquema de montagem do experimento de REMA em placa de 96 poços..... 37
Figura 14 – Galatos de alquila acetilados inibem crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri.* 43
Figura 15 – Plaqueamento em superfície para determinação da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados. 45
Figura 16 – Tamanho celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tratadas com galatos de alquila acetilados ao longo de 6 horas. 47
Figura 17 - Galatos de alquila promovem a disrupção do septo em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.....49

CHAPTER 2 - ANALISYS OF ACETYLATED ALKYL GALLATES TARGETING THE CELL DIVISION MACHINERY IN *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Figure 18 – SDS-PAGE of the FtsZ purification steps..... 59

Figure 19 – FtsZ from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* polymerization depends on the presence of $MgCl_2$ 59

Figure 20 – GTPase Activity of FtsZ from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in the presence of acetylated alkyl gallates..... 61

Figure 21 – Sedimentation of FtsZ in the presence of acetylated alkyl gallates. 62

Figure 22 – Sedimentation of FtsZ in the presence of acetylated alkyl gallates and 0.01% Triton X-100 63

Figure 23 – Cells of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* treated with Live/Dead BacLight Ki 65

Figure 24 – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* membrane integrity is affected by the presence of acetylated alkyl gallates..... 65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Tabela Descrição Página

Tabela 1 – Valores de CIM_{90} e CIM_{50} dos galatos de alquila acetilados. 42

Tabela 2 – Dados comparativos de concentração inibitória mínima (CIM_{90}) e lipofilicidade teórica entre galatos de alquila acetilados e galatos de alquila não acetilados..... 44

Tabela 3 – Atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados. 46

Tabela 4 – Comprimento de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tratadas com galatos de alquila acetilados. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviatura	Descrição
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Microgramas por mililitro
µM	Micromolar
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM_{50}	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano
CIM_{90}	Concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CV	Controle de veículo
CVC	Clorose variegada do citrus
DMSO	Dimetil sulfóxido
$D.O._{600nm}$	Densidade óptica no comprimento de onda de 600nm
FtsZ	*filamentation temperature sensitive protein* Z
FUNDECITRUS	Fundo de Defesa da Citricultura
GFP	*Green fluorescent protein*
HBL	Huanglongbing
LB	Meio Lauria Bertani
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos

NYG	Meio de cultura *Nutrient Yeast Glycerol*
pv.	patovar
REMA	*Resazurin Microtiter Assay Plate*
rpm	Rotações por minuto
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento
SEAB	Secretaria do Estado de Agricultura e Abastecimento
subsp.	Subespécie
UAF	Unidade arbitrária de fluorescência
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
WT	*Wild type*
X. citri* subsp. *citri	*Xanthomonas citri* subsp. *citri*

SUMÁRIO

RESUMO 5
ABSTRACT 6
LISTA DE FIGURAS 7
LISTA DE TABELAS 9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS 10
1 INTRODUÇÃO GERAL 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 A Citricultura Brasileira 17
2.2 O agente causal do cancro cítrico: *Xanthomonas citri* subsp. *citri (X. citri)* 18
2.3 O Cancro Cítrico 21
2.4 Divisão celular bacteriana 27
2.5 FtsZ como alvo de novos antimicrobianos 30
CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 32
1 OBJETIVOS GERAIS 33
1.1 Objetivos Específicos 33
2 MATERIAIS E MÉTODOS 34
2.1 Otimização dos galatos de alquila para atividade antibacteriana 34
2.2 Linhagens celulares e condições de crescimento 35
2.3 Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) 36
2.4 Determinação da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados 38
2.5 Microscopia de Contraste por Interferência Diferencial (DIC) e Microscopia de Fluorescência 39
2.5.1 Análise do septo de Xanthomonas citri subsp. citri na presença de galatos de alquila acetilados 39
2.5.2 Análise de tamanho de X. citri subsp. citri na presença de galatos de alquila acetilados 39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
3.1 Inibição do crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de galatos de alquila acetilados 41

3.2 Caracterização da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados 45
3.3 Tamanho celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de galatos de alquila acetilados 46
3.4 Galatos de alquila modificados podem ter como alvo a maquinaria de divisão celular 48
4 CONCLUSÕES 50

CHAPTER 2 - ANALISYS OF ACETYLATED ALKYL GALLATES TARGETING THE CELL DIVISION MACHINERY IN *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 51
ABSTRACT 52
1 INTRODUCTION 53
1.1 FtsZ as a target of new antibiotics 53
2 GENERAL OBJECTIVES 55
2.1 Specific Objectives 55
3 MATERIAL AND METHODS 56
3.1 Expression and Purification of FtsZ from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 56
3.2 Determination of Protein Concentration 56
3.3 GTPase Activity assay 57
3.4 Sedimentation Assay 57
3.5 Membrane Permeability Assay 58
4 RESULTS AND DISCUSSION 59
4.1 Purification of FtsZ protein from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 59
4.2 The GTPase Activity of FtsZ in the Presence of Acetylated Alkyl Gallates 60
4.3 Sedimentation of FtsZ in Presence of Acetylated Alkyl Gallates 62
4.4 Acetylated Alkyl Gallates Increase the Membrane Permeability in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 64
5 CONCLUSIONS 68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

1 INTRODUÇÃO GERAL

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri* subsp. *citri*) é o agente causal do cancro cítrico, uma doença grave que acomete variedades de citros cultivadas hoje ao redor do mundo. Não há métodos de controle curativos e, para se evitar a disseminação da doença, faz-se: (a) manejo integrado com bactericidas cúpricos, uso de variedades menos susceptíveis; ou (b) a erradicação de plantas presentes nas áreas infestadas com o patógeno. Essa doença encontra-se em progressivo aumento no estado de São Paulo, e a prática da eliminação de plantas está cada vez mais em desuso, apesar de ainda ser obrigatória por lei. Quando há presença do patógeno em muitas áreas de produção, a prática da erradicação torna-se extremamente custosa, resultando na preferência pelo emprego do manejo integrado.

O estado de São Paulo encontra-se atualmente nesse processo de transição entre essas duas estratégias, antagônicas, de controle. Por outro lado, embora o manejo integrado permita a produção de frutas cítricas em condições endêmicas da doença, essa prática implica na manutenção permanente do patógeno nas áreas de produção. Como consequência, medidas de controle precisam ser continuamente empregadas pelos produtores. Além disso, como o manejo integrado resulta apenas em uma relativa redução das perdas de produção, faz-se ainda mais necessária a busca por alternativas mais eficazes de controle dessa doença.

Em vista disso, o nosso grupo de pesquisa, juntamente com outros colaboradores, visa ao estudo de alternativas para o setor citrícola, pela síntese e caracterização de moléculas potencialmente inibidoras da bactéria causadora do cancro cítrico. Recentemente, nosso grupo demonstrou que ésteres de ácido gálico são inibidores de crescimento de *X. citri*, e que as bactérias tratadas com essas substâncias apresentaram redução em sua habilidade de colonização do hospedeiro citros (SILVA et al., 2013). Além disto, as bactérias tratadas com galatos de alquila tiveram sua morfologia celular alterada com aumento significativo de tamanho e apresentaram perturbações relacionadas a processos de segregação cromossômica e divisão celular bacteriana. Posteriormente, nosso grupo demonstrou também que as mesmas substâncias teriam a maquinaria de divisão celular e membranas como alvo de ação (KRÓL et al., 2015).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) é um intermediário no metabolismo especial vegetal sendo um componente de taninos hidrolisáveis (GRUNDHOFER et al.; MUIR et al.; WANG, S. et al., 2010) e, juntamente com seus derivados semissintéticos, tem sido associado a

um amplo espectro de ações biológicas como antioxidante, antiviral, antitumoral (ARUOMA et al., 1993; DODO et al., 2008; KRATZ et al.; LOCATELLI et al., 2008; MORAIS et al., 2010; ROSSO et al., 2006), antifúngico (FUJITA; KUBO, 2002) e antibacteriano, inclusive contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (KUBO et al., 2004; KUBO; XIAO; FUJITA, 2002; MERKL et al., 2010).

Com base nos resultados anteriores do grupo, e visando alternativas ao controle do cancro cítrico, este trabalho propôs caracterizar moléculas de galatos de alquila modificados, os galatos de alquila acetilados, quanto ao seu potencial de inibição **(Capítulo 1)** e seu mecanismo de ação **(Capítulo 2)** em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, com foco no processo de divisão celular bacteriano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. W.; ERRINGTON, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. **Nat Rev Microbiol.,** v. 7, n. 9, p. 642-53., 2009.

AMARAL, A. M. D. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo., 2003. Disponível em: < http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot086.pdf >. Acesso em: 04/03/2015.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. A epidemiologia do cancro cítrico. **Summa Phythopathologica,** v. 27, p. 151-156, 2001.

ANDERSON, D. E. et al. Comparison of Small Molecule Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ and Identification of a Reliable Cross-Species Inhibitor. **ACS Chem Biol,** v. 7, n. 11, p. 1918-1928, 2012/11/16 2012.

ARUOMA, O. I. et al. Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. **J. Agric. Food & Chem.,** v. 41, p. 1880-1885, 1993.

BALGAVÝ, P.; DEVÍNSKY, F. Cut-off effects in biological activities of surfactants. **Advances in Colloid and Interface Science,** v. 66, p. 23-63, 1996.

BEHLAU, F. **Epidemiologia do cancro cítrico (Xanthomonas axonopodis pv. citri) em laranja 'Pêra'(Citrus sinensis) sob condições de controle químico e cultural**. 2006. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz

BEHLAU, F. et al. Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. **Plant Pathology,** v. 59, n. 6, p. 1031-1036, 2010.

BEHLAU, F. et al. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. **Crop Protection,** v. 27, n. 3–5, p. 807-813, 3// 2008.

BEHLAU, F. et al. Molecular characterization of copper resistance genes from Xanthomonas citri subsp. citri and Xanthomonas alfalfae subsp. citrumelonis. **Appl Environ Microbiol,** v. 77, n. 12, p. 4089-96, Jun 2011.

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

BEURIA, T. K.; SANTRA, M. K.; PANDA, D. Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. **Biochemistry.,** v. 44, n. 50, p. 16584-93., 2005.

BI, E. et al. FtsZ and cell division. **Res. Microbiol. ,** v. 142, p. 249-252, 1991.

BI, E.; LUTKENHAUS, J. FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli. **Nature,** v. 354, n. 6349, p. 161-164, 1991.

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.

BORK, P.; SANDER, C.; VALENCIA, A. An ATPase domain commom to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin and hsp 70 heat shock proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 89, p. 7290-7294, 1992.

BRADBURY, J. F. Guide to plant Pathogenic Bacteria. **Slough: C.A.B. International**, p. 332, 1993.

BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science.,** v. 292, n. 5525, p. 2275-6., 2001.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. Xanthomonas citri: breaking the surface. **Mol Plant Pathol,** v. 4, n. 3, p. 141-57, May 1 2003.

BUDDELMEIJER, N.; BECKWITH, J. Assembly of cell division proteins at the E. coli cell center. **Curr Opin Microbiol.,** v. 5, n. 6, p. 553-7., 2002.

CHAGAS, M. C. M. et al. Phyllocnistis citrella Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium Xanthomonas axonopodis pv citri in Brazil. **Neotrop. Entomol.,** v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.

CHEN, Y.; ERICKSON, H. P. Rapid in Vitro Assembly Dynamics and Subunit Turnover of FtsZ Demonstrated by Fluorescence Resonance Energy Transfer. **Journal of Biological Chemistry,** v. 280, n. 23, p. 22549-22554, June 10, 2005 2005.

DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. **Nature,** v. 417, n. 6887, p. 459-63., 2002.

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

DE BOER, P.; CROSSLEY, R.; ROTHFIELD, L. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. **Nature,** v. 359, n. 6392, p. 254-6, Sep 17 1992.

DODO, K. et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. **Bioorg Med Chem.,** v. 16, n. 17, p. 7975-82. Epub 2008 Jul 29., 2008.

DOMADIA, P. et al. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochem Pharmacol.,** v. 74, n. 6, p. 831-40. Epub 2007 Jun 23., 2007.

ERICKSON, H. P.; ANDERSON, D. E.; OSAWA, M. FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 74, n. 4, p. 504-28, Dec 2010.

ERRINGTON, J.; DANIEL, R. A.; SCHEFFERS, D. J. Cytokinesis in bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev.,** v. 67, n. 1, p. 52-65, table of contents., 2003.

FEICHTENBERGER, E. et al. **Doenças dos Citros (Citrus spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.;BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. ,**. Ed. Agronômica Ceres, 2005. 239

FOSS, M. H. et al. Inhibitors of bacterial tubulin target bacterial membranes in vivo. **MedChemComm,** v. 4, n. 1, p. 112-119, 2013.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **Int J Food Microbiol.,** v. 79, n. 3, p. 193-201., 2002.

GARRITY, G.; HOLT, J. An overview of the road map to the manual. **Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn. Springer Verlag, New York**, p. 1-19, 2000.

GOEHRING, N. W.; BECKWITH, J. Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. **Curr Biol.,** v. 15, n. 13, p. R514-26., 2005.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. **Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV**, 2002.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. **Cintrus Canker: The pathogen and its impact**. Plant Health Progress 2002

GOTTWALD, T. R. et al. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology,** v. 92, n. 4, p. 361-77, Apr 2002.

GOTTWALD, T. R.; TIMMER, L. W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Trop. Agric.,** v. 72, p. 194-201, 1995.

GRAHAM, J. H. et al. Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol Plant Pathol,** v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

GRAVENA, S. História do controle de pragas na citricultura brasileira. **Citrus Research & Technology,** v. 32, n. 2, p. 85-92, 2011.

GRUNDHOFER, P. et al. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. n. 0031-9422 (Print), 20010625 DCOM- 20011004

GUEIROS-FILHO, F. J.; LOSICK, R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes Dev.,** v. 16, n. 19, p. 2544-56., 2002.

HARRY, E.; MONAHAN, L.; THOMPSON, L. Bacterial cell division: the mechanism and its precison. **Int Rev Cytol.,** v. 253, p. 27-94., 2006.

HASSE, C. H. Pseudomonas citri, the cause of citrus canker. **Journal Agricola Res. ,** v. 4, p. 97-100, 1915.

HAYDON, D. J. et al. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. **Science,** v. 321, n. 5896, p. 1673-5, Sep 19 2008.

HAYWARD, A. C. The host of *Xanthomonas* In: (Ed.). ***Xanthomonas***: Springer Netherlands, 1993. p.1-119.

JAISWAL, R. et al. Totarol inhibits bacterial cytokinesis by perturbing the assembly dynamics of FtsZ. **Biochemistry.,** v. 46, n. 14, p. 4211-20. Epub 2007 Mar 10., 2007.

KHAN, L. D.; HINGORANI, M. K. Strain studies on *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. **Journal Hort Scienc,** v. 45, p. 15-17, 1970.

KRATZ, J. M. et al. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. n. 1678-8060 (Electronic), 20080917 DCOM- 20081117

KRÓL, E. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Frontiers in Microbiology,** v. 6, n. 390, 2015.

KRÓL, E.; SCHEFFERS, D. J. FtsZ Polymerization Assays: Simple Protocols and Considerations. **Journal of Visualized Experiments,** v. 81, p. 13, 2013.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity of akyl gallates against Bacillus subtilis. **J Agric Food Chem.,** v. 52, n. 5, p. 1072-6., 2004.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Anti-MRSA activity of alkyl gallates. **Bioorg Med Chem Lett.,** v. 12, n. 2, p. 113-6., 2002.

LEITE JR, R. P. Cancro Cítrico: Prevenção e Controle no Paraná. Londrina, Brazil. **Fundação Instituto Agronômico do Paraná.**, 1990.

LEITE JR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by Xanthomonas campestris pv. citri in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection,** v. 9, n. 1, p. 3-7, 2// 1990.

LEYNS, F. et al. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review,** v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LOCATELLI, C. et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorg Med Chem.,** v. 16, n. 7, p. 3791-9. Epub 2008 Jan 31., 2008.

LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nat Rev Drug Discov.,** v. 7, n. 4, p. 324-38., 2008.

LOWE, J.; AMOS, L. A. Crystal struture of the bacterial cell-division protein FtsZ. **Nature,** v. 391, p. 203-206, 1998.

LUTKENHAUS, J. FtsZ ring in bacterial cytokinesis. **Mol Microbiol,** v. 9, n. 3, p. 403-409, 1993.

LUTKENHAUS, J.; ADDINALL, S. G. Bacterial cell division and the Z ring. **Annu Rev Biochem.,** v. 66, p. 93-116., 1997.

MARGALIT, D. N. et al. Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 101, n. 32, p. 11821-6. Epub 2004 Aug 2., 2004.

MARTINS, P. M. et al. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in Xanthomonas citri ssp. citri: targeting the division septum. **FEMS Microbiol Lett,** v. 2010, p. 23, 2010.

MERKL, R. et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids

Alkyl Esters. **Czech J. Food Sci.,** v. 28, n. 4, p. 275-279, 2010.

MICHIE, K. A.; LÖWE, J. Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. **Annu. Rev. Biochem.,** v. 75, p. 467-492, 2006.

MORAIS, M. C. et al. Suppression of TNF-alpha induced NFkappaB activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat Prod Res,** v. 24, n. 18, p. 1758-65, 2010.

MORIMOTO, R. I. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. **Cancer Cells,** v. 3, n. 8, p. 295-301, Aug 1991.

MUIR, R. M. et al. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (Escherichia coli) and walnut (Juglans regia). n. 1573-5028 (Electronic), 20110315 DCOM- 20110517

MUKHERJEE, A.; DAI, K.; LUTKENHAUS, J. Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 90, p. 1053-1057, 1993.

MUKHERJEE, A.; LUTKENHAUS, J. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. **Journal of Bacteriology,** v. 176, n. 9, p. 2754-2758, 1994.

_____. Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. **The EMBO Journal,** v. 17, n. 2, p. 462-469, Jan 15 1998.

NAMEKATA, T.; ROSSI, A.; CERAVOLO, L. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja, Cordeirópolis,** v. 17, n. 1, p. 67-78, 1996.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. 2003.

NEVES, M. F. et al. O Retrato da Citricultura Brasileira. v. 1ª, 2010.

NOGALES, E. E. A. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. **Nat Struct Biol,** v. 5, n. 6, p. 451-458, 1998.

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, n. 8, p. 2720-2., 2002.

ROMBERG, L.; LEVIN, P. A. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. **Annu. Rev. Microbiol,** v. 57, p. 125-154, 2003.

ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. FEALQ/FUNDECITRUS. Piracicaba, SP**:** 201 p. 2001.

ROSSETTI, V. V. **Manual Ilustrativo de doenças dos citrus.** FEALQ/FUNDECITRUS, 2001.

ROSSO, R. et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alquil esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorg Med Chem.,** v. 14, n. 18, p. 6409-13. Epub 2006 Jun 8., 2006.

SAA. **Resolução SAA - 147**. Secretaria de Agricultura e Abastecimento: Diário Oficial do Estado de São Paulo. Resolução SAA - 147 , de 31-10-2013 2013.

SANCHES, A. L. R. et al. 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.

SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst Appl Microbiol,** v. 29, n. 8, p. 690-5, Dec 2006.

SCHAAD, N. W. et al. 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. **Syst Appl Microbiol,** v. 28, n. 6, p. 494-518, Aug 2005.

SCHEFFERS, D. J. et al. GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. **Biochemistry.,** v. 41, n. 2, p. 521-9., 2002.

SCHUBERT, T. S. et al. Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida—Again. **Plant disease,** v. 85, n. 4, p. 340-356, 2001/04/01 2001.

SILVA, I. C.; FERREIRA, H. Drug Sensitivity Assay of Xanthomonas. citri subsp. citri Using REMA Plate Method. **Bio-Protocol** v. 3, Aug 20, 2013 2013.

SILVA, I. C. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against Xanthomonas citri subsp. citri. **J Bacteriol.,** v. 195, n. 1, p. 85-94. doi: 10.1128/JB.01442-12. Epub 2012 Oct 26., 2013.

SOBRINHO, A. P. C. et al. A Cultura dos Citros. 2013. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Citricultura/35RO/35%C2%AA%20RO_%20Citricultura_Embrapa%20parte%203.pdf >. Acesso em: 15/03.

STRAHL, H.; HAMOEN, L. W. Membrane potential is important for bacterial cell division. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 107, n. 27, p. 12281-12286, July 6, 2010 2010.

STRICKER, J.; ERICKSON, H. P. In Vivo Characterization of Escherichia coli ftsZ Mutants: Effects on Z-Ring Structure and Function. **Journal of Bacteriology,** v. 185, n. 16, p. 4796-4805, August 15, 2003 2003.

SWARUP, S. et al. A pathogenicity locus from Xanthomonas citri enables strains from several pathovars of X. campestris to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology,** v. 81, n. 7, p. 802-809, 1991.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. 399

VAN DEN ENT, F.; LOWE, J. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. **Embo J.,** v. 19, p. 5300-5307, 2000.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 45, p. 472-489, 1995.

VICENTE, M. et al. Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. **J Bacteriol.,** v. 188, n. 1, p. 19-27., 2006.

WANG, J. et al. Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. **J Biol Chem.,** v. 278, n. 45, p. 44424-8. Epub 2003 Sep 2., 2003.

WANG, S. et al. Actin-like cytoskeleton filaments contribute to cell mechanics in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2010.

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Plagas y enfermedades de los citricos.** 1996.