Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Departamento de Ciências Biológicas

ISABEL CRISTIANE DA SILVA

Inibição da divisão celular em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Bacillus subtilis*

ARARAQUARA
2014

ISABEL CRISTIANE DA SILVA

Inibição da divisão celular em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Bacillus subtilis*

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP- Araraquara como pré-requisito para obtenção do título de doutor

Orientador: Henrique Ferreira
Co-orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento

ARARAQUARA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Silva, Isabel Cristiane da
S586i Inibição da divisão celular em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Bacillus subtilis* / Isabel Cristiane da Silva. – Araraquara, 2014
98 f.: il., grafs, tabs

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Henrique Ferreira
Coorientador: Luis Vitor Silva do Sacramento

1. Cancro cítrico. 2. Galatos de alquila. 3. Divisão celular. 4. Septo bacteriano. I. Ferreira, Henrique, orient. II. Sacramento, Luis Vitor Silva do, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Ferreira **(Orientador e Presidente)**

Prof. Dr. José Belasque Júnior

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Prof. Dr. Franklin Behlau

Araraquara, 28 de fevereiro de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais Ana e Edevaldo e meu irmão Fernando. Nada disso seria possível sem a ajuda e o amor de vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento a todos que contribuíram de forma variada e em diferentes níveis ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço imensamente ao meu orientador Henrique Ferreira, pela oportunidade, apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho.

Meu reconhecimento aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas, por todo apoio, aprendizado e convivência.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e de defesa Profa Dra Clarice Queico Fujimura Leite, Fernando Rogério Pavan e Franklin Behlau pelas preciosas e enriquecedoras considerações.

Ao Prof. Dr. Luis Octávio Regasini que foi um colaborador de importância vital para o desenvolvimento deste trabalho, sendo responsável por selecionar e fornecer as substâncias testadas. Agradeço também pelas discussões sempre frutíferas, apontamentos e estimada amizade.

Ao Prof. Dr. José Belasque Junior, por todas as valiosas sugestões, por sua contribuição com os testes de patogenicidade e ajuda com a análise estatística dos dados. Fica aqui o meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento pela co-orientação, por disponibilizar seu laboratório no início deste trabalho, por toda sua ajuda, generosidade e carinho.

Ao Fundecitrus, pelo apoio e mudas cedidas.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, pela receptividade e disponibilidade de equipamentos.

As minhas colegas de laboratório Paula e Teresa pelo apoio acadêmico e agradáveis momentos de convivência.

À minha querida amiga Júlia pelas discussões acadêmicas, apoio, companheirismo, conselhos e por estar presentes nos melhores e piores momentos. Araraquara não é a mesma sem você.

Quero aqui agradecer também a Amanda pela amizade, carinho, conversas e principalmente pelos momentos que passamos juntas durante a nossa estadia na Europa. Esse foi um momento muito especial da minha vida e foi muito bom tê-lo compartilhado com você.

Ao João pela força, amor, carinho e compreensão nos momentos distantes.

Em especial quero agradecer aos meus queridos pais Ana e Edevaldo e meu irmão Fernando, por serem meu pilar de sustentação. Obrigada por todo incentivo, apoio incondicional e sabedoria. Tudo o que sou hoje eu agradeço a vocês.

I would like to express my gratitude to Dr. Dirk-Jan Scheffers, for accepting me into his group for one year, and whose expertise, understanding, and patience, added considerably to my graduate experience.

I would like to acknowledge the University of Groningen and the Department of Molecular Microbiology. My graduate experience benefitted greatly from the time I spent there.

I must also acknowledge the various members of the Molmic group with whom I had the opportunity to work They provided a friendly and cooperative atmosphere to work.

I would like to thank Ana Borges, and Danae Morales Angeles, which were good friends, always cheering me up (I miss our Friday`s nachos). It would have been a lonely lab without them. I will also thank another special person, Ewa Król, who deserves credit for providing much needed assistance and taking time out from her busy schedule helping me with all the FtsZ experiments. My research would not have been possible without her help.

Thanks also goes out to my friends at Winschoterdiep who provided a fun filled environment to live.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP; processo 2010/02667-4) e ao Programa Ciência sem Fronteiras (CNPq; processo 201196/2012-3) pelas bolsas concedidas.

"The more we learn about the world, and the deeper our learning, the more conscious, specific, and articulate will be our knowledge of what we do not know; our knowledge of our ignorance. For this indeed, is the main source of our ignorance - the fact that our knowledge can be only finite, while our ignorance must necessarily be infinite."

Karl Popper

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é o agente causal do cancro cítrico asiático, uma severa doença que afeta todos os cultivares das principais áreas produtores ao redor do mundo. Até o momento não há nenhum tratamento capaz de combater o cancro cítrico. Dessa forma, a erradicação de plantas infectadas constitui a única medida de controle efetivo para evitar a disseminação da doença. Com o programa de erradicação sob ameaça e um claro risco de que Xac torne-se endêmica na principal área produtora de laranja no mundo, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novas estratégias para o combate do cancro. Neste trabalho foi avaliada a atividade de galatos de alquila para a prevenção do crescimento de Xac. Estes ésteres desempenham um potencial de atividade anti-Xac similar ao da kanamicina (controle positivo), como observado pelo teste Resazurin Microtiter Assay (REMA). O tratamento de Xac com estas substâncias induziram alteração na morfologia celular, e a investigação de possíveis alvos intracelulares usando linhagens de Xac com o septo e centrômero marcados, apontaram para um alvo comum envolvido com a segregação cromossômica/divisão. Além disso, a inoculação artificial de citros com Xac pré-tratada com galatos de alquila demonstraram que a bactéria perde a habilidade de colonizar o hospedeiro, o que é uma evidência a favor do potencial destes ésteres em proteger plantas contra a infecção de Xac. No intuito de determinar o mecanismo de ação, alguns experimentos foram realizados em *Bacillus subtillis*. Os galatos de alquila também mostraram-se ativos contra *B. subtillis*. A localização de FtsZ foi rapidamente perturbada após o tratamento, o que sugere que as substâncias possam ter a maquinaria de divisão celular como alvo. Quando estudados *in vitro*, as substâncias afetaram FtsZ formando estruturas que podiam ser facilmente sedimentadas em alta velocidade, independentemente da presença de nucleotídeo. Estas estruturas parecem ser específicas, já que a proteína BSA (soro albumina bovina) não sedimentou na presença dos galatos de alquila. Contudo, a hidrólise de GTP, um indicador da dinâmica de FtsZ, foi inibida pelos substâncias. Combinados, estes dados sugerem fortemente que FtsZ possa ser um alvo para os galatos de alquila.

Palavras-chave: cancro cítrico, galatos de alquila, divisão celular, septo, FtsZ

ABSTRACT

The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) is the causal agent of asiatic citrus canker, a severe disease that affects all the cultivars of citrus in the main citrus producing areas worldwide. There is no curative treatment for citrus canker. Thus, the eradication of infected plants constitutes the only effective control for the spread of disease. Since the eradication program is under threat, and with a clear risk of Xac becoming endemic in the main orange producing area worldwide, there is an urgent need for the development of new strategies to fight citrus canker. In this work, were evaluated the potential use of alkyl galates to prevent Xac growth. These esters displayed a potent anti-Xac activity similar to kanamycin (positive control) as observed by the Resazurin Microtiter Assay (REMA). Treatment of Xac with these compounds induced altered cell morphology, and investigation of the possible intracellular targets using Xac strains labeled for septum and centromere pointed to a common target involved with chromosome segregation and cell division. Furthermore, artificial inoculation of citrus with Xac pre-treated with alkyl galates showed that the bacterium loses the ability to colonize its host, which argued in favor of the potential of these esters to protect citrus plants against Xac infection. In attempt to determine their mechanism of action some experiments were performed in *Bacillus subtillis*. Alkyl gallates were also active against *B. subtilis* and the FtsZ localization is rapidly perturbed after the treatment, which suggested that the compounds may target the cell division machinery. When studied *in vitro*, the alkyl gallates affected FtsZ by forming structures that could easily be spun down at high velocity, independent of the presence of nucleotide. These structures seem to be specific since the BSA (bovine serum albumin) protein did not sediment in the presence of the alkyl gallates. Also, GTP hydrolysis, an indicator of FtsZ dynamics, was inhibited by the alkyl gallates. Combined, these data strongly indicated that FtsZ could be a target of alkyl gallates.

Key words: citrus canker, alkyl gallates, cell division, septum, FtsZ

Lista de Figuras

Figura 1 -	Lesões típicas do cancro cítrico	**12**
Figura 2 -	Divisão Celular Bacteriana	**16**
Figura 3 -	Regulação espacial do agrupamento do anel Z.	**17**
Figura 4 -	Efeito dos galatos de alquila na habilidade de Xac em induzir sintomas de cancro cítrico	**42**
Figura 5 -	Galatos de alquila promovem a disrupção do septo divisional de Xac	**48**
Figura 6 -	Galatos de alquila tem como alvo o centrômero de Xac	**49**
Figura 7 -	Curva de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp *citri* na presença dos galatos de alquila	**51**
Figura 8 -	Efeito dos galatos de alquila na morfologia do anel Z em *Bacillus subtilis*	**57**
Figura 9 -	Efeito dos galatos de alquila na organização do nucleoide de *B. subtilis.*	**59**
Figura 10 -	Localização da proteína reguladora espacial MinC	**62**
Figura 11 -	Efeito dos galatos de alquila na distribuição de MreB-GFP	**64**
Figura 12 -	Ensaio de Sedimentação	**66**
Figura 13 -	Galatos de Alquila inibem a atividade GTPásica de FtsZ. Hidrólise de GTP.	**68**
Figura A1 -	Avaliação de Inibição do crescimento utilizando o ensaio REMA	**90**
Figura A2 -	Galatos de alquila inibem crescimento bacteriano	**94**
Figura A3 -	Morfologia Celular após tratamento com galatos de alquila	**97**

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Função das principais proteínas relacionadas à divisão celular	**20**
Tabela 2 -	Exemplos de substâncias inibidoras de FtsZ	**21**
Tabela 3 -	Linhagens e plasmídeos utilizados	**25**
Tabela 4 -	Atividade anti-*Xanthomonas* subsp *citri* do ácido gálico galatos de alquila	**34**
Tabela 5 -	Análise morfológica das células tratadas com galatos de alquila	**45**
Tabela 6 -	Atividade anti- *Bacillus subtilis* dos galatos de alquila.	**55**
Tabela 7 -	Resumo das atividades desempenhadas pelos galatos de alquila contra *Xanthomonas* subsp *citri*	**73**
Tabela A1 -	Relação de substâncias químicas utilizadas e respectiva atividade *in vitr*o a partir do ensaio REMA.	**87**

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Soro albumina bovina
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO_{600}	Densidade óptica no comprimento de onda de 600nm
Fts	Filamento termossensível
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Proteína fluorescente verde
GTP	Guanosina trifosfato
HO	Hoechst
IP	Iodeto de propídeo
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodalton
LB	Luria-Bertani
min	minutos
PBS	Tampão fosfato salino
Pi	Fosfato inorgânico
r.p.m.	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TBS	Tampão tris salino
UFC	Unidade formadora de colônia

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I **9**

1. INTRODUÇÃO 10

1.1 A citricultura e o cancro cítrico 10

1.2 O processo de divisão bacteriana 14

1.3 FtsZ como alvo promissor para agentes antibacterianos 18

2. OBJETIVOS 23

2.1 Objetivo Geral 23

2.2 Objetivos Específicos 23

3. MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1 Síntese dos galatos de alquila. 24

3.2 Linhagens, plamídeos e condições de crecimento 24

3.3 Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate"(REMA) 26

3.4 Microscopia 27

3.5 Coloração Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo 27

3.6 Teste de Patogenicidade 28

3.7 Curva de Crescimento 28

3.9 Ensaio de sedimentação 29

3.10 Avaliação da atividade GTPásica de FtsZ 29

3.11 Análise Estatística 30

4 RESULTADOS 31

4.1 Inibição do crescimento de Xac por substâncias mimetizando inibidores descritos de FtsZ 31

4.2 Células de Xac tratadas com galatos de alquila são incapazes de induzir lesões de cancro em citros 35

4.4 Galatos de alquila podem ter como alvo a maquinaria de segregação cromossômica e divisão celular 40

4.5 Galatos de alquila atuam precocemente na inibição do crescimento celular 44

4.6 Galatos de alquila inibem a proliferação de Bacillus subtilis 48

4.7 Galatos de alquila promovem a disrupção do septo em Bacillus subtilis 50

4.8 Galatos de alquila não interferem na organização do nucleóide em B. subtilis 52

4.10 Galatos de alquila tem efeito na localização de GFP-MreB 57

4.11 Galatos de alquila perturbam a dinâmica de polimerização 59

4.12 A Atividade GTPasica de FtsZ é inibida pelos galatos de alquila 61

5 DISCUSSÃO 63

6 CONCLUSÕES 69

7 REFERÊNCIAS BIBILOGRÁFICAS 70

8 ANEXOS 87

CAPÍTULO II **98**

ARTIGO PUBLICADO 98

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

1.1 A citricultura e o cancro cítrico

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de frutas cítricas, sendo o estado de São Paulo responsável pela maior parte da produção nacional com 601,22 mil hectares de área plantada. O país detém atualmente mais da metade da produção mundial de suco de laranja exportando 98% da sua produção. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos em fábricas brasileiras. A estimativa para a safra paulista 2013/2014 é de 327 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg. Sendo este setor da economia responsável pela geração de 230 mil empregos diretos e indiretos (Neves *et al.*, 2010).

Apesar de sua importância econômica, a citricultura é alvo de inúmeras doenças e pragas que são responsáveis por redução da produtividade e qualidade dos frutos .Dentre estas ameaças está o cancro cítrico.

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). O ge□nero *Xanthomonas* compreende um grupo de bactérias Gram-negativas bastonetiformes, medindo entre 0,2 e 0,6 μm de diâmetro e 0,8 a 2,9 μm de comprimento, aeróbicas, com um único flagelo na posição polar (Swings e Civerolo, 1993 (Bedendo, 1995). As condições ótimas para a sobrevive□ncia da bactéria são: alta umidade e temperatura entre 20 e 39°C (Rossetti, 2001). Quase todas as infecc□ões ocorrem em folhas em até 40 a 45 dias de crescimento. A infecc□ão nos frutos ocorre nos primeiros tre□s meses de vida de formac□ão dos mesmos.

As bactérias do ge□nero *Xanthomonas* patoge□nicas aos citros são: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*) (Schaad *et al.*, 2005; Schaad *et al.*, 2006).

Xac é causadora do cancro cítrico asiático ou cancrose A, distribuída mundialmente, sendo patoge□nica a todas as variedades comerciais de citros (Fawcett e Bintancourt, 1949). O cancro cítrico pode causar danos significativos para a planta, como queda prematura dos frutos, desfolha e gerar enormes prejuízos econo□micos para os produtores. *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*, restrita à América do Sul, e é o agente etiológico das cancroses B e C, com limitada gama de hospedeiros. A Mancha

bacteriana causada pela *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* caracteriza-se pela formac□ão de lesões não salientes, halo amarelo em folhas, ramos e, raramente, em frutos. Não apresenta lesões corticosas e eruptivas típicas do cancro cítrico (Schoulties *et al.*, 1987; Schaad *et al.*, 2005).

O cancro cítrico causa lesões necróticas em frutos, folhas e ramos desencadeando perda na qualidade e quantidade dos mesmos O tamanho das lesões varia de 2 até mais de 12 mm de diâmetro em folhas e até um centímetro de diâmetro ou comprimento nos frutos e ramos (Rossetti, 2001). Os sintomas aparecem inicialmente como lesões pequenas ligeiramente elevadas e arredondadas. A seguir, as lesões assumem aspecto marrom eruptivo (Schubert *et al.*, 2001; Gottwald *et al.*, 2002; Brunings e Gabriel, 2003). Nos frutos, as lesões são de aspecto pardo, salientes e, algumas vezes um halo amarelo circunda as lesões (Amorim e Bergamin Filho, 2001; Rossetti, 2001; Feichtenberger *et al.*, 2005) (Figura 1).

A bactéria penetra nos tecidos das plantas através de aberturas naturais como os estômatos e hidatódios, bem como regiões submetidas a ferimentos mecânicos. A disseminação de Xac com infecção de novos órgãos ocorre em decorrência da exsudação da bactéria quando estas são umedecidas pelo orvalho, chuva ou irrigação. Este processo também é extremamente facilitado pelo vento (Bock *et al.*, 2005), favorecendo a dispersão para grandes distâncias. O trânsito de pessoas pelos pomares, o maquinário e utensílios agrícolas também são agentes importantes para a dissipação da doença (Gottwald *et al.*, 2002). Além disso, ferimentos causados pela lagarta minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* também levam a um aumento na incidência de cancro devido à formação de galerias abaixo da epiderme de folhas facilitando a entrada e a dispersão do patógeno (Chagas *et al.*, 2001).

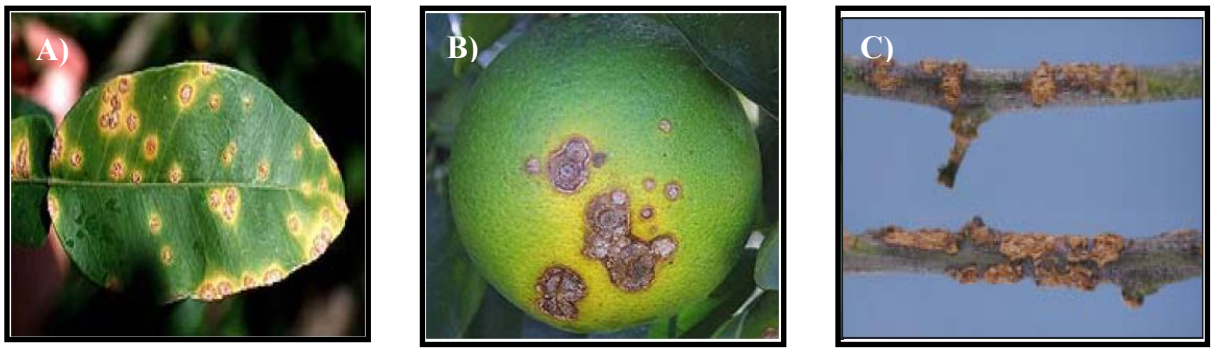


Figura 1. Lesões típicas do cancro cítrico em A) Folhas; B) Frutos e C) Ramos. Extraído de Gottwald *et al.* (2002).

O estado de São Paulo, o qual é responsável pela produção de 75% das laranjas no Brasil, teve seu primeiro caso de Xac detectado em 1957 (Bitancourt, 1957), e desde então tem adotado um programa de erradicação bastante rigoroso, considerado até agora a única e efetiva estratégia para evitar o avanço do cancro cítrico em áreas não endêmicas (Belasque Jr. *et al.*, 2009). Durante os anos de 1999 até 2009, os produtores do estado de São Paulo foram obrigados a eliminar todas as plantas nos talhões onde a incidência de pés contaminados estivesse acima de 0,5 %, abaixo deste cenário, teriam que erradicar somente plantas afetadas e as adjacentes em um raio de 30 metros. A partir da metade de 2009 a legislação foi amenizada, aplicando-se somente a regra dos 30 metros. Como consequência, o cancro cítrico teve um crescimento de 893% em relação a 2009, quando apenas 0,14% dos talhões apresentavam a doença (Belasque Jr, 2012).

Em novembro de 2013, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento publicou uma nova mudança abrandando ainda mais as regras de controle do cancro cítrico no estado de São Paulo, a Resolução SAA - 147. Pela nova resolução, não é mais obrigatória realizar-se a erradicação das plantas que estiverem em um raio de 30 metros de uma planta contaminada com cancro cítrico. Passa-se a adotar eliminação da planta contaminada e pulverização com cobre das plantas no raio de 30 metros (Saa, 2013).

O cancro já se encontra endêmico em outras áreas de plantação no sul do Brasil. Nesta região, assim como na Argentina, os produtores utilizam medidas de manejo integrado como o cultivo de plantas com genótipos menos susceptíveis, plantio de quebra-ventos como barreira contra a dispersão da doença e pulverização de

formulações cúpricas (Leite Jr, 1990; Leite Jr e Mohan, 1990; Behlau *et al.*, 2008; Behlau, Amorim*, et al.*, 2010). Estas práticas aumentam o custo da produção e não são tão efetivas quanto a erradicação para prevenir novas infecções ou a disseminação de Xac, contudo, a pulverização de cobre é conhecida por deixar resíduos em frutas e solo, e também por propiciar o surgimento de cepas resistentes (Canteros, 1999).

1.2 O processo de divisão bacteriana

Apesar do genoma de Xac ter sido publicado em 2002, há ainda uma grande necessidade de se realizar estudos para uma melhor compreensão de processos biológicos essenciais desta bactéria como a segregação cromossômica, divisão celular e crescimento. A divisão celular já tem sido amplamente caracterizada em outras bactérias como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Errington *et al.*, 2003; Goehring e Beckwith, 2005; Harry *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2006; Lock e Harry, 2008; Adams e Errington, 2009).

O processo de divisão em bactérias envolve a invaginação da membrana citoplasmática juntamente com a parede celular para a formação do septo na região mediana dos cocci ou bastonetes, invariavelmente separando dois cromossomos recém-duplicados. Seguindo-se a septação, o peptidoglicano do septo bacteriano é hidrolisado permitindo a separação definitiva das duas novas células (Migocki *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2006).

A divisão em bactérias é controlada por um complexo macromolecular chamado de divisomo (Errington *et al.*, 2003; Goehring e Beckwith, 2005). O agrupamento do divisomo é iniciado a partir da polimerização de FtsZ, que organiza um estrutura em forma de anel (anel Z) situado próximo a membrana plasmática, e internamente a ela, onde irá ocorrer a divisão celular. A polimerização de FtsZ ocorre por auto-associação e o anel gerado atua como arcabouço para o recrutamento de uma dezena de outras proteínas durante a progressão e término da divisão bacteriana (Figura 2).

Estudos em *E. coli* demonstraram ocorrer uma sequência quase linear de recrutamento dos constituintes da maquinaria de formação do septo, que ocorre na seguinte ordem: FtsZ > [FtsA, ZapA, ZipA] > (FtsE, FtsX)> FtsK > FtsQ > (FtsB, FtsL) > FtsW > FtsI > FtsN >AmiC > EnvC (Chen e Beckwith, 2001; Buddelmeijer e Beckwith, 2002; Vicente *et al.*, 2006). Proteínas entre colchetes são independentes uma das outras, mas dependentes de FtsZ para sua localização no meio da célula; proteínas entre parênteses apresentam associação simultânea ao complexo. No entanto, esta linearidade de recrutamento não é observada em *B. subtilis,* onde as associações proteicas parecem ocorrer em dois passos. Primeiramente FtsA, ZapA, SepF (e provavelmente EzrA) se localizam com o anel Z e são dependentes de FtsZ para o recrutamento ao sítio de divisão. Na sequencia, as proteínas que se ligam à membrana

DivIB (seu homólogo em *E. coli* é FtsQ ou FtsQEc), DivIC (FtsBEc), FtsL, PBP2B (FtsIEc), e provavelmente FtsW, parecem ser recrutadas de forma conjunta ou cooperativa, mas não linear, sendo todas estas interdependentes para a localização no septo. Mutações ou depleções de qualquer uma dessas proteínas promovem um impedimento na associação das demais (Errington *et al.*, 2003).

FtsZ purificada demonstrou possuir atividade GTPásica, sendo a auto-associação resultado da ligação e hidrólise de GTP (De Boer *et al.*, 1992; Scheffers *et al.*, 2002). Tal atividade de polimerização e hidrólise parece ser a fonte da dinâmica observada para o anel Z (Stricker *et al.*, 2002; Chen e Erickson, 2005). Sendo a polimerização de FtsZ dependente da ligação com GTP (Mukherjee e Lutkenhaus, 1994) enquanto que a hidrólise de GTP promove o desagrupamento dos protofilamentos de FtsZ (Mukherjee e Lutkenhaus, 1998).

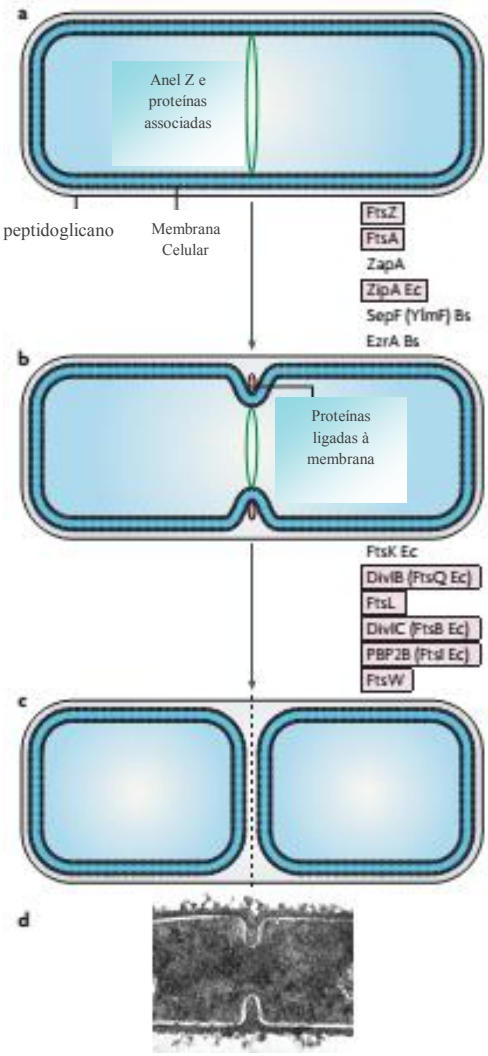


Figura 2. Divisão Celular Bacteriana. A) Formação do anel Z ocorre no meio da célula e recruta várias proteínas que se ligam a FtsZ. B) As proteínas de divisão que se ligam à membrana são então recrutadas, em seguida inicia-se a invaginação da parede celular e membrana formando o septo entre os dois cromossomos recém-duplicados. C) O peptidoglicano do septo divisional é hidrolisado permitindo a separação das duas células recém-formadas. O processo de divisão demonstrado aqui é do bastonete Gram-positivo *Bacillus subtilis*. Em *Escherichia coli*, a hidrólise da parede septal coincide com a formação do septo. Logo, ao contrário do que ocorre com *B. subtilis* a constrição ocorre durante a divisão celular. D) Eletromicrografia do septo divisional de *B. subtilis* durante a divisão celular. Extraído de Lock e Harry (2008).

Para controlar a montagem correta deste anel na região mediana das células, há sistemas de organização temporal/espacial que garantem uma perfeita constrição sem fragmentação dos cromossomos em processo de separação (Figura 3). A saber, o sistema Noc, que evita o guilhotinamento de material genético (Woldringh *et al.*, 1991), o sistema MinCDE, que opera no posicionamento do anel Z exatamente no meio das células e evitando a formação de septo em outras regiões que não sejam o meio, e finalmente a segregação cromossômica que aventa-se que poderia sinalizar de alguma forma para o momento adequado da terminação do ciclo liberando o fechamento definitivo do anel (Hu *et al.*, 1999; Raskin e De Boer, 1999; Hu e Lutkenhaus, 2001).

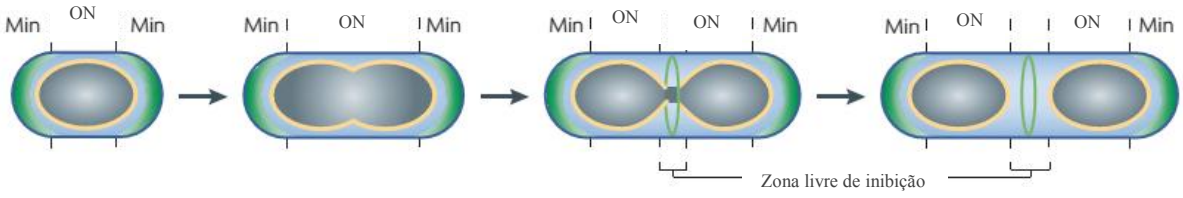


Figura 3. Regulação espacial do agrupamento do anel Z. Oclusão do Nucleóide (ON), que é mediado pelo sistema Noc (em *Bacillus. subtilis*) ou SlmA (em *Escherichia coli*), inibe a formação do anel Z próximo ao nucleóide. O sistema Min atua prevenindo o agrupamento do anel Z nos polos. Da esquerda para a direita: em células "recém-formadas", ambos os sistemas inicialmente inibem o agrupamento de FtsZ por toda a célula; em seguida ocorre a elongação celular e a replicação cromossômica, a ON mantém a inibição na parte cilíndrica da célula; e finalmente, a progressão da segregação cromossômica revela uma zona livre de inibição exatamente no meio da célula, permitindo assim a formação do anel Z. Extraído de Adams e Errington (2009).

1.3 FtsZ como alvo promissor para agentes antibacterianos

Embora quase todas as proteínas que se localizam no septo bacteriano já tenham sido identificadas (Tabela 1) (Lutkenhaus e Addinall, 1997), a exata função da maioria destas proteínas ainda não foi totalmente elucidada. A proteína melhor caracterizada é FtsZ, desempenhando papel essencial no processo de divisão celular. Protofilamentos de FtsZ se agrupam formando o anel Z no sítio de divisão celular. O anel Z serve como plataforma para o recrutamento de outras proteínas para iniciar a citocinese. Ou seja, outras proteínas envolvidas com a divisão celular são dependentes de FtsZ para sua correta localização. Além disso, a dinâmica de formação do anel Z é responsável por gerar a força necessária para a constrição e divisão celular. Dessa forma, a proteína FtsZ é um alvo bastante promissor para o desenvolvimentos de novos agentes antibacterianos (Vollmer, 2006; Lock e Harry, 2008). Outro ponto muito importante a ser ressaltado é que a proteína FtsZ é um análogo funcional e estrutural muito distante das tubulinas encontradas em eucariotos mais derivados, além disso, a atividade bioquímica e estrutura da proteína já foi determinada por cristalografia de raio X, o que facilita a busca de novas substâncias utilizando ensaios automatizados em larga escala (*high-throughput screening*), ou uma possível modificação de substâncias já existentes. Logo, substâncias que atuem na maquinaria de divisão celular representam uma abordagem bastante promissora para o tratamento de infecções bacterianas, e neste intuito, muitos estudos têm sido focados para o desenvolvimento de substâncias, que tenham FtsZ como alvo, por exemplo a viriditoxina (Locatelli *et al.*, 2009), dicamanetina e 2-hidroxi-5-benzilisouvarinol-B (Urgaonkar *et al.*, 2005), zantrinas Z1-Z5 (Margalit *et al.*, 2004), sanguinarina (Pichoff e Lutkenhaus, 2007), A189 (Beall e Lutkenhaus, 1992) e OTBA ácido benzóico) (Beuria *et al.*, 2009) (Tabela 2).

Neste trabalho foi realizada uma busca por substâncias capazes de perturbar o crescimento de Xac e que pudesse atuar em processos de inibição da divisão celular. Primeiramente, foi avaliada a atividade anti-Xac de 85 substâncias estruturalmente similares aos inibidores de FtsZ já descritos na literatura (Tabela 1). Dentre elas a classe dos ésteres de ácidos gálicos foi selecionada para o restante dos ensaios por se mostrar bastante promissora.

O ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico), é um intermediário no metabolismo vegetal secundário sendo um componente de taninos hidrolisáveis (Grundhofer *et al.*; Muir *et al.*; Wang *et al.*, 2010) , e juntamente com seus derivados

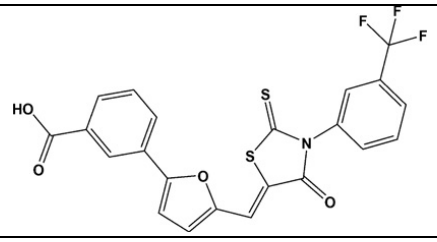
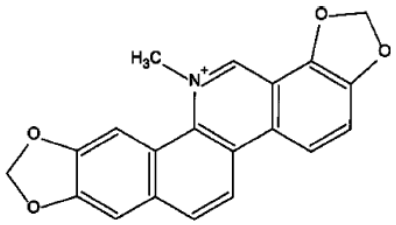
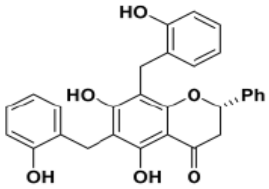
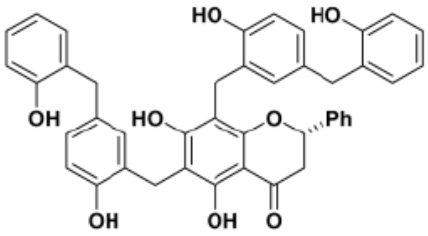
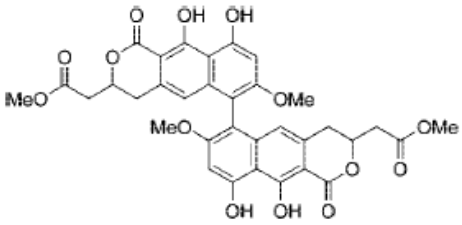
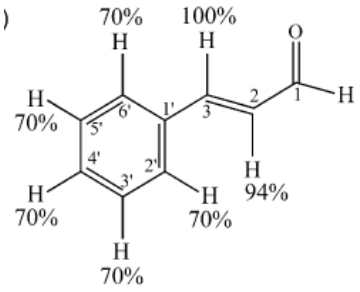
semissintéticos tem sido associado a um amplo espectro de ações biológicas como antioxidante, anti-viral, anti-tumoral (Kratz *et al.*; Aruoma *et al.*, 1993; Rosso *et al.*, 2006; Dodo *et al.*, 2008; Locatelli *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2010). O galato de octila, apresentou atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* em todas as fases de crescimento (Fujita e Kubo, 2002). Leal relatou uma potente fungitoxicidade do galato de nonila contra leveduras, dermatófitos e hialohifomicetos Além disso, o ácido gálico e seus derivados demonstraram possuir atividades antibacterianas (Kubo *et al.*, 2004; Merkl *et al.*, 2010). O galato de laurila demonstrou atividade contra microrganismos Gram-positivos/negativos, incluindo *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) (Kubo *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi demonstrado que os galatos de alquila foram potentes inibidores de crescimento de Xac. A atividade anti-Xac destas substâncias está relacionada com o tamanho da cadeia. Foi também observado que os galatos de alquila eliminaram a habilidade de Xac colonizar seu hospedeiro. Finalmente, foi demonstrada uma evidência de possíveis alvos intracelulares destas substâncias, uma vez que bactérias tratadas com galatos de alquila apresentaram disrupção do septo divisional e/ou centrômero bacteriano.

Tabela 1. Função das principais proteínas relacionadas à divisão celular

Proteína	Função	Fonte
FtsZ	Inicia a formação do anel Z no meio da célula e serve como arcabouço para o agrupamento do divisomo.	(Bi *et al.*, 1991; Dai e Lutkenhaus, 1991)
FtsA	Ancora FtsZ à membrana para o agrupamento do anel Z, organiza os polímeros de FtsZ e recruta proteínas *downstream*.	(Lutkenhaus e Donachie, 1979)
ZipA	Promove o agrupamento do anel Z e é um ancoradouro secundário de FtsZ à membrana.	(Hale e De Boer, 1997)
ZapA	Promove a polimerização e estabiliza os protofilamentos de FtsZ.	(Gueiros-Filho e Losick, 2002)
FtsQ	Função desconhecida; possível papel na síntese do peptidoglicano septal.	(Storts *et al.*, 1989)
FtsK	DNA translocase (ATPase), importante para a segregação cromossômica e formação do septo.	(Wang e Lutkenhaus, 1998)
FtsW	Síntese de peptidoglicano no septo e estabilização do anel Z.	(Boyle *et al.*, 1997)
FtsL	Função desconhecida, possível regulador do agrupamento do anel Z.	(Guzman *et al.*, 1992; Daniel *et al.*, 1998)
SepF	Promove o agrupamento do anel Z e assegura o correto desenvolvimento do septo. Papel possivelmente sobreposto com FtsA.	(Hamoen *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2006)
MinCDE	Regulador negativo da divisão celular, responsável pelo correto posicionamento do anel Z no meio da célula.	(Hu *et al.*, 1999; Hu e Lutkenhaus, 2001; Lutkenhaus, 2007)
MreB	Promove o alongamento e manutenção da forma celular. Interage com FtsZ sendo essencial para a constrição do anel Z, maturação do divisomo e síntese de peptidoglicano.	(Doi *et al.*, 1988; Fenton e Gerdes, 2013)

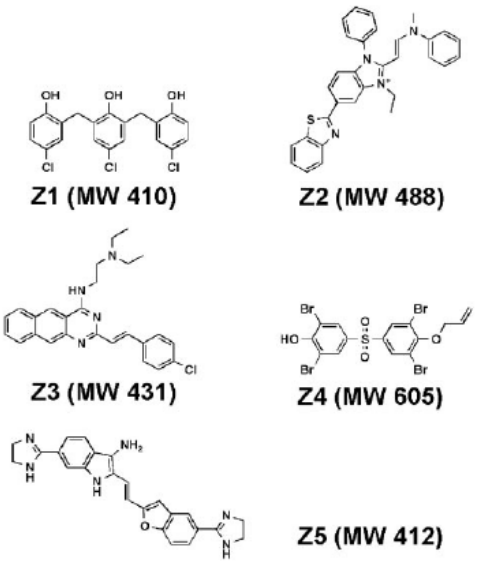
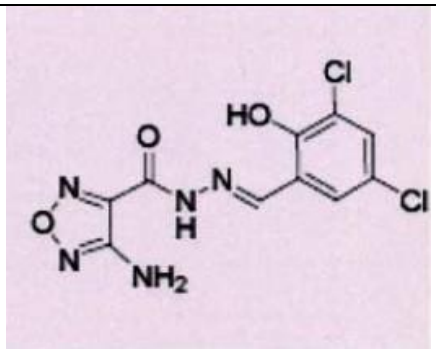
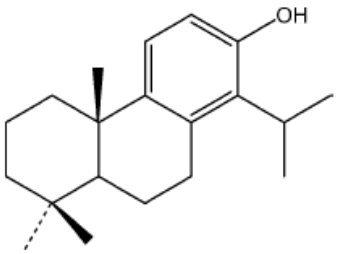
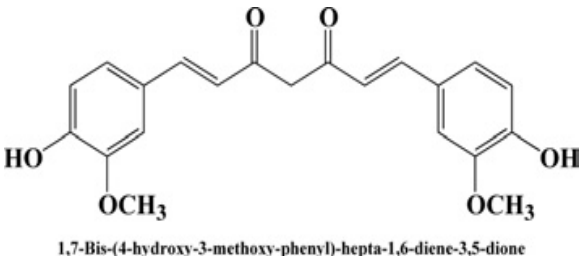
Tabela 2. Exemplos de substâncias inibidoras de FtsZ

Substância/ Referência	Estrutura	Mecanismo de Ação
otba (Beuria *et al.*, 2009)		Aumenta o agrupamento de filamentos de FtsZ e previne o desagrupamento inibindo a atividade GTPásica *in vitro*
sanguinarina *(Beuria et al., 2005)*		Inibe o agrupamento de protofilamentos de FtsZ
dicamanetina (Urgaonkar *et al.*, 2005)		Inibidor da atividade GTPásica de FtsZ
2 hidroxi-5-benziliso-uvarinol-B (Urgaonkar *et al.*, 2005)		Inibidor da atividade GTPásica de FtsZ
viridotoxina (Wang *et al.*, 2003)		Bloqueia polimerização de FtsZ e inibe atividade GTPásica de FtsZ
cinamaldehido (Domadia *et al.*, 2007)		Se liga a FtsZ inibindo a função GTPásica e a polimerização de FtsZ perturbando o agrupamento do anel Z *in vivo*

(Continua na próxima página)

Tabela 2. Exemplos de substâncias inibidoras de FtsZ

(Continuação)

zantrinas (Margalit *et al.*, 2004)		Inibe a GTPase de FtsZ desestabilizando os protofilamentos de FtsZ ou induzindo a hiperestabilidade do filamento a partir do aumento de associações laterais
a189 (Ito *et al.*, 2006)		Inibidor de GTPase
totarol (Jaiswal *et al.*, 2007)		Bloqueia polimerização de FtsZ e inibe atividade GTPásica de FtsZ
curcumina (Rai *et al.*, 2008)		Bloqueia polimerização de FtsZ e inibe atividade GTPásica de FtsZ

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar substâncias químicas capazes de promover a inibição de processos essenciais em Xac.

2.2 Objetivos Específicos

1. identificar classes de substâncias químicas capazes de inibir o crescimento de Xac.
2. determinar o nível de inibição (faixa inibitória) de tais substâncias.
3. prospecção de substâncias inibitórias de crescimento e que alteram a forma celular de Xac.
4. identificar dentre a classe dos ésteres de ácido gálico, substâncias que atuem em processos de segregação, divisão e crescimento bacteriano.
5. observar efeitos do tratamento com galatos de alquila na localização de proteínas relacionadas com divisão celular.
6. avaliar possíveis alterações na dinâmica de polimerização da proteína de divisão celular FtsZ induzidos pelos galatos de alquila.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos galatos de alquila.

Ésteres sintéticos do ácido gálico foram preparados segundo descrito previamente (Morais *et al.*, 2010; Ximenes *et al.*, 2010) com algumas modificações. Uma solução de 3 ml de N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1,0 mmol) em *p*-dioxano seco foi adicionada a uma solução fria (5°C) de 0,2 mmol de ácido gálico (Sigma) (Tabela 3) e 20 mmol de álcool de alquila em 6 ml de *p*-dioxano seco. Após 48 horas, o solvente foi removido sob baixa pressão. O resíduo foi particionado 3 vezes com acetato de etila (EtOAc) e submetido a filtração. O filtrado foi lavado sucessivamente com solução aquosa de ácido cítrico (3 vezes) e solução aquosa $NaHCO_3$ (3 vezes), secas com MgSO4 anidro, e evaporada sob baixa pressão. O extrato bruto foi purificado em coluna de sílica gel eluída com uma mistura de hexanos e EtOAc, tendo como resultado os galatos de alquila (Tabela 3). As estruturas moleculares dessas substâncias foram estabelecidas por análise espectral de ressonância magnética nuclear 1H e 13C (Morais *et al.*, 2010; Ximenes *et al.*, 2010).

3.2 Linhagens, plamídeos e condições de crecimento

As linhagens e os plasmídeos estão listados na tabela 3. As células foram cultivadas a 30 ºC em meio Luria Bertani (LB) sólido e líquido, sob rotação de 200 rpm. Foram utilizados os seguintes antibióticos quando necessários: ampicilina (20 μg ml^{-1} para Xac e 100 μg ml^{-1} -1 para *B. subtilis*), kanamicina (15,6 μg ml^{-1} e 50 μg ml^{-1} para *B. subtilis*) e espectinomicina (50 μg ml^{-1}).

Tabela 3. Linhagens e plasmídeos utilizados

Identificação	Características Relevantes	Referência
Linhagem		
Xanthomonas citri* subsp. *citri		
306	selvagem	(Da Silva *et al.*, 2002)
GFP-ZapA	Xac *amy*::pPM2a-*zapA*	(Martins *et al.*, 2010)
Xac *parB*::pAPU3(ParB-GFP)	pPM7g-*parB* integrado em *parB*; Ap^R Km^R	(Ucci *et al.*, 2014)
Bacillus subtilis		
168	*trpC2* selvagerm	Laboratório D.J. Scheffers
FtsZ-YFP	*trpC2amy::*spc Phyperspac-*ftsz-eyfp*	Laboratório D.J. Scheffers
1999 (GFP-MinC)	*trpC2 amyE*::spc Pxyl-*gfp-minC minD*	(Marston e Errington, 1999)
RWSB1(GFP-MreB)	*amyE*::spc Pxyl *gfp-mreB*	(Dominguez-Escobar *et al.*, 2011)
Escherichia coli		
BL21 (DE3)		(Studier *et al.*, 1990)
DH5α	*F-endA1 hsdR17 supE44 thi-1 k-recA1 gyrA96 relA1 D (lacZYA-argF)U169 U 80 dlacZ D M15*	Gibco-Brl
Plasmídeos:		
pCXZ	*bla Ptac-ftsZBS*	(Wang e Lutkenhaus, 1993)
pBS58	*spc ftsQAZEC*	(Wang e Lutkenhaus, 1993)

3.3 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. Para os testes, foram selecionadas pelo Professor Doutor Luis Octávio Regasini, 85 substâncias semissintéticas disponíveis no Instituto de Química da Unesp/Araraquara (Anexo Tabela 1) que possuíam estrutura próxima as encontradas na literatura, previamente descritas como inibidoras da divisão celular (Tabela 2).

As bactérias selvagens Xac e *B. subtilis,* foram cultivadas em meio sólido LB e mantidas em estufa à 30^{O} C por 72 e 24 horas, respectivamente. Após este período foram inoculadas em 3 ml meio líquido (4 a 5 colônias) por 18 horas a 30^{O} C .

A concentração do inóculo foi corrigida para 10^5 células/ poço em volume final de 100 µL de meio de cultura. Foram adicionados aos 100 µL de substâncias diversas e representativas de classes químicas provenientes de coleções (Tabela 2). As soluções estoque das substâncias foram diluídas em 10% de DMSO (DMSO diluído em H_2O) e as concentrações utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir da diluição dos estoques (fator de diluição 2:1) onde a maior concentração utilizada apresentava 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 de 100 µL de meio de cultura, kanamicina 15,6 µg ml^{-1} e solução de DMSO 1%, respectivamente. As concentrações utilizadas das drogas foram 1000 µg ml^{-1}, 500 µg ml^{-1}, 250 µg $ml^{-}1$, 125 µg ml^{-1}, 60 µg ml^{-1}, 30 µg ml^{-1} e 15 µg ml^{-1}. Em seguida submetidas à incubação a 30 ^{O}C, por 24 horas. Após esse período foi adicionada uma solução de resazurina por três horas na concentração de 0,01 % em água destilada estéril.

A resazurina possui potencial redox (Óxido-Redução), com mudança colorimétrica e um indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo, onde microrganismos viáveis reduzem a resazurina (de cor azul) para resofurina (de cor rosa), mudança de cor essa detectada pelo scanner de fluorescência SPECTRAFluor Plus (TECAN®), utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm, respectivamente.

A fim de determinar a população total bacteriana após o tratamento, uma alíquota de 10 μL de suspensão de células submetidas ao tratamento foi retirada da placa antes da adição da resazurina e posteriormente cultivadas em meio LB sólido.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - definida como a concentração capaz de inibir 90 % da população bacteriana – foram realizadas retas de regressão logarítmicas a partir dos resultados obtidos em três experimentos independentes.

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

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

[1] UAF: Unidades Arbitrárias de Fluorescência

3.4 Microscopia

Linhagens selvagem e mutantes de Xac e *B. subtilis* foram submetidas a tratamento com os galatos de alquila de zero a seis horas a 30 ºC e em seguida, imobilizadas em lâminas previamente cobertas com agarose 1% em PBS 1X e lamínula. As células foram visualizadas por microscopia de contraste de fase e microscopia de epifluorescência utilizando-se o microscópio óptico BX-61 (Olympus) em um aumento de 100X, a aquisição de fotos foi feita com câmera monocromática XM-10 com auxílio de software Cell^F (Olympus). As medições de tamanho celular foram realizadas com o mesmo software.

3.5 Coloração Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo

Corantes fluorescentes como o Hoechst 33342 (HO) são utilizados para observação de DNA por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo emitindo fluorescência azul quando ligada ao DNA. A bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina. O iodeto de propídeo (IP) é um corante vermelho fluorescente utilizado amplamente como marcador de morte celular, uma vez que só atravessa a membrana celular de células mortas (Breusegem *et al.*, 2002).

Imediatamente após o tratamento com as substâncias na CIM_{50}, as células foram centrifugadas. Em uma suspensão celular de 100 µl foi acrescentada uma solução de fluorocromos, contendo 25 % da solução aquosa de IP (1mg ml^{-1}), 10 % da solução aquosa de HO (1mg ml^{-1}) e 15 % de PBS. A reação foi incubada por 5 minutos a 37º C e as células foram observadas em microscopia de epifluorescência, em espectro de absorção de 360 nm e 538 nm. A avaliação qualitativa foi realizada levando-se em consideração a coloração das células. As células foram classificadas de acordo com sua coloração em: viáveis (coradas apenas pelo HO) e mortas (coradas por ambos corantes HO e IP).

3.6 Teste de Patogenicidade

O hospedeiro utilizado foi a laranja doce Pera Rio (*Citrus sinensis*), cultivada e mantida em casa de vegetação nas condições de 25–35 ^{o}C .

O teste foi realizado por infiltração, onde Xac selvagem foi cultivada em LB até que atingisse a $D.O_{600nm}$ ~ 1. Em seguida, a suspensão de células foi diluída para 10^5 UFC/ ml em LB e tratadas com as substâncias na faixa de CIM_{80} pelo período de seis horas a 30º C. Em seguida, aproximadamente 100 µL da suspensão de células foi infiltrado em regiões entre nervuras das folhas nas superfícies abaxiais com o auxílio de seringas hipodérmicas, sem agulha. Como controles foram infiltrados: a) apenas meio de cultura líquido; b) apenas a droga na CIM_{80}; c) linhagem selvagem da bactéria sem tratamento e d) DMSO 1%. Este experimento foi realizado em triplicata. O desenvolvimento dos sintomas foi avaliado durante o curso de três semanas.

3.7 Curva de Crescimento

Foram inoculadas 2 a 3 colônias isoladas de Xac em meio LB líquido contendo ampicilina (20 µg ml^{-1}), com posterior incubação destas por 14 horas a 30 ºC sob rotação de 200 rpm. Após este período, a densidade óptica ($D.O._{600\ nm}$) foi medida e ajustada para $D.O._{600nm}$ ~ 0,1, em triplicata, seguindo-se o cultivo nas mesmas condições supracitadas. Quando as culturas atingiam a $D.O._{600\ nm}$ ~0,3, eram submetidas ao tratamento com as substâncias na concentração de CIM_{50}. Foram efetuadas medições de D.O. a cada duas horas por um período máximo de 10 horas. Como controles de veículo e positivos foram utilizados DMSO 1% e kanamicina (15,6 µg ml^{-1}).

3.8 Expressão e purificação de FtsZ de *Bacillus subtilis*

A linhagem recém-transformada BL21(DE3) carregando os plasmídeos pCXZ e pBS58 foi cultivada em meio LB com 100 μg ml^{-1} de ampicilina, 50 μg ml^{-1} de espectinomicina e glicose (0,5 %). A cultura crescida por uma noite a 30º C foi diluída na ordem de 1/100 em 1 litro de meio fresco e incubada a 37ºC até a $D.O._{600nm}$ de 0,4 a 0,7 momento no qual foi adicionado 1 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosiídeo) para indução da expressão proteica. Após 3 horas, as células foram coletadas por centrifugação (15 minutos; 4 ºC; 10000 r.p.m.), lavadas com TBS gelado e congeladas em nitrogênio líquido. FtsZ foi então purificado segundo descrito anteriormente (Mukherjee e Lutkenhaus, 1998; Scheffers, 2008). A concentração de proteínas foi determinada utilizando o Kit Bio-Rad DC *protein assay.*

3.9 Ensaio de sedimentação

O ensaio de sedimentação de FtsZ foi realizado como descrito por Mukherjee e Lutkenhaus (1998). FtsZ (10 mM) foi incubado à 30 ºC nos tampões de polimerização (50 mM Hepes / NaOH, pH 7,5; 50 mM KCl). As substâncias ou DMSO 1% foi adicionado nas concentrações de CIM antes que a polimerização fosse iniciada com a adição de GTP (2 mM) ou de GDP (2 mM). O volume total de cada reação foi de 50 μL.

A reação foi incubada por 20 minutos (30 ºC e 300 r.p.m.), sendo em seguida submetidas à ultracentrifugação de 100,000 r.p.m. por 15 minutos a 25 ºC. O sobrenadante de cada um dos tubos foi cuidadosamente removido e os pellets com a proteína foram ressuspendidos em igual volume de tampão de amostra SDS-PAGE. A quantidade de FtsZ presente nas frações foi determinada por SDS-PAGE, seguida de coloração por Coomassie azul brilhante.

3.10 Avaliação da atividade GTPásica de FtsZ

O impacto das substâncias na atividade GTPásica foi avaliada medindo a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada a partir da hidrólise de GTP por FtsZ na presença ou ausência das substâncias utilizando o kit verde malaquita (Malachite Green Phosphate Assay Kit, Bioassay). Esse ensaio é baseado na quantificação do complexo verde formado entre a malaquita, molibdato e ortofosfato livre.

Reações de 20 μL foram realizadas em duplicatas em placas de qPCR de 96 poços, com 10 mM de FtsZ, tampão de polimerização (50 mM Hepes / NaOH, pH 7,5; 300 mM KCl) e substâncias na concentração CIM ou veículo (DMSO 1%), incubadas

por 30 minutos à 30 ºC. GTP (1 mM) foi adicionado a cada 5 minutos durante os 30 minutos de incubação. Após esse período 20 ml de cada amostra foram retiradas e adicionadas a uma placa de 96 poços previamente preparada com uma solução de 80 µL de verde malaquita e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorvância foi lida em um leitor de placas (Powerwave, Biosystems) na faixa de 620 nm. A quantidade de Pi liberado por cada molécula de FtsZ por minuto foi determinada utilizando uma curva padrão de fosfato diluídas na faixa de 0 a 40 mM. Cada experimento foi realizado três vezes (Scheffers *et al.*, 2002).

3.11 Análise Estatística

As alterações de aumento no comprimento celular induzidos pelos galatos de alquila foram avaliadas pelo teste estatístico *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5 % utilizando o software Graph Pad (Prism, EUA) versão 5.01, 2007.

Para o estudo da porcentagem de células mortas em função da concentração das substâncias para a determinação das CIM, CIM_{50} e CIM_{80} utilizou-se análises de regressão logarítmica.

4 RESULTADOS

4.1 Inibição do crescimento de Xac por substâncias mimetizando inibidores descritos de FtsZ

De um total de 85 substâncias semissintéticas selecionadas que apresentavam similaridades estruturais as já descritas, 41 apresentaram atividade inibitória em ensaios de REMA. Em Anexo estão apresentados os dados de triagem que foram realizados com as 85 substâncias na Tabela Anexo1 e Figura Anexo1. Por se tratar de um número elevado de substâncias foi escolhida apenas uma classe – a dos ácidos gálicos – para dar continuidade ao trabalho

Para a avaliação do potencial de inibição de crescimento dessas substâncias, células de Xac foram cultivadas e submetidas a diferentes concentrações de ácido gálico (Tabela 4,) e também a uma coleção de ésteres de alquila do ácido gálico (3,4,5-trihydroxybenzoates) (ácido gálico, galato de metila, galato de etila, galato de propila, galato de *i*-propila , galato de butila, galato de *i*-butila, galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila, galato de octila, galato de nonila, galato de decila e galato de undecila , galato de dodecila, galato de tetracila), em seguida avaliadas pelo ensaio REMA (Figura. A2). Os galatos de alquila estão organizados na Tabela 4, de acordo com o tamanho de suas cadeias alquil conforme denotam seus prefixos (met, eti, etc.). Como não foram encontrados trabalhos que sugerissem uma faixa de concentração a ser utilizada para os ensaios de REMA com nossa bactéria, optou-se por utilizar concentrações abaixo das usadas em defensivos agrícolas para *Xanthomonas vesicatoria,* onde se aconselha a utilização de 250 g 100 L^{-1} de água (Seab, 2011). As concentrações utilizadas neste trabalho variaram, em sua maioria, entre 15 a 1000 μg ml^{-1}, onde a máxima concentração está duas vezes e meia abaixo da estipulada para defensivos agrícolas.

Na tabela 4 também estão apresentados os valores de CIM destas substâncias, que foram determinados dentro de uma faixa de concentração de 3,9 a 1000 μg ml^{-1} (determinadas por regressão logarítmica). De um total de 16 substâncias testadas, 14 galatos de alquila (galato de metila, galato de etila, galato de propila, galato de *i*-propila , galato de butila, galato de *i*-butila, galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila, galato de octila, galato de nonila, galato de decila e galato de undecila , galato

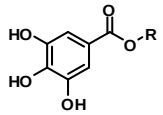
de dodecila) foram capazes de inibir o crescimento bacteriano (~88% da série dos galatos de alquila).

O ácido gálico por si só não demonstrou atividade anti-Xac, com um valor de CIM de 500 μg ml^{-1} (2940 μM). Por outro lado, o metil galato apresentou uma CIM de 62,5 μg ml^{-1} (340 μM), o qual foi aproximadamente oito vezes mais potente que o ácido gálico. Esta observação suporta a ideia de que a esterificação do grupo carboxil na estrutura do ácido gálico foi um importante critério para a atividade antimicrobiana, o que encorajou outros estudos para a investigação de outros derivados esterificados de C2 a C14. Entre essas substâncias, aquelas com cadeias laterais variando de 9 a 11 átomos de carbono (galato de nonila, galato de decila e galato de undecila) desempenharam atividades anti-Xac mais elevadas. O undecil galato, por exemplo, apresentou um feito inibitório com uma CIM de 15,6 μg ml^{-1} (48 μM), valor equivalente à atividade inibitória do controle positivo utilizado nos experimentos (CIM = 15,6 μg ml^{-1}ou 32 μM).

Dessa forma, os resultados aqui apresentados indicam uma clara correlação entre os valores de CIM, comprimento da cadeia e sua contribuição para a lipofilicidade. Considerando que a lipofilicidade é um parâmetro crucial para o desenvolvimento de substâncias bioativas, os valores teóricos de lipofilicidade dos galatos de alquila foram calculados como coeficiente de partição (C log *P)* como relatado anteriormente (Rosso *et al.*, 2006) (Tabela 4). Comparando-se determinados valores de CIM com os de C log *P*, pode-se observar que a atividade anti-Xac dos galatos de alquila está intimamente ligada com sua lipofilicidade. Galatos altamente lipofóbicos (galato de metila, galato de etila, galato de propila e galato de *i*-propila, galato de butila e galato de *i*-butila,) os quais exibiram C log *P* variando entre 0,92 a 1,95, assim como o mais altamente lipofílicos (dodecil galato, C log *P* = 5,30) apresentaram em geral um menor efeito anti-bacteriano. A atividade anti-Xac aumenta na mesma medida em que há aumento do número de átomos de carbono da cadeia lateral, até atingir um pico, aqui representado por undecil galato (C log *P* = 4,90). Subsequentemente, é observada uma queda deste efeito pelo dodecil galato (C log *P* = 5,30), se esta tendência for mantida, homólogos mais longos que 15 carbonos na cadeia lateral deverão exibir atividade anti-Xac com valores de CIM provavelmente superiores a 2732 μM. Todavia, essas substâncias desempenhariam uma potência muito baixa, o que não seria um investimento vantajoso.

Finalmente, para determinar a atividade bactericida ou bacteriostática dos substâncias, células submetidas ao tratamento foram plaqueadas em meio LB. Como resultado, não foi possível detectar crescimento celular após o tratamento, nas concentrações em que o REMA que indicava 100% de inibição, desta forma conclui-se que os galatos de alquila atuam irreversivelmente neste patógeno possuindo atividade bactericida.

Tabela 4. Atividade anti- *Xanthomonas citri* subsp *citri* do ácido gálico e galatos de alquila



Substância	**R**[a]	**C log *P*** [b]	**(CIM em µM^{-1})**	**CIM**[c]
ácido gálico	H	0,89	2940	500
galato de metila	CH_3	0,92	340	62,5
galato de etila	CH_2CH_3	1,27	315	62,5
galato de propila	$(CH_2)_2CH_3$	1,73	295	62,5
galato de *i*-propila	$CH(CH_3)_2$	1,55	295	62,5
galato de butila	$(CH_2)_3CH_3$	2,13	276	62,5
galato de *i*-butila	$CH_2CH(CH_3)_2$	1,95	276	62,5
galato de pentila	$(CH_2)_4CH_3$	2,53	130	31,2
galato de hexila	$(CH_2)_5CH_3$	2,92	123	31,2
galato de heptila	$(CH_2)_6CH_3$	3,32	116	31,2
galato de octila	$(CH_2)_7CH_3$	3,72	110	31,2
galato de nonila	$(CH_2)_8CH_3$	4,11	53	15,6
galato de decila	$(CH_2)_9CH_3$	4,51	50	15,6
galato de undecila	$(CH_2)_{10}CH_3$	4,90	48	15,6
galato de dodecila	$(CH_2)_{11}CH_3$	5,30	185	62,5
galato de tetradecila	$(CH_2)_{13}CH_3$	6,09	2732	1000
Kanamicina[d] –	–	–	32	15,6

[a] R, substituinte

[b] Coeficiente de partição: lipofilicidade teórica (Rosso *et al.*, 2006).

[c] CIM, Concentração Inibitória Mínima, Concentração capaz de inibir 90 % do crescimento da população celular, expresso em µg ml^{-1}.

[d] Controle positivo.

4.2 Células de Xac tratadas com galatos de alquila são incapazes de induzir lesões de cancro em citros

A colonização do hospedeiro é um processo vital para a sobrevivência de qualquer patógeno, por esse motivo, avaliou-se se o tratamento com os galatos de alquila poderia interferir na habilidade das células de Xac em se multiplicar em seu habitat natural e produzir lesões típicas de cancro cítrico. Para isso, folhas de laranja doce, cultivar Pera Rio – um hospedeiro sabidamente susceptível- foram infiltradas com suspensão celular de Xac (10^5 UFC ml^{-1}) após o tratamento com as substâncias na CIM_{80}, e subsequentemente acompanhadas pelo período de três semanas. A razão do uso da CIM_{80} foi a de garantir que após o tratamento, ainda haveria células vivas suficientes para a colonização do hospedeiro.

A lesão típica de cancro induzida por células não tratadas (controle) é caracterizada pela hiperplasia e hipertrofia na região do inóculo, a qual é frequentemente circundada por um halo clorótico (Figura 4 A). Seis substâncias testadas (galato de butila, galato de *i*-butila,, galato de pentila, galato de hexila , galato de heptila e galato de nonila) impediram completamente a habilidade de Xac em produzir sintomas da doença (Figura 4 B). O galato de octila, embora ativo, induziu apenas uma redução parcial dos sintomas. Os substâncias restantes não induziram nenhum efeito detectável na habilidade de colonização de Xac. A infiltração dos substâncias não resultou em lesões no tecido foliar, assim como o controle de veículo (Xac + DMSO 1%) não impediu o aparecimento dos sintomas (Figura 3 A).

Independentemente do mecanismo de ação, os galatos de alquila (galato de butila, galato de *i*-butila, galato de pentila, galato de hexila , galato de heptila e galato de nonila) direta ou indiretamente impediram a habilidade de Xac em colonizar um hospedeiro susceptível, demonstrando que estas substâncias conferem uma substancial ação sobre patógeno.

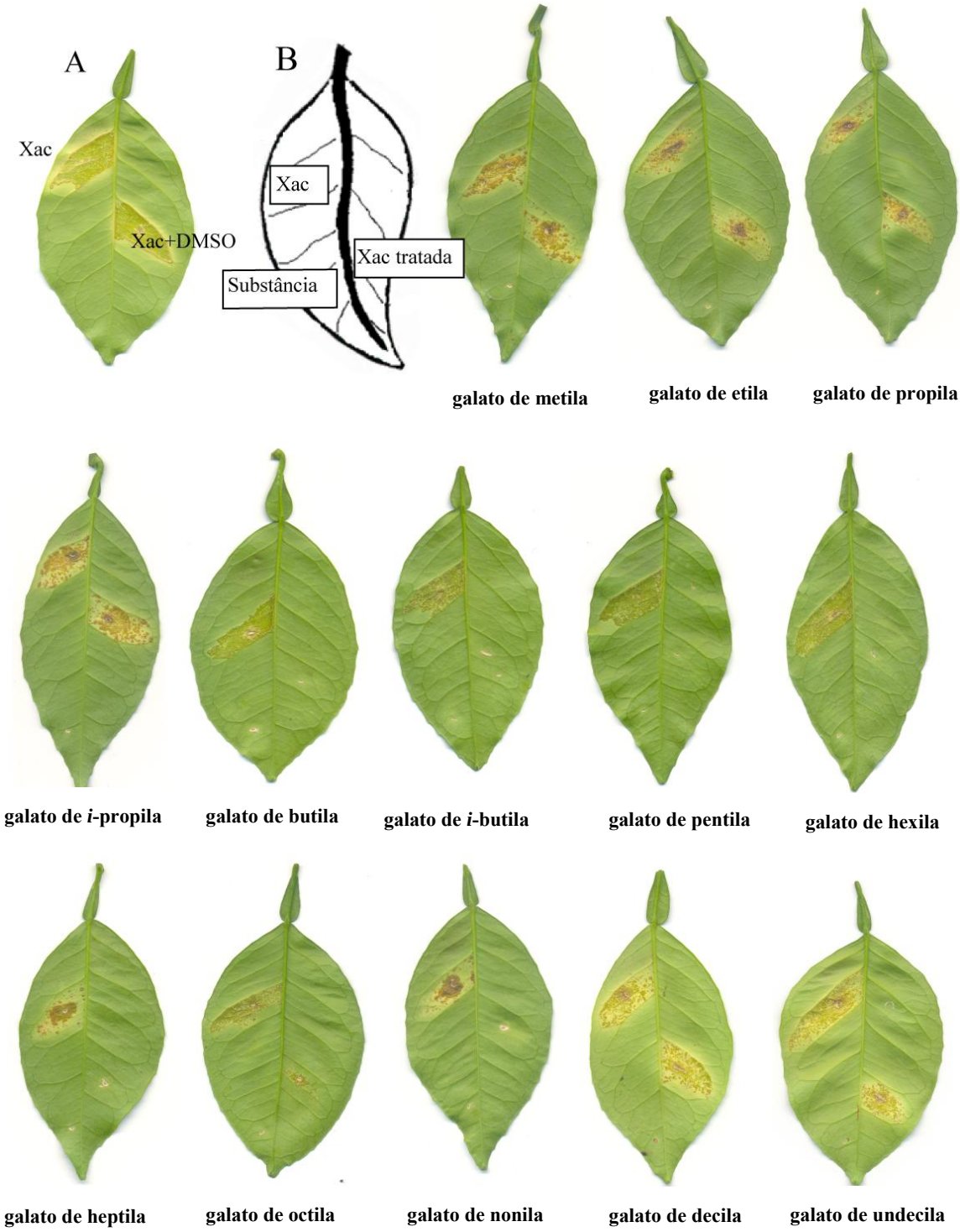


Figura 4- Efeito dos galatos de alquila na habilidade de *Xanthomonas* subsp *citri* em induzir sintomas de cancro cítrico. As células foram submetidas ao tratamento com os galatos de alquila na concentração correspondente a CIM_{80} por um período de seis horas e em seguidas infiltradas em folhas de *Citrus sinensis* L. Osbeck (Pera Rio). A) Folha infiltrada com Xac não tratada e Xac tratada com o veículo DMSO1%. Os resultados correspondem a três semanas de incubação. B) Equema de infiltração para as folhas restantes: Xac não tratada, Substância, galato de alquila dissolvido em DMSO 1% e Xac tratada com os substâncias indicados abaixo da figura. Imagem representativa de triplicatas.

4.3 Galatos de alquila induzem aumento no tamanho celular em Xac

Para observar se os galatos de alquila seriam capazes de promover alterações grosseiras na forma dos bastonetes, tais como filamentação e indícios de parada de divisão celular, foi utilizada a observação da morfologia por microscopia de contraste de fase. Para isso células selvagens de Xac foram submetidas a tratamento por 6 horas com as 14 substâncias que demonstraram padrão dose-resposta no ensaio REMA acima descrito (Tabela 4: galato de metila, galato de etila, galato de propila, galato de *i*-propila , galato de butila, galato de *i*-butila, galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila, galato de octila, galato de nonila, galato de decila e galato de undecila , galato de dodecila).

O tratamento de Xac com os galatos de alquila gerou fenótipos aberrantes como septo deslocado, ou seja, formação de constrições em áreas não localizadas na região central do bacilo, e bactérias com volume celular extremamente aumentado (dados não mostrados). Como estes fenótipos não foram eventos predominantes nas amostras, sendo estes documentados apenas após exaustiva investigação, foi executada uma medição mais acurada para a detecção de variações morfológicas (Tabela 5).

Primeiramente, foi realizada uma comparação visual ente células tratadas e não tratadas o que possibilitou a detecção de alterações no comprimento e volume celular (Figura A3). Em seguida, 100 células foram medidas individualmente para cada concentração testada (as concentrações utilizadas para as análises morfológicas variaram de 3,9 a 60 μg ml^{-1}, sendo esta última a máxima concentração onde se pode detectar células na microscopia de contraste de fase sem a acumulação de restos celulares). As medições foram realizadas em dois experimentos independentes gerando um total de n=200, que foi utilizado para o cálculo do tamanho celular (Tabela 5). O tratamento com 10 substâncias (galato de metila, galato de etila, galato de propila, galato de *i*-propila , galato de hexila, galato de heptila, galato de octila, galato de nonila, galato de decila e galato de undecila) produziram aumento significantivo na média do tamanho celular. Para cada experimento marcado com um asterisco compare o valor expresso como a média do tamanho celular do controle experimental interno (CI, Xac não-tratada) com o tratamento (cada tratamento possui seu próprio controle interno para evitar estimativas erradas devido a pequenas flutuações no tamanho da célula que podem ocorrer naturalmente; os CIs foram feitos ao mesmo tempo e nas mesmas condições do tratamento, no entanto, sem os substâncias). Os galatos de alquila: galato

de butila, galato de *i*-butila, galato de pentila e galato de dodecila; foram os únicos que não diferiram estatisticamente quando comparados aos CIs. Juntos esses resultados mostram que 10 das 14 substâncias que inibiram o crescimento de Xac no REMA (~72% da série dos galatos) foram capazes de induzir mudanças morfológicas nesta bactéria. A observação de que Xac continua a crescer em tamanho após o tratamento com os galatos de alquila denota que não há inibição de processos de transcrição/tradução nestas células, o que pode ser um indicativo de perturbações de outros processos celulares como a divisão e/ou segregação cromossômica. Por outro lado, as substâncias: galato de butila, galato de *i*-butila, galato de pentila e galato de dodecila podem operar na inibição do crescimento atuando em outros alvos.

Tabela 5. Comprimento de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tratadas com galatos de alquila

Substância [a]	Não tratado (µm) CI [b]	Tratado [c] (µm)
galato de metila	1,44 ± 0,31	1,74 ± 0,32*
galato de etila	1,44 ± 0,31	1,65 ± 0,65*
galato de propila	1,44 ± 0,31	1,57 ± 0,21*
galato de *i*-propila	1,44 ± 0,31	1,61 ± 0,28*
galato de butila	1,49 ± 0,23	1,52 ± 0,21
galato de *i*-butila	1,49 ± 0,23	1,47 ± 0,18
galato de pentila	1,72 ± 0,3	1,85 ± 0,48
galato de hexila	1,72 ± 0,3	1,97 ± 0,62*
galato de heptila	1,39 ± 0,27	1,62 ± 0,3*
galato de octila	1,39 ± 0,27	1,71 ± 0,32*
galato de nonila	1,39 ± 0,27	1,71 ± 0,38*
galato de decila	1,39 ± 0,27	1,6 ± 0,29*
galato de undecila	1,52 ± 0,24	1,62 ± 0,32*
galato de dodecila	1,57 ± 0,29	1,60 ± 0,30

n=200; dados correspondem a média ± desvio padrão [a] números entre parênteses correspondem a numeração adotada na Tabela 2; [b]média do comprimento celular do controle interno (células não tratadas); [c] células foram tratadas por seis horas a 30 ^{O}C; * p< 0,05; *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

4.4 Galatos de alquila podem ter como alvo a maquinaria de segregação cromossômica e divisão celular

No tópico anterior, foi levantada a hipótese que alguns galatos poderiam perturbar os processos de divisão celular e /ou segregação cromossômica baseado na observação de que células tratadas com estas substâncias exibiram aumento no comprimento celular. Dessa forma, foram utilizados marcadores fluorescentes para avaliar a habilidade destas substâncias em promover a disrupção do centrômero e/ou septo. Foram usadas duas linhagens mutantes de Xac para estas análises/; uma Xac *amy*::pPM2a-*zapA*, que expressa cópias extras de ZapA em fusão com GFP (GFP-ZapA) (Martins *et al.*, 2010) e a outra Xac *parB*::pPM7g-*parB*, que expressa ParB-GFP ao longo das proteínas ParB nativas (Ucci *et al.*, 2014).

No intuito de avaliar se os galatos de alquila poderiam perturbar a formação do septo, células de Xac *amy*::pPM2a-*zapA* foram tratadas com s substâncias que alteraram a morfologia celular (Tabela 5: galato de metila, galato de etila, galato de propila, galato de *i*-propila , galato de hexila, galato de heptila, galato de octila, galato de nonila, galato de decila e galato de undecila). Células não tratadas e as tratadas com DMSO1% exibiram o padrão de localização de GFP-ZapA, o que corresponde a um septo fluorescente entre as bactérias em divisão (Fig. 5 A, setas). Quando expostas aos galatos de alquila, pode-se observar uma completa disrupção do septo (Figura. 5 B), onde a fluorescência GFP-ZapA fica dispersa por todo o citoplasma nas células tratadas com as substâncias: galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila, galato de octila. O tratamento com algumas substâncias (como o galato de octila) induziu uma aparente contração do conteúdo citoplasmático em algumas células (Figura 5 B, asteriscos na microscopia de contraste de fase).

Apenas células de normal aspecto (Figura 4B, marcada com uma cruz) foram consideradas nas análises. O tempo de exposição/documentação foi de seis horas, com observações a cada 30 minutos; todas as substâncias mencionadas promoveram a disrupção do septo nos primeiros 30 minutos após tratamento. Fenótipo este indicativo de parada de divisão celular. As células tratadas com os galatos de alquila galato de hexila, galato de heptila, galato de octila continuaram a crescer em tamanho (veja a seção anterior), o que indica que elas eram metabolicamente ativas.

O alongamento bacteriano também pode ocorrer em resposta a defeitos na segregação cromossômica, neste sentido, o complexo DNA/ParB-GFP, que é conhecido por formar o centrômero bacteriano, pode servir com um marcador para a disrupção da maquinaria de segregação cromossômica. Em consequência ao tratamento com os galatos de alquila, quatro sustâncias (galato de hexila, galato de heptila, galato de octila e galato de decila) demonstraram atividade contra o complexo DNA/ParB-GFP (Figura 6 B). As avaliações a cada 30 minutos demonstraram que este complexo é bastante estável, levando em média quatro horas para que as substâncias causassem a disrupção celular (o equivalente a duas divisões bacterianas para Xac).

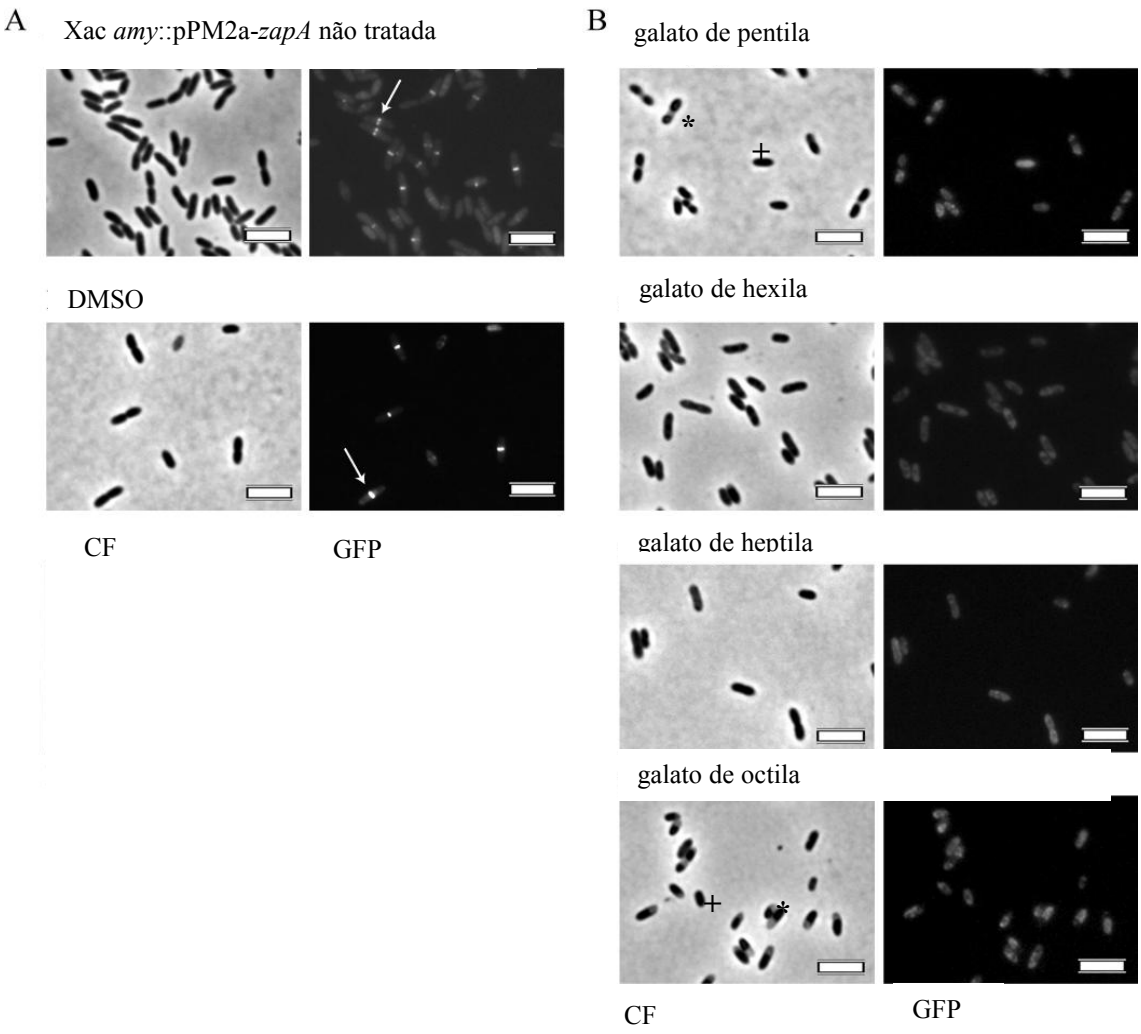


Figura 5. Galatos de alquila promovem a disrupção do septo divisional de *Xanthomonas citri* subsp *citri*. Células mutantes de Xac expressando GFP-ZapA foram cultivadas até a $D.O._{600\ nm}$ ~ 0,3, submetidas a tratamentos com os galatos de alquila nas concentrações correspondentes a CIM_{50}. A presença ou ausência do septo GFP-ZapA marcado foi monitorado por microscopia de fluorescência a cada 30 minutos de exposição ao tratamento. A) Células cultivadas na ausência de galatos de alquila (não tratadas) ou na presença de 1% de DMSO. As setas marcam os septos. B) Células tratadas com os galatos de alquila (somente as substâncias que perturbaram o septo estão apresentados). Células similares as assinaladas com asterisco foram excluídas e consideradas as que se pareciam como as marcadas com cruzes. DMSO, veículo; CF, contraste de fase; GFP, proteína fluorescente verde; Barra de escala 4µM. Aumento 100X.

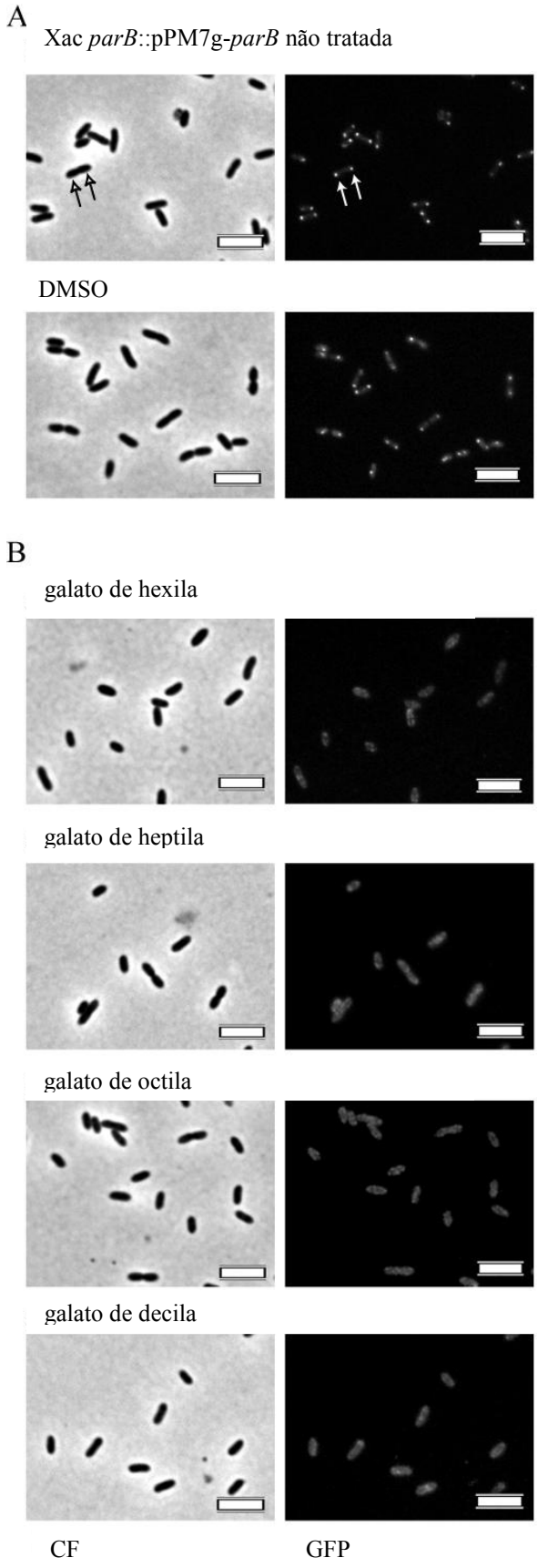


Figura 6. Galatos de alquila tem como alvo o centrômero de *Xanthomonas citri* subsp *citri*. ParB-GFP Foi cultivado até a $D.O._{600\ nm}$ ~0,3 então submetidas a tratamentos com os galatos de alquila nas concentrações correspondentes a CIM_{50} por seis horas a 30ºC. A presença ou ausência de ParB-GFP marcado foi monitorada por microscopia de fluorescência a cada 30 minutos de exposição e documentada a partir de 2 horas. A) Células cultivadas na ausência das substâncias ou na presença de DMSO 1%. O sinal de ParB-GFP está marcado com setas no painel GFP. B) Células expostas aos galatos de alquila, dados são relativos apenas as substâncias que promoveram a disrupção do centrômero. DMSO, veículo; CF, contraste de fase; GFP, proteína fluorescente verde; Barra de escala 4 μM. Aumento de 100X.

4.5 Galatos de alquila atuam precocemente na inibição do crescimento celular

O estudo das curvas de crescimento de Xac na presença de galatos de alquila demonstram o ponto de atuação destas substâncias. A inibição de crescimento precoce pode ser indicativa de atuação em processos dinâmicos, como exemplo a divisão celular. Na Figura 7, estão demonstradas as curvas de crescimento de Xac na presença das diversas substâncias em análise na concentração de CIM_{50}, realizadas por um período de 10 horas em meio LB com crescimento a 30^{O} C. Ao todo oito substâncias (galato de i-propila, galato de butila, galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila, galato de octila, galato de decila e galato de undecila) apresentaram atuação precoce nestas análises atuando em geral nas primeiras 2 horas de contato com as células (atuam no período de primeira divisão celular).

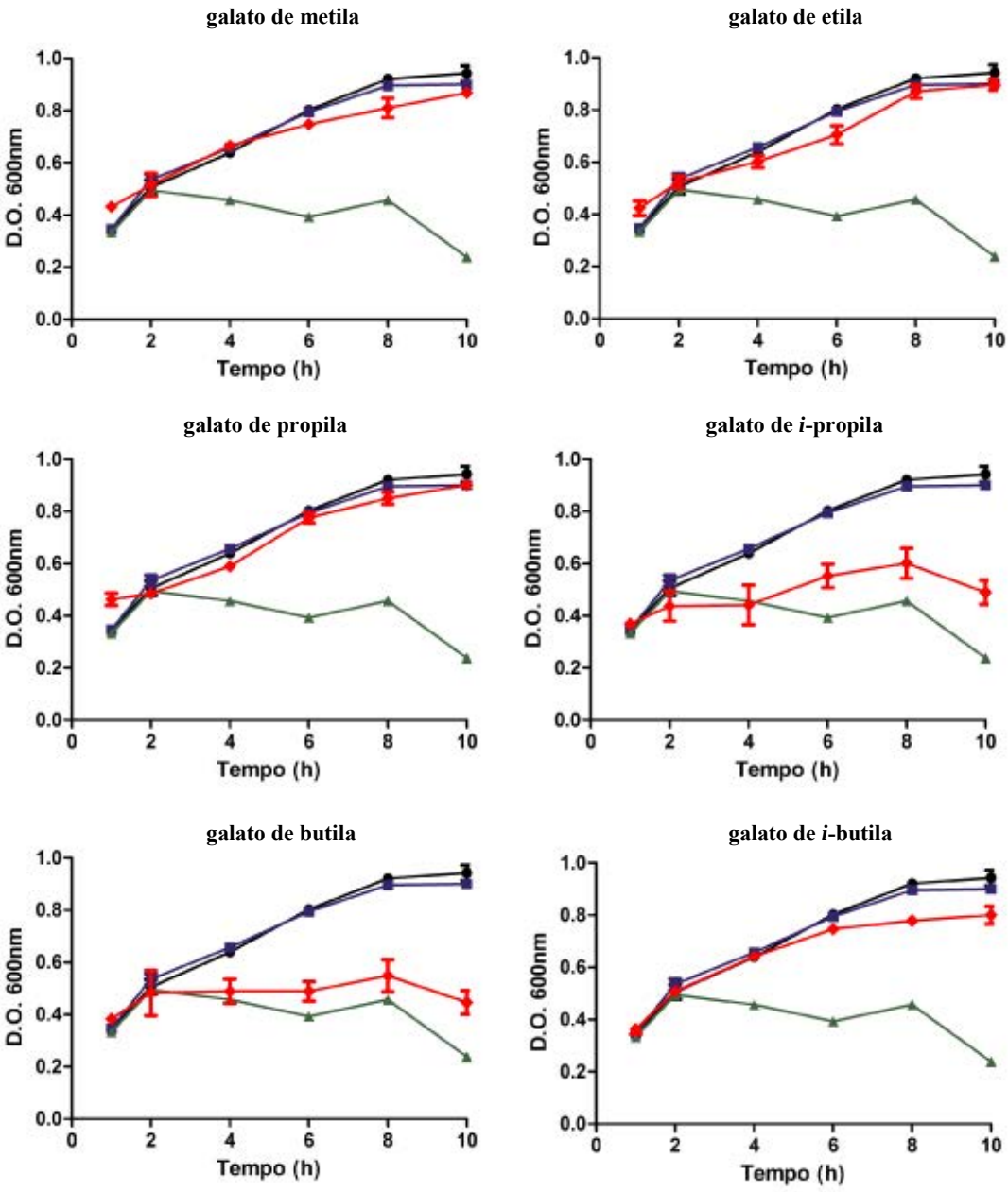


Figura 7. Curva de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp *citri* na presença dos galatos de alquila. A bactéria foi cultivada na presença dos galatos de alquila na CIM_{50}. (●) Controle Negativo (ausência de inibidores), (■) Controle de veículo (1% DMSO), (▲) Controle Positivo (kanamicina 15,6 µg ml^{-1}), (◆) galatos de alquila. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Cada ponto no gráfico é representa a média ± Desvio Padrão.

(Continua na próxima página)

Figura 6 (Continuação)

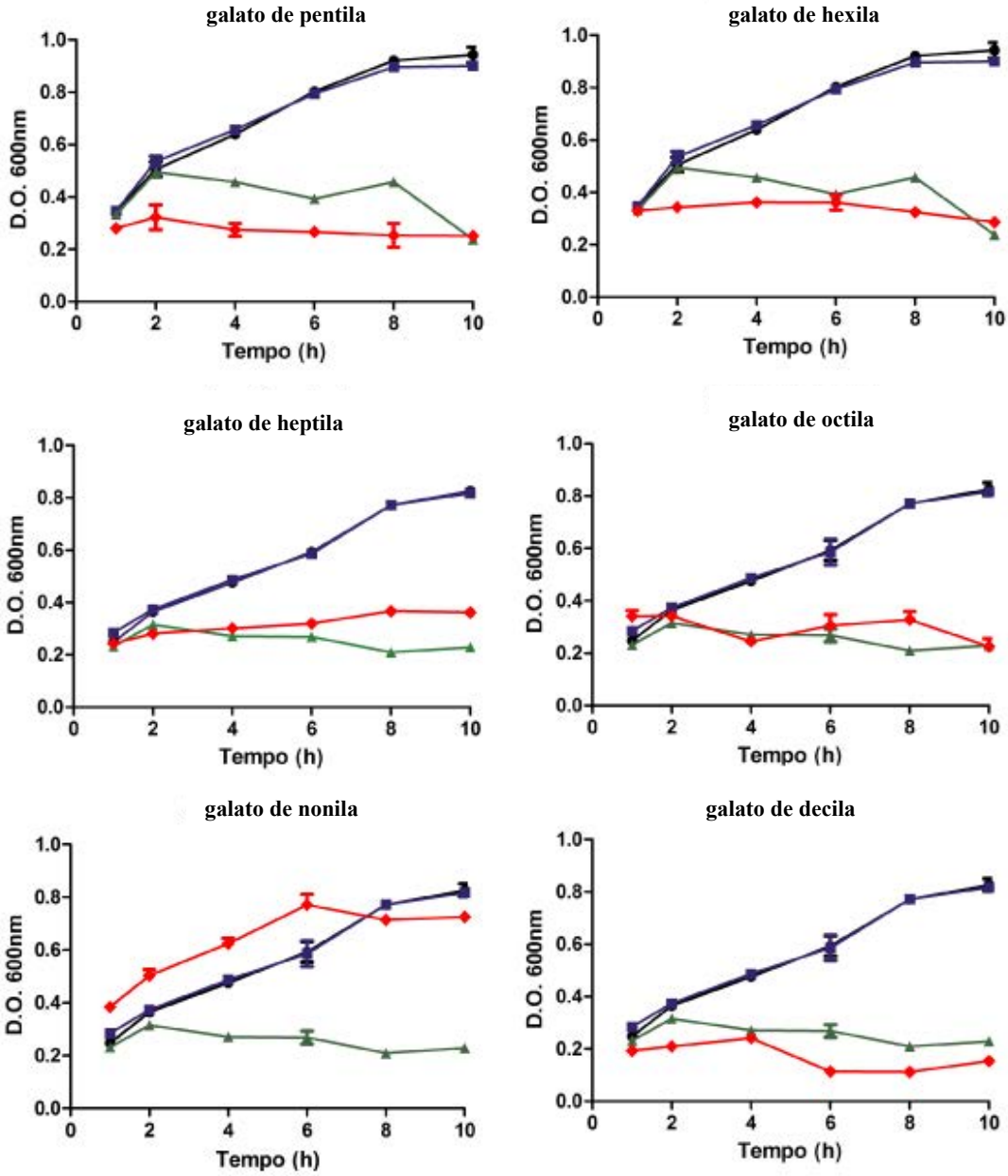


Figura 7. Curva de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp *citri* na presença dos galatos de alquila. A bactéria foi cultivada na presença dos galatos de alquila na CIM_{50}. (●) Controle Negativo (ausência de inibidores), (■) Controle de veículo (1% DMSO), (▲) Controle Positivo (kanamicina 15.6 µg ml^{-1}), (◆) galatos de alquila. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Cada ponto no gráfico é representa a média ± Desvio Padrão.

(Continua na próxima página)

Figura 6 (Continuação)

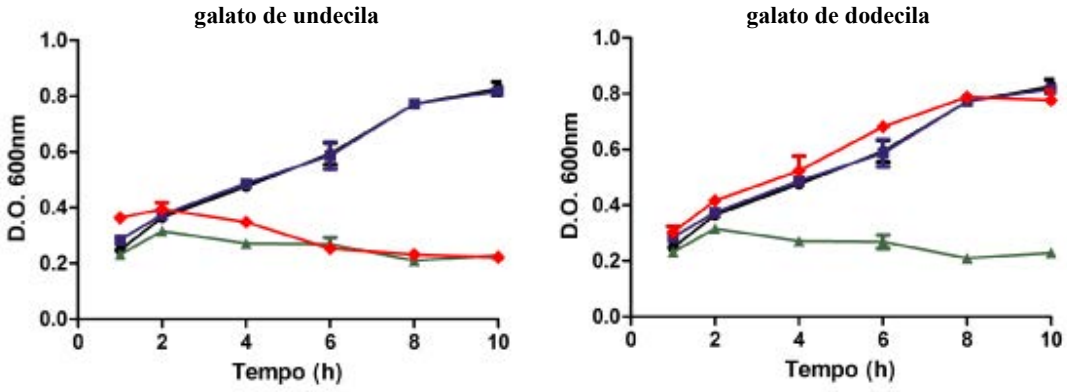


Figura 7. Curva de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp *citri* na presença dos galatos de alquila. A bactéria foi cultivada na presença dos galatos de alquila na CIM_{50}. (●) Controle Negativo (ausência de inibidores), (■) Controle de veículo (1% DMSO), (▲) Controle Positivo (kanamicina 15.6 µg ml^{-1}), (◆) galato de alquila. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Cada ponto no gráfico representa a média ± Desvio Padrão.

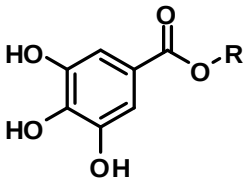
4.6 Galatos de alquila inibem a proliferação de *Bacillus subtilis*

Sabendo-se que ZapA é um regulador da divisão celular, contribuindo para a estabilidade do anel Z (Gueiros-Filho e Losick, 2002) e que o tratamento com os galatos de alquila provoca uma completa disrupção do septo divisional, a hipótese de que as substâncias tenham a maquinaria de divisão celular como alvo tornou-se mais plausível. Para a verificação desta hipótese foram realizados uma série de experimentos bioquímicos e celulares em colaboração com o Dr. Dirk-Jan Scheffers da Universidade de Groningen, utilizando como modelo experimental *B. subtillis*.

Inicialmente tentou-se utilizar Xac como modelo para a caracterização do alvo das substâncias. No entanto, apesar da expressão de Xac FtsZ em *Escherichia coli* ter sido bem sucedida, não foi possível obter o grau de pureza de proteina necessária para os testes. Contudo, é importante salientar que FtsZ é uma proteína conservada e apresenta elevada similaridade entre as moléculas de diferentes gêneros (ex. XacFtsZ e *B. subtillis* FtsZ são 75,4% similares), o que torna o modelo *B. subtilis* bastante confiável.

Foram utilizados para as analises com *B. subtilis* apenas as quatro substâncias que induziram a disrupção do septo divisional (galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila e galato de octila). Primeiramente a atividade anti-*Bacillus* das substâncias foi avaliada utilizando-se o ensaio REMA da mesma forma como realizada anteriormente para Xac. As concentrações utilizadas variaram de 15 a 1000 µg ml-1 (Tabela 6). Os resultados mostram que os valores de CIM obtidos estão na faixa de 50 a 235 µg ml^{-1}. É possível observar que a atividade antibacteriana assim como em Xac, aumenta de acordo com o número de carbonos na cadeia lateral e é diretamente relacionada com o aumento da lipofilicidade e neste caso, atingindo ponto de corte com o galato de heptila (C log P = 3,32).

Tabela 6. Atividade anti- *Bacillus subtilis* dos galatos de alquila.



Substância	R[a]	C *log P* [b]	CIM[c]
galato de pentila	$(CH_2)_4CH_3$	2,53	235
galato de hexila	$(CH_2)_5CH_3$	2,92	90
galato de heptila	$(CH_2)_6CH_3$	3,32	50
galato de octila	$(CH_2)_7CH_3$	3,72	105
kanamicina [d]			50

[a] R, substituinte

[b] Coeficiente de partição: lipofilicidade teórica (Rosso *et al.*, 2006).

[c] CIM, Concentração Inibitória Mínima, Concentração capaz de inibir 90 % do crescimento da população celular, expresso em $\mu g\ ml^{-1}$.

[d] Controle positivo.

4.7 Galatos de alquila promovem a disrupção do septo em *Bacillus subtilis*

Para averiguar o efeito das substâncias no processo de formação de septo em *B. subtilis*, submetemos mutantes desta bactéria expressando FtsZ-YFP aos galatos de alquila. Células não tratadas ou tratadas com o veículo DMSO 1% apresentam padrão de localização de FtsZ com um anel de fluorescência localizado entre dois bastonetes se dividindo (Figura 8 A B). Como controles de morte celular foram utilizados: 1) cianina carbonil *m*-clorofenilhidrazona (CCCP): um ionóforo que anula o potencial de membrana por destruição dos gradientes de prótons existentes na membrana plasmática, desencadeando a inibição da fosforilação oxidativa e consequentemente interferindo no funcionamento da ATP sintase (Novo *et al.*; Vicente *et al.*, 2006); 2) nisina: um lantibiótico produzido por *Lactococcus lactis* que mata a célula formando poros na membrana bacteriana (Swings e Civerolo, 1993). Em células tratadas com CCCP os anéis Z continuaram intactos, já o tratamento com nisina provocou uma redução no número de anéis, mas ainda é possível observá-los facilmente. Situação muito diferente da encontrada nas células submetidas ao tratamento com os galatos de alquila onde a localização de FtsZ-YFP foi imediatamente perturbada, observando-se a presença de pontos de fluorescência visíveis e dispersos por todo o citoplasma (Figura 8 C-E). Este foi exatamente o mesmo efeito observado com o mutante de Xac GFP-ZapA após o tratamento, indicando dessa forma, que FtsZ possa ser um alvo das substâncias. E que este efeito ocorre rapidamente durante a divisão, pois além de ocorrer imediatamente após a adição da substância, ZapA é sabidamente uma proteína recrutada precocemente ao divisomo por FtsZ durante a divisão (Vicente *et al.*, 2006).

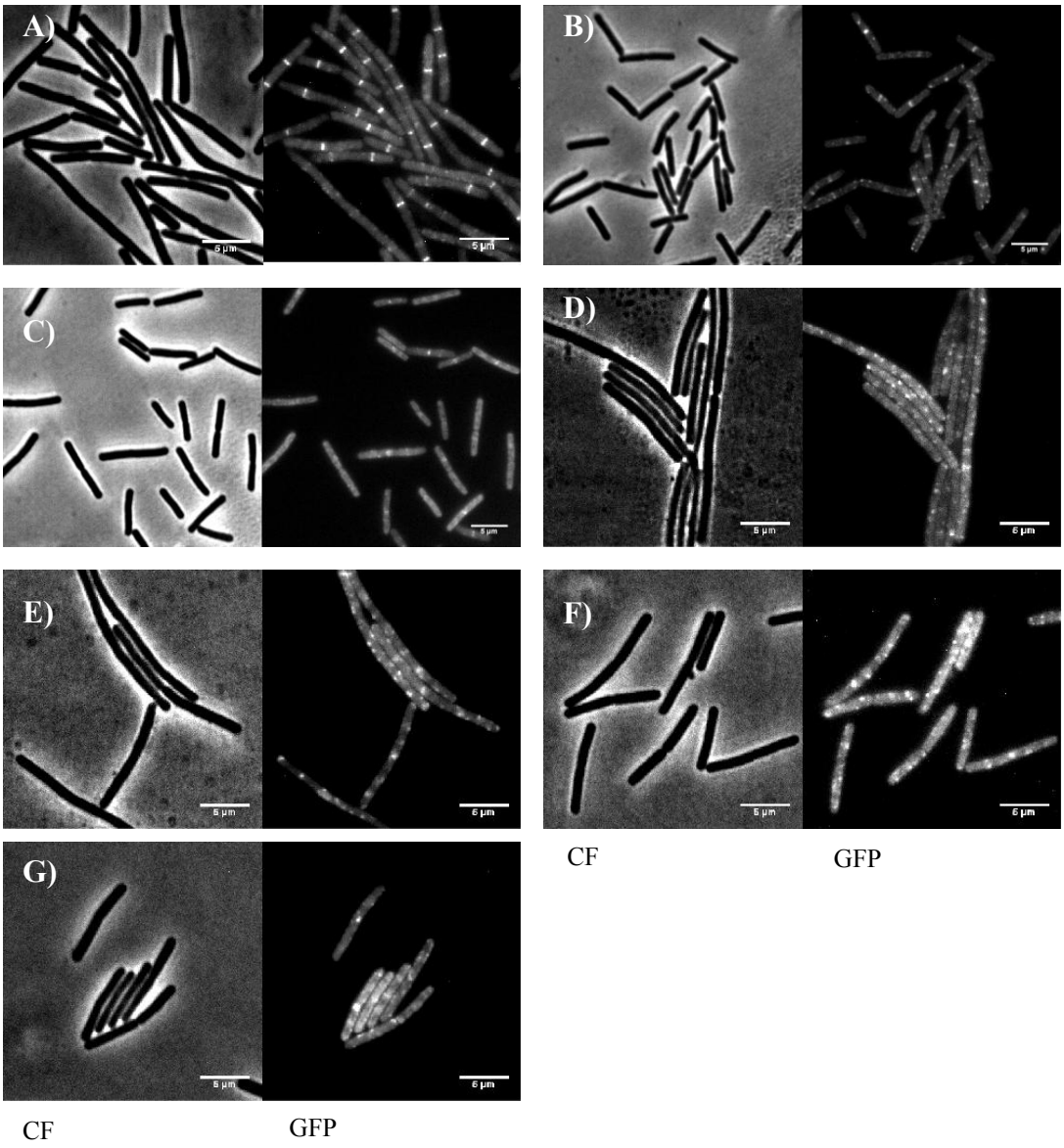


Figura 8. Efeito dos galatos de alquila na morfologia do anel Z em *Bacillus subtilis*. A) Localização celular de FtsZ-YFP em *Bacillus subtilis* na presença de DMSO 1%, **B)** CCCP, **C)** nisina , **D)** galato de pentila, **E)** galato de hexila, **F)** galato de heptila , **G)** galato de octila. As células foram cultivadas até a D.O. $_{600nm}$ ~0.3, e então tratadas com os galatos de alquila na concentração de CIM_{50} e observadas logo em seguida. CF, contraste de fase.; GFP, proteína fluorescente verde . Barra de escala, 5µm.

4.8 Galatos de alquila não interferem na organização do nucleóide em *B. subtilis*

Resultados com Xac mostraram que os galatos de alquila interferiram concomitantemente no segrossomo e divisomo, sugerindo que os processos de segregação cromossômica e divisão celular estariam interligados neste fitopatógeno (Silva *et al.*, 2013). Para averiguar se as substâncias teriam o mesmo efeito em *B. subtilis*, observamos a organização do nucleoide de células tratadas com os galatos de alquila utilizando o corante de DNA Hoechst 33342 (Figura 9). Além disso, usamos o corante iodeto de propídio como indicador de morte celular.

Como resultado desta análise observou-se que apesar das substâncias promoverem a disrupção do anel Z, elas não parecem interferir na organização e distribuição do nucleóide. Tal observação corrobora o fato da segregação e divisão serem processos independentes em *B. subtilis* e mostram que provavelmente FtsZ seja o principal alvo dos galatos. Além disso, grande parte das células estava inviável.

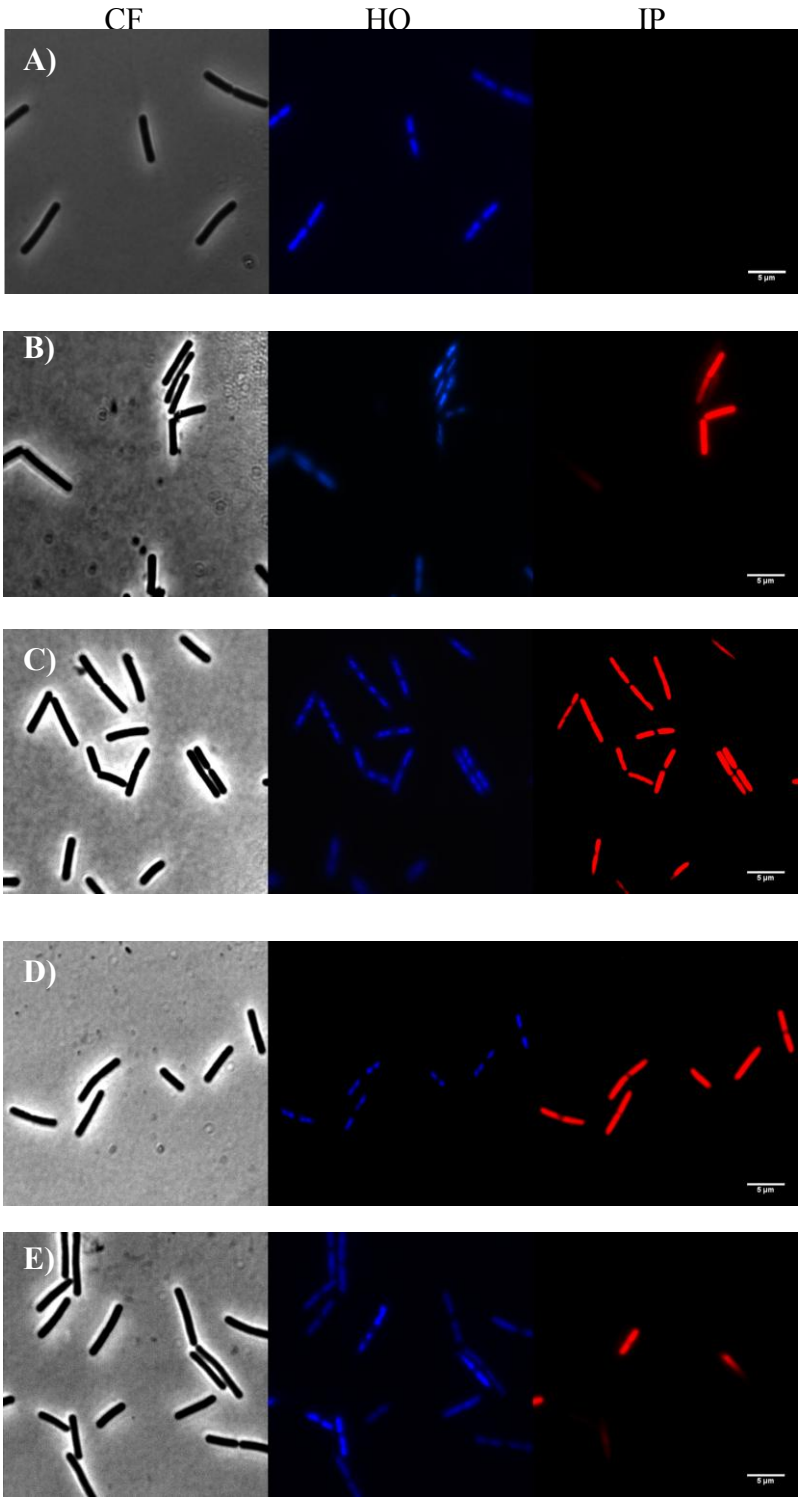


Figura 9. Efeito dos galatos de alquila na organização do nucleoide de *B. subtilis.* Células de *Bacillus subtilis* coradas com Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídeo (IP) na presença de **A**) DMSO 1%, **B)** CCCP, **C)** nisina **D)** *n*-pentil galato **E)** *n*-hexil galato. As células foram cultivadas até a D.O $_{600nm}$ ~0.3, e então tratadas com os galatos de alquila na concentração de CIM_{50} e observadas logo em seguida. CF, contraste de fase. Barra de escala, 5µm.

(Continua na próxima página)

Figura 8 (Continuação)

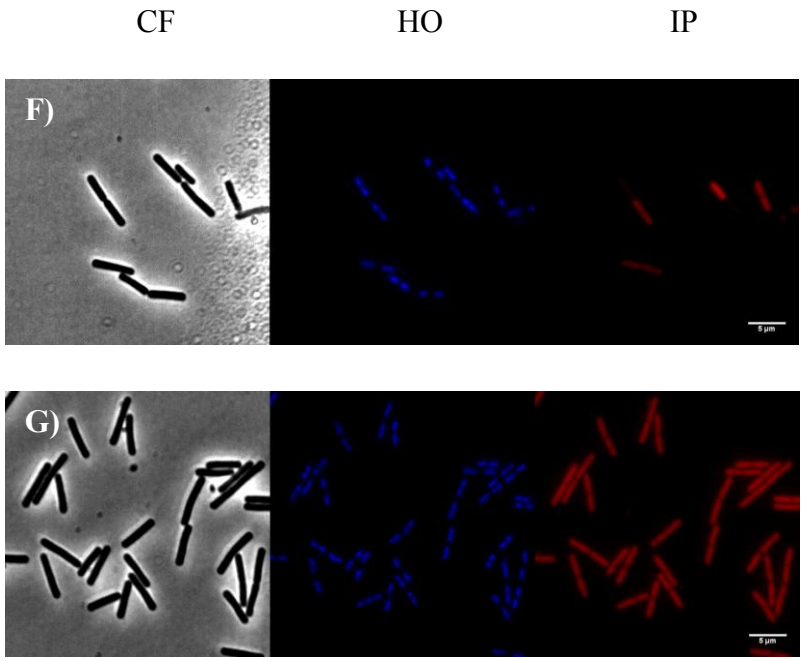


Figura 9. Efeito dos galatos de alquila na organização do nucleoide de *B. subtilis.* Células de *Bacillus subtilis* coradas com Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídeo (IP) na presença de **E)** *n*-hexil galato **F)** *n*-heptil galato **G)** *n*-octil galato. As células foram cultivadas até a D.O $_{600nm}$ ~0.3, e então tratadas com os galatos de alquila na concentração de CIM_{50} e observadas logo em seguida. CF, contraste de fase. Barra de escala, 5µm.

4.9 A proteína de regulação espacial GFP-MinC apresenta localização dispersa após tratamento com galatos de alquila.

Foi demonstrado recentemente que substâncias capazes de alterar o potencial transmembrana em bactérias alteram a localização de proteínas como MinD, FtsA e MreB influenciando assim nos processos de divisão celular (Strahl e Hamoen, 2010). Para investigar se os galatos poderiam ter alguma atuação em processos que regulam a correta localização do anel Z, o efeito na localização do marcador GFP-MinC em *B. subtilis* foi observado. As células tratadas com o controle de veículo exibiram o perfil de localização padrão de GFP-MinC aqui vistos como manchas acumuladas nas extremidades dos bastonetes ou nos septos em estágio tardio de divisão (Figura 10 A).

As células tratadas com os galatos apresentaram fluorescência GFP-MinC dispersa por todo o citoplasma (Figura 10 D-G). Esses dados apontam para uma possível influência dos galatos de alquila nos processos regulados pelo sistema Min, e que tais efeitos assim como sugerido por Strahl e Hamoen (2010), seriam desencadeados por mudanças relacionadas a força próton-motora, mais especificamente alterações no potencial transmembrana. No entanto, os resultados apresentados aqui são ainda preliminares e estudos para avaliar possíveis efeitos dos galatos de aquila no potencial de membrana dessas células precisam ser realizados para confirmar a influência destes substâncias nesta via.

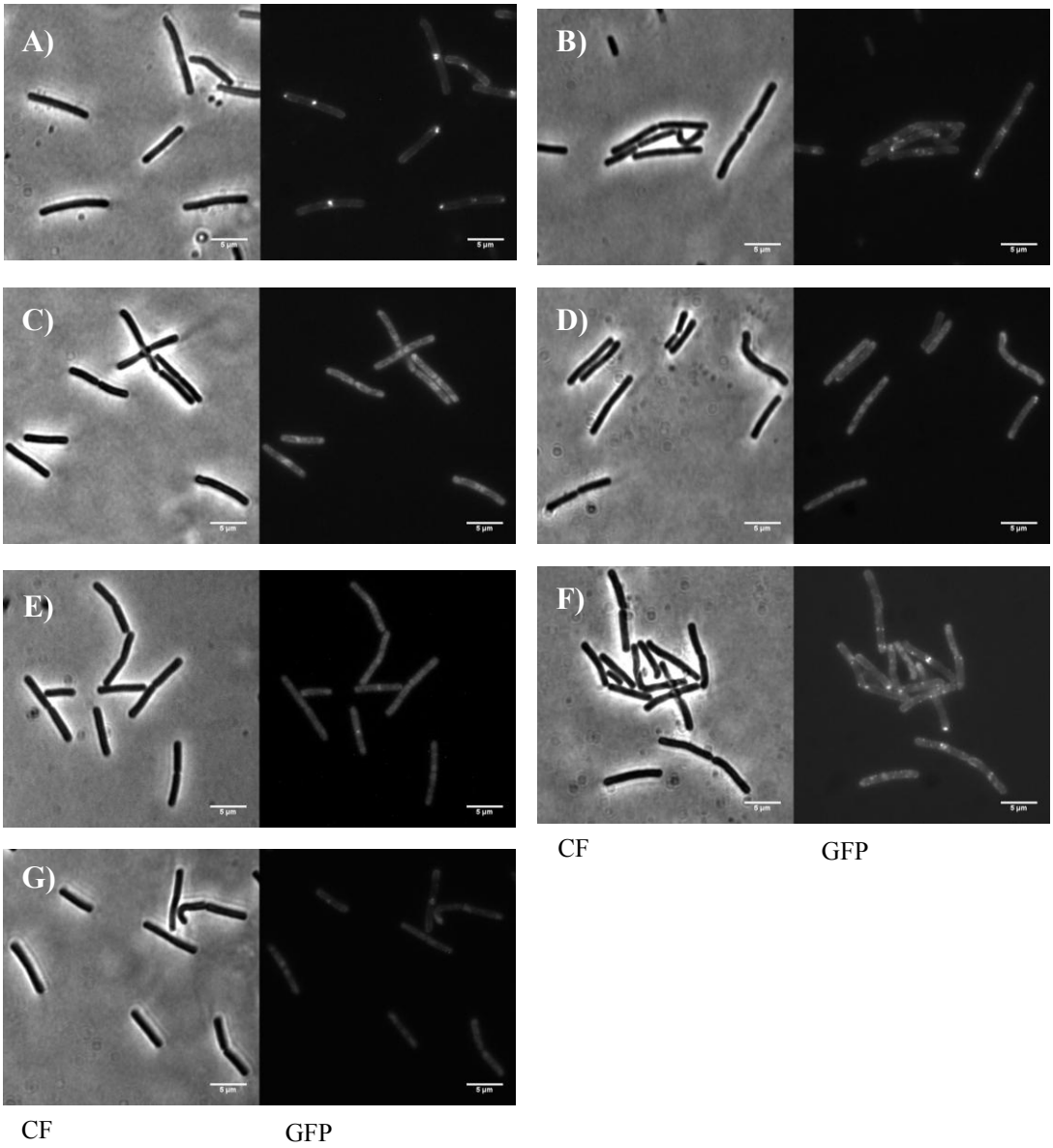


Figura 10. Localização da proteína reguladora espacial GFP-MinC. A) Localização celular de GFP-MinC em *Bacillus subtilis* na presença de DMSO 1%, **B)** CCCP, **C)** nisina , **D)** galato de pentila, **E)** galato de hexila, **F)** galato de heptila , **G)** galato de octila. As células foram cultivadas até a D.O. $_{600nm}$ ~0.3, e então tratadas com os galatos de alquila na concentração de CIM_{50} e observadas logo em seguida. CF, contraste de fase; GFP, proteína fluorescente verde. Barra de escala, 5µm.

4.10 Galatos de alquila tem efeito na localização de GFP-MreB

Foi demonstrado recentemente por Fenton e Gerdes (2013) que a proteína MreB interage diretamente com FtsZ e que esta interação é necessária para a constrição do anel Z em *E. coli*. A fim de investigar possíveis efeitos dos galatos de alquila nesta proteína utilizamos como marcador a proteína MreB em fusão com GFP em *B. subtilis*. Células tratadas com DMSO 1% apresentaram pontuações de fluorescência presente ao longo de toda a periferia da célula (padrão de localização esperado para GFP-MreB) (Figura 11 A). Contudo o tratamento com as substâncias promoveu a deslocalização destas proteínas com distribuição dispersa ao longo de toda a célula. (Figura 11 D-G).

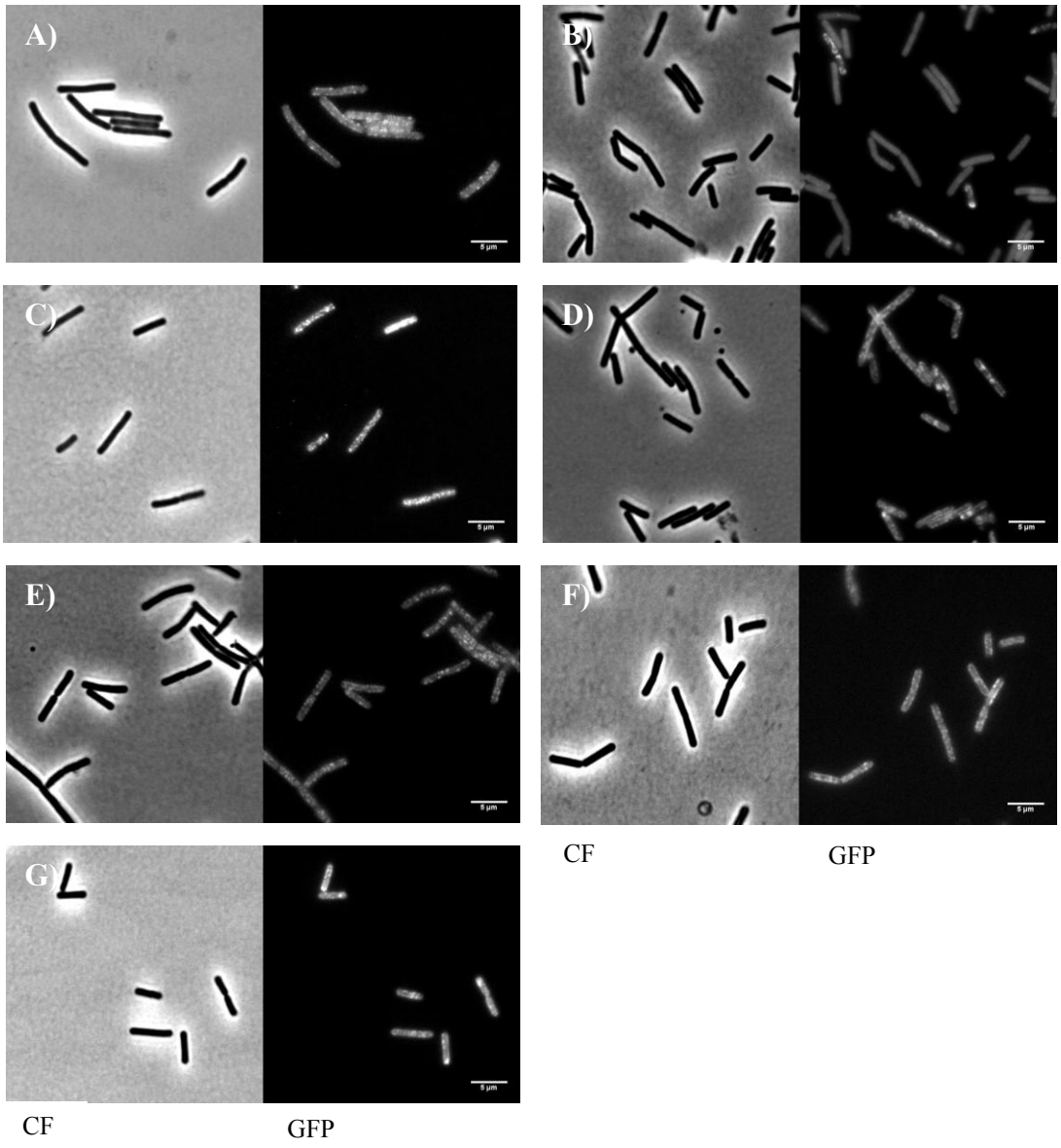


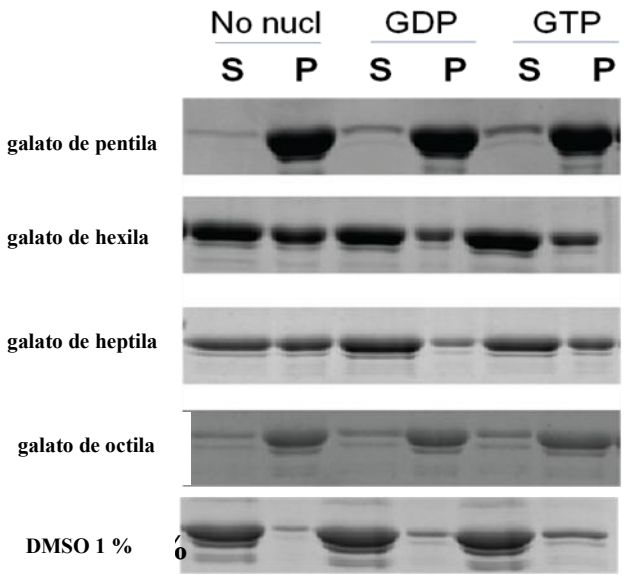
Figura 10. Efeito dos galatos de alquila na distribuição de GFP-MreB. A) Localização celular de GFP-MreB em *Bacillus subtilis* na presença de DMSO 1%, **B)** CCCP, **C)** nisina **D)** galato de pentila **E)** galato de hexila **F)** galato de heptila **G)** galato de octila. As células foram cultivadas até a D.O. $_{600nm}$ ~0.3, e então tratadas com os galatos de alquila na concentração de CIM_{50} e observadas logo em seguida. CF, contraste de fase; GFP, proteína fluorescente verde. Barra de escala, 5µm.

4.11 Galatos de alquila perturbam a dinâmica de polimerização

Para investigar o efeito dos galatos de alquila no agrupamento dos protofilamentos de FtsZ foi utilizado o teste de sedimentação na presença das substâncias nas concentrações de CIM. O processo de polimerização foi ainda avaliado na ausência de nucleotídeos ou com a adição de GTP ou GDP. Durante o processo de ultracentrifugação, a sedimentação de FtsZ ocorre normalmente de forma GTP-dependente (Figura 11 A, DMSO 1%). No entanto, quando as substâncias foram adicionadas nota-se um expressivo aumento de FtsZ na fração pellet, efeito esse claramente evidenciado quando adicionadas as substâncias: galato de pentila e galato de octila, onde quase toda a proteína pode ser encontrada no pellet. Observa-se também uma distribuição um pouco mais homogênea na quantidade de FtsZ entre pellet e sobrenadante para as substâncias: galato de hexila e galato de heptila , mas ainda assim em quantidade superior de sedimento no pellet em comparação com o controle DMSO 1%. Tal aumento em sedimentação demonstrou ser independente do nucleotídeo utilizado (GTP ou GDP) e também foi observado mesmo em condições desfavoráveis ao agrupamento dos protofilamentos (ausência de nucleotídeo).

Além disso, este efeito parece ser específico para a proteína FtsZ, já que o mesmo resultado não foi obtido com a proteína BSA quando tratada com as mesmas substâncias, reforçando a ideia de que as substâncias atuam em FtsZ (Figura 12 B).

A)



B)

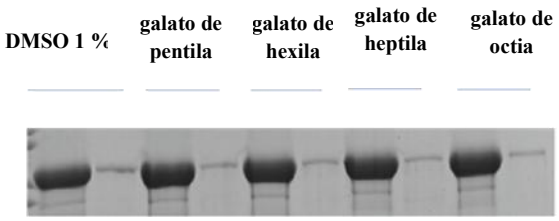


Figura 12. Ensaio de sedimentação. A) A proteína FtsZ (10 µM) foi incubada no tampão de polimerização 50 mM Hepes/NaOH; 50 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; pH 7,5 a 30°C e tratada com os galatos de alquila nas concentrações de CIM (ou DMSO 1% como controle de veículo). A polimerização foi induzida pela adição de 2 mM GTP (ou 2 mM GDP como controle). **B**) A proteína BSA (10 µM) foi incubada com o mesmo tampão de polimerização. Após 20 minutos de incubação, os polímeros foram recuperados por ultracentrifugação. S, sobrenadante; P, pellet, No Nucl: ausência de nucleotídeo.

4.12 A Atividade GTPasica de FtsZ é inibida pelos galatos de alquila

A dinâmica de agrupamento de FtsZ é regulada pela hidrólise de GTP (Mukherjee e Lutkenhaus, 1998). Dessa forma, decidiu-se avaliar se a dinâmica de polimerização poderia ser comprometida pelos galatos de alquila. Para isso, a quantidade de Pi liberado por molécula de FtsZ foi quantificada em relação ao tempo (Figura 13).

As substâncias galato de pentila e galato de hexila, apresentaram redução na atividade GTPásica na ordem 65 e 68 % respectivamente, enquanto que as substâncias galato de heptila e galato de octila, inibiram aproximadamente metade da atividade (52 e 49 %, respectivamente) em comparação com o controle DMSO 1% (Veículo). A atividade GTPásica é requerida para a dinâmica de agrupamento de FtsZ e portanto a inibição dessa atividade irá perturbar a formação do protofilamento.

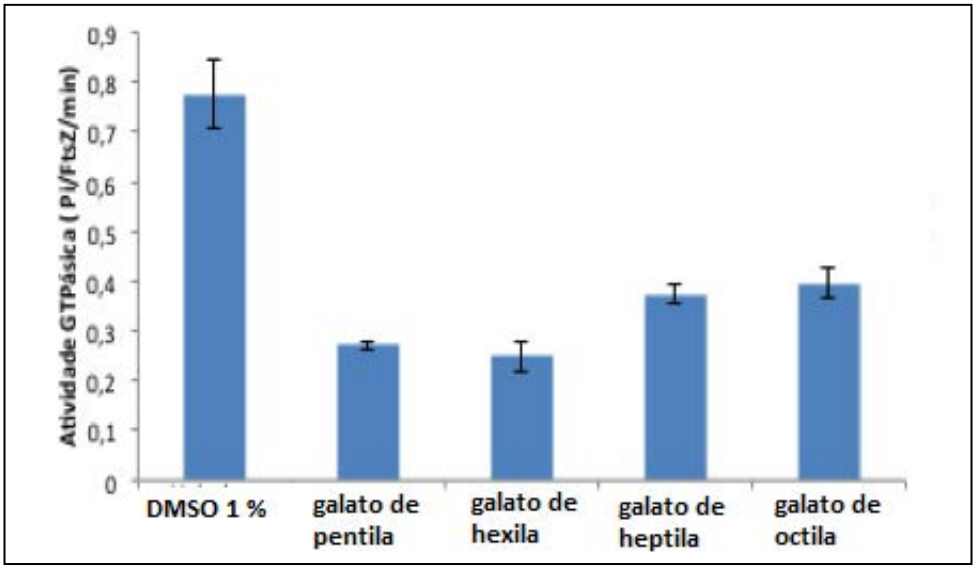


Figura 13. Hidrólise de GTP. A proteína FtsZ (10 µM) foi incubada em tampão de polimerização 50 mM Hepes/NaOH; 300 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; pH 7,5 a 30 °C. Após a adição de 1mM de GTP, a liberação do fosfato foi acompanhada pelo ensaio colorimétrico verde Malachita e a atividade GTPásica foi determinada por 30 minutos em uma reta de regressão linear de liberação de fosfato. Média + Erro padrão de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

O patógeno Xac é o agente causal do cancro cítrico, uma severa doença que afeta cultivares de citros no mundo todo e representa uma grande ameaça a uma das atividades econômicas mais importantes no Brasil. A erradicação de pomares inteiros com árvores infectadas por Xac é até o momento a única medida efetiva de controle para prevenir a disseminação da doença para novas áreas no estado de São Paulo. No entanto, a obrigação de fazê-lo com base em leis governamentais gerou um grande descontentamento especialmente entre os citricultores.

A citricultura na maior área produtora no mundo, o estado de São Paulo, parece estar mudando de um sistema de erradicação para um sistema de manejo integrado (Belasque Jr. & Behlau, 2011) onde qualquer ajuda no controle dessa doença será de grande valia. Aqui foi demonstrado o potencial uso de galatos de alquila para prevenir o crescimento e a disseminação de Xac. Um compilado das atividades dos galatos contra Xac está sumarizado na Tabela 7. O ensaio colorimétrico REMA indicou que os galatos de alquila são potentes agentes anti-Xac, apresentando valores de CIM comparáveis ao controle positivo utilizado kanamicina (15,6 $\mu g\ ml^{-1}$). Outrossim, estes dados estão de acordo com outros estudos em séries homólogas (Wang e Lutkenhaus, 1993; Gundogdu *et al.*, 2011; Marteyn *et al.*, 2014) demonstrando que o comportamento dos galatos de alquila poderia estar relacionado com o fenômeno *cutoff* o qual tem sido frequentemente atribuído a suas propriedades anfifílicas. Estruturalmente, a propriedade anfifílica dos galatos de alquila está associada a presença de dois grupos, hidroxilas fenólicas (parte hidrofílica) e a cadeia lateral alquila (cauda lipofílica). Dessa forma, é provável que o tamanho da cadeia lateral esteja relacionado com uma efetiva liberação da porção bioativa dos galatos de alquila (unidade de ácido gálico) para dentro das células.

Atualmente, a única substância utilizada no campo que confere algum grau de proteção contra o cancro são formulações a base de cobre. Pulverizações de cobre conferem relativo controle na prevenção de novas infecções em tecidos de plantas jovens e imaturas (folhas, ramos e frutos) (Gottwald e Timmer, 1995; Behlau, Belasque Jr*., et al.*, 2010). O efeito tóxico do cobre em Xac se dá apenas na superfície da planta sem nenhuma ação interna/sistêmica. Como consequência, tecidos infectados podem atuar como fonte de inoculo bacteriano, mesmo em plantas frequentemente pulverizadas com formulações de cobre (Behlau, Amorim*, et al.*, 2010). Embora útil e frequentemente aplicado na agricultura, formulações cúpricas são tóxicas para o meio

ambiente e podem levar ao desenvolvimento de populações bacterianas resistentes (Behlau *et al.*, 2011). Desta forma o desenvolvimento de novas substâncias com ação anti-Xac são de extrema importância.

Neste trabalho foi demonstrado que a exposição de células de Xac a galatos de alquila eliminaram a habilidade deste patógeno em colonizar e/ou induzir sintomas de cancro cítrico *in planta*.

Há na literatura vários trabalhos sobre inibidores de divisão celular que foram identificados e /ou desenvolvidos baseados em prospecção de substâncias naturais semissintéticos e sintéticos capazes de realizar a disrupção da função de FtsZ em bactérias (Awasthi *et al.*, 2011). Algumas destas têm sido incluídas em processos de pedidos de patente, já que inibidores de divisão celular são considerados hoje alvos ideais para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. O que suporta essa visão é o fato de que fatores proteicos na divisão celular bacteriana, um processo essencial para a vida, são em geral exclusivos às bactérias. Além disso, esses fatores são muito difundidos e conservados neste domínio de vida, e para proteínas que apresentam algum grau de homologia a eucariotos (ex. FtsZ e tubulinas em organismos eucariotos (Erickson & Stoffler, 1996; Lowe & Amos, 1998). Há ainda diferenças consideráveis entre eles para permitir o desenvolvimento de inibidores específicos de bactérias. Este trabalho mostra que os substâncias (galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila e galato de octila) de alguma forma são capazes de promover a disrupção do septo em Xac (Tabela 4). Além disso, células de Xac tratadas com essas substâncias foram incapazes de colonizar o hospedeiro citros, o que aponta para o seu potencial uso para proteção contra este patógeno.

Três dos quatro galatos que induziram a disrupção do septo também atuaram no centrômero de Xac (galato de hexila, galato de heptila e galato de octila). Para demonstrar isso, foi utilizado uma linhagem mutante de Xac expressando ParB-GFP (Ucci *et al.*, 2014) no qual o complexo ParB-GFP/DNA (o centrômero bacteriano) tem um padrão de localização facilmente reconhecível com dois *foci* por bactéria, cada um ocupando uma região perto do polo da célula (Figura. 6). Após o tratamento com os galatos de alquila (galato de pentila, galato de hexila, galato de heptia e galato de octila), os dois foci do centrômero desapareceram e apenas uma fluorescência dispersa pode ser detectada nas células. Esta observação levantou a possibilidade de que um fator/sistema comum a ambos os processos de segregação cromossômica e a divisão

celular pode ser o alvo real destes substâncias em Xac. A segregação cromossômica e a divisão celular são dois processos essenciais interligados em bactéria (Lemon e Grossman, 2001; Lau *et al.*, 2003; Thanbichler e Shapiro, 2006). Alguns componentes que ligam diretamente esses dois processos (ex. FtsZ e ParB via um inibidor de FtsZ como MipZ em *Caulobacter crescentus*) já foram demonstrados (Thanbichler e Shapiro, 2006; Donovan *et al.*). Curiosamente, foi encontrado em nosso laboratório um esquema de divisão celular/segregação cromossômica que se assemelha ao que foi proposto para o modelo de *C. crescentus* (Ptacin *et al.*, 2010; Ucci *et al.*, 2014). A correta localização do septo nestas células é definida pela ação de MipZ, o que por sua vez tem sua localização dependente do complexo centromérico (ParB/DNA). A disrupção de MipZ e/ou a função centromérica leva a um defeito na divisão celular em *C. crescentus* (Thanbichler e Shapiro, 2006). Finalmente, proteínas do citoesqueleto, como as parecidas como MreB, possuem sua contribuição no sistema de particionamento do cromossomo em bactéria (Gitai *et al.*, 2005). Baseado nessas observações, pode-se especular que as substâncias (galato de hexila, galato de heptila e galato de octila) atuam promovendo a disrupção da divisão celular tendo como alvo a maquinaria de segregação de Xac, o que também requer futuras investigações.

Para uma melhor caracterização da ação dos galatos de alquila na divisão celular foram realizados experimentos com as substâncias que induziram disrupção do septo em Xac (galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila e galato de octila) para avaliar a dinâmica de polimerização de FtsZ assim como a observação de outras proteínas também envolvidas no processo de divisão celular. Este estudo foi realizado em *B. subtilis.* Inicialmente tentou-se realizar os experimentos utilizando Xac como modelo, no entanto, após várias tentativas falhas de se purificar a proteína XacFtsZ, optamos por utilizar como modelo um organismo cujos mecanismos de divisão celular já foram amplamente estudados. Além disso, FtsZ é uma proteína conservada que possui um alto grau de homologia entre ambos microrganismos (Xac e *B.subtilis*), logo os resultados obtidos em *B. subtilis* podem ser extrapolados para Xac com razoável confiabilidade.

Assim como observado para Xac, os galatos de alquila também foram capazes de inibir a proliferação de *B.subtilis in vitro*, com atividade farmacológica diretamente relacionada com sua lipofilicidade. Desta forma, os galatos demonstraram ser ativos tanto contra microrganismos Gram-negativos, como Gram-positivo, independente da diferença da estrutura da parede celular de ambos.

A dinâmica de agrupamento do anel Z é um evento de extrema importância para a divisão celular. Acredita-se que a dinamicidade do anel Z seja regulada pela combinação de reguladores positivos (ZipA, SepF, etc) e negativos (EzrA, SulA, etc) para o agrupamento de protofilamentos de FtsZ (Singh et al ., 2007; Lowe et ., 2007; Singh et al ., 2008). Estes fatores são recrutados ao divisomo em diferentes períodos durante a divisão celular. Durante os estágios iniciais, os reguladores positivos promovem o agrupamento de FtsZ formando um arcabouço para o anel Z. Assim que os reguladores negativos são recrutados ao divisomo, o anel Z começa a se despolimerizar, seguido pela constrição da membrana e parede celular, levando a formação de duas células filhas. A estabilização dos protofilamentos de FtsZ pode ser inibida por substâncias que inibem a despolimerização do anel, inibindo a constrição do anel e consequentemente inibindo a divisão celular (Beuria et al., 2009).

Para estudar os efeitos das substâncias na formação do anel Z utilizamos uma linhagem de *B. subtilis* que expressava a fusão de FtsZ-YFP. Imediatamente após o tratamento a formação do anel Z foi drasticamente perturbada. Contudo, não observamos indícios de alteração na organização do nucleóide bacteriano, resultado este também obtido por outros inibidores de FtsZ na literatura (Jaiswal *et al.*, 2007; Beuria *et al.*, 2009). Além disso, o efeito causado por estas substâncias parece ser rápido pois além da disrupção ocorrer imediatamente após a adição dos mesmos, a proteína GFP-XacZapA que é recrutada ao divisomo em estágios precoces da divisão celular, foi completamente perturbada pelos galatos de alquila (Silva et al. 2013). No entanto, os *foci* de FtsZ ainda podem recrutar proteínas tardias como MinC. O sistema Min é um regulador espacial que inibe a polimerização de FtsZ. Localiza-se geralmente no meio da célula, chegando tardiamente, depois que a célula iniciou o processo de divisão ou pode ser encontrada nos pólos das células (Marston e Errington, 1999; Gregory *et al.*, 2008). Dentre as proteínas recrutadas precocemente ao divisomo e que recentemente demonstrou interagir diretamente com FtsZ está a MreB. E está interação é necessária para a constrição do anel Z (Fenton e Gerdes, 2013). MreB é um homólogo bacteriano da actina, é requerida para a manutenção do formato bacilar de bactérias, direção da síntese e inserção de novas unidades de peptidoglicano permitindo o crescimento no comprimento bacteriano (Figge *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010), além da manutenção da polaridade celular e participação da segregação cromossômica (Ebersbach e Gerdes; Graumann; Michie e Lowe; Shaevitz e Gitai; Shih e Rothfield). A interação de MreB e

FtsZ é necessária para a constrição do anel (Fenton e Gerdes, 2013). O tratamento com as substâncias demonstraram interferir na dinâmica de MreB desestabilizando a proteína, o que pode influenciar nos processos nos quais MreB participa.

No presente estudo, foi demonstrado que os galatos de alquila promoveram o agrupamento e a estabilidade dos protofilamentos de BsFtsZ. Recentes estudos indicaram que algumas das pequenas moléculas orgânicas tidas como inibidoras de FtsZ atuam inibindo a atividade GTPásica podendo algumas delas também atuar diminuindo (Keffer *et al.*; Plaza *et al.*; Stokes *et al.*; Ito *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2011) ou aumentando o agrupamento (Margalit *et al.*, 2004; Haydon *et al.*, 2008; Haydon *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2011) ou agregação (Anderson *et al.*; Jaiswal *et al.*, 2007) dos protofilamentos de FtsZ. Foi hipotetizado que os galatos de alquila possam inibir a dinâmica do anel Z promovendo uma hiperestabilização dos protofilamentos de FtsZ e esta estabilização pode ser direta ou por meio da inibição da ligação de reguladores negativos à FtsZ. Este mecanismo é similar ao mecanismo de ação de otba (Beuria *et al.*, 2009) e também de uma dos fármacos mais utilizadas na terapia anticâncer, o paclitaxel, que é conhecido por inibir a proliferação de células mamíferas perturbando o agrupamento das fibras do fuso mitótico promovendo o agrupamento da tubulina e estabilizando os microtúbulos (Jordan e Wilson). Dessa forma é possível concluir que os galatos de alquila são candidatos com grande potencial no combate não só ao cancro cítrico como também uma nova alternativa para antibióticoterapia tendo a maquinaria de divisão celular como ao menos um dos seus alvos.

Tabela 7. Resumo das atividades desempenhadas pelos galatos de alquila contra Xac

Substância	Inibição do crescimento	Impedimento de colonização do hospedeiro	Regressão do cancro	Aumento do tamanho celular	Disrupção do septo/centrômero	
					septo	centrômero
ácido gálico	–	–	–	–	–	–
galato de metila	+	–	–	+	–	–
galato de etila	+	–	–	+	–	–
galato de propila	+	–	–	+	–	–
galato de *i*-propila	+	–	–	+	–	–
galato de butila	+	+	+	–	–	–
galato de *i*-butila	+	+	+	–	–	–
galato de pentila	+	+	+	–	+	–
galato de hexila	+	+	–	+	+	+
galato de heptila	+	+	–	+	+	+
galato de octila	+	–	–	+	+	+
galato de nonila	+	+	–	+	–	–
galato de decila	+	–	–	+	–	+
galato de undecila	+	–	–	+	–	–
galato de dodecila	+	–	–	–	–	–
galato de tetradecila	–	–	–	–	–	–

6 CONCLUSÕES

1. O presente trabalho demonstrou que o galatos de alquila possuem atividade anti-bacteriana *in vitro*. Além disso, os valores de CIM estão relacionados com o tamanho da cadeia e, por conseguinte, com a lipofilicidade.
2. Alguns dos galatos de alquila tem habilidade de impedir completamente a colonização de Xac em seu hospedeiro.
3. Galatos de alquila induziram um significativo aumento no volume celular de Xac , assim como também promoveram a disrupção do septo e centrômero bacteriano em linhagens mutantes com marcadores fluorescentes..
4. A diferença de parede celular entre organismos Gram-positivos e negativos não influenciou no mecanismo de ação das substâncias, visto que elas também foram ativas contra *Bacillus subtilis*.
5. A localização de FtsZ foi rapidamente perturbada após o tratamento, sugerindo que as substâncias possam ter a maquinaria de divisão celular como alvo.
6. Os galatos de alquila interferem especificamente na dinâmica de polimerização de FtsZ, promovendo o agrupamento ou agregação dos protofilamentos, além de induzirem a a atividade GTPásica.
7. Estes resultados juntos sugerem que FtsZ seja um alvo dos galatos de alquila

7 REFERÊNCIAS BIBILOGRÁFICAS

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.

ADAMS, D. W. et al. Multiple effects of benzamide antibiotics on FtsZ function. **Mol Microbiol.,** v. 80, n. 1, p. 68-84. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07559.x. Epub 2011 Feb 15., 2011.

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. n. 1554-8937 (Electronic), 20121116 DCOM- 20130417

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.

AWASTHI, D.; KUMAR K FAU - OJIMA, I.; OJIMA, I. Therapeutic potential of FtsZ inhibition: a patent perspective. n. 1744-7674 (Electronic), 2011 2011.

BEALL, B.; LUTKENHAUS, J. Impaired cell division and sporulation of a Bacillus subtilis strain with the ftsA gene deleted. **J Bacteriol.,** v. 174, n. 7, p. 2398-403., 1992.

BEDENDO, I. **Manchas Foliares In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L**. Manual de Fitopatologia.: Agrono□mica Ceres. v1**:** 848-858. p. 1995.

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. ISSN 1365-3059. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02344.x >.

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. ISSN 0261-2194. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219407002980 >. Acesso em: 2008/5//.

BEHLAU, F. et al. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection,** v. 29, p. 300-305, 2010.

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. ISSN 1098-5336 (Electronic)

BELASQUE JR, J. Incidência de cancro cítrico aumenta 39% no Estado de São Paulo. 2012. Disponível em: < http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/incidencia-de-cancro-citrico-aumenta-39-no-estado-de-sao-paulo/13 >.

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.

BEURIA, T. K. et al. Promoting assembly and bundling of FtsZ as a strategy to inhibit bacterial cell division: a new approach for developing novel antibacterial drugs. **Biochem J,** v. 423, n. 1, p. 61-9, Oct 1 2009. ISSN 1470-8728 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19583568 >.

BI, E. et al. FtsZ and cell division. **Res Microbiol,** v. 142, n. 2-3, p. 249-52, Feb-Apr 1991. ISSN 0923-2508 (Print)

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. ISSN 0191-2917 Disponível em: < http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-89-0071 >.

BOYLE, D. S. et al. ftsW is an essential cell-division gene in Escherichia coli. **Mol Microbiol,** v. 24, n. 6, p. 1263-73, Jun 1997. ISSN 0950-382X (Print)

BREUSEGEM, S. Y.; CLEGG, R. M.; LOONTIENS, F. G. Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)4 DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. **Journal of Molecular Biology,** v. 315, n. 5, p. 1049-1061, 2/1/ 2002. ISSN 0022-2836. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002228360195301X >.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. Xanthomonas citri: breaking the surface. **Mol Plant Pathol,** v. 4, n. 3, p. 141-57, May 1 2003. ISSN 1364-3703 (Electronic)

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.

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

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. ISSN 1519-566X (print). Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2001000100009&lng=en >.

CHEN, J. C.; BECKWITH, J. FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during Escherichia coli cell division. **Mol Microbiol.,** v. 42, n. 2, p. 395-413., 2001.

CHEN, Y.; ERICKSON, H. P. Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. **J Biol Chem.,** v. 280, n. 23, p. 22549-54. Epub 2005 Apr 11., 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.

DAI, K.; LUTKENHAUS, J. ftsZ is an essential cell division gene in Escherichia coli. **J Bacteriol,** v. 173, n. 11, p. 3500-6, Jun 1991. ISSN 0021-9193 (Print)

DANIEL, R. A. et al. Characterization of the essential cell division gene ftsL(yIID) of Bacillus subtilis and its role in the assembly of the division apparatus. **Mol Microbiol,** v. 29, n. 2, p. 593-604, Jul 1998. ISSN 0950-382X (Print)

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., 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.

DOI, M. et al. Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of Escherichia coli cells. **J Bacteriol,** v. 170, n. 10, p. 4619-24, Oct 1988. ISSN 0021-9193 (Print)

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.

DOMINGUEZ-ESCOBAR, J. et al. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. n. 1095-9203 (Electronic), 20110708 DCOM- 20110719 2011.

DONOVAN, C. et al. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from Corynebacterium glutamicum. n. 1098-5530 (Electronic), 20100616 DCOM- 20100706 2010.

EBERSBACH, G.; GERDES, K. Plasmid segregation mechanisms. n. 0066-4197 (Print), 20051115 DCOM- 20060201

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.

FAWCETT, H. S.; BINTANCOURT, A. A. Observac□ões sobre as doenc□as dos citrus no Paraguay. **O Biológico,,** v. 6, p. 289–296, 1949.

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

FENTON, A. K.; GERDES, K. Direct interaction of FtsZ and MreB is required for septum synthesis and cell division in Escherichia coli. **The EMBO Journal,** v. 32, n. 13, p. 1953-1965, 2013. ISSN 1460-2075. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.129 >.

FIGGE, R. M.; DIVAKARUNI, A. V.; GOBER, J. W. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in Caulobacter crescentus. **Mol Microbiol,** v. 51, n. 5, p. 1321-32, Mar 2004. ISSN 0950-382X (Print)

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

GITAI, Z. et al. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. **Cell,** v. 120, n. 3, p. 329-41, Feb 11 2005. ISSN 0092-8674 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15707892 >.

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. **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. ISSN 0031-949X (Print)

0031-949X (Linking).

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

GRAUMANN, P. L. Cytoskeletal elements in bacteria. n. 0066-4227 (Print), 20070927 DCOM- 20071213

GREGORY, J. A.; BECKER, E. C.; POGLIANO, K. Bacillus subtilis MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. **Genes Dev,** v. 22, n. 24, p. 3475-88, Dec 15 2008. ISSN 0890-9369 (Print)

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.

GUNDOGDU, M. E. et al. Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. **Embo J.,** v. 30, n. 3, p. 617-26. doi: 10.1038/emboj.2010.345. Epub 2011 Jan 11., 2011.

GUZMAN, L. M.; BARONDESS, J. J.; BECKWITH, J. FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in Escherichia coli. **J Bacteriol,** v. 174, n. 23, p. 7716-28, Dec 1992. ISSN 0021-9193 (Print)

HALE, C. A.; DE BOER, P. A. Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in E. coli. **Cell.,** v. 88, n. 2, p. 175-85., 1997.

HAMOEN, L. W. et al. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. **Mol Microbiol,** v. 59, n. 3, p. 989-99, Feb 2006. ISSN 0950-382X (Print)

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

HAYDON, D. J. et al. Creating an Antibacterial with in Vivo Efficacy: Synthesis and Characterization of Potent Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ with Improved Pharmaceutical Properties. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 53, n. 10, p. 3927-3936, 2010/05/27 2010. ISSN 0022-2623. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jm9016366 >. Acesso em: 2014/03/21.

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. ISSN 1095-9203 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18801997 >.

HU, Z.; LUTKENHAUS, J. Topological regulation of cell division in E. coli. spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. **Mol Cell.,** v. 7, n. 6, p. 1337-43., 2001.

HU, Z. et al. The MinC component of the division site selection system in Escherichia coli interacts with FtsZ to prevent polymerization. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 96, n. 26, p. 14819-24., 1999.

ISHIKAWA, S. et al. A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in Bacillus subtilis. **Mol Microbiol,** v. 60, n. 6, p. 1364-80, Jun 2006. ISSN 0950-382X (Print)

ITO, H. et al. A 4-aminofurazan derivative-A189-inhibits assembly of bacterial cell division protein FtsZ in vitro and in vivo. **Microbiol Immunol.,** v. 50, n. 10, p. 759-64., 2006.

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.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. n. 1474-175X (Print), 20040401 DCOM- 20040525

KEFFER, J. L. et al. Chrysophaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria. n. 1464-3391 (Electronic), 20130820

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

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.

LAU, I. F. et al. Spatial and temporal organization of replicating Escherichia coli chromosomes. **Mol Microbiol,** v. 49, n. 3, p. 731-43, Aug 2003. ISSN 0950-382X (Print)

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. ISSN 0261-2194. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0261219490900389 >.

LEMON, K. P.; GROSSMAN, A. D. The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. **Genes Dev,** v. 15, n. 16, p. 2031-41, Aug 15 2001. ISSN 0890-9369 (Print)

LOCATELLI, C. et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chem Biol Interact.,** v. 181, n. 2, p. 175-84. Epub 2009 Jul 3., 2009.

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.

LUTKENHAUS, J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annu Rev Biochem.,** v. 76, p. 539-62., 2007.

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

LUTKENHAUS, J. F.; DONACHIE, W. D. Identification of the FTSA gene product. **Journal of Bacteriology,** v. 137, p. 1088–1094, 1979.

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.

MARSTON, A. L.; ERRINGTON, J. Selection of the midcell division site in Bacillus subtilis through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. **Mol Microbiol,** v. 33, n. 1, p. 84-96, Jul 1999. ISSN 0950-382X (Print)

MARTEYN, B. S. et al. ZapE Is a Novel Cell Division Protein Interacting with FtsZ and Modulating the Z-Ring Dynamics. **MBio,** v. 5, n. 2, 2014. ISSN 2150-7511 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24595368 >.

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.; LOWE, J. Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. n. 0066-4154 (Print), 20060607 DCOM- 20070205

MIGOCKI, M. D. et al. The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in Bacillus subtilis. **EMBO Rep.,** v. 3, n. 12, p. 1163-7. Epub 2002 Nov 21., 2002.

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.

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.; LUTKENHAUS, J. Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. **J Bacteriol,** v. 176, n. 9, p. 2754-8, May 1994. ISSN 0021-9193 (Print)

MUKHERJEE, A.; Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. **Embo J.,** v. 17, n. 2, p. 462-9., 1998.

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

NOVO, D. J. et al. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus. n. 0066-4804 (Print), 20000501 DCOM- 20000501

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.

PARK, Y. S. et al. Synthesis of (−)-Viriditoxin: A 6,6′-Binaphthopyran-2-one that Targets the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. **Angewandte Chemie International Edition,** v. 50, n. 16, p. 3730-3733, 2011. ISSN 1521-3773. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/anie.201007298 >.

PICHOFF, S.; LUTKENHAUS, J. Identification of a region of FtsA required for interaction with FtsZ. **Mol Microbiol.,** v. 64, n. 4, p. 1129-38., 2007.

PLAZA, A. et al. Chrysophaentins A-H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. n. 1520-5126 (Electronic), 20100630 DCOM- 20101001

PTACIN, J. L. et al. A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. **Nat Cell Biol,** v. 12, n. 8, p. 791-8, Aug 2010. ISSN 1476-4679 (Electronic)

RAI, D. et al. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **Biochem J.,** v. 410, n. 1, p. 147-55., 2008.

RASKIN, D. M.; DE BOER, P. A. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 96, n. 9, p. 4971-6., 1999.

ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrado de doenc□as dos citros**. FEALQ/FUNDECITRUS. Piracicaba, SP**:** 201 p. 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.

SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst Appl Microbiol,** v. 29, n. 8, p. 690-5, Dec 2006. ISSN 0723-2020 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17183629 >.

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. ISSN 0723-2020 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16104350 >.

SCHEFFERS, D. J. The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. **FEBS Lett,** v. 582, n. 17, p. 2601-8, Jul 23 2008. ISSN 0014-5793 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18588879 >.

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.

SCHOULTIES, C. L. et al. Citrus Canker in Florida. . **Plant Disease,** v. 71, p. p.388-395, 1987.

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. ISSN 0191-2917. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.340 >. Acesso em: 2014/03/19.

SEAB. **Secretaria do Estado de Agricultura e abastecimento do Paraná.** 2011.

SHAEVITZ, J. W.; GITAI, Z. The structure and function of bacterial actin homologs. n. 1943-0264 (Electronic), 20100902 DCOM- 20110105

SHIH, Y. L.; ROTHFIELD, L. The bacterial cytoskeleton. n. 1092-2172 (Print), 20060908 DCOM- 20061017

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.

STOKES, N. R. et al. Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. n. 0021-9258 (Print), 20051128 DCOM- 20060203

STORTS, D. R. et al. Overproduction and identification of the ftsQ gene product, an essential cell division protein in Escherichia coli K-12. **J Bacteriol,** v. 171, n. 8, p. 4290-7, Aug 1989. ISSN 0021-9193 (Print)

STRAHL, H.; HAMOEN, L. W. Membrane potential is important for bacterial cell division. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 27, p. 12281-6, Jul 6 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

STRICKER, J. et al. Rapid assembly dynamics of the Escherichia coli FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 99, n. 5, p. 3171-5. Epub 2002 Feb 19., 2002.

STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.,** v. 185, p. 60-89., 1990.

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

THANBICHLER, M.; SHAPIRO, L. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in Caulobacter. **Cell.,** v. 126, n. 1, p. 147-62., 2006.

UCCI, A. P. et al. Asymmetric chromosome segregation in Xanthomonas citri ssp. citri. **Microbiologyopen,** v. 3, n. 1, p. 29-41, Feb 2014. ISSN 2045-8827 (Electronic)

URGAONKAR, S. et al. Synthesis of antimicrobial natural products targeting FtsZ: (+/-)-dichamanetin and (+/-)-2' "-hydroxy-5' '-benzylisouvarinol-B. **Org Lett.,** v. 7, n. 25, p. 5609-12., 2005.

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

VOLLMER, W. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? **Appl Microbiol Biotechnol.,** v. 73, n. 1, p. 37-47. Epub 2006 Oct 6., 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, L.; LUTKENHAUS, J. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. **Mol Microbiol.,** v. 29, n. 3, p. 731-40., 1998.

WANG, S. et al. Actin-like cytoskeleton filaments contribute to cell mechanics in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2010. Disponível em: < http://www.pnas.org/content/early/2010/04/26/0911517107.abstractN2 - A filamentous cytoskeleton largely governs the physical shape and mechanical

properties of eukaryotic cells. In bacteria, proteins homologous to all three classes of eukaryotic cytoskeletal filaments have recently been discovered. These proteins are essential for the maintenance of bacterial cell shape and have been shown to guide the localization of key cell-wall-modifying enzymes. However, whether the bacterial cytoskeleton is stiff enough to affect the overall mechanical rigidity of a cell has not been probed. Here, we used an optical trap to measure the bending rigidity of live Escherichia coli cells. We find that the actin-homolog MreB contributes nearly as much to the stiffness of a cell as the peptidoglycan cell wall. By quantitatively modeling these measurements, our data indicate that the MreB is rigidly linked to the cell wall, increasing the mechanical stiffness of the overall system. These data are the first evidence that the bacterial cytoskeleton contributes to the mechanical integrity of a cell in much the same way as it does in eukaryotes. >.

WANG, X.; LUTKENHAUS, J. The FtsZ protein of Bacillus subtilis is localized at the division site and has GTPase activity that is dependent upon FtsZ concentration. **Mol Microbiol.,** v. 9, n. 3, p. 435-42., 1993.

WOLDRINGH, C. L. et al. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. **Res Microbiol.,** v. 142, n. 2-3, p. 309-20., 1991.

XIMENES, V. F. et al. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. **J Agric Food Chem,** v. 58, n. 9, p. 5355-62, May 12 2010. ISSN 1520-5118 (Electronic)

8 ANEXOS

Tabela A1. Relação de substâncias químicas utilizadas e respectiva atividade in vitro a partir do ensaio REMA.

Substância	Atividade *in vitro*
ácido gálico	+
galato de metila	+
galato de etila	+
galato de propila	+
galato de *i*-propila	+
galato de butila	+
galato de *i*-butila	+
galato de pentila	+
galato de hexila	+
galato de heptila	+
galato de octila	+
galato de nonila	+
galato de decila	+
galato de undecila	+
galato de dodecila	+
galato de tetradecila	-
pro-zer	+
pro-meti	+
pro-eti	+
pro-pro	+
pro-but	+
pro-pen	+
pro-hex	+
pro-hept	+
pro-oct	+
pro-non	+
pro-dec	+
pro-dod	-
pro-tet	-
pro-hed	-
pro-ocd	-
pro-ace	-

(Continua na próxima página)

Tabela A1. (Continuação)

Substância	Atividade *in vitro*
fer-zer	-
fer-meta	-
fer-metb	+
fer-eti	-
fer-proa	-
fer-prob	-
fer-isoa	-
fer-isob	+
fer-but	+
fer-pent	+
fer-hex	+
fer-hept	-
fer-oct	-
fer-ace	-
aci	-
met	+
eta	+
but	+
pen	+
hex	+
hept	-
oct	-
non	-
iso	+
2-chalc	-
23- chalc	-
25- chalc	+
34- chalc	-
chalc A	-
chalc-B	+
chalc-D	-
chalc-E	-
chalc-N	-
cin-met	-
cin-zer	-
apocin	+
querc	-

(Continua na próxima página)

Tabela A1. (Continuação)

cum-zer	-
cum-eti	-
sola-sodi	-
sola-magi	-
ac-cloro	-
ptero	-
ac-sina	+
ac-olea	-
acr-50H	-
acr30H	-
acr-5CH3	-
acr-3CH3	-
mf 2,5	-
m705.5	-
f3.5.3	-
rutina	-

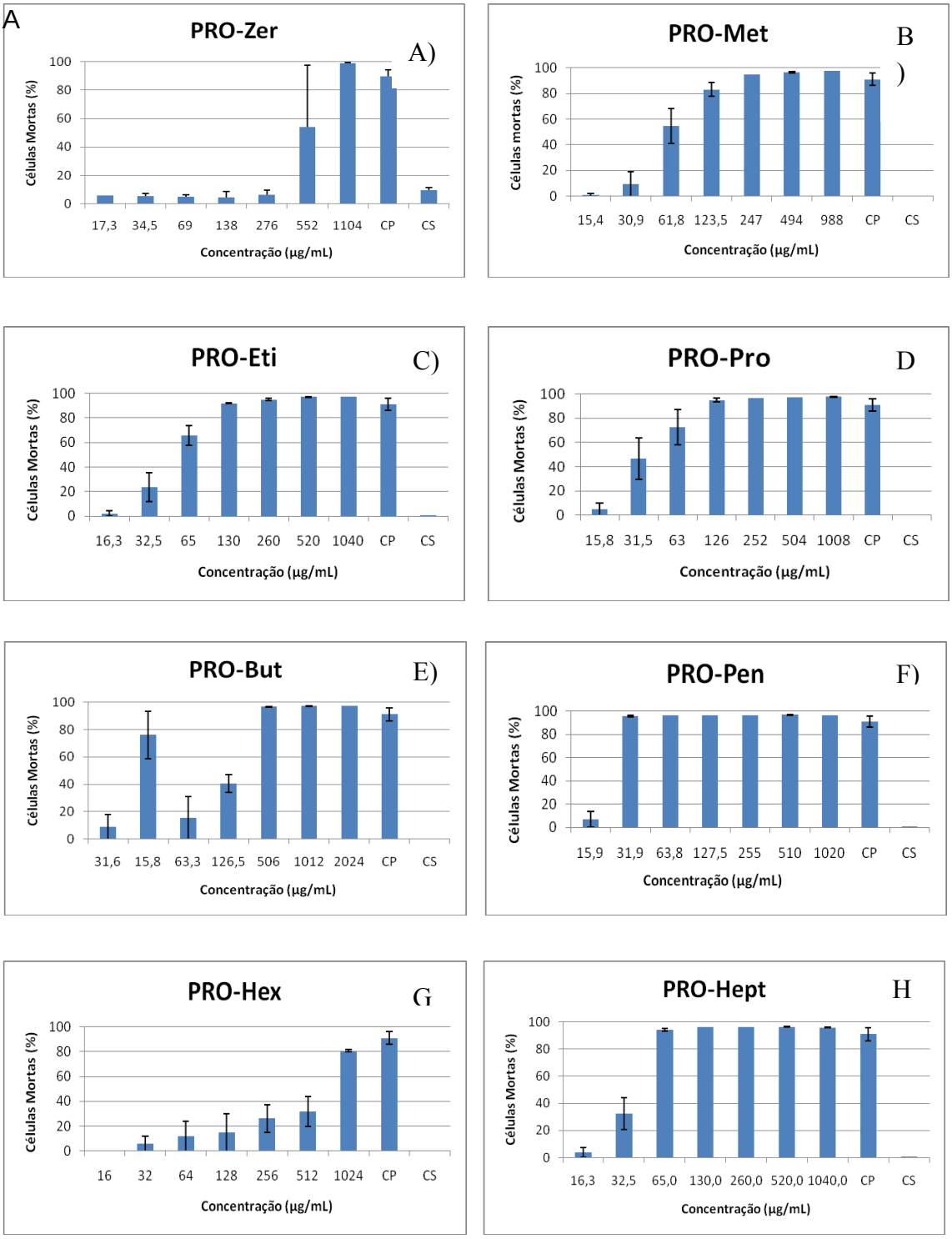


Figura A1. Avaliação de Inibição do crescimento utilizando o ensaio REMA. Porcentagem de células mortas. A) Pro-Zer, B) ProMet, C)Pro-Eti, D)Pro-Pro,. E)Pro-But, F)Pro-Pen, G) Pro-Hex, H) Pro-Hept. Controle Positivo, CP, kanamicina 15,6 µg ml^{-1};, CS, DMSO 1%.

(Continua na próxima página)

Figura A1. (Continuação)

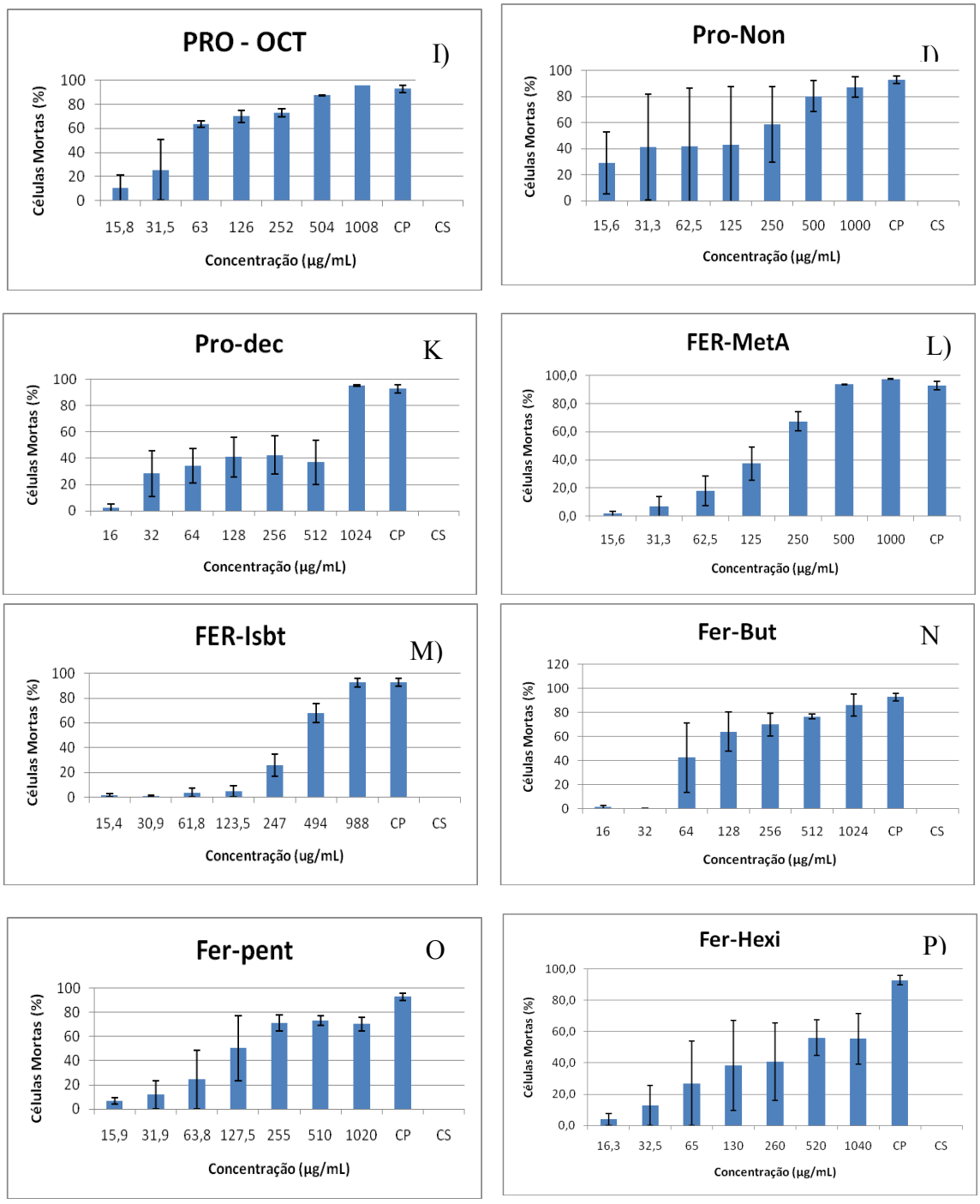


Figura A1. Avaliação de Inibição do crescimento utilizando o ensaio REMA. Porcentagem de células mortas. I) Pro-Oct, J) Pro-Non, K) Pro-Dec, L) Fer-MetA, M) Fer-Isbt, N) Fer-But, O) Fer-Pent, P) Fer-Hexi. CP: kanamicina 15,6 µg ml^{-1}; CS: DMSO 1%.

(Continua na próxima página)

Figura A1. (Continuação)

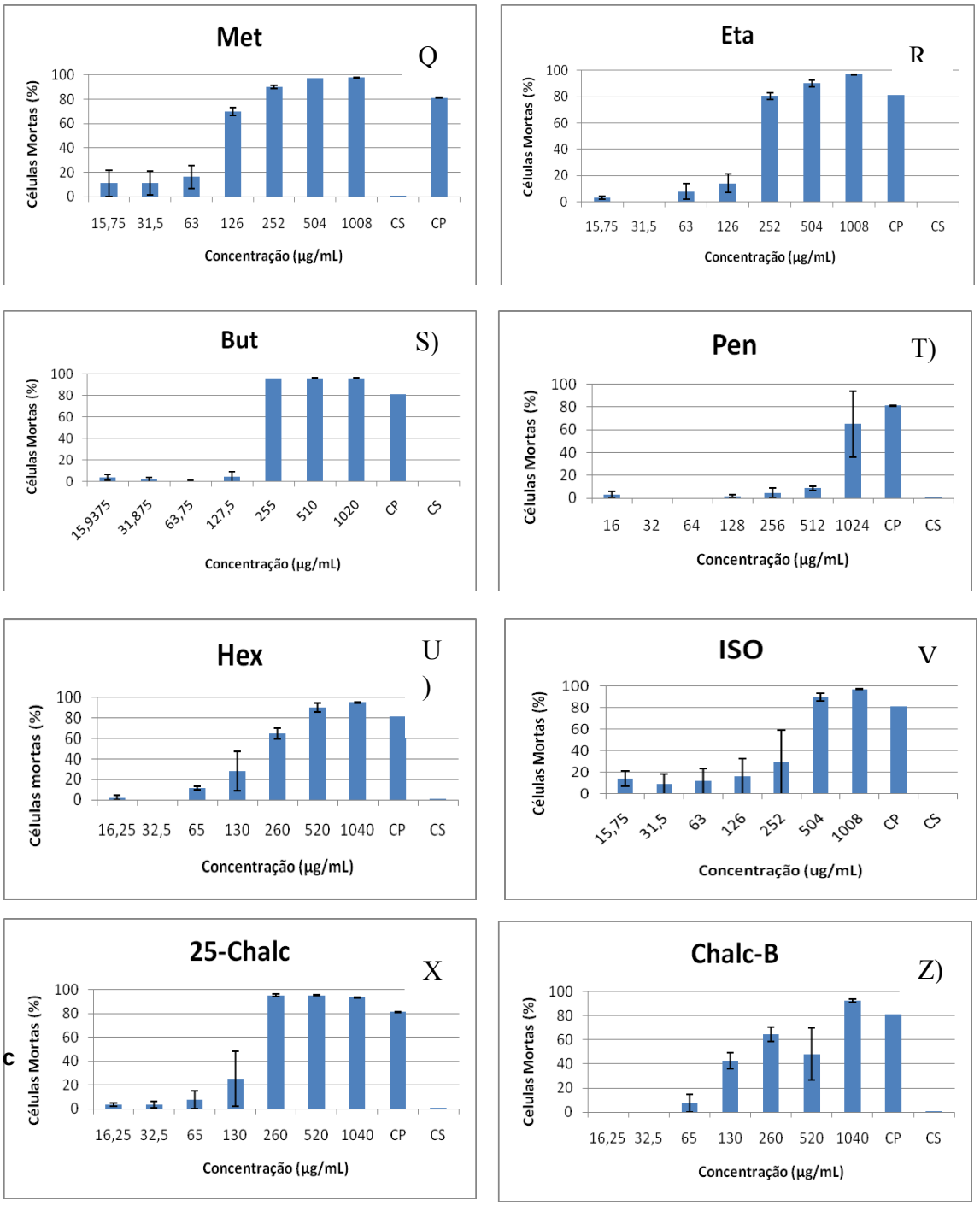


Figura A1. Avaliação de Inibição do crescimento utilizando o ensaio REMA. Porcentagem de células mortas. Q) Met, R) Eta, S) But, T) Pen, U) Hex, V) Isso, X) 25-Chalc, Z) Chalc-B. CP: kanamicina 15,6 µg ml^{-1}; CS: DMSO 1%.

(Continua na próxima página)

Figura A1. (Continuação)

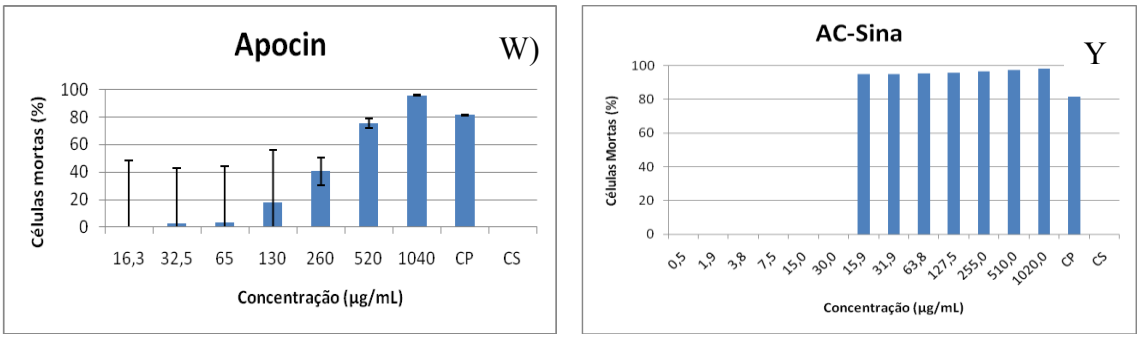


Figura A1. Avaliação de Inibição do crescimento utilizando o ensaio REMA. Porcentagem de células mortas. W) Apocin, Y) Ac-Sina. CP: kanamicina 15,6 µg ml^{-1}; CS: DMSO 1%.

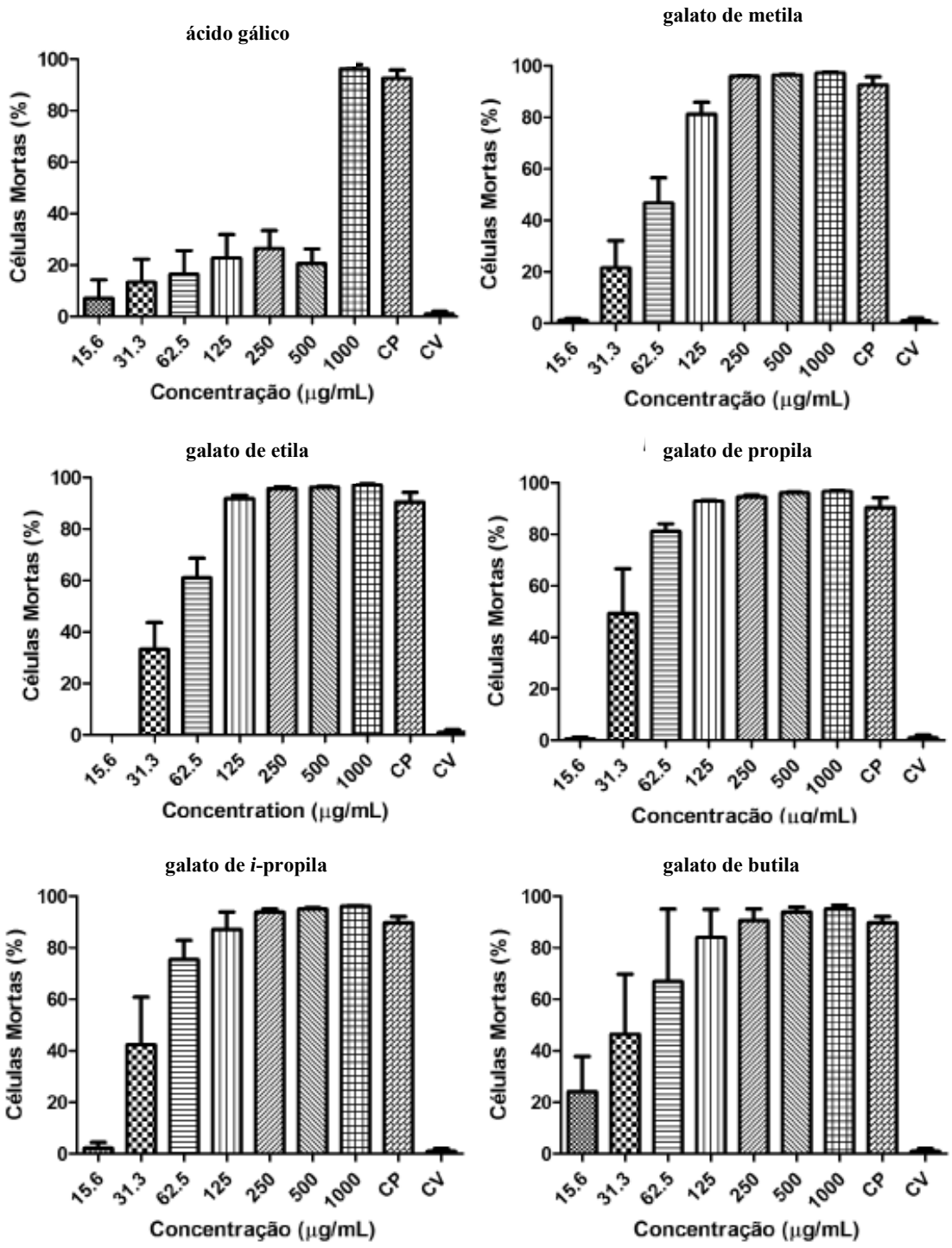


Figura A2. Galatos de alquila inibem crescimento bacteriano. A atividade antibacteriana dos galatos de alquila foi avaliada usando o ensaio REMA. Porcentagem de morte celular. Dados correspondem a média de três experimentos independentes (média ± erro padrão). CP, controle positivo (Kanamicina 15,6 μg ml^{-1}); CV, Controle de Veículo (DMSO 1%).

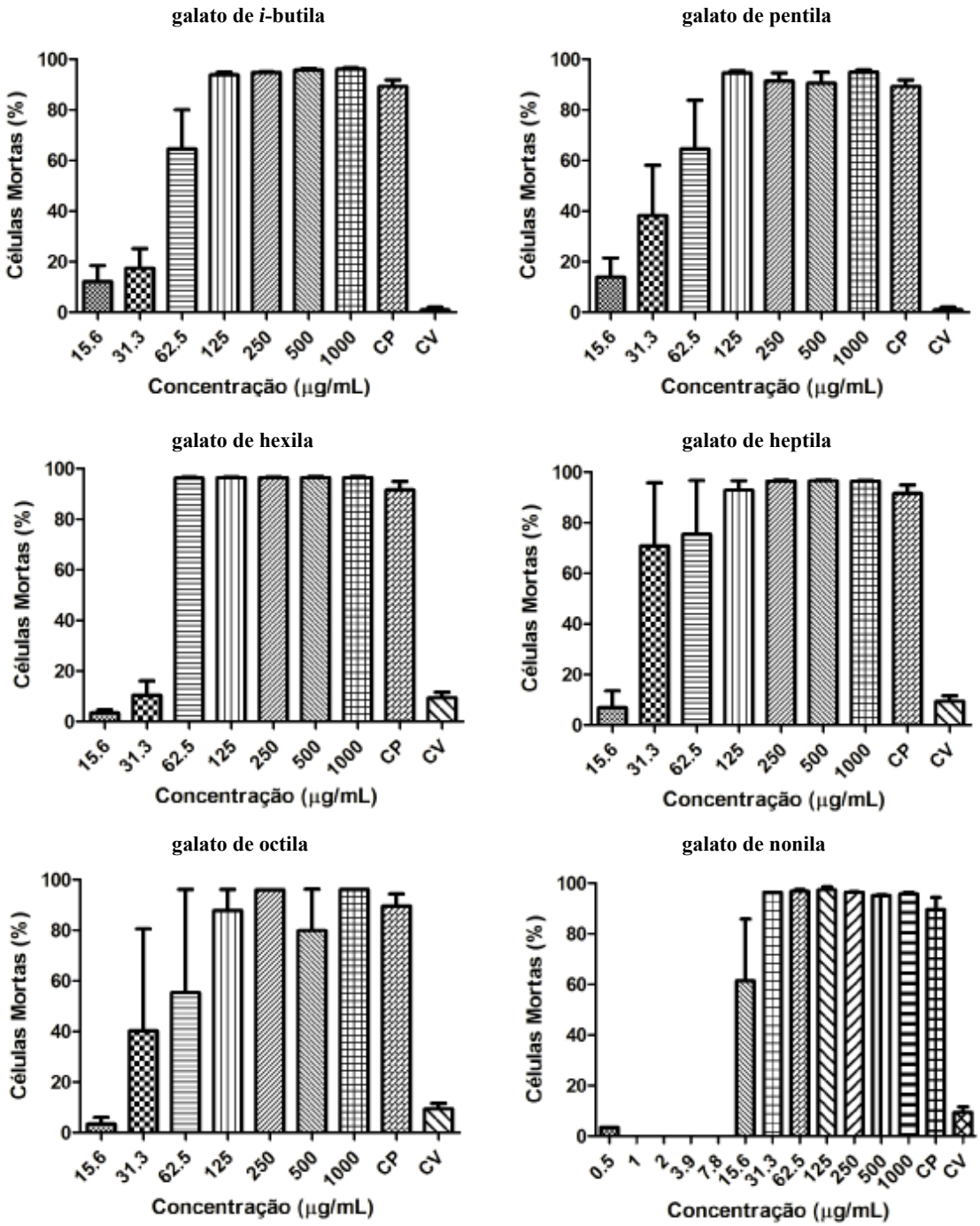


Figura A2. Galatos de alquila inibem crescimento bacteriano. A atividade antibacteriana dos galatos de alquila foi avaliada usando o ensaio REMA. Porcentagem de morte celular. Dados correspondem a média de três experimentos independentes (média ± erro padrão). CP, controle positivo (Kanamicina 15,6 μg ml^{-1}); CV, Controle de Veículo (DMSO 1%).

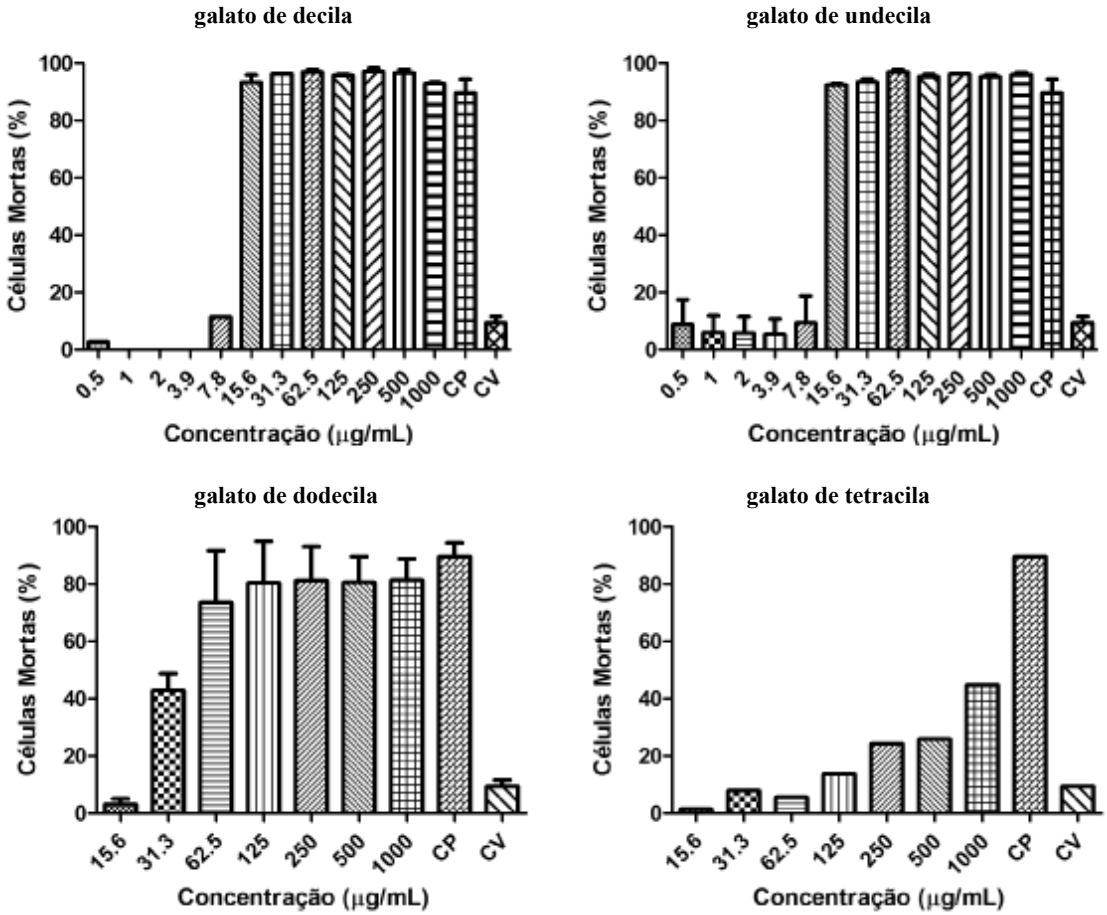


Figura A2. Galatos de alquila inibem crescimento bacteriano. A atividade antibacteriana dos galatos de alquila foi avaliada usando o ensaio REMA. Porcentagem de morte celular. Dados correspondem a média de três experimentos independentes (média ± erro padrão). CP, controle positivo (Kanamicina 15,6 µg ml^{-1}); CV, Controle de Veículo (DMSO 1%).

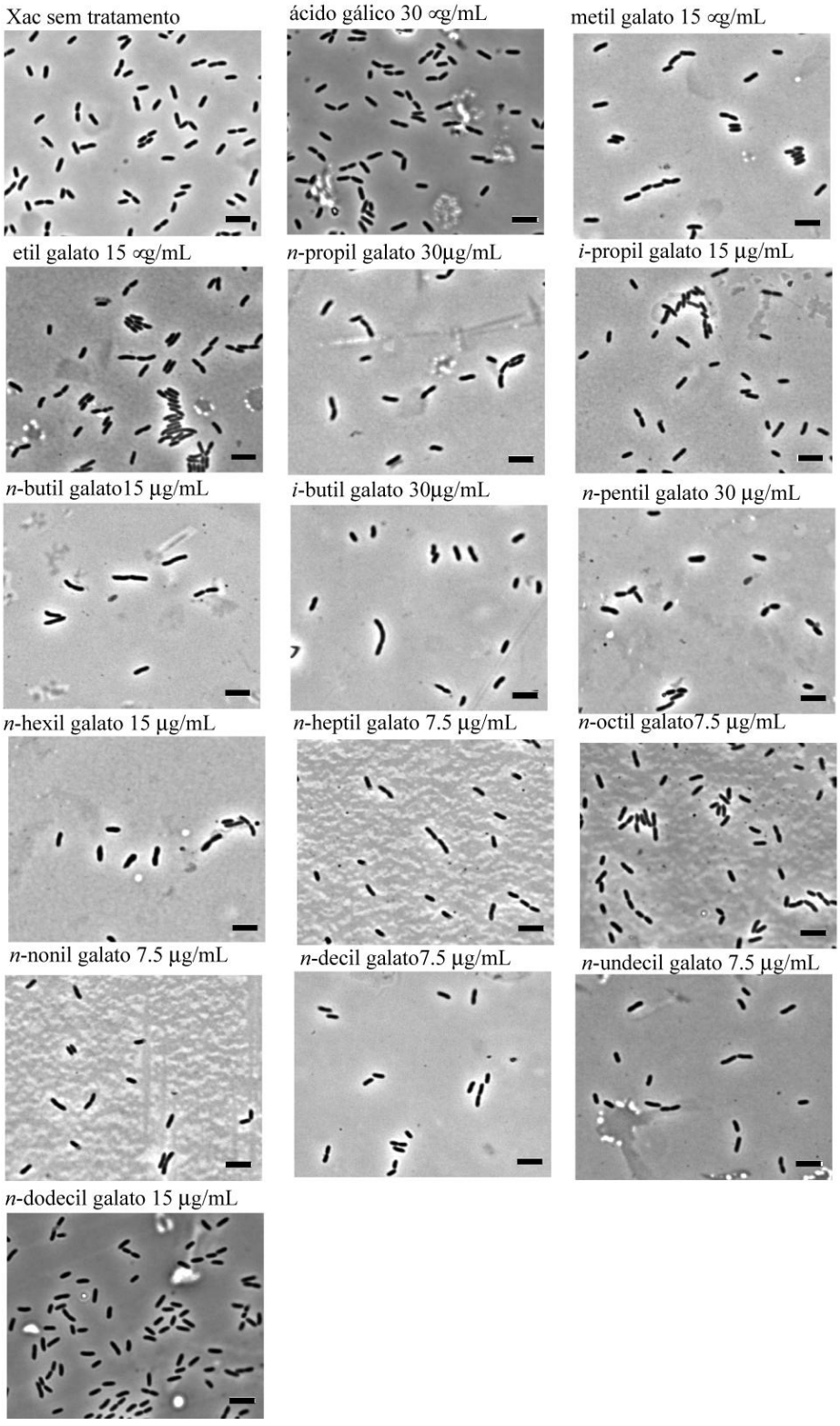


Figura A3. Morfologia Celular após tratamento com galatos de alquila. Xac Selvagem foi crescida a 30ºC até a D.O. 600nm ~ 0.3, então submetida a seis horas de tratamento com galatos de alquila. Células foram examinadas em lâminas cobertas com 1% agarose por microscopia de contraste de fase. Barra de escala: 4µm.Aumento of 100X.

Capítulo II

Artigo publicado

Journal of Bacteriology

Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against Xanthomonas citri subsp. *citri*

I. C. Silva, L. O. Regasini, M. S. Petrônio, D. H. S. Silva, V. S. Bolzani, J. Belasque Jr., L. V. S. Sacramento and H. Ferreira
J. Bacteriol. **2013, 195(1):85. DOI: 10.1128/JB.01442-12. Published Ahead of Print 26 October 2012.**

Updated information and services can be found at:
http://jb.asm.org/content/195/1/85

These include:

SUPPLEMENTAL MATERIAL Supplemental material

REFERENCES This article cites 50 articles, 12 of which can be accessed free at: http://jb.asm.org/content/195/1/85#ref-list-1

CONTENT ALERTS Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: **http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml**
To subscribe to to another ASM Journal go to: **http://journals.asm.org/site/subscriptions/**

Journals.ASM.org

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

JB
Journals.ASM.org

Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

I. C. Silva,[a] L. O. Regasini,[b] M. S. Petrônio,[b] D. H. S. Silva,[b] V. S. Bolzani,[b] J. Belasque, Jr.,[c] L. V. S. Sacramento,[d] H. Ferreira[a]

Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, Sao Paulo, Brazil[a]; Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Sao Paulo, Brazil[b]; Departamento Científico, Fundecitrus, Araraquara, Sao Paulo, Brazil[c]; Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, FCF, UNESP, Araraquara, Sao Paulo, Brazil[d]

The plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is the causal agent of Asiatic citrus canker, a serious disease that affects all the cultivars of citrus in subtropical citrus-producing areas worldwide. There is no curative treatment for citrus canker; thus, the eradication of infected plants constitutes the only effective control of the spread of *X. citri* subsp. *citri*. Since the eradication program in the state of São Paulo, Brazil, is under threat, there is a clear risk of *X. citri* subsp. *citri* becoming endemic in the main orange-producing area in the world. Here we evaluated the potential use of alkyl gallates to prevent *X. citri* subsp. *citri* growth. These esters displayed a potent anti-*X. citri* subsp. *citri* activity similar to that of kanamycin (positive control), as evaluated by the resazurin microtiter assay (REMA). The treatment of *X. citri* subsp. *citri* cells with these compounds induced altered cell morphology, and investigations of the possible intracellular targets using *X. citri* subsp. *citri* strains labeled for the septum and centromere pointed to a common target involved in chromosome segregation and cell division. Finally, the artificial inoculation of citrus with *X. citri* subsp. *citri* cells pretreated with alkyl gallates showed that the bacterium loses the ability to colonize its host, which indicates the potential of these esters to protect citrus plants against *X. citri* subsp. *citri* infection.

Brazil is the main producer of concentrate orange juice in the world. Exporting 98% of its production, Brazil holds the leading position in the orange juice business, representing 85% of the international market in this sector (1). Brazilian citriculture, an economic activity that generates over $2 billion/year in export revenues, contributes to more than half of the orange juice produced globally. Despite great success, the culturing of citrus faces constant threats such as diseases, which in the past decade forced the eradication of 40 million trees, resulting in the suppression of the spread of the disease.

Among the threats, citrus canker represents one of the most serious diseases of citrus, which is present in the main sweet-orange-producing areas of the world, the state of São Paulo, Brazil, and Florida. The etiological agent is the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (2). *X. citri* subsp. *citri* is responsible for Asiatic citrus canker, a severe form of the disease that affects all the commercially important citrus species and cultivars in use (reviewed in reference 3). Infected trees exhibit crater-like lesions on aerial tissues, and with time, infection decreases orange production. In susceptible citrus hosts and in the absence of disease control measures, it causes premature fruit drop, defoliation, and shoot dieback. *X. citri* subsp. *citri* penetrates the host plant by natural openings (stomata) and wounds (3). Bacteria spread in the orchards through the action of wind-blown rain, and the colonization of the leaf mesophyll is exacerbated by the concomitant presence of the citrus leaf miner *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) (4).

The state of São Paulo, which produces 75% of the oranges in Brazil, had the first official detection of *X. citri* subsp. *citri* in 1957 (5), and since then, it adopted a strict eradication program still considered the only effective strategy to avoid the advance of citrus canker in areas where it is not endemic (6). From 1999 until 2009, growers in the state of São Paulo were obligated to eliminate all the plants in an orchard if the incidence of symptomatic trees exceeded 0.5%; below this figure, the growers had to eradicate only the affected trees and the neighboring ones contained in a radius of 30 m. From mid-2009, the legislation in this state was relaxed, and only the 30-m radius is being applied. As a consequence, 6 months after the legislation change, the number of new cases of the disease increased 80%, and there is now a real risk of citrus canker becoming endemic in the state of São Paulo. Citrus canker is already endemic in other orange-planting areas in the south of Brazil. There, as well as in Argentina, producers use integrated management approaches such as the cultivation of less-susceptible citrus genotypes produced in *X. citri* subsp. *citri*-free nurseries, the planting of windbreaks as barriers against the spread of the disease, and the spraying of copper bactericides (7). These practices increase the cost of production and are not as effective as eradication to prevent new infections and the spread of *X. citri* subsp. *citri*; besides, copper sprays are known to leave residuals on fruits and soil, and the emergence of resistant strains is an issue (8). Current research is focused on developing new strategies to minimize losses and to make citriculture profitable. The use of a combination of disease control measures is recommended, which includes the induction of innate plant defenses (9, 10), the generation of more resistant citrus varieties (11, 12), and, perhaps, the

Received 9 August 2012 **Accepted** 19 October 2012
Published ahead of print 26 October 2012
Address correspondence to H. Ferreira, henrique.ferreira@linacre.oxon.org.
I.C.S. and L.O.R. contributed equally to this work.
Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/JB.01442-12.
Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/JB.01442-12

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â¢Ã‚Â€Ã‚Â¡ÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

development/amelioration of chemical inhibitors to fight the bacterium and yet display reduced environmental impacts.

Supporting this idea, we initiated a search for natural and synthetic compounds that are able to perturb the growth of *X. citri* subsp. *citri*. We evaluated the anti-*X. citri* subsp. *citri* activity of gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), an intermediate of the hydrolysable tannin biosynthesis pathway in plants (13–15) which, together with its natural and semisynthetic derivatives, has been associated with a broad spectrum of biological actions (16–21). Moreover, gallic acid and derivatives demonstrated antimicrobial properties. Octyl gallate exhibited fungicidal activity against *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* at any stage of their growth (22, 23). Leal et al. previously reported the potent fungitoxicity of nonyl gallate against yeasts, dermatophytes, and hialohyphomycetes (24). Lauryl gallate was found to show antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (25, 26).

Here we demonstrate that alkyl gallates are potent inhibitors of *X. citri* subsp. *citri*. The anti-*X. citri* subsp. *citri* activity of such compounds can be correlated with the size of their carbon side chain. We show evidence for the possible intracellular targets of these compounds, as bacteria treated with alkyl gallates exhibited a disruption of the divisional septum and/or the bacterial centromere. We also show that the treatment of the bacterium with selected alkyl gallates reduces viability and host infection and that these compounds may possess postinfection activity, indicating their potential for use in disease management.

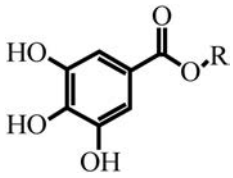
MATERIALS AND METHODS

Synthesis of the alkyl gallates. Synthetic esters of gallic acid were prepared as described previously, with minor modifications (16, 17). A 3.0-ml solution of *N*,*N*′-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1.0 mmol) in dried *p*-dioxane was added to a cooled (5°C) solution of 0.2 mmol gallic acid (Sigma) (compound 1) (Table 1) and 20 mmol alkyl alcohol in 6.0 ml of dried *p*-dioxane. After 48 h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was partitioned 3 times with ethyl acetate (EtOAc) and filtered. The filtrate was washed successively with a saturated aqueous citric acid solution (3 times) and saturated aqueous $NaHCO_3$ (3 times), dried over anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under reduced pressure. The crude products were purified over a silica gel column eluted with mixtures of hexanes and EtOAc, furnishing alkyl gallates (compounds 2 to 16) (Table 1). The molecular structures of these compounds were established by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectral analysis (16, 17).

Bacterial strains and media. Wild-type *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (2) strain 306 (IBSBF 1594), formerly designated *X. axonopodis* pv. *citri*, was used in the present work. The *X. citri* subsp. *citri* 306 mutant strains expressing green fluorescent protein (GFP)-ZapA (27) and ParB-GFP (A. P. Ucci and H. Ferreira, unpublished data) were *X. citri* subsp. *citri amy*::pPM2a-*zapA* and *X. citri* subsp. *citri parB*::pPM7g-*parB*, respectively. Cells were cultivated at 30°C under rotation (200 rpm) in LB/LB agar medium (28), and kanamycin was added, when required, at 15.6 μg/ml.

REMA. The resazurin microtiter assay (REMA) plate method was performed as previously described (29, 30), with modifications. Stock solutions of chemicals at 2 to 5 mg/ml were prepared by dissolving the alkyl gallates (dried-powder samples) in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (diluted in LB). Test suspensions of gallates were prepared by diluting the stock solutions in LB using a 2-fold scheme; after serial dilution, the most concentrated sample had ~1% DMSO (which did not alter *X. citri* subsp. *citri* growth in preliminary analyses) and an initial concentration of a given compound at 1,000 μg/ml. The concentration range prepared for each of the compounds was 15 to 1,000 μg/ml. In 96-well microtiter plates, 100 μl of each of the compound dilutions was added to a mixture of 90 μl of LB and 10 μl of bacterial inoculum (standardized to 10^5 CFU/well). The negative control consisted of 190 μl of LB and 10 μl of cell suspension; the positive control had the addition of kanamycin (15.6 μg/ml). Upon the incubation of the test plates at 30°C for 24 h, cell viability was determined by the addition of 15 μl of a 0.01% (wt/vol) resazurin solution to each of the wells, following an extra incubation period of 2 h at 30°C. Viable microorganisms reduced the blue dye to a pink color, which was detected by fluorescence scanning using a SPECTRAfluor Plus (Tecan) microfluorimeter set to an excitation/emission profile of 530 nm/590 nm. Three independent experiments were conducted, and the data were used to construct plots of chemical concentration versus cell growth inhibition in order to determine the MIC_{50} and MIC_{80}.

TABLE 1 Anti-*Xanthomonas citri* activities of gallic acid and alkyl gallates



Compound	Name	R[c]	MIC (μg/ml) (MIC in μM)	C log *P*[a]
1	Gallic acid	H	500 (2,940)	0.89
2	Methyl gallate	CH_3	62.5 (340)	0.92
3	Ethyl gallate	CH_2CH_3	62.5 (315)	1.27
4	*n*-Propyl gallate	$(CH_2)_2CH_3$	62.5 (295)	1.73
5	*i*-Propyl gallate	$CH(CH_3)_2$	62.5 (295)	1.55
6	*n*-Butyl gallate	$(CH_2)_3CH_3$	62.5 (276)	2.13
7	*i*-Butyl gallate	$CH_2CH(CH_3)_2$	62.5 (276)	1.95
8	*n*-Pentyl gallate	$(CH_2)_4CH_3$	31.2 (130)	2.53
9	*n*-Hexyl gallate	$(CH_2)_5CH_3$	31.2 (123)	2.92
10	*n*-Heptyl gallate	$(CH_2)_6CH_3$	31.2 (116)	3.32
11	*n*-Octyl gallate	$(CH_2)_7CH_3$	31.2 (110)	3.72
12	*n*-Nonyl gallate	$(CH_2)_8CH_3$	15.6 (53)	4.11
13	*n*-Decyl gallate	$(CH_2)_9CH_3$	15.6 (50)	4.51
14	*n*-Undecyl gallate	$(CH_2)_{10}CH_3$	15.6 (48)	4.90
15	*n*-Dodecyl gallate	$(CH_2)_{11}CH_3$	62.5 (185)	5.30
16	*n*-Tetradecyl gallate	$(CH_2)_{13}CH_3$	1,000 (2,732)	6.09
Kanamycin[b]			15.6 (32)	

[a] Theoretical lipophilicity (20).
[b] Positive control.
[c] R, radical.

Microscopy. Cells of wild-type and mutant strains of *X. citri* subsp. *citri* were treated with the alkyl gallates for 6 h at 30°C and immobilized on agarose-covered slides for observations by microscopy, as previously described (27). Cells were visualized by using an Olympus BX-61 microscope and documented with a monochromatic XM-10 camera. Image processing and analyses were conducted by using Cell-F (Olympus).

Pathogenicity tests. The host citrus used was cultivar Pera Rio of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), kept under greenhouse conditions at 25°C to 35°C. For the infiltration tests, *X. citri* subsp. *citri* cells were cultivated in LB until the optical density (OD) at 600 nm reached ~1; cells were diluted to 10^5 CFU/ml in LB and treated with the compounds at the MIC_{80} for 6 h at 30°C. After this period, cell suspensions were infiltrated on the abaxial surface of leaves by using hypodermic syringes. Symptoms were observed during the course of 3 weeks. All the tests were performed in triplicates.

For the postinfection test, *X. citri* subsp. *citri* cell suspensions were diluted to 10^8 CFU/ml in LB; leaves were inoculated by the puncture

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ†Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã¢Ã¢Â¢

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â¢Ã‚Â€Ã‚Â¡ÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â,Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

method, in which needles are rapidly immersed into the cell suspension following the perforation of the leaves from the abaxial surface. After the development of symptoms, in up to 4 weeks, ~5 μl of the compounds at 2 mg/ml was dropped onto the lesions, and exposure took place for 30 min at room temperature. Forty-eight hours after the treatment, lesions were removed individually from the leaves and macerated in 1 ml of 1× phosphate-buffered saline (PBS), and the number of viable cells in the suspensions was determined by plating onto NYG agar (5 g/liter peptone, 3 g/liter yeast extract, and 20 g/liter glycerol).

Statistics. Statistical analysis was performed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey posttest ($P < 0.05$). MIC values were determined by using logarithmic regression analyses.

RESULTS

Alkyl gallates inhibit *X. citri* subsp. *citri* growth. In order to evaluate the potential of alkyl gallates to inhibit the growth of *X. citri* subsp. *citri*, cells were cultivated and exposed to different concentrations of gallic acid (compound 1) (Table 1) and a collection of gallic acid alkyl esters (3,4,5-trihydroxybenzoates) (compounds 2 to 16), followed by an evaluation of their inhibitory activities using the REMA (see Fig. S1 in the supplemental material). In Table 1, we also summarize the MICs of these compounds, which were determined within the concentration range of 3.9 to 1,000 μg/ml. Of the 16 compounds tested, 14 alkyl gallates (compounds 2 to 15) were able to inhibit bacterial growth. Gallic acid itself was not active against *X. citri* subsp. *citri*, exhibiting an MIC of 500 μg/ml (2,940 μM). On the other hand, methyl gallate (compound 2) showed an MIC of 62.5 μg/ml (340 μM), which was approximately 8 times more potent than gallic acid (compound 1). This observation supported the idea that the esterification of the carboxyl group on gallic acid structure was an important criterion for the anti-*X. citri* subsp. *citri* activity, which encouraged us to further investigate other derivatives esterified with linear and ramified alcohols from C_2 to C_{14}. Among these, the compounds that carried side chains ranging from 9 to 11 carbon atoms (compounds 12 to 14) displayed the most potent activities against *X. citri* subsp. *citri*. Undecyl gallate (compound 14), for instance, showed a more prominent effect, with an MIC of 15.6 μg/ml (48 μM), which resembles the inhibitory activity of our positive control, kanamycin (MIC = 15.6 μg/ml, or 32 μM). Altogether, our results indicate a clear and positive correlation among MIC values, alkyl chain length, and lipophilicity.

Considering that lipophilicity is an important property for the development of bioactive compounds (31), the theoretical lipophilicity values of the alkyl gallates were expressed as calculated partition coefficients (C log *P*), as previously reported (20) (Table 1). By comparisons of the determined MIC values with the C log *P* values, we noticed that the anti-*X. citri* subsp. *citri* activity of the alkyl gallates was associated with their lipophilicity. Highly lipophobic gallates (compounds 2 to 7), which exhibit C log *P* values ranging from 0.92 to 1.95, as well as the highly lipophilic dodecyl gallate (compound 15) (C log $P = 5.30$) had an overall weak antibacterial effect. The anti-*X. citri* subsp. *citri* activity then increased in conjunction with an increase in the number of side-chain carbons until reaching a peak, here represented by undecyl gallate (compound 14) (C log $P = 4.90$). Subsequently, we documented a diminished effect for dodecyl gallate (compound 15) (C log $P = 5.30$), which preceded the approach of a cutoff represented by tetradecyl gallate (compound 16) (C log $P = 6.09$).

Finally, in order to test if the compounds had bacteriostatic or bactericidal activities, we attempted to propagate the cells in LB agar after the treatments. As a result, we could not detect cellular growth following treatment with chemicals in concentrations where the REMA indicated 100% inhibition; hence, we conclude that the alkyl gallates eliminated bacterial viability.

***X. citri* subsp. *citri* cells treated with alkyl gallates are unable to induce citrus canker lesions.** The colonization of the host is a vital process to the survival of any pathogen; therefore, we wanted to evaluate if the treatment of *X. citri* subsp. *citri* cells with the alkyl gallates would impair their ability to multiply in artificially inoculated plant tissues and to produce the typical symptoms of citrus canker. Leaves of sweet orange, cultivar Pera Rio, a susceptible host, were infiltrated with *X. citri* subsp. *citri* cell suspensions (10^5 CFU/ml) after treatment with the substances at the MIC_{80} and monitored for a period of 3 weeks in order to score for the appearance of symptoms. The reason for the use of the MIC_{80} was to ensure that after treatment, there would be enough live cells, although exposed to a fairly high concentration of the compounds, to be evaluated in their ability to colonize the host citrus.

The typical canker lesions induced by the untreated cells (control) can be characterized by hyperplasia and hypertrophy on the region of the inoculum, which is frequently surrounded by a chlorotic halo (Fig. 1A). Six of the substances tested (compounds 6 to 10 and 12) (Table 1) completely precluded the ability of *X. citri* subsp. *citri* to produce disease symptoms (Fig. 1B). Alkyl gallate compound 11, although active, induced only a partial reduction of the symptoms. The remaining chemicals did not induce any detectable alteration of the colonization/virulence phenotype of *X. citri* subsp. *citri*. Note that the infiltration of the compounds alone or with 1% DMSO did not produce any lesions on leaves. In addition, the treatment of *X. citri* subsp. *citri* with DMSO (without any alkyl gallate) did not reduce the virulence of the bacterium (Fig. 1A).

Irrespective of their mechanisms of action, alkyl gallate compounds 6 to 10 and 12 directly or indirectly impaired the ability of *X. citri* subsp. *citri* to colonize a susceptible host, demonstrating that these compounds confer substantial protection against *X. citri* subsp. *citri* infection. In order to evaluate their potential to heal diseased leaves, we treated citrus canker lesions individually with compounds 6 to 10 and 12 (Fig. 2). Host leaves were perforated with needles previously immersed in *X. citri* subsp. *citri* cell suspensions, and upon the appearance of symptoms, ~5 μl of alkyl gallate compounds 6 to 10 and 12 (at 2 mg/ml) was dropped onto the cankers. At 48 h posttreatment, alkyl gallates 6, 7, 9, 10, and 12 caused a significant reduction of the bacterial population inside the lesions. Compounds 6, 7, 10, and 12 showed a reduction of the bacterial count of practically 1 order of magnitude and were as effective on the lesions as the positive control, kanamycin (also at 2 mg/ml) (compare the log CFU/ml determined for the controls and DMSO-treated and untreated lesions with the ones for kanamycin and the compounds). Compound 9 was the most prominent of the alkyl gallates tested, showing a reduction of the bacterial population of almost 2 orders of magnitude. The only exception was compound 8, which was active at precluding host colonization and unable to act postinfection. Altogether, the data show the potential of alkyl gallates to treat affected plant tissues.

Alkyl gallates induce an increase in cell length. To investigate the possible mechanisms of action of the alkyl gallates, we studied the effects of these compounds on cell morphology. In these analyses, we looked for signs of division arrest and/or chromosome

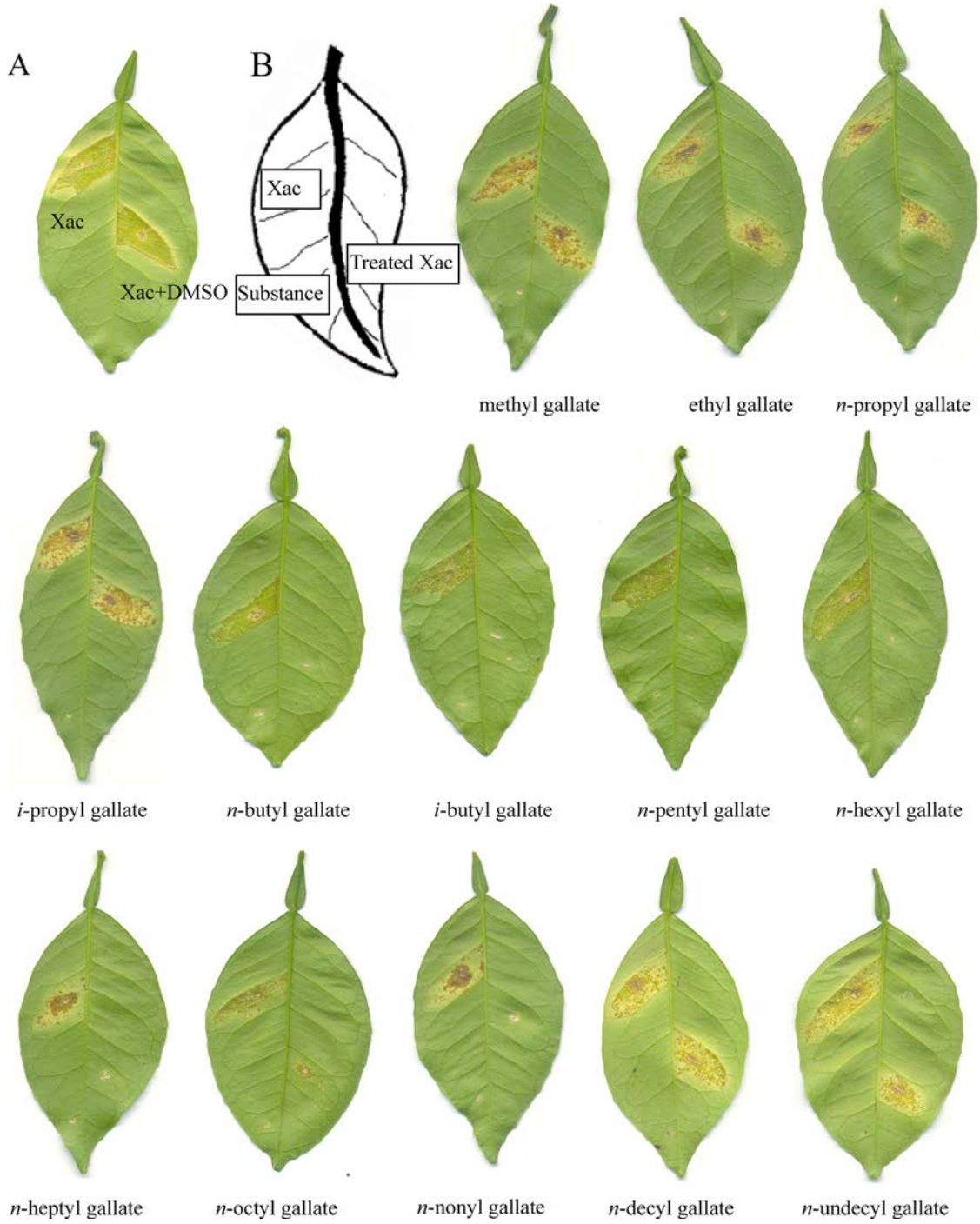


FIG 1 Effects of alkyl gallates on the ability of *X. citri* subsp. *citri* to induce citrus canker symptoms. Cells were subjected to treatment with the compounds at concentrations corresponding to the MIC_{80} for a period of 6 h and subsequently infiltrated into leaves of *Citrus sinensis* L. Osbeck (Pera Rio). (A) Leaf infiltrated with untreated *X. citri* subsp. *citri* cells and *X. citri* subsp. *citri* cells treated with the vehicle 1% DMSO. Results correspond to a period of 3 weeks of incubation. (B) Schematics of infiltration for the remaining leaves. Xac, untreated *X. citri* subsp. *citri* cells; Substance, alkyl gallate dissolved in 1% DMSO; Treated Xac, treated *X. citri* subsp. *citri* cells. The compounds used are indicated below each picture. Here we show a representative experiment from three independent tests.

segregation defects, which can normally be translated as increased-length and cell filamentation phenotypes.

Wild-type cells of *X. citri* subsp. *citri* were treated for 6 h with the 14 compounds for which we observed a concentration-response pattern in the REMA described above (compounds 2 to 15) (Table 1). The treatment of *X. citri* subsp. *citri* with the alkyl gallates generated aberrant phenotypes, such as cells showing septum misplacement, judged by the fact that constrictions were formed in places other than in the middle of the rod, and some rods with extremely increased cellular volumes (data not shown). Since

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚Â'ÃƒÂ‚Ã‚Â'ÃƒÂƒÃ¢â€šÃ¬Ã¢â€žÃ¢Â¡ÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

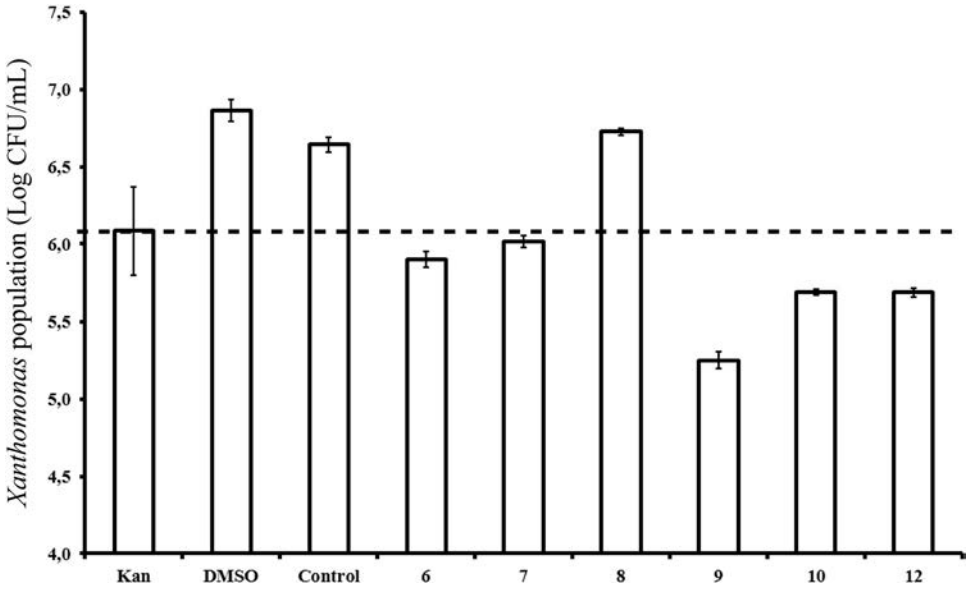


FIG 2 Bacterial population is reduced in lesions treated with the alkyl gallates. Lesions of citrus canker were treated with the alkyl gallates at 2 mg/ml for 30 min; 48 h after exposure to the compounds, lesions were removed individually from the leaves and macerated in 1× PBS, and the number of viable cells in the suspensions was determined by plating onto NYG agar. Each bar corresponds to the average of the bacterial population per milliliter (log CFU/ml) from 6 lesions per treatment (± standard deviations). Kan, kanamycin (2 mg/ml); DMSO (1%), vehicle in which the compounds were diluted; Control, untreated lesions.

these phenotypes were documented rarely following an exhaustive inspection of the samples, we decided to use a more tractable measurement to detect morphological variations. First, we performed pairwise visual comparisons of treated and untreated cells, which enabled us to detect alterations in cell length (see Fig. S2 in the supplemental material). Second, to facilitate the evaluations, we measured individually 100 cells for each concentration of the chemical compounds tested (the concentrations used for morphological analyses varied from 3.9 to 60 μg/ml, the last one being the maximum concentration for which we could detect cells under phase-contrast microscopy without the accumulation of cell debris). Measurements were performed in two independent experiments, giving a total of 200 cells, and used to calculate the average size of the cells (Table 2). Treatment with substances 2 to 5 and 9 to 14 led to a significant increase in the average cell size. For each value marked with an asterisk in Table 2, compare the value expressed as the average cell size for the internal experimental control (IC) (untreated *X. citri* subsp. *citri* cells) with that for treatment (note that each treatment had its own IC to avoid wrong estimates due to small fluctuations in cell size that may occur naturally; ICs were performed alongside and under the same conditions of treatment without the compounds). Alkyl gallates 6 to 8 and 15 were the only ones that did not differ statistically compared with their internal controls. Taken together, these results show that 10 out of 14 substances that inhibited the growth of *X. citri* subsp. *citri* in REMA (~72% of the alkyl gallate series) were able to induce morphological changes in this bacterium, detected as significant increases in cell length. The observation that *X. citri* subsp. *citri* continued to grow after treatment with the alkyl gallates argues against an inhibition of the transcription/translation processes in these cells, and it might be indicative of perturbations of other cellular processes, such as cell division and/or chromosomal segregation. On the other hand, compounds 6 to 8 and 15 might cause growth inhibition by acting on other targets.

Alkyl gallates may target the chromosome segregation and cell division machineries. As described above, we raised the possibility that some alkyl gallates could perturb the processes of cell division and/or chromosome segregation based on the observation that *X. citri* subsp. *citri* cells treated with these compounds exhibited an increased cell length. To further investigate this, we looked at the ability of such compounds to disrupt the centromere and/or septum structures with the help of fluorescent markers. Two *X. citri* subsp. *citri* mutant strains were used for these analyses: one was the *X. citri* subsp. *citri amy*::pPM2a-*zapA* mutant expressing extra copies of ZapA as GFP fusions (GFP-ZapA) (27),

TABLE 2 Morphological analysis of cells treated with the alkyl gallates[a]

Compound[b]	Avg cell length (μm) ± SD	
	IC[c]	Treated[d]
2	1.44 ± 0.31	1.74 ± 0.32*
3	1.44 ± 0.31	1.65 ± 0.65*
4	1.44 ± 0.31	1.57 ± 0.21*
5	1.44 ± 0.31	1.61 ± 0.28*
6	1.49 ± 0.23	1.52 ± 0.21
7	1.49 ± 0.23	1.47 ± 0.18
8	1.72 ± 0.3	1.85 ± 0.48
9	1.72 ± 0.3	1.97 ± 0.62*
10	1.39 ± 0.27	1.62 ± 0.3*
11	1.39 ± 0.27	1.71 ± 0.32*
12	1.39 ± 0.27	1.71 ± 0.38*
13	1.39 ± 0.27	1.6 ± 0.29*
14	1.52 ± 0.24	1.62 ± 0.32*
15	1.57 ± 0.29	1.60 ± 0.30

[a] $n = 200$. Data correspond to averages ± standard deviations.
[b] Numbers correspond to the numbers shown in Table 1.
[c] Average length of the internal control (IC) (untreated cells).
[d] Cells were treated for 6 h at 30°C. *, $P < 0.05$ by one-way ANOVA with a Tukey posttest.

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚Â'ÃƒÂ‚Ã‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â¢Ã‚Â€Ã‚Â¡ÃƒÂ‚Ã‚Â,Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

and the other was the *X. citri* subsp. *citri parB*::pPM7g-*parB* mutant, which expresses ParB-GFP alongside the native ParB proteins (A. P. Ucci and H. Ferreira, unpublished).

ZapA is a conserved bacterial factor that acts as a positive regulator of the cell division protein FtsZ (32). Considering that the site of ZapA action is right at the site of Z-ring formation, GFP-ZapA constitutes an excellent septum marker. In order to evaluate if the alkyl gallates could perturb septum assembly, we subjected *X. citri* subsp. *citri amy*::pPM2a-*zapA* cells to treatment with the compounds that induced altered cell morphology (compounds 2 to 5 and 9 to 14) (Table 1). Normally growing *X. citri* subsp. *citri amy*::pPM2a-*zapA* cells, or even cells treated with the vehicle 1% DMSO, exhibited the standard GFP-ZapA localization pattern, which corresponds to a fluorescent septum between dividing rods (Fig. 3A, arrows). When the cells were exposed to the alkyl gallates, compounds 9, 10, and 11 induced a complete disruption of the septa (Fig. 3B), where the GFP-ZapA fluorescence signal was dispersed throughout the cytoplasm. Note that treatment with some compounds (e.g., alkyl gallate 11) induced an apparent contraction of the cytoplasmic content in a few cells (Fig. 3B, asterisks). Only cells with a normal aspect (Fig. 3B, black and white crosses) were considered in our analyses. The time course of exposure/documentation was 6 h of total exposure with observations every 30 min; all the compounds mentioned above disrupted the septum within the first 30 min. As usual for a division arrest phenotype, the cells treated with alkyl gallates 9, 10, and 11 continued to grow (see above), which indicates that they are metabolically active but not dividing normally.

Given the fact that, by REMA, we noticed a clear peak of anti-*X. citri* subsp. *citri* activity around compound 13, which could be related to its carbon side chain, we wondered if it was possible to extend our window of compounds targeting the septum by evaluating alkyl gallates with shorter carbon side chains as well. As a result, we found that compound 8 was also able to disrupt the septal structure (Fig. 3B), even though this substance did not promote any significant alteration in cell length (see above).

Rod elongation may also occur in response to chromosome segregation defects, and in this sense, the ParB-GFP/DNA complex, which is known to form a centromere-like structure in bacteria, may serve as a marker for the disruption of the segrosome (the chromosome segregation machinery). The bacterial centromere is constituted by ParB bound to DNA at specific *cis*-acting elements (*parS*) located around the origin of replication of the chromosomes (e.g., *Bacillus subtilis* [33]). As proposed previously, ParB functions by interacting with other cellular factors to facilitate chromosome partitioning toward the polar regions, enabling cell division to proceed (34–36). Thus, ParB-GFP colocalizes with the origins, and the centromere structure formed can be seen by fluorescence microscopy as two foci, each close to a cell pole (37, 38). *X. citri* subsp. *citri* also exhibits a ParB-GFP localization profile (Fig. 4A, arrows) (Ucci and Ferreira, unpublished) that resembles the ones documented previously for *B. subtilis* and, perhaps, *Caulobacter crescentus* (37–39). Upon treatment with the alkyl gallates, we found that four substances (compounds 9 to 11 and 13) (Table 1) showed activity against the ParB-GFP/DNA complex (Fig. 4B). The time course of treatment showed that this complex is fairly stable, taking an average of 4 h to be disrupted by the compounds (the equivalent of two doubling times for *X. citri* subsp. *citri*). This is consistent with the observation that in *B. subtilis*, Spo0J-GFP (a ParB-like protein) can be seen throughout

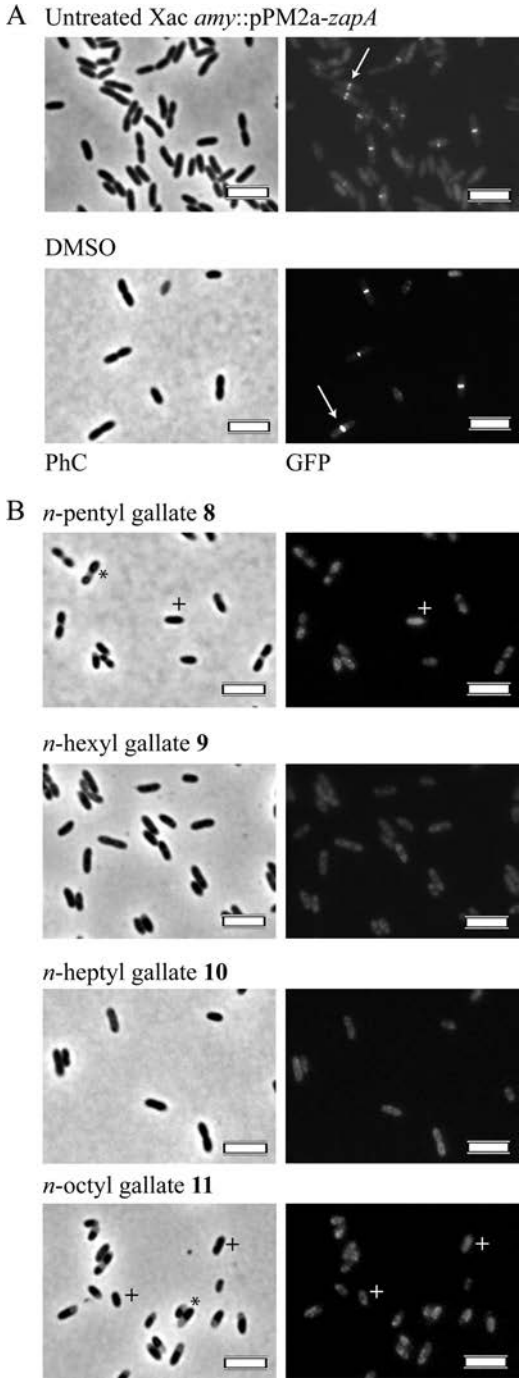


FIG 3 Alkyl gallates disrupt the divisional septum of *X. citri* subsp. *citri*. Mutant cells of *X. citri* subsp. *citri* expressing GFP-ZapA were cultivated until the OD at 600 nm reached ~0.3 and then subjected to treatments with the alkyl gallates at concentrations corresponding to the MIC_{50}. The presence or absence of GFP-ZapA septal labeling was monitored by fluorescence microscopy after 30 min of exposure to the alkyl gallates. (A) Cells cultivated in the absence (untreated) or in the presence of 1% DMSO. Septa are marked with arrows. (B) Cells treated with the alkyl gallates (we show only data for the compounds that perturbed septa). Note that in our analyses, we excluded cell types which resembled the ones labeled with asterisks and considered those similar to the ones marked with crosses. DMSO, vehicle in which substances were dissolved; PhC, phase-contrast microscopy. The scale bars correspond to 4 μm. Magnification, ×100.

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚Â'Ã‚Â'ÃƒÂƒÃ‚Â¢Ã‚Â€Ã‚Â¡ÃƒÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ‚ÂƒÃ‚Â‚Ã‚ÂƒÃ‚Â‚Ã‚ÂƒÃ‚ÂƒÃ‚Â¢Ã‚Â€Ã‚Â¡Ã‚ÂƒÃ‚Â‚Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

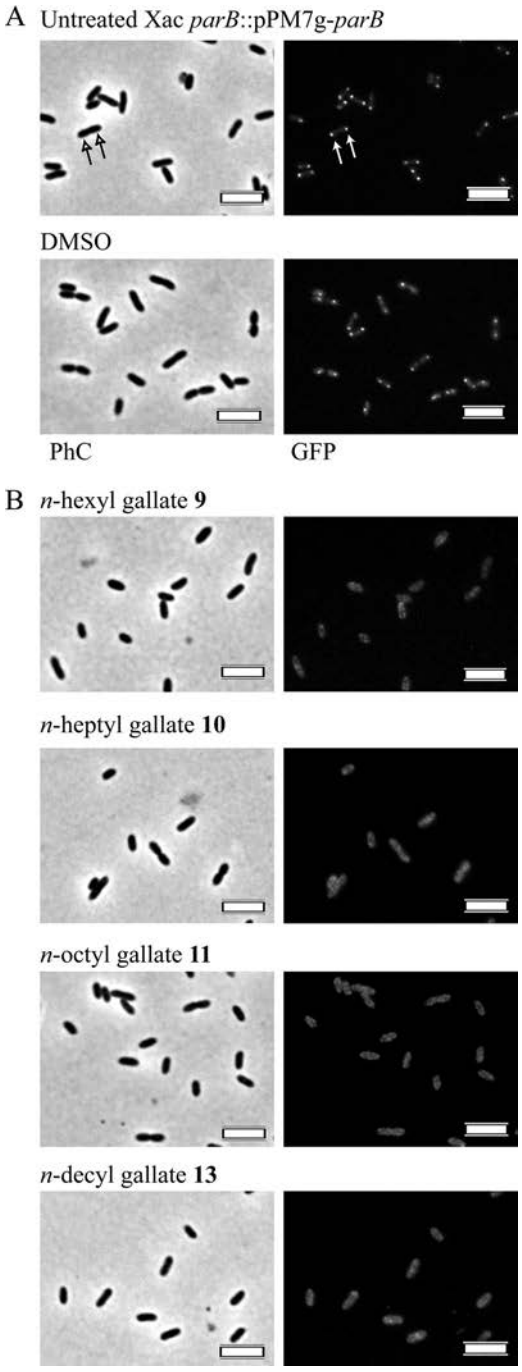


FIG 4 Alkyl gallates target the centromere of *X. citri* subsp. *citri*. *X. citri* subsp. *citri* mutants expressing ParB-GFP were cultivated until the OD at 600 nm reached ~0.3 and then treated with the alkyl gallates at the MIC_{50} for a period of 6 h at 30°C. The presence or absence of ParB-GFP foci was monitored by fluorescence microscopy every 30 min from the start of exposure to the compounds and documented after 2 h. (A) Cells cultivated in the absence (untreated) or in the presence of 1% DMSO. The ParB-GFP signal is marked with white arrows on the GFP panel. (B) Cells exposed to the alkyl gallates. Data are relative only to compounds that disrupted the centromere. DMSO, vehicle in which substances were dissolved; PhC, phase-contrast microscopy. The scale bars correspond to 4 μm. Magnification, ×100.

TABLE 3 Summary of the activities displayed by alkyl gallates against *X. citri* subsp. *citri*

Compound	Presence of activity				
	Growth inhibition	Impairs host colonization	Increases cell length	Septum/centromere disruption	
				Septum	Centromere
1	−	−	−	−	−
2	+	−	+	−	−
3	+	−	+	−	−
4	+	−	+	−	−
5	+	−	+	−	−
6	+	+	−	−	−
7	+	+	−	−	−
8	+	+	−	+	−
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	−	+	+	+
12	+	+	+	−	−
13	+	−	+	−	+
14	+	−	+	−	−
15	+	−	−	−	−
16	−	−	−	−	−

the cell cycle, and occasionally, a Spo0J-GFP focus splits into two, which happens when an origin of replication fires (40). When we compared the pictures taken using phase-contrast microscopy with the GFP ones after treatment with the alkyl gallates, we saw that cells looked fairly normal, although enlarged, but without a clear sign of death and/or an accumulation of inclusion bodies. Our results indicate an action of the alkyl gallates on the centromere complex instead of a simple aggregation of ParB-GFP in *X. citri* subsp. *citri* cells.

Among the four compounds that disrupted the septum (compounds 8 to 11), three also acted on the centromere (compounds 9 to 11), which raises the possibility that they may target a factor(s) or system(s) that is common to both processes of chromosome segregation and cell division.

DISCUSSION

The plant pathogen *Xanthomonas citri* is the causal agent of citrus canker, a severe disease that affects cultivars of citrus worldwide and represents a major threat to one of the most important economic activities in Brazil. The eradication of entire orchards of trees infected by *X. citri* subsp. *citri* is the only effective control to prevent the spread of the disease to new areas; however, the obligation to do so based on legal governmental actions has led to many disputes, generating too much discontent, especially among orange growers (3). Citriculture in the largest orange-producing area in the world, the state of São Paulo, Brazil, seems to be shifting from eradication to an integrated management system (7), where any help to control citrus canker will make a difference. Here we show the potential use of alkyl gallates to prevent *X. citri* subsp. *citri* growth and dissemination, and in addition, some of the compounds tested displayed an ability to reduce the bacterial population within lesions of diseased leaves. The compiled activities of gallic acid and the alkyl gallates against *X. citri* subsp. *citri* are summarized in Table 3. The colorimetric REMA indicated that the alkyl gallates are potent anti-*X. citri* subsp. *citri* agents exhibiting MICs comparable to those of our positive control, kanamycin

(<50 μg/ml). Furthermore, our data are in agreement with data from many other studies of homologous series (41–43) showing that the biological behavior of the alkyl gallates could be correlated with the cutoff phenomenon, which has frequently been attributed to their amphiphilic properties. Structurally, the amphiphile of the alkyl gallates is associated with the presence of two groups, phenolic hydroxyls (hydrophilic moiety) and an alkyl side chain (lipophilic tail). Therefore, we believe that the length of the carbon side chain determines the release of the bioactive portion of the alkyl gallates (the gallic acid unit) inside the cells.

At present, the only substances used in the field to confer some degree of protection against *X. citri* subsp. *citri* are copper-based formulations. Copper sprays confer a relative control of citrus canker, reducing new infections on young, immature plant tissues (leaves, stems, and fruits) (44, 45). The toxic effect of copper against *X. citri* subsp. *citri* takes place only at the plant surface, without any internal and/or systemic action (46). As a consequence, infected tissues may act as a source of bacterial inoculum, even though plants receive frequent sprays of copper formulations (44, 46). Although useful and frequently applied in agriculture, copper accumulates in the environment and may lead to the development of copper-resistant bacterial populations (46, 47). Here we showed that the exposure of *X. citri* subsp. *citri* cells to alkyl gallates (compounds 6 to 12, except compound 11) (Table 3) prevents the pathogen from colonizing and/or inducing citrus canker symptoms *in planta*, which has a potential disinfectant action. To our knowledge, this is the first report showing the effect of organic compounds against *X. citri* subsp. *citri*. Moreover, the treatment of citrus canker lesions on the leaves of a susceptible host with alkyl gallates 6, 7, 9, 10, and 12 impaired the proliferation of the pathogen within the plant tissue. Further analyses are now required in order to evaluate the leaf surface retention and subsequent penetrability of the compounds into the mesophyll, which are important measures to judge their efficacy in the field.

There have been several reports in the literature of cell division inhibitors that were identified and/or developed based on assisted screenings for natural, semisynthetic, and synthetic compounds that are able to disrupt FtsZ function in bacteria (for a comprehensive review, see reference 48). Several of these compounds have been included in patent-claiming processes, since cell division has become one of the ideal targets for the development of antibacterial agents. What supports this view is the fact that protein factors that operate on bacterial cell division, an essential process for life, are in general unique to *Bacteria*. Moreover, these factors are widespread and conserved among this domain of life, and for those proteins which show some degree of homology to eukaryotic counterparts (e.g., bacterial FtsZ and eukaryotic tubulins [49, 50]), there are still considerable differences among them to allow for the development of bacterium-specific inhibitors. Here we found that compounds 8 to 11 were able to disrupt septum formation in *X. citri* subsp. *citri* (Table 3). Moreover, we demonstrated that *X. citri* subsp. *citri* cells treated with such substances were unable to colonize the host citrus, which showed their potential to protect against this plant pathogen. At the moment, it remains unknown whether the disappearance of the septum induced by these compounds was a direct effect on FtsZ or indirect by targeting any of the other cell division proteins that are recruited to the Z ring during cytokinesis (51). Future experiments to assess the direct action of alkyl gallates on FtsZ are needed and will be carried out shortly.

Three out of the four gallates that disrupted the septum also targeted the centromere of *X. citri* subsp. *citri* (compounds 9 to 11) (Table 3). To show this, we used an *X. citri* subsp. *citri* mutant strain expressing ParB-GFP (Ucci and Ferreira, unpublished) in which the ParB-GFP/DNA complex (the bacterial centromere) has an easily recognizable localization pattern of 2 foci per rod, each occupying a region close to a cell pole (Fig. 4). Upon treatment with alkyl gallates 9 to 11, the two discrete centromere foci disappeared, and only dispersed fluorescence could be detected within the cells. This observation raised the possibility that a factor/system common to both chromosome segregation and cell division could be the real target for these compounds in *X. citri* subsp. *citri*. Chromosome segregation and cell division are two essential and interlinked processes in bacteria (34, 52, 53). Direct links between components of the two processes (e.g., FtsZ and ParB via an FtsZ inhibitor such as MipZ in *C. crescentus*) have been demonstrated (34, 36). Curiously, we found recently that *X. citri* subsp. *citri* has an overall chromosome segregation/cell division scheme that resembles what was proposed previously for the model *C. crescentus* (54; Ucci and Ferreira, unpublished). In the latter, the correct site for septum assembly within the cell is defined by the action of MipZ, which in turn has its localization dependent on the centromere (ParB/DNA) complex. The disruption of MipZ and/or the centromere function leads to a cell division defect in *C. crescentus* (34). Finally, cytoskeletal proteins, such as the actin-like protein MreB, contribute to chromosome partitioning in bacteria (55). Based on these observations, we speculate that compounds 9 to 11 may disrupt cell division by targeting the chromosome segregation machinery of *X. citri* subsp. *citri*, which also requires further investigation.

The present study shows that the alkyl gallates could be grouped according to two main different biological profiles, which probably reflect their actions on distinct targets. The first group is represented by those compounds that induced altered cell morphology (compounds 2 to 5) (Table 3), but they were unable to interfere with host colonization; furthermore, they showed no detectable influence on the processes of chromosome segregation and/or cell division. The second group (compounds 9 to 11) precluded the ability of *X. citri* subsp. *citri* to colonize the host citrus, where chromosome segregation and cell division were implicated as the intracellular targets for such compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

I.C.S. received a Ph.D. scholarship from FAPESP (2010/02667-4). This work was supported by FAPESP research grants 2004/09173-6, 2010/05099-7, and 2011/07458-7.

We thank Dirk-Jan Scheffers and Franklin Behlau for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. **Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki RB.** 2010. O retrato da citricultura brasileira, vol 1. Marcos Fava Neves, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil.
2. **Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK.** 2005. 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*

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ†Ã'ÃƒÂ‚Ã†Ã'ÃƒÂƒÃ†Ã¢Â€Â¡ÃƒÂ‚Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ†Â'ÃƒÂ‚Ã†Â'ÃƒÂƒÃ†Â'Ã‚Ã¢Â€Â¡ÃƒÂ‚Ã‚Â¡LIO DE MESQUITA FILHO

(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. **28**:494–518.

3. **Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS.** 2002. Citrus canker: the pathogen and its impact. Plant Health Prog. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/.
4. **Chagas MCM, Parra JRP, Namekata T, Hartung JS, Yamamoto P.** 2001. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. Neotrop. Entomol. **30**:55–59.
5. **Bitancourt AA.** 1957. O cancro cítrico. Biologico **23**:101–111.
6. **Belasque J, Jr, Fernandes NG, Massari CA.** 2009. The success of eradication campaign of citrus canker in São Paulo States, Brazil. Summa Phytopathol. **35**:91–92.
7. **Belasque J, Jr, Behlau F.** 2011. Current status of citrus canker control in São Paulo state, Brazil: a new chapter in a 50-year book?, p 13–15. *In* Ferreira H, Belasque J, Jr (ed), Proceedings of the International Workshop on *Xanthomonas citri*/Citrus Canker. UNESP/Fundecitrus, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil. http://www.fcfar.unesp.br/wxc/download/workshop_Xanthomonas.pdf.
8. **Canteros BI.** 1999. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, p 455–459. *In* Mahadevan A (ed), Plant pathogenic bacteria. Proceedings of the International Society of Bacteriology, Centre for Advanced Study in Botany. University of Madras, Chennai, India.
9. **Miller AM, Barreto TP, Silva MRL, Leite RP, Jr.** 2011. Control of citrus canker mediated by neonicotinoids in combination with acibenzolar-S-methyl, p 49–51. *In* Ferreira H, Belasque J, Jr (ed), Proceedings of the International Workshop on *Xanthomonas citri*/Citrus Canker. UNESP/Fundecitrus, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil. http://www.fcfar.unesp.br/wxc/download/workshop_Xanthomonas.pdf.
10. **Graham JH, Myers ME.** 2011. Soil drenches of imidacloprid, thiamethoxam and acibenzolar-S-methyl for induction of SAR to control citrus canker in young citrus trees. Plant Dis. **95**:725–728.
11. **Yang L, Hu C, Li N, Zhang J, Yan J, Deng Z.** 2011. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. Plant Mol. Biol. **75**:11–23.
12. **Fu XZ, Chen CW, Wang Y, Liu JH, Moriguchi T.** 2011. Ectopic expression of MdSPDS1 in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) reduces canker susceptibility: involvement of H(2)O(2) production and transcriptional alteration. BMC Plant Biol. **11**:55. doi:10.1186/1471-2229-11-55.
13. **Grundhofer P, Niemetz R, Schilling G, Gross GG.** 2001. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. Phytochemistry **57**:915–927.
14. **Muir RM, Ibanez AM, Uratsu SL, Ingham ES, Leslie CA, McGranahan GH, Batra N, Goyal S, Joseph J, Jemmis ED, Dandekar AM.** 2011. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). Plant Mol. Biol. **75**:555–565.
15. **Werner I, Bacher A, Eisenreich W.** 1997. Retrobiosynthetic NMR studies with 13C-labeled glucose. Formation of gallic acid in plants and fungi. J. Biol. Chem. **272**:25474–25482.
16. **Ximenes VF, Lopes MG, Petronio MS, Regasini LO, Silva DH, da Fonseca LM.** 2010. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2′-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. J. Agric. Food Chem. **58**:5355–5362.
17. **Morais MC, Luqman S, Kondratyuk TP, Petronio MS, Regasini LO, Silva DH, Bolzani VS, Soares CP, Pezzuto JM.** 2010. Suppression of TNF-alpha induced NFkappaB activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. Nat. Prod. Res. **24**:1758–1765.
18. **Dodo K, Minato T, Noguchi-Yachide T, Suganuma M, Hashimoto Y.** 2008. Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (−)-epigallocatechin gallate. Bioorg. Med. Chem. **16**:7975–7982.
19. **Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva MC, de Souza CA, Licinio MA, Leal P, Bazzo ML, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB.** 2008. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. Bioorg. Med. Chem. **16**:3791–3799.
20. **Rosso R, Vieira TO, Leal PC, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB.** 2006. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alquil esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. Bioorg. Med. Chem. **14**:6409–6413.
21. **Regasini LO, Fernandes DC, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Barreiro EJ, Cardoso-Lopes EM, Young MCM, Torres LB, Vellosa JCR, Oliveira OMM.** 2008. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). Quim. Nova **31**:802–806.
22. **Kubo I, Xiao P, Fujita K.** 2001. Antibacterial activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. Bioorg. Med. Chem. Lett. **11**:347–350.
23. **Fujita K, Kubo I.** 2002. Antifungal activity of octyl gallate. Int. J. Food Microbiol. **79**:193–201.
24. **Leal PC, Mascarello A, Derita M, Zuljan F, Nunes RJ, Zacchino S, Yunes RA.** 2009. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. Bioorg. Med. Chem. Lett. **19**:1793–1796.
25. **Kubo I, Xiao P, Fujita K.** 2002. Anti-MRSA activity of alkyl gallates. Bioorg. Med. Chem. Lett. **12**:113–116.
26. **Kubo I, Fujita K, Nihei K.** 2003. Molecular design of multifunctional antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Bioorg. Med. Chem. **11**:4255–4262.
27. **Martins PM, Lau IF, Bacci M, Belasque J, Jr, do Amaral AM, Taboga SR, Ferreira H.** 2010. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. FEMS Microbiol. Lett. **310**:76–83.
28. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
29. **Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC.** 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3616–3619.
30. **Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F.** 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:2720–2722.
31. **Waring MJ.** 2010. Lipophilicity in drug discovery. Exp. Opin. Drug Discov. **5**:235–248.
32. **Gueiros-Filho FJ, Losick R.** 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. Genes Dev. **16**:2544–2556.
33. **Lin DC, Grossman AD.** 1998. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. Cell **92**:675–685.
34. **Thanbichler M, Shapiro L.** 2006. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. Cell **126**:147–162.
35. **Marston AL, Errington J.** 1999. Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. Mol. Cell **4**:673–682.
36. **Donovan C, Schwaiger A, Kramer R, Bramkamp M.** 2010. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **192**:3441–3451.
37. **Glaser P, Sharpe ME, Raether B, Perego M, Ohlsen K, Errington J.** 1997. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. Genes Dev. **11**:1160–1168.
38. **Lin DC, Levin PA, Grossman AD.** 1997. Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**:4721–4726.
39. **Mohl DA, Gober JW.** 1997. Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. Cell **88**:675–684.
40. **Sharpe ME, Errington J.** 1998. A fixed distance for separation of newly replicated copies of oriC in *Bacillus subtilis*: implications for co-ordination of chromosome segregation and cell division. Mol. Microbiol. **28**:981–990.
41. **Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T.** 2004. Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. J. Agric. Food Chem. **52**:3329–3332.
42. **Birnie CR, Malamud D, Schnaare RL.** 2000. Antimicrobial evaluation of N-alkyl betaines and N-alkyl-N,N-dimethylamine oxides with variations in chain length. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:2514–2517.
43. **Hammond DG, Kubo I.** 2000. Alkanols inhibit respiration of intact mitochondria and display cutoff similar to that measured in vivo. J. Pharmacol. Exp. Ther. **293**:822–828.
44. **Behlau F, Belasque J, Jr, Graham JH, Leite RP, Jr.** 2010. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. Crop Prot. **29**:300–305.
45. **Gottwald TR, Timmer LW.** 1995. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Trop. Agric. **72**:194–201.

46. **Behlau F, Canteros BI, Jones JB, Graham JH.** 2012. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri.* Eur. J. Plant Pathol. **133**:949–963.
47. **Graham JH, Dewdney MM, Myers ME.** 2010. Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit. Proc. Fla. State Hortic. Soc. **123**:92–98.
48. **Awasthi D, Kumar K, Ojima I.** 2011. Therapeutic potential of FtsZ inhibition: a patent perspective. Expert Opin. Ther. Pat. **21**:657–679.
49. **Erickson HP, Stoffler D.** 1996. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. J. Cell Biol. **135**:5–8.
50. **Lowe J, Amos LA.** 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. Nature **391**:203–206.
51. **Errington J, Daniel RA, Scheffers DJ.** 2003. Cytokinesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67**:52–65.
52. **Lau IF, Filipe SR, Soballe B, Okstad OA, Barre FX, Sherratt DJ.** 2003. Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. Mol. Microbiol. **49**:731–743.
53. **Lemon KP, Grossman AD.** 2001. The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. Genes Dev. **15**:2031–2041.
54. **Ptacin JL, Lee SF, Garner EC, Toro E, Eckart M, Comolli LR, Moerner WE, Shapiro L.** 2010. A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. Nat. Cell Biol. **12**:791–798.
55. **Gitai Z, Dye NA, Reisenauer A, Wachi M, Shapiro L.** 2005. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. Cell **120**:329–341.

Downloaded from http://jb.asm.org/ on March 27, 2014 by UNIVERSIDADE EST.PAULISTA JÃƒÂƒÃ†Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã¢Â€Â¦Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚Ã‚