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

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

ABIGAIL SAVIETTO

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

Março - 2016

ABIGAIL SAVIETTO

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

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira¹

Coorientadora: Dra. Isabel Cristiane da Silva²

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

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

**Rio Claro
2016**

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

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

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

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

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

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Profa. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

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

AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGMENTS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
REVISÃO DA LITERATURA		
Figura 1	– Produção de Laranjas no Brasil.	17
Figura 2	– Distribuição mundial do cancro cítrico.	20
Figura 3	– Lesões típicas do cancro cítrico.	22
Figura 4	– Ciclo de vida do cancro cítrico.	24
Figura 5	– <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> próximo da abertura estomatal	25
Figura 6	– Medidas de controle do cancro cítrico.	26
Figura 7	– Série histórica do Índice de talhões contaminados (%) por cancro cítrico no estado de São Paulo (2000-2012).	26
Figura 8	– Divisomo formado pelo anel Z e outras proteínas associadas.	29
Figura 9	– Formação do septo e divisão celular bacteriana.	30
CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE GALATOS DE ALQUILA ACETILADOS SOBRE <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>		
Figura 10	– Reação de esterificação do ácido gálico	34
Figura 11	– Reação de síntese de galatos de alquila acetilados.	35
Figura 12	– Galatos de alquila acetilados.	35
Figura 13	– Esquema de montagem do experimento de REMA em placa de 96 poços.	37
Figura 14	– Galatos de alquila acetilados inibem crescimento de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	43
Figura 15	– Plaqueamento em superfície para determinação da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados.	45
Figura 16	– Tamanho celular de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> tratadas com galatos de alquila acetilados ao longo de 6 horas.	47
Figura 17	– Galatos de alquila promovem a disrupção do septo em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	49

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

Figure 18 – SDS-PAGE of the FtsZ purification steps.....	59
Figure 19 – FtsZ from <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> polymerization depends on the presence of MgCl ₂	59
Figure 20 – GTPase Activity of FtsZ from <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> in the presence of acetylated alkyl gallates.....	61
Figure 21 – Sedimentation of FtsZ in the presence of acetylated alkyl gallates.	62
Figure 22 – Sedimentation of FtsZ in the presence of acetylated alkyl gallates and 0.01% Triton X-100.....	63
Figure 23 – Cells of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> treated with Live/Dead BacLight Ki	65
Figure 24 – <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> membrane integrity is affected by the presence of acetylated alkyl gallates.....	65

LISTA DE TABELAS

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

Tabela	Descrição	Página
Tabela 1	Valores de CIM ₉₀ e CIM ₅₀ dos galatos de alquila acetilados.	42
Tabela 2	Dados comparativos de concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) e lipofilicidade teórica entre galatos de alquila acetilados e galatos de alquila não acetilados.....	44
Tabela 3	Atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados.	46
Tabela 4	Comprimento de células de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> tratadas com galatos de alquila acetilados.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviatura	Descrição
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µg/mL	Microgramas por mililitro
µM	Micromolar
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano
CIM ₉₀	Concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CV	Controle de veículo
CVC	Clorose variegada do citrus
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O. _{600nm}	Densidade óptica no comprimento de onda de 600nm
FtsZ	<i>filamentation temperature sensitive protein Z</i>
FUNDECITRUS	Fundo de Defesa da Citricultura
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HBL	Huanglongbing
LB	Meio Lauria Bertani
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos

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

SUMÁRIO

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

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

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

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

1 INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

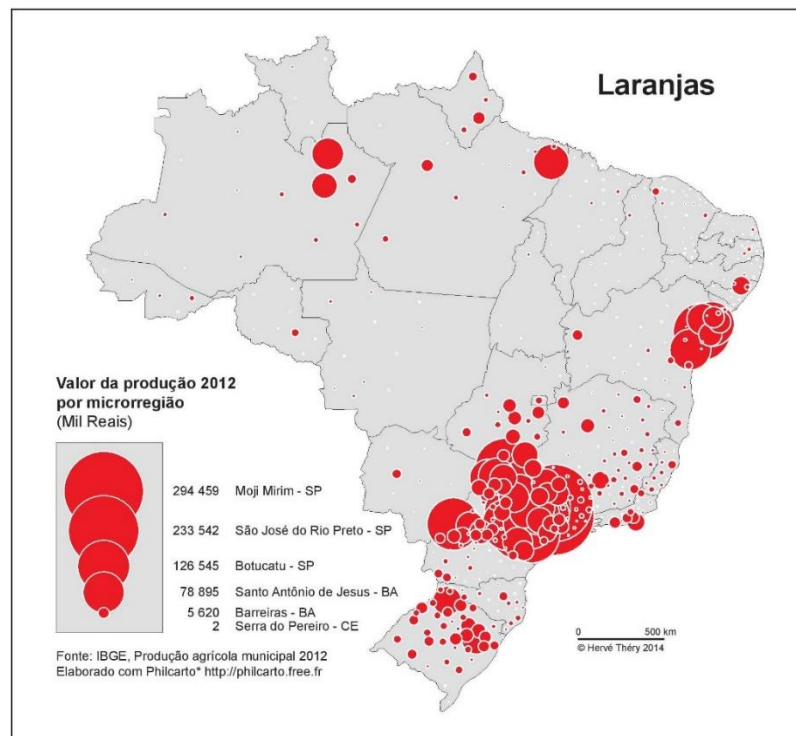
Com base nos resultados anteriores do grupo, e visando alternativas ao controle do cancro cítrico, este trabalho propôs caracterizar moléculas de galatos de alquila modificados, os galatos de alquila acetilados, quanto ao seu potencial de inibição (**Capítulo 1**) e seu mecanismo de ação (**Capítulo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

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Citricultura Brasileira

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja doce – principal produto do complexo agroindustrial da citricultura brasileira. A produção está distribuída por todas as regiões (**Figura 1**), mas com notória concentração no sudeste do país, especialmente no estado de São Paulo, onde se concentram 77% da produção nacional de citros (SOBRINHO et al., 2013). A estimativa da safra de laranja 2016/17 publicada em 10 de maio de 2016 pelo Fundecitrus com cooperação da Markestrat, FEA-RP/USP e FCAV/Unesp (Jaboticabal) é de 245,74 milhões de caixas (40,8 kg).

Figura 1 – Produção de Laranjas no Brasil



THÉRY, Hervé; MELLO-THÉRY, Neli Aparecida de. *Atlas do Brasil*. 2. ed. Prelo. Mapa original (base cartográfica com generalização; algumas feições do território nacional não estão representadas).

Fonte: IBGE, 2012.

Em torno de 50% da produção mundial de laranja e 80% da brasileira resultam em sucos industrializados. O principal comprador da bebida brasileira é a União Europeia que aumenta

significativamente o percentual de importação anualmente. A maior parte das importações mundiais (85%) é absorvida por apenas três mercados: Estados Unidos, União Europeia e Canadá.

Da laranja, além do suco, são extraídos óleos essenciais e líquidos aromáticos. O bagaço de citros, com alto teor energético, é um subproduto industrial de expressivo valor econômico, para alimentação animal, sobretudo para ruminantes e, em especial, a vaca de leite.

A produção tem como principal destino a indústria de sucos, sendo que apenas 14% do total de laranjas produzidas pelo cinturão citrícola do estado de São Paulo são absorvidos pelo mercado interno de frutas *in natura*, segundo dados de comercialização de frutos pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) - sendo, portanto, os 86% restantes direcionados à indústria.

Entretanto, diversos fatores têm contribuído para uma baixa absorção da laranja produzida por citricultores independentes no mercado de sucos, causando um desestímulo destes na permanência na cultura de citros. Esses fatores compreendem (a) a oferta de sucos e bebidas de outras frutas no mercado internacional concorrendo com o suco de laranja (NEVES et al., 2010); (b) a queda das exportações devido à crise econômica da Europa, nosso principal importador; (c) as grandes quantidades de suco armazenadas pela indústria a fim de se evitar o rebaixamento dos preços pagos pelos importadores. Sendo assim, os mais prejudicados são os pequenos e médios produtores, que se encontram descapitalizados. A situação é agravada pelo não escoamento esperado das safras e pela baixa produtividade dos pomares, consequência da dificuldade em se adotarem tecnologias modernas, o que não acontece com os grandes produtores.

O desestímulo da classe agrícola contribui para o aumento de fatores de risco comprometedores da sustentabilidade da produção de citros. Muitos insetos se tornaram um desafio para o seu controle biológico, dentre eles a cigarrinha, a mosca da fruta, pulgões, o minador dos citros *Phyllocnistis citrella*, o psílideo *Diaphorina citri*, entre outros insetos vetores ou facilitadores da entrada de agentes etiológicos que causam doenças graves como a *huanglongbing* (HLB), a clorose variegada dos citros (CVC), a pinta preta e o cancro cítrico (GRAVENA, 2011), sendo esse último, foco deste trabalho.

2.2 O agente causal do cancro cítrico: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*)

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) é uma bactéria pertencente ao gênero *Xanthomonas* (do grego, “*xanthos*”, amarelo e “*monas*”, unidade), um dos maiores grupos de bactérias

fitopatogênicas dispersos na natureza, com capacidade de infectar um grande número de hospedeiros que incluem, pelo menos, 68 famílias de plantas e mais de 240 gêneros (HAYWARD, 1993) sendo que desse total, 120 são monocotiledôneas e 280 dicotiledôneas (LEYNS et al., 1984).

A bactéria foi identificada e isolada pela primeira vez em 1915 por Clara Hasse, que classificou o microrganismo como sendo pertencente ao gênero *Pseudomonas*, com o nome de *Pseudomonas citri* (HASSE, 1915). Em 1949, Dowson reclassificou a bactéria em *Xanthomonas citri* (KHAN; HINGORANI, 1970). Após 25 anos, a bactéria foi reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995). Mais recentemente, em 2006, foi mais uma vez reclassificada e até os dias de hoje é denominada *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006).

A mais atual reclassificação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas para citros foi baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados e reassociação DNA-DNA (SCHAAD et al., 2006). Antes, as espécies eram pertencentes a uma mesma espécie bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) e separadas em patovares de acordo com a patogenicidade em diferentes hospedeiros (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelo*) (VAUTERIN et al., 1995). Porém, a classificação atual considera esses microrganismos como sendo três espécies diferentes: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (antiga *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (antiga *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelo* (antiga *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*) (SCHAAD et al., 2006; SCHAAD et al., 2005). De acordo com a mais recente classificação, a bactéria do presente estudo pertence ao filo Proteobacteria, classe “Gammaproteobacteria”, ordem “Xanthomonadales”, família “Xanthomonadaceae” e gênero *Xanthomonas* (GARRITY; HOLT, 2000).

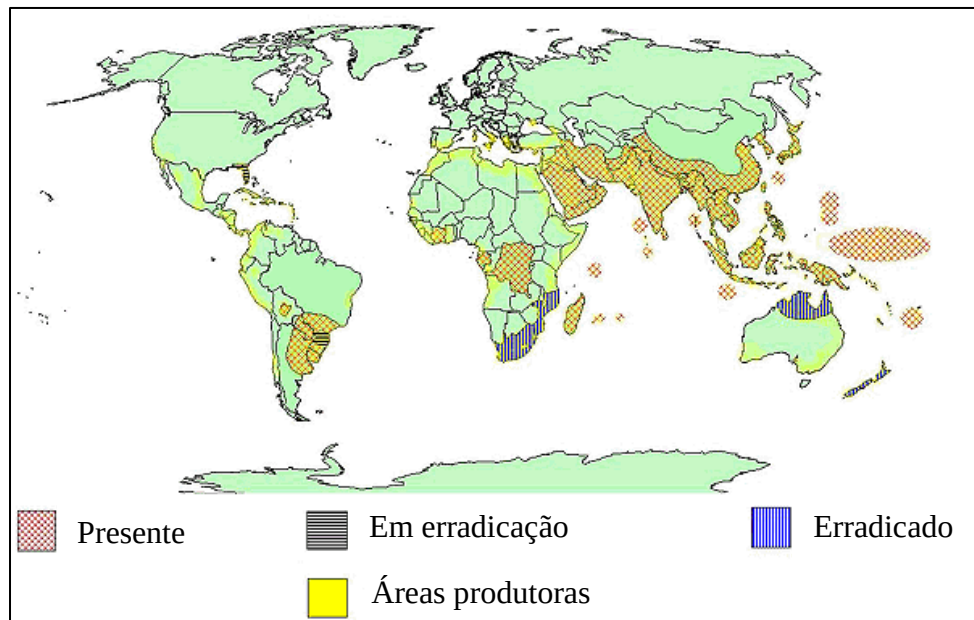
Embora *X. citri* tenha sido recentemente reclassificada, ela é ainda hoje conhecida e encontrada na literatura com o apelido de “Xac”, pois em 2002, ano de publicação de seu genoma completo (DA SILVA et al., 2002), era ainda classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac).

A bactéria possui a morfologia de um bastonete reto com comprimento variando de 1,5 a 2,0 μm e largura entre 0,5 e 0,7 μm . Ela apresenta um único flagelo polar, é Gram-negativa, aeróbica obrigatória, não fixadora de nitrogênio, não formadora de esporos e não é nutricionalmente exigente (SWINGS; CIVEROLO, 1993). Na natureza, é raramente encontrada

livre no solo, já que é adaptada ao crescimento endofítico (SWINGS e CIVEROLO, 1993). Em laboratório, cultivada em meios de cultura artificiais, a bactéria forma colônias amareladas devido à produção de um pigmento chamado xantomonadina, importante na proteção contra raios ultravioleta (BRADBURY, 1993). As colônias possuem aspecto mucoso devido a produção de goma xantana, um exopolissacarídeo que auxilia na dispersão e sobrevivência do patógeno. As colônias são visíveis após dois a três dias de incubação com temperatura variando de 28 a 30 °C (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

X. citri está distribuída em inúmeros países da América, África, Ásia e Oceania (**Figura 2**) e causa a doença chamada cancro cítrico asiático ou cancriose A. O cancro cítrico foi introduzido nas Américas do Norte e do Sul e Oceania no século passado, provavelmente por meio de material contaminado com a bactéria. Nesses continentes estão dois dos principais produtores mundiais de citros, o Brasil e os Estados Unidos.

Figura 2 – Distribuição mundial do cancro cítrico.



Fonte: *Plant Health Progress*, 2002 (imagem modificada). Acessado em 8/3/2016.

Essa bactéria infecta quase todas as variedades e espécies de citros e é a mais patogênica de todas as espécies de *Xanthomonas* que provocam o cancro (NAMEKATA; ROSSI; CERAVOLO, 1996; WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1996). As variedades de citros

apresentam variações quanto à susceptibilidade em relação à bactéria, seguindo esta ordem: poncan, mexerica do rio, limão Tahiti, laranja pêra, laranja Valência, laranja Natal, tangor murcote, limão cravo, laranja Hamlin, laranja baianinha, limão siciliano, limão Galego e pomelo.

Há algumas espécies dentro do gênero *Xanthomonas* que também provocam outros tipos de cancrose, como por exemplo a *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. Porém sua classificação infraespecífica se dá a nível de estirpe (estirpe B, C e D), ocorrendo em diferentes variedades de citros. A Cancrose B é também chamada de “falso cancro” e é provocada pela estirpe B de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa-B). Ela ocorre em um menor número de espécies de citros de uma forma bem mais lenta e branda do que a cancrose A e restringe-se a locais como Argentina, Paraguai e Uruguai (ROSSETTI, V.V., 2001). A Cancrose C, causada pela estirpe C de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa-C), infecta apenas o limoeiro galego (*Citrus aurantifolia*) e é endêmica de algumas regiões do estado de São Paulo (AMARAL, 2003). A cancrose D é causada pela estirpe D de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa-D) e foi relatada apenas no México. Ainda não está bem caracterizada, mas causa lesões em folhas e ramos de limoeiro galego (*Citrus aurantifolia*). Além dessas, outra espécie de *Xanthomonas*, a *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*, causa a cancrose E ou mancha bacteriana dos citros e ataca especificamente porta-enxertos de citrumelo ‘Swingle’ e é restrita à Flórida (BEHLAU, 2006; SCHAAD et al., 2006; SWINGS; CIVEROLO, 1993).

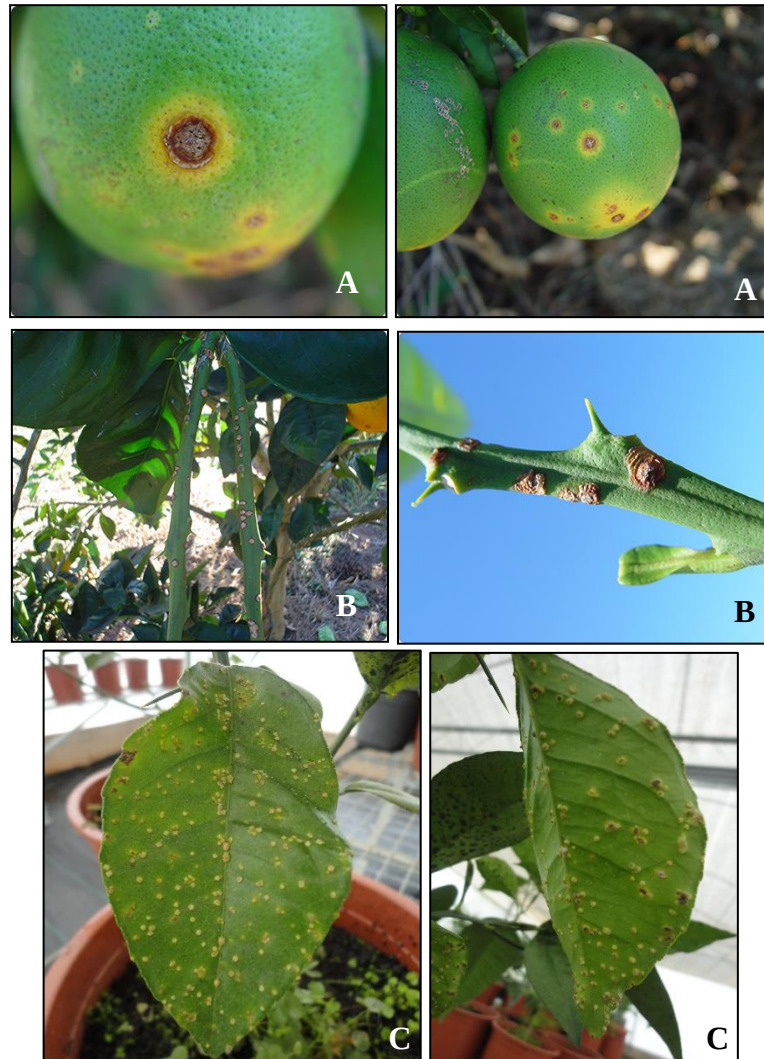
2.3 O Cancro Cítrico

O cancro cítrico foi diagnosticado pela primeira vez no Brasil, na região de Presidente Prudente – SP, em 1957 (BITANCOURT, 1957). Nesse mesmo ano, foram adotadas algumas medidas de eliminação por meio de uma campanha de erradicação do cancro cítrico que permanece até os dias de hoje. Entretanto, apesar dos esforços já em 1957 para o controle o cancro cítrico, a bactéria também foi encontrada nos estados Mato Grosso do Sul e Paraná. Hoje o cancro está presente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima.

Bitancourt (1957) caracterizou o cancro cítrico como sendo uma doença que acomete folhas, frutos e ramos, e sua sintomatologia básica se resume a lesões corticosas e salientes cor de palha que ocorrem devido ao rompimento da epiderme (**Figura 3**). As lesões se tornam pardas ou escuras, corticosas e salientes, com margens protuberantes e centros afundados (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; GOTTWALD, T. R.; SUN; et al., 2002; SCHUBERT et al., 2001). A lesão pode ou não ser circundada por um halo amarelo, que se manifesta entre uma semana e dois meses

após a inoculação e atinge de 2 até 12 milímetros de diâmetro (AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2001; FEICHTENBERGER et al., 2005; ROSSETTI, V.V. , 2001).

Figura 3 – Lesões típicas do cancro cítrico



(A) frutos (B) ramos (C) folhas **Fonte:** (A) e (B) FUNDECITRUS, 2013 (Acessado em 08/03/2015). (C) LGB – Laboratório de Genética de Bactérias, arquivo pessoal de Lúcia B. Cavalca. Detalhe para sintomas na parte abaxial e adaxial da folha.

A formação desse halo está associada à menor produção de clorofilas a e b, caroteno e xantofila (DAS, 2003). Nas folhas, o aparecimento destas lesões se dá geralmente na superfície abaxial, local onde há maior concentração de estômatos (AMARAL, 2003), embora também seja muito comum o aparecimento de sintomas na superfície adaxial da folha. Esse sintoma, segundo o

FUNDECITRUS, é decisivo para o diagnóstico do cancro cítrico, pois é a única doença conhecida com lesões salientes que aparecem dos dois lados da folha (**Figura 3C**).

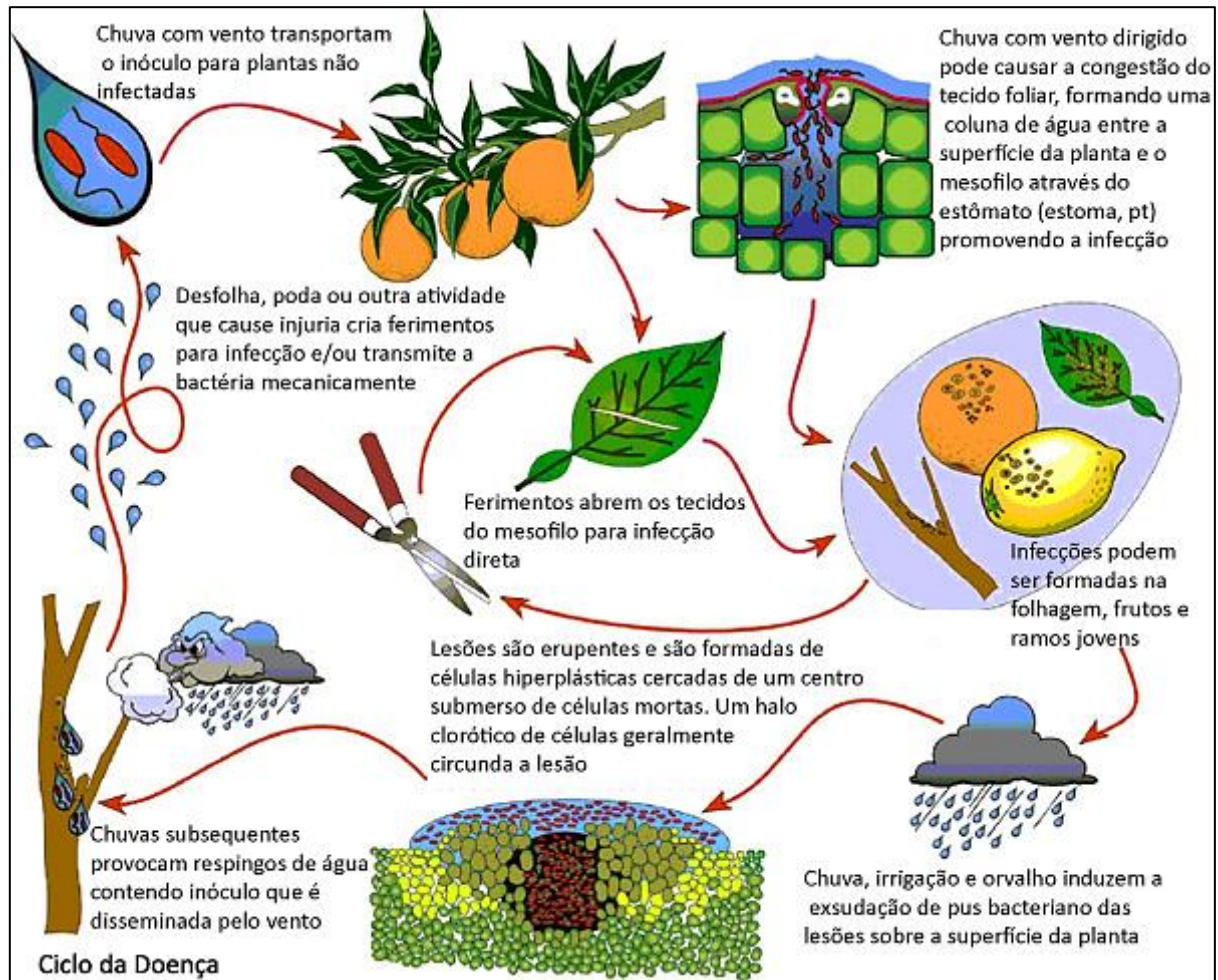
Ainda, conforme a **figura 3C**, nota-se que os tecidos das folhas infectadas também podem apresentar como características a clorose (amarelamento), hiperplasia (devido à excessiva divisão mitótica celular) e necrose. Essas características também são utilizadas para o diagnóstico da doença (SWARUP et al., 1991).

A bactéria, quando estabelecida no hospedeiro, provoca destruição de área foliar interferindo no processo de fotossíntese. Causa também excessiva produção de etileno como resposta ao estresse biótico, provocando consequentemente a queda prematura de folhas e frutos, aspecto alterado do fruto, seca de ramos novos e, em casos extremamente rigorosos, a morte do hospedeiro (BROWN, 2001).

Com a formação do cancro e ruptura da epiderme, cria-se uma porta de saída para grandes quantidades da bactéria. O patógeno pode ser levado pelo vento, água ou pelo trânsito de pessoas e maquinário no pomar para outras plantas ainda não infectadas, fechando o ciclo. O ciclo completo do cancro cítrico é representado esquematicamente na **figura 4**.

A bactéria se dissemina facilmente nos pomares, tendo os fenômenos naturais (chuva e vento) e o homem (trânsito de pessoas, equipamentos, material biológico e de veículos) como seus principais disseminadores. A bactéria é muito resistente e consegue sobreviver por vários anos em material vegetal cítrico contaminado (AMARAL, 2003). Ocorre principalmente em regiões com alta umidade (chuvas abundantes) e altas temperaturas (entre 20 °C e 35 °C), atacando a planta especialmente durante o período de crescimento dos frutos e folhas (BOCK; PARKER; GOTTWALD, 2005; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Figura 4 - Ciclo de vida do cancro cítrico

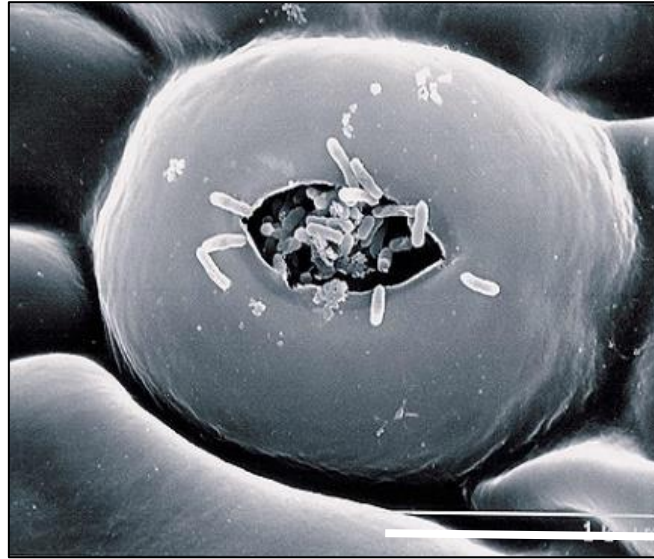


Fonte: Cancro cítrico: medidas essenciais de controle. FUNDECITRUS, 2009.
Acesso em 08/03/2015.

No processo de contaminação, após uma fase epífita, quando a bactéria coloniza a superfície da planta cítrica hospedeira sem causar a doença, inicia-se o processo de infecção, cujo primeiro passo é a penetração da bactéria na planta por qualquer abertura disponível no vegetal, sendo ela natural (tecidos jovens), tais como estômatos (**Figura 5**), hidatódios e lenticelas, ou por meio de ferimentos causados por equipamentos, trânsito de pessoas nos pomares, atrito entre partes da própria planta ou abrasão de partículas de poeira (GOTTWALD, T.R.; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). A penetração é favorecida pelo acúmulo de água sobre a superfície foliar (SCHUBERT et al., 2001). As galerias produzidas pela larva minadora (*Phyllocnistis citrella*) também favorecem a entrada da bactéria na planta, intensificando os danos causados pela doença (CHAGAS et al.,

2001; GRAVENA, 2011). Após a entrada da bactéria no hospedeiro, sua colonização se restringe ao local de infecção.

Figura 5 – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* próxima da abertura estomatal



Microscopia eletrônica de infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na parte abaxial de folha de *grapefruit* (*Citrus paradisi*). Detalhe das bactérias e estômato aberto após 5 dias de infecção. Infiltração no mesófilo foliar, com cultura de 10^5 UFC/mL. A barra de escala corresponde a 10 μ m. **Fonte:** (GRAHAM et al., 2004).

Para a sua permanência e sobrevivência nos espaços intercelulares do parênquima vegetal, a bactéria ativa genes específicos que expressam inúmeras proteínas relacionadas à patogenicidade para desencadear o processo infeccioso, além de iniciar a produção de polissacarídeos extracelulares como a goma xantana (BROWN, 2001).

A estratégia mais eficaz contra o avanço do cancro cítrico em áreas não endêmicas é o sistema de erradicação das árvores infectadas. A campanha de erradicação do cancro cítrico é auxiliada por órgãos como o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) desde 1977. Essa associação é mantida por citricultores e pelas indústrias de sucos e visa a uma campanha voltada para a sanidade dos pomares. O estado de São Paulo adotou em 2000 um rigoroso plano de erradicação da doença, regulamentado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) (BELASQUE JR.; FERNANDES; MASSARI, 2009), e que vem sendo modificado ano a ano.

Na primeira regulamentação, os citricultores eram obrigados a eliminar todas as plantas nos talhões onde a incidência de indivíduos contaminados estivesse acima de 0,5%; abaixo desse cenário, deveriam erradicar somente plantas afetadas e as adjacentes em um raio de 30 metros

(Figura 6A). Em meados de 2009, a legislação foi amenizada, aplicando-se somente a regra dos 30 metros. Como consequência, as áreas com incidência do cancro cítrico têm aumentado em número, como demonstrado por Sanches et.al (2014) com dados fornecidos pelo FUNDECITRUS (Figura 7).

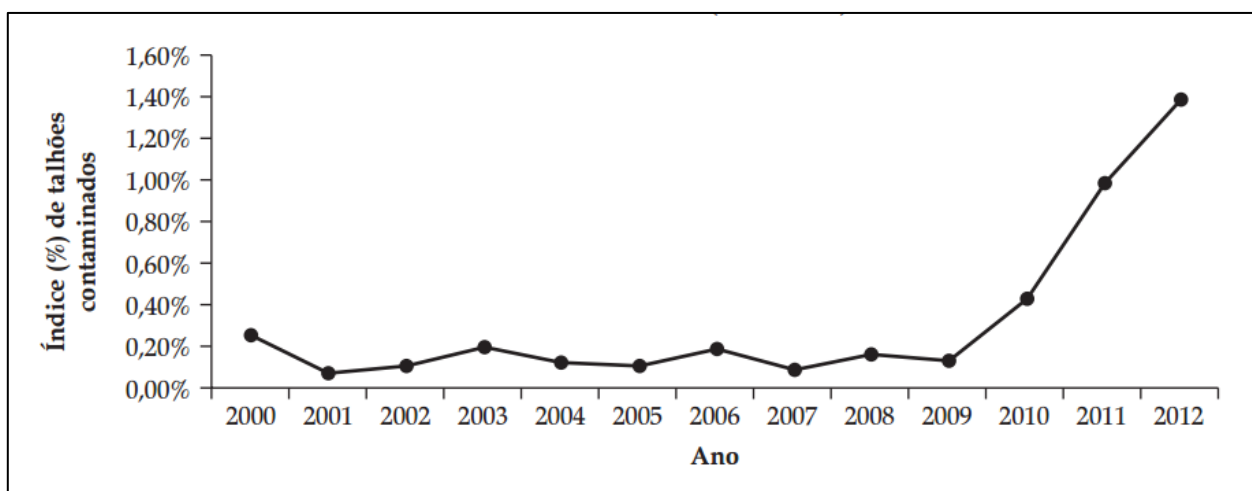
Figura 6 – Medidas de controle do cancro cítrico



(A) Erradicação de plantas num raio de 30 metros (B) Pulverização de formulação contendo cobre

Fonte: FUNDECITRUS, 2009.

Figura 7 - Série histórica do Índice (%) de talhões contaminados por cancro cítrico no estado de São Paulo (2000-2012)



Fonte: (SANCHES et al., 2014)

Em 31 de outubro 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 (SAA, 2013), que se encontra em vigência até hoje. Com essa resolução, não é mais obrigatório erradicar as plantas que estiverem em um raio de 30 metros a partir da planta contaminada com a doença. O método a ser adotado é a eliminação da planta contaminada e a pulverização, com calda cúprica na concentração de 0,1% de cobre metálico, de todas as plantas de citros que estiverem em um raio perifocal de, no mínimo, 30 metros medidos a partir da planta eliminada contaminada (**Figura 6B**). A pulverização deve ser repetida a cada brotação. Com a publicação da resolução, passou a ser obrigatório informar em relatório semestral as inspeções e a eliminação de plantas contaminadas pelo cancro cítrico. Os relatórios de inspeções recebidos pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), da Secretaria Estadual de Agricultura, apontam que foram erradicadas 45,3 mil plantas com sintomas do cancro cítrico (0,02 % do total do Estado), no segundo semestre de 2014.

Em áreas onde o cancro apresenta-se em sua forma endêmica, como regiões do sul do país e Argentina, os produtores encontraram medidas de gestão e manejo integrado em seu cultivo, tais como o uso de plantas com genótipos menos susceptíveis à doença, plantio de barreiras que reduzem a disseminação da bactéria pelo vento e chuva e a aplicação de formulações contendo cobre (BEHLAU et al., 2010; BEHLAU et al., 2008; LEITE JR, R.P. , 1990; LEITE JR, R. P.; MOHAN, 1990). Entretanto, essas práticas acabam por aumentar o custo da produção e não são tão eficazes na prevenção de novas infestações da doença. Além disso, sabe-se que essas formulações contendo cobre acumulam-se no solo, lençóis freáticos e nos próprios frutos, propiciando o surgimento de cepas de *X. citri* subsp. *citri* resistentes (BEHLAU et al., 2011).

Dessa forma, e considerando-se as consequências no estado de São Paulo após a implementação da Resolução SAA – 147, o desenvolvimento de substâncias inovadoras ecologicamente corretas para combater *X. citri* subsp. *citri* se faz necessário, para não somente prevenir a disseminação da doença, mas também para se impedir o acúmulo de resíduos tóxicos no ambiente.

2.4 Divisão celular bacteriana

O sequenciamento do genoma completo da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi publicado em 2002 por Silva e colaboradores. Apesar disso, ainda há grande necessidade de se investigarem os processos biológicos essenciais dessa espécie, como a segregação cromossômica,

a divisão celular e o crescimento bacteriano, a fim de elaborar alternativas para o controle desse patógeno.

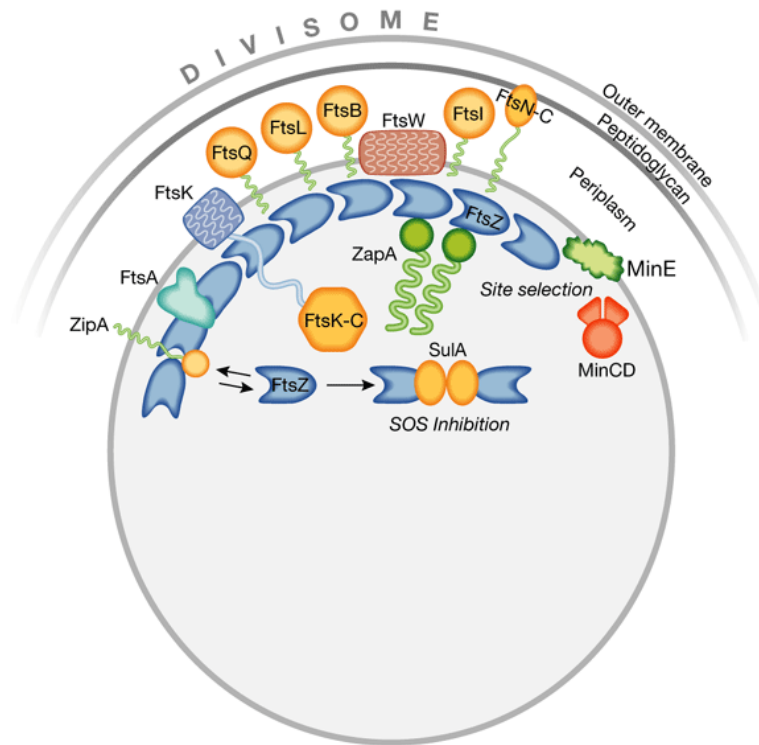
No final da década de 60, um estudo utilizando mutantes de *Escherichia coli* capazes de filamentar, quando incubadas a determinadas temperaturas, demonstrou a importância do estudo dos processos de divisão celular e, posteriormente, vários avanços foram feitos na genética de bactérias. Estudos posteriores levaram ao conhecimento de genes hoje largamente estudados, denominados de *fts*, do inglês “*filamentation temperature sensitive*”.

O processo de divisão celular tem sido largamente caracterizado em modelos bacterianos como a *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (ADAMS; ERRINGTON, 2009; ERRINGTON; DANIEL; SCHEFFERS, 2003; GOEHRING; BECKWITH, 2005; HARRY; MONAHAN; THOMPSON, 2006; LOCK; HARRY, 2008; VICENTE et al., 2006) e, em alguns casos, com *Caulobacter crescentus*. No entanto, apesar da distância filogenética entre esses microrganismos, todos apresentam como principal mecanismo de divisão celular uma estrutura denominada “anel Z” (ERRINGTON et al., 2003), que se apresenta conservada na maioria das bactérias, inclusive em Archaea (LUTKENHAUS; ADDINALL, 1997).

A primeira etapa conhecida na citocinese bacteriana, durante a divisão celular, é a montagem da proteína FtsZ num anel contrátil, o chamado anel Z, na superfície mediana interna da membrana citoplasmática (BI, E. et al., 1991; BUDELMEIJER; BECKWITH, 2002; ROMBERG; LEVIN, 2003). O anel Z identifica o futuro local de divisão, está sob diversos níveis de regulamentação e serve como suporte para a montagem das outras proteínas (LOWE; AMOS, 1998; VICENTE et al., 2006) que têm papel fundamental no processo de divisão celular. A **figura 8** representa um esquema do divisomo, e é possível observar a associação de monômeros da proteína FtsZ formando um arcabouço no qual outras proteínas são sequencialmente recrutadas e associadas durante o processo de divisão celular.

Durante a divisão celular, os monômeros de FtsZ se associam e se desassociam de maneira dinâmica e contínua, de forma dependente de GTP. Os polímeros ou protofilamentos de FtsZ são compostos por até 30 subunidades monoméricas (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010) em sua forma ativa durante a divisão celular. A associação entre monômeros se dá sob uma orientação chamada “cabeça-cauda”. O espaço entre a cabeça de um monômero e a cauda de outro é onde se forma o sítio catalítico de ligação com o nucleotídeo GTP (ERICKSON et al., 2010).

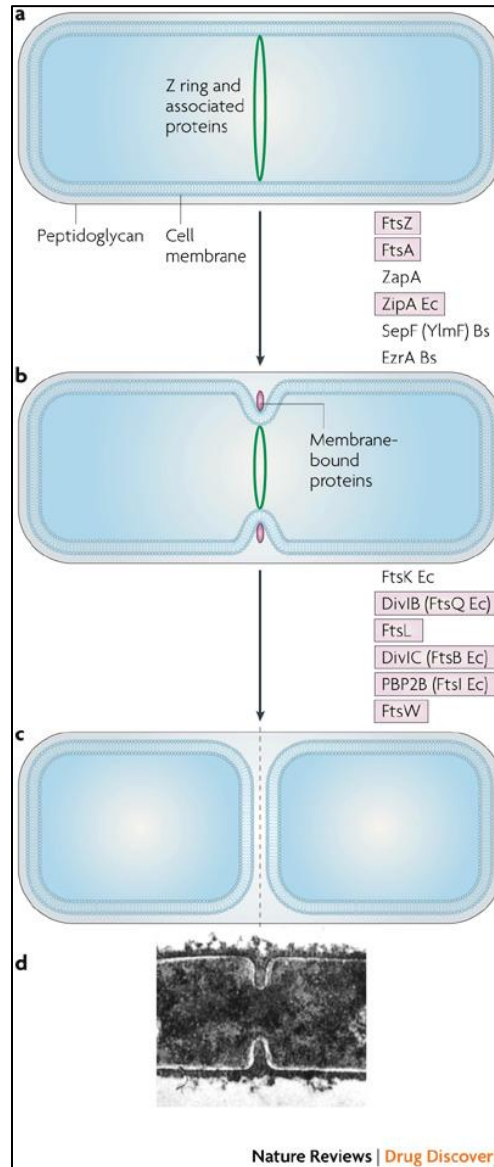
Figura 8 – Divisomo formado pelo anel Z e outras proteínas associadas



Fonte: (VICENTE et al., 2006)

A FtsZ purificada demonstrou possuir atividade GTPásica, sendo que a autoassociação dinâmica de seus monômeros é resultado da polimerização e hidrólise de GTP (DE BOER; CROSSLEY; ROTHFIELD, 1992; SCHEFFERS et al., 2002). Após a auto-hidrólise de GTP, o monômero FtsZ-GDP é dissociado do protofilamento, ficando livre no citosol até ser ativado novamente ao ligar-se a um novo GTP (MICHIE; LÖWE, 2006; MUKHERJEE; LUTKENHAUS, 1998).

FtsZ é considerada uma proteína essencial no processo de divisão celular por duas razões principais: a primeira é de servir ela própria como um arcabouço onde o septo será montado, recrutando consecutivamente proteínas acessórias para compor a maquinaria de divisão (ADAMS; ERRINGTON, 2009); a segunda é a de gerar uma força de contração capaz de iniciar o invaginamento da membrana plasmática (ERICKSON et al., 2010) (**Figura 9d**), apesar de essa função poder estar difusa entre várias proteínas do divisomo, dado o rápido *turn over* de proteínas que se associam a Z (STRICKER; ERICKSON, 2003).

Figura 9 – Formação do septo e divisão celular bacteriana

(a) A formação do anel Z ocorre na porção mediana da célula e recruta várias proteínas acessórias. **(b)** A invaginação da parede celular e membrana plasmática se inicia posteriormente ao recrutamento das proteínas acessórias. Forma-se assim, o septo entre dois cromossomos recém-duplicados. **(c)** O processo é terminado com a hidrólise de peptidoglicano do septo, separando as duas células-filhas. O processo de divisão demonstrado aqui é do bastonete Gram-positivo *Bacillus subtilis*. Em *Escherichia coli*, a hidrólise do septo coincide com a formação do septo. Logo, ao contrário do que ocorre com *B. subtilis*, a constricção ocorre durante a divisão celular. **(d)** Detalhe da microscopia eletrônica da invaginação da membrana plasmática de *B. subtilis* durante a divisão celular. **Fonte:** Lock e Harry (2008).

2.5 FtsZ como alvo de novos antimicrobianos

Quando um antibiótico é desenvolvido e introduzido no mercado, sua utilidade clínica começa a diminuir até um ponto em que há restrição de seu uso, devido ao surgimento de cepas

resistentes. Portanto, não é surpreendente o fato de que muitos antibióticos lançados nas últimas décadas, que são em sua ampla maioria de origem natural ou semissintética, tenham sua utilidade limitada à época de sua descoberta e em pouco tempo se tornarem obsoletos. Outro fator que contribui muito para tornar um antibiótico menos eficiente é a sua utilização indiscriminada e incorreta, o que favorece o surgimento de microrganismos resistentes.

Uma alternativa capaz de superar esse problema é a descoberta de novos agentes antibacterianos com mecanismos de ação mais específicos e inovadores. A divisão celular bacteriana é um processo essencial que ainda não é alvo de antibióticos usados clinicamente (LOCK; HARRY, 2008), nem usado como um alvo para combater patógenos de plantas, como o cancro cítrico (BEHLAU et al., 2010; GOTTWALD, T. R.; TIMMER, 1995).

Duas características interessantes de *FtsZ* sugerem que ela seja um alvo promissor para o desenvolvimento de novos antimicrobianos: (1) ela é essencial para a viabilidade celular e, portanto, para a patogenicidade da bactéria; (2) é conservada em muitas bactérias e, frequentemente, ausente em células eucarióticas (ADAMS; ERRINGTON, 2009; HAYDON et al., 2008; LUTKENHAUS, 1993). Apesar do fato de algumas proteínas que compõem a maquinaria de divisão celular bacteriana apresentarem homólogos em seres humanos - por exemplo, *FtsZ* é um homólogo da tubulina (LOWE; AMOS, 1998; NOGALES, 1998), e *FtsA*, é homóloga da actina (BORK; SANDER; VALENCIA, 1992; VAN DEN ENT; LOWE, 2000) - inibidores específicos dessas proteínas de divisão celular bacteriana não mostraram perturbar seus homólogos eucarióticos. Desse modo, sugere-se que drogas que possuem *FtsZ* como alvo apresentam menor toxicidade sobre células eucarióticas, devido à sua especificidade em estruturas conservadas em procariotos (LOCK; HARRY, 2008).

CAPÍTULO 1

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

1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais do presente trabalho foram: analisar a susceptibilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (wild type) (*X. citri* subsp. *citri* WT) frente a quatro novas moléculas de galatos de alquila acetilados e verificar o efeito *in vivo* dessas drogas sobre uma linhagem mutante de *X. citri* subsp. *citri* contendo GFP associado à proteína ZapA.

1.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de galatos de alquila acetilados frente a *X. citri* subsp. *citri* WT.
- Determinar as concentrações ou faixas de concentração em que as drogas atuam como bactericidas ou bacteriostáticas;
- Analisar comportamento do septo bacteriano em linhagem mutante de *X. citri* subsp. *citri* (*X. citri amy::pPM2a-ZapA*) na presença das drogas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

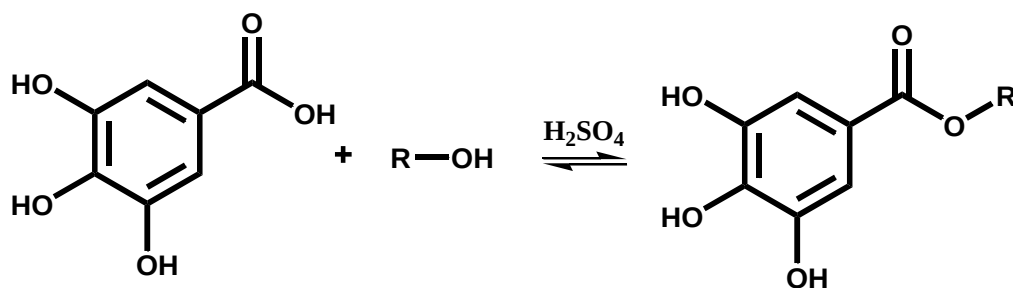
2.1 Otimização dos galatos de alquila para atividade antibacteriana

Baseados em resultados anteriores (SILVA et al., 2013), quatro galatos de alquila (galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila e galato de octila) que apresentaram ação anti – *X. citri* subsp. *citri* foram modificados na tentativa de melhorar a penetrabilidade no mesófilo foliar de citros e em células de *X. citri* subsp. *citri*, assim como aumentar sua retenção na superfície foliar e talvez sua estabilidade sob diversas condições ambientais (chuva, luz do sol, etc.), a saber em testes futuros. A escolha pela acetilação está relacionada a observações de nosso grupo, que corroboram para um potencial aumento na atividade antibacteriana.

A síntese química foi supervisionada e executada pelo laboratório de Preparações de Substâncias Bioativas do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE – UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

A síntese dos galatos de alquila acetilados, utilizados no presente estudo, desenvolveu-se em duas etapas. Primeiramente, o ácido gálico foi esterificado pelo método da esterificação de Fischer, usando ácido gálico e alquil álcoois sob catálise ácida a 110 °C (**Figura 10**).

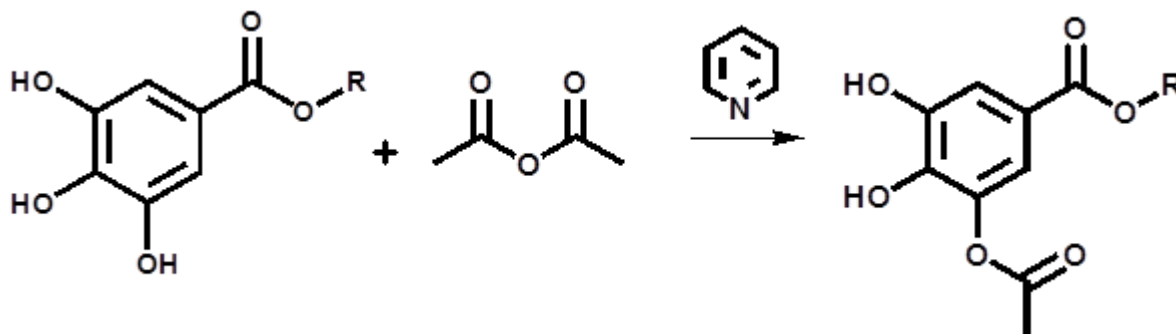
Figura 10 – Reação de esterificação do ácido gálico



Fonte: LGB – Laboratório de Genética de Bactérias.

Subsequentemente, os galatos de alquila formados como produtos dessa reação foram submetidos a uma reação de síntese catalisada por piridina, na presença de anidrido acético (**Figura 11**).

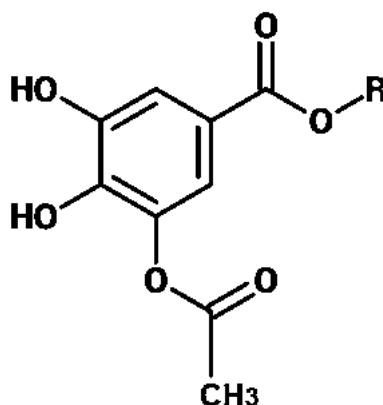
Figura 11 – Reação de síntese de galatos de alquila acetilados.



Fonte: elaborado pela autora

As moléculas utilizadas no presente estudo derivaram de alquil galatos variando de 5 a 8 carbonos, a saber: galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila e galato de octila. O produto da reação de acetilação dessas moléculas é descrito na **Figura 12**.

Figura 12 – Galatos de alquila acetilados.



Fonte: elaborado pela autora

(R) grupos substituintes compostos por –pentila $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, –hexila $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$, –heptila $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ ou –octila $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$.

2.2 Linhagens celulares e condições de crescimento

As linhagens bacterianas de *X. citri* subsp. *citri* utilizadas no presente trabalho encontram-se disponíveis no Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP – Rio Claro, e derivam de trabalhos anteriores do grupo, a saber: (a)

Xanthomonas citri subsp. *citri* (wild type) (*X. citri* subsp. *citri* WT), cepa selvagem isolada ambientalmente e (b) cepa mutante variante de *X. citri* subsp. *citri* WT, contendo proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) associada à proteína ZapA (*X. citri amy::pPM2a-ZapA*) (MARTINS et al., 2010).

As células foram cultivadas a 30 °C em meio *Nutriet Yeast Glycerol* (NYG) sólido e posteriormente 1 a 2 colônias foram semeadas em meio líquido, sob rotação de 200 rpm. Foram utilizados os seguintes antibióticos, quando necessário: ampicilina (20 µg/mL) e canamicina (20 µg/mL).

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

A avaliação da susceptibilidade de *X. citri* subsp. *citri* sobre as substâncias foi realizada utilizando-se o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) descrito anteriormente (PALOMINO et al., 2002) com algumas modificações (SILVA; FERREIRA, 2013). A cepa de *X. citri* subsp. *citri* WT foi cultivada em meio NYG a 30 °C por 48 horas. Após esse período, 4 a 5 colônias foram inoculadas em 4 mL de meio NYG líquido e cultivadas a 30 °C com agitação de 200 rpm, por 18 horas.

As soluções-estoque das substâncias foram diluídas em DMSO 100% (v:v) e as concentrações utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir da diluição dos estoques (fator de diluição 2:1) em água destilada, sendo que a maior concentração de DMSO durante os testes foi de no máximo 1% de DMSO (concentração não prejudicial para a viabilidade celular, averiguada em testes preliminares).

Os controles utilizados durante o teste foram: (a) controle negativo (CN) (100 µL de meio de cultura); (b) controle positivo (CP) (canamicina a 20 µg/mL); (c) controle do veículo (ou diluente) (CV) (solução de DMSO 1% em meio de cultura).

Durante a preparação do ensaio de REMA em microplacas de 96 poços de fundo chato, a diluição seriada gerou, em cada linha da placa, diferentes concentrações, sendo elas 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,56 µg/mL e 0,78 µg/mL. A montagem do experimento em microplacas de 96 poços foi realizada conforme esquematizado na **figura 13**; nota-se que cada substância foi testada em duplicata na mesma placa.

Os poços das colunas 1 e 12 não foram utilizados no experimento, mas foi adicionado água a esses poços, para evitar evaporação. Após realizada a diluição seriada das substâncias,

transferindo-se 100 μL do conteúdo dos poços da linha A para a linha B e assim por diante, foram adicionados 10 μL de inóculo padronizado, contendo 10^5 UFC/poço em volume final de 100 μL .

As placas foram incubadas a 30 °C por 6 horas. Após esse período, adicionou-se 15 μL de solução de resazurina à 0,01 % em água destilada esterilizada, e a placa foi novamente incubada por mais 2 a 3 horas nas mesmas condições.

Figura 13 - Esquema de montagem do experimento de REMA em placa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 μL H ₂ O	200 μL G5	200 μL G5	200 μL G6	200 μL G6	200 μL G7	200 μL G7	200 μL G8	200 μL G8	100 μL CN	100 μL CP	200 μL H ₂ O
B	200 μL H ₂ O	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (50 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CP	200 μL H ₂ O
C	200 μL H ₂ O	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CP	200 μL H ₂ O
D	200 μL H ₂ O	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (12,5 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CP	200 μL H ₂ O
E	200 μL H ₂ O	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (6,25 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CV	200 μL H ₂ O
F	200 μL H ₂ O	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,125 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (3,12 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CV	200 μL H ₂ O
G	200 μL H ₂ O	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (1,56 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CV	200 μL H ₂ O
H	200 μL H ₂ O	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL (0,78 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL CN	100 μL CV	200 μL H ₂ O

Colunas 1 e 12: água. Colunas 2 e 3: substância G5. Colunas 4 e 5: substância G6. Colunas 6 e 7: substância G7. Colunas 8 e 9: substância G8. Coluna 10: CN (controle negativo, 100 μL de meio de cultura). Poços 11A a 11D: CP (controle positivo, canamicina a 20 $\mu\text{g/mL}$). Poços 11E a 11H: CV (controle do veículo solução de DMSO 1% em meio de cultura).

A resazurina possui potencial óxido redutor, apresentando mudança colorimétrica em resposta ao metabolismo. Microrganismos viáveis reduzem a resazurina (de cor azul não fluorescente) para resofurina (de cor rosa fluorescente). Essa mudança de cor foi detectada quantitativamente utilizando-se o leitor de microplacas Synergy (Biotek) que apresenta filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm, respectivamente. Os valores obtidos durante a leitura, dados em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF), foram extraídos

para o software Gen5 (Biotek) para posterior análise dos dados e determinação das concentrações inibitórias.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição (NCCLS, 2003). Para a determinação da CIM₉₀, concentração capaz de inibir o crescimento de 90% da população bacteriana, obtiveram-se regressões logarítmicas a partir dos resultados de três ou mais experimentos independentes. O potencial inibitório de cada substância foi expresso pela porcentagem de morte celular em relação ao controle negativo, segundo a fórmula:

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

*UAF: Unidades arbitrárias de fluorescência

2.4 Determinação da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados

Para determinar a atividade bactericida ou bacteriostática dos galatos de alquila acetilados nas concentrações testadas no ensaio de REMA, cerca de 10 µL do conteúdo de cada poço da placa de 96 poços foi semeado após o tratamento e antes da adição da resazurina, durante o ensaio de REMA. O plaqueamento foi feito em meio NYG sólido contendo ampicilina (20 µg/mL), com a ajuda de um carimbo próprio para placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. O plaqueamento foi repetido em triplicata, em cada experimento independente.

A atividade bacteriostática foi determinada analisando-se os poços que apresentaram 100% de morte celular no ensaio de REMA e que, quando plaqueados, apresentaram crescimento bacteriano. Quando, após a inoculação, não se observou crescimento, essa concentração foi considerada bactericida.

2.5 Microscopia de Contraste por Interferência Diferencial (DIC) e Microscopia de Fluorescência

2.5.1 Análise do septo de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de galatos de alquila acetilados

Uma linhagem mutante de *X. citri* subsp. *citri* expressando GFP-ZapA (*X. citri amy::pPM2a-ZapA*) foi utilizada nos testes de microscopia de fluorescência a fim de se observarem indícios de desestruturação do anel Z mediante análise da localização dessa proteína.

Após cultivo em meio NYG líquido e incubação a 30 °C e 200 rpm por 18 horas, o pré-inóculo foi diluído até D.O_{600 nm} ~ 0,1, e novamente incubado nas mesmas condições até a D.O_{600 nm} ~ 0,3. As células foram submetidas ao tratamento com os galatos de alquila acetilados nas concentrações correspondentes à CIM₅₀ (**Tabela 1**), e incubadas por 6 horas a 30 °C e 200 rpm. Uma alíquota de 10 µL de cada tratamento foi retirada a cada 1 hora (incluindo a hora zero, logo após a adição das substâncias). As amostras foram imobilizadas em lâminas previamente preparadas com agarose 1 % em solução salina 0,9 %.

Para a visualização, utilizou-se microscópio óptico BX-61 (Olympus), em um aumento de 100 vezes; o registro fotográfico foi feito com câmera digital ORCA-Flash 2.8 (Hamamatsu), e as análises foram feitas por meio do software CellSens Dimension 1.11 (Olympus).

2.5.2 Análise de tamanho de *X. citri* subsp. *citri* na presença de galatos de alquila acetilados

Células de *X. citri* subsp. *citri* WT foram utilizadas nos testes de microscopia de contraste de fase a fim de se observarem mudanças no tamanho celular na presença dos galatos de alquila acetilados. Após cultivo em meio NYG líquido a 30 °C e 200 rpm durante 18 horas, o pré-inóculo foi diluído até D.O_{600 nm} ~ 0,1, e novamente incubado nas mesmas condições até a D.O_{600 nm} ~ 0,3.

As células foram submetidas ao tratamento com os galatos de alquila acetilados nas concentrações correspondentes à CIM₅₀ e CIM₈₀ (quando necessário) (**Tabela 1**), e incubadas por 6 horas a 30 °C e 200 rpm. Uma alíquota de 1 µL de cada tratamento foi retirada a cada 1 hora (incluindo a hora zero, logo após a adição das substâncias) para análise em microscopia de contraste de fase. As amostras foram imobilizadas em lâminas previamente preparadas com agarose 1% em solução salina 0,9%.

Para a visualização, utilizou-se microscópio óptico BX-61 (Olympus), em um aumento de 100 vezes. As análises de tamanho celular foram feitas por meio do software CellSens Dimension 1.11 (Olympus).

Fez-se o experimento em duplicata, e mais de 250 células foram contadas por tratamento a cada observação. As alterações de aumento no comprimento celular induzidos pelos galatos de alquila acetilados 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 6.07, 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Inibição do crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de galatos de alquila acetilados

Para a avaliação do potencial de inibição de crescimento bacteriano, células de *X. citri* subsp. *citri* WT foram cultivadas e submetidas a diferentes concentrações dos galatos de alquila acetilados. Em seguida, os tratamentos foram avaliados pelo ensaio REMA.

O ensaio colorimétrico REMA indicou que os galatos de alquila são potentes agentes inibidores do crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, apresentando valores de CIM comparáveis ao controle positivo (canamicina 20 µg/mL) (**Figura 14** – CP, controle positivo). Os valores de CIM₉₀ e CIM₅₀ estão sumarizados da **tabela 1**.

Os resultados apresentados demonstram que a modificação por acetilação nas moléculas de galatos de alquila aumentou a atividade desses compostos quando comparados ao galatos de alquila não acetilados. A atividade antibacteriana aumentou em, no mínimo, 36,1% (galato de heptila acetilado *versus* galato de heptila não acetilado) e, no máximo, 80,6% (galato de octila acetilado *versus* galato de octila não acetilado) (**Tabela 2**).

Os resultados apresentados na **tabela 2** mostram ainda a correlação direta existente entre os valores de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) dos galatos de pentila, hexila, heptil e octila acetilados com o comprimento da cadeia alquila: quanto maior o tamanho da cadeia carbônica, maior a atividade antimicrobiana contra *X. citri* subsp. *citri*: CIM_{octila} (27,92 µg/mL) < CIM_{heptila} (31,97 µg/mL) < CIM_{hexila} (34,65 µg/mL) < CIM_{pentila} (45,73 µg/mL).

Um fator importante na inferência para melhor atividade dos galatos de alquila acetilados em relação aos seus correspondentes originais é dado em valores teóricos de lipofilicidade, como sendo o coeficiente de partição (C log P), descrito por Rosso et al. (2006).

A atividade biológica de moléculas de cadeia longa é frequentemente relacionada não-linearmente ao tamanho da cadeia. Em estudos com moléculas de séries homólogas (WANG, J. et al., 2003), a atividade biológica dessas moléculas aumentou progressivamente com o aumento do tamanho da cadeia até um ponto crítico, acima do qual a atividade biológica começou a decair. Esse comportamento é chamado de “efeito *cut-off*” e foi observado pela primeira vez em moléculas antimicrobianas por Domagk em 1935 (BALGAVÝ; DEVÍNSKY, 1996).

O aumento da potência dos galatos de alquila, quando modificados, provavelmente se deve ao fato de a acetilação, feita na porção polar da molécula, ter reduzido a quantidade de hidroxilas

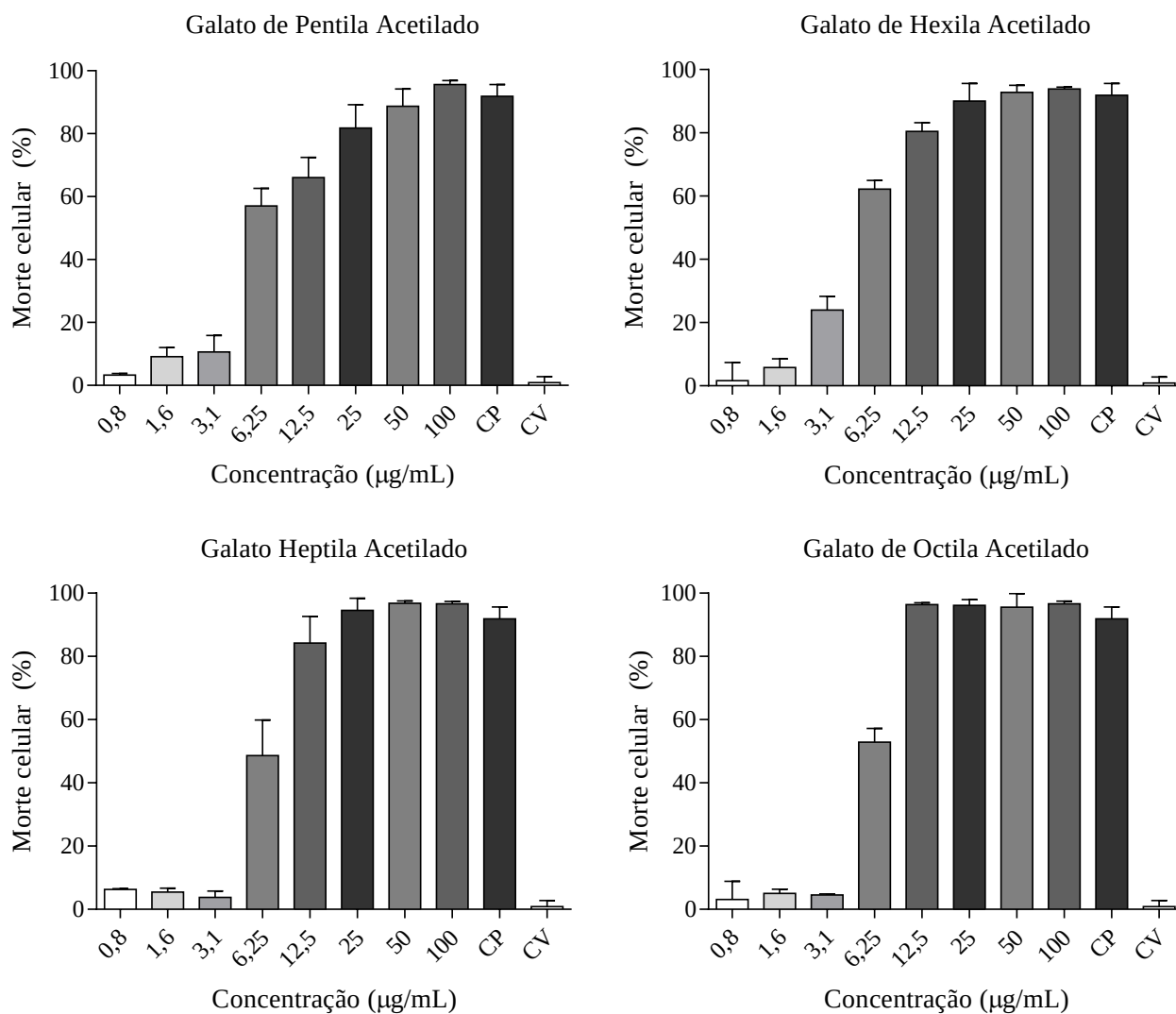
fenólicas e, dessa forma, aumentado a lipofilicidade média da molécula. Os galatos de alquila acetilados apresentaram-se em média 18% mais lipofílicos do que seus correspondentes não acetilados e, portanto, pode-se concluir que a acetilação promoveu aumento da lipofilicidade média das moléculas e, por consequência, de sua atividade antimicrobiana, em uma faixa de $C \log P$ em que o efeito *cut-off* não é ainda observado.

Tabela 1 - Valores de CIM₉₀ e CIM₅₀ dos galatos de alquila acetilados.

Substância (R ^a)	$C \log P^b$	CIM90		CIM50	
		$\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	$\mu\text{mol.L}^{-1}$
Pentil (CH ₂) ₄ CH ₃	3,12	45,73	161,99	8,28	29,3
Hexil (CH ₂) ₅ CH ₃	3,58	34,65	116,90	6,7	22,6
Heptil (CH ₂) ₆ CH ₃	4,04	31,97	102,90	7,5	24,16
Octil (CH ₂) ₇ CH ₃	4,51	27,92	86,09	7,22	22,25

(a) R, grupo substituinte; **(b)** Coeficiente de partição: dado de lipofilicidade teórica (Rosso et al., 2006)

Figura 14 – Galatos de alquila acetilados inibem crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



A atividade antibacteriana dos galatos de alquila acetilados foi avaliada por meio do ensaio de REMA. Os dados apresentam a porcentagem de morte celular em relação à concentração de substância (µg/mL) e correspondem à média de três experimentos independentes (média $\pm$ desvio padrão). CP, controle positivo (canamicina 20 µg/mL); CV, Controle de veículo (DMSO 1%).

Tabela 2 – Dados comparativos de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) e lipofilicidade teórica entre galatos de alquila acetilados e galatos de alquila não acetilados.

Droga (R) ^a	Galatos de alquila acetilados			Galatos de alquila (Silva, <i>et al.</i> 2013)		
	C <i>log</i> P ^b	CIM ₉₀ (μM)	CIM ₉₀ (μg/mL)	C <i>log</i> P ^b	CIM ₉₀ (μM)	CIM ₉₀ (μg/mL)
Pentil (CH ₂) ₄ CH ₃	3,12	161,99	45,73	2,53	416,20	235
Hexil (CH ₂) ₅ CH ₃	3,58	116,90	34,65	2,92	267,42	90
Heptil (CH ₂) ₆ CH ₃	4,04	102,90	31,97	3,32	167,71	50
Octil (CH ₂) ₇ CH ₃	4,51	86,09	27,92	3,72	336,48	105

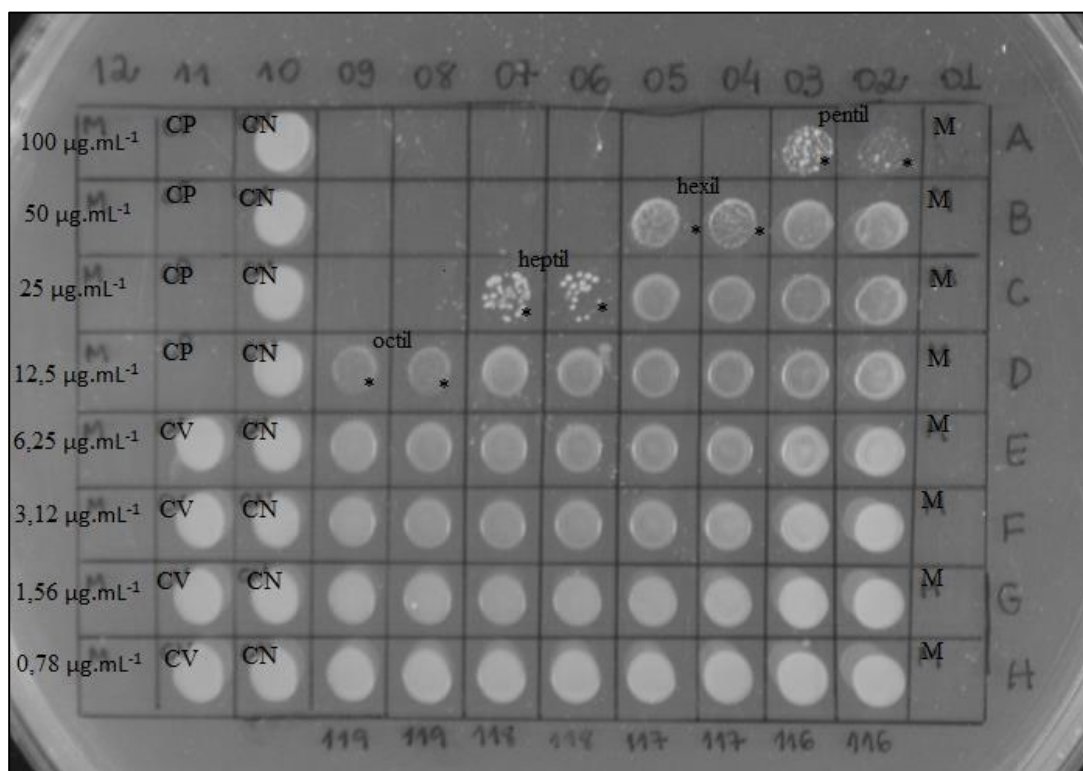
(a) R, grupo substituinte; (b) Coeficiente de partição: dado de lipofilicidade teórica (Rosso *et al.*, 2006)

3.2 Caracterização da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados

Para se determinar a atividade bactericida ou bacteriostática das substâncias em diferentes concentrações, utilizou-se a metodologia de plaqueamento em superfície. Os poços tratados com as substâncias foram plaqueados antes da adição de resazurina, durante o ensaio de REMA.

Os poços que apresentaram ~100% de inibição no ensaio de REMA em que, após o plaqueamento, não se observou crescimento, foram considerados poços que correspondem à concentração mínima bactericida (CMB) (**Figura 15**).

Figura 15 – Plaqueamento em superfície para determinação da atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados.



Poços marcados com asterisco apresentaram ~100% de inibição do crescimento bacteriano no ensaio de REMA e demarcam poços em que a concentração equivale à concentração bacteriostática, pois apresentam crescimento. Poços de concentrações acima, onde não houve crescimento, correspondem à concentração mínima bactericida (CMB). A CMB da substância G5 (galato de pentila modificado) é $>100 \mu\text{g/mL}$. Colunas 1 e 12: M (água). Colunas 2 e 3: galato de pentila acetilado. Colunas 4 e 5: galato de hexila acetilado. Colunas 6 e 7: galato de heptila acetilado. Colunas 8 e 9: galato de octila acetilado. Coluna 10: CN (controle negativo, 100 μL de meio de cultura). Poços 11A a 11D: CP (controle positivo, canamicina a 20 $\mu\text{g/mL}$). Poços 11E a 11H: CV (controle do veículo, solução de DMSO 1% em meio de cultura).

A concentração mínima bactericida (CMB) é definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 99,99% do inóculo bacteriano (NCCLS, 2003), e nesse caso, corresponde à menor concentração onde não houve crescimento após o plaqueamento, durante o ensaio de REMA. As concentrações abaixo desse valor, e que também apresentaram aproximadamente 100% de inibição do crescimento no ensaio de REMA, são consideradas concentrações bacteriostáticas. Os valores estão sumarizados na **tabela 3**.

Tabela 3 – Atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados.

Substância (R ^a)	CMB ^b (µg/mL)	Concentração bacteriostática (µg/mL)
Pentil (CH ₂) ₄ CH ₃	>100	100
Hexil (CH ₂) ₅ CH ₃	>50 <100	50
Heptil (CH ₂) ₆ CH ₃	>25 < 50	25
Octil (CH ₂) ₇ CH ₃	>12,5 < 25	12,5

(a) R, grupo substituinte (b) CMB, concentração mínima bactericida.

3.3 Tamanho celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na presença de galatos de alquila acetilados

Para se observar se os galatos de alquila acetilados seriam capazes de promover alterações no comprimento celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, as células foram submetidas a tratamento por 6 horas na presença das drogas na CIM₅₀.

A **figura 16** representa as médias e desvios-padrão de dois experimentos independentes ao longo de 6 horas em contato com os galatos de alquila acetilados. Cada tratamento gerou um total de n = 200 células. Os resultados de análise estatística encontram-se sumarizados na **tabela 4**. O tratamento com as drogas galato de heptila e galato de octila acetilados produziram aumento significativo na média do tamanho celular ($p < 0.05$).

A observação de que as células de *X. citri* apresentam aumento no tamanho celular médio sugerem que as drogas galatos de heptila e galto de octila acetilados apresentam como mecanismo de ação a divisão celular. Por outro lado, as drogas galato de pentila e de hexila acetilados podem ter outros alvos de ação que não a maquinaria de divisão celular.

Figure 16 – Tamanho celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tratadas com galatos de alquila acetilados na CIM₅₀ ao longo de 6 horas.

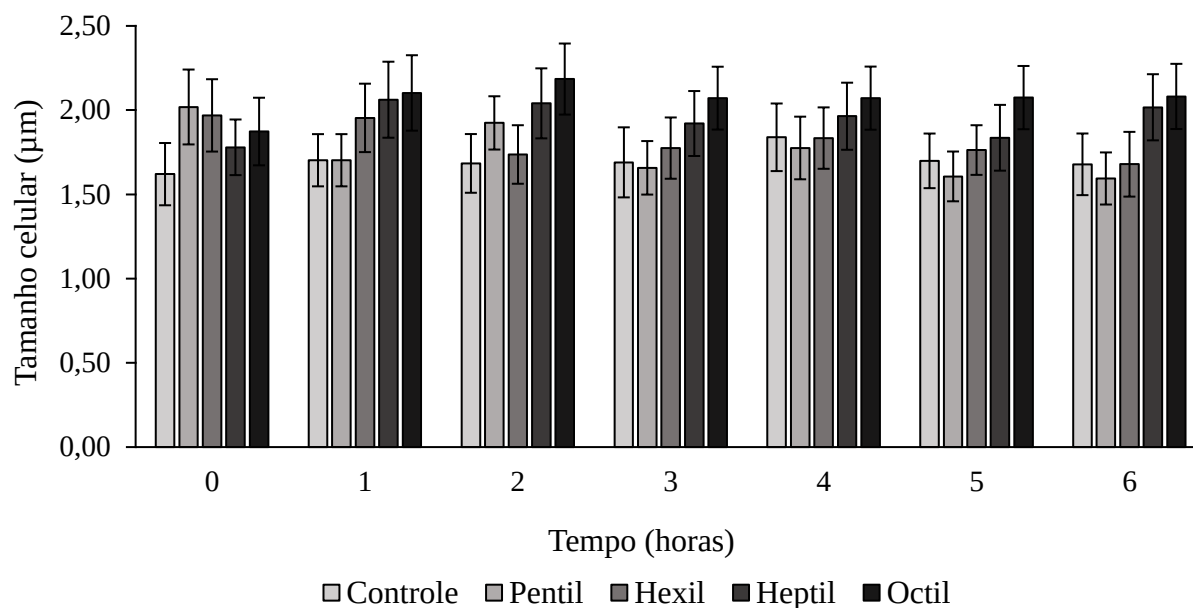


Tabela 4 – Comprimento de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tratadas com galatos de alquila acetilados.

Tratamento	Tamanho celular (μm)
Controle negativo	1,70 ± 0,36
Pentil	1,75 ± 0,34
Hexil	1,81 ± 0,37
Heptil	1,94 ± 0,39*
Octil	2,07 ± 0,4*

Células foram tratadas por seis horas a 30 °C; n = 200; dados correspondem à média ± desvio padrão. *valores estatisticamente significativos, pelo método *One-way* ANOVA com pós teste de Tukey, com $p < 0,05$, em relação ao controle negativo.

Os dados de aumento de tamanho celular de *X. citri* subsp. *citri* apresentados corroboram ainda aqueles descritos por Silva et al. (2013), em que heptil galato e octil galato não acetilados também induziram aumento significativo em *X. citri* subsp. *citri*, indicando que a acetilação da molécula pode não ter interferido na mudança do alvo de ação dessas drogas (KRÓL et al, 2015).

3.4 Galatos de alquila modificados podem ter como alvo a maquinaria de divisão celular

Galatos de alquila com cadeias laterais que variam de 6 a 8 átomos de carbono foram capazes de induzir um aumento do comprimento celular em *X. citri* subsp. *citri*, como descrito anteriormente por Silva et al. (2013). Subsequentemente, foi demonstrado que esse efeito é mediado por disrupção do processo de divisão celular (KRÓL et al., 2015). Os resultados anteriores (seção 4.3 deste trabalho) mostram que galatos de alquila acetilados também induzem aumento significativo em células de *X. citri* subsp. *citri* tratadas com os galatos de alquila acetilados.

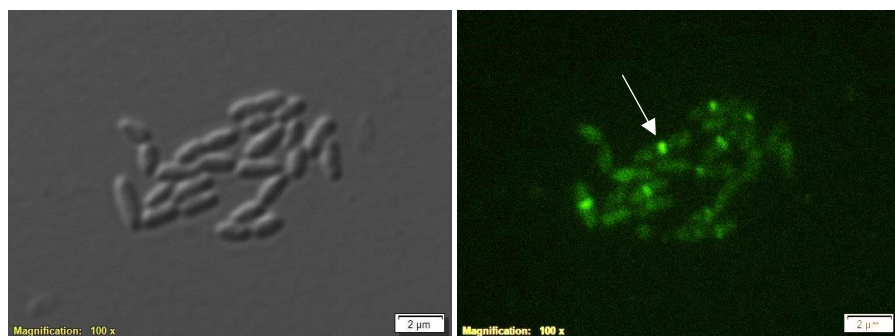
Com a finalidade de se verificar se os galatos de alquila acetilados teriam como alvo a maquinaria de divisão celular de *X. citri* subsp. *citri*, assim como os galatos de alquila dos quais se originaram, utilizou-se a técnica de microscopia de fluorescência. Para analisar *in vivo* o comportamento do septo divisional na presença das drogas, foi utilizada uma linhagem mutante *X.citri amy::pPM2a-ZapA* (MARTINS et al., 2010) que expressa GFP-ZapA, uma proteína acessória de divisão celular. ZapA é atraída para o anel Z durante a citocinese e o estabiliza aumentando a associação entre os protofilamentos de FtsZ. Portanto, a GFP-ZapA pode ser utilizada como um marcador do septo de divisão (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

Em condições normais de crescimento, as células de *X.citri amy::pPM2a-ZapA* apresentam acúmulo de fluorescência perpendicular ao eixo longitudinal, entre duas células em divisão (**Figuras 17A**, septo indicado pela seta). Os resultados mostram que células não tratadas ou tratadas com DMSO 1% - veículo no qual as drogas foram diluídas - exibiram o padrão normal de localização de GFP-ZapA. O mesmo fenótipo se verificou quando as células foram tratadas com galato de pentila e galato de hexila acetilados (dados não apresentados).

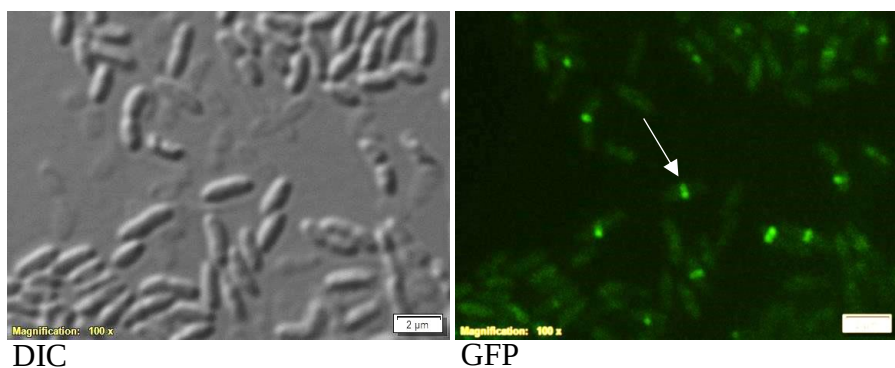
Entretanto, quando as células foram expostas aos galados de heptila e octila acetilados, pôde-se observar a completa disrupção do septo, em que a fluorescência GFP-ZapA se apresentou dispersa por todo o citoplasma. Esses resultados sugerem que as drogas podem atuar sobre a maquinaria de divisão celular de *X. citri* subsp. *citri* (**Figura 17**).

Figure 17 – Galatos de alquila promovem a disrupção do septo em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

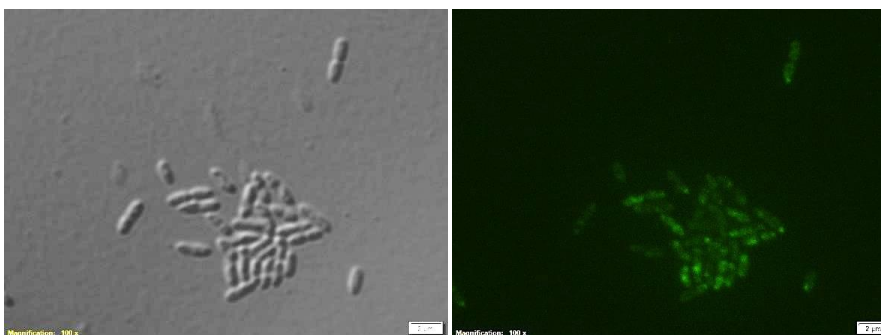
A *X. citri amy::pPM2a-ZapA* sem tratamento



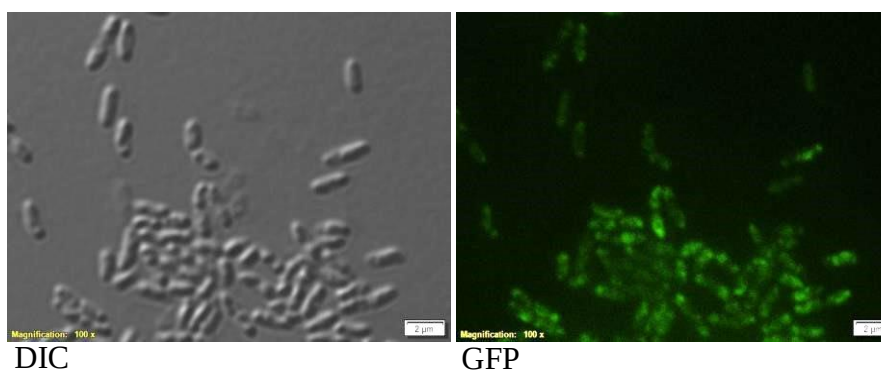
B *X. citri amy::pPM2a-ZapA* com DMSO 1%



C *X. citri amy::pPM2a-ZapA* com galato de heptila acetilado



D *X. citri amy::pPM2a-ZapA* com galato de octila acetilado



Células mutantes de *X. citri* subsp. *citri* expressando GFP-ZapA foram cultivadas até a DO (600nm) $\sim 0,3$ e submetidas ao tratamento com galatos de alquila acetilados nas concentrações correspondentes à CIM₅₀. A presença ou ausência de septo marcado com GFP-ZapA foi monitorado por microscopia de fluorescência após 10 minutos da adição das substâncias. **(A)** Células cultivadas na ausência das substâncias (controle negativo); **(B)** Células tratadas com DMSO 1% (controle do veículo). Septos estão indicados pelas setas; **(C)** Células tratadas com galato de heptila acetilado e **(D)** células tratadas com galato de octila acetilado (apenas dados das duas drogas que apresentaram padrão de disrupção do septo). DMSO: veículo no qual as drogas foram diluídas; DIC: Microscopia de Contraste por Interferência Diferencial. GFP: microscopia de fluorescência. A barra de escala corresponde a 2µm. Aumento de 100x.

4 CONCLUSÕES

As drogas estudadas no presente trabalho – galatos de alquila acetilados – apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em concentrações inibitórias mínimas comparáveis ao do controle positivo utilizado, a canamicina (20µg/mL).

Além disso, as moléculas de galato de alquila acetiladas mostraram-se em média 18% mais lipofílicas que as moléculas de galatos de alquila dos quais se originaram, e tiveram sua eficácia antimicrobiana aumentada em, no mínimo, 36 % (galato de pentila acetilado), chegando a até 80 % mais eficácia (galato de octila acetilado) quando comparados aos galatos de alquila não acetilados. Com base nesses resultados, é possível concluir que a acetilação promoveu um potencial aumento na atividade antimicrobiana dessas drogas.

As células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, tratadas com as drogas galato de heptila e galato de octila acetilados, tiveram aumento significativo no tamanho celular, quando comparadas ao controle negativo. Além disso, em análises *in vivo*, utilizando-se microscopia de fluorescência, as mesmas drogas promoveram ruptura do septo em *X. citri* subsp. *citri* marcada com GFP na proteína acessória de divisão celular ZapA. Esses resultados indicam que essas duas drogas possam ter a maquinaria de divisão celular como alvo.

CHAPTER 2

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

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) is the etiological agent of citrus canker, a disease that affects all the varieties of citrus of economic importance around the world. Currently, eradication of infected trees constitutes the only effective practice to control the spread of *X. citri*. This measure has enormous social and economic impact in the orange juice production industry. Related to this, recent relaxations in the policies of eradication within the state of São Paulo indicate that citrus canker may become endemic in the main orange producer of the world. In an effort to help the fight against citrus canker this work is focused on the development of environmental friendly drugs able to kill *X. citri*, yet with the smallest possible footprint in environment. In the present work, the drugs under investigation are the acetylated alkyl gallates, which derive from esters of gallic acid (SILVA et al., 2013). Acetylated alkyl gallates showed anti – *X. citri* activity, significant increase in cell length and, in microscopy analysis, they were found to disrupt the divisional bacterial septum. To further extend our investigation about the intracellular targets of the acetylated alkyl gallates, we assessed the effects of the drugs on purified *X. citri*-FtsZ *in vitro*. The results showed that acetylated heptyl and octyl gallates can inhibit the GTPase activity of FtsZ in 45%. However, the low solubility of the drugs were an issue throughout the biochemical experiments performed in this work. Despite this, acetylated alkyl gallates seemed to inhibit *X. citri* by dissipating the cell membrane potential.

Key words: Alkyl gallates, Z-ring, FtsZ, Polymerization, GTPase, Cell division.

1 INTRODUCTION

1.1 FtsZ as a target of new antibiotics

The development of antibiotic resistance is a current problem and unfortunately, most of new antibiotics that have been produced are variants of existent products. This means that bacteria can acquire resistance to these modified drugs and, in order to overcome this issue, there is an urgent need for new antibacterial agents with novel mechanisms of action. Bacterial cell division is an essential process that is not yet targeted by clinically approved antibacterials (LOCK; HARRY, 2008), nor used as a target to combat plant pathogens like citrus canker (BEHLAU et al., 2010; GOTTWALD, T. R.; TIMMER, 1995).

Division is an essential process for cell viability and it starts when cytoplasmic FtsZ (*Filamenting temperature-sensitive mutant Z*) polymerize in the midcell, forming the so-called Z-ring (BI, ERFEI; LUTKENHAUS, 1991). The Z-ring serves as a scaffold, recruiting other proteins and leading to a complex named divisome (LOWE; AMOS, 1998; VICENTE et al., 2006). The divisome carries out the division process at the right place and time during the cell cycle as it remains associated with the leading edge of the invaginating septum until division is completed (DE BOER et al., 1992).

FtsZ was characterized by *in vitro* and *in vivo* assays and its properties have been studied in a several Gram-negative and Gram-positive bacterial models such as *Escheria coli* and *Bacillus subtilis*. FtsZ is a GTPase protein which specifically binds and hydrolyses GTP (DE BOER et al., 1992). FtsZ monomers assemble into protofilaments by stacking vertically in a head-to-tail orientation and the GTP binding site is localized between two subunits of FtsZ, where the catalytic center is formed by the two neighboring monomers. (ERICKSON et al., 2010).

During the cell division process the Z-ring is dynamically maintained by the constant and quick turnover of the FtsZ polymers (CHEN; ERICKSON, 2005) which seems to be driven by FtsZ's GTP hydrolysis (DE BOER et al., 1992; MUKHERJEE; DAI; LUTKENHAUS, 1993; MUKHERJEE; LUTKENHAUS, 1994). GTP nucleotide is typically bound to the T2, T3 and T4 loops of the FtsZ molecule, whereas the γ -phosphate and the magnesium ion are also bound by the T7 loop of the subsequent FtsZ monomer.

FtsZ has long been recognized as an attractive target for potential antibiotic drugs due to three interesting properties: (I) the divisome components are essential for the cell viability, and thus for pathogenicity of the bacteria; (II) the division proteins are conserved among bacteria; and (III) they often have markedly different structures than their eukaryotic homologs (ADAMS; ERRINGTON, 2009; HAYDON et al., 2008; LUTKENHAUS, 1993). For example, bacterial FtsZ and FtsA are homologues of human tubulin and actin (BORK et al., 1992; VAN DEN ENT; LOWE, 2000), respectively, however, specific inhibitors of these bacterial cell division proteins have not been shown to perturb the eukaryotic homologues (LOCK; HARRY, 2008).

FtsZ polymerization has been extensively studied *in vitro*. There are simple methods to investigate the FtsZ polymerization, activity and interaction with other proteins or drugs. Król & Scheffers (2013) described some improvements in protocols to measure GTPase activity and FtsZ polymerization, including light scattering, sedimentation, GTP hydrolysis assays and electron microscopy. Sophisticated methods to study FtsZ polymerization often involve more specialized equipment, and/or mutant FtsZ with fluorescent labels (CHEN; ERICKSON, 2005).

2 GENERAL OBJECTIVES

The main objective of this work was to study *in vitro* FtsZ polymerization dynamics in the presence of the acetylated alkyl gallates and to confirm their mode of action by direct targeting the FtsZ protein from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

2.1 Specific Objectives

- To express and purify FtsZ protein from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in order to obtain soluble protein that can be used during the biochemical assays.
- To test the effect of acetylated alkyl gallates on the GTP hydrolysis activity of FtsZ over time.
- To monitor the FtsZ polymerization using sedimentation assay in the presence of the drugs.

3 MATERIAL AND METHODS

3.1 Expression and Purification of FtsZ from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

FtsZ protein from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* was expressed and purified using the ammonium sulfate precipitation method (KRÓL; SCHEFFERS, 2013; MUKHERJEE; LUTKENHAUS, 1998) with modifications.

To purify FtsZ from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, an overnight culture of *E. coli* BL21 containing the pET15b-FtsZ vector were grown at 37 °C and 200 rpm in 0.5 L of Luria broth (LB) culture medium supplemented with ampicillin (50 µg/ml). When the culture reached the optical density (OD_{600 nm}) in a range of 0.6 to 0.8, the FtsZ overproduction was induced for 4 hours by addition of 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were harvested by centrifugation in JLA 10.5 rotor for 15 min, 6000 × g at 4 °C and then re-suspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 50 mM KCl, 5mM magnesium acetate) including 1 tablet/10 mL Complete Mini Easy pack EDTA-free protease inhibitors (Roche).

After that, cells were lysed by sonication and 10-30 µL was withdrawn for SDS-PAGE analysis (cell extract, CE). Cell debris and insoluble particles were removed by centrifugation (JA 25.50 rotor, 15 min, 15.000 rpm and subsequently 45 min, 25.000 rpm, 4 °C) resulting in the cell free extract (CFE). The volume of the supernatant was measured and ammonium sulfate was carefully added up to 20% saturation to precipitate the soluble fraction containing FtsZ. The solution was incubated for 30 min with slowly stirring at 4 °C and then centrifuged at maximum speed, for 20 min at 4 °C in Allegra X-12 Series Centrifuge (Beckman Coulter). Another sample (supernatant, S) was withdrawn for SDS-PAGE analysis. The pellet was re-suspended in buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 50 mM KCl) and dialyzed overnight to the same buffer. The buffer was changed next day in the morning and the dialysis continued for a few more hours.

3.2 Determination of Protein Concentration

Protein concentration was determined with DC Protein Assay (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard.

3.3 GTPase Activity assay

The effect of the drugs on the GTPase activity of FtsZ was assessed by measuring the amount of inorganic phosphate (Pi) released from GTP hydrolysis by FtsZ as described by Król and Scheffers (KRÓL; SCHEFFERS, 2013) with modifications.

Solutions of 20 μ L of acetylated alkyl gallates at 100 μ g/mL, 10 μ M FtsZ and 10 mM MgCl_2 were prepared in polymerization buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9; 50 mM KCl; 0.02% Triton X-100). 1% DMSO and 2 mM EDTA were used as a vehicle control and polymerization control respectively. A 96-well qPCR plate was incubated for 5 min at 30 °C. The reaction was started by adding 20 μ L of 2 mM GTP dissolved in buffer B. Each reaction was performed in duplicate.

The reactions were stopped at different time points with working reagent from Malachite Green Phosphate Assay Kit (Bioassay), and incubated for 30 min at room temperature for color development. The absorbance was measured at 630 nm on a Powerwave plate reader (Biotek). The color development time was the same for each reaction. The free phosphate in every sample was calculated using a phosphate standard curve and the data was plotted as phosphate released over time. The final FtsZ GTP hydrolysis activity was calculated from the linear range of this curve.

3.4 Sedimentation Assay

The FtsZ sedimentation assay was carried out as described by Król and Scheffers (2013) with modifications.

5 μ M FtsZ was incubated at 30 °C for 5 min with/without 5 mM MgCl_2 and with/without 1 mM GTP or GDP, as indicated, in buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.9; 50 mM KCl). The samples were centrifuged at $180.000 \times g$, for 15 min at 20 °C. The supernatants (S) were carefully transferred to fresh tubes and the pellets (P) and supernatants (S) were re-suspended in equal volume of SDS-PAGE protein sample buffer. The amount of FtsZ in the samples was determined by SDS-PAGE, followed by staining with Coomassie Brilliant Blue.

The sedimentation assay with drugs was performed in the same conditions as described above but the reactions contained 10 μ M FtsZ and the tested drugs at 50 μ g/mL concentration or 1% DMSO (compound vehicle), as indicated. The total volume of each reaction was 50 μ L. After polymerization, a sample of 10 μ L was collected for SDS-PAGE (Whole Protein - W). 10 μ M FtsZ-interacting protein His-EzrA and/or bovine serum albumin (BSA) were used as controls.

3.5 Membrane Permeability Assay

An overnight culture of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* grown in NYG medium was diluted 1:100 into fresh NYG medium and grown at 30 °C and 200 rpm until exponential phase (O.D.₆₀₀ ~ 0.5 – 0.8). 1 mL of culture was treated with the drugs at MIC₅₀ or 1% DMSO and incubated for 60 min at the same conditions. A positive control for membrane permeability was performed using heat shock at 55 °C for 2 min. The samples were spun down at 11,000 × g for 30 sec and the pellets were re-suspended in 70 µL of 0.85% NaCl.

The membrane integrity was assessed using the Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The DNA-binding dyes propidium iodide (20 mM) and SYTO 9 (3.34 mM) were mixed in equal volumes, and 0.2 µL of the dye mixture was added to the cells, incubated for 5 min at room temperature and spun down again. The pellets were re-suspended in 1 mL of 0.85 % NaCl and cells were immobilized on agarose-covered slides for observation by fluorescence microscopy.

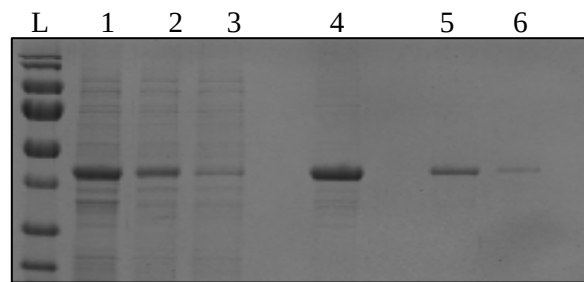
Two independent experiments were performed and more than 250 cells were counted in each treatment.

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Purification of FtsZ protein from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

FtsZ from *X. citri* subsp. *citri* was overproduced in *E. coli* BL21 cells and purified using ammonium sulfate precipitation as previously described in the section 3.1. The protein was purified in a soluble form in a high yield (130 mg of protein per litre of culture). SDS-PAGE analysis of the purified protein showed a single band (**Figure 18**) corresponding to molecular weight of ~43 kDa, which agrees with the calculated molecular weight.

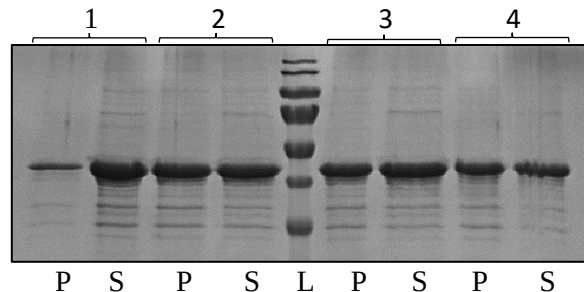
Figure 18 – SDS-PAGE of the FtsZ purification steps



(L) Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher) with 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 kDa bands; (1) Cell extract (CE); (2) Cell free extract (CFE); (3) Supernatant after 20% ammonium sulfate precipitation; (4) Dialyzed FtsZ protein; (5) Dialyzed FtsZ protein diluted 5 fold; (6) Dialyzed FtsZ protein diluted 10 fold.

Intriguingly, FtsZ from *X.citri* sedimented not only in the presence of GTP in the polymerization reaction, but as well as with GDP and in the absence of nucleotide in the reaction. However, without Mg^{2+} in the reaction, only minor amount of protein was found in the pellet (**Figure 19**). This result suggests that FtsZ from *X. citri* might have been purified with GTP bound to it, since the sedimentation is already seen only in the presence of magnesium.

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



5 μ M FtsZ was incubated only in buffer B (1); in the presence of 5 mM $MgCl_2$ (2); in the presence of 5 mM $MgCl_2$ and 1 mM GTP (3); in the presence of 5 mM $MgCl_2$ and 1 mM GDP (4). The samples were allowed to polymerize at 30 °C for 20 min and then centrifuged at $180\,000 \times g$. The bands were analyzed by SDS-PAGE gel. (P) Pellet and (S) Supernatant of each treatment are shown. (L) Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher) with 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35 kDa bands.

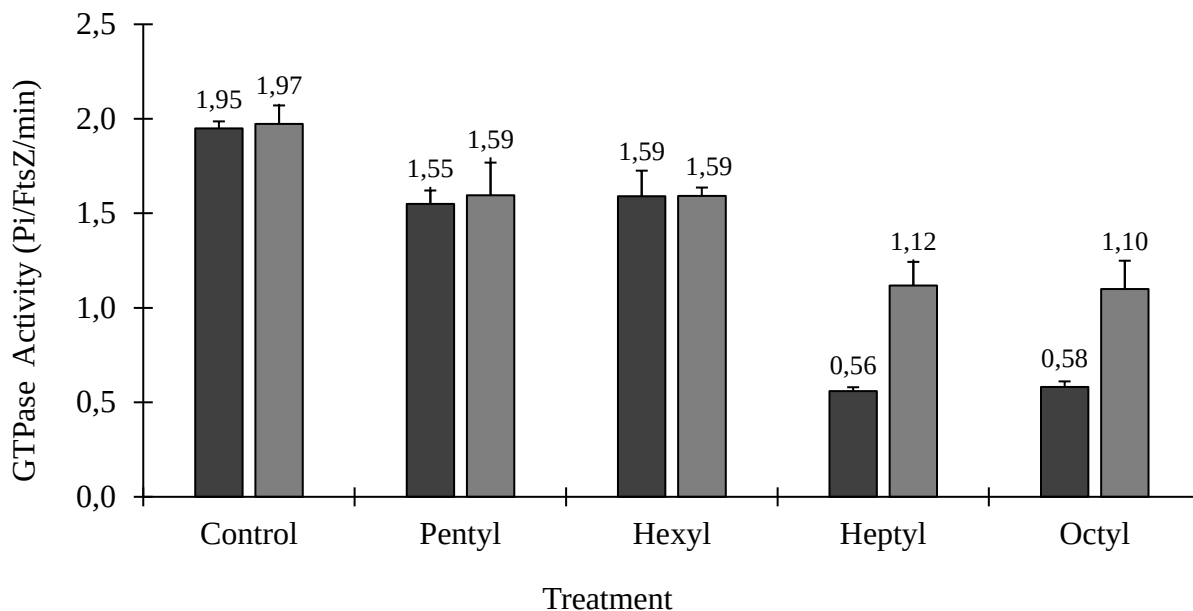
4.2 The GTPase Activity of FtsZ in the Presence of Acetylated Alkyl Gallates

During the cell division process the Z-ring is dynamically maintained by the constant and quick turnover of the FtsZ polymers (CHEN; ERICKSON, 2005) which seems to be driven by FtsZ's GTP hydrolysis (DE BOER et al., 1992; MUKHERJEE et al., 1993; MUKHERJEE; LUTKENHAUS, 1994). We assessed the GTPase activity of FtsZ purified from *X. citri* when incubated with the drugs.

To test this we used a malachite green sodium molybdate assay to quantify the inorganic phosphate produced by hydrolysis of GTP during FtsZ assembly in the presence of the tested drugs (ANDERSON et al., 2012). The GTPase activity of FtsZ protein in the presence of 50 µg/mL of acetylated alkyl gallates is shown (**Figure 20** – without Triton, dark grey bars). The GTPase activity of FtsZ in the presence of acetylated heptyl and octyl gallates was reduced by about 70% when compared with the control. Acetylated pentyl and hexyl gallates did not influence FtsZ GTPase activity significantly.

However, we have found some issues regarding the solubility of the drugs, most probably due to their high hydrophobicity (**Table 1, chapter 1**). Additionally, it has been reported that some small molecules identified as FtsZ inhibitors could form aggregates or colloids that block the GTPase activity of FtsZ in a non-specific manner. This aspecific inhibition can be avoided by the addition of the nonionic surfactant Triton X-100, which disrupts the aggregate forms of the drugs. Therefore, it prevents finding false-positives drugs in high throughput screening of FtsZ inhibitors (ANDERSON et al., 2012).

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



FtsZ from *X. citri* subsp. *citri* (5 μ M) was incubated with acetylated alkyl gallates at 50 μ g/ml (dark grey bars) and acetylated alkyl gallates at 50 μ g/ml with buffer complemented with 0.01% (w/v) of Triton X-100 (light grey bars). 1% DMSO was used as vehicle control. GTPase activity was monitored using malachite green assay. Averages and standard deviations of two experiments are shown.

As can be seen in **Figure 20**, acetylated heptyl and octyl gallates were in fact false positive inhibitors of the GTPase activity of FtsZ. This activity is higher in the presence of Triton X-100, however, acetylated heptyl and octyl gallate still showed approximately 45% of GTPase inhibition in the presence of surfactant. Unfortunately, this inhibition may not be originated from the intrinsic ability of the drugs to block GTPase activity, because even in the presence of 0.01% Triton X-100 the sample presented some level of turbidity. In addition, higher concentrations of Triton X-100 seems to have a negative effect on GTPase activity (ANDERSON et al., 2012) and lower concentrations of drugs (25 μ g/mL) showed no inhibition of protein's GTPase activity (*data not shown*).

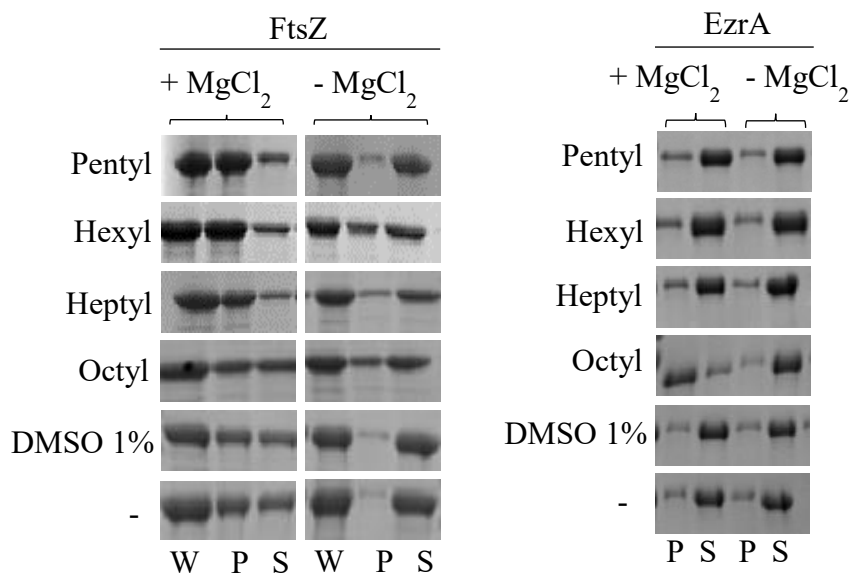
4.3 Sedimentation of FtsZ in Presence of Acetylated Alkyl Gallates

FtsZ polymerization in the presence of acetylated alkyl gallates was also assessed by the sedimentation assay. Because *X. citri* FtsZ showed atypical behavior and it sedimented without the nucleotide, but in the presence of magnesium, we decided to carry out the sedimentation assay only in the presence and absence of magnesium.

The drugs were added to the reaction mixture at the beginning of the polymerization reaction at 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration and the reaction proceeded further for 20 min. FtsZ sedimented more in the presence of the drugs when compared with the negative control (FtsZ without drugs) and the vehicle control (FtsZ with 1% DMSO) (**Figure 21**). The pellets were bigger when compared with the supernatant in the controls with MgCl_2 . The results showed a correlation between the amount of protein sedimented and the alkyl-size chain.

However, acetylated octyl gallate was also able to sediment the FtsZ-binding protein EzrA. This result suggests that, in the presence of the drug, the sedimentation of FtsZ could be a result of aspecific protein aggregation caused by the low solubility of the drugs.

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



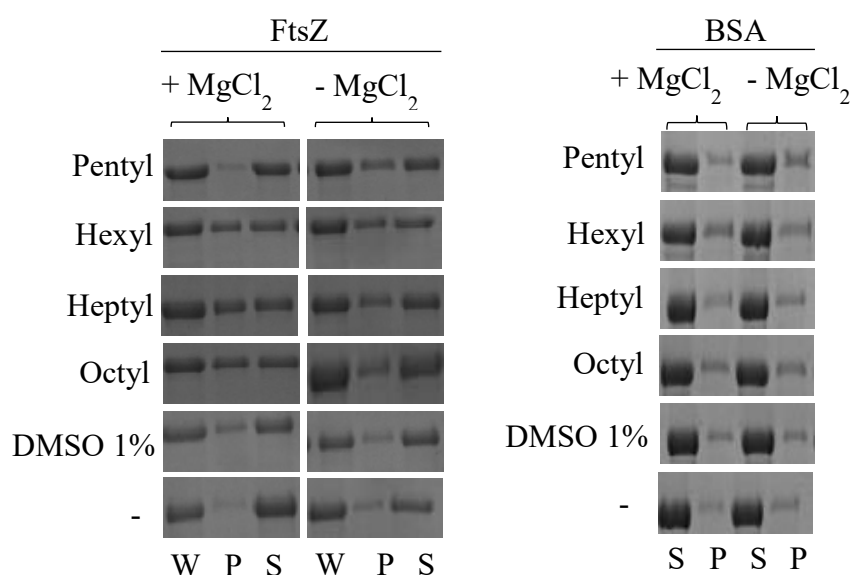
5 μM FtsZ was incubated with acetylated alkyl gallates (50 $\mu\text{g/mL}$). In the sample without drug (-) the same volume of polymerization buffer was added to the sample as for the treatment. EzrA protein (5 μM) was used as a control.

In order to exclude false positives, as discussed above for the GTPase activity, a second sedimentation assay containing the polymerization buffer complemented with 0.01% Triton X-100

was performed. The results (**Figure 22**) demonstrate that Triton X-100 decreased the level of sedimentation of the FtsZ protein during the test, also for the control without drug.

Acetylated hexyl, heptyl and octyl gallates were still able to sediment the protein, but pentyl showed no pellet after centrifugation. The drugs were not able to sediment the protein used as a control (BSA) indicating that acetylated hexyl, heptyl and octyl gallates could have specific activity on FtsZ polymerization.

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



5μM FtsZ was incubated with acetylated alkyl gallates (50 μg/mL) and 0.01% Triton X-100 in buffer B. In the sample without drug (-) the same volume of polymerization buffer was added to the sample instead of drug. BSA (10 μM) was used as a control.

This results, however, should be taken carefully, because of the low solubility of the drugs. 0.01% Triton X-100 could have increased the solubility of acetylated pentyl gallate, and because of that, no FtsZ pellet fraction was presented. This result indicates that this drug might have no effect on FtsZ clustering or aggregation. On the other hand, 0.01% of Triton X-100 was not sufficient to solubilize the other drugs that present higher lipophilicity.

The sedimentation results of the protein control (BSA) also showed that the pellets of BSA are slightly bigger in the presence of the drugs, especially when MgCl₂ is presented. This supports the claim that the drugs were not completely soluble with 0.01% Triton X-100. For acetylated

pentyl gallate the effect seems to be reversed – it seems more soluble with MgCl_2 than without and this is also what is observed with the pellet of BSA and FtsZ.

Higher concentrations of Triton X-100 would be needed to solubilize the others acetylated alkyl gallates, but it is known that increased detergent concentrations might affect FtsZ activity (ANDERSON et al., 2012).

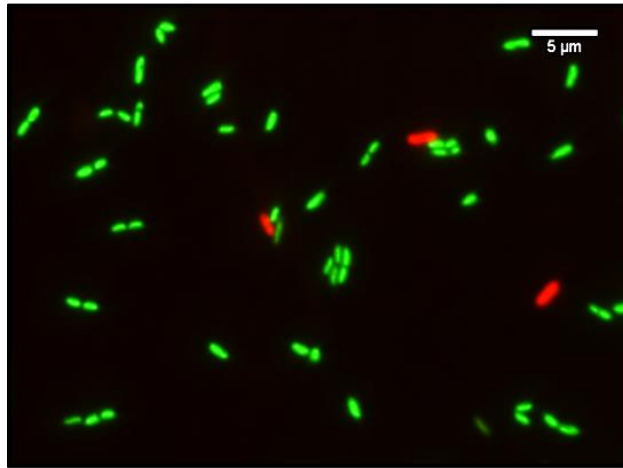
Therefore, it remains difficult to confirm that the sedimentation of FtsZ protein when treated with acetylated alkyl gallates are caused by their intrinsic ability to affect the cell division protein, or if it is most probably due to protein aggregation caused by the drugs low solubility.

4.4 Acetylated Alkyl Gallates Increase the Membrane Permeability in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

It has been shown that drugs found to disrupt the cell division machinery *in vivo* can also disrupt cell membrane function (BEURIA; SANTRA; PANDA, 2005; DOMADIA et al., 2007; JAISWAL et al., 2007; KRÓL et al., 2015; MARGALIT et al., 2004). Consequently, these drugs produce phenotypes that are similar to the inhibition of proteins associated with membranes, including bacterial cytoskeleton homologs, such as FtsZ. Furthermore, the loss of the transmembrane potential was recently reported as a negative regulator of FtsZ function (STRAHL; HAMOEN, 2010). Based on the results described here about the effect of acetylated alkyl gallates on the cell division protein FtsZ, we wanted to investigate whether the disruption of septa observed in the *in vivo* assay (section 1.3) was caused by the change in the transmembrane potential.

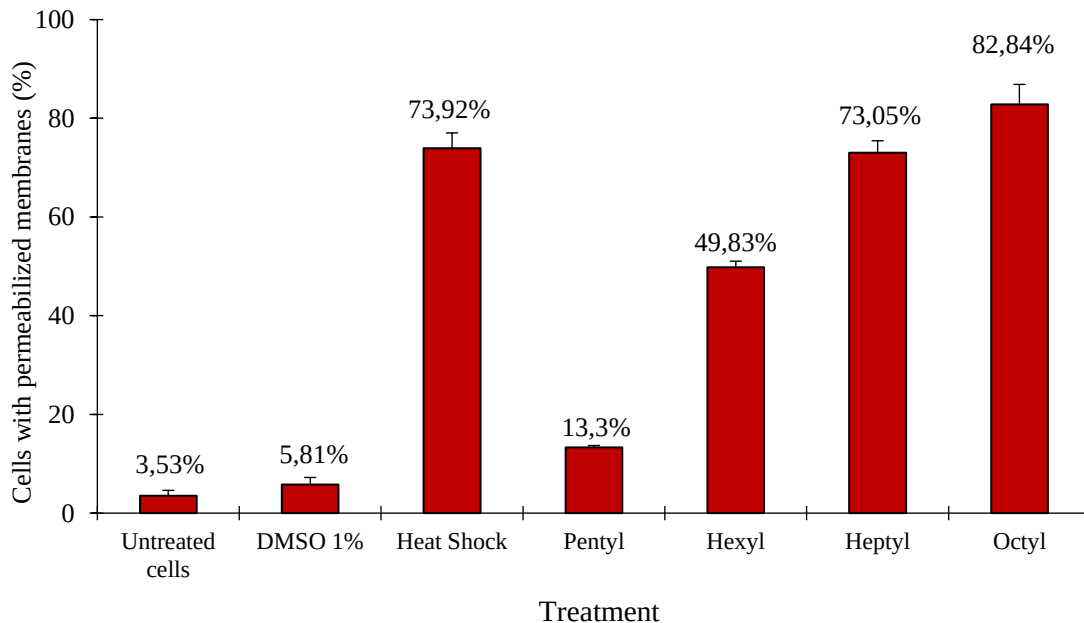
To assess the effect of the acetylated alkyl gallates on cell membrane integrity *in vivo*, we used the Live/Dead BacLight kit used in that assay is based on a mixture of two nucleic acid binding dyes: green SYTO 9 and red propidium iodide. These dyes have different ability to penetrate bacterial cell membranes. SYTO 9, when alone, stain all cell nucleotides – the ones with intact as well as damaged membranes. In the other hand, propidium iodide penetrates only bacteria with damaged membranes, causing a reduction in the SYTO 9 fluorescence when both are together. Consequently, using a proper mixture of the dyes, bacteria with damaged cell membranes are stained as red fluorescent, and intact cell membranes are stained as green fluorescent (**Figure 23**).

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



Illustrative example of the colorimetric pattern of untreated cells of *X. citri* colored by Live/Dead BacLight (Invitrogen) visualized under fluorescence microscopy. Bar corresponds to 5 μm . Magnification x100.

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



Cells of *X.citri* subsp. *citri* were incubated with the drugs at MIC_{50} or 1% DMSO for 1 hour and membrane integrity was assessed with the Live/Dead assay. Heat Shock at 55 °C for 2 minutes was used as a positive control. The experiment was performed twice and more than 250 cells were counted per treatment. The values were converted into percentages; average and standard deviation are shown.

A treatment of heat shock, which is known to perturb membrane structure (MORIMOTO, 1991), was used as a positive control. All acetylated alkyl gallates were able to cause damage in the membrane *in vivo* in different extent, depending on the length of the alkyl chain of the acetylated alkyl gallate (**Figure 24**). The biological activity (STRAHL; HAMOEN, 2010) of a simple organic compound was previously found to correlate with their theoretical lipophilicity value, represented as the $C \log P$ – a partitioning coefficient between *n*-octanol and water (ROSSO et al., 2006). It is clear that the lipophilicity of a molecule plays an important role in the antibacterial activity.

The effect of acetylated alkyl gallates in the cell membrane might be related to their amphiphilic properties. Structurally, the amphiphilic properties of the tested drugs originate from the presence of two groups: the phenolic hydroxyl groups (hydrophilic moiety) and the alkyl side chains (lipophilic tail).

An increasing in the permeability of cells is observed accordingly with the alkyl chain length – acetylated pentyl gallate showed 13.3% permeability, while acetylated octyl gallate showed 82.84%. It is likely that the alkyl chain length of acetylated alkyl gallates influences directly their ability to penetrate lipid bilayer membranes and thus, cause damage to cell membranes.

The disruption of the divisome visualized using cells of the mutant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* amy::pPM2a-ZapA (MARTINS et al., 2010) upon treatment with the acetylated alkyl gallates suggested that the drugs could be targeting the essential bacterial cell division protein FtsZ *in vivo* (results from section chapter 1). Based on the data obtained in this work, the mislocalization of the septum can be explained by the fact that many cell division-related proteins have an organized distribution and localization modulated by a proton motive force that comes from the membrane potential (FOSS et al., 2013; STRAHL; HAMOEN, 2010). Once the membrane potential is disrupted many cell division proteins have their localization, structure or membrane binding affected. Strahl & Hamoen (2010) reported the effect of CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) – a well-known dissipator of membrane proton motive force – on protein localization in *Bacillus subtilis* (STRAHL; HAMOEN, 2010). They found that in the presence of CCCP FtsZ and ZapA had a reduction in septal localization.

In summary, although acetylated heptyl gallate and acetylated octyl gallate may bind FtsZ *in vitro*, the mislocalization of membrane-associated protein observed in *in vivo* experiments may be due to the changes in the physicochemical properties of membranes.

5 CONCLUSIONS

FtsZ has long been recognized as an attractive target for potential antibacterial drugs. In the present work, we investigated the FtsZ polymerization dynamics in the presence of acetylated alkyl gallates. We made use of standard methodologies such as GTPase activity and sedimentation assay in order to confirm their mode of action by targeting the FtsZ protein from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Acetylated alkyl gallates were derived from alkyl gallates previously described as good inhibitors of *X. citri* growth (SILVA et al., 2013). The modification chemically led to an increase of their theoretical lipophilicity ($C \log P$ value) which consequently increased the activity of the drugs against the tested bacteria.

Besides the great results regarding the activity of the acetylated alkyl gallates in *X. citri*, the low solubility of the drugs were an issue throughout the biochemical experiments performed in this work. Due to the high lipophilicity of the acetylated alkyl gallates compared with the unmodified alkyl gallates and the high concentrations of salt in the buffer required for FtsZ polymerization, the drugs presented here were less suitable for the methodologies. Consequently, the impact of the drugs on FtsZ polymerization remains unclear.

Despite this, acetylated heptyl and octyl gallates seemed to inhibit *X. citri* by dissipating the cell membrane potential. These drugs presented a typical phenotype of mislocalization of FtsZ-associated protein (ZapA) in the *in vivo* experiments with GFP-ZapA mutant (Chapter 1). However, many FtsZ inhibitors – including the alkyl gallates (KRÓL et al., 2015), can also affect membranes in different concentrations than they affect FtsZ protein. Therefore, it remains necessary to confirm its ability to target FtsZ using other concentrations as well as using other methodologies such as light scattering, electron microscopy or binding of the drugs to FtsZ.

Nevertheless, acetylated pentyl and hexyl gallate do not showed to have any effect on septum *in vivo* and they were not able to inhibit GTPase activity. Instead of this, they showed reasonable effect on membrane permeability, concluding that their mechanism of action is also mostly like non-ionic surfactants, as well as the other two in the tested concentration

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MERKL, R. et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters. **Czech J. Food Sci.**, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2., 2002.

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

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

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

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

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

SANCHES, A. L. R. et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, p. 549-566, 2014.

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

SCHAAD, N. W. et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv.

phaseoli (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Syst Appl Microbiol**, v. 28, n. 6, p. 494-518, Aug 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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