

---

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

---

**CHALCONAS E CURCUMINOIDES COMO NOVAS ALTERNATIVAS PARA  
COMBATER O CANCRO CÍTRICO E ALGUNS PATÓGENOS DE INTERESSE  
CLÍNICO**

**LUANA GALVÃO MORÃO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Aplicada.

**Novembro - 2018**

LUANA GALVÃO MORÃO

CHALCONAS E CURCUMINOIDES COMO NOVAS ALTERNATIVAS PARA  
COMBATER O CANCRO CÍTRICO E ALGUNS PATÓGENOS DE INTERESSE  
CLÍNICO

Orientador: PROF. DR. HENRIQUE FERREIRA

Co-orientador: PROF. DR. LUIS OCTAVIO REGASINI

Tese apresentada junto ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do título  
de Doutor em Microbiologia Aplicada.

Rio Claro

2018

M829c Morão, Luana Galvão  
Chalconas e Curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cístico e alguns patógenos de interesse clínico / Luana Galvão Morão. -- Rio Claro, 2018  
197 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira  
Coorientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

1. Chalconas. 2. Curcuminoides. 3. Cancro cístico. 4. Patógenos de interesse clínico. 5. Agentes antimicrobianos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

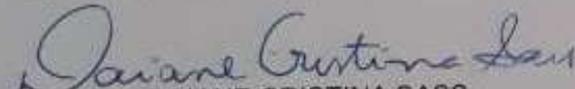
TÍTULO DA TESE: NOVAS CLASSES DE COMPOSTOS SINTÉTICOS: UMA ALTERNATIVA PARA COMBATER O CANCRO CÍTRICO E ALGUNS PATOGÊNICOS DE INTERESSE CLÍNICO

**AUTORA: LUANA GALVÃO MORÃO**  
**ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA**  
**COORIENTADORA: ISABEL CRISTIANE DA SILVA**

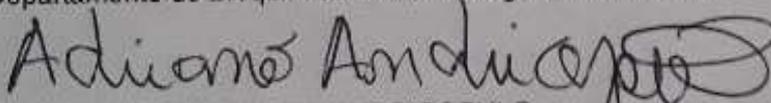
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. ADRIANO DEFINI ANDRICOPULO  
Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO  
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA  
Departamento de Biotecnologia / Instituto Agrônomo de Campinas

Rio Claro, 08 de novembro de 2018

Título alterado para: "CHALCONAS E CURCUMINOIDES COMO NOVAS ALTERNATIVA PARA COMBATER O CANCRO CÍTRICO E ALGUNS PATÓGENOS DE INTERESSE CLÍNICO"

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvana e Alencar, meu irmão Kauan e, especialmente, a minha filha amada Maria Eduarda. Sem o amor e paciência de vocês nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a Deus e aos meus anjos e mentores de luz que sempre me guiaram em todos os meus caminhos. Agradeço, imensamente, a minha família – Silvana, Alencar, Kauan e Duda por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos até mesmo nos mais difíceis. Vocês com certeza foram impulso e incentivo para que eu sempre continuasse em frente, com muita determinação, perseverança e fé. Duda agradeço você, em especial, minha filha, por ter sido meu grande presente no decorrer desse doutorado e que, desde então, tem me ensinado a ser um ser humano melhor. Dedico todo meu amor e esforço profissional a você.

Agradeço ao meu grande amigo e companheiro Felipe, que sempre me deu ânimo para continuar estudando, sonhando e lutando.

Agradeço aos meus colegas de departamento Lorena, Vinicius, Jaqueline, Lusiane, Susan, Tatiane, Patrícia, Gabrielle, pela amizade e companheirismo. Agradeço também toda a equipe do laboratório de Genética de Bactérias (LGB), em especial minha grande amiga Lilian.

Meu sincero e mais verdadeiro agradecimento para meu orientador Prof. Dr. Henrique Ferreira, que me recebeu no laboratório de braços abertos e me deu toda a estrutura para que eu pudesse trabalhar e aprender da melhor maneira possível. Devo a você tudo o que sei e sou, hoje, profissionalmente. Agradeço também ao Prof. Dr. Fernando Pavan por ter me recebido no laboratório da UNESP de Araraquara e ter me incluído à equipe como se fosse um de seus alunos.

Agradeço, grandemente, ao Prof. Dr. Luis Otávio Regasini que junto do professor Henrique, encabeçou todo o projeto temático. Além disso, agradeço pela co-orientação e por dispendir tempo e dedicação na síntese e fornecimento dos compostos para que fosse possível a realização deste trabalho. Agradeço também aos alunos e amigos do professor Luis, que contribuíram para este trabalho – Bia, Gabi e, especialmente, Carlos.

Agradeço ao Prof. Dr. Dirk-Jan Scheffers, nosso colaborador da Holanda, por contribuir com análises e uma grande parceria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Finalmente, agradeço ao projeto FAPESP-NWO 2013/50367-8 e à CAPES por financiarem a minha pesquisa e garantirem a oportunidade de trabalhar com aquilo que amo: a Microbiologia.

Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isto não tem muita importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado. (William Shakespeare)

## RESUMO

O cancro cítrico é uma das doenças mais preocupantes no âmbito da citricultura. Causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* esta doença caracteriza-se pela aparição de lesões eruptivas e corticosas, castanho-amareladas em diversas partes aéreas das mais variadas espécies de Citros, sendo algumas mais susceptíveis que outras. Além disso, a infecção bacteriana na planta hospedeira desencadeia algumas alterações fisiológicas e metabólicas da planta dentre elas a produção demasiada de etileno, o que causa outro sintoma característico da doença, a queda prematura de frutos, o maior problema que o cancro cítrico acarreta, uma vez que os frutos não estão maduros e prontos o suficiente para serem colhidos e comercializados, podendo gerar prejuízo ao citricultor. Até o momento não há substâncias que sejam eficientes contra a bactéria *Xanthomonas citri*. Existem apenas medidas paliativas e, essencialmente, preventivas tais como a utilização de quebra ventos nos pomares, controle de mudas sadias, controle da larva minadora (*Phyllocnistis citrella*) e pulverização massiva de soluções de cobre fixo. A aplicação de soluções cúpricas é prejudicial ao meio ambiente, uma vez que o cobre tem efeito tóxico, cumulativo, carcinogênico e mutagênico, em pequenas quantidades. Sabe-se, também que há genes de resistência ao cobre, já existentes em *X. citri*.

Paralelamente ao setor citrícola, tem-se a indústria farmacêutica e o extremo desafio em descobrir e produzir novas classes de antimicrobianos que apresentem capacidade de aniquilar diversas bactérias patogênicas de interesse clínico. O grande problema enfrentado, neste caso, é o uso incorreto de antimicrobianos existentes combinado com o aumento desenfreado de resistência bacteriana e ainda com a burocracia e alto custo nas pesquisas de ponta visando novas substâncias bioativas.

Considerando a necessidade da obtenção de novas classes de substâncias potencialmente ativas e com menor taxa de toxicidade, tanto no setor citrícola quanto farmacêutico, nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o Instituto de Química (Laboratório de Química Verde Medicinal) da UNESP de São José do Rio Preto e Universidade de Groningen, na Holanda, objetivaram a síntese de classes de compostos derivados de substâncias naturais, a fim de avaliar sua capacidade antimicrobiana frente ao fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri* bem como a alguns microrganismos de interesse clínico e modelos microbiológicos, tais como *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica Typhimurium*, *E. faecalis* e *S. aureus*. Ao todo foram testadas três classes de compostos sintéticos derivadas de curcumina e chalconas pelo método de microdiluição REMA. Também foi investigado o modo de ação dos compostos que foram bioativos, através de diversas técnicas: ensaio da integridade de membrana citoplasmática, ensaio de ruptura de septo de divisão celular, análise com FT-IR, análise da atividade GTPásica de FtsZ (associado ao septo de divisão celular), avaliação de síntese de macromoléculas através de radiomarcadores (para DNA, RNA, proteínas e parede celular) e dosagem de ATP intracelular para avaliar perturbação na via energética.

Nove compostos foram ativos contra *B. subtilis*, seis contra *X. citri* e dois contra *S. aureus*, atingindo um percentual de inibição de crescimento bacteriano maior que 90%. Testes realizados em plantas infectadas com *X. citri*, tratada com os compostos, mostraram a eliminação da capacidade de causar cancro comparado aos controles negativos. Os testes do modo de ação destes compostos sugeriram que alguns podem ter ação multi target, outro composto mostrou ação específica na desestruturação da integridade da membrana citoplasmática e outro ainda demonstrou agir na ruptura do septo de divisão celular bacteriana. No entanto análises futuras e novos testes do modo de ação podem confirmar e completar esses resultados.

**Palavras-chaves:** *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, cancro cítrico, patogênicos, compostos sintéticos, antimicrobianos.

## ABSTRACT

Citrus canker is one of the most worrying diseases in the citrus industry. Caused by Gram-negative bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* this disease is characterized by the appearance of eruptive, yellow-brown lesions in several aerial parts of the most varied *Citrus* species, some being more susceptible than others. In addition, the bacterial infection in the host plant triggers some physiological and metabolic changes of the plant, among them the production of too much ethylene, which causes another characteristic symptom of the disease, premature fruit drop, the biggest problem that citrus canker causes, since the fruits are not ripe and ready enough to be harvested and marketed, may cause harm to the farmer. To date there are no substances that are effective against the bacterium *Xanthomonas citri*. There are only palliative and, essentially, preventive measures such as the use of windbreaks in orchards, control of healthy seedlings, control of the larvae (*Phyllocnistis citrella*) and massive spraying of fixed copper solutions. The application of copper solutions is harmful to the environment, since copper has a toxic, cumulative, carcinogenic and mutagenic effect, in small amounts. It is also known that copper resistance genes already exist in *X. citri*.

Parallel to the citrus industry, there is the pharmaceutical industry and the extreme challenge of discovering and producing new classes of antimicrobials that have the capacity to kill several pathogenic bacteria of clinical interest. The major problem faced in this case is the misuse of existing antimicrobials combined with the unbridled increase in bacterial resistance and still with the bureaucracy and high cost in cutting-edge research aiming new bioactive substances.

Considering the need to obtain new classes of potentially active substances with a lower toxicity rate, both in the citrus and pharmaceutical sectors, our research group, in collaboration with the Institute of Chemistry (Laboratório de Química Verde Medicinal) of UNESP of São José do Rio Preto and the University of Groningen, in the Netherlands, aimed to synthesize classes of compounds derived from natural substances in order to evaluate their antimicrobial capacity against the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* as well as to some microorganisms of clinical interest and microbiological models such as *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica Typhimurium*, *E. faecalis* and *S. aureus*. In all, three classes of synthetic compounds derived from curcumin and chalcones were tested by the REMA microdilution method. It was also investigated the mode of action of the compounds that were bioactive, through several techniques: cytoplasmic membrane integrity assay, cell division septum disruption assay, FT-IR analysis, analysis of GTPase activity of the FtsZ (associated with the cell division septum), evaluation of macromolecular synthesis through radiolabels (for DNA, RNA, proteins and cell wall) and dosage of intracellular ATP to evaluate disturbance in the energy pathway.

Nine compounds were active against *B. subtilis*, six against *X. citri* and two against *S. aureus*, reaching a percentage of inhibition of bacterial growth greater than 90%. Tests performed on plants infected with *X. citri* treated with the compounds showed the elimination of the ability to cause canker compared to the negative controls. The mode of action tests of these compounds suggested that some may have multi target action, another compound showed specific action on cytoplasmic membrane integrity disturbance and another still showed to act on bacterial cell division septum disruption. However, future analyzes and new mode of action tests can confirm and complete these results.

**Key-words:** *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*, citrus canker, pathogens, synthetic compounds, antimicrobials.

## LISTA DE FIGURAS

<b>I Figura 1</b> - Árvores com sintoma de cancro por região.....	26
<b>I Figura 2</b> - Lesões típicas de cancro cítrico.....	28
<b>I Figura 3</b> - Estrutura das proteínas da família PthA/AvrBs3. LRR- Região de Leucinas Repetidas; NLS- Sinal de Localização Nuclear e AAD- Domínio Ativador Transcricional Ácido.....	35
<b>I Figura 4</b> - Modelo esquemático das quatro variantes de PthAs. A diferença entre elas está na região de domínio repetido interno.....	36
<b>I Figura 5</b> - Principais sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas. Tipo I, exemplo de secreção de hemolisinas em <i>Escherichia coli</i> . Tipo V, montagem do P-pili em <i>E. coli</i> . Tipo II, secreção de pululanase por <i>Klebsiella axytoca</i> . Tipos III e IV, secreção de proteínas em <i>Xac</i> . C: meio intracelular bacteriano. MI: membrana interna bacteriana. P: espaço periplasmáticos. ME: membrana externa. E: espaço extracelular bacteriano.....	39
<b>I Figura 6</b> - Estrutura geral das chalconas.....	44
<b>I Figura 7</b> - Reação Genérica de Condensação Aldólica de Claisen-Schmidt para obtenção de (A) hidroxichalconas e (B) metoxichalconas.....	46
<b>I Figura 8</b> - Modelo de aplicação para teste de infiltração “ <i>in planta</i> ” com dose subletal.....	50
<b>I Figura 9</b> - Modelo de aplicação na folha (teste com dose segura).....	51
<b>I Figura 10</b> - Avaliação de MBC para Hidroxichalconas e Metoxichalconas contra <i>X. citri</i> em função da concentração de composto utilizada.....	55
<b>I Figura 11</b> - Teste de infiltração “ <i>in planta</i> ” com dose subletal para os compostos bioativos. CN: Controle Negativo; DMSO 1%: Controle do Veículo .....	56

<b>I Figura 12</b> - Níveis de resistência registrados diariamente para populações de <i>Xac</i> contra (A) A4 (B)A11 (C) A19 (D) BC1 (E) MA1 (F) T9A e canamicina (Controle positivo).....	57
<b>I Figura 13</b> - Dose segura para aplicação “ <i>in planta</i> ” com os compostos bioativos. CN: Controle negativo – <i>Xac</i> sem tratamento e salina.....	58
<b>I Figura 14</b> - Avaliação de permeabilidade de membrana para <i>X.citri</i> com células sem tratamento (controle negativo - CN); tratadas com DMSO 1% (controle veicular); tratadas com aquecimento térmico 50°C – 20 min (controle positivo - CP); aquecimento térmico 60°C – 20 min (controle positivo - CP) e tratadas com os compostos bioativos na MIC <sub>90</sub> , durante o contato de 15 e 30 min. Ampliação: 100 x. Barra: 5μ.....	59
<b>I Figura 15</b> - Avaliação de desestruturação de septo com <i>X. citri</i> GFP-ZapA com células sem tratamento (controle negativo - CN), tratadas com DMSO1% (controle do veículo); tratadas com galato de hexila (controle positivo - CP) (SILVA et al., 2013) e tratadas com os compostos bioativos na MIC <sub>90</sub> , durante o contato de 15 e 30 min. Ampliação: 100x. Barra 5μ.....	64
<b>I Figura 16</b> - Concentração de ATP (unidades relativas de luz) após 80 minutos de tratamento de células de <i>Xac</i> com 1x e 2x MIC de <b>BC1</b> e <b>T9A</b> ; 40 μg.mL <sup>-1</sup> de CCCP. 100% foi definido como a mediana da luminescência da amostra controle sem qualquer composto adicionado, cada círculo representa uma réplica e barras indicam a mediana de cada condição testada.....	67
<b>I Figura 17</b> - Efeitos em <i>Xac</i> para as quatro principais vias de síntese macromolecular de <b>BC1</b> e <b>T9A</b> , tanto em comparação com controles negativos (-) como antibióticos com atividades específicas direcionadas para DNA, RNA, proteína e síntese de peptidoglicano: Ciprofloxacina (Cip), Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tet) e Benzil Penicilina (PenG);	

respectivamente. Cada círculo representa uma réplica experimental, barras indicam a incorporação relativa mediana em cada condição testada.....	69
<b>I Figura 18</b> - Resultados de REMA em curto período para <i>Xac</i> .....	69
<b>RL Figura 1</b> - Custo para investigação e produção de novos fármacos no decorrer dos anos.....	92
<b>RL Figura 2</b> – Estrutura geral dos curcuminoides.....	95
<b>III Figura 1</b> - Análise comparativa do potencial antimicrobianos em função dos sítios ativos das moléculas entre (A) chalcona e flavona e (B) hidroxichalcona e hidroxiflavona.....	118
<b>III Figura 2</b> - Análise comparativa do potencial antimicrobiano em função das hidroxilas ligadas em anéis diferentes entre posições (A) <i>orto</i> e (B) <i>para</i> .....	119
<b>III Figura 3</b> - Avaliação de MBC para (A) Metoxichalconas e (B) Hidroxichalconas, contra <i>B. subtilis</i> em função de diversas concentrações de composto. CN: <i>B. subtilis</i> em meio LB; CV: <i>B. subtilis</i> em DMSO 1%; CP: <i>B. subtilis</i> em 20µg.mL <sup>-1</sup> de canamicina.....	121
<b>III Figura 4</b> - Avaliação de permeabilidade de membrana para <i>B. subtilis</i> com células sem tratamento (controle negativo); tratadas com DMSO 1% (controle do veículo); tratadas com nisina – 15 e 30 min (controle positivo) (KRÓL et al., 2015) e tratadas com os compostos que foram bioativos contra <i>B. subtilis</i> na MIC <sub>90</sub> , nos tempos de contato de 15 e 30 min. Ampliação: 100 x. Barra: 5µ.....	122
<b>III Figura 5</b> - Porcentagem de células bacterianas com membrana permeável após tratamento com hidroxichalconas/metoxichalconas na MIC <sub>90</sub> durante 15 e 30 minutos. Células sem tratamento: controle negativo; Nisina: Controle positivo. A barra de tiras representa a análise em 15 minutos e a barra pintada representa a análise em 30 minutos.....	127

<b>III Figura 6</b> - Espectro de FT-IR de <i>B. subtilis</i> antes e após tratamento com (A) células não tratadas; (B) nisina a 5 µg.mL <sup>-1</sup> ; (C) BC1; (D) A4; (E) A10; (F) A11; (G) A19; (H) MA1; (I) T4; (J) T9A e (K) T10A.....	129
<b>III Figura 7</b> - Avaliação de desestruturação de septo com <i>B. subtilis</i> FtsZ-GFP com células sem tratamento (controle negativo - CN); tratadas com DMSO 1% (controle do veículo); tratadas com galato de hexila (controle positivo - CP) (KRÓL et al., 2015) e tratadas com todos os compostos bioativos contra <i>B. subtilis</i> na MIC <sub>90</sub> , durante 15 e 30 minutos de contato. Ampliação: 100 x. Barra: 5µ.....	132
<b>III Figura 8</b> - Atividade GTPásica de FtsZ de <i>B. subtilis</i> tratados com (A) BC1 e (B) T9A.....	137
<b>III Figura 9</b> - Concentração de ATP (unidades relativas de luz) após 30 minutos de tratamento de células de <i>B. subtilis</i> com 1x e 2xIC de BC1 e T9A; 40 µg.mL <sup>-1</sup> de 7b-BF <sub>4</sub> . 100% foi definido como a mediana da luminescência da amostra controle sem qualquer composto adicionado, cada círculo representa uma réplica e barras indicam a mediana de cada condição testada.....	141
<b>III Figura 10</b> - Efeitos em <i>B. subtilis</i> para as quatro principais vias de síntese macromolecular aplicando BC1 e T9A, tanto em comparação com controles negativos (-) como antibióticos com atividades específicas direcionadas para DNA, RNA, proteína e síntese de peptidoglicano: Ciprofloxacina (Cip), Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tet) e Vancomicina (Van); respectivamente. (A) tratamento em 60 minutos (B) tratamento em 80 minutos. Cada círculo representa uma réplica experimental, barras indicam a incorporação relativa mediana em cada condição testada.....	142
<b>III Figura 11</b> - Resultados de REMA (controle 2 para <i>B. subtilis</i> é a mediana dos replicados que geram overflow após 60 minutos; o controle é a mediana incluindo os replicados que geram overflow após 40 minutos) note que 100% ocorre em 60 minutos.....	143

<b>IV Figura 1</b> - Ensaio MBC para <i>S. aureus</i> com os compostos bioativos em diversas concentrações. CP: controle positivo; CV: controle do veículo – DMSO 1%; CN: controle negativo.....	180
<b>IV Figura 2</b> - Avaliação de permeabilidade de membrana para <i>S. aureus</i> com células sem tratamento (controle negativo - CN); tratadas com DMSO 1% (controle do veículo); tratadas com nisina - 5µg.mL <sup>-1</sup> (controle positivo - CP) e tratadas com os compostos <b>BC1</b> e <b>A11</b> na MIC <sub>90</sub> – 30 min. Ampliação: 100 x. Barra 5µ.....	181
<b>IV Figura 3</b> - Porcentagem de células bacterianas com membrana danificada após tratamento com hidroxichalconas e metoxichalconas na MIC <sub>90</sub> durante 30 minutos. Células não tratadas: controle negativo; Nisina: Controle positivo.....	183

## LISTA DE TABELAS

<b>I Tabela 1</b> - Metoxichalconas e Hidroxichalconas com ação antimicrobiana selecionados via Screening.....	52
<b>I Tabela 2</b> - Valores de MIC e (%) de inibição de crescimento.....	54
<b>II Tabela 1</b> - Inibição de crescimento celular bacteriano para 100 µg.mL <sup>-1</sup> de composto.....	108
<b>III Tabela 1</b> - Compostos selecionados via screening com ação contra <i>B. subtilis</i> .....	116
<b>III Tabela 2</b> - Determinação de valores de MIC e (%) de inibição de crescimento.....	120
<b>IV Tabela 1</b> - Chalconas e Metoxichalconas selecionadas via Screening.....	177
<b>IV Tabela2</b> - Screening de hidroxichalconas/ metoxichalconas contra microrganismos patogênicos.....	178
<b>IV Tabela 3</b> - Determinação das MICs dos compostos bioativos contra <i>S. aureus</i> .....	180

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALP** – Área Livre de Praga

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**ATCC** - American Type Culture Collection

**BHI** – Brain Heart Infusion

***B. subtilis*** – *Bacillus subtilis*

**Caged** – Cadastro Geral de Empregados e Desempregados

**CCCP** – Cianeto de carbonilo 3-clorofenilhidrazona

**CCD** – Cromatografia de Camada Delgada

**CC** - Cromatografia em Coluna

**CDC** – Centers of Disease Control and Prevention

**Cip** - Ciprofloxacino

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

***E. coli*** – *Escherichia coli*

***E. faecalis*** – *Enterococcus faecalis*

**EPA** – Environmental Protection Agency

**ERV** – *Enterococcus* resistentes à Vancomicina

**Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz

**FtsZ** – Filamentation temperature-sensitive mutante Z

**FT-IR** - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

**GFP** – Proteína Fluorescente Verde

**GTP** – Guanosina Trifosfato

**HR** – Reações de hipersensibilidade

**IP** – Iodeto de Propídio

**IPTG** - Isopropil-  $\beta$ -D-tiogalactosideo

**LB** – Luria Bertani

**MAPA** – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MIC** – Concentração Inibitória Mínima

**MBC** – Concentração Bactericida Mínima

**MOA** – Modo de Ação

**MRSA** – *S. aureus* resistentes à Meticilina

**NCCLS** - Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico

**NNIS** – National Nosocomial Infections Surveillance

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ORF** – Open Reading Frames

**PenG** – Penicilina G

**PIB** – Produto Interno Bruto

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

**RAM** – Resistência Antimicrobiana a Farmacos

**REMA** – Resazurin Microtiter Assay Plate

**Rif** - Rifampicina

**rpm** – Rotações por minuto

**SAA** – Secretaria da Agricultura e Abastecimento

*S. enterica pv. Typhimurium* - *Salmonella enterica pv. Typhimurium*

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

**SMR** – Sistema de Mitigação de Risco

**TAL** – Ativador Transcricional como efetores

**TSB** – Caldo de soja tríptica

**Tet** – Tetraciclina

**Van** – Vancomicina

**VRSA** – *S. aureus* resistentes à Vancomicina

*Xac* – *Xanthomonas axonopodis pv. citri*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	240
2. OBJETIVOS .....	22
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
CAPÍTULO I.....	24
HIDROXICALCONAS E METOXICALCONAS SINTÉTICAS: UMA ALTERNATIVA NO COMBATE AO CANCRO CÍTRICO .....	24
1. REVISÃO DA LITERATURA .....	24
1.1. A citricultura brasileira .....	24
1.2. O cancro cítrico.....	25
1.3. Utilização de soluções cúpricas em pomares.....	28
1.4. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	30
1.4.1. Interação planta-patógeno.....	32
1.4.2. Fatores de virulência.....	33
1.4.3. Sistemas de secreção .....	36
1.5. Legislação sobre o cancro cítrico.....	40
1.6. Chalconas, hidroxichalconas e metoxichalconas: uma possível alternativa eficaz no combate ao cancro cítrico .....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. Síntese das Metoxichalconas e Hidroxichalconas (realizado pelos colaboradores de São José do Rio Preto) .....	45
2.2. Linhagens celulares e condições de crescimento.....	46
2.3. Screening de Compostos.....	46
2.4. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) .....	47
2.5. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (MBC).....	47
2.6. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos ativos.....	47

2.6.1.	Ensaio de Permeabilidade de Membrana.....	48
2.6.2.	Ensaio de Desestruturação de Septo de Divisão Celular.....	48
2.7.	Síntese de Macromoléculas.....	49
2.8.	Ensaio da concentração de ATP intracelular .....	49
2.9.	Teste de patogenicidade - infiltração “ <i>in planta</i> ” (dose subletal).....	50
2.10.	Indução de resistência para <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	51
2.11.	Teste de aplicação “ <i>in planta</i> ” em dose de segurança .....	51
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
3.1.	Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) e ação bactericida.....	52
3.2.	Teste de patogenicidade - infiltração “ <i>in planta</i> ”(dose subletal).....	55
3.3.	Indução de Resistência para <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	56
3.4.	Teste de aplicação “ <i>in planta</i> ” em dose de segurança .....	57
3.5.	Microscopia de Permeabilidade de Membrana Citolplasmática.....	58
3.6.	Microscopia de Desestruturação de Septo de Divisão Celular .....	63
3.7.	Síntese de macromoléculas .....	67
4.	CONCLUSÃO.....	70
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
CAPÍTULO II.....		90
1.	REVISÃO DA LITERATURA PARA CAPÍTULOS II, III E IV .....	91
1.1.	A escassa descoberta de novos antimicrobianos e o avanço da resistência bacteriana.....	91
1.2.	A utilização de moléculas naturais como antimicrobianos dentre elas a curcuminoides e chalconas .....	93
1.3.	Importância da utilização de <i>B. subtilis</i> em estudos biológicos .....	95
1.4.	Microrganismos patógenos: características gerais, fatores de resistência e virulência.....	96
CAPÍTULO II.....		107

CAPÍTULO II - Artigo publicado na MicrobiologyOpen - DOI: 10.1002/mbo3.683 .....	108
1. INFORMAÇÕES DE APOIO .....	108
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109
3. ANEXO .....	110
ARTIGO PUBLICADO NA MICROBIOLYOPEN.....	110
CAPÍTULO III .....	111
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO ANTIMICROBIANO DE HIDROXICHALCONAS E METOXICHALCONAS CONTRA O MICRORGANISMO <i>Bacillus subtilis</i> .....	112
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	112
1.1. Síntese das Metoxichalconas e Hidroxichalconas (realizado pelos colaboradores de São José do Rio Preto) .....	112
1.2. Linhagens celulares e condições de crescimento.....	112
1.3. Screening de Compostos.....	112
1.4. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) .....	112
1.5. Avaliação da Mínima Concentração Bactericida (MBC).....	112
1.6. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos ativos.....	112
1.6.1. Ensaio de Permeabilidade de Membrana.....	113
1.7. Ensaio com FT-IR.....	113
1.8. Avaliação da atividade GTPásica vinculada a FtsZ.....	114
1.10. Ensaio da concentração de ATP intracelular .....	115
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
2.1. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) – determinação de MIC e MBC .....	119
2.2. Microscopia de Permeabilidade de Membrana Citoplasmática.....	121
2.3. Análise de FT-IR .....	127
2.4. Microscopia de Desestruturação de Septo de Divisão Celular .....	131

2.5. Ensaio da atividade GTPásica vinculada a FtsZ.....	136
2.6. Síntese de Macromoléculas.....	140
3. CONCLUSÃO.....	144
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	144
CAPÍTULO IV .....	175
COMPOSTOS SINTÉTICOS PROMISSORES CONTRA MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO.....	175
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	175
1.1. Linhagens celulares e condições de crescimento.....	175
1.2. Screening de Compostos.....	175
1.3. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) .....	175
1.4. Avaliação da Mínima Concentração Bactericida (MBC).....	175
1.5. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática.....	176
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	176
2.1. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) .....	177
2.2. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática.....	180
3. CONCLUSÃO.....	184
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	184
CONCLUSÃO GERAL .....	186
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	186

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O setor agrícola aquece a economia de diversos países, contribuindo para o PIB, geração de empregos além da movimentação de produtos entre um país e outro. Dentro do setor agrícola o Brasil domina, mundialmente, a exportação de laranja doce, onde 98% de sua produção é exportada (NEVES, 2010). A maior produção fica concentrada nos Estados de São Paulo e Paraná, embora sejam as regiões onde mais apresentem problemas relacionados a doenças que acometem os citros. No geral, a citricultura brasileira sofre com barreiras legislativas e fitossanitárias no mercado de exportações, justamente por não estar livre de doenças vinculadas ao *Citrus* como é o caso do greening, CVC, morte súbita e cancro cítrico, por exemplo. Esta última doença ganha destaque neste trabalho e tem despertado muita preocupação, uma vez que não há tratamento eficaz que confira a erradicação permanente.

O cancro cítrico é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e embora possua cinco tipos diferentes de cancrose, a cancrose tipo A é a mais severa e agressiva de todas elas, a qual é causada pela bactéria citada (BRUNINGS et al., 2003; SCHAAD et al, 2005). Os sintomas gerados quando a bactéria infecta a planta são lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração castanho-amarelada e aspecto eruptivo (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 1981; NAMEKATA, 1991; ROSSETTI, 1993;). A grande problemática de pomares infectados com cancro cítrico é, principalmente a ocorrência da queda prematura de frutos que ficam inapropriados para a comercialização, prejudicando o agricultor e seu lucro.

Em 2017 foi estabelecida uma nova legislação para o cancro cítrico e de acordo com essa nova lei federal, Instrução Normativa nº. 37 de 05/09/2016 (IN 37), as estratégias de controle do cancro cítrico são dependentes do status fitossanitário da doença na área. Existem quatro cenários que podem ser encontrados na região onde há plantação de *Citrus*: Área com praga ausente; Área livre da praga (ALP); Área sob erradicação ou supressão e Área sob sistema de mitigação de risco (SMR). No estado de São Paulo, foi determinado pela Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº. 10 de 20/02/2017 (Resolução SAA 10), que a estratégia de controle oficial adotada a partir de 2017 é o SMR, onde a doença passa a ser controlada por um conjunto de medidas de manejo como, por exemplo, o monitoramento e controle de mudas sadias, trânsito de pessoas e equipamentos, instalação de quebra ventos, controle do minador dos *Citrus*, utilização de indutores de resistência, além do uso massivo da pulverização com soluções cúpricas (cobre fixo); tudo objetivando reduzir o impacto da doença na produção. (FUNDECITRUS, 2018).

Entretanto sabe-se que o cobre apresenta pouca ou

nenhuma ação curativa sobre o cancro cítrico. Sua ação reduz a chance de infecção trazendo uma ação mais preventiva (LEITE JUNIOR et al., 1987). Além disso, o cobre é um metal tóxico em quantidades pequenas e com efeito cumulativo no solo, água, frutos; outro fator preocupante quando pensa-se em seu uso de maneira massiva. Alguns estudos, também, já reportaram genes de *Xanthomonas* com resistência ao cobre (BEHLAU et al., 2011).

Paralelamente ao setor agrícola tem-se a indústria farmacêutica que sofre inúmeras barreiras burocráticas bem como científicas na pesquisa e descoberta de novos agentes com potencial antimicrobiano, que futuramente podem tornar-se fármacos. Algumas bactérias têm desenvolvido resistência de maneira desenfreada e, embora seja considerado um fenômeno ecológico que responde frente ao uso de antibióticos e sua presença no ambiente, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento desses microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais (LEVY, 1991; PENNA et al., 2001). Fármacos com novos mecanismos de ação deverão apresentar vantagens no combate a microrganismos resistentes e à emergência de novos patógenos. Vale ainda ressaltar que muitos protótipos que são pesquisados e desenvolvidos acabam não sendo adequados para uso como fármacos devido a problemas relacionados à farmacocinética, por isso a necessidade de testes e buscas por novos compostos de grande eficácia e aplicabilidade.

Embora a bactéria *Bacillus subtilis*, comumente, não seja patogênica, é muito utilizada pela sua relevância como microrganismo modelo de bactéria Gram-positiva (MOSZER et al, 2002) em Microbiologia, por ter tamanho relativamente grande e ser de fácil cultivo. Apresenta forma de bastonete, produz endósporos e tem algumas enzimas tóxicas. Bioensaios com *B. subtilis* são utilizados para analisar sua resposta mediante ao experimento e estimar se a mesma resposta é válida para outras bactérias patogênicas Gram-positivas. De acordo com a literatura *B. subtilis* tem sido usado como modelo de bactéria para vários estudos biológicos como ensaios de mecanismos de ação de compostos com ação antimicrobiana (MATIAS et al., 2005; MÜLLER et al., 2016), estudos de divisão celular (PINHO et al., 2013), dentre outros.

Finalmente, diante de todo esse contexto faz-se necessária a busca por novos agentes antimicrobianos com eficácia contra *Xac*, considerando uma opção mais concreta e, talvez, mais “ecologicamente correta”. Além disso, a avaliação da atividade antimicrobiana com *B. subtilis* é testada neste trabalho com intuito de compreender o mecanismo de ação dos compostos, caso sejam bioativos, em Gram-positivas. Portanto, este estudo objetivou a realização da síntese de compostos derivados de curcumina e chalconas, classe de compostos naturais, e posterior avaliação da atividade antimicrobiana contra *Xanthomonas citri*, *Bacillus*

*subtilis* e alguns microrganismos de interesse clínico tais como: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. enterica Typhimurium*, forcenidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz). O modo de ação dos compostos bioativos também foi investigado. Ao todo foram testadas três séries, sendo elas curcuminóides, hidroxichalconas e metoxichalconas. O modo de ação de cada um dos compostos bioativos foi avaliado de acordo com diversas técnicas para investigar ação em membrana citoplasmática, síntese protéica, divisão celular, síntese de DNA, síntese de RNA e síntese de parede celular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

Avaliação da capacidade antimicrobiana e investigação do modo de ação de classes de compostos sintéticos, visando o combate ao cancro cítrico e doenças relacionadas a patógenos de interesse clínico.

### **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Síntese de Curcuminoides, Hidroxichalconas e Metoxichalconas (realizado em colaboração com o Laboratório de Química Verde e Medicinal - UNESP de São José do Rio Preto);
- 2) Avaliação da atividade antimicrobiana em *X. citri*; *B. subtilis* e patogênicos de interesse clínico (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. enterica Typhimurium*);
- 3) Ensaios do Mecanismo de ação dos compostos bioativos em *X. citri*; *B. subtilis* e *S. aureus*;
- 4) Teste em planta, para avaliar a capacidade dos compostos eliminarem sintomas de cancro;

# CAPÍTULO I

# CAPÍTULO I

## HIDROXICALCONAS E METOXICALCONAS SINTÉTICAS: UMA ALTERNATIVA NO COMBATE AO CANCRO CÍTRICO

### 1. REVISÃO DA LITERATURA

#### *1.1. A citricultura brasileira*

A citricultura é uma atividade mundialmente importante e possui relevância econômica em sua produção para mais de 80 países, sendo que os citros são cultivados em diferentes regiões concentrando-se, predominantemente, em áreas tropicais e subtropicais (SENTELHAS, 2005). O maior produtor de tangerina e grapefruit é a China. A produção de limão e lima é dominada pelo México. Já a liderança mundial de produção e exportação de laranja doce é assumida pelo Brasil (MARKESTRAT E CITRUSBR, 2018). As primeiras exportações datam de 1962 e a partir daí a citricultura tem contribuído definitivamente para o desenvolvimento do Brasil, o qual detém 76% da produção mundial de suco de laranja e 98% de exportação de tudo o que produz (NEVES, 2017). De acordo com o Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged), ligado ao Ministério do Trabalho, não há outro setor do agronegócio que empregue tanto quanto o setor citrícola no estado de São Paulo gerando um emprego para cada nove hectares. Já o setor de cana, por exemplo, necessita de 80 hectares para garantir um emprego (CAGED, 2017).

Mesmo ocupando a liderança no ranking da exportação de laranja doce mundial, a citricultura brasileira tem enfrentado problemas nos últimos anos. Em 2012 encarou uma de suas maiores crises, ocasionada por fatores climáticos, fitopatológicos e mercadológicos, que impactou a safra de 2013/2014 (CONAB, 2013). O país sofre barreiras legislativas e fitossanitárias em grandes mercados importadores como os Estados Unidos e a Comunidade Europeia, pois o Brasil não é considerado área livre de doenças como o greening, CVC, pinta preta e cancro cítrico. Portanto, medidas rigorosas de inspeção e legislativas são determinadas e o Brasil as deve cumprir além de tentar impedir, ao máximo, a entrada e estabelecimento de doenças em pomares de *Citrus* (FUNDECITRUS, 2018).

### 1.2.O cancro cítrico

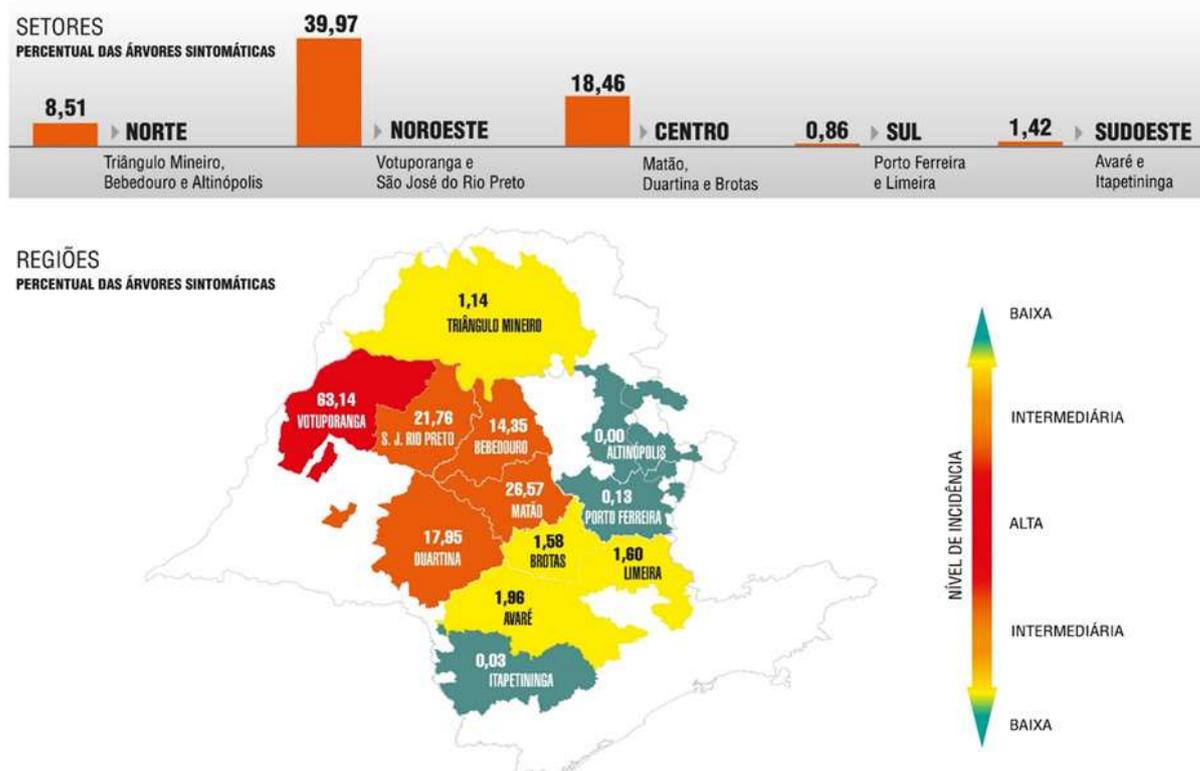
O cancro cítrico é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*). Essa doença originou-se na Ásia, onde ocorre de forma endêmica em todos os países produtores (FUNDECITRUS, 2018). Foi registrada em território brasileiro desde 1957, inicialmente na região de Presidente Prudente/SP (BITTANCOURT, 1957).

Existem cinco tipos de cancores descritos até o momento, os quais são denominados “A”, “B”, “C”, “D” e “E”. Cada tipo de cancrose tem sua característica epidemiológica definida em diversos aspectos, porém a cancrose de maior relevância e preocupação é a do tipo A (também conhecida como “asiática”), pois é a forma mais severa e agressiva propagada da doença, além do seu amplo espectro de infecção em diversos cultivares de *Citrus*. (BRUNINGS E GABRIEL, 2003; SCHAAD et al, 2005). Porém existem diferenças de suscetibilidade entre eles, ou seja, existem genótipos menos suscetíveis que apresentam menos sintomas e progresso da doença mais lento comparado a outros genótipos. Em ordem crescente de suscetibilidade temos: Ponkan, 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 (FUNDECITRUS, 2018).

O número de produtores que encontram cancro cítrico em seus pomares tem aumentado em todas as regiões do estado de São Paulo. Especialistas acreditam que muitos citricultores ainda não descobriram a existência da doença em suas propriedades por não fazer a inspeção de cancro ou até mesmo por não saber identificar seus sintomas. Portanto, o combate ao cancro cítrico é um dos maiores desafios da citricultura paulista. A Figura 1 mostra um levantamento de árvores com incidência de sintomas, no estado de São Paulo, deixando claro que a região de Votuporanga é a que tem maior incidência de árvores doentes (FUNDECITRUS, 2018).

**Figura 1.** Árvores com sintoma de cancro por região

**CINTURÃO CITRÍCOLA = 11,71% DAS ÁRVORES SINTOMÁTICAS**



Fonte: FUNDECITRUS, 2018

Para melhor compreensão e em termos didáticos o ciclo do cancro cítrico pode ser dividido em quatro fases de acordo com a entrada da *Xac* no pomar, danos que ela causa às plantas e disseminação da doença por toda área. As fases do ciclo são: 1) Colonização - consiste no início da doença que é quando os sintomas aparecem. O cancro não é uma doença sistêmica e, portanto, as bactérias apenas colonizam o local infectado, onde enzimas são liberadas para degradação de células e obtenção de nutrientes. Esse rompimento celular provoca morte de células e necrose com lesões. A diminuição dos espaços intercelulares também é acompanhada de acúmulo de goma xantana, produzida pela *Xac*, e resulta num tecido infectado com aparência de encharcado e escurecido, já que a água fica retida no xilema devido à capacidade higroscópica da goma (PADMANABHAM et al., 1973). A partir daí o processo de colonização bacteriana continua radialmente iniciando-se nas margens das lesões. Nesta fase a temperatura é um fator extremamente relevante, uma vez que a temperatura ótima para a multiplicação de *Xac* está entre 25°C a 35°C. 2) Infecção – *Xac* se instala na planta. Ao se depositar na planta, após disseminação por chuvas, restos de colheita, pessoas ou veículos transitando pela lavoura, *Xac* pode colonizar a superfície foliar de maneira epífita, fase em que a bactéria coloniza a planta sem causar doença (PALAZZO et al., 2018).

al., 1984); todavia quando as condições ambientais tornam-se favoráveis e o hospedeiro apresenta uma porta de entrada natural (estômatos, hidatódios, lenticelas) ou por ferimentos (causados pelo homem, espinhos, máquinas, abrasão de partículas de poeira, atrito entre partes da planta, e por insetos, como o minador dos citros - *Phyllocnistis citrella*), *Xac* coloniza os espaços intercelulares pela ativação da expressão de genes ligados à patogenicidade e virulência (LAIA, 2007). A penetração bacteriana é ainda mais favorecida quando se formam películas de água sobre a superfície da folha (BROWN, 2001; GRAHAM et al., 1992). Também há produção de polissacarídeos extracelulares como a goma xantana (BROWN, 2001). 3) Disseminação – esta fase é caracterizada pela capacidade da bactéria se espalhar de uma lesão para as demais partes da planta ou para outras plantas do pomar, a partir de uma lesão previamente formada. A água, novamente é um fator importante para disseminar a doença (veículo para a bactéria), porém o vento também é outro fator que auxilia na disseminação da bactéria. A disseminação da doença pode estar vinculada a ação de chuvas, do homem, máquinas, ferramentas, equipamentos, mudas, material de colheita e/ou vestuários infestados. 4) Sobrevivência – finalmente o cancro cítrico pode permanecer em lesões antigas e ser disseminado ano após ano. Em condições favoráveis, na presença de água e aberturas naturais da planta ou ferimentos, a bactéria reinicia a infecção e o ciclo da doença. Fora da planta *Xac* possui um curto período de sobrevivência, sendo que não há plantas hospedeiras que não sejam os citros, tampouco estruturas que garantam mais tempo de sobrevivência como, por exemplo, esporos. (FUNDECITRUS, 2018).

Os sintomas que acometem plantas contaminadas com cancro cítrico não são o maior problema enfrentado no âmbito da citricultura, pois raramente uma planta morre em detrimento desta doença. No entanto o estresse biótico gerado altera todo rendimento e produção da planta e esta por sua vez responde a esse estresse com a produção de inúmeras substâncias, tais como o etileno, que ocasiona um desequilíbrio hormonal (CROZIER et al. 2001) e seu excesso induz a queda prematura de frutos, sintoma característico da doença. Uma vez que não estão maduros o suficiente e sofrem queda prematura, os frutos tornam-se inaproveitáveis comercialização (BROWN 2001; RYBAK et al., 2009).

Quando as plantas são acometidas pelo cancro cítrico podem apresentar lesões nos mais variados órgãos da parte aérea da planta (SCHUBERT; SUN, 1996). As lesões de cancro caracterizam-se por serem circulares, corticosas, salientes, de coloração castanho amarelado e aspecto eruptivo (BITTANCOURT, 1957; GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989; ROSSETTI, 2001), conforme mostra a Figura 2. Devido aos grandes prejuízos que o agente etiológico do cancro cítrico causa foram feitas inúmeras tentativas de se descobrir

maneiras bem sucedidas para o controle da doença, cujo marco principal no histórico da busca de solucionar tal problemática foi o sequenciamento completo do genoma de *Xac* (DA SILVA et al. 2002), que garantiu possibilidades de implementar estratégias na engenharia genética, buscando genes alvos e utilizando para expressão de patogenicidade e/ou virulência. Além disso, sabe-se que não há cura para o cancro cítrico, pois não há defensivos agrícolas eficazes contra a doença, há apenas ação preventiva com a pulverização de soluções cúpricas em pomares. No entanto, sabe-se que o cobre é altamente tóxico para o meio ambiente e tem se buscado alternativas que possam substituir a utilização de soluções cúpricas nos pomares de *Citrus*.

**Figura 2.** Lesões típicas de cancro cítrico



**Fonte: Agrolink e Fundecitrus**

### *1.3. Utilização de soluções cúpricas em pomares*

A aplicação de cobre nos pomares de *Citrus* não previne a entrada da bactéria, mas ajuda a minimizar a quantidade de sintomas aparente nas plantas bem como a queda prematura de frutos (FUNDECITRUS, 2018). Todas as soluções cúpricas utilizadas para pulverizar os pomares citrícolas são à base de cobre fixo – compostos químicos tais como óxido cuproso, oxiclreto de cobre e hidróxido de cobre. Há um motivo para as aplicações serem feitas com cobre fixo e ele é explicado pela baixa solubilidade dos cobres fixos em água, garantindo efeito residual na planta. Em outras palavras, quando pulverizados nos

pomares, tais compostos formam uma película protetora e atuam preventivamente na planta (FUNDECITRUS, 2018). Embora a pulverização de cúpricos reduza a perda de culturas e ajudem a controlar o cancro cítrico, eles também podem afetar negativamente o meio ambiente (BEHLAU et al., 2017a).

Em 2008 o cobre ganhou atenção quando a Environmental Protection Agency (EPA) dos EUA registrou mais de 200 superfícies de cobre como agentes antimicrobianos. Ficou documentado que o mecanismo de ação dos compostos cúpricos seria por meio da morte por contato, apesar de ainda não estar completamente elucidado (GRASS et al, 2010). Zambolin et al (1995) sugeriram que o mecanismo de ação era por meio da penetração no interior dos organismos e a partir disso provocava reações químicas não específicas entre grupamentos presentes nas proteínas (sulfidrílicos (SH), amino (NH<sup>2</sup>) e hidroxílicos (OH)), com ácidos nucleicos e seus precursores em rotas metabólicas, desestabilizando o metabolismo das bactérias e fungos.

Muitos estudos sugerem ação antibacteriana do cobre. Faúndez et al (2004) registraram inibição do crescimento de *C. jejuni* e *S. enterica* quando permaneceram em contato com superfícies de cobre. Aguiar (2009) também mostrou a ação bactericida do cobre, porém agora com nanopartículas testadas contra *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para *Xac* também há efeito quando se pulveriza cobre nos pomares de *Citrus*, embora sua ação preventiva seja a forma mais bem sucedida. Todavia, pesquisas já notificaram que bactericidas cúpricos pulverizados podem reduzir o desenvolvimento do cancro cítrico, (LEITE JUNIOR et al., 1987), comprovando uma pequena ação curativa. Porém, segundo Maciel (1994), inúmeros estudos já foram feitos com o objetivo de avaliar a verdadeira capacidade dos cúpricos no âmbito do controle do cancro, e foi concluído que a eficácia desses produtos está apenas na ação protetiva dos tecidos suscetíveis à entrada da bactéria. Tem-se observado também que as pulverizações são mais bem sucedidas no controle do cancro cítrico quando outras medidas são adotadas, simultaneamente, como por exemplo, colocação de quebra ventos e a poda de tecidos lesionados, visando a diminuição das fontes de inóculo (CANTEROS, 2005).

Algumas decisões legislativas acabam piorando o problema, pois, sem querer, estimulam o uso massivo de produtos cúpricos. Em março de 2017 entrou em vigor a Normativa 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa lei permite ao produtor a implementação de um plano de mitigação da doença em alguns estados como, por exemplo, São Paulo (área de maior produção de laranjas do mundo). Nesse contexto, assume-se que a bactéria tem condição endêmica, conforme já ocorre nos estados ao

sul do Brasil, Argentina e Flórida. O sistema de mitigação requer algumas medidas de controle tais como o plantio de laranjeiras menos suscetíveis à doença, a implantação de barreiras verdes com o intuito de reduzir a disseminação de *Xac* através das chuvas e do vento e a pulverização de quantidades massivas de formulações cúpricas. Entretanto o cobre é altamente tóxico em pequenas quantidades, além de ter efeito cumulativo no solo, frutas e água, podendo causar efeitos adversos no crescimento das raízes e na absorção de nutrientes pelas árvores cítricas (FAN et al., 2011; FONES et al., 2013; BRUNETTO et al., 2016; CORNU et al., 2017). Ainda, Halliwell e Gutteridge (1986) descobriram que o cobre pode entrar em contato com radicais hidroxila altamente reativos e causar danos ao DNA, o que pode garantir mutações e câncer.

Behlau et al. (2011) identificaram a existência de genes em *Xac* com resistência ao cobre, tornando ainda mais difícil a erradicação da bactéria. Outros estudos associados à linhagens de *X. citri* resistentes ao cobre têm sido amplamente explorados (BEHLAU et al., 2013; RICHARD et al., 2016; BEHLAU et al., 2017b; RICHARD et al., 2017) e comprovam que há extrema necessidade da busca por novos agentes antimicrobianos com eficácia contra *Xac*.

#### 1.4. *Xanthomonas citri*

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (do grego, “xanthos” = amarelo; “monas” = unidade), está contida no maior grupo de bactérias fitopatogênicas existentes na natureza. Essa bactéria cosmopolita acomete as diversas espécies de *Citrus* e é a mais agressiva e devastadora espécie de todas do gênero *Xanthomonas* que provocam o cancro cítrico asiático (NAMEKATA et al., 1996; ROSSETTI, 1993). *Xac* foi, inicialmente, isolada e identificada pela pesquisadora Clara H. Hasse (1915) que, também investigou sua patogenicidade e classificou-a como *Pseudomonas citri*. Porém, em 1949, Dowson reclassificou a bactéria como *Xanthomonas citri* (KHAN E HINGORANI, 1970) e passados alguns anos a bactéria foi reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995; HARTUNG et al. 1996). Já em 2006, a nomenclatura foi novamente alterada para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SHAAD et al., 2001). Apesar da mudança na nomenclatura, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é, até hoje, muito conhecida e caracterizada na literatura com a denominação *Xac*, uma vez que em 2002, foi finalizado o sequenciamento completo do seu genoma (DA SILVA et al., 2002) e a nomenclatura ainda era *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). Portanto, neste trabalho utilizaremos essa nomenclatura para ela: *Xac*.

Conforme já foi dito, *Xac* é um bastonete, Gram-negativo, é aeróbica, monotríquia, e mede entre 0,2 e 0,6 µm de diâmetro e 0,8 e 2,9 µm de comprimento (MOREIRA et al. 2005). Outra característica marcante é que as colônias de *Xac* são amarelas e mucoides quando cultivadas em meios de cultura artificiais, uma vez que há produção de um pigmento chamado xanthomonadina (importante na proteção contra raios ultravioleta) (BRADBURY, 1993) bem como de um exopolissacarídeo conhecido como goma xantana, auxiliadora na construção de biofilmes e dispersão da bactéria. A goma xantana é, também, muito utilizada em indústrias alimentícias e petrolíferas (WHITESIDE et al. 1988; VAUTERIN et al., 1996; DIANESE e SHAAD, 1982; TSUYUMU et al., 1996). *Xac* tem maior incidência em regiões tropicais e subtropicais, onde permanece o clima quente e úmido, e acomete as plantas, em especial, durante os períodos de crescimento das folhas e frutos (GOTTWALD e GRAHAM, 2000; WEELS et al., 1987).

Embora *Xac* seja devastadora para seu hospedeiro, ela possui baixa resistência às adversidades ambientais às quais é exposta no ambiente epifítico, o que garante um curto período de sobrevivência longe das lesões que provoca. Também não há identificação de qualquer vetor que atue no ciclo da doença. Dessa forma, conforme mencionado anteriormente, a *Xac* é disseminada, basicamente, através dos eventos climáticos tais como chuvas, ventos e também é carregada por objetos contaminados como roupas, equipamentos, trânsito de pessoas e máquinas nos pomares (GRAHAM et al, 2004).

As bactérias fitopatogênicas, como é o caso de *Xac*, fazem a modulação da expressão dos genes que são responsáveis pelos processos da patogenicidade, conseqüentemente, infecção e virulência, suplantando assim os mecanismos de defesa da planta hospedeira e garantem um meio adequado para sobreviver e multiplicar (BUTTNER E BONAS, 2002). A *Xac* ocupa o espaço extracelular na planta hospedeira e por isso necessita injetar proteínas efetoras no interior dessas células, as quais são responsáveis pelo desenvolvimento da doença e/ou desencadeamento da resposta de defesa por parte do hospedeiro (BRUNINGS E GABRIEL, 2003). Para que haja a inserção dessas proteínas efetoras, *Xac* utiliza-se de sistemas denominados sistemas de secreção. Mais precisamente, o sistema que injeta as proteínas efetoras é o sistema tipo III (SSTT) e será discutido no item adiante. As proteínas efetoras possuem domínios específicos de sinalização nuclear que funcionam como fatores de transcrição, interagem com proteínas da planta sendo conduzidas ao núcleo (SZUREK, 2002; KAY E BONAS, 2009).

Conforme já foi dito, não há tratamento eficaz permanente para erradicação desta bactéria quando infecta a planta dos citros, motivo esse que se faz necessária a busca pelo

desenvolvimento de agentes antimicrobianos que possam combatê-la, garantindo a segurança dos agricultores de citros e o melhoramento na sua produção.

#### *1.4.1. Interação planta-patógeno*

A interação planta-patógeno é altamente específica entre o vegetal e o fitopatógeno. Considera-se que a interação entre fitopatógeno e planta hospedeira bem como a capacidade de causar a doença depende de um complexo processo regulado e coordenado por muitos genes bacterianos que estão associados à patogenicidade e virulência. O ataque à planta pode gerar uma interação compatível ou incompatível.

Enquanto o fitopatógeno tenta desativar todo sistema de defesa da planta esta tenta eliminar o fitopatógeno para que não ocorra infecção por inúmeros mecanismos tais como espessamento de cutículas, presença de substâncias com ação antimicrobiana (DIXON et al., 1994; HAMMOND-KOSACK et al., 2000), produção de espécies ativas de oxigênio (DIXON et al., 1994; BOLWELL, 1995), degradação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (CORBIN et al., 1987), morte celular programada onde há infecção (HR) (HAMMOND-KOSACK et al., 1996), lignificação e reforço da parede celular (GRAND et al., 1987), produção e acúmulo de fitoalexinas (GUSTINE, 1990). Um processo bem conhecido sobre a maneira que a planta responde quando ocorre invasão por um patógeno é o estresse oxidativo, que assume grande importância no início da indução e, conseqüentemente, sinaliza para outras vias de defesa, como por exemplo, reações catalisadas por peroxidases que garantem a polimerização de fenóis, a formação de lignina e ligações cruzadas de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Todo esse processo desencadeado pelo estresse oxidativo garante o reforço da parede celular vegetal e também toxicidade sobre os patógenos (LABANCA, 2002), os quais possuem sensibilidade em sua membrana citoplasmática aos radicais livres (ELSTNER, 1982). É válido lembrar que o tempo de reconhecimento entre microrganismo-planta e a resposta garantida desta invasão é diferente entre plantas que demonstram diferentes níveis de susceptibilidade (YANG et al., 1997; KELLER, 1999).

O sistema de defesa da planta é capaz de reconhecer algumas características presentes no fitopatógeno como, por exemplo, quitina, flagelina, glicoproteínas e lipopolissacáridos (GÖHRE E ROBATZEK, 2008; POSTEL E KEMMERLING, 2009). Essas características microbianas são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns) e são responsáveis pela ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs - Pattern-recognition receptors) que encontram-se nas membranas das células da planta hospedeira (JONES E DANGL, 2006). Esse processo

garante o início da resposta de defesa inespecífica da planta e desencadeia a PTI (PAMP-Triggered Immunity) (CHISHOLM et al., 2006).

Em contrapartida os fitopatógenos desenvolveram moléculas efetoras que suprimem a PTI e promovem a virulência do patógeno. Essas moléculas efetoras, comumente, são transpostadas para as células do hospedeiro através de sistemas de secreção e esse processo resultada na chamada susceptibilidade induzida por efector (ETS - Effector Triggered Susceptibility). As moléculas efetoras são chamadas de proteínas de virulência (Avr) e são codificadas por genes de avirulência correspondentes (*avr*). Elas podem ser reconhecidas pelas células da planta pelas proteínas de resistência específicas, denominadas de proteínas R e codificadas por genes R, gerando uma resposta de resistência chamada de imunidade desencadeada por efetores – ETI (effector-triggered immunity) (CHISHOLM et al., 2006; BOYD et al., 2013). A interação entre Avr/R é similar ao modelo chave-fechadura, onde a proteína Avr do patógeno se encaixa em sítios do receptor, proteína R, da planta. Uma vez que isso ocorre se consolida o sistema de defesa (MENDOZA, 2016).

Entretanto, se a planta não reconhece o patógeno ou, ainda, se ela não ativa, rapidamente, suas vias de defesa, a colonização e infecção ocorrem e recebe o nome de interação compatível, pois não houve interação Avr/R (GREWAL et al., 2012; FEBRES et al., 2009; DOMINGUES et al., 2011; DAURELIO et al., 2013).

Sabe-se que para os fitopatógenos, o papel dos sistemas de secreção são fundamentais por diversos motivos e, no caso da interação planta-patógeno o Sistema tipo III (SSTT) se mostra essencial com relação ao desencadeamento de respostas (HUECK 1998) porque uma das classes de proteínas secretadas pelo SSTT são, exatamente, as proteínas de avirulência (Avr) e, conforme descrito, elas são essenciais na interação planta-patógeno, uma vez que garantem a especificidade da interação. Além disso, estas proteínas são espécie-específicas, limitando a gama de hospedeiros para o patógeno (VIVIAN, 1997; CORNELIS, 2000; BÜTTNER, 2002).

#### 1.4.2. Fatores de virulência

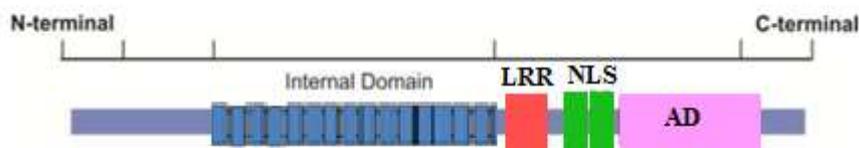
A bactéria *Xanthomonas citri* tornou-se um importante microrganismo modelo para estudo da interação planta-patógeno, na compreensão de patogenicidade bacteriana e estudo de mecanismos de virulência (BÜTTNER E BONAS 2010). A anotação dos genes presentes no genoma de *Xac* possibilitou a identificação de alguns mecanismos que são utilizados para garantir a sua sobrevivência bem como para infectar a planta hospedeira (DA SILVA et al., 2002). Grande parte das proteínas que foram codificadas no sequenciamento de *Xac* está envolvida com adaptação, patogenicidade e virulência como, por exemplo, proteínas AvrBs3 -

vinculadas ao Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) e a resposta de hipersensibilidade (HpaA, Hrp e Hrc), proteínas associadas ao Sistema de Secreção do Tipo IV, proteínas responsáveis pela degradação da parede celular da planta hospedeira, enzimas participantes da síntese de exopolissacarídeos, proteínas que podem estar envolvidas com produção de toxinas e destoxificação, proteínas de superfície de membrana, além de proteínas de adaptação a condições atípicas (choque térmico e vias de transdução de sinais). Existem, também, duas cópias de genes que codificam proteínas que estão associadas ao Sistema de Secreção do Tipo II e, ainda, proteínas que têm relação com a secreção de enzimas extracelulares (JACOB et al., 2009).

Sabe-se que *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) causa o cancro cítrio transferindo efetores do tipo III para o interior da planta hospedeira através do SSTT, modulando a transcrição da planta para desencadear a doença (SCHAAD et al., 2006).

Há diversos fatores de patogenicidade que *Xac* implanta para tentar estabelecer a doença, porém o fator mais importante e amplamente estudado é de uma família efetora do tipo III - TALEs (Ativadores efetivos Transcricionais) (HU et al., 2014). *Xac*, tem uma ampla gama de hospedeiros, e para garantir a infecção contém um gene de virulência *pthA* que codifica um efector de efeito transcricional (TALE) secretado por SSTT e que promove a hipertrofia celular (AL-SAAD I et al., 2007). OS TALEs são transportados para o núcleo da planta e ligam-se a regiões codificadoras de DNA específicas de TALE, ativando a transcrição de genes para gerar suscetibilidade à doença ou resistência (CHEN et al., 2010). Os TALEs ainda contem um domínio central de repetições exibindo repetições em série de uma sequência de 33 a 35 aa e o número de repetições variáveis é conhecido como Diresíduos de variáveis repetidas (RVDs) (12º e 13º aminoácidos). Os RVDs se ligam a nucleotídeos únicos específicos e determinam a especificidade para suscetibilidade à doença (S) ou resistência (R) (BOCH et al., 2009). PthAs são proteínas ricas em leucinas, contendo 12,3% do total de aminoácidos da proteína e na região dos 34 aminoácidos repetidos em tandem, as leucinas respondem por 14,7% do total (YANG E GABRIEL, 1995). Possuem uma região N-terminal e um domínio C-terminal ácido (AAD), típico de fatores de transcrição (SWARUP et al., 1991), conforme mostra a Figura 3.

**Figura 3.** Estrutura das proteínas da família PthA/AvrBs3. LRR- Região de Leucinas Repetidas; NLS- Sinal de Localização Nuclear e AAD- Domínio Ativador Transcricional Ácido

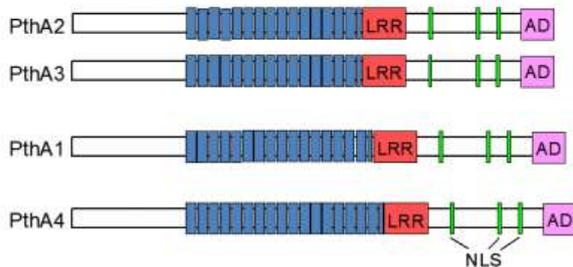


Fonte: Adaptado de YANG et al. (1994)

As PthAs são consideradas o principal efetor da patogênese de *Xac* (LI et al., 2014) sendo um efetor ativador transcricional (TAL), que dirigem a expressão do gene CsLOB1 de suscetibilidade ao cancro. Recentemente foi relatada a caracterização funcional de CsLOB1, por Duan e colaboradores (2018). Eles mostraram que a localização de CsLOB1 em protoplastos cítricos é, principalmente no núcleo e que esta proteína está associada a indução de sintomas de cancro.

Todas as cepas de *Xanthomonas* têm pelo menos um tipo-ativador da família PthA que ativa os genes de suscetibilidade à doença (S) do hospedeiro. Porém, ao contrário de outras *Xanthomonas*, que apresentam várias cópias de TALEs no cromossomo, a *Xac* possui TALEs em plasmídeos. Mais especificamente, *Xac* 306 possui quatro PthAs (TALEs), sendo dois em cada um dos dois plasmídeos (DA SILVA et al. 2002). As isoformas (Figura 4) diferem no domínio repetido interno que garantem a especificidade e reconhecimentos de alvos na célula hospedeira (DOMINGUES, 2010). No entanto, apenas a PthA4 é conhecida por provocar cancro, embora acredita-se que as PthAs 1–3 também possam contribuir para a patogenicidade em certos hospedeiros – laranja Pêra (ABE E BENEDETTI, 2016). Ainda no caso da *Xac*, a PthA4 exerce a função de induzir sintomas de cancro cítrico através da ativação de genes hospedeiros específicos, CsLOB-1, um membro da família dos fatores de transcrição de limites laterais de órgãos (LOB), e CsSWEET1, um homólogo da família genética do transportador de açúcar SWEET e da suscetibilidade à doença do arroz (HU et al., 2014).

**Figura 4.** Modelo esquemático das quatro variantes de PthAs. A diferença entre elas está na região de domínio repetido interno



**Fonte:** DOMINGUES (2010)

Além disso, foi registrado que as PthAs apresentam papel aditivo no âmbito da patogenicidade e aptidão bacteriana, uma vez que deleções em dois ou mais genes *pthA* diminuem o crescimento bacteriano em planta de forma mais acentuada que deleções únicas. Em alguns casos ainda, o aparecimento de sintomas de cancro em determinadas espécies de *Citrus*, através da contribuição de PthAs 1 - 3, não se relaciona com a ativação do gene S de cancro, LOB1, mas com a indução de outros alvos PthA, incluindo LOB2 e dioxigenase (DIOX). Nesses casos parece estar associada a polimorfismos de nucleotídeos encontrados em locais de ligação ou próximos a PthA (ABE E BENEDETTI, 2016).

Contudo, explorar e compreender os fatores ligados à patogenicidade e virulência de *Xac* bem como a interação planta hospedeira-patógeno até o estabelecimento da doença, é indispensável para a busca de soluções de controle e combate ao cancro cítrico, seja no âmbito da engenharia genética ou até mesmo para a produção de compostos que atuem no alvo específico da bactéria e eliminação da infecção.

#### 1.4.3. Sistemas de secreção

A secreção protéica é caracterizada como um processo pelo qual uma proteína atravessa a membrana externa celular, permanecem ligadas à superfície celular e eliminam proteínas; ou ainda proteínas que fazem parte de estruturas especiais montadas na superfície da célula (HUECK, 1998; THANASSI, 2000). Este procedimento é necessário ser feito inúmeras vezes e por diversos motivos fisiológicos da bactéria seja na construção de flagelo, obtenção de nutrientes, para expressar alguns fatores de virulência, dentre outros. Obviamente as bactérias Gram-negativas enfrentam grande desafio já que as proteínas necessitam atravessar além de citoplasma e membrana interna, o periplasma e a membrana externa (PUGSLEY 1993; THANASSI, 2000).

Alguns fitopatógenos agem secretando enzimas que atuam e necrosam o tecido da planta hospedeira, enquanto outros secretam macromoléculas - na maioria dos casos proteínas, mas também complexos núcleo-proteicos - no interior das células da planta hospedeira (JACOB et al., 2009). Os fitopatógenos, os Gram-negativos, são capazes de colonizar seu hospedeiro através de inúmeros sistemas. Os sistemas mais comumente utilizados para que as bactérias realizem a tarefa de colonização do hospedeiro dividem-se em 5 grupos (Tipos I a V) e podem, ainda, ser agrupados em Sec-dependentes, onde consistem os Tipos II e V, ou em Sec-independentes, onde consistem os Tipos I e III. O sistema tipo IV (SSTQ) possui vias tanto Sec-dependentes como independentes (JACOB et al., 2009). A Figura 5 mostra um esquema dos cinco tipos de sistemas de secreção de maneira simples e didática.

Os sistemas Sec-dependentes – Sistemas tipo II (SSTD) e V (SSTC) apresentam um complexo de proteínas que catalisam a translocação por meio da membrana interna até o espaço periplasmático através do reconhecimento de um peptídeo sinal na porção N-terminal. O SSTD é muito conservado nas bactérias Gram-negativas, conseqüentemente, está presente em *Xac* contendo duas cópias deste (DA SILVA et al., 2002). Este sistema está associado com a secreção de exoenzimas como pectato liases, poligalacturonases, proteases, celulasas e alcalinas fosfatases, e essas, por sua vez, estão comumente relacionadas à degradação de tecidos da planta hospedeira (SALMOND E REEVES 1993; BRUNINGS E GABRIEL, 2003). As duas etapas para a secreção das exoenzimas ocorrem da seguinte maneira: 1) todo aparato Sec (Sistema Secretório Geral Conservado) associa a substância que será secretada ao peptídeo sinal e a exporta. Isso ocorre através da membrana interna até o espaço periplasmático. 2) Os componentes de secreção tipo II secretam o produto pela membrana externa (PUGSLEY 1993). Estudos recentes mostram que a *Xac*, além de possuir genes especificamente definidos para a secreção via SSTD, também secreta enzimas que degradam a parede celular da planta cítrica infectada (BAPTISTA, 2006). WANG e colaboradores (2008) mostraram, também, que há interação entre alguns dos sistemas de secreção, uma vez que algumas proteínas do SSTD são controladas pelos genes *hrpX* e *hrpG*, que também são controladores do SSTT (Sistema tipo III).

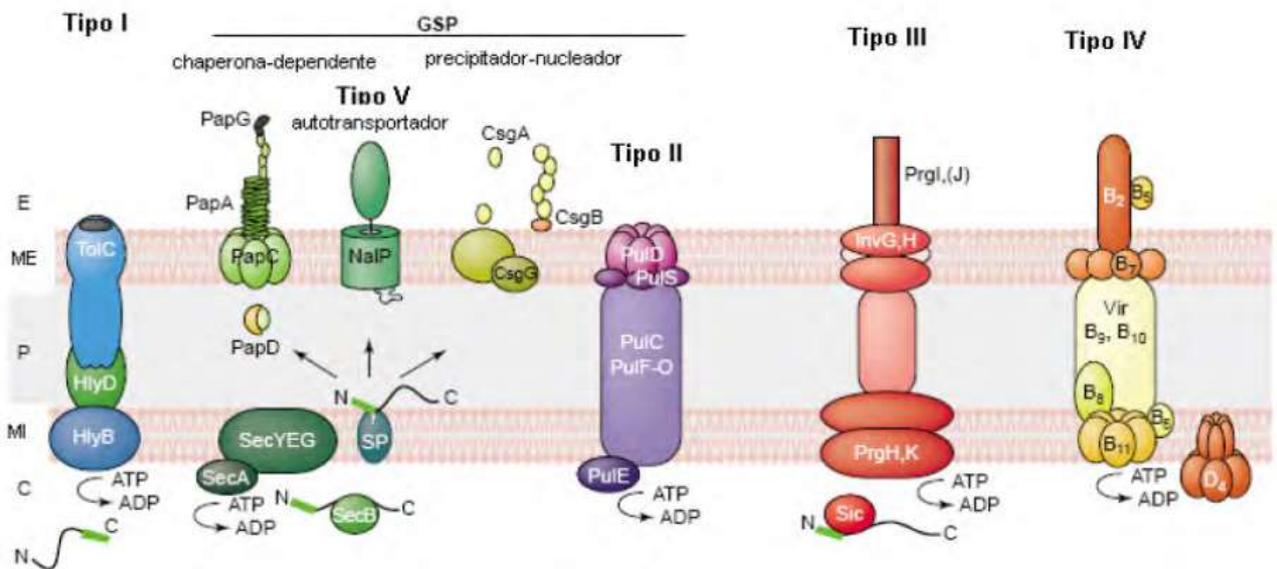
O SSTC é também chamado de auto transportador. O domínio  $\beta$ , que fica na porção C-terminal do auto transportador, vincula-se à membrana externa e forma um poro cuja porção N-terminal da proteína passa. Em seguida ocorre uma auto proteólise e a proteína é liberada para o meio extracelular (THANASSI et al.1998).

Já os Sistemas Sec-independentes – Sistemas I e III – são os constituintes diretos do complexo secretório e mandam o substrato para o meio externo, através de secreção contínua (DUONG E WICKNER 1997; HUECK, 1998; REMAUT E WAKSMAN 2004). Em detalhes, o sistema secretório do tipo I, é composto pelas proteínas HlyB, HlyD e TolC, e secreta algumas proteases, toxinas e lipases. A função do sistema I está atrelada ao transporte de proteínas que saem do citoplasma e vão para o meio extracelular. O exemplo mais comum deste sistema é observado em *E. coli* e exerce a função de secreção da hemolisina (HUECK, 1998). Neste sistema há três estruturas participantes: 1) ATPase na membrana interna para gerar energia ao sistema, 2) uma proteína de membrana externa que gera um poro de passagem e 3) proteína de fusão de membrana que ancora membrana interna e associa a proteínas das membranas interna e externa (HUECK 1998; REMAUT e WAKSMAN 2004).

Como já foi dito, *Xac* contem um sistema secretor especializado em injetar proteínas que são essenciais nas vias de patogenicidade e virulência. Dessa forma, todo material modulador de patogenicidade e virulência é injetado para dentro do citoplasma celular das plantas infectadas pelo patógeno, através de um aparato. Este aparato, que é chamado de sistema secretório tipo III ou SSTT, é conservado entre diversos patógenos (HUECK, 1998; CORNELIS e VAN GIJSEGEM, 2000; YEN et al., 2007). Em fitopatógenos, há um grupo de genes, já mencionado, que codificam o SSTT. Este grupo de genes é chamado de hrp (Hypersensitive Response And Pathogenicity), essenciais para garantir a patogenicidade e também a multiplicação bacteriana na planta hospedeira. Uma vez expressos ocorre o desencadeamento de sintomas já conhecidos e caracterizados nas plantas suscetíveis (ALFANO E COLLMER, 1997). Em fitobactérias, o SSTT é codificado por cerca de 25 genes, cujas proteínas formam um complexo que atravessa tanto a membrana interna quanto a membrana externa celular bacteriana. Além disso, são constituintes do sistema, também, uma proteína formadora de poro na membrana externa bem como uma ATPase citoplasmática (THANASSI, 2000; HUECK, 1998). Todas essas proteínas associam-se a uma estrutura supramolecular semelhante a uma seringa (cujo corpo está inserido na membrana interna e a agulha passa pela membrana externa) contactando a célula hospedeira (ANDERSON, 1999; BÜTTNER, 2002; ALFANO, 1996). Além das proteínas que garantem a estrutura do sistema secretor, há também uma estrutura basal e um pilus, que são conservados entre inúmeras espécies de patógenos. Posteriormente, observou-se a mesma estrutura em fitopatógenos e esta recebeu o nome de pili Hrp (LI, 2002; BÜTTNER, 2002). Esse pilus Hrp é constituído por uma proteína em forma de hélice (não conservada entre fitopatógenos e patógenos de animais) que atravessa ambas as membranas celulares (EBEL, 1998; DELAHAY, 1999). O

SSTT tem um mecanismo de secreção similar aos sistemas de biogênese das organelas, onde uma das vias tem a função de montagem das estruturas de superfície (THANASSI, 2000).

**Figura 5.** Principais sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas. Tipo I, exemplo de secreção de hemolisinas em *Escherichia coli*. Tipo V, montagem do P-pili em *E. coli*. Tipo II, secreção de pululanase por *Klebsiella axytoca*. Tipos III e IV, para a secreção de proteínas em *Xac*. C: meio intracelular bacteriano. MI: membrana interna bacteriana. P: espaço periplasmáticos. ME: membrana externa. E: espaço extracelular bacteriano



Fonte: REMAUT E WAKSMAN (2004)

Contudo, a hipótese de funcionamento desse sistema está embasada no conceito de que o pilus age como uma ponte entre bactéria e células eucarióticas do hospedeiro e gera o contato físico entre eles (HUECK, 1998; THANASSI, 2000; GALÁN, 1999; LI, 2002) que possibilita o SSTT exportar proteínas bacterianas efetoras para a célula hospedeira. Esse processo acarreta na modificação do metabolismo do hospedeiro. O estudo de WEBER et al. (2005) mostrou uma pesquisa com *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, e notou-se que além dessa bactéria ter um SSTT funcional, se ocorresse alterações nos genes *hrp* e *hrc* (Hypersensitive Response Conserved) (com excessão de *hrpF*) gerava um mutante que inutilizava o pilus vinculado ao SSTT e, portanto, a incapacidade de liberar proteínas relacionadas a esse sistema. Em outras palavras o sistema secretório tipo III exporta inúmeros fatores proteicos para o citoplasma do hospedeiro eucariótico com a finalidade de modular respostas celulares e permitir a interação (VIPREY, 1998 E PRESTON, 2001; HE, 2004).

Já o sistema secretório tipo IV (SSTQ) é considerado muito importante para *Xac*, uma vez que está ligado à patogenicidade dela. Este sistema é comumente estudado em *A.*

*tumifaciens* (fitopatógono causador de tumores comumente chamados de galha da coroa), e sabe-se que seu funcionamento é garantido por dois genes chamados virB e virD. Esses genes codificam proteínas formadoras de uma estrutura injetora de outras proteínas, as quais se ligam ao DNA do hospedeiro. Além disso, o sistema IV tem importância, também, na conjugação bacteriana bem como na colonização do hospedeiro (CHRISTIE, 2004; FRONZES et al., 2009). Conforme é conhecido, durante a conjugação, há uma transferência de um complexo-proteína-ácido nucleico de uma bactéria doadora para uma receptora através de um canal secretório e uma ponte (pilus). Quando o genoma de *Xac* foi sequenciado pôde-se notar que seu SSTQ é codificado por dois loci virB. O primeiro loci foi localizado no cromossomo de *Xac* e o outro no plasmídeo pXac64 (DA SILVA et al., 2002; ALEGRIA, 2004). Segundo Alegria e colaboradores (2005), acreditam que o SSTQ de pXac64 de *Xac*, possivelmente, codifica um sistema conjugativo tradicional, uma vez que o locus vir é similar ao sistema mpfa-J presente no plasmídeo pWWO de *Pseudomonas putita*, responsável pela conjugação desta bactéria (GREATED et al., 2002).

Finalmente, pode-se inferir que a análise de proteínas que são secretadas por fitopatógenos é uma poderosa ferramenta no âmbito do conhecimento de criar novos métodos de combate à infecção, principalmente, no caso, de entender melhor o aparato genético, bioquímico e metabólico da interação fitopatógono-hospedeiro. Além disso, seu entendimento é importante no desenvolvimento de novos compostos com maior especificidade sobre o patógeno e que sejam capazes de associar o controle da doença com ganhos de produtividade mas também minimizem o impacto ambiental.

#### *1.5. Legislação sobre o cancro cítrico*

As estratégias para controlar o cancro cítrico estão embasadas na atual legislação federal, Instrução Normativa nº. 37 de 05/09/2016 (IN 37), que visa a adoção de algumas medidas conforme a situação fitossanitária da doença na área afetada. Existem quatro cenários que podem ser encontrados na região onde há plantação de *Citrus*: 1) Área com praga ausente – estados brasileiros sem ocorrência da doença. Nessas áreas o controle é feito apenas para monitorar os pomares e evitar que o cancro cítrico se instale, cuidando da entrada de novas mudas e do trânsito de materiais e objetos. 2) Área livre da praga (ALP) – locais onde não há ocorrência da doença, embora ela esteja presente naquele estado. As medidas para controle tornam-se as mesmas que na área ausente de pragas. 3) Área sob erradicação ou supressão – locais com registro da presença da bactéria, porém com baixa incidência. O controle se baseia no plantio de mudas livres de sintomas e eliminação das plantas infectadas. 4) Área sob sistema de mitigação de risco (SMR) – onde a doença já foi disseminada por todo

estado. Nestes casos, o controle da doença é feito por uma série de medidas de manejo, como por exemplo, o monitoramento e controle de mudas sadias, trânsito de pessoas e equipamentos, instalação de quebra ventos, controle do minador dos *Citrus*, utilização de indutores de resistência; tudo objetivando a redução dos impactos da doença na produção. Dessa maneira as frutas de mesa, *in natura*, são selecionadas em unidades de consolidação (UC), com o objetivo de evitar que frutas infectadas sejam comercializadas (FUNDECITRUS, 2018).

Para o estado de São Paulo, a medida necessária para tentar controlar o cancro, a partir de 2017, foi o sistema de mitigação de risco (SMR). Essa determinação foi feita pela Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº. 10 de 20/02/2017 (Resolução SAA 10). A mitigação de risco é uma maneira de permitir que o agricultor mantenha plantas infectadas no pomar sem arrancá-las, mas tome alguns cuidados que são requeridos pela legislação tais como o monitoramento das pragas que afetam a citricultura, o cadastramento e inspeção do pomar, pulverização de cobre, utilização de quebra ventos bem como o corte e embalagem dos frutos, dentre outros já mencionados. Toda essa ação gera um certificado fitossanitário para permissão da exportação (FUNDECITRUS, 2018).

#### *1.6. Chalconas, hidroxichalconas e metoxichalconas: uma possível alternativa eficaz no combate ao cancro cítrico*

Agentes antimicrobianos atuam por diferentes mecanismos de ação: (1) bloqueio na síntese da parede celular, (2) bloqueio na síntese de proteínas, (3) alteração da permeabilidade da membrana, (4) bloqueio direto ou indireto da biossíntese de ácidos nucleicos e (5) inibição de divisão celular (VOLLMER, 2006; LOCK E HARRY, 2008; DEVASAHAYAM et al., 2010; SILVER, 2011). A membrana bacteriana é um alvo interessante para o desenho de novos antimicrobianos, pois o arranjo da membrana bacteriana é diferente da membrana dos eucariotos, conferindo maior seletividade ao composto (EPAND et al., 2016). Da mesma forma, compostos que atuam no processo de divisão celular bacteriana também são considerados promissores no tratamento de infecções bacterianas, uma vez que as proteínas e processos envolvidos na divisão da célula bacteriana são diferentes das células eucarióticas (VOLLMER, 2006; LOCK E HARRY, 2008).

Pesquisar novas substâncias com relevância e importância no setor agrícola, industrial e na medicina vem sendo cada vez mais necessário. Portanto, a técnica de screening de algumas classes de moléculas químicas, com o emprego de ensaios que as identifique (DONÁDIO, 2002), tem sido muito aplicada e bem sucedida e, mesmo com todo o avanço na área da síntese química, combinatória e planejamento racional de fármacos, os produtos

naturais ainda são investigados porque são fonte insubstituíveis de moléculas biologicamente ativas (HARVEY, 2000; DUARTE, 2006; BARREIRO E BOLZANI, 2009; CAMATTI et al., 2011). Além de oferecerem ampla diversidade estrutural são fontes de inúmeros fármacos existentes, atualmente. Portanto, há um grande interesse em moléculas provenientes de produtos naturais, embora nem todas sejam passíveis de síntese, uma vez que a estrutura pode ser complexa e tornar o processo muito difícil e custoso (DIAS et al., 2012; LAHLOU, 2013).

No entanto, existem dificuldades para aproveitar tais compostos e produzir novas substâncias que tenham ação antimicrobiana, uma vez que essa busca depende de muito tempo, alto custo, faltam leis específicas para a exploração da biodiversidade e há poucas informações sobre a identidade de muitos compostos naturais (STROHL, 2000). Mesmo assim, há algumas classes de compostos que contêm estruturas mais simples, porém com possibilidade de serem modificados, estruturalmente, visando a melhoria e/ou seletividade de atividades biológicas específicas. Uma dessas classes são os compostos fenólicos e, ainda dentro dos fenólicos, estão as chalconas.

As chalconas fazem parte de uma classe de metabólitos secundários de plantas que, frequentemente, atuam na defesa desses vegetais como neutralizadores dos radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) (Figura 6). Esse processo é ativado na planta para a prevenção de danos moleculares ou danos provocados por fitopatógenos, apontando que chalconas já apresentam uma atividade antimicrobiana, além da ação protetiva contra insetos e herbívoros (YAYLI et al., 2005). Além disso, esses compostos possuem pigmentação amarela, mas podem ficar vermelhas em meio alcalino (ZUANAZZI, 2002; ANDERSEN e MARKHAM, 2006). Elas podem ser extraídas de diversos órgãos vegetais (especialmente nas flores), tanto de plantas rasteiras como arbóreas, ou podem ser obtidas por síntese química (ZUANAZZI, 2002). No caso das chalconas serem sintetizadas, o procedimento pode ser feito por diferentes métodos, embora o mais comum seja a condensação aldólica de Claisen-Schmidt. Essa condensação ocorre entre aldeídos e cetonas aromáticas, normalmente à 50°C, e na presença de catalisadores ácidos ou básicos com diferentes padrões de substituição (SOLOMON e FRYHLE, 2008). Devido à presença de anéis aromáticos em sua estrutura, as chalconas possuem arranjo planar o que garante estabilidade química para a molécula e favorece sua atividade farmacológica.

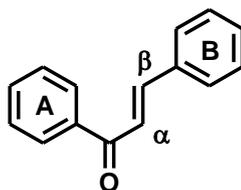
Quimicamente, as chalconas são compostos orgânicos, precursores dos flavonoides de cadeia aberta. Estruturalmente, as chalconas caracterizam-se por apresentar um núcleo que é principal componente da estrutura. Esse núcleo é chamado de 1,3 difenil-2-propen-1-ona ou, simplesmente, benzal-acetofenona (ALLINGER et al., 1976; ZUANAZZI, 2002; ZACARIAS

et al., 2006). Há dois anéis aromáticos presentes na estrutura química (denominados anel A e B) que estão ligados por três carbonos, constituindo cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas. Tanto a carbonila (C=O) quanto a porção olefínica (-C=C-) estão associadas aos anéis aromáticos, sendo que o anel A é proveniente da cetona e o anel B proveniente do aldeído (DHAR, 1981; RAO et al., 2004; PÉREZ et al., 2005). Além disso, a classificação das chalconas é feita considerando, inicialmente, o número de substituintes que estão presentes no núcleo B, sendo que esses substituintes podem ser um ou até três átomos e/ou grupos funcionais. Como as chalconas podem sofrer diversas modificações estruturais, dependendo do substituinte empregado, pode-se classificar suas interações com relação aos efeitos estéricos (gerados por substituintes volumosos), eletrônicos (gerados pela diferença da eletronegatividade entre os grupos substituintes) e presença de sítios ácido/base de Lewis (possibilidade de formar ligações de hidrogênio e/ou complexos intra e intermoleculares) (CESARIN; FERREIRA; BRAZ, 2001). Contudo, as modificações mais comuns que ocorrem na classe das chalconas são as substituições nos anéis A e B nas mais variadas posições (JURCSAK e ZANINI, 1999) além de adições halogênicas na dupla ligação (BIEBER, 1999). Quando trata-se de chalconas provenientes da natureza (plantas) sempre apresentam substituintes, os quais se localizam, comumente, no núcleo aromático e podem ser metoxilas, hidroxilas, O-glicosilas, C-glicosilas e C-alquilas (ZUANAZZI, 2002).

O verdadeiro interesse em estudar a classe das chalconas é devido à facilidade em realizar modificações moleculares, aumentando sua atividade alelopática, bem como a atuação delas nas atividades biológicas (BITENCOURT et al., 2007). Sendo assim, as chalconas têm sido alvo de muitos estudos com o objetivo de determinar sua estrutura, reatividade química, inibição/indução enzimática, ação diurética, anti-inflamatória (BANDGAR et al., 2010; NASSAR et al., 2011; BANO et al., 2013), antioxidante (PATIL et al., 2007; BANDGAR et al., 2010; DOAN et al., 2011), bacteriostática (DEVIA et al., 1998), antimalárica (YADAV et al., 2012), antifúngica (ANAND et al., 2012), antibacteriana (LIARAS et al., 2011), anti-HIV (SHARMA et al., 2011), antimutagênica, antiparasitária, anti-hiperglicêmica (ATTAR et al., 2011; HSIEH et al., 2012) e antitumoral (DIMMOCK et al., 1999; MURTHY et al., 2013; MAI et al., 2014). A eficácia das chalconas, no que diz respeito à ação antibacteriana, é maior contra bactérias Gram-positivas, na maioria das vezes. No entanto, alguns análogos têm potencial inibidor contra bactérias Gram-negativas (OPLETALOVA, 2000). Há registros de ação das chalconas contra as bactérias *Staphylococcus epidermidis* (DIMMOCK et al., 1999), *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ALCARAZ et al., 2000), *Escherichia coli* (ALVAREZ et al., 2004),

dentre outras. Alguns trabalhos testam, exatamente, extratos de plantas com alto teor de compostos fenólicos para investigar a ação específica de determinadas chalconas, como por exemplo, a 2',4'- dihidroxichalcona, componente majoritário da planta *Zuccagnia punctata* Cav. O trabalho de Zampini e colaboradores (2005) apontou que essa chalcona apresentou valores de MIC entre 0,10 e 1,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as bactérias *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia mercerscens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Stenotrophomonas maltophilia* e entre 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Outro trabalho que registra a eficácia das chalconas é o de Sato e colaboradores (2003), que isolaram cinco compostos da raiz de *Erythrina poeppigiana* (corticeira), dos quais dois deles eram chalconas: a angolensina ( $\alpha$ -metildioxibenzoina) e a eripostirene (4,2'-dihidroxi-4'-metoxi-5'-prenil-chalcona). Posteriormente os compostos foram testados contra 13 cepas de *S. aureus* e a eripostirene apresentou a melhor ação (MIC = 6,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

**Figura 6.** Estrutura geral das chalconas



No entanto, apesar do extenso estudo sobre a ação antimicrobiana das chalconas, seu mecanismo de ação ainda é incerto (WU et al., 2013). Porém alguns levantamentos sugerem que a ação esteja ligada a três mecanismos comumente citados: danos à membrana citoplasmática - forte indício de que compostos aromáticos e fenólicos atuem na membrana citoplasmática, alterando sua estrutura, bem como afetam no transporte ativo, além de coagular o conteúdo celular (IKIGAI et al., 1993; SIKKEMA et al., 1995; BURT, 2004), inibição da síntese de ácidos nucleicos (MORI et al., 1987) e inibição do metabolismo energético (HARAGUCHI et al., 1998). Alguns autores ainda detalharam alguns alvos específicos variados das chalconas, como por exemplo, inibidores da proteína tirosina fosfatase A / B (PtpA e PtpB), inibidores da enzima lactato / isocitrato desidrogenase, inibidores da formação de biofilmes, inibidores da enzima DNA girase, inibidores da bomba de efluxo NorA, inibidores da proteína FtsZ, ou ainda, responsáveis pelo rompimento da membrana celular (SIVAKUMAR et al., 2010; SIVAKUMAR et al., 2012; MAHAPATRA et al., 2015).

A membrana citoplasmática da bactéria é uma estrutura essencial na respiração celular e no transporte de nutrientes. Sendo assim, conforme já mencionado, essa estrutura é um excelente alvo para desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana, pois não pode ser facilmente combatida através de simples mutações pontuais e, portanto, exibirão baixas frequências de resistência. Poucos fármacos comercialmente disponíveis possuem esse MOA (telavancina e daptomicina) (CARPENTER E CHAMBERS, 2004; HIGGINS et al., 2005; POGLIANO et al., 2012; WENZLER E RODVOLD, 2015; KIRKHAM et al., 2016). A busca por novos compostos antimicrobianos que atinjam a membrana citoplasmática bacteriana de novas maneiras é de grande interesse para o desenvolvimento de novos compostos com a finalidade de combater o surgimento da resistência bacteriana. Todo esse contexto de atuação das chalconas incentivou nosso grupo a investigar a atividade bacteriana de algumas chalconas bem como seu modo de ação específico.

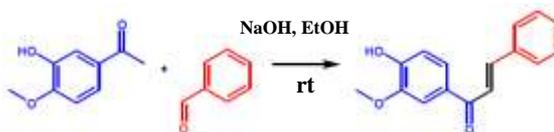
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Síntese das Metoxichalconas e Hidroxichalconas (realizado pelos colaboradores de São José do Rio Preto)

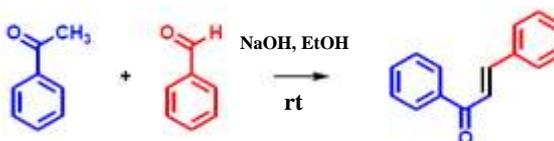
Para a preparação das hidroxichalconas e metoxichalconas foram empregadas reações de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, por catalise básica, utilizando derivados de apocinina com benzaldeído (Figura 7A), e acetofenona com benzaldeído (Figura 7B); respectivamente. O catalisador, etóxido de sódio ( $\text{EtO}^-\text{Na}^+$ ), foi preparado a partir da solubilização de 800 mg de hidróxido de sódio em 20 mL de etanol. Em um balão reacional monotubulado 5 mmol de derivados de benzaldeído e derivados de apocinina (no caso de hidroxichalconas) bem como acetofenona (no caso de metoxichalconas), solubilizados em 10 mL de etanol e 20 mL da solução 5 mmol do catalisador. O pH final das reações foi aproximadamente 14,0, para as hidroxichalconas e 12,0 para as metoxichalconas. As reações foram mantidas sob agitação constante até ser constatada a conversão significativa dos reagentes em produtos. Este acompanhamento foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada, em que foi utilizada cromatoplaça de gel de sílica em base de alumínio. Após a conversão dos reagentes em produtos, as reações foram vertidas em gelo triturado e armazenados. Após este procedimento adicionou-se 50,0 mL de ácido clorídrico e observou  $\text{pH} = 1,0$ . O produto obtido precipitou e foi seco à temperatura ambiente. Quando as substâncias apresentaram impurezas estas foram submetidas à métodos cromatográficos de purificação. As fórmulas estruturais das hidroxichalconas e das metoxichalconas com atividade antimicrobiana selecionadas, através do REMA, estão apresentadas na Tabela 1.

**Figura 7.** Reação genérica de Condensação Aldólica de Claisen-Schmidt para obtenção de **(A)** hidroxichalconas e **(B)** metoxichalconas

**(A)**



**(B)**



### 2.2. Linhagens celulares e condições de crescimento

Para a avaliação da ação antimicrobiana dos compostos o grupo usufruiu do microrganismo fitopatológico, praga quarentenária e causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*X. citri* - *Xac*) obtida do Instituto Biológico, Seção de Bactérias Fitopatológicas (IBSBF-1594) (SCHAAD, *et al.*, 2006). Além disso, a linhagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* GFP-ZapA com septo marcado (*Xac amy::pgcd21-ZapA* – B.C. Santos; K. U. Sato; H. Ferreira (dado não publicado) foi utilizada para análises de mecanismo de ação em septo de divisão celular, através de microscopia de fluorescência. As linhagens foram cultivadas em meio NYG à 29° C.

### 2.3. Screening de Compostos

Inicialmente os compostos avaliados neste trabalho foram “desenhados” com base em um amplo levantamento bibliográfico que o grupo vem buscando. O objetivo inicial do grupo era buscar e desenvolver compostos com potencial ação antimicrobiana, porém, especificamente, que o alvo primário dos compostos fosse desestruturação de septo de divisão celular. Compostos que atuam em divisão celular bacteriana são extremamente interessantes, uma vez que proteínas e processos envolvidos na divisão da célula bacteriana são diferentes das células eucarióticas (VOLLMER, 2006; LOCK E HARRY, 2008), podendo gerar baixa toxicidade do composto além de alta seletividade e especificidade. Todos os compostos, apresentados neste trabalho, foram submetidas à síntese e processo de purificação. A purificação de cada composto foi certificada através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (dados realizados pelos colaboradores do LAQ - Laboratório de Antibióticos e

Quimioterápicos do IBILCE e não apresentados neste trabalho). No geral, 77 compostos tiveram sua capacidade antimicrobiana avaliada e as análises de Screening inicial selecionaram compostos que apresentavam porcentagem de inibição bacteriana  $\geq 90\%$ . Sendo assim, os compostos das séries hidroxichalconas e metoxichalconas foram submetidos à screening inicial que consistiu do REMA adaptado segundo Palomino et al., (2002) e Silva et al. (2013). Foram testados apenas os potenciais de inibição de crescimento bacteriano nas maiores concentrações (100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), padronizadas pelo nosso grupo de pesquisa.

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

A avaliação da inibição de crescimento bacteriano foi realizada utilizando-se o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) descrito por Palomino et al. (2002) e Martin et al. (2003) com algumas modificações (SILVA, et al., 2013). A alteração de cor, decorrente deste ensaio, foi detectada em scanner de fluorescência Synergy H1 (BIOTEK) utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. O potencial inibitório de cada tratamento foi expresso pela porcentagem de morte celular, calculada em relação ao controle negativo. Foi possível a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) após a realização de três REMAS independentes bem como a elaboração gráfica da proporção dose-resposta dos dados gerados em planilhas no Excel 2010 e Origin 8.0, contendo valores de média aritmética bem como valores de desvio padrão. Eram gerados gráficos da dose-resposta do composto em seguida eram elaboradas regressões polinomiais que relacionavam porcentagem de inibição bacteriana e concentração de composto. Essas regressões forneciam equações as quais possibilitava o cálculo da MIC de cada composto.

#### *2.5. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (MBC)*

A MBC é a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano, ou seja, onde houve 99,9% de morte bacteriana (DUARTE et al., 2003). O teste consistiu da inoculação da mutiplaca de REMA, através de um replicador de placas, em placa de Petri contendo meio sólido e mantido em incubadora B.O.D à 29 °C, por 48 horas.

#### *2.6. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos ativos*

Para avaliar os possíveis mecanismos de ação dos compostos que apresentaram capacidade antimicrobiana, nosso grupo de pesquisa possui alguns métodos comumente utilizados (1) Ensaio de permeabilidade de membrana (2) Ensaio de desestruturação de septo de divisão celular (3) Ensaio de síntese de macromoléculas e (4) Ensaio da concentração de

ATP intracelular (os dois últimos ensaios foram feitos em colaboração com o Laboratório de Bioquímica da Universidade de Groningen – Holanda).

### 2.6.1. Ensaio de Permeabilidade de Membrana

Foi realizado de acordo com Król e colaboradores (2015) salvo algumas adaptações para *X. citri*, uma vez que foi realizado com número de células proporcionais ao REMA ( $10^5$  células) para manter o padrão dose-resposta entre microrganismo e composto testado. A análise foi feita com o kit Live/dead Baclight (Thermo-Scientific L7012). Esse kit utiliza misturas de dois corantes, sendo eles o SYTO9 e o Iodeto de Propídio (IP). Ambos visam a coloração fluorescente do ácido desoxiribonucléico (DNA), embora essa marcação difere tanto em características espectrais como na capacidade de penetração nas células bacterianas. O SYTO9 tem a propriedade de colorir todas as células bacterianas de azul ou verde (dependendo do filtro de microscópio utilizado), tanto as de membrana citoplasmática intacta como as de membrana danificadas. No entanto o IP penetra apenas nas células que possuem alguma perturbação na estrutura da membrana citoplasmática, uma vez que a molécula de IP é maior e só consegue penetrar no interior celular bacteriano, a partir de danos gerados na membrana, como por exemplo poros. Ocorre a formação de um complexo PI-DNA emitindo forte fluorescência vermelha, o que garante a capacidade de quantificar a viabilidade celular (ZHOU et al., 2018). É válido lembrar que os máximos de excitação/ emissão para estes corantes são cerca de 480/500 nm para coloração de SYTO 9 e 490/635 nm para IP.

Toda a análise foi realizada nos tempos de 15 e 30 minutos levando em consideração que trinta minutos seria tempo suficiente para um composto atuar na membrana citoplasmática, já que o tempo de doubling time de *X. citri* é 120 minutos, portanto aceitável de ser avaliado dentro do período de 30 minutos, não excedendo o seu ciclo celular bacteriano. O controle positivo utilizado foi aquecimento térmico das células de *Xac*, segundo Morão et al. (2015). Todas as visualizações foram feitas utilizando um microscópio Olympus BX-61, equipado com uma câmera monocromática OrcaFlash-2.8, e orientado pelo software CellSens versão 11, através dos filtros DAPI/FITC e Texas Red.

### 2.6.2. Ensaio de Desestruturação de Septo de Divisão Celular

As células avaliadas ao microscópio foram coletadas de placas de REMA após 15 e 30 minutos de exposição aos compostos. Em seguida foram imobilizadas em lâminas com agarose, essencialmente como descrito por Silva et al. (2013). *X. citri* com septo marcado a partir do promotor pgcd21 foi cultivada e a expressão de GFP-ZapA foi induzida na presença de arabinose 0,01%, durante 30 minutos. Todas as visualizações foram feitas utilizando um

microscópio Olympus BX-61, equipado com uma câmera monocromática OrcaFlash-2.8, e orientado pelo software CellSens versão 11, através do filtro GFP.

### 2.7. Síntese de Macromoléculas

Essa análise foi feita apenas para dois dos compostos que apresentaram ação contra *X. citri*, sendo eles **BC1** e **T9A**. Quatro vias de síntese macromoleculares foram avaliadas através da monitorização da incorporação de precursores marcados radioativamente. [5-<sup>3</sup>H] uridina, [metil-<sup>3</sup>H] timidina, L-[3,4,5-<sup>3</sup>H(N)] leucina e D-[6-<sup>3</sup>H(N)] cloridrato de glucosamina (todos a 0,5 µCi/mL) foram utilizados para monitorar, respectivamente, a síntese de RNA, DNA, proteína e peptidoglicano. Durante este experimento, as células de *X. citri* foram cultivadas até a fase exponencial inicial em meio Xam1. Utilizou-se 1 mM de precursor não marcado para RNA e peptidoglicano, e 10 µM para DNA e proteína. As células foram incubadas na presença de precursores marcados durante 80 minutos com agitação a 30 °C. *X. citri* foi testada na presença de 30 µg.mL<sup>-1</sup> de **BC1** e 20 µg.mL<sup>-1</sup> de **T9A**, sem composto (controle negativo) e com um antibiótico inibidor da via de síntese testada (controle positivo) - RNA: rifampicina 0,625 µg.mL<sup>-1</sup>, DNA: ciprofloxacina 10,0 µg.mL<sup>-1</sup>, proteína: tetraciclina 10 µg.mL<sup>-1</sup> e peptidoglicano: penicilina G 800 µg.mL<sup>-1</sup>. Pelo menos oito réplicas foram feitas por precursor testado. Durante a incubação, alíquotas foram retiradas e precipitadas com ácido tricloroacético 12% gelado, por 35 minutos e então foram filtradas através de membranas de nitrocelulose (tamanho de poro de 0,45 µm). Os filtros foram lavados com ácido tricloroacético 12% gelado, transferidos para 2 mL de fluido de cintilação Ultima Gold MV (PerkinElmer) e medidos num analisador de cintilação líquida Tri-Carb 2000CA (Packard Instruments).

Para esses ensaios foi realizado um novo REMA com a finalidade de avaliar o impacto dos compostos na atividade respiratória após um curto período de tempo. As células de *X. citri* foram incubadas em contato com resazurina em meio Xam1, em placas de 96 poços. O composto **BC1** foi utilizado a uma concentração final de 30 µg.mL<sup>-1</sup> enquanto **T9A** foi utilizado a 20 µg.mL<sup>-1</sup>, para *X. citri*. Rifampicina 0,625 µg.mL<sup>-1</sup>, ciprofloxacina 10,0 µg.mL<sup>-1</sup>, tetraciclina 10 µg.mL<sup>-1</sup> e penicilina G800 1,0 µg.mL<sup>-1</sup> foram usados como controles bem como amostras sem adição de composto. A resazurina foi adicionada a uma concentração final de 0,1 µg. mL<sup>-1</sup>. A fluorescência (excitação 530 nm, emissão 560 nm, largura de banda 9 nm) foi registada de 20 em 20 minutos até 120 minutos, num leitor de placas BioTek Synergy Mx 96-well plate reader.

### 2.8. Ensaio da concentração de ATP intracelular

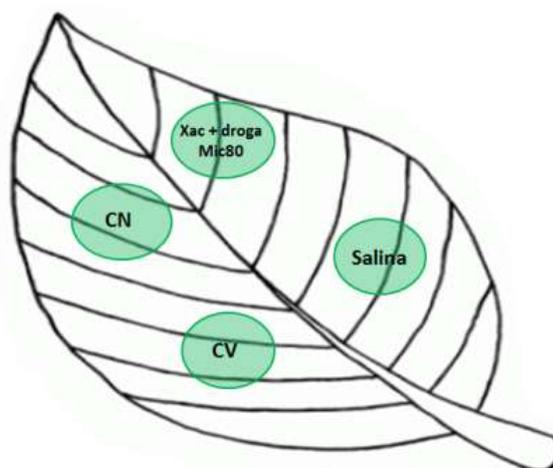
Os níveis de ATP foram medidos em *X. citri* utilizando o ensaio de Viabilidade Celular Microbiana BacTiter-Glo™ (Promega). Utilizou-se CCCP (carbonil cianeto m-

clorofenil hidrazina,  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como controle positivo para *X. citri*. As células foram incubadas numa placa de 96 poços ( $30^\circ\text{C}$ , 1000 rpm), durante 80 minutos para *X. citri*. Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cultura de células a 100  $\mu\text{L}$  de Reagente BacTiter-Glo™, por 5 minutos, numa placa branca de 96 poços ( $26^\circ\text{C}$ , 1000 rpm). A luminescência foi medida em um luminômetro Tecan Infinite F200 Pro, sendo a quantidade de luz emitida uma medida para a concentração de ATP intracelular.

### 2.9. Teste de patogenicidade - infiltração “in planta” (dose subletal)

O teste de infiltração “in planta” foi feito de acordo com Silva et al. (2013), adaptado, considerando cada um dos compostos ativos em *Xanthomonas citri*. Seguiu-se aplicando doses de  $\text{MIC}_{80}$  de composto que apresentou ação, em folhas de *Citrus* (triplicata). Foi realizado um ensaio de REMA de forma a obter  $10^5$  células/poço junto às doses corretas e proporcionais de cada composto avaliado. As folhas utilizadas receberam quatro tipos de tratamento, sendo eles (1) controle negativo - inóculo de *X. citri* ressuspensa em salina 0,9%; (2) controle negativo 2 – apenas salina 0,9%; (3) controle do veículo – inóculo de *X. citri* contendo DMSO 1% e ressuspensa em salina 0,9%; (4) amostra em análise – *X. citri* tratada na concentração de cada composto e ressuspensa em salina 0,9% (Figura 8). Todos os tratamentos foram aplicados na folha com auxílio de seringa. O teste foi monitorado por vinte dias visando o acompanhamento de aparecimento ou não de sintoma de cancro na folha. Todas as folhas foram destacadas e escaneadas para avaliação dos resultados, posteriormente autoclavadas e descartadas.

**Figura 8.** Modelo de aplicação para teste de infiltração “in planta” com dose subletal



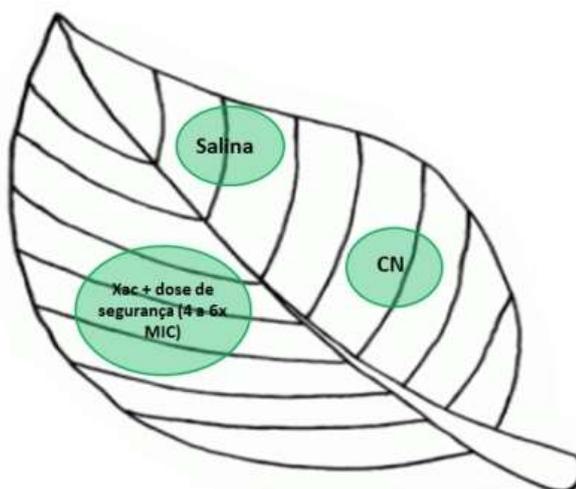
### 2.10. Indução de resistência para *Xanthomonas citri*

O teste de indução de resistência foi realizado de acordo com Oz e colaboradores (2014) salvo algumas adaptações. Análises foram feitas em placas de REMA de 96 poços para os compostos e canamicina (controle positivo); todos em duplicata. Foram adicionadas doses de composto referentes à sua MIC/6; MIC/4; MIC/2; MIC; 2x MIC; 4x MIC e 6x MIC em cada poço da placa. O inóculo de *X. citri* foi cultivado em 17 horas, onde sua D.O<sub>600nm</sub> foi ajustada para 0,8 seguida de diluições adequadas para garantir a adição de 10µL de inóculo/poço, sabendo-se que há 10<sup>5</sup> células/poço – cuja D.O<sub>600nm</sub> obtida foi de 0,1. A cada 24 horas a placa em análise era observada, considerando a turbidez de cada poço. Poços turvos representavam crescimento celular bacteriano e alíquotas eram retiradas (10µL) do poço turvo de maior concentração do composto. Em seguida, a alíquota era adicionada na próxima coluna com as mesmas doses para análise de turbidez consecutiva. O ensaio foi realizado por cerca de 20 dias.

### 2.11. Teste de aplicação “in planta” em dose de segurança

O teste da dose de aplicação segura foi realizado para todos os compostos que foram submetidos ao teste de indução de resistência e consistiu da mesma metodologia do teste de infiltração “in planta” com dose subletal. Neste caso a concentração de composto inoculado “in planta” foi considerada uma dose acima daquela encontrada no teste de indução de resistência, levando-se em conta que seria uma concentração suficiente para combater, inclusive, linhagens naturalmente resistentes. O modelo de aplicação na folha foi o mesmo mostrado na Figura 9. Após 20, as folhas foram destacadas, escaneadas e analisadas quanto ao aparecimento de cancro ou não.

**Figura 9.** Modelo de aplicação na folha (teste com dose segura)

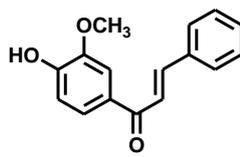
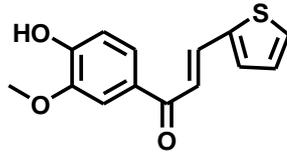
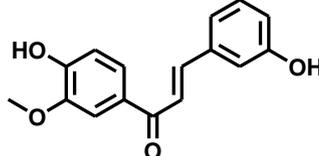
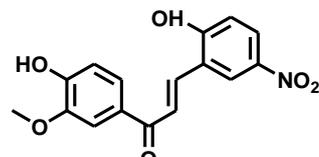


### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

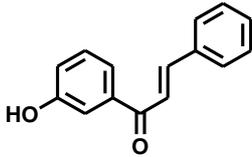
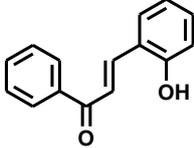
#### 3.1. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) e ação bactericida

Combater o cancro cítrico é um dos maiores desafios da citricultura paulista e, até o momento, não há nenhum tratamento eficaz contra a bactéria *Xanthomonas citri*. Dessa forma, o desenvolvimento de substâncias inovadoras e ecologicamente corretas para combater *Xac* se faz necessário, visando não somente prevenir a disseminação da doença, mas também na tentativa de impedir o acúmulo de resíduos tóxicos no solo, como o cobre, que apresenta efeito residual tóxico e cumulativo. Uma vez que as plantas produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (AHMAD et al., 2001). Seis compostos com potencial ação antimicrobiana foram selecionados neste trabalho, pois apresentaram ação contra *Xanthomonas citri* com porcentagem de inibição de crescimento superior a 90%. A estrutura molecular dos compostos selecionados bem como seu código está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Metoxichalconas e Hidroxichalconas com ação antimicrobiana selecionados via Screening

Hidroxichalconas e Metoxichalconas com ação contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	
Código do Composto	Estrutura molecular
BC1	
A4	
A11	
A19	

---

<b>MA1</b>	
<b>T9A</b>	

---

A Tabela 2 apresenta dados obtidos dos ensaios de inibição de crescimento bacteriano e nota-se que para a maior concentração avaliada ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) houve cerca de 96% de inibição bacteriana contra *Xac* para todos os compostos que apresentaram ação. Também é possível observar, na Tabela 2, os valores obtidos das MIC's de cada composto, determinadas através de regressões polinomiais com auxílio do software Origin 8.0. O composto mais potente dentre os seis selecionados foi **A19**, pois apresentou os menores valores de MIC.

Apesar do oxiclreto de cobre ter mostrado o menor valor de MIC, no geral, e consequentemente atraindo para seu uso contínuo, ainda é válido considerar que o cobre é um metal pesado com efeitos potencialmente tóxicos, conforme mencionado anteriormente. Sendo assim, é de extrema relevância considerar sua substituição aos compostos avaliados, uma vez que são derivados de compostos naturais e, provavelmente, devam apresentar menor toxicidade e impactos negativos à fauna, flora e meio ambiente, em geral.

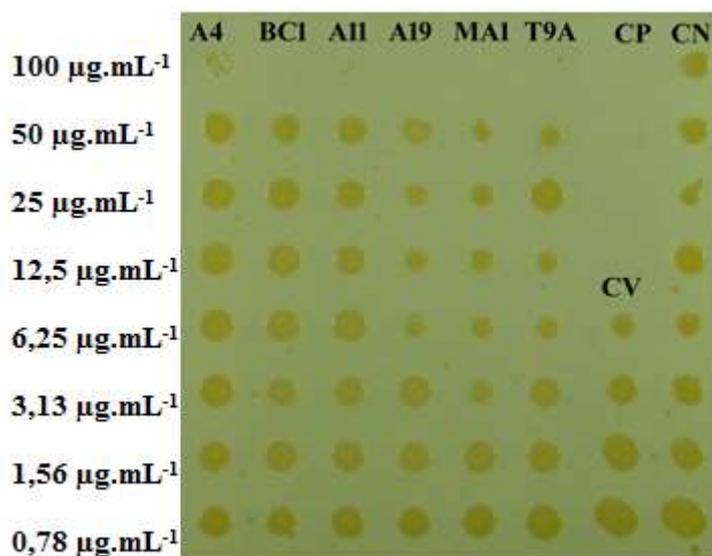
**Tabela 2.** Valores de MIC e (%) de inibição de crescimento

<b>Composto</b>	<b>(%) inibição de crescimento (100 µg.mL<sup>-1</sup>) (estatística ±SD)</b>	<b>MIC<sub>50</sub> <i>Xac</i> (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>MIC<sub>50</sub> <i>Xac</i> (µM)</b>	<b>MIC<sub>90</sub> <i>Xac</i> (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>MIC<sub>90</sub> <i>Xac</i> (µM)</b>
<b>BC01</b>	96,70 ± 1,46	29,99	120	90,76	357,32
<b>MA1</b>	96,86 ± 0,53	20,07	89,60	36,16	161,43
<b>T9A</b>	96,63 ± 0,61	37,04	165,36	48,59	216,92
<b>A4</b>	96,27 ± 1,92	40,52	155,85	86,57	332,96
<b>A11</b>	96,47 ± 0,91	34,68	128,92	81,88	304,39
<b>A19</b>	96,98 ± 0,42	17,10	54,29	25,57	81,17
<b>*Canamicina (CP)</b>	94,91 ± 0,62	-	-	20	41,28
<b>Oxicloreto de cobre</b> (NAZARÉ et al., 2018)	-	-	-	43,1	20,05

\*Canamicina (CP) – Antibiótico utilizado como controle positivo.

Análises de MBC apontaram que **BC1**, **A11**, **A19**, **MA1** e **T9A** são bactericidas na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> enquanto que **A4** apresentou ação bacteriostática até a maior concentração testada, conforme mostra a Figura 10.

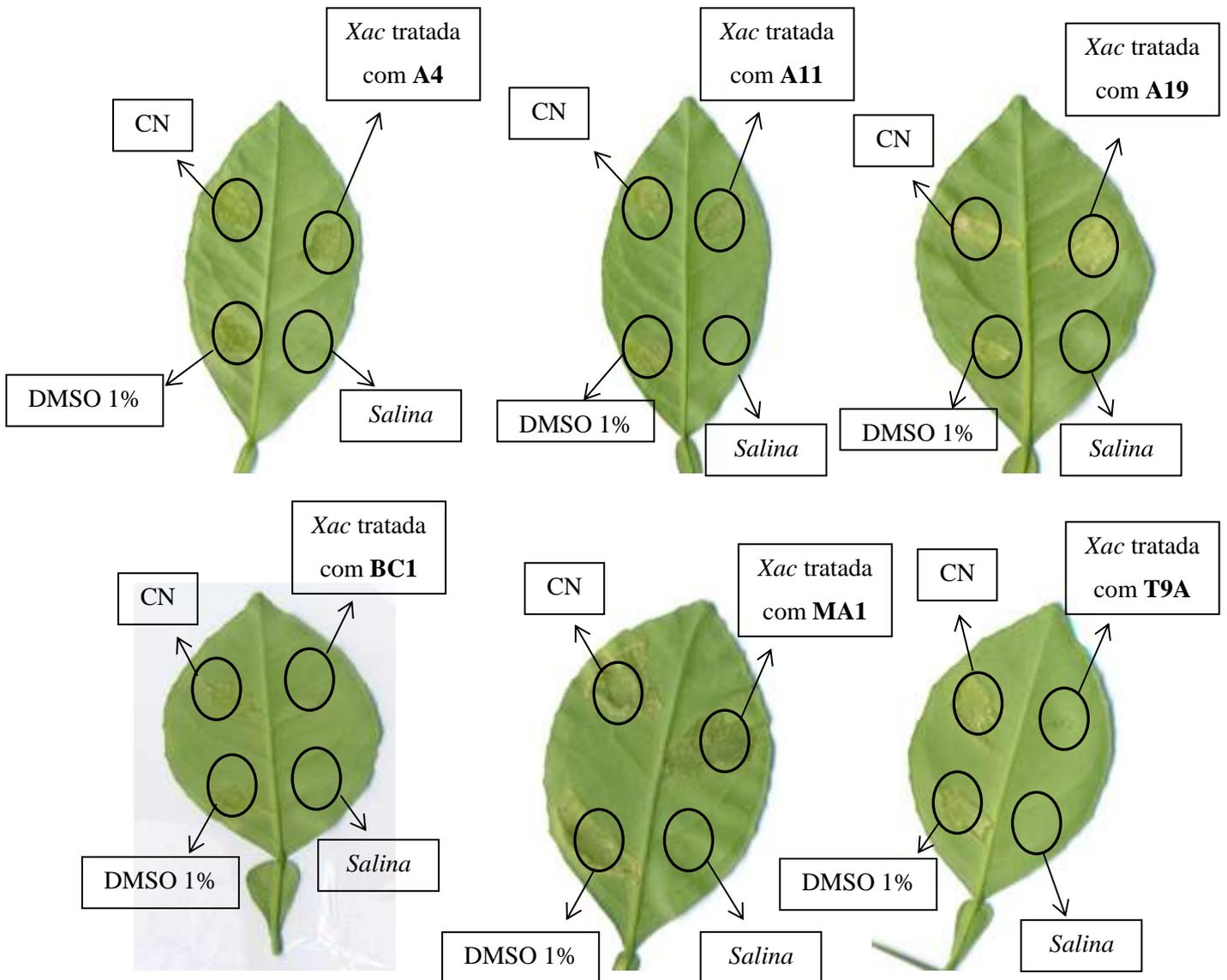
**Figura 10.** Avaliação de MBC para Hidroxichalconas e Metoxichalconas contra *X. citri* em função da concentração de composto utilizada



### 3.2. Teste de patogenicidade - infiltração “in planta”

Esse teste foi baseado no método de infiltração “in planta” onde aplica-se um volume padrão de *Xac* tratada com o composto a ser avaliado, com o auxílio de uma seringa. Aplica-se também, o mesmo volume de *Xac* sem tratamento e uma análise comparativa é realizada. A dose de aplicação neste primeiro teste foi a concentração de cada composto na MIC<sub>80</sub> (dose subletal), uma vez que a intenção era observar se os 20% de bactérias tratadas, porém viáveis era capaz de ainda causar sintomas de cancro ou se a planta respondia a essa infecção ativando seus sistemas de defesa. Em outras palavras, a exposição das células aos compostos na MIC<sub>80</sub> objetivou avaliar se os compostos aplicados em uma dose subletal seriam capazes de prejudicar quaisquer processos bioquímicos e/ou metabólicos, tornando a patogenicidade de *Xac* inviável. Foi registrado que, neste caso, houve surgimento de sintoma de cancro onde aplicou-se *Xac* tratada com os compostos em dose subletal, comprovando que a planta foi incapaz de apresentar um sistema de defesa eficaz e, conseqüentemente, o sintoma de cancro se consolidou. No entanto observa-se, na Figura 11, que para os compostos **A4**, **A11**, **A19** e **MA1**, as lesões de cancro surgiram de forma bem agressiva, com necrose e hiperplasia do tecido, porém para os tratamentos com **BC1** e **T9A** foi observada redução no nível de agressão da doença, uma vez que pequenas pústulas de cancro foram expressas, mas não tão agressivas como o controle negativo. Esses dois compostos demonstram ser promissores no que diz respeito a possíveis investimentos devido à grande eficácia para aplicação em pomares, tanto no âmbito protetivo quanto no sentido de amenizar a agressividade da doença.

**Figura 11.** Teste de infiltração “*in planta*” com dose subletal para os compostos bioativos.  
 CN: Controle Negativo; DMSO 1%: Controle do Veículo

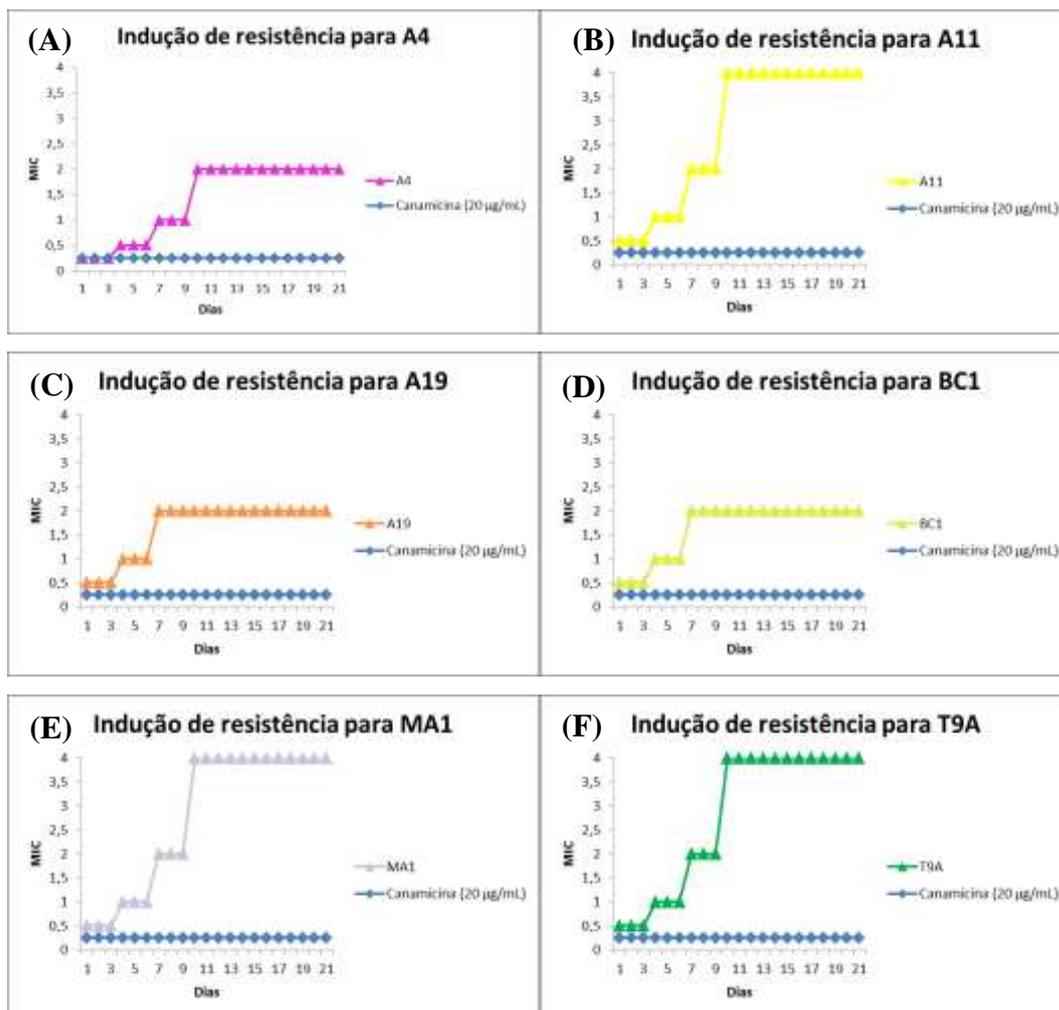


### 3.3. Indução de Resistência para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Neste teste foi observado, primeiramente, que não houve indução de resistência para o controle positivo canamicina na dose avaliada de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Também, foi possível determinar morte para **A4**, **A19** e **BC1** em doses duas vezes maiores que a MIC (Figuras 12A, 12C, 12D) e para **A11**, **MA1** e **T9A** doses quatro vezes a MIC (Figuras 12B, 12E, 12F). No entanto, este teste possibilitou que fosse determinada uma dose a qual denominamos “dose de aplicação segura”. Essa dose indica que naquela determinada concentração devem ser eliminadas toda e qualquer bactéria que possa infectar a planta, incluindo as mais resistentes, até o momento. Para certificação de que nosso conceito e a dose padronizada estavam corretos, foi realizado um novo teste de patogenicidade “*in planta*”, cuja dose de aplicação

segura de cada composto foi utilizada. Sendo assim, após, aproximadamente, 20 dias o teste foi observado e a infiltração com *Xac* tratada com o composto foi comparada com a infiltração de *Xac* sem tratamento. Notou-se que o controle negativo – *Xac* aplicada sem tratamento - já havia lesões de cancro enquanto que para *Xac*, que foi tratada com as doses de segurança, a indução de cancro foi eliminada (Figura 13).

**Figura 12.** Níveis de resistência registrados diariamente para populações de *Xac* contra (A) A4 (B) A11 (C) A19 (D) BC1 (E) MA1 (F) T9A e canamicina (Controle positivo)

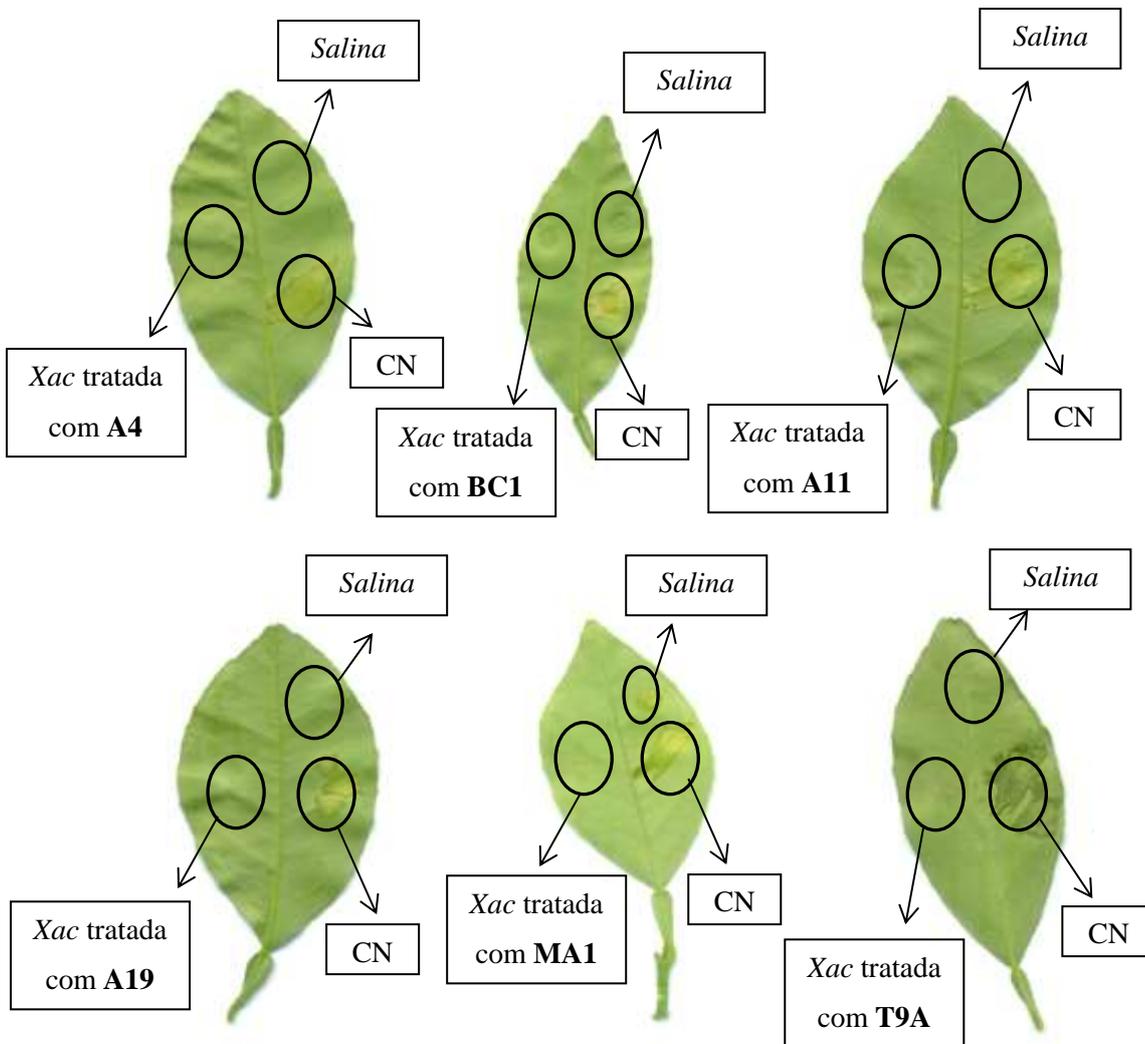


### 3.4. Teste de aplicação “in planta” em dose de segurança

O teste de aplicação da dose de segurança foi realizado para todos os compostos submetidos ao teste de indução de resistência. Resultados apontaram que a dose mínima a ser utilizada para morte total de possíveis células resistentes seria de 4x MIC para **A4**, **A19** e **BC1** enquanto que para **MA1**, **T9A** e **A11** seria acima de 6x MIC (Figura 12). Esse teste mostrou que os compostos são eficazes no tratamento do cancro e que a dose de aplicação segura está correta e padronizada, uma vez que foi eliminada a habilidade da bactéria causar cancro

(Figura 13). Finalmente, em estudos de toxicidade que poderão ser realizados futuramente, temos aqui alternativas que poderão vir a ser de interesse, pois todos induziram morte definitiva em pelo menos até 6xMIC.

**Figura 13.** Dose segura para aplicação “*in planta*” com os compostos bioativos. CN: Controle negativo – *Xac* sem tratamento e salina



### 3.5. Microscopia de Permeabilidade de Membrana Citoplasmática

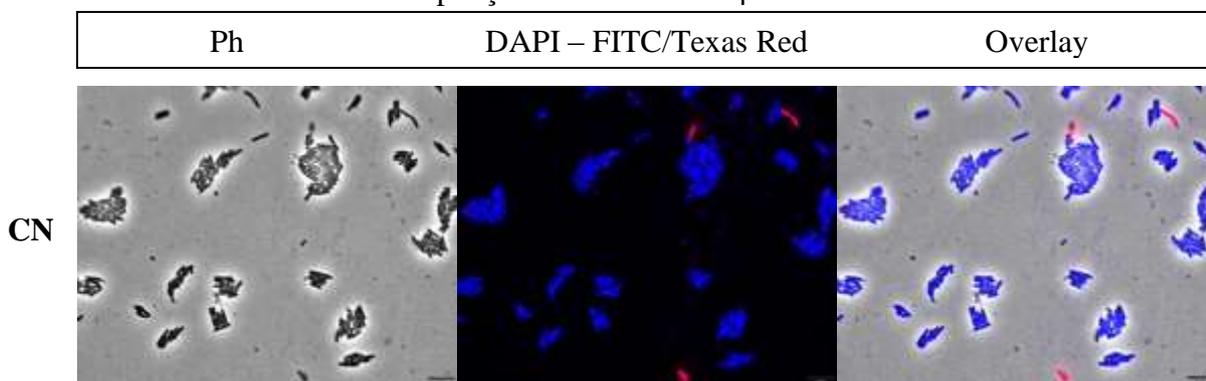
Sabe-se que a maioria das chalconas possui mecanismo de ação, possivelmente, relacionado a três vias distintas: (1) danos à membrana citoplasmática (IKIGAI et al., 1993); (2) inibição da síntese de ácidos nucleicos (MORI et al., 1987) ou (3) inibição do metabolismo energético (HARAGUCHI et al. al., 1998). Dessa forma foi extremamente importante a realização de alguns testes de mecanismo de ação desses compostos com a finalidade de estabelecer o verdadeiro modo de ação deles nas bactérias afetadas. O mecanismo de ação dos compostos foi avaliado utilizando técnicas previamente realizadas para investigar a atuação de compostos em *B. subtilis* e outros microrganismos como

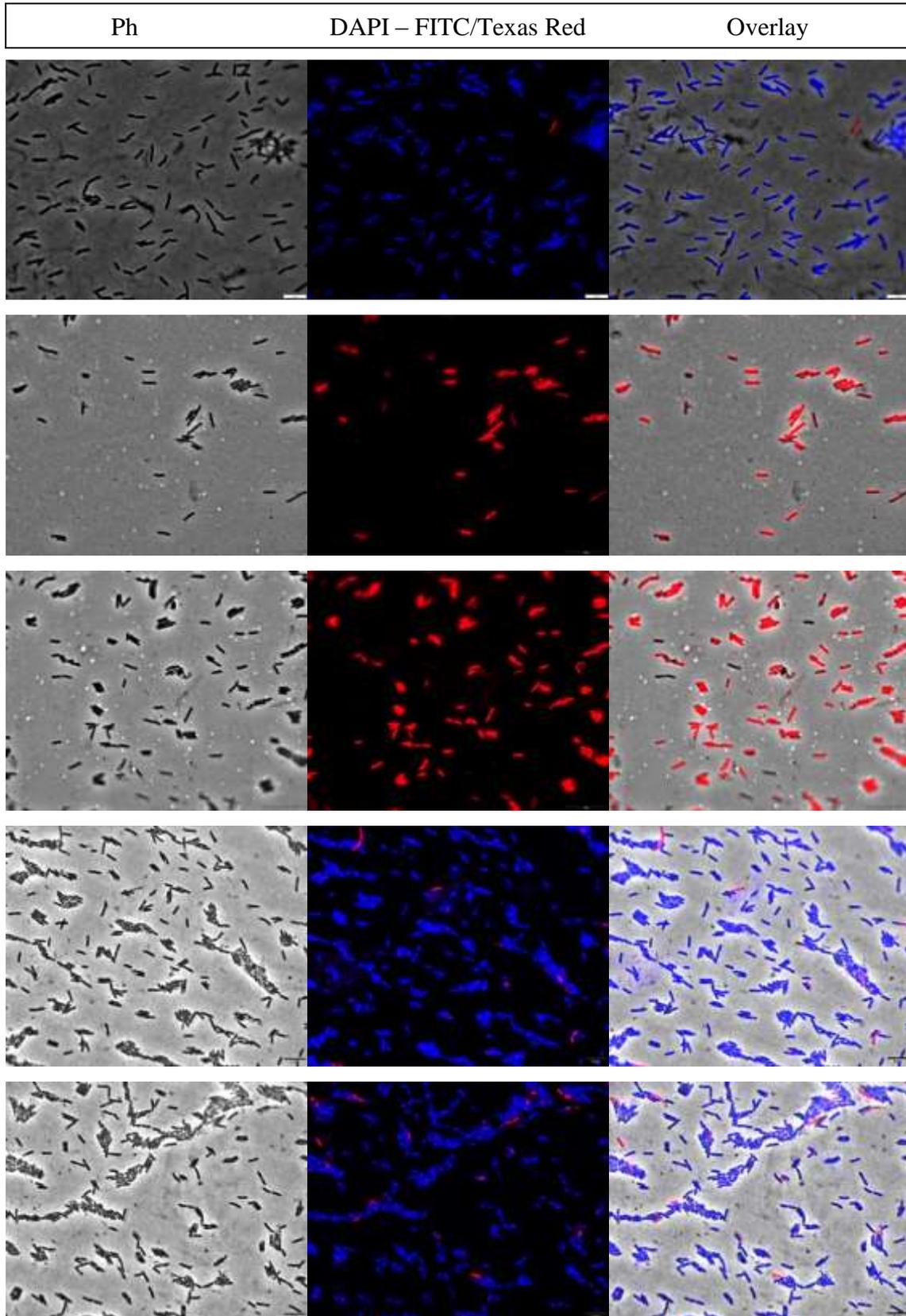
*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CHERRINGTON et al., 1990; CHIRIAC et al.2015; ELNAKADY et al., 2016; MULLER et al. 2016). Também, testou-se o modo de ação em *Xac* devido ao nosso conhecimento prévio e em trabalhar com este microrganismo em laboratório, além de ser muito relevante o teste de modo de ação em modelos bacterianos tanto Gram-positivos, como *B. subtilis*, quanto Gram-negativos, como *Xac*.

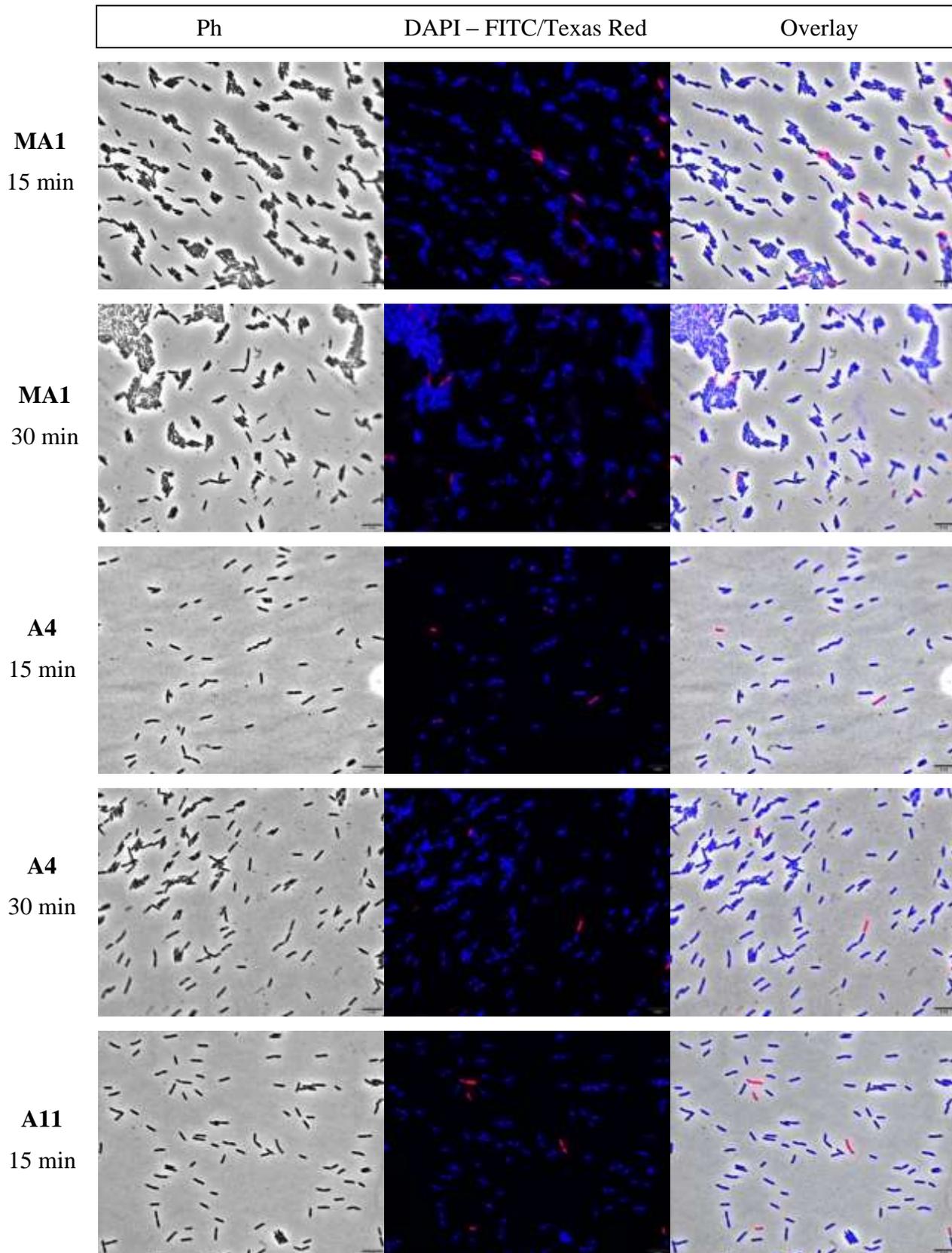
O primeiro ensaio de mecanismo de ação realizado foi o da avaliação da integridade da membrana citoplasmática de *Xac*, utilizando o kit Live/Dead (Thermo Fisher).

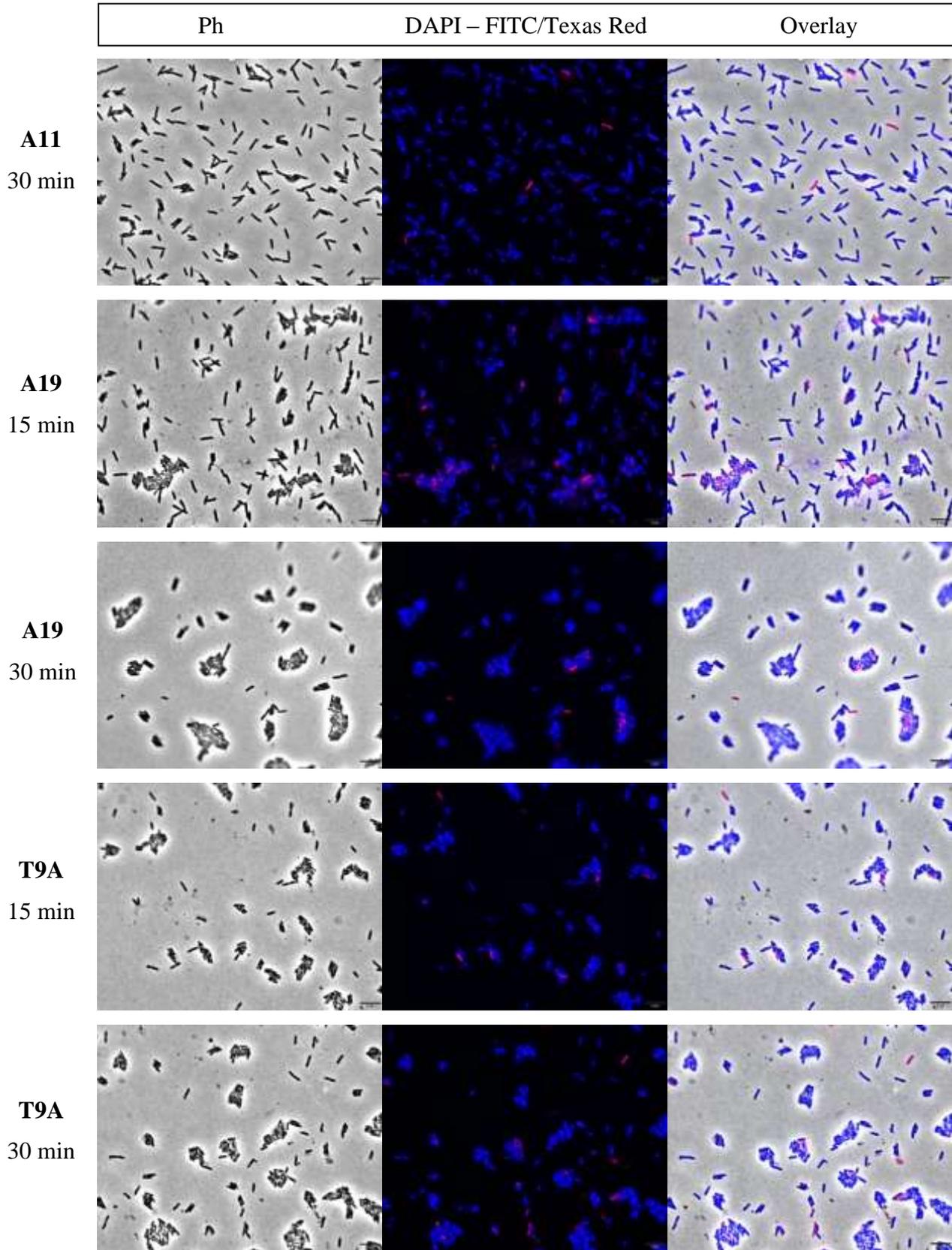
Na Figura 14, observa-se células bacterianas não tratadas (controle negativo) e tratadas com DMSO1% (controle do veículo). Em ambos os casos a membrana permaneceu intacta, como esperado para os controles. Quando as células de *Xac* foram submetidas a 20 minutos de aquecimento térmico 50 e 60°C (controle positivo) (Figura 14) observou-se coloração avermelhada nas células, devido à sua capacidade de promover estresse termal e depolarização da membrana citoplasmática bacteriana, tornando-se permeável ao IP (MORÃO et al., 2015). No entanto, *Xac* não demonstrou alteração na permeabilidade de sua membrana citoplasmática quando colocada em contato com quaisquer um dos seis compostos potencialmente bioativos, conforme apontam registros dos ensaios de microscopia com os compostos avaliados, já que a maioria das células encontram-se coradas de azul, ou seja, com membrana intacta (Figura 14).

**Figura 14.** Avaliação de permeabilidade de membrana para *X.citri* com células sem tratamento (controle negativo - CN); tratadas com DMSO 1% (controle veicular); tratadas com aquecimento térmico 50°C – 20 min (controle positivo - CP); aquecimento térmico 60°C – 20 min (controle positivo - CP) e tratadas com os compostos bioativos na MIC<sub>90</sub>, durante o contato de 15 e 30 min. Ampliação: 100 x. Barra: 5μ









O ensaio complementar FT-IR, que foi realizado com células de *B. subtilis* para confirmar os dados da microscopia de integridade de membrana (Capítulo III), não pôde ser realizado para *Xac*, uma vez que esta bactéria é produtora de goma xantama, além de ser formadora de biofilmes. A maioria dos espectrômetros infravermelhos modernos pode ser convertida para analisar amostras via ATR, montando o acessório ATR no compartimento de amostras do espectrômetro, porém nosso equipamento não possui esse sistema acoplado e, portanto não se pôde fazer análises com células de *Xac*. Para que possa ser compreendida, essa técnica de amostragem de reflexão total atenuada (ATR) é utilizada, simultaneamente, com a espectroscopia de infravermelho. Essas duas técnicas, em conjunto, eliminam quaisquer tipos de preparação adicional à amostra e permitem que esta seja analisada diretamente (seja no estado líquido ou sólido). O processo que ocorre de uma análise com ATR baseia-se na propriedade de reflexão interna total e resulta numa onda evanescente. Em seguida, um feixe de luz infravermelha atravessa pelo cristal ATR e há reflexão, pelo menos uma vez, da superfície interna que está em contato com a amostra. Isso gera uma onda evanescente que se estende à amostra. Finalmente o feixe é detectado, por um detector, quando sai do cristal (HARRICK, 1967).

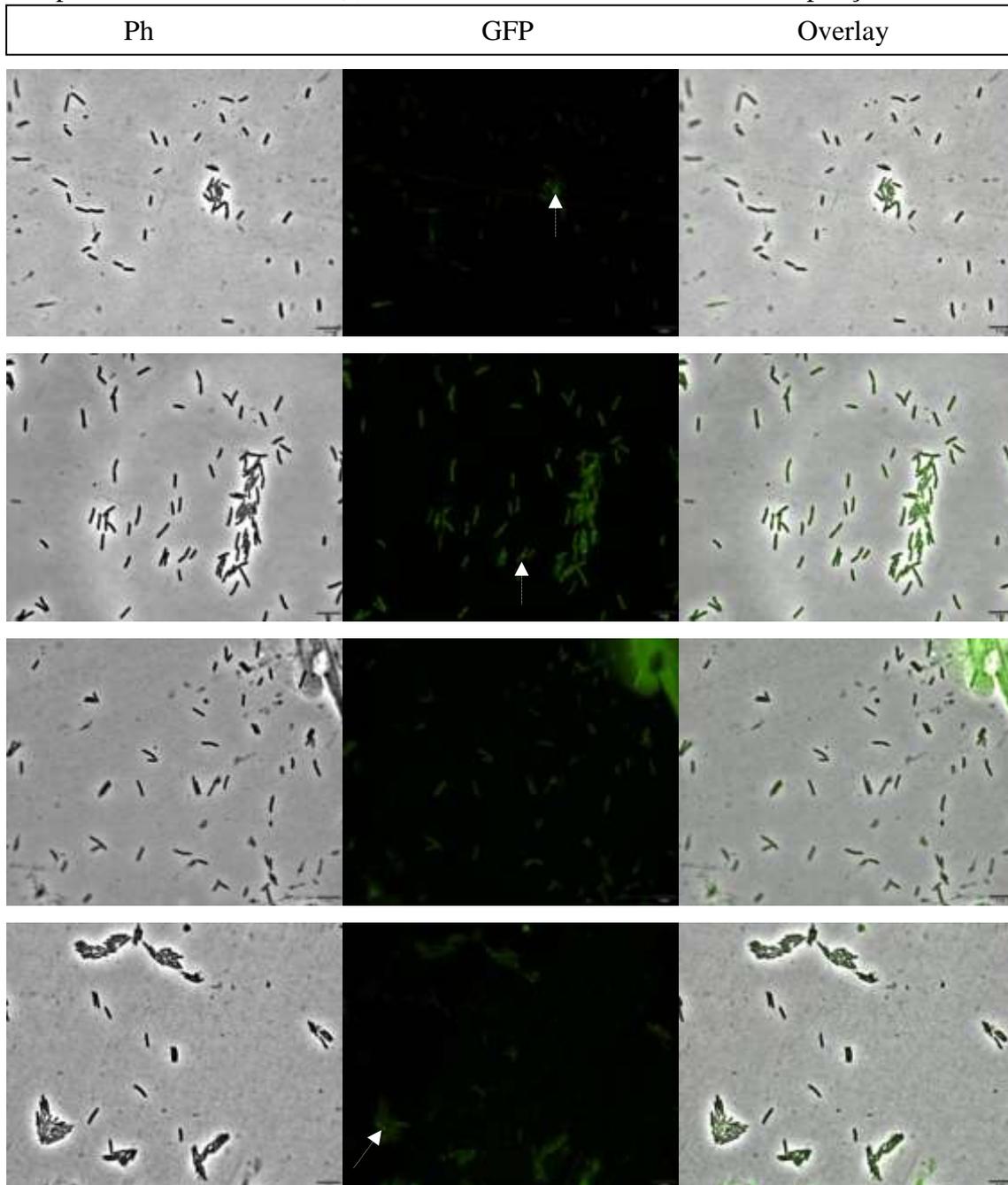
### *3.6. Microscopia de Desestruturação de Septo de Divisão Celular*

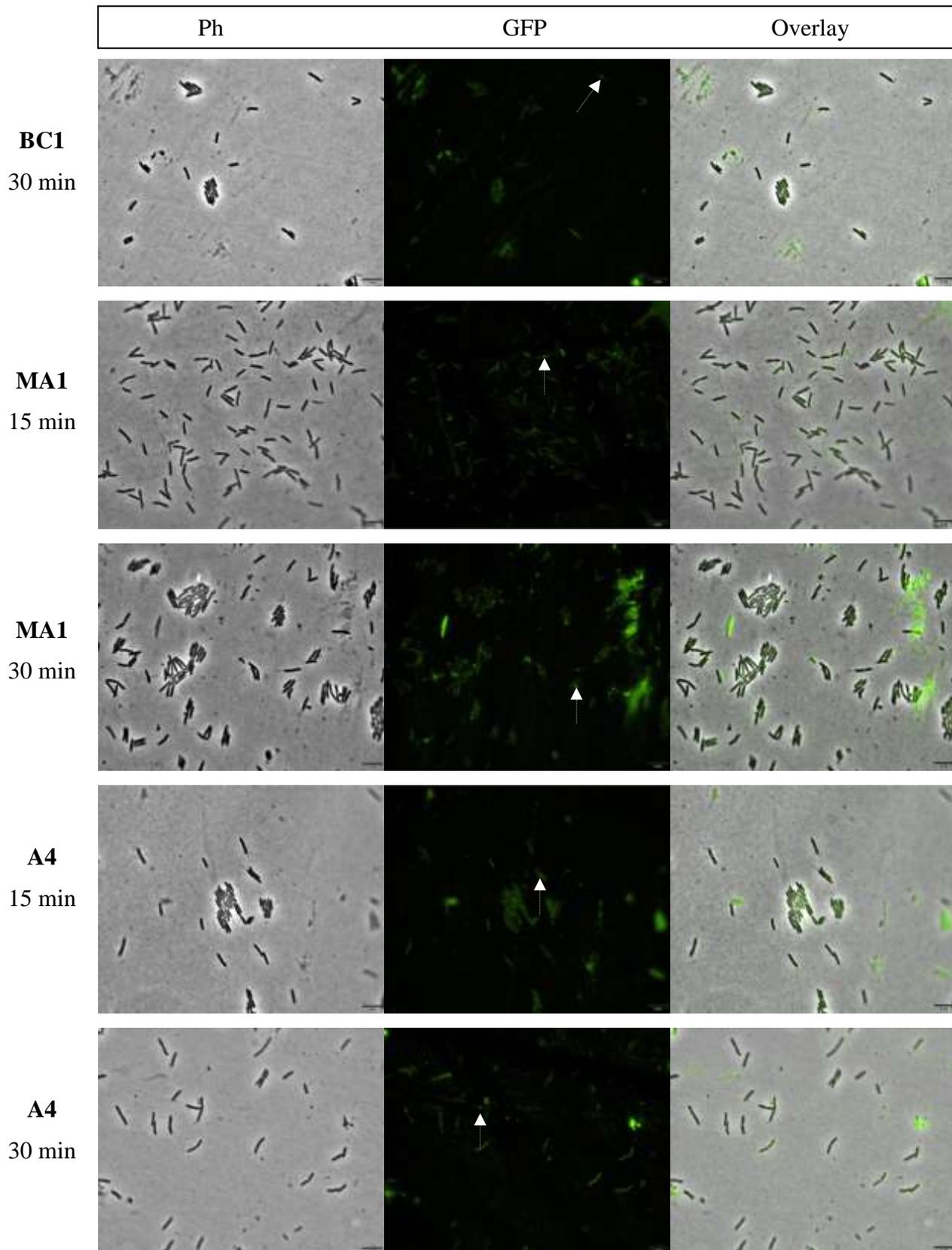
Neste teste foi possível observar a presença ou não do septo de divisão celular no centro da célula bacteriana através de microscopia de fluorescência, uma vez que a uma das proteínas (ZapA) que participam da montagem e recrutamento da formação do anel Z foi marcada com GFP, proteína que expressa cor verde fluorescente quando induzida.

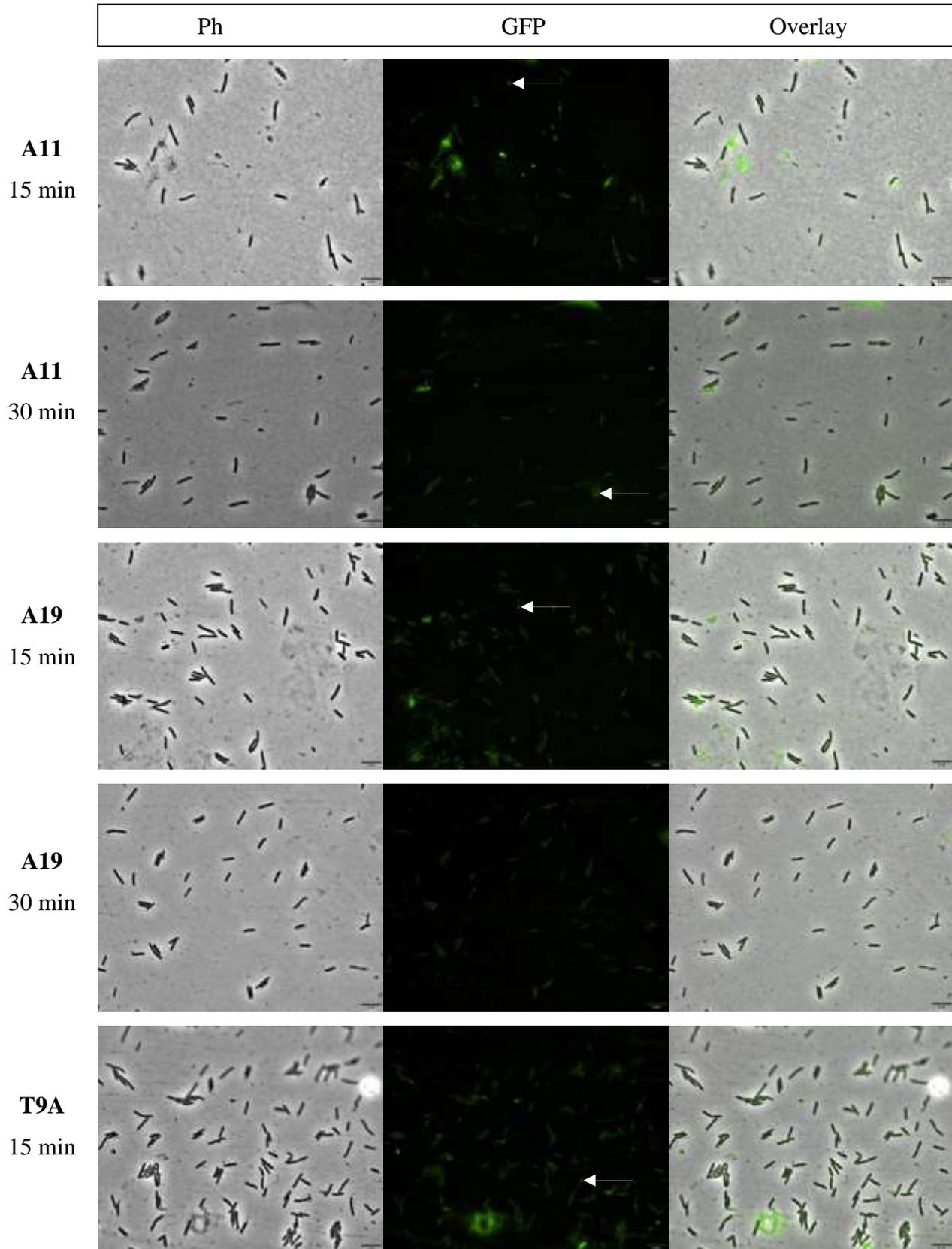
Na Figura 15, observa-se células não tratadas em divisão celular (controle negativo), onde o septo divisional ocupa a porção central da célula, representado por uma barra verde brilhante – formado por GFP -ZapA perpendicular ao longo do eixo do bastonete (indicado pela seta). O mesmo é observado para o controle do veículo, quando as células foram tratadas com DMSO1%. No entanto, quando as células de *Xac* foram tratadas com galato de hexila, usado como controle positivo, devido à sua capacidade de causar desestruturação no septo de *Xac*, houve acúmulo de fluorescência GFP-ZapA no citoplasma das células (SILVA et al., 2013) (Figura 15). Foi observada ruptura de septo apenas para células tratadas com o composto **A19** no tempo de 30 minutos (Figura 15) Esse resultado sugere que o composto **A19** tem ação tardia em septo, ou seja, seu alvo primário, provavelmente, não é na via da divisão celular, uma vez que compostos que agem nessa via atuam de maneira rápida porque o septo de divisão celular é uma estrutura dinâmica que sofre polimerizações e despolimerizações rápidas, de acordo com a ocorrência deste processo na célula. Análises da

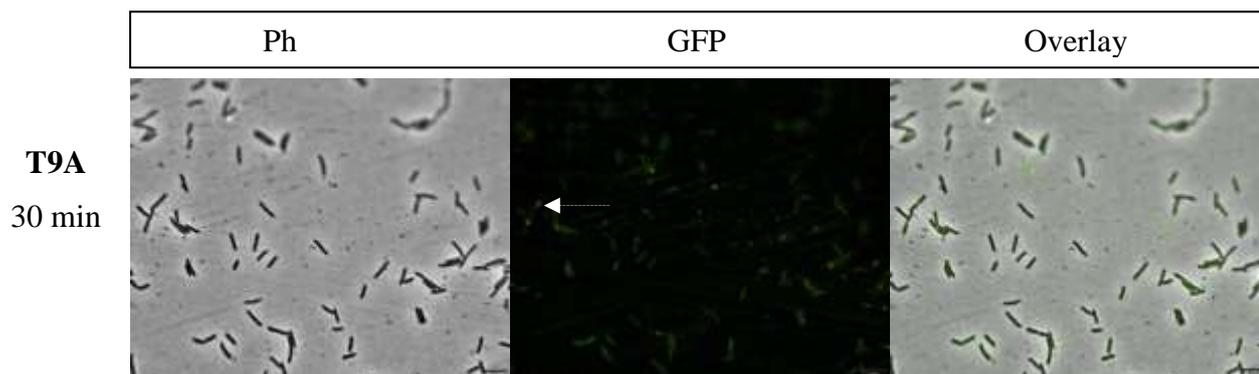
atividade GTPásica associada a FtsZ poderiam confirmar se **A19** atua na via de divisão celular ou não, uma vez que FtsZ é a proteína essencial no processo de recrutamento e montagem do septo de divisão celular e sua ativação está vinculada a hidrólise de um GTP. Porém esse ensaio não foi realizado pelo nossos colaboradores até o presente momento.

**Figura 15.** Avaliação de desestruturação de septo com *X. citri* GFP-ZapA com células sem tratamento (controle negativo - CN), tratadas com DMSO1% (controle do veículo); tratadas com galato de hexila (controle positivo - CP) (SILVA et al., 2013) e tratadas com os compostos bioativos na MIC<sub>90</sub>, durante o contato de 15 e 30 min. Ampliação: 100x. Barra 5 $\mu$







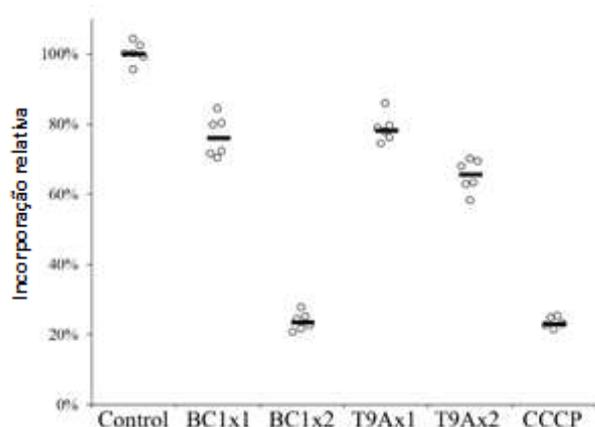


### 3.7. Síntese de macromoléculas

A síntese de macromoléculas visou testar vias específicas e verificar se os compostos aplicados nas vias afetavam-a de alguma forma. Este foi o primeiro registro existente sobre a incorporação de precursores macromoleculares em *X. citri*.

Para a avaliação da concentração de ATP intracelular em *Xac*, após 80 min de tratamento com os compostos, não notou-se alterações nos padrões. Considerando que 100% indica que não houve quaisquer perturbações na via avaliada e 0% indica que houve perturbação na via em detrimento da adição de composto nota-se, na Figura 16, que **BC1** causou uma ligeira diminuição em 1x a concentração de MIC e em 2xMIC causou um efeito semelhante de CCCP, mas não evidencia que há efeito direto na concentração de ATP causada por **BC1** em *Xac*. O efeito nas análises tratadas com **T9A** indicou, também, que o composto não afeta a via metabólica energética.

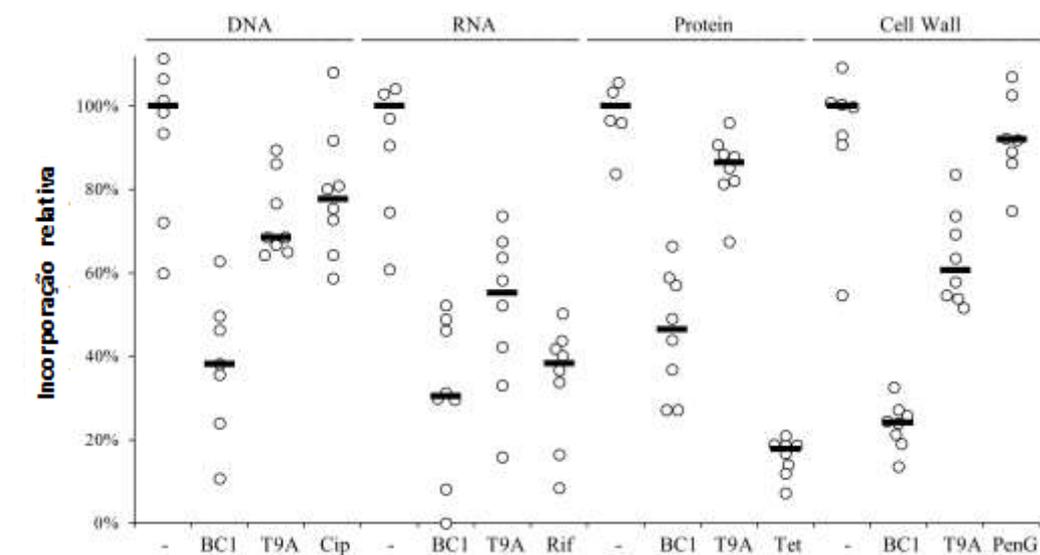
**Figura 16.** Concentração de ATP (unidades relativas de luz) após 80 minutos de tratamento de células de *Xac* com 1x e 2x MIC de **BC1** e **T9A**; 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de CCCP. 100% foi definido como a mediana da luminescência da amostra controle sem qualquer composto adicionado, cada círculo representa uma réplica e barras indicam a mediana de cada condição testada



A Figura 17 indica o que ocorreu quando as quatro vias analisadas foram avaliadas frente aos compostos **BC1** e **T9A**. Vale ressaltar que para esse teste o valor de 100% indica que não houve quaisquer perturbações na via avaliada, sendo que o controle negativo (-) assumiu valores igual ou o mais próximo possível de 100%. Já para o caso de ocorrer alteração na via avaliada o valor de incorporação relativa assume percentuais mais próximos de 0%. Sendo assim, foi possível observar, na Figura 17, uma análise comparativa de **BC1** e **T9A** com os antibióticos comercialmente existentes, que apresentam diferentes alvos de ação nas bactérias (controles positivos). Este teste permitiu observar a similaridade de **BC1** e **T9A**, em relação ao seu modo de ação, com os antibióticos de modo de ação já estabelecidos. No entanto nota-se que os níveis de incorporação não se aproximam do valor ideal de 0% tanto para a análise com os compostos testados como para os controles positivos. Considerou-se, então, que o teste não foi eficaz para *Xac* uma vez que o tempo de 80 minutos equivale a 26% do doubling time da bactéria (*Xac* divide-se uma vez a cada 5,1 horas em meio Xam1 a 30° C). Em outras palavras, acredita-se que o teste não tenha sido eficaz para *Xac* uma vez que 80 minutos de análise não é o tempo suficiente para que a bactéria permita assimilação e penetração dos compostos bem como gere uma resposta nas vias macromoleculares. Isso é ainda mais dificultado já que *Xac* é uma bactéria Gram-negativa e apresenta membrana externa como barreira de permeabilidade e seletividade a alguns compostos.

É válido lembrar, para esse teste, que a vancomicina não afeta as bactérias Gram-negativas (REYNOLDS, 1989) e que *Xac* é resistente à ampicilina (WENG et al., 1999). Portanto, decidimos usar a benzilpenicilina como um controle para a incorporação da parede celular, uma vez que este antibiótico foi previamente relatado como sendo efetivo contra *X. citri* (MUBEEN et al., 2015). Sendo assim, a mínima concentração inibitória da benzilpenicilina foi determinada, previamente. O valor da MIC obtida foi de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e essa concentração foi utilizada quatro vezes mais como controle positivo para a incorporação de glucosamina. No entanto, as células de *X. citri* expostas à penicilina foram capazes de incorporar 92% de glucosamina quando comparadas ao controle. Esse resultado indica que, possivelmente, a benzilpenicilina tem mais afinidade por proteínas de ligação à penicilina (PBPs) responsáveis pela hidrólise e menos afinidade por PBPs responsáveis pela síntese de peptidoglicano. Dessa maneira as células ainda poderiam construir peptidoglicano e alongar-se, mas perdem a capacidade de realizar divisão celular, levando à morte celular (TYPAS et al., 2012). O inibidor da síntese de DNA, ciprofloxacina, causou apenas 22% de redução na incorporação de timidina quando comparado ao controle positivo, comprovando a ineficácia do ensaio devido ao pouco tempo de análise.

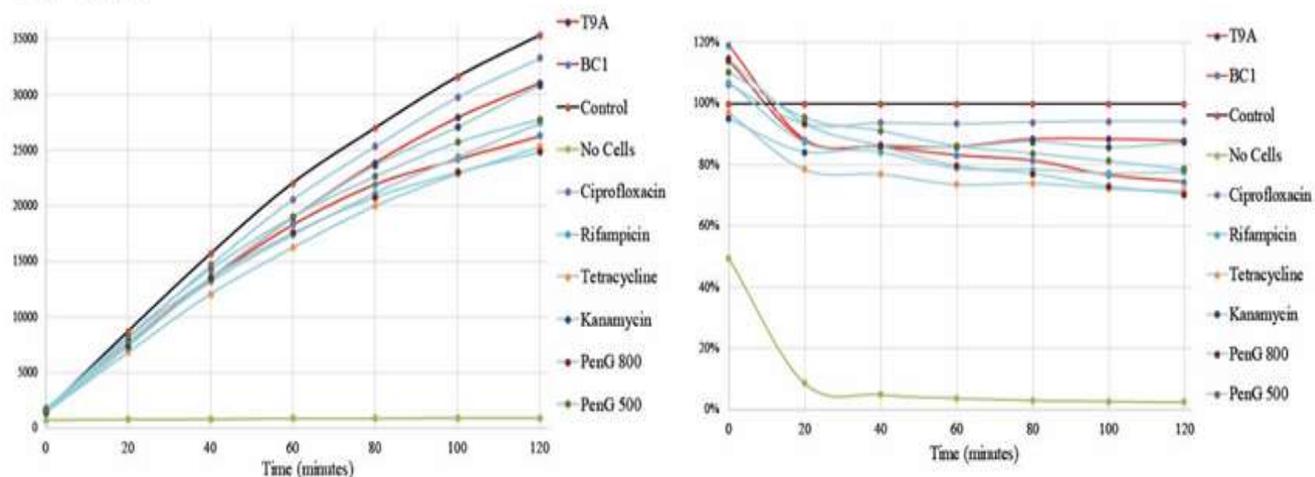
**Figura 17.** Efeitos em *Xac* para as quatro principais vias de síntese macromolecular de **BC1** e **T9A**, tanto em comparação com controlos negativos (-) como antibióticos com atividades específicas direcionadas para DNA, RNA, proteína e síntese de peptidoglicano: Ciprofloxacina (Cip), Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tet) e Benzil Penicilina (PenG); respectivamente. Cada círculo representa uma réplica experimental, barras indicam a incorporação relativa mediana em cada condição testada



Finalmente a Figura 18 apresenta apenas os resultados avaliados pelo REMA em curto período, objetivando mostrar que as células bacterianas não estavam mortas, ou seja, havia atividade respiratória e o que estava ocorrendo nas vias de síntese de macromoléculas era, realmente, devido à adição de composto.

**Figura 18.** Resultados de REMA em curto período para *Xac*

*X. citri*



Considerando os resultados obtidos sugere-se há um indicativo de que os compostos **BC1** e **T9A** possam apresentar ação multi target no interior da bactéria, uma vez que no ensaio de síntese de macromoléculas apresentam menor percentual de incorporação para RNA e parede celular. No entanto como o ensaio não foi bem sucedido devido ao curto período de tempo avaliado comparado ao doubling time da bactéria seria necessário repetir esse teste, em maior período, para finalmente certificar a hipótese de **BC1** e **T9A** agirem na perturbação e bloqueio da síntese de RNA e parede celular. O composto **A19** pode apresentar ação em septo de divisão celular, porém novas análises devem ser feitas para comprovação deste resultado, como por exemplo, o ensaio da atividade GTPásica associada a FtsZ. Para os demais compostos que não apresentaram ação em membrana nem em divisão celular, sugere-se que seja feito o teste de síntese de macromoléculas, afim de que, futuramente, o modo de ação deles possa ser desvendado.

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a síntese e modificação realizada nas chalconas foi eficaz com relação à atividade antibacteriana, onde foram observados seis compostos ativos contra *Xanthomonas citri*, eficazes tanto em testes *in vitro* como nos testes em planta. Considera-se que estes compostos sejam promissores para possíveis investimentos em produção massiva e uso no campo, com o objetivo de combater o cancro cítrico e substituir a utilização de soluções cúpricas. Porém, sugere-se que novos estudos sobre o modo de ação destes compostos sejam realizados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, V. Y.; BENEDETTI, C. E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Mol Plant Pathol.**, v. 17(8), p.1223-36, 2016.
- AGUIAR, S. C. **Análise da ação bactericida in vitro de nanopartículas de cobre.** 2009. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Fisioterapia, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, 2009. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/000042/0000421B.pdf>>. Acesso em: 12 de jul. de 2016.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, **J. of Etnopharmacol.** 74: 113-123, 2001.

- ALCARÁZ, L. E.; BLANCO, S. E.; PUIG, O. N.; TOMÁS, F.; FERRETTI, F. H. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Theor. Biol.** 21;205(2) :231-40, 2000.
- ALEGRIA, M. C. Identificação de interações proteína-proteína envolvendo os produtos dos loci hrp, vir e rpf do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tese de doutorado, IQ-USP, 2004.
- ALEGRIA, M. C. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*. **J. Bacteriol**, Estados Unidos, v. 186, p. 6186- 6197, 2004.
- ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H.; DA SILVA, A.C.; FARAH, C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*, **J Bacteriol.**, Estados Unidos, v.187, p. 2315-2325, 2005.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **Plant Cell**, Estados Unidos, v. 8, p. 1683-1698, 1996.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.5655-5662, 1997.
- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JOGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. Química Orgânica, 2ª ed., LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, Rio de Janeiro, 962 p, 1976.
- AL-SAADY, A.; REDDY, J. D.; DUAN, Y. P.; BRUNINGS, A. M.; YUAN, Q.; GABRIEL, D. W. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. **Mol. Plant Microbe Interact.** v.20, p.934–943, 2007.
- ALVAREZ M.; ZARELLI, E.P.; PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. **Biocell.**, v. 28, p. 31-34, 2004.
- ANAND, N.; SINGH, P.; SHARMA, A.; TIWARI, S.; SINGH, V.; SINGH, D. K.; SRIVASTAVA, K. K.; SINGH, B. N.; TRIPATHI, R. P. Synthesis and evaluation of small libraries of triazolylmethoxy chalcones, flavanones and 2-aminopyrimidines as

- inhibitors of mycobacterial FAS-II and PknG. **Bioorg. Med. Chem.**, 20, 5120–5163, 2012.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R.; “Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications”. **New York: Taylor & Francis Group**, 1<sup>a</sup> ed., 2006.
  - ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. **Curr. Opin. Microbiol.**, Inglaterra, v. 2, p. 18-24, 1999.
  - ATTAR, S.; O'BRIEN, Z.; ALHADDAD, H.; GOLDEN, M. L.; CALDERÓN-URREA, A.; Ferrocenylchalcones versus organic chalcones: A comparative study of their nematocidal activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 19, 2055–2073, 2011.
  - BANDGAR, B. P.; GAWANDE, S. S.; BODADE, R. G.; TOTRE, J. V.; KHOBRAGADE, C. N.; “Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazole chalcones as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents”. **Bioorgan. Med. Chem.** v.18, p. 1364-1370, 2009.
  - BANO, S.; JAVED, K.; AHMAD, S.; RATHISH, I. G.; SINGH, S.; CHAITANYA, M.; ARUNASREE, K. M.; ALAM, M. S. Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. **Eur. J. Med. Chem.**, 65, 51–59, 2013.
  - BAPTISTA, J. C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 93f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, 2006.
  - BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, 2009.
  - BEHLAU, F. et al. Molecular Characterization of Copper Resistance Genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 12, p.4089-4096, 22 abr. 2011.
  - BEHLAU, F.; HONG, J. C.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. **Phytopathology.**, v.103(5), p.409–18, 2013.
  - BEHLAU, F.; SCANDELAI, L. H. M.; DA SILVA, G. J. R.; LANZA, F. E. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Prot.**, v. 94, p. 185–191, 2017a.
  - BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; LUGO, A. J.; ELIBOX, W.; MINSAVAGE, G. V.; POTNIS, N.; et al. Characterization of a unique copper resistance gene cluster in

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. **Eur J Plant Pathol.**, v.147(3), p.671–81, 2017b.

- BIEBER, L. M. Química Orgânica Experimental: integração da teoria, experimento e análise. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 605-610, 1999.
- BITTANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.
- BITENCOURT, H. R.; SANTOS, L. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; “Allelopathic of synthetic chalcone, its precursors and of related cetones and aldehydes”. **Revista Planta Daninha**. v.25, n.4, p.747-753, 2007.
- BOCH, J.; SCHOLZE, H.; SCHORNACK, S.; LANDGRAF, A.; HAHN, S.; KAY, S.; et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. **Science**, v.326(5959), p.1509–12, 2009.
- BOLWELL, G. P. et al. The origin of the oxidative burst in plants. **Free Radical Research**, v. 23, n. 6, p. 517–532, 1995.
- BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O’SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends Genet.** v.29(4), p. 233-40, 2013.
- BRADBURY, J. F. Guide to plant Pathogenic Bacteria. Slough: C.A.B. **International**, p. 332, 1993.
- BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº37 DE 5 DE SETEMBRO DE 2016. Ficam instituídos, em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa, os critérios e procedimentos para o estabelecimento e manutenção do status fitossanitário relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Brasília- DF, 2017.
- BRASIL, RESOLUÇÃO SAA Nº 10, DE 20 DE FEV. DE 2017. Delimita e oficializa todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco, relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e institui procedimentos fitossanitários. São Paulo – SP, fev. 2017. Disponível em <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=337839>. Acesso em 01/10/2018.
- BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, Estados Unidos, n. 292, p. 2275-2278, 2001.
- BRUNETTO, G.; DE MELO, G.W.; TERZANO, R.; DEL BUONO, D.; ASTOLFI, S.; TOMASI, N.; PII, Y.; MIMMO, T.; CESCO, S. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293–307, 2016.

- BRUNINGS, A. M; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 3, 141-157, 2003.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO Journal**, New York, v. 2, n. 20, p. 5313-5322, 2002.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.
- CAGED – Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Ministério do Trabalho). Disponível em <<http://trabalho.gov.br/trabalhador-caged>>. Acesso em 02 de out. de 2018.
- CAMATTI, S. V. et al. Avaliação in vitro de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [S.l.], v. 6, n. 2, aug. 2011. ISSN 1980-9735.
- CANTEROS, B. I. Manejo de enfermidades em Citrus: cancroses, moteado negro (black spot) y caída anormal de frutos. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CITRICULTURA DO RS, 12., 2005, Faxinal do Soturno. **Anais...** Porto Alegre,: UFRGS, FEPAGRO e EMATER/RS, p.113-128, 2005.
- CARPENTER, C. F.; CHAMBERS, H. F. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. **Clin Infect Dis**. 1;38(7):994-1000, 2004.
- CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 604- 611, 2001.
- CHEN, L. Q.; HOU, B.H.; LALONDE, S.; TAKANAGA, H.; HARTUNG, M. L.; QU, X. Q.; GUO, W. J.; KIM, J. G.; UNDERWOOD, W.; CHAUDHURI, B.; et al. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. **Nature**. v.468, p. 527–532, 2010.
- CHERRINGTON, C. A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology** 68, 69-74, 1990.
- CHIRIAC, A. I.; KLOSS, F.; KRÄMER, J.; VUONG, C.; HERTWECK, C.; SAHL, H. G. Mode of action of closthioamide: the first member of the polythioamide class of

- bacterial DNA gyrase inhibitors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, dkv161, 2015.
- CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**. v. 24;124(4), p.803-14, 2006.
  - CITRUS BR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Comércio - Exportações Brasileiras. (2014-2015) Disponível em <<http://www.citrusbr.com/>>. Acesso em 02 de out. de 2018.
  - CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Terceiro Levantamento. Brasília: CONAB, p. 11, 2013.
  - CORBIN, D. R.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 12, p. 4337–4344, 1987.
  - CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of tipe III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 54, p. 735-774, 2000.
  - CORNU, J. Y.; HUGUENOT, D.; JÉZÉQUEL, K.; LOLLIER, M.; LEBEAU, T. Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 26, 2017.
  - CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems, **Biochim. Biophys. Acta**. Holanda, v. 1694, p. 219-234, 2004.
  - CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Maryland USA: American Society of Plants Physiologists**, Estados Unidos, p. 850-829, 2001.
  - DA SILVA, A.C.R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOSO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.;

- MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Inglaterra, v.417, p.459-463, 2002.
- DAURELIO, L. D.; ROMEROE, M.; PETROCELLI, S.; MERELO, P.; CORTADI, A.; TALÓN, M.; TADEO, F.; ORELIANO, E.; Characterization of *Citrus sinensis* transcription factors closely associated with the non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 10, p. 934-942, 2013.
  - DELAHAY, R. M. et al. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Estados Unidos, v. 274, p. 35969-35974, 1999.
  - DEVASAHAYAM, G.; SCHELD, M.; HOFFMAN, P. S. Newer antibacterial drugs for a new century. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 19, 215–234, 2010.
  - DEVIA, A. C.; FERRETTI, F. A.; PONCE, C. A.; TOMÁS, F. Conformational equilibrium and intramolecular hydrogen bond of 4'X and 4X substituted 2'(OH) chalcones. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 493, p. 187-197, 1999.
  - DHAR, D. N.; “The Chemistry of Chalcones and Related Compounds”. **New York: Wiley**, 1981.
  - DIANESE, J. C.; SHAAD, N. W. Isolation and characterization of inner and outer membranes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, v.72, p. 1284-1289, 1982.
  - DIAS, D. A. [et.al] (2012) - A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**. 2 (2) (2012) 303-336.
  - DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M.; “Bioactivities of chalcones”. **Curr. Med. Chem**, v. 6, p. 1125-1149, 1999.
  - DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479–501, 1994.
  - DOAN, T. N.; TRAN, D.T. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of a novel series of chalcones, pyrazolic chalcones, and allylic chalcones. **Pharmacol. & Pharm.**, 2, p. 282–288, 2011.

- DONÁDIO, S. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 175-185, 2002.
- DOMINGUES, M. N.; SOUZA, T. A.; CERNADAS, R. A.; OLIVEIRA, M. L. P.; DOCENA, C.; FARAH, C. S.; BENEDETTI, C. E. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. **Molecular Plant Pathology**, 11(5), 663–675, 2010.
- DOMINGUES, M. N. Caracterização de proteínas de *Citrus sinensis* que interagem com a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico. UNICAMP, 2011.
- DUAN, S.; JIA, H.; PANG, Z.; TEPER, D.; WHITE, F.; JONES, J.; ZHOU, C.; WANG, N. Functional characterization of the citrus canker susceptibility gene CsLOB1. **Mol Plant Pathol.**, 2018.
- DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutants streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.26, n.4, p. 527-31, 2003.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, 2006. Disponível em: < [https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf) > Acesso em 11/11/2018.
- DUONG F, WICKNER W. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling, **Embo J**, Inglaterra, v. 16, p. 4871-4879, 1997.
- EBEL, F. et al. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 30, p. 147-161, 1998.
- ELNAKADY. Y. A.; CHATTERJEE, I.; BISCHOFF, M.; ROHDE, M.; JOSTEN, M.; SAHL, H.; HERRMANN, M.; MÜLLER, R. Investigations to the antibacterial mechanism of action of kendomycin. **PloS one** 11, e0146165, 2016.
- ELSTNER, E. F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual review of plant physiology**, v. 33, n. 1, p. 73-96, 1982.
- EPA - Environmental Protection Agency. EPA registers copper-containing alloy products [Internet]. 2008 . Washington: EPA; 2008.

- EPAND, R. M.; WALKER, C.; EPAND, R. F.; MAGARVEY, N. A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochim. Biophys. Acta**, 1858, 980–987, 2016.
- FAN, J.; HE, Z.; MA, L. Q.; STOFFELLA, P. J. Accumulation and availability of copper in citrus grove soils as affected by fungicide application. **J. Soil. Sediment.**, v. 11, p. 639–648, 2011.
- FAÚNDEZ, G. et al. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 4, n. 1, 2004.
- FEBRES, V. J.; KHALAF, A.; GMITTER, J. R.; FG; MOORE, G. A. Production of disease resistance in *Citrus* by understanding natural defense pathways and pathogen interactions. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 3, p. 30-39, 2009.
- FONES, H.; PRESTON, G. M. The impact of transition metals on bacterial plant disease. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 37, p. 495–519, 2013.
- FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. The structural biology of type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p.703-714, 2009.
- FUNDECITRUS. Fundo De Defesa Da Citricultura. Disponível em:  
<<http://www.fundecitrus.com.br/>> - Acesso em 10/05/2018.  
<<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>- Acesso em 10/05/2018.
- GALÁN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, Estados Unidos, v. 284, p. 1322-1328, 1999.
- GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annu Rev Phytopathol.** v. 46, p. 189-215, 2008.
- GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic *Citrus* canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.
- GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of *Citrus* canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. Compendium of citrus diseases. **American Phytopathological Society**, p. 5-7, 2000.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus

- cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v.82, p.1319-1325, 1992.
- 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.
  - GRAND, C.; SARNI, F.; LAMB, C. J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 169, n. 1, p. 73–77, 1987.
  - GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M.. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 5, p.1541-1547, 30 dez. 2010.
  - GREATED, A.; LAMBERTSEN, L.; WILLIAMS, P. A.; THOMAS, C. M. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid p WWO from *Pseudomonas putida*, **Environ Microbiol.**, Estados Unidos, v.4, p. 856-871, 2002.
  - GREWAL, R.K.; GUPTA, S.; DAS, S. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice. **BMC Genomics**, v. 13, p. 49 -61, 2012.
  - GUSTINE, D. L. et al. Metabolites from pseudomonas-corrugata elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. **Phytopathology**, v. 80, n. 12, p. 1427–1432, 1990.
  - HALLIWELL B, GUTTERIDGE, JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys. Acta**. 1271:501–14, 1986.
  - HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773–1791, 1996.
  - HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, cap. 21, p. 1102–1156, 2000.
  - HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; KINOSHITA, T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**. 48 (1): 125±9, 1998. PMID: 9621457.
  - HARRICK, N. J. Internal Reflection Spectroscopy. **John Wiley & Sons Inc.** p. 342. ISBN 978-0-470-35250-2, 1967.
  - HARTUNG, J, T.; PRUVOST, O. P.; VILLEMONT, I.; ALVAREZ, A. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by

immunocapture and a nested polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v. 86, p. 95-101, 1996.

- HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.
- HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, p. 181-206, 2004.
- HIGGINS, D. L.; CHANG, R.; DEBABOV, D. V.; LEUNG, J.; WU, T.; KRAUSE, K. M.; SANDVIK, E.; HUBBARD, J. M.; KANIGA, K.; SCHMIDT, D. E.; JR. GAO, Q.; CASS, R. T.; KARR, D. E.; BENTON, B. M.; HUMPHREY, P. P. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49, 1127–1134, 2005.
- HSIEH C. T.; HSIEH T.J.; EL-SHAZLY M.; CHUANG D. W.; TSAI Y. H.; YEN C. T.; WU S. F.; WU Y. C.; CHANG F. R.; “Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents.” **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3912- 3915, 2012.
- HU, Y.; ZHANG, J.; JIA, H.; SOSSO, D.; LI, T.; FROMMER, W. B.; et al. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **PNAS.**, v. 111(4):E521–9. 1, 2014.
- HUECK, C. J. Microbiol. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Mol. Biol. Rev.**, Estados Unidos, v. 62, p. 379-433, 1998.
- IKIGAI, H.; NAKAE, T.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochim. Biophys. Acta.** 1147 (1): 132±6, 1993. Epub 1993/04/08. PMID: 8466924.
- JACOB, T. R. **Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes pthAs em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UNESP - Jaboticabal, São Paulo, 2009.
- JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**. v.16;444(7117), p. 323-9, 2006.
- JURCSAK, N. W.; ZANINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. **J. Chem. Ed.**, v. 76, n. 5, p. 653-654. 1999.

- KAY, S., BONAS, U. How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. **Microbiology**, 12, 37-43, 2009.
- KELLER, H. et al. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. **Plant Cell**, v. 11, n. 2, p. 223–235, 1999.
- KHAN, L. D.; HINGORANI, M. K. Strain studies on *Xanthomonas citri*. **Journal Hort. Science**, v. 45, p. 15-17, 1970.
- KIRKHAM, S.; CASTELLETTO, V.; HAMLEY, I. W.; INOUE, K.; RAMBO, R.; REZA, M.; RUOKOLAINEN, J. Self-Assembly of the Cyclic Lipopeptide Daptomycin: Spherical Micelle Formation Does Not Depend on the Presence of Calcium Chloride. **Chem. Phys. Chem.** 17, 2118–2122, 2016.
- KRÓL, E.; BORGES, A. S.; SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Front. Microbiol.** 6, 1–12, 2015.
- LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo – SP, 2002.
- LAHLOU, M., (2013) - The success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology and Pharmacy**. 4 (2001) 17-31.
- LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese**. Tese (Doutorado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV UNESP. Jaboticabal – SP, 2007.
- LEITE JUNIOR, R.P. Cancro cítrico no Estado do Paraná aos 40 anos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.91-92, 1997.
- LI, C. M. et al. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. **EMBO J.**, Inglaterra, v. 21, p. 1909-1915, 2002.
- LI, Z.; ZOU, L.; YE, G.; XIONG, L.; JI, Z.; ZAKRIA, M.; HONG, N.; WANG, G.; CHEN, G. A potential disease susceptibility gene CsLOB of citrus is targeted by a major virulence effector PthA of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Mol Plant.**, v. 7(5), p.912-5, 2014.

- LIARAS, K.; GERONITAKI, A.; GLAMOCLIIJA, J.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M. Thiazole-based chalcones as potent antimicrobial agents. Synthesis and biological evaluation. **Bioorg. Med. Chem.**, 19, p. 3135–3140, 2011.
- LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 7, 324–338, 2008.
- MAI, C. W.; YAEGHOBI, M.; ABD-RAHMAN, N.; KANG, Y. B.; PICHKA, M. R. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure e activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. **Eur. J. Med. Chem.**, 77, 378–387, 2014.
- MACIAS, F.A., et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biol. Sci. Space**, v. 17, n.1, p. 18-23, 2003.
- MACIEL, J. L. N. **Resistência ao cobre e perfil de restrição de ADN plasmidial de *Xanthomonas campestris* pv. *citri***. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 69 f., 1994.
- MAHAPATRA, D. K; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **Bioorg. Med. Chem.**, 20, 5150–5163, 2015.
- MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. p. 3616–3619, 2003.
- MENDOZA, E. F. R. **Identificação de genes-alvos na patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com enfoque no sistema de secreção do tipo III**. (Tese – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias), UNESP Jaboticabal – SP, 2016.
- MOLECULAR PROBES I. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. *LIVE/DEAD® BacLight™ Bact. Viability Kits.* , 1–8, 2004.
- MORÃO, L. G.; SUMARES, J. A. P.; MARTINS, P. M. M.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; BELASQUE Jr., J.; FERREIRA, H. Temperature stress promotes cell division arrest in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **MicrobiologyOpen**, 2015.

- MOREIRA, L. M.; DE SOUZA, R. F.; DIGIAMPIETRI, L. A.; DA SILVA, A. C.; SETUBAL, J. C. Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. **OMICS**, Estados Unidos, v. 9, p. 43-76, 2005.
- MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**. 26 (8): 2231±4, 1987 [http://dx. doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84689-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84689-0).
- MUBEEN, M. et al., In-vitro efficacy of antibiotics against *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri through inhabitation zone techniques, **Int. J. Agric. Appl. Sci.** Vol. 7, No.1, 2015.
- MULLER, A.; WENZEL, M.; STRAHL, H.; GREIN, F.; SAAKI, T. N. V.; KOHL, B.; SIERSMA, T.; BADOW, J. E.; SAHL, H.; SCHNEIDER, T.; HAMOENC, L. W. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 113, E7077-E7086, 2016.
- MURTHY, Y. L. N.; SUHASINI, K. P.; PATHANIA, A. S.; BHUSHAN, S.; NAGENDRA SASTRY, Y. Synthesis, structure activity relationship and mode of action of 3-substitutedphenyl-1-(2,2,8,8-tetramethyl-3,4,9,10-tetrahydro-2H,8H-pyrano[2,3f]chromen-6 yl)-propenones as novel anticancer agents in human leukaemia HL-60 cells. **Eur. J. Med. Chem.**, 62, 545–555, 2013.
- NAMEKATA, T., ROSSI, A. C., CERÁVOLO, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**, v. 17, n. 1, p. 67-78, 1996.
- NASSAR, E.; ABDEL-AZIZ, H. A.; IBRAHIM, H. S.; MANSOUR, A. M. Synthesis of diarylpyrazoles containing a phenylsulphone or carbonitrile moiety and their chalcones as possible anti-Inflammatory agents. **Sci. Pharm.**, 79, 507–524, 2011.
- NAZARÉ, A. C.; POLAQUINI, C. R.; CAVALCA, L. B.; ANSELMO, D. B.; SAIKI, M. F. C.; MONTEIRO, D. A.; ZIELINSKA, A.; RAHAL, P.; GOMES, E.; SCHEFFERS, D. J.; FERREIRA, H.; REGASINI, L. O. Design of Antibacterial Agents: Alkyl Dihydroxybenzoates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Int. J. Mol. Sci.**, 19, 3050, 2018.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: MARKESTRAT - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, p. 137, 2010.

- OPLETALOVA, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceska Slov. Farm.**, vol. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.
- OZ, T.; GUVENEK, A.; YILDIZ, S.; KARABOGA, E.; TAMER, Y. T.; MUMCUYAN, N.; OZAN, V. B.; SENTURK, G. H.; COKOL, M.; YEH, P.; TOPRAK, E. Strength of Selection Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance **Evolution.**, 31, p. 2387–2401, 2014.
- PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Journal Phytopathology**, v. 26, p. 215-217, 1973.
- PALAZZO, D.; JÚNIOR, V. M.; NOGUEIRA, E. Effect of some climatic factors on the index of infection of citrus canker caused of *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* on *Valencia orange* (*Citrus sinensis*) in bataguassu, ms. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 283–290, 1984.
- PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents Chemother.**, 46, 2720–2722, 2002.
- PATIL, P.S.; SHETTIGAR, V.; DHARMAPRAKASH, S. M.; “Synthesis and crystal structure of 1-(4-fluorophenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-one”. **Mol. Cryst. Liq. Cryst.**, v. 461, p. 123-130, 2007.
- PÉREZ, C. N.; HENRIQUES, C. A.; MEDEIROS, K. C. F.; MEDEIROS, L. C. F.; “Catalisadores heterogêneos para a síntese de chalconas com interesse farmacológico”. **Revista Estudos**, v. 32, p. 2111-2130, 2005.
- POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. **J. Bacteriol.** 194, 4494–4504, 2012.
- POSTEL, S.; KEMMERLING, B. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. **Semin Cell Dev Biol.** v.20(9), p.1025-31, 2009.
- PRESTON, G. M.; BERTRAND, N.; RAINEY, P. B. Type III secretion in plants growthpromoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 41, p. 999-1014, 2001.

- PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, Estados Unidos, v. 57, p. 50-108, 1993.
- RAO, Y. K.; FANG, S.; TZENG, Y. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.
- REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Structural biology of bacterial pathogenesis, **Curr. Opin. Struct. Biol.**, Estados Unidos, v. 14, p. 161-170, 2004.
- REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8, p. 943-950, 1989.
- RICHARD, D.; TRIBOT, N.; BOYER, C.; TERVILLE, M.; BOYER, K.; JAVEGNY, S.; et al. First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotype a causing Asiatic citrus canker in Réunion, France. **Plant Dis.**, v.101(3), p.503, 2016.
- RICHARD, D.; BOYER, C.; VERNIÈRE, C.; CANTEROS, B. I.; LEFEUVRE, P.; PRUVOST, O. Complete genome sequences of six copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* strains causing Asiatic citrus canker, obtained using long-read technology. **Genome Announc.**, v.5(12), p. e00010-17, 2017.
- RYBAK, M., MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; JONES, J. B. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 249–262, 2009.
- ROSSETTI, V. V.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. Fundação Cargill, p. 84, 1993.
- ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba. Fealq/Fundecitrus. 2001.
- SALMOND GP, REEVES PJ. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gramnegative bacteria, **Trends Biochem Sci.**, Holanda, v. 18, p. 7-12, 1993.
- SATO, M., TANAKA, H., YAMAGUCHI, R., OH-UCHI, T., ETOH, H. *Erythrina poeppigiana*-derived phytochemical exhibiting antimicrobial activity against *Candida albicans* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 37, p. 81-85, 2003.
- SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I. V.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. M. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 29, p.690–695, 2006.

- SCHUBERT, T. S.; SUN, X. (fifth revision January 2003). Bacterial Citrus canker. **Plant Pathology**, Circular 377. Florida Department of Agriculture and Conservation Services. Division of Plant Industry. 1996.
- SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, P. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundag, p. 319-341, 2005.
- SHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Eds) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS: St. Paul, v. 3, p. 373, 2001.
- SHARMA, H.; PATIL, S.; SANCHEZ, T. W.; NEAMATI, N.; SCHINAZI, R. F.; BUOLAMWINI, J. K. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of 3-keto salicylic acid chalcones and related amides as novel HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorg. & Med. Chem.**, 19, 2030–2045, 2011.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 201-222, 1995.
- SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRÂNIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; BELASQUE, J.; SACRAMENTO, L. V. S.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **J. Bacteriol.**, 195, 85–94, 2013.
- SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clin. Microbiol. Rev.**, 24, 71–109, 2011.
- SIVAKUMAR, P. M.; IYER, G.; NATESAN, L.; DOBLE, M. 3'-Hydroxy-4-methoxychalcone as a potential antibacterial coating on polymeric biomaterials. **Applied Surface Science**, 256, p. 6018–6024, 2010.
- SIVAKUMAR, P. M.; COMETA, S.; ALDERIGHI, M.; PRABHAWATHI, V.; DOBLE, M.; CHIELLINI, F. Chalcone embedded polyurethanes as a biomaterial: Synthesis, characterization and antibacterial adhesion. **Carbohydr. Polym.**, 87, 353–360, 2012.
- SOLOMON, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; “Organic Chemistry”. USA: **John Wiley and Sons**, 9<sup>a</sup> ed., 2008.
- STASKAWICZ, B. J. et al. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 2285–2289, 2001.
- STROHL, W.R. The role os natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

- SZUREK, B., MAROIS, E., BONAS, U. & ACKERVEKEN, G. V. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. **The Plant Journal**, 26(5), p. 523-534, 2002.
- THANASSI, D. G.; SAULINO, E. T.; HULTGREN, S. J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway, **Curr. Opin. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 1, p. 223-231. 1998.
- THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 420-430, 2000.
- TSUYUMU, S. et al. Factors involved in the pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: MILLS, D.; KUNEH, H.; KEEN, N.T. (Ed) Molecular aspects of pathogenicity and resistance: requirement for signal transduction. APS Press: St Paul, Minnesota, p. 105-113, 1996.
- TYPAS, A.; BANZHAF, M.; GROSS, C. A.; VOLLMER, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. **Nature Reviews Microbiology** 10, p. 123, 2012.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of Genetic Microbiology**, v.137, p. 1307-1316, 1996.
- VIPREY, V. et al. Symbiotic implications of Type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 28, p. 1381-1389, 1998.
- VIVIAN, A.; GIBBON, M. J. Avirulence genes in plant pathogenic bacteria: signals or weapons? **Microbiology**, Estados Unidos, v. 143, p. 693-704, 1997.
- VOLLMER, W. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 73, p. 37-47, 2006.
- <<http://markestrat.com.br/>> Acesso em 02 out. de 2018.
- WANG, L.; RONG, W.; HE, C. Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, PghAxc and PghBxc, are regulated by Type III Secretion Regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Beijing, v. 21, n.5, p.555-563, 2008.

- WEBER, E.; OJANEN-REUHS, T.; HUGUET, E.; HAUSE, G.; ROMANTSCHUK, M.; KORHONEN, T.; BONAS, U.; KOEBNIK, R. The Type III-Dependent Hrp Pilus Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with Pepper Host Plants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, n.7, p.2458-2468, 2005.
- WEELS, J. M. et al. *Xylella fastidiosa* gen. Nov. gram negative xylem limited fastidious plant bacterial related to *Xanthomonas* spp. **International journal of systematic bacteriology**. v. 37, p. 136-143, 1987.
- WENG, S.-F.; Chen, C.-Y.; LEE, Y.-S.; LIN, J.-W.; TSENG, Y.-H. Identification of a Novel  $\beta$ -Lactamase Produced by *Xanthomonas campestris*, a Phytopathogenic Bacterium. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 43, p. 1792-1797, 1999.
- WENZLER, E.; RODVOLD, K. A. Telavancin: the long and winding road from discovery to food and drug administration approvals and future directions. **Clin. Infect. Dis.** 61 (Suppl 2), S38–47, 2015.
- WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: APS Press, p. 80, 1988.
- WU, T.; HE, M.; ZANG, X.; ZHOU, Y.; QIU, T.; PAN, S.; XU, X. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1828, p. 2751-2756, 2013.
- YADAV, N.; DIXIT, S. K.; BHATACCARYA, A.; MISHRA, L. C.; SHARMA, M; AWASTHI, S. K.; BHASIN, V. K. Antimalarial activity of newly synthesized chalcone derivatives *in vitro*. **Chem. Biol. Drug Des.**, 80, p. 340–347, 2012.
- YANG, Y.; DE FEYER, R.; GABRIEL, D. W. Host – specific symptoms and increase release of *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas* pv. *Malvacearum* from leaves are determined by the 102 – bp Tandem Repeats of *pthA* and *avrB6*, respectively. **Mol. Plant-Microbe Interact**, Estados Unidos, v.7, p. 345-355. 1994.
- YANG, Y.; GABRIEL, D. W. Intragenic Recombination of a Single Plant Pthogen Gene Provides a Mechanism for the Evolution of New Host Specificities. **Journal of Bacteriology**, 4963- 4968, 1995.
- YANG, Y. O.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in defense responses. **Genes & Development**, v. 11, n. 13, p. 1621–1639, 1997.
- YAYLI, N.; ÜÇÜNCÜ, O.; AYDIN, E.; GÖK, Y.; YASAR, A.; BALTAÇI, C.; YILDIRIM, N.; KÜCÜK, M. Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in

- solution and the oxidant activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry** , v. 169, p. 229-234, 2005.
- YEN, Y. T.; BHATTACHARYA, M.; STATHOPOULOS, C. Genome-wide in-silico mapping of the secretome in pathogenic *Yersinia pestis* KIM. **FEMS Microbiology Letters**, v.279, p.56-63, 2007.
  - ZACARIAS, N. A.; COSTA, C. E.; CAMPIOTI, D. A.; VIERTLER, H.; SUMODJO, T. A. Comportamento potenciodinâmico da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (chalcona) e 1,3- difenil-3-fenitio-2-propen-1-ona em DMF. Disponível em: <http://www.s bq.org.br>. Acesso em 15 de maio de 2018.
  - ZAMBOLIM L.; VALE F. X. R.; PEREIRA A. A.; CHAVES G. M. Café. In: VALE F. X. R., ZAMBOLIM L (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, p.83-180, 1997.
  - ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* CAV. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 450-456, 2005.
  - ZHOU, J.; TAO, Q. Q.; WANG, P. Y.; et al. Antimicrobial evaluation and action mechanism of pyridinium-decorated 1,4-pentadien-3-one derivatives. **Bioorganic Med. Chem. Lett. [Internet]**. 28(10), 1742–1746, 2018.
  - ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 4<sup>a</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 499-526, 2002.

# CAPÍTULO II

## 1. REVISÃO DA LITERATURA PARA CAPÍTULOS II, III E IV

### 1.1. *A escassa descoberta de novos antimicrobianos e o avanço da resistência bacteriana*

Antibióticos são conceituados como substâncias produzidas por diversas bactérias e fungos e, que utilizados em baixas concentrações, eliminam ou impedem o crescimento de outros, de forma seletiva. Esse conceito não considera compostos produzidos sinteticamente, uma vez que, esses agrupados com os compostos naturais e seus derivados, são classificados como antimicrobianos. Os antimicrobianos podem, ainda, ser subdivididos de acordo com a especificidade, como por exemplo, antibacterianos, antifúngicos, dentre outros (ROBBERS et al., 1997; GOODMAN, 2003). O conceito mais crítico, ainda é a definição de “seletividade” ou também chamada de “toxicidade seletiva” a qual se baseia na ação do antibiótico - deve inibir ou eliminar o microrganismo, mas não pode inibir ou matar o organismo hospedeiro. No caso deste trabalho, trataremos nossos compostos como “antimicrobianos”.

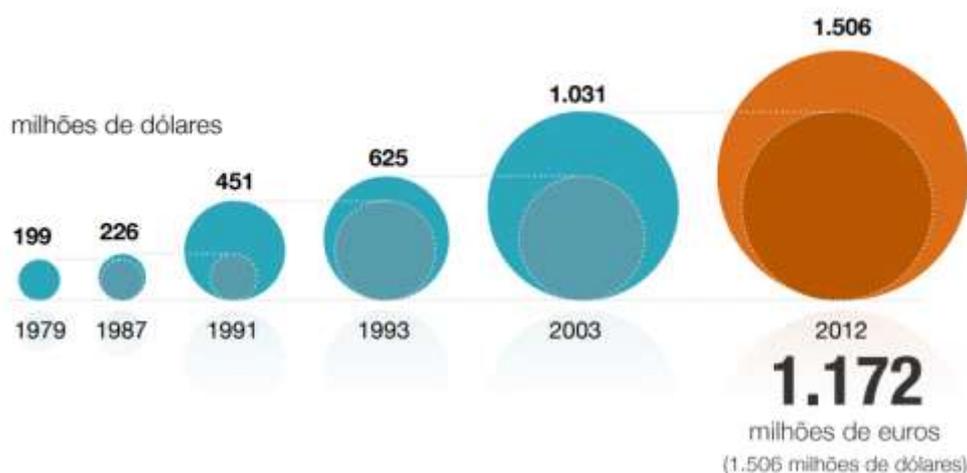
O consumo exacerbado de antibióticos gera um dos assuntos mais registrados e preocupantes associados à evolução biológica: a resistência antimicrobiana a fármacos (RAM). Esse é um problema encontrado tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Alguns pesquisadores como Baquero e Blázquez (1997) temem a volta da chamada era pré-antibiótico, uma vez que relatam a falta de inovação no âmbito farmacêutico, já que nenhuma nova classe de compostos foi registrada, embora as pesquisas sejam intensas.

O surgimento de bactérias multirresistentes é ainda o fator mais agravante, pois vem causando sérios problemas em ambientes hospitalares e complicações socioeconômicas generalizadas (WU et al., 2013). A resistência vem muitas vezes da utilização incorreta e desenfreada de antibióticos (CANTAS et al., 2013). Para combater essa resistência antimicrobiana acredita-se que seja necessário buscar novas fontes de fármacos com novos modos de ação (MOA), superando esses mecanismos preexistentes que garantem a resistência aos antibióticos (BUSH et al., 2011; BLAIR et al., 2015). Essa ameaça cresce cada vez mais e exige uma forte e rápida resposta global.

Em 2011 mais de 3200 moléculas em desenvolvimento foram encontradas, porém só foram adiante 35 novos fármacos. Em 2012, a investigação e desenvolvimento de um novo medicamento era cerca de 1172 milhões de euros (1506 milhões de dólares), seis vezes mais do que em 1979 (APIFARMA, 2012). Pesquisas atuais e publicadas no *Jama Internal Medicine* afirmam que para lançar um novo fármaco no mercado os custos oscilam entre os 159 milhões de dólares (500 milhões de reais) e 1,95 bilhão de dólares (6,12 bilhões de reais) (EL PAÍS, 2017).

Dessa maneira é evidente e compreensível o motivo do registro de fármacos ter decrescido cada vez mais no decorrer dos anos além do consequente e preocupante reaparecimento de doenças como tuberculose, hanseníase e varíola, da resistência bacteriana de doenças, antes facilmente curáveis, e outras incuráveis como do vírus HIV. A Figura 1 apresenta o custo real para produção de novos fármacos desde 1979 até 2012.

**Figura 1.** Custo para investigação e produção de novos fármacos no decorrer dos anos



Fonte: APIFARMA (2012)

Conforme mencionado na Capítulo I, agentes antimicrobianos atuam por diferentes mecanismos de ação: (1) bloqueio na síntese da parede celular, (2) bloqueio na síntese de proteínas, (3) alteração da permeabilidade da membrana, (4) bloqueio direto ou indireto da biossíntese de ácidos nucleicos e (5) inibição de divisão celular (VOLLMER, 2006; LOCK E HARRY, 2008; DEVASAHAYAM et al., 2010; SILVER, 2011). A membrana bacteriana é um alvo interessante para o desenho de novos fármacos antibacterianos, pois o arranjo da membrana bacteriana é diferente da membrana dos eucariotos, conferindo maior seletividade ao fármaco (EPAND et al., 2016). Da mesma forma, compostos que atuam no processo de divisão celular bacteriana também são considerados promissores no tratamento de infecções bacterianas, uma vez que as proteínas e processos envolvidos na divisão da célula bacteriana são diferentes das células eucarióticas (VOLLMER, 2006; LOCK E HARRY, 2008).

Os compostos naturais são muito importantes na busca por novas moléculas que sejam biologicamente ativas, porém existem dificuldades para o aproveitamento de compostos naturais e produção de novas substâncias que tenham ação antimicrobiana, uma vez que essa busca depende de muito tempo, alto custo, faltam leis específicas para a exploração da

biodiversidade e há poucas informações sobre a identidade de muitos compostos naturais (STROHL, 2000).

Há, então, um grande desafio na busca e desenvolvimento de novos compostos potencialmente ativos de acordo com o cenário vivido atualmente, para ferramentas mais eficientes, viáveis e menos custosas (BARREIRO et al., 2007).

### *1.2.A utilização de moléculas naturais como antimicrobianos dentre elas a curcuminoides e chalconas*

Nas últimas décadas, com o crescente aumento das tecnologias e inovações, além do conhecimento avançado no âmbito do setor farmacêutico, novas descobertas têm sido feitas. Compostos mais bioativos, eficazes, com maior especificidade e baixa toxicidade são o alvo das pesquisas, embora esse processo de descoberta seja lento, complexo, demandando alto custo e extremamente dependente das inovações científicas e tecnológicas (GÓES, 2004; GUIDO et al., 2008). Nesse aspecto os produtos naturais tornam-se importantes na busca e desenvolvimento de novos antimicrobianos. Atualmente há inúmeros métodos para se obter um novo composto candidato a antimicrobiano, sendo alguns deles o bioisosterismo, latenciação, homologação, simplificação e hibridização molecular. A síntese de moléculas bioativas baseada em compostos naturais tem sido de grande interesse, pois apresentam características privilegiadas como estruturas artificiais, boa propriedade físico-química, biocompatibilidade superior, baixa toxicidade a mamíferos, menor toxicidade ao meio ambiente, especificidade para as espécies-alvo e modos de ação únicos (SHARMA et al., 2004; LAO et al., 2006; LI et al., 2011; ZHAO et al., 2011; GAN et al., 2016).

As plantas sintetizam metabólitos secundários que também são chamados de fitoquímicos. Dentre estes metabólitos secundários produzidos, há os compostos aromáticos que constituem um grupo interessante, sendo eles os terpenóides, fenilpropanóides, indol e compostos sulfurados (SHARMA et al., 2013). Além disso, a ação antimicrobiana dos produtos naturais têm sido atrelada a presença de compostos fenólicos (EL-MASSRY et al. 2009; MAIER et al. 2009; MAJHENIĆ et al., 2007) e acredita-se que o modo de ação dos compostos vegetais gerem danos à membrana citoplasmática bacteriana, principalmente, devido a hidrofobicidade característica destes compostos bem como pela influência nos sistemas enzimáticos e material genético bacteriano (ARQUÉS et al. 2008; BURT et al. 2007; GOÑI et al. 2009).

Alguns países de grande diversidade na flora como, por exemplo, o Brasil, Cuba e México têm estudos sobre plantas nativas com atividades antimicrobianas (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; MAHASNEH et al., 1999; AHMAD; BEG, 2001; DUARTE et al., 2005), porém existe a falta de investigações científicas que determinem o potencial

terapêutico destas plantas para confirmar suas propriedades. Muitos desses países da América Latina detêm bancos de triagem que documentam produtos naturais e sua atividade antimicrobiana. São exemplos esses países: Cuba (MARTÍNEZ et al., 1996), Honduras (LENTZ et al., 1998) México (NAVARRO et al., 1996; ROJAS et al., 2001) e Brasil (SARTORATTO et al., 2004; DUARTE et al., 2005). No Brasil, a busca por compostos naturais com atividade antimicrobiana aumentou, significativamente, nos últimos anos, sendo que o país possui 20% do número de espécies de plantas do planeta, detentor de uma das maiores biodiversidades de plantas do mundo (CARVALHO et al. 2007).

De acordo com a literatura, considerando os produtos naturais, não existe um consenso com relação à dose de inibição adequada comparada aos antibióticos padrões. Alguns autores consideram que o nível de inibição deva ser próximo ou similar ao de antibióticos. Já outros acreditam que a MIC deva ser em concentrações mais altas. Aligianis e colaboradores (2001) propuseram uma classificação para produtos naturais baseado nos resultados de MIC, sendo de forte inibição quando a MIC é de até 500 µg/mL; inibição moderada para MIC entre 600 e 1500 µg/mL e de fraca inibição para MIC acima de 1600 µg/mL.

O desenvolvimento de compostos alternativos ou métodos de tratamentos mais ecológicos no ataque de microrganismos através de mecanismos únicos pode ser de grande importância para a pesquisa. Muitos estudos e pesquisas têm sido dedicados para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas com admiráveis atividades farmacológicas e objetivo de que tenham alta eficiência (MA et al., 2014; HU et al., 2017; WANG et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

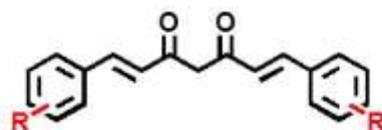
A curcumina, também conhecida como “açafraão-da-índia”, “açafraão-da-terra”, “cúrcuma” ou “turmerico” é uma das substâncias que podem ser isoladas dos rizomas da planta *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). O pigmento obtido é amarelo e apresenta muitas aplicações medicinais e culinárias (ANAND et al., 2008), desde ação antibacteriana (RAI et al., 2008; CUONG et al., 2015), antifúngica (UNGPHAIBOON et al., 2005; LEE, 2014), antiviral (MISHRA et al., 2015; SORDILLO E HELSON, 2015), anti-inflamatória (WANG et al.; 2015; ESATBEYOGLU et al., 2015) e antioxidante (RECENO ET AL., 2015; ZAIDI E MAHBOOB, 2015). Substâncias naturais ou sintéticas que apresentam esqueleto carbônico similar ao da curcumina são denominadas curcuminoides (ANAND et al., 2008).

Curcuminoides, portanto, são um grupo de compostos fenólicos que tem mostrado amplos benefícios (Figura 2). É comercializado como açafraão ou curcumina, tanto em pó como em óleo (FILHO, et al., 2000). Dentro da *Curcuma longa* (CECÍLIO FILHO et al, 2000) pode-se encontrar a curcumina ou diferolul metano, a desmetoxicurcumina e a

bisdemetoxicurcumina. Foi identificado um quarto pigmento que recebeu o nome de ciclocurcumina (LIN e LIN, 2008).

Os pigmentos curcuminóides são biosintetizados a partir da fenilalanina que sofre ação da enzima fenilalanina amonialiase e gera o ácido cinâmico. Este por sua vez, sofre uma metilação e torna-se ácido ferúlico. Duas moléculas de ácido ferúlico sofrem uma reação de condensação e originam os pigmentos curcuminóides (ROUGHLEY e WHITING, 1973; SANTOS et al., 2000; PÉRET-ALMEIDA, 2008). Conforme mencionado, anteriormente, o grande interesse em estudar esses compostos é devido a inúmeros ensaios preliminares mostrarem atividades diversas, desde anti-inflamatória, antibacteriana, até antitumoral (ASAI et al., 1999; GUL et al., 2004; ALMEIDA, 2006; LIN e LIN, 2008; SILVA-FILHO et al., 2009; SWANSON et al., 2010). Tønnesen e Karlsen (1987) e Singh et al. (2002) registraram atividade antibacteriana para a curcumina quando testada contra *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S.epidermidis*, e *Salmonella typhimurium*. A curcumina também inibiu o crescimento de *Helicobacter pylori* (MAHADY et al., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (RUDRAPPA E BAIS, 2008), *Bacillus subtilis*, e *E. coli* (KAUR et al., 2010) por redução da virulência ou interrompendo a divisão celular.

**Figura 2.** Estrutura geral dos curcuminóides



Outra classe de compostos que contêm estruturas mais simples, porém com possibilidade de serem modificados, estruturalmente, visando a melhoria e/ou seletividade de atividades biológicas específicas são os compostos fenólicos. Dentro dos fenólicos está contido o grupo das chalconas, foco deste trabalho. As chalconas estão referenciadas e citadas na página 41, item 1.6 (Capítulo I).

### 1.3.Importância da utilização de *B. subtilis* em estudos biológicos

*Bacillus subtilis* é uma bactéria presente no meio ambiente. Possui característica aeróbia, Gram-positiva com capacidade para formação de esporos. Geralmente, o potencial patogênico de *B. subtilis* é descrito como baixo e/ou ausente (DE BOER E DIDERICHSEN, 1991) embora existam relatos na literatura de infecções ocasionadas por *B. subtilis* (KISS et al., 1988; RICHARD et al., 1988; THOMAS E WHITTET, 1991; VELASCO et al., 1992; WALLET et al., 1996). Há algumas espécies de *B. subtilis* que podem ser responsáveis por

causar infecções gastrointestinais, dentre outras (DROBNIIEWSKI, 1993). A intoxicação alimentar causada por *B. subtilis* se dá, principalmente, pela produção de algumas enterotoxinas que está ganhando reconhecimento cada vez maior, ainda mais pela sua estabilidade ao calor (PUKALL et al., 2005; MIKKOLA, 2006). É responsável por causar infecções fatais, como septicemia, em pacientes imunocomprometidos (OGGIONI et al., 1998). Outros estudos apontaram contaminação em alguns cereais infantis e fórmulas secas causaram vômitos. O agente contaminante foram toxinas associadas ao *B. subtilis* e *B. cereus* (DUC et al. 2005).

Algumas espécies de *Bacillus* também produzem os biosurfactantes naturais mais importantes como, por exemplo, a surfactina, no caso de *B. subtilis* (MIKKOLA, 2006). Cepas que produzem surfactina possuem alta mobilidade, uma vez que essa substância auxilia na movimentação celular e reduz a tensão superficial (KINSINGER et al. 2003, HOFEMEISTER et al. 2004, MUKHERJEE E DAS 2005). Essas cepas também são capazes de formar biofilmes, porém as que não produzem não o formam (CONNELLY et al. 2004). A bacteriocina subtilina, substância também produzida por *B. subtilis* ATCC 6633, tem estrutura similar com a nisina e possui capacidade de inibir a germinação de esporos de *Clostridium* e de *B. cereus* (CHATTERJEE et al. 2005).

Uma própria estirpe de *B. subtilis* FZB24 é utilizada comercialmente no biocontrole contra fitopatógenos, pois produzem compostos semelhantes à substância iturina (KILIAN et al. 2000). Cepas de *Bacillus* que produzem tanto surfactina como iturina têm sido utilizadas para garantir o crescimento de plantas. *B. subtilis* também produzem várias outras substâncias antifúngicas, antibacterianas e antitumorais documentadas em vários trabalhos como, por exemplo, no de Mikkola e colaboradores (2006).

Além da importância de combater essas cepas resistentes de *B. subtilis* que causam infecções e produzem muitas toxinas, muitos bioensaios laboratoriais com *B. subtilis* são utilizados para analisar sua resposta mediante aos experimentos e estimar se a mesma resposta seria válida para outras bactérias Gram-positivas. Em outras palavras *B. subtilis* é considerado microrganismo modelo de bactéria Gram-positiva em vários estudos (MATIAS E BEVERIDGE, 2005; PINHO et al., 2013; MÜLLER et al., 2016) assim como neste trabalho.

#### *1.4. Microrganismos patogênicos: características gerais, fatores de resistência e virulência*

Abordamos neste item as características gerais dos microrganismos patogênicos utilizados para o estudo deste trabalho. Considera-se de extrema importância a descoberta das características gerais bem como de resistência e virulência de determinados microrganismos

de relevância clínica. Essa importância se dá devido às questões emergenciais na saúde pública visando a busca de alternativas de tratamento e desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos pela comunidade científica.

As bactérias do gênero *Enterococcus* são comensais e estão presentes na microbiota do homem e de outros animais, embora possam ser agentes infecciosos oportunistas, principalmente em pacientes de riscos (FACKLAM, et al., 2002). Distribuem-se pelos mais diversos habitats desde solo, água e plantas até os mais diversificados tipos e espécies de animais (MURRAY, 1990; AARESTRUP et al., 2002). São caracterizadas como cocos ovóides, Gram-positivos, arranjados tanto individualmente como em pares ou em cadeia. São, também, anaeróbios facultativos e crescem em temperaturas entre 10 a 45 °C.

Inicialmente, *Enterococcus* possuíam resistência natural frente a diversos antibióticos comercializados, tais como cefalosporinas, fluoroquinolonas, mas também têm adquirido resistência à ampicilina e aos aminoglicosídeos, em baixas concentrações (gentamicina e estreptomicina), as penicilinas “antiestafilocócicas” (oxacilina) e ao trimetoprim (BONTEN et al., 2001; RICE et al., 2003). Posteriormente algumas cepas tornaram-se resistentes à vancomicina, o que causou extrema preocupação e interesse nas pesquisas científicas e farmacêuticas (RICE, 2001; RICE et al., 2003). Acredita-se que os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) tiveram um bacilo Gram-positivo esporulado, como ancestral comum e esse bacilo apresentava resistência aos glicopeptídios (MESSI et al., 2006, SORUM et al., 2006). A resistência garantida sobre os glicopeptídios vancomicina e teicoplanina ocorre devido à presença de genes específicos de resistência. Esses genes são denominados vanA, van B, van C, van D, vanE e vanG. O processo de resistência ocorre, pois há síntese de precursores de parede celular modificados os quais a vancomicina tem menos afinidade (CETINKAYA et al., 2000).

Sabe-se que os *Enterococcus* são a maior causa de infecções hospitalares (CETINKAYA et al., 2000). No Brasil as inúmeras causas registradas por infecções com *Enterococcus* são septicemias, infecções do trato respiratório baixo, infecções cutâneas ou de tecidos moles além de infecções do trato urinário (SADER et al., 2001).

Outra bactéria de extrema relevância no cenário das infecções hospitalares é *Staphylococcus aureus* que apresenta morfologia esférica (0,5 a 1,5 µm de diâmetro), é Gram e catalase-positiva e é, comumente, encontrada na pele bem como fossas nasais, garganta, intestino, até mesmo de indivíduos saudáveis (BANNERMAN, 2003; CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005). Podem estar arranjados individualmente, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados como cachos de uva, uma vez que sua divisão celular ocorre em

três planos perpendiculares. A coloração das colônias pode ser acinzentada até o amarelo-ouro, de forma que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, embora não seja notada em anaerobiose ou em caldo (CASSETTARI et al., 2005; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI E ALTHERTHUM, 2005).

Todavia, *S. aureus* também é classificado como microrganismo oportunista e é capaz de provocar desde infecções brandas (furúnculos e celulites) até as mais graves (meningite, pneumonia, endocardite, septicemia e síndrome do choque tóxico). Essas doenças provocadas podem ser provenientes da invasão direta do microrganismo nos tecidos, mas também pode ocorrer devido à produção de algumas toxinas (SCHECHTER et al., 1998; BRAUNWALD et al., 2002; ANDRIOLO, 2005), como por exemplo, alfa, beta e gama toxinas, a leucocidina, a esfoliatina, toxina do choque tóxico e as enterotoxinas (SCHECHTER et al., 1998; BRAUNWALD et al., 2002; NOVICK, 2000)

*S. aureus* pode migrar para diversos sítios e se a pele/mucosa apresentarem lesão ou comprometimento é capaz de se alojar, provocando danos locais (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005; ROBERT E CHAMBERS, 2005). Há riscos, também, para indivíduos com queimaduras, diabéticos, HIV-positivos ou que realizam diálise. *S. aureus* produz toxinas estafilocócicas que se responsabilizam pela necrose epidérmica tóxica (síndrome da pele escaldada) e pela síndrome do choque tóxico. Além disso, os *Staphylococcus* podem causar infecções alimentares, pois produzem exotoxinas em alimentos contaminados (LOWY, 1998; CAVALCANTI et al., 2005; CARVALHO et al., 2005). O *S. aureus* também é um dos maiores causadores de meningites associadas a derivações ventriculoperitoneais (FOSTER E HOOK, 1998; CARVALHO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005). É encontrado em infecções ósseas, de prótese e artrites sépticas, uma vez que é capaz de expressar diversas proteínas de superfície (adenosinas) que se aderem à matriz óssea (SANTOS et al., 2007).

A bacteremia pode ser ocasionada em locais diversos, causando endocardites, osteomielites, pioartrites e formação de abscessos metastáticos (na pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro). *S. aureus* também têm capacidade de formar biofilmes em superfícies de alguns materiais onde a penetração de antibióticos é ínfima tais como cateteres endovenosos e próteses (DAVIS, 2005).

A maior preocupação com relação a esse microrganismo é devido a seu rápido progresso adaptativo garantindo resistência aos mais variados antibióticos existentes no mercado. O potencial infeccioso de *S. aureus* está na facilidade em disseminar pelos mais variados tecidos, mas também por produzir enzimas tóxicas como as betalactamases, catalases, hialuronidas, DNAses, dentre outras (SCHECHTER et al., 1998; NOVICK,

2000; BRAUNWALD et al., 2002). Além disso, *S. aureus* possui estruturas na parede celular e muitos fatores de virulência, como polissacarídeos, proteínas antigênicas e outras moléculas (ácido tecóico, o glicanopeptídeo, a proteína A, adesinas) que induzem, possivelmente, uma resposta imunológica no hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2001; LUTZ et al., 2003).

Historicamente, desde a descoberta e comercialização da sulfanilamida, na década de 30, acreditava-se que os problemas infecciosos haviam sido aniquilados. No entanto, rapidamente, cepas de *S. aureus* se mostraram resistentes a este antimicrobiano até que surgiu a penicilina e, novamente, *S. aureus* adquiriu resistência, uma vez que é produtor da enzima betalactamase (hidrólise do anel betalactâmico da penicilina). A resistência se estendeu à amoxicilinas e ampilicinas (FREITAS E FONSECA, 1987; TAVARES, 2002; MAMISUKA, 2005). Contudo, foi lançada uma nova classe de antibióticos denominada meticilina e logo em seguida vieram as cefalosporinas. Já na década de 70 novas cepas resistentes surgiram e receberam o nome de MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina), resistentes a tudo que havia no mercado. Sendo assim, foram disseminadas em ambientes hospitalares e garantiram inúmeras infecções. A vancomicina é eficiente no tratamento das infecções causadas pelas cepas MRSA, apesar de apresentar efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (SRINIVASAN et al., 2002; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005; MACHADO et al., 2005). Porém, em 1997, descobriram-se novas cepas resistentes, também, aos glicopeptídios (vancomicina) e foram denominadas de VRSA. Desde então a resistência de *S. aureus* ganhou destaque e tornou-se um desafio para novas pesquisas e buscas de novos antimicrobianos (SANTOS et al., 2007).

O que se sabe é que a resistência de *S. aureus* está atrelada tanto à mutação de genes, que alteram sítios ativos relacionados ao antibiótico, quanto à aquisição de genes de resistência (que inativam ou destroem o composto) decorrentes de outras bactérias, da mesma espécie ou de espécies distintas através de plasmídeos ou transposons (BERNARD et al., 2004; LIMA et al., 2005; TAVARES, 2002). No caso de MRSA, por exemplo, o que garante a resistência é um gene cromossômico (*mecA*) que codifica modificações no receptor betalactâmico e estimula a produção de uma proteína ligante à penicilina (PPB2a) de baixa afinidade ao antibiótico (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). Nos hospitais brasileiros, a taxa de cepas MRSA está entre 40 a 80%, principalmente em UTIs (MUTO et al., 2003).

Com relação as cepas VRSA, acreditava-se que a resistência estava vinculada ao gene Van, o mesmo encontrado em *Enterococcus*. Sendo assim, acreditava-se na transferência via plasmídeo, uma vez que esse processo foi observado em laboratório (VELÁZQUEZ et al., 2002). No entanto estudos que realizaram PCR de VanA e VanB mostraram-se negativos, comparativamente, e a nova hipótese é que há um espessamento da parede celular, com maior

produção de peptidoglicano e monômeros de mureína, garantindo a resistência à vancomicina. Dessa forma as moléculas de vancomicina são retidas na parede e uma dose menor penetra na membrana citoplasmática (TAVARES, 1999; VELÁQUEZ et al., 2002; CASSETTARI et al., 2005; TIWARI E SEM, 2006).

Atualmente, as infecções por VRSA são tratadas com estreptograminas, as oxazolidinonas, a glicilciclina, mas a vancomicina também pode ser utilizada em sinergismo (TAVARES, 2002). No entanto, diante de todo esse contexto, nota-se a extrema urgência pela pesquisa científica para que hajam descobertas de novas classes de antimicrobianos visando o combate desses agentes infecciosos.

Em contrapartida existe outra bactéria que gera muitos desafios e preocupações para a saúde pública: a bactéria *Escherichia coli*. Ela é constituinte da família Enterobacteriaceae, sendo uma das principais bactérias presentes nas microbiotas intestinais tanto do homem quanto de outros animais (CAMPOS E TRABULSI, 2002). É caracterizada por ser um bastonete, Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado, com tamanho entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm. Apresentam motilidade, uma vez que possuem flagelos peritríqueos e a temperatura ótima para seu crescimento é de 37 °C (BARNES et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005). Em meios nutrientes sólidos, *E. coli* apresenta de 1 a 3 mm de diâmetro, podendo ser lisa ou rugosa; ou ainda intermediárias e mucoides. Algumas cepas, ainda, são capazes de produzir H<sub>2</sub>S além de ter atividade das enzimas β-galactosidase e β-glucoronidase (OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). A bactéria *E. coli* está contida nos coliformes fecais, sendo um indicador de contaminação fecal e, possivelmente, de bactérias patogênicas (OLIVEIRA et al., 2004). Ela é disseminada pelas fezes, poeira, água, embora seu habitat seja o trato intestinal (ANDRADE, 2005; SAVIOLLI, 2010). Possui diversos sorotipos e acredita-se que a maioria não apresente virulência. No entanto, algumas cepas são responsáveis pela alta incidência de infecções entéricas bem como extra-intestinais e sugere-se que estas adquiriram alguns grupos de genes que garantiram fatores de virulência, durante o processo evolutivo (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002; SAIDENBERG, 2008; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009; SAVIOLLI, 2010).

Há um agrupamento dos diversos patótipos de *E. coli* conforme o seu mecanismo de patogenicidade, já que esta bactéria possui variadas formas de iniciar e contaminar seu hospedeiro (BARNES et al., 2003; KNÖBL et al., 2006; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Mesmo assim, é considerada que a patogenicidade conferida a essa bactéria é decorrente de diversos mecanismos de virulência combinados, principalmente, de ganhos genéticos do processo evolutivo, através de mutações ou transferência horizontal, mas também por

estruturas do próprio microrganismo (KUHNER T et al., 2000; HENTSCHEL E HACKER, 2001; ROCHA, 2008; SAVIOLLI, 2010). Sendo assim, *E. coli* pode ser classificada de acordo com seus fatores de virulência presentes: antígenos somáticos (Öhne – O), capsulares (Kapsel – K), flagelares (Hauch – H) e fimbriais (Fimbriae – F). (CAMPOS E TRABULSI, 2002; ROCHA, 2008). Baseados, ainda, nestes fatores de virulência, *E. coli* recebe a classificação nos variados patótipos: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorágica), EaggEC (*E. coli* enteroagregativa), UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* meningite neo natal), REDEC (*E. coli* enteropatogênica) e APEC (*E. coli* patogênica aviária). (CROXEN E FINLAY, 2010; SAVIOLLI, 2010). Além disso, *E. coli* também produz diversas toxinas tais como colicinas, sideróforos, enterotoxinas e citotoxinas (ASSIS E SANTOS, 2001; CAMPOS, 2006).

As EPEC acometem humanos e animais causando diarreia com muco, vômitos e febre. Sua característica é de colonização das microvilosidades do intestino causando lesão ou desaparecimento de suas margens, embora não produzam toxinas (CROXEN E FINLAY, 2010). Isso garante perda de peso, má digestão e má absorção (MINAGAWA, 2007). Já as ETEC acometem humanos e animais causando diarreia e hipotermia. Elas colonizam mucosa nas proximidades do intestino delgado e produzem toxinas (toxina termolábil (LT) e toxina termoestável (ST)) (CAMPOS & TRABULSI, 2002; ROCHA, 2008; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009; CROXEN E FINLAY, 2010).

As EIEC acometem humanos e animais causando distúrbios no intestino grosso, febre e diarreias com muco e sangue. Elas colonizam o cólon e sua característica determinante é a presença de um plasmídeo que garante a infecção e carrega todos os genes de virulência (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Em contrapartida, as EHEC acometem humanos e animais causando diarreia com sangue, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica trombocitopênica. Elas danificam as células do epitélio do intestino grosso e produzem a toxina Shiga, fatal para crianças (ROCHA, 2008; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2011). Já as EaggEC acometem humanos e animais causando diarreia persistente. Elas colonizam ambos os intestinos aderindo-se em agregados no cólon, secretam muco e podem formar biofilmes, além de produzirem uma toxina termolábil e uma citotoxina termoestável (CAMPOS E TRABULSI, 2002; SYDOW, 2005; MINAGAWA, 2007).

As UPEC acometem humanos e animais causando infecções urinárias tais como cistite e pielonefrite. Elas penetram no trato urinário, invadindo a bexiga, mas também podem se

instalar nos rins, chegando a causar até septicemia (SIDOW, 2005; BERCHIERI JUNIOR, et al., 2009). As NMEC causam meningite em recém-nascidos pois colonizam o sistema nervoso central (SAVIOLLI, 2010). Já as REDEC podem causar diarreia, porém não há definições comprovadas de sua patogenia (MINAGAWA, 2007). Finalmente as APEC (colibacilose aviária) acometem aves (BARNES et al., 2003; BARCELOS, 2005).

Há também a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* que está contida na família Pseudomonadaceae, possui morfologia de bastonete, é Gram-negativa, aeróbia e podem estar arrançadas individualmente, pares ou em cadeias. Também apresentam flagelo monotríquio, o qual confere motilidade, e alguns pigmentos fluorescentes que se difundem em meios de cultivo. Esses pigmentos são denominados pioverdina, piocianina, piorrubina e piomelanina. Além disso, *P. aeruginosa* não fermenta carboidratos, utiliza o nitrato como aceptor final de elétrons (não oxigênio) e produz arginina desidrolase e ornitina-descarboxilase (PALLERONI et al., 1973; POLLACK, 1995).

O NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) e o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) registraram, em 1996 nos EUA, a bactéria *P. aeruginosa* como a principal causadora de infecções hospitalares, comparado aos patógenos que causam pneumonia em UTI's (Unidades de Terapia Intensiva) (RICHARDS et al. 1999). *P. aeruginosa* também é causadora de infecções em sítios cirúrgicos, hospitalares em geral e infecções na corrente sanguínea. Sader e colaboradores (2001) registraram o mesmo cenário para o Brasil, com ênfase nas pneumonias.

Essa bactéria é amplamente disseminada devido a condições de fácil adaptação em vários ambientes, temperatura e umidade bem como capacidade de doar e receber fatores de resistência a antimicrobianos (FAVERO et al., 1971) Alguns fatores que conferem patogenicidade a essa bactéria são a garantia da aderência ao hospedeiro; produção de polissacarídeos (algumas cepas produzem alginato cuja função está associada a aderência, resistência ao hospedeiro); toxinas extracelulares (elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina, hemolisinas e exotoxinas); presença de lipopolissacarídeos de parede celular (endotoxinas) (MAI et al, 1993; JAFFARBANDJEE et al., 1995; ARNOW E FLAHERTY, 1996).

*P. aeruginosa* tem capacidade de proliferar em equipamentos hospitalares (cateteres, tubos nasogástricos, reservatórios de armazenamento de água em farmácia e/ou laboratório) soluções antissépticas, desinfetantes, dentre outros (CRISTINA E COSTERTON 1984; DASGUPTA E COSTERTON, 1989; NICKEL et al., 1989; MARRIE et al., 1990; KOWALEWSKAGROCHOWSKA, 1991), através da formação de biofilmes, o que garante a

infecção de muitos indivíduos comprometidos imunologicamente, principalmente os que se encontram em UTI's (GRUNDMANN et al. 1995, MOOLENAR et al. 2000).

Muitas doenças são provocadas por *P. aeruginosa* seja pela produção de suas toxinas ou pela formação de biofilme que acarretam desde infecções simples da pele até sepses fatais (MURRAY, 1995; PALLERONI, 1998). É um importante patógeno em infecções com indivíduos acometidos com fibrose cística, além de pacientes com queimaduras, endocardites, pneumonia, problemas urológicos e infecções em recém-nascidos (FLICK E CLUFF, 1976; KNOWLES et al., 1995; BARTH E PITT, 1998).

O maior fator agravante se dá pela alta taxa de resistência, pois até a década de 60 *P. aeruginosa* era sensível, apenas, a polimixinas. Passado algum tempo, com novas classes descobertas sabe-se que a bactéria apresentava sensibilidade a alguns aminoglicosídeos, as carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, a algumas cefalosporinas de terceira e quarta geração, aos carbapenemas, ao aztreonam e as fluoroquinolonas. Mesmo assim, *P. aeruginosa* possui forte adaptação e facilidade em adquirir resistência (mutação, conjugação, transposição e indução) e tornou-se resistente a carbenicilina, ceftazidima e gentamicina (FERREIRA, 2005). Além da  $\beta$ -lactamase cromossômica, inúmeras  $\beta$ -lactamases plasmidiais ou provenientes de transposons foram registradas, até mesmo as de amplo espectro (ESBLs) (PITT, 1998). Além disso, há as metalo- $\beta$ -lactamases que degradam antimicrobianos  $\beta$  lactâmicos, inclusive os de amplo espectro e inibidores de  $\beta$  lactamases. Foi registrada uma enzima desse tipo em *P. aeruginosa*, a qual foi denominada de IMP-1 (WATANABE et al., 1991; BUSH, 1998). Finalmente, as polimixinas foram documentadas por serem eficazes contra *P. aeruginosa*, porém apresentam alta toxicidade. Por algum tempo foram restritas à comercialização, no Brasil, mas diante da alta taxa de resistência bacteriana e escassa opção para tratamento de cepas resistentes voltou a ser utilizado e já existem cepas resistentes a esse composto (YOUNG et al., 1992; LEVIN et al., 1999). O cenário é agravante e implora pelo rápido desenvolvimento de novas drogas.

A bactéria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* também ganha destaque no âmbito das preocupações relacionadas à saúde pública. Essa bactéria pertence à família Enterobacteriaceae. São bastonetes, Gram-negativos, não esporuladas, anaeróbios facultativos de tamanho entre 2,0 a 5,0  $\mu\text{m}$  e largura de 0,7 a 1,5  $\mu\text{m}$ . A temperatura ótima de crescimento é de 37° C, embora elas sobrevivam ao congelamento e sejam sensíveis ao calor (destruída por aquecimento a 60°C, de 15 a 20 minutos) (ICMSF, 1996; D'AOUST E MAURER, 2007). São caracterizadas pela presença de flagelos peritríquios (apresentam motilidade), fímbrias,

lipopolissacarídeos e proteínas de membrana externa que são responsáveis pela aderência e invasão ao epitélio intestinal do hospedeiro (HOLT et al., 1994; BERNDT et al., 2007).

Inicialmente a classificação de *Salmonella* é um pouco confusa pelas inúmeras nomenclaturas de sorotipagem. Essa nomenclatura é feita de acordo com as estruturas encontradas na superfície celular, assim como é feito para *E. coli*. Pode-se classificá-las através da cápsula (antígeno capsular “Vi”), da parede celular (antígenos somáticos “O”) e dos flagelos (antígenos flagelares “H”) (BRENNER et al., 2000; POPOFF et al., 2005). Além disso, o gênero *Salmonella* possui duas espécies sendo elas a *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira ainda se divide em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* e ainda cada uma é dividida de acordo com seu perfil antigênico. No caso a espécie abordada nesse trabalho é a *S. enterica* que agrupa mais de 2400 sorotipos, sendo que as mais envolvidas em infecções humanas são as *S. enterica* subsp. *enterica*, que habitam animais de sangue quente e garantem 99% das salmoneloses humanas. Todos os sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* recebem, ainda, uma nomenclatura vinculada ao local onde foram isoladas. Portanto designa-se *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium ou apenas *Salmonella* Typhimurium (POPOFF et al., 2005).

As principais fontes que podem conter *Salmonella* são a água, solo, as fezes de animais, insetos e superfícies de equipamentos, o que lhe confere ampla capacidade de infecção (SCALLAN et al., 2011). Muitas vezes sua presença está relacionada com produção animal, abatedouros, dentre outros e, portanto, é frequentemente encontrada em alimentos de origem animal bem como vinculada a problemas de saúde pública, sendo classificada como doença zoonótica (transmitida diretamente ou indiretamente entre os animais e os seres humanos) (EFSA, 2014a; WHO, 2015).

Os sintomas típicos de salmonelose em indivíduos acometidos pela bactéria são diarreia, vômito, febre, náusea e cólicas abdominais. Em alguns casos, a doença evolui para uma grave diarreia acompanhada de desidratação e pode disseminar para intestino, sangue até ocasionar a morte do indivíduo (CDC, 2014; CDC, 2015; EFSA, 2014).

No Brasil, existem diversos cuidados, monitoramento e medidas de biossegurança para garantir a ausência dessas bactérias em criadouros. No entanto sempre há registros de surtos de salmonelose. Entre os anos 2000 a 2014 foram notificados 38,2 % casos de DTAs associados à *Salmonella* (BRASIL, 2014). *Salmonella* também é capaz de formar biofilmes e isso prejudica ainda mais a tentativa de aniquilar com esse microrganismo em ambientes alimentícios e hospitalares, pois a capacidade de formação desses biofilmes estende-se a

superfícies bióticas (plantas, células epiteliais) e abióticas (plástico, borracha, vidro) (LEWIS, 2001; STEENACKERS et al. 2012; O'LEARY et al., 2013).

Existem vários genes que garantem a virulência de *Salmonella* e estes podem ser cromossômicos e plasmidiais. Frequentemente esses genes encontram-se em regiões cromossômicas que recebem o nome de ilhas de patogenicidade em *Salmonella* (IPS) (FERREIRA E CAMPOS, 2008). Ao todo são 5 IPS, sendo que a IPS-1 é a mais conhecida e explorada. Sabe-se que existem genes *inv* (localizados na IPS-1) responsáveis pela invasão e infecção de *Salmonella* no epitélio intestinal (FERREIRA E CAMPOS, 2008).

Há ampla resistência da *Salmonella* com relação às inúmeras classes de antibióticos presentes no mercado como cloranfenicol (genes plasmidiais que codificam a produção de cloranfenicol-acetiltransferases e inativam o composto), sulfametoxazol-trimetoprim, ampicilina e amoxicilina (MEUNIER et al., 2002; DOUBLET et al., 2004; ALTERTHUM, 2008a; BRASIL, 2007;). Também já foram notificadas resistência frente às cefalosporinas de terceira geração e as fluoroquinolonas (FERREIRA E CAMPOS, 2008). Um relatório feito pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) apontou resistência de *Salmonella* isolada de carcaça de frango para estreptomicina (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%), ácido nalidíxico (44,0%), ceftiofur (22,8%), aztreonam (20,4%), enrofloxacina (18,4%), cefoxitina (17,3%), cefalotina (12,4%) e tetraciclina (11,2%) (BRASIL, 2012).

*Salmonella* possui um gene denominada *qnr* que lhe confere resistência às quinolonas pois garante a proteção da DNAGirase (GAY et al., 2006). Essas bactérias também possuem diversos tipos de genes que codificam  $\beta$ -lactamases, inclusive genes que codificam enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (BUSH, 2001; MICHAEL et al., 2006). Há registros, também, de resistência à ceftriaxona, devido a seu uso frequente na medicina veterinária (CARATTOLI et al., 2002). Outra resistência que é apresentada em *Salmonella* esta vinculada à gentamicina, uma vez que essa bactéria possui genes de resistência a ela (genes de N-acetiltransferase - *aac(3)* e *aac(6')*) (MICHAEL et al., 2006). Além disso, há resistência para as tetraciclinas, devido a presença de genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetG* (FRECH E SCHWARZ, 2000; MICHAEL et al., 2006). Também há resistência diante das sulfonamidas, utilizadas tanto na medicina humana quanto na veterinária, devido à presença de três genes, *sul1*, *sul2* e *sul3*, que codificam uma enzima para a via de síntese de ácido fólico (precursor de RNA e DNA) que não é inibida pelo antimicrobiano (RANDALL et al., 2004; LYNNE et al., 2008). Já existe resistência à fosfomicina através do gene *fosA3* (LIN E CHEN, 2015).

No geral, sugere-se que os genes foram adquiridos no processo evolutivo através de incorporação de material genético proveniente de outras bactérias (BERCHIERI JÚNIOR E FREITAS NETO, 2009).

As abordagens e estudos realizados com essas bactérias descritas deixa clara a extrema necessidade do desenvolvimento e síntese de novas classes que tenham potencial ação antimicrobiana, podendo evitar o aumento crescente da resistência bacteriana bem como de maiores prejuízos para os seres humanos e saúde pública.

# CAPÍTULO II

**CAPÍTULO II - Artigo publicado na MicrobiologyOpen - DOI: 10.1002/mbo3.683**

**1. INFORMAÇÕES DE APOIO**

Foi realizado um Screening geral inicial de compostos através do método de microdiluição Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA), de acordo com Palomino e colaboradores (2002) e também Martin et al. (2003). A Tabela 1 mostra a porcentagem de inibição de crescimento celular bacteriano testado através de REMA, quando adicionou-se 100 µg.mL<sup>-1</sup> de cada composto avaliado neste trabalho.

**Tabela 1.** Inibição de crescimento celular bacteriano para 100 µg.mL<sup>-1</sup> de composto

<b>Composto</b>	<i>X. citri</i> (%)	<i>B. subtilis</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)	<i>S. enterica</i> <i>Typhimurium</i> (%)	<i>E. coli</i> (%)	<i>S. aureus</i> (%)	<i>E. faecalis</i> (%)
<b>Cafeína</b>	0	8,0	Não testado	Não testado	27,89	3,30	53,68
<b>Rutina</b>	17,8	6,6	Não testado	Não testado	10,50	0,96	66,40
<b>Curcumina</b>	5,7	97,8	Não testado	64,80	66	94,86	52,46
<b>Umbeliferona</b>	0	12,1	Não testado	Não testado	34,08	3,05	31,28
<b>Morina</b>	0	7,8	Não testado	Não testado	18,31	2,92	70,44
<b>Crisina</b>	0	26,3	Não testado	Não testado	7,91	15,35	44,71
<b>Piperina</b>	46,3	5,8	Não testado	Não testado	0	0	59,74
<b>Quercetina</b>	1,8	68,4	Não testado	Não testado	57,91	26,66	40,88
<b>Cinamaldeído</b>	7,3	75,4	Não testado	Não testado	68,74	0	46,82
<b>AC-1</b>	5,6	76,3	8,7	67,1	0	6,5	62,4
<b>AC-2</b>	4,2	35,5	1,8	72,1	0	22,4	21,4
<b>AC-7</b>	33,8	4,6	9,0	69,6	7,5	8,7	43,7
<b>AC-8</b>	47,1	1,6	5,0	75,4	38,1	11,4	67,9
<b>AC-10</b>	6,21	18,4	1,6	72,8	0	0,8	69,5
<b>AC-12</b>	61,0	93,2	5,7	59	1,3	21,2	77,9
<b>AC-13</b>	8,6	17,8	0,4	61	2,4	11,7	0
<b>CH-1</b>	35,5	0	1,0	71,3	2,9	23,20	42,2
<b>CH-2</b>	33,2	0	2,40	37,9	1,6	39,52	62,4

<b>CH-3</b>	34,3	0	0,84	74,4	2,3	19,90	40,93
<b>CH-4</b>	5,6	5,6	5,06	69,9	0	19,46	68,05
<b>CH-6</b>	51,	0	0,87	64,1	11,7	22,63	0
<b>CH-7</b>	32,	2,3	3,73	60,9	1,9	9,58	72,2
<b>CH-10</b>	37,3	4,3	2,21	72,3	1,5	13,80	51,19
<b>CH-13</b>	18,6	29,3	4,61	73,7	0,9	3,39	69,46
<b>CH-14</b>	22,4	5,2	2,09	46,1	0,7	14,70	0
<b>CH-19</b>	65,2	0	3,79	71,3	2,2	6,13	0

A partir desse Screening observou-se que tanto os compostos naturais testados como os curcuminóides sintetizados pelo grupo, não foram eficazes contra *X. citri* e nenhum outro patógeno de interesse clínico. Apenas a curcumina, composto natural, precursor dos curcuminóides, bem como **AC-12**, um de seus análogos apresentaram porcentagem de inibição de crescimento celular acima de 90% para *B. subtilis*. A partir daí nosso grupo objetivou investigar, detalhadamente, o modo e alvo de ação de **AC-12** comparado a curcumina em *B. subtilis* que gerou a publicação do artigo em anexo.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs : Rapid, Simple, and Inexpensive Method. **Antimicrob Agents Chemother** 47 (11), 3616–3619, 2003.
- PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobail Agents Chemother**. 46(8), 2720–2722, 2002.

### **3. ANEXO**

**ARTIGO PUBLICADO NA MICROBIOLYOPEN**

## ORIGINAL ARTICLE

# A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*

Luana G. Morão<sup>1\*</sup> | Carlos R. Polaquini<sup>2\*</sup> | Malgorzata Kopacz<sup>3</sup> |  
 Guilherme S. Torrezan<sup>2</sup> | Gabriela M. Ayusso<sup>2</sup> | Guilherme Dilarri<sup>1</sup> | Lúcia B. Cavalca<sup>1</sup> |  
 Aleksandra Zielińska<sup>3</sup> | Dirk-Jan Scheffers<sup>3</sup>  | Luis O. Regasini<sup>2</sup> |  
 Henrique Ferreira<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brazil

<sup>3</sup>Department of Molecular Microbiology, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

**Correspondence**

Luis O. Regasini, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil.  
 Email: regasini@ibilce.unesp.br and Henrique Ferreira, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil.  
 Email: henrique.ferreira@linacre.oxon.org

**Funding information**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2013/50367-8 and FAPESP 2014/18330-0; Netherlands Organization for Scientific research, Grant/Award Number: 729.004.005; INCT Citros, Grant/Award Number: 2014/50880-0 and 465440/2014-2

**Abstract**

Curcumin is the main constituent of turmeric, a seasoning popularized around the world with Indian cuisine. Among the benefits attributed to curcumin are anti-inflammatory, antimicrobial, antitumoral, and chemopreventive effects. Besides, curcumin inhibits the growth of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. The anti-*B. subtilis* action happens by interference with the division protein FtsZ, an ancestral tubulin widespread in *Bacteria*. FtsZ forms protofilaments in a GTP-dependent manner, with the concomitant recruitment of essential factors to operate cell division. By stimulating the GTPase activity of FtsZ, curcumin destabilizes its function. Recently, curcumin was shown to promote membrane permeabilization in *B. subtilis*. Here, we used molecular simplification to dissect the functionalities of curcumin. A simplified form, in which a monocarbonyl group substituted the  $\beta$ -diketone moiety, showed antibacterial action against gram-positive and gram-negative bacteria of clinical interest. The simplified curcumin also disrupted the divisional septum of *B. subtilis*; however, subsequent biochemical analysis did not support a direct action on FtsZ. Our results suggest that the simplified curcumin exerted its function mainly through membrane permeabilization, with disruption of the membrane potential necessary for FtsZ intra-cellular localization. Finally, we show here experimental evidence for the requirement of the  $\beta$ -diketone group of curcumin for its interaction with FtsZ.

**KEYWORDS**

antibacterial compound, cell division, membrane permeabilization, turmeric

## 1 | INTRODUCTION

Molecular simplification is a strategy used for the discovery and development of new drugs based on bioactive natural products exhibiting complex molecular structures or toxic groups. The concept of

molecular simplification is related to the withdrawal of functional groups from prototype molecules, while keeping or enhancing desirable bioactivity. Lidocaine, for example, is a simplified form of cocaine that retains the local anesthetic properties without the narcotic side effects (Gordh, 2010). Phenetidine is a simplified morphine,

\*These authors contributed equally to this study.

which has demonstrated similar analgesic activity (Janssen & van der Eycken, 1968). The molecular simplified analogue of quinine, mefloquine, exhibits potent antimalarial action, and is also effective against resistant strains of *Plasmodium* (Grigg et al., 2016; Murray & Perkins, 1996). Finally, the analogue designed by the molecular simplification of piperlongumine, a natural alkaloid, is more active and selectively cytotoxic against breast cancer cells than the prototype molecule (Valli et al., 2017).

Curcumin (1) is a diphenolic compound extracted from the rhizomes of *Curcuma longa*, which exhibits a large range of bioactive properties that include antifungal, antiviral, and anticancer activities (Chen et al., 2016; Di Martino et al., 2017; Kumar et al., 2014). The antibacterial activity of curcumin and its natural and synthetic analogues has been extensively revised by Moghadamtousi et al. (2014). However, our main interest in curcumin relates to its ability to inhibit bacterial cytokinesis (Kaur, Modi, Panda, & Roy, 2010; Rai, Singh, Roy, & Panda, 2008). Division in bacterial cells requires the proper assembly of a septal structure, the Z-ring, which has as main constituent the tubulin-like protein FtsZ (Lutkenhaus, 2007). FtsZ has a pivotal function during this process, as it acts as a division scaffold and recruits several other cellular factors that assemble the divisome (the protein complex operating on cell division) (Hurley et al., 2016; Xiao & Goley, 2016). FtsZ polymerizes in a GTP-dependent manner into protofilaments that associate to compose the Z-ring at the site of division. Curcumin was shown to inhibit the assembly of FtsZ protofilaments in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), where it exerts its function by stimulating the GTPase activity of FtsZ (Rai et al., 2008).

Another function that has been attributed to curcumin is the ability to modify lipid bilayers, which may consequently alter the function of membrane proteins (Hung et al., 2008; Ingolfsson, Koeppe, & Andersen, 2007). Supporting this, curcumin I, the main constituent of the seasoning turmeric, was found to permeabilize bacterial membranes (Tyagi, Singh, Kumari, Kumari, & Mukhopadhyay, 2015). The pool of biological properties of curcumin has been recognized as pan-assay interference compound (PAIN) and invalid metabolic panacea (IMP) (Nelson et al., 2017). These classifications are attributed to prototypes that exhibit poor performance as lead compounds due to their activities in various biological assays in which they may interfere with the assay reading rather than displaying a specific interaction with a target. Among the functionalities of the curcumin structure, the  $\beta$ -diketone moiety seems to be related to the PAIN and IMP behaviors, especially by metal chelation and structural decomposition (Hampannavar, Karpoomath, Palkar, & Shaikh, 2016; Heger, van Golen, Broekgaarden, & Michel, 2014). Taking this into account, we designed and synthesized a simplified analogue of curcumin (2) in which a monocarbonyl group replaced

the  $\beta$ -diketone, while preserving both double bonds, as well as the vanillyl moieties (Figure 1). The antibacterial activity of 2 and its analogues (compounds 3–8) were evaluated against a panel of gram-positive and gram-negative bacteria. Compound 2 was active against the plant pathogen *Xanthomonas citri* (*X. citri*), the clinically relevant strains *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (*S. enterica*) and *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), and the gram-positive bacterial model *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Moreover, 2 was able to disrupt the divisome of *B. subtilis*; however, further biochemical analysis did not support a direct and/or specific action on FtsZ. Finally, our data support the view that 2 exerts its function against *B. subtilis* by membrane pore formation, which suggests that the  $\beta$ -diketone moiety is required for the interaction of curcumin and FtsZ.

## 2 | RESULTS

### 2.1 | Synthesis and $^1\text{H}$ NMR spectrum data of simplified curcumin (2) and its analogues (3–8)

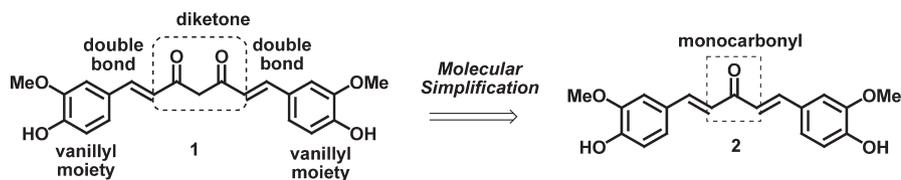
Synthesis of 2 and its analogues (3–8) was achieved by the reaction between the respective benzoic aldehydes and acetone. Analogues of 2 bearing phenyl rings symmetrically substituted by halogens ( $-\text{F}$  and  $-\text{Br}$ ) and electron-donating [ $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  and  $-\text{OCH}_3$ ] substituents were synthesized, with yields ranging from 61% to 87% (Figure 2). The structure of 2–8 was identified by  $^1\text{H}$  NMR spectrum data analyses. The most characteristic signals observed in the  $^1\text{H}$  NMR spectra were those of the olefinic double bond hydrogen, which were present as a pair of doublets with coupling constants ranging from 15.6 to 16.2 Hz, indicating the *trans* configuration. For all the compounds, NMR parameters corresponded with the proposed structures.

(1E,4E)-1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (2): Yellow solid. 68% yield.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (mult.; J in Hz): 7.70 (d; 16.2; H- $\beta$ ), 7.21 (dd; 2.4 and 8.4; H-6), 7.14 (d; 2.4; H-2), 6.97 (d; 8.4; H-5), 6.96 (d; 16.2; H- $\alpha$ ), 5.95 (br s; 4-OH), 3.98 (s; 3-OCH<sub>3</sub>).

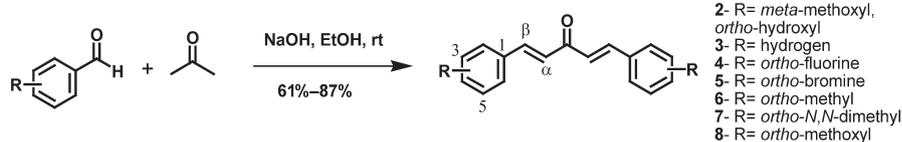
(1E,4E)-1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one (3): Yellow solid. 61% yield.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (mult.; J in Hz): 7.77 (d; 15.6; H- $\beta$ ), 7.65 (dd; 1.8 and 6.6; H-2 and H-6), 7.45 (m; H-3, H-4 and H-5), 7.12 (d; 15.6; H- $\alpha$ ).

(1E,4E)-1,5-bis(4-fluorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (4): Yellow solid. 84% yield.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (mult.; J in Hz): 7.73 (d; 15.6; H- $\beta$ ), 7.64 (d; 8.4; H-2 and H-6), 7.14 (dd; 8.4 and 9.0; H-3 and H-5), 7.02 (d; 15.6; H- $\alpha$ ).

(1E,4E)-1,5-bis(4-bromophenyl)penta-1,4-dien-3-one (5): Yellow solid. 75% yield.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (mult.; J in Hz): 7.69



**FIGURE 1** Curcumin (1) and its simplified analogue (2)

**FIGURE 2** Synthesis of simplified curcumin (2) and its analogues (3–8)**TABLE 1** Antibacterial activity of simplified curcumin and its analogues

	Bacteria	Compound (100 µg/mL) Percentage of growth inhibition <sup>a</sup>							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Gram-negative	<i>Xanthomonas citri</i> IBSBF-1594	<10	61	<10	<10	<10	34	47	<10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	67	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium ATCC13311	66	59	67	72	61	70	75	73
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	65	<10	<10	<10	<10	<10	38	<10
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	95	21	<10	22	12	<10	11	<10
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	52	78	62	21	<10	44	68	70
	<i>Bacillus subtilis</i> Strain 168	98	93	78	35	18	<10	<10	19

<sup>a</sup>Growth inhibition is inversely proportional to the amount of resazurin reduced by NADH to resorufin, where 100% reduction means no growth inhibition.

(d; 15.6; H- β), 7.58 (d; 8.4; H-2 and H-6), 7.50 (d; 8.4; H-3 and H-5), 7.07 (d; 15.6; H-α).

(1E,4E)-1,5-bis(4-methylphenyl)penta-1,4-dien-3-one (6): Yellow solid. 63% yield. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (mult.; J in Hz): 7.74 (d; 16.2; H- β), 7.55 (d; 8.4; H-2 and H-6), 7.25 (d; 8.4; H-3 and H-5), 7.07 (d; 16.2; H- α), 2.42 (s; 4-CH<sub>3</sub>).

(1E,4E)-1,5-bis(4-(dimethylamino)phenyl)penta-1,4-dien-3-one (7): Red solid. 87% yield. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (mult.; J in Hz): 7.71 (d; 16.2; H- β), 7.54 (d; 9.0; H-2 and H-6), 6.92 (d; 16.2; H- α), 6.72 (d; 9.0; H-3 and H-5), 3.06 (s; 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

(1E,4E)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (8): Yellow solid. 74% yield. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (mult.; J in Hz): 7.73 (d; 16.2; H- β), 7.60 (d; 8.4; H-2 and H-6), 6.98 (d; 16.2; H- α), 6.96 (d; 8.4; H-3 and H-5), 3.88 (s; 4-OCH<sub>3</sub>).

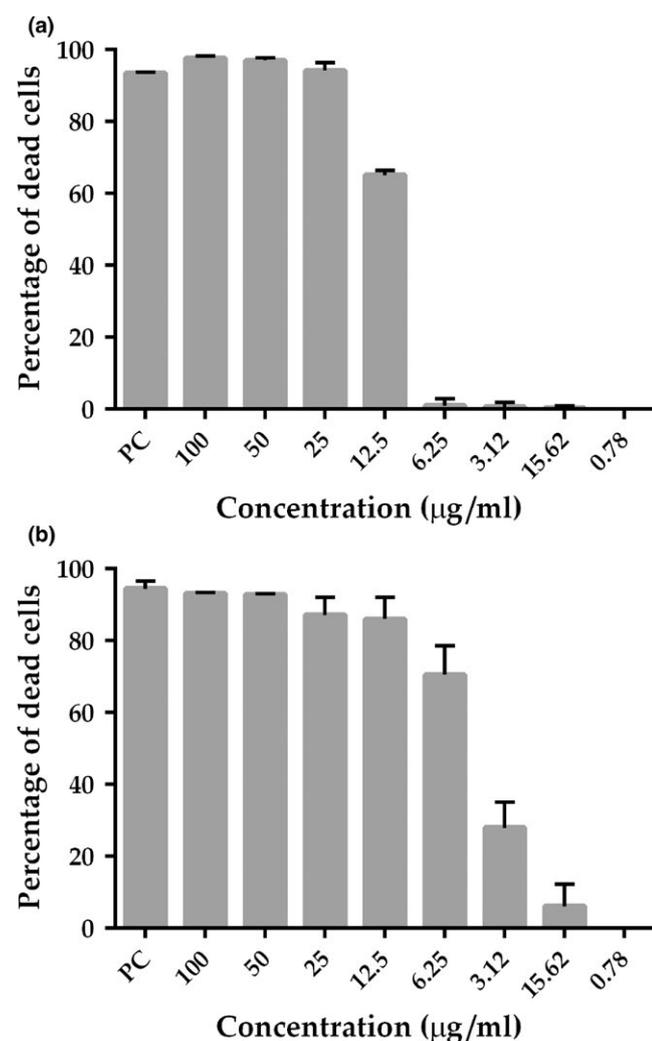
## 2.2 | Preliminary screening of the antibacterial activity of 2 and its analogues

The antibacterial activities of the compounds 1 (curcumin) and 2–8 were evaluated against a panel of gram-positive and gram-negative bacteria using *resazurin* microtiter assay plate (REMA), an assay that measures the cell respiratory activity by the indirect detection of NADH production. In order to guarantee a fair comparison among the tests (number of cells exposed/concentration of compound), the amount of cells was standardized to 10<sup>5</sup> and the

concentration of each of the compounds under analysis was fixed at 100 µg/mL. Curcumin (1) was active against six of seven bacteria tested, except for the plant pathogen *X. citri*. The percentage of growth inhibition caused by 1 for those affected varied from 52% to 98% (Table 1; growth inhibition was determined as a diminished percentage of resazurin reduction to its fluorescent form resorufin when comparing untreated and treated cells). Besides, 1 was more active against the gram-positive strains *S. aureus* and *B. subtilis*, reaching inhibition levels of more than 90% at the concentration of 100 µg/mL. When we consider the simplified forms derived from 1, two important human pathogens, *S. enterica* and *E. faecalis*, were the preferred targets. *S. enterica* was the most sensitive strain being inhibited by all of the compounds tested (2–8) with percentages of inhibition varying from ~60% to 75%. Next, *E. faecalis* was inhibited by four of seven compounds (2, 3, 7, and 8) and displayed a growth inhibition ranging from 62%–78%. Noteworthy, compound 2 was the only one to inhibit the phytopathogen *X. citri*, the etiological agent of citrus canker, which is a severe disease that affects citrus plants worldwide. Compound 2 was active against four different species, two gram-negative and two gram-positive, considering the inhibition level of ~60% or above. Additionally, 2 inhibited growth of nearly 80% of *E. faecalis*, an important human pathogen with documented resistance to diverse antibiotics, and more than 90% of *B. subtilis*. Therefore, compound 2 was chosen for further characterization.

### 2.3 | Activity of 2 against *B. subtilis*

In order to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of 2 against *B. subtilis*, we exposed this bacterium to various concentrations of the compound and measured the cell respiratory activity using REMA. The concentration window analyzed varied from 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to approximately 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . We detected clear concentration–response patterns for both compounds (1 and 2), and the decays of activity started approximately at the concentrations of 12.5 and 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively (Figure 3a,b). It was observed that, at least for compound 2 (3B), the following concentrations (~3–0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) induced less inhibition with a soft decline. Subsequently, polynomial regression was used to perform fit to the data, which enabled us to determine the MIC<sub>90</sub> of 12.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and MIC<sub>50</sub> of 5.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 2, and the MIC<sub>90</sub> of 24.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and MIC<sub>50</sub>



**FIGURE 3** Growth inhibition profile of *B. subtilis* treated with compounds 1 and 2. Bacterium was exposed to different concentrations of the compounds 1 (a) and 2 (b) (x-axis) and the percentages of growth inhibition were plotted as vertical bars (y-axis). Bars represent the average value derived from three independent experiments; standard deviation is depicted above each bar. PC, positive control kanamycin at 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$

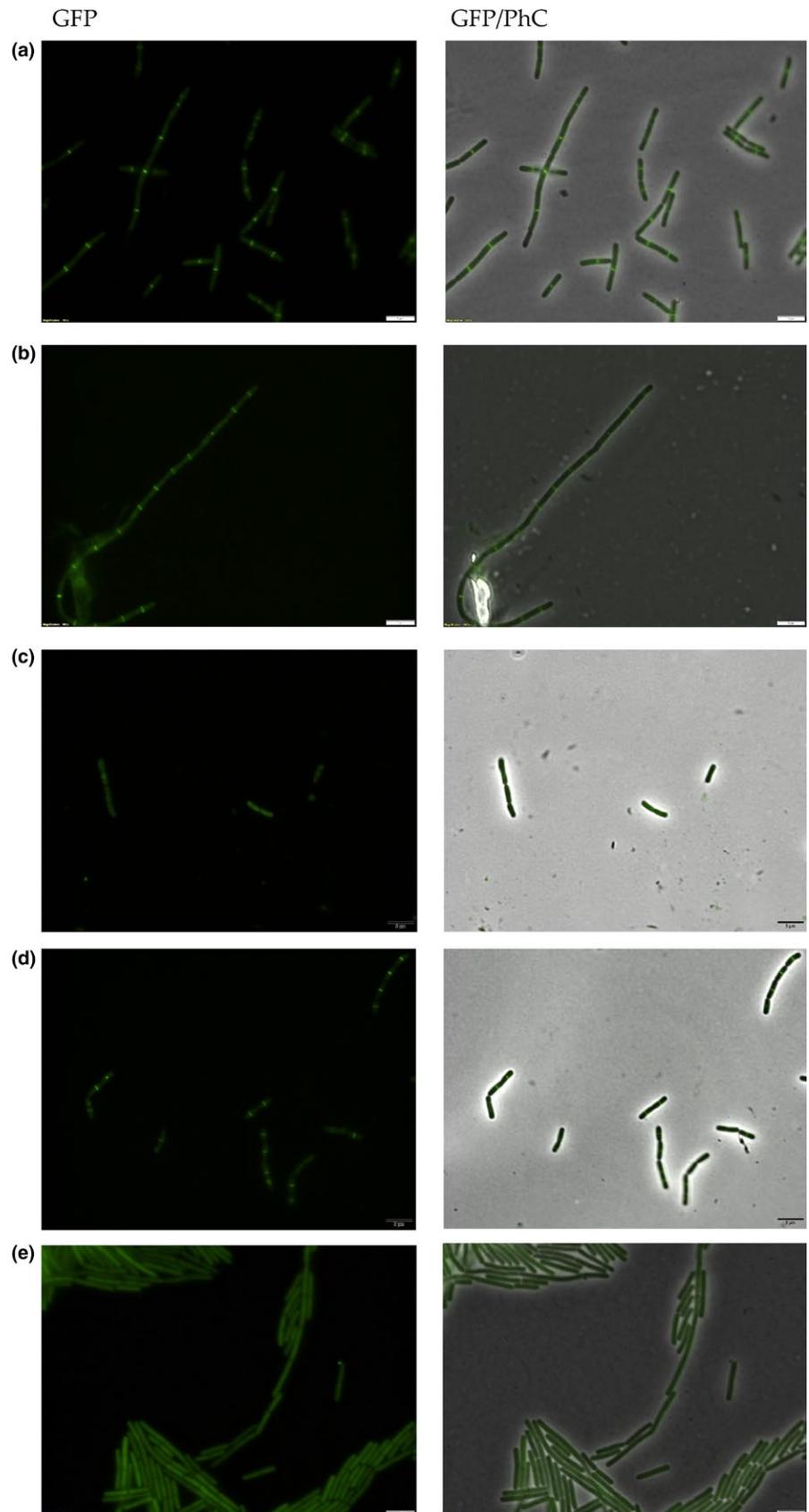
of 11.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 1. Therefore, compound 2 displayed a MIC<sub>90</sub> that was nearly two times more potent than curcumin, from which it derives. To evaluate if 1 and 2 had bacteriostatic or bactericidal action, aliquots of cell suspensions were collected during REMA and plated in LB medium to check for cell viability. The samples were collected after the exposure to the compounds and before resazurin was added. As a result, colony development was observed for all of the concentrations tested, including those where REMA indicated nearly 100% of cell growth inhibition (above 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Therefore, both compounds, 1 and 2, have bacteriostatic action against *B. subtilis* at the concentration range analyzed.

### 2.4 | Disruption of the divisional septum of *B. subtilis*

Curcumin (1) has been implicated in the inhibition of the FtsZ-ring formation in *B. subtilis* (Rai et al., 2008). As 2 is an analogue of 1, we wondered if this compound could perturb the divisional septum of *B. subtilis* as well. To evaluate this, a *B. subtilis* strain expressing FtsZ-GFP (labeled for the divisional septum) was cultivated in LB, and then diluted in fresh medium so to give a final concentration of  $10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , which is the same concentration used in REMA. Cells were then exposed to 1 and 2 for up to 30 min, which corresponds to nearly a doubling time of *B. subtilis*, followed by microscopic observations at every 5 min (Figure 4). In panel A (GFP and GFP/PhC merged), we observed the standard pattern of septation (untreated cells), here represented by a bright bar, perpendicular to the long axis of the rods, which is formed by FtsZ-GFP. The septa here occupy the central portion of the cells under division. For the culture treated with 1% Dimethyl sulfoxide (DMSO), the vehicle in which 1 and 2 were dissolved, the same pattern was documented without any disruption of the divisome (Figure 4b). In agreement with data from Rai et al. (2008), exposure of *B. subtilis* to 1 at MIC<sub>90</sub> led to a complete dissolution of the septa after 15 min, with the concomitant accumulation of FtsZ-GFP fluorescence in the cytoplasm of the cells (Figure 4c). Noteworthy, compound 2 lost the ability to target the divisional septum, even after a longer incubation period of 30 min (Figure 4d). Here the septa are practically identical to the untreated control (compare Figure 4a and d). However, extending the incubation time with 2 for 90 min led to a complete disruption of the septal structures, which was comparable to the treatment with 1 (compare Figure 4c with e). Although 90 min of exposure to the compound may be considered too long, one could argue that 2 may have residual action on septum, specially considering the fact that the cells in panel 4E have no clear sign of morphological damage and/or stress.

### 2.5 | Assaying the interference of the simplified curcumin on the FtsZ polymerization dynamics

Disruption of the divisional septum in *B. subtilis* could be a consequence of direct action of 2 on the bacterial tubulin protein FtsZ and/or other proteins or cellular structures that stabilize and modulate the assembly of the septum. FtsZ is a GTPase that polymerizes



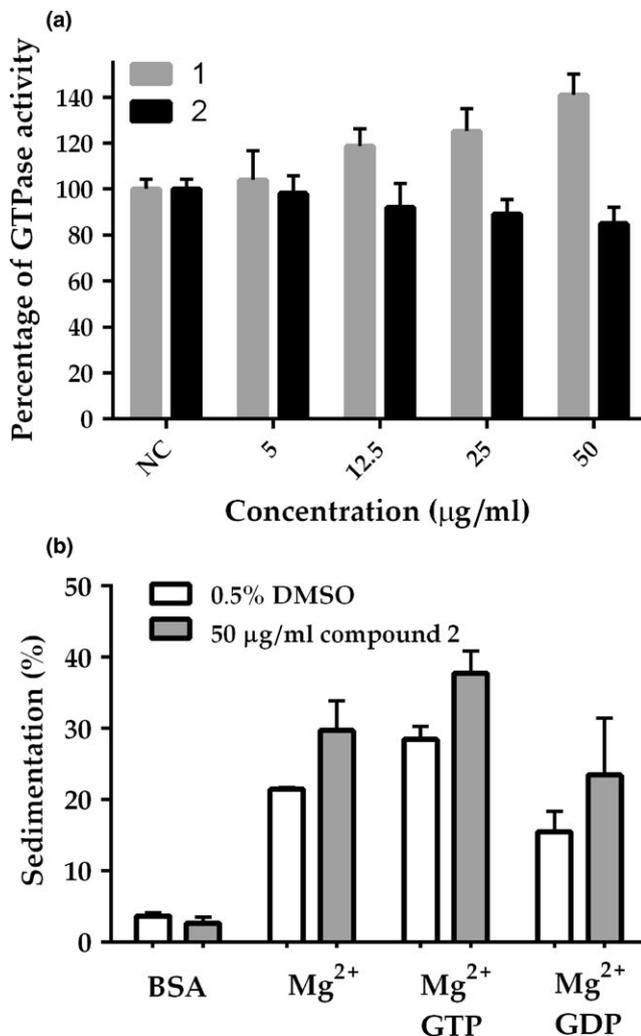
**FIGURE 4** Septum disruption in *B. subtilis*. *B. subtilis* expressing FtsZ-GFP was cultivated in LB until the OD<sub>600</sub> nm of ~0.4; cultures were diluted to 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>, and exposed to the test compounds at MIC<sub>90</sub>. (a) Cells cultivated in LB; (b) LB + 1% DMSO; (c) cells after 15 min of exposure to 1; (d) 30 min of exposure to 2, and (e) 90 min of exposure to 2. GFP/PhC, phase contrast images superimposed on GFP fluorescence images. Magnification 100×; bar, 5 μm

into protofilaments in the presence of magnesium and both nucleotide cofactors GTP or GDP (Erickson, Anderson, & Osawa, 2010), and is the main scaffold protein of the bacterial septum. The

possible interference of 2 was investigated using *B. subtilis* FtsZ and a polymerization/associated GTP hydrolysis assay (Król et al., 2015). Incubation of FtsZ with a concentration of 2 equivalent to

the MIC90 (12.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) led to 16% inhibition of the GTPase activity (Figure 5a; compare the black bars at NC and 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). When the concentration of 2 was increased fourfold (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the inhibition doubled and reached 35%, which does not appear to be consistent with a specific action of 2 on the GTPase activity of FtsZ. The same set of experiments was conducted using compound 1, and, in accordance with data from Rai et al. (2008), we documented an increase in the GTPase activity of FtsZ as the concentration of 1 was raised (Figure 5a, gray bars).

Even though 2 does not seem to interfere significantly with the GTPase activity of FtsZ, this compound could somehow preclude FtsZ dynamics by interfering with polymerization and/or bundling

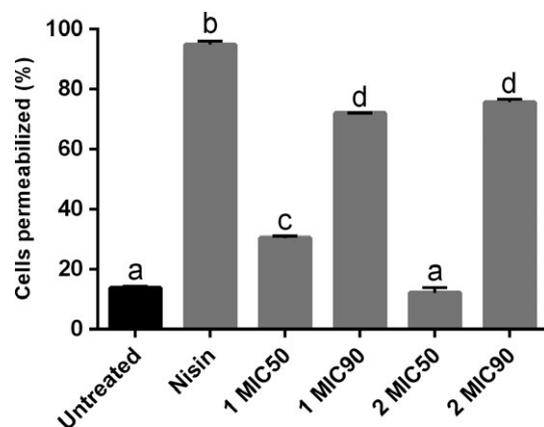


**FIGURE 5** FtsZ GTPase activity and sedimentation dynamics. (a) The GTPase activity of *B. subtilis* FtsZ was evaluated using different concentrations of 1 and 2 (5–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), or the vehicle DMSO at 0.5% (NC). Bars represent average values derived from three independent experiments; standard deviation values are depicted as vertical lines above the bars. (b) Sedimentation of FtsZ: *B. subtilis* FtsZ was incubated with 2 at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  prior to polymerization at 30°C, which started by adding nucleotides. Bars represent average values of FtsZ sedimentation (calculated from the pellet fraction in SDS-PAGE) derived from two independent experiments; standard deviation is depicted above the bars

of the FtsZ protofilaments. These possibilities were investigated through sedimentation analyses, where FtsZ was exposed to 2 at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  before GTP and GDP were added. Polymerization was initiated by the nucleotide incorporation into the reaction and measured by the determination of the amount of FtsZ recovered in the pellet after centrifugation (Figure 5b). Bovine serum albumin (BSA) was included as a control for aspecific protein aggregation, which would also result in sedimentation. Treatment with 2 and GTP led to a nearly 40% of FtsZ recovered in the pellet. The sedimentation observed with 2 was not significantly different from the sedimentation documented in the presence of DMSO, although 2 did seem to slightly increase the amount of FtsZ recovered. This could be indicative of an increased bundling, that in turn may influence the GTPase activity. BSA did not sediment, indicating that 2 did not cause aspecific protein aggregation.

## 2.6 | Simplified curcumin acts on the membrane of *B. subtilis*

Tyagi et al. (2015) recently reported that curcumin I, the most active constituent of turmeric, has biological activity against *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, and they also showed that, at least regarding *E. coli* and *S. aureus*, curcumin I exerts its action by disrupting the membrane potential. As membrane potential seems to be necessary for the localization of factors such as FtsZ (Strahl & Hamoen, 2010), compound 2 could be disrupting the *B. subtilis* divisional septum by perturbing its membrane integrity. To collect supportive evidence for this, *B. subtilis* strain 168 cells ( $10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were exposed to 1 and 2 at MIC50 and MIC90 for 30 min, and stained afterward with the fluorescent dyes SYTO 9 and propidium iodide (PI). These dyes allow the identification of cells with intact and compromised membranes, respectively (Figure 6). In our experiments, untreated cultures normally exhibit ~15% of the cells permeable to PI (untreated). Treatment with 1% DMSO (not shown) essentially resulted in the same pattern observed for the untreated culture. This contrasted sharply with the results of exposure of *B. subtilis* to Nisin (our positive control), a lantibiotic able to form transmembrane pores and to induce high PI intake, affecting almost 100% of the cells (Figure 6). Treatment of the cells with 1 at MIC50 practically doubled the amount of cells compromised when compared with the untreated culture. By increasing the concentration of 1 to MIC90, the extent of cells affected became even more pronounced, reaching ~70% of the cells. Compound 2, on the other hand, had no effect at MIC50, in which the percentage of cells with compromised membranes was practically the same as the untreated. However, by increasing the concentration of 2 to the MIC90, there was a significant increase in PI intake, with the compound affecting ~70% of the cells. Notably, compound 2, at MIC90, was as effective as 1 to induce PI intake in the time-frame evaluated. In summary, both compounds, 1 and 2, had the ability to target the bacterial membrane, and, judging by the fact that 2 had little influence on the GTPase activity and sedimentation dynamics of purified FtsZ, our data suggest that the primary target of compound 2 is the bacterial membrane.

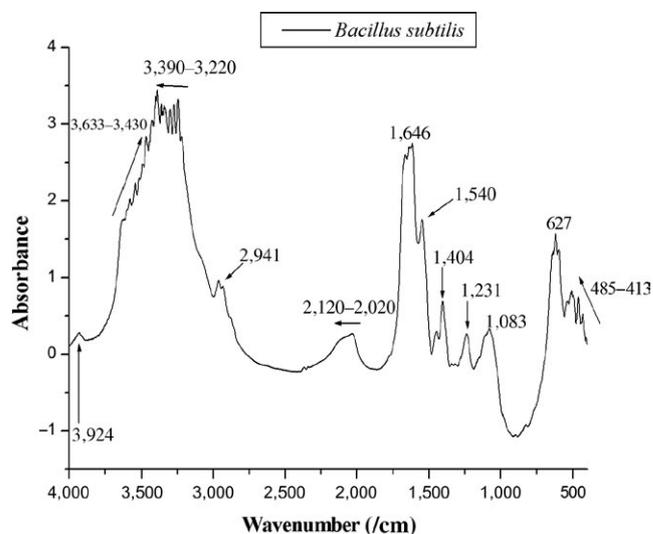


**FIGURE 6** Membrane permeabilization in *B. subtilis*. Bacterium was exposed to 1 and 2 at MIC50 and MIC90 for 30 min. The percentage of cells with membrane permeabilization is plotted as vertical bars (y-axis), which represent the average values derived from three independent experiments (in each experiment the number of cells counted was of ~150;  $n = 450$ ); standard deviation is depicted above each bar. The letters above the bars indicate significant difference among treatments

## 2.7 | FT-IR spectrophotometry

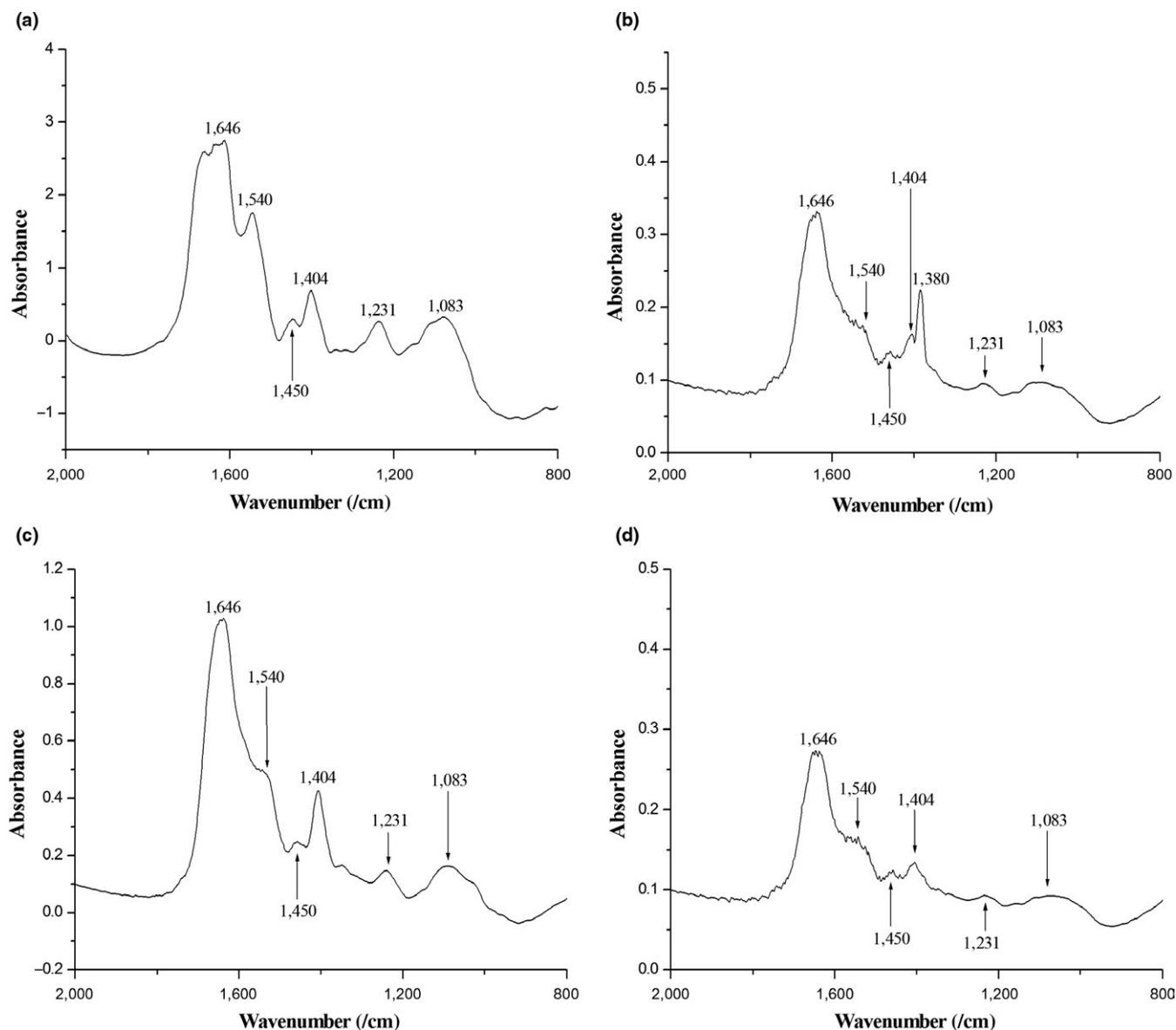
To investigate the extent of interference 2 might have on the surface of the cells, we employed FT-IR, a technique potentially able to show perturbations of diverse chemical structures. First, we analyzed the FT-IR spectrum of untreated *B. subtilis* (Figure 7). According to the literature (Garip, Gozen, & Severcan, 2009), typical bands of the *Bacillus* spectrum could be detected in the regions 1083, 1231, 1540, and 1646  $\text{cm}^{-1}$ . These peaks represent stretching of C–O bonds found in glycogen (1083  $\text{cm}^{-1}$ ), and  $\text{PO}_2^-$  groups belonging to the structural phospholipids of the cytoplasmic membrane (1231  $\text{cm}^{-1}$ ). The vibrations of N–H bonds and stretching of the C–N bond belonging to the amide II found in alpha helices of proteins are seen in the 1540  $\text{cm}^{-1}$  region, and the stretching of the C=O bond of amide I, also belonging to alpha helices, is identified at peak 1646  $\text{cm}^{-1}$ . The peak 1404  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to vibrations of sulfonic groups present in various structures of the bacterial cell wall. Vibrations in the regions 3390–3220 and 3633–3430  $\text{cm}^{-1}$  are presumed to be residual groups of hydroxyl and amine on the surface of the bacterial biomass. Peaks 2941, 3924, 627, and 485–413  $\text{cm}^{-1}$  are residues of  $\text{-CH}_3$ , O–H, and free amine groups. Finally, the band 2120–2020  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the  $\text{CO}_2$  from the air. This technique is useful to perform a general reading of the cells, allowing us to mark regions and peaks representing some particular structures. Therefore, any change in a particular peak may be an indication of modification of the original bacterial structure related to that peak (Vishu Kumar, Varadaraj, Gowda, & Tharanathan, 2005).

The region comprised between 4000 and 2000  $\text{cm}^{-1}$  represents free amine groups, carbon dioxide from the air, and hydroxyl groups from the bacterial surface. The same is true for the region 800–400  $\text{cm}^{-1}$ , being also associated with free amine



**FIGURE 7** FT-IR spectrum of untreated cells of *B. subtilis*

residues and carbon groups from the bacterial surface. For this reason, we concentrated our observations in the spectra ranging from 2000 until 800  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 8a–d), considered the fingerprint region (Jebsen et al., 2012). When we compared the spectra of *B. subtilis* before and after contact with 2 (compare a and b), we identified a decrease in intensity of peaks 1646 and 1540  $\text{cm}^{-1}$ , which are associated with alpha helix and amide II of proteins. Other peaks that almost disappeared from the spectrum were 1450, 1404, 1231, and 1083  $\text{cm}^{-1}$ , associated with lipids from the cytoplasmic membrane (1450  $\text{cm}^{-1}$ ), sulfonic groups from the bacterial cell wall (1404  $\text{cm}^{-1}$ ), phospholipids from the cytoplasmic membrane (1231  $\text{cm}^{-1}$ ), and glycogen (1083  $\text{cm}^{-1}$ ). Exposure to 2 led to the detection of a new peak (1380  $\text{cm}^{-1}$ ) belonging to the vibrations of  $\text{COO}^-$  groups related to fatty acids (Figure 8b). This new finding may be associated to the fragmentation of lipids from the bacterial cell as a consequence of exposure to the compound. The FT-IR spectrum of *B. subtilis* exposed to 1 was very similar in shape to the spectrum of untreated cells (compare a and c), although with an overall lower intensity. This suggests that 1 is not affecting or modifying structures of the bacterial cell that could be captured by this technique, which consequently reinforces the view that the mechanism(s) of action of 1 differ(s) from 2. Noteworthy, the FT-IR spectrum of *B. subtilis* exposed to nisin, known to form pores on the bacterial membrane (Wiedemann, Benz, & Sahl, 2004), displayed changes resembling those induced by 2 (compare a with b and d). The peaks 1646 and 1540  $\text{cm}^{-1}$  showed lower intensity as well as noise along the band; the same pattern was seen for peaks 1450 and 1404  $\text{cm}^{-1}$ . Finally, peaks 1231 and 1083  $\text{cm}^{-1}$  virtually disappeared from the spectrum of nisin, a result also observed after exposure to 2 (compare b and d). As the above-mentioned regions (1646 and 1540, 1646 and 1540, and 1231 and 1083  $\text{cm}^{-1}$ ) are associated with structures mainly found in the cytoplasmic membrane, the FT-IR data reinforced our suggestion that 2 is targeting the bacterial membrane.



**FIGURE 8** FT-IR spectra of *B. subtilis* exposed to 1 and 2. (a) untreated cells of *B. subtilis*; (b) *B. subtilis* after contact with 2 at MIC90; (c) 1 at MIC90 and (d) nisin at 5 µg/mL

### 3 | DISCUSSION

Curcumin (1) is the active constituent of turmeric, a seasoning with a long history of use in popular medicine (Goel, Kunnumakkara, & Aggarwal, 2008). Among the benefits that have been attributed to 1, the antibacterial action was the focus of our studies. Besides, we wanted to investigate the functional group(s) of 1 that are involved with the action it exerts on the bacterial division protein FtsZ (Rai et al., 2008). FtsZ is an ancient tubulin widespread in *Bacteria*. Subunits of FtsZ associate in a GTP-dependent manner to form polymers, which subsequently bundle to form the Z-ring, a ring-like structure that coordinates the bacterial cell division (Hurley et al., 2016; Lutkenhaus, 2007; Xiao & Goley, 2016). In the recent years, FtsZ has become a target for the development of antibacterial compounds. Among the reasons for that we cite its low homology in primary

sequence to tubulins of derived eukaryotes, allied to the fact that FtsZ is well conserved throughout *Bacteria* (Hurley et al., 2016; Lock & Harry, 2008; Lowe & Amos, 1998). Such characteristics may represent low(er) toxicity for eukaryotes and larger spectra of action of the FtsZ inhibitors. Rai et al. (2008) reported that 1 inhibits the assembly of FtsZ protofilaments, and stimulates the GTPase activity of the protein. Authors also determined the dissociation constant of 1 to FtsZ (~7 µM), which was considerably low denoting specific binding. In our microscopic analyses, compound 2, a derivative of 1, had only a minor effect on the divisome of *B. subtilis*. In addition, 2 was able to permeabilize the bacterial membrane, an activity also documented for 1 (Figure 6). However, subsequent biochemical characterizations did not support an specific action of 2 on the cell division protein FtsZ. Compound 2 showed only a slightly inhibition of the GTPase activity of *B. subtilis* FtsZ, with a slight interference in FtsZ

sedimentation. Our results suggest that disruption of cell division by **2** was probably an indirect consequence of perturbations of the bacterial membrane potential, which is known to interfere with the localization of FtsZ (Strahl & Hamoen, 2010).

To further explore the possible sites of action of **2**, *B. subtilis* was exposed to **1** and **2**, as well as to nisin, and after that analyzed using FT-IR. The reasoning here was that FT-IR, a technique that can potentially show perturbations of several chemical structures, could document alterations induced by the compounds at the surface of the cells. Overall, FT-IR spectra of the *B. subtilis* exposed to **2** showed reduction in intact cells in the samples. In addition, our results suggest that the perturbation caused by **2** seems to take place mainly at the component structures of the cytoplasmic membrane. Compound **1** did not induce detectable alterations on the FT-IR spectrum of *B. subtilis*, which is in agreement with its suggested mode of action: perturbation of the bacterial cell division (Rai et al., 2008). Notably, nisin, a lantibiotic that targets the bacterial membrane producing pores (Wiedemann et al., 2004), induced similar FT-IR spectral alterations as **2** (Figure 8b,d). Altogether, the FT-IR spectra were capable of pinpointing chemical structures perturbed in the cells upon exposure to **2**. Moreover, the altered regions correspond to chemical structures or cellular components that are part of the cytoplasmic membrane, seemingly the primary target of **2**.

Molecular simplification is a powerful tool that enables the identification of functionality groups within bioactive compounds. This technique applied to **1** seems to have allowed us to discriminate between two of its functionalities: while **1** targets FtsZ and the membrane (Rai et al., 2008; Tyagi et al., 2015), compound **2** targets the membrane more prominently (Figures 5 and 6). In the present work, a set of seven compounds were generated in which the  $\beta$ -diketone of **1** was replaced by a monocarbonyl group (Figure 1), whereas their phenyl rings carry symmetric halogens (-F and -Br) or electron-donating substituents [-CH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and -OCH<sub>3</sub>] (Figure 2). Kaur et al. (2010) used *in silico* molecular docking to tentatively identify the interaction between **1** and FtsZ from *E. coli* and *B. subtilis*. Based on their model, the  $\beta$ -diketone portion of **1** interacts with the Glycine residues 21 and 22 of *B. subtilis*-FtsZ, and with the Glycine residues 20, 21, and 109 of *E. coli*-FtsZ. Therefore, our results give experimental support for their model in which the presence of the monocarbonyl group replacing the  $\beta$ -diketone may have changed the FtsZ binding properties of **2**. In addition, our data shows that the  $\beta$ -diketone group is not required for membrane targeting.

The derived form **2** was further modified into compounds **3–8** and their antibacterial properties were assessed using a panel of bacterial isolates of clinical interest, as well as a plant pathogen. The series **2–8** was noticeably effective against *S. enterica* sorovar Typhimurium, a model enteropathogenic bacterium that is responsible for acute forms of food-borne diarrhea. Wotzka, Nguyen, and Hardt (2017) mentioned in their review the need for more efficient therapies against enteropathogens, which include *S. enterica* Typhimurium. In addition to this, acquired antibiotic resistance in *Salmonella* is a matter of concern (Michael & Schwarz, 2016). Here, we described seven compounds (**2–8**) with the ability to inhibit

growth of *S. enterica* Typhimurium. Although the maximum inhibition level observed was 75% (**7**), the anti-*Salmonella* activity of the series as a whole pointed to the effectiveness of the basic structure of **2** against this bacterium, irrespective of the substituent atom/group used.

Among the compounds, **2** was active against five of seven bacterial isolates. Additionally, **2** showed a nearly 60% increase in potency against *E. faecalis* when compared to **1**, while practically keeping the antibacterial property of **1** against *S. enterica* Typhimurium and *B. subtilis*. *E. faecalis* is a gram-positive bacterium widespread in nature, and also found as a commensal of the gastrointestinal tract of animals. Furthermore, *E. faecalis* has been associated with nosocomial infections and thus poses a considerable threat to human health worldwide. The ability of compound **2** to kill *E. faecalis* emerges as a new therapeutic possibility against an opportunistic pathogen, known to be resilient to several antibiotic treatments (acquired and intrinsic resistance of *E. faecalis* has been nicely reviewed by Guzman Prieto et al., 2016; van Harten, Willems, Martin, & Hendrickx, 2017).

Compound **2** was the only derivative able to kill the plant pathogen *X. citri*, which is the etiological agent of citrus canker, a disease that affects all the commercially important varieties of citrus plants and responsible for significant economic losses to the orange juice industry (Gottwald, Graham, & Schubert, 2002). Citrus canker cannot be treated, however, farmers can manage the problem and control the spread of *X. citri* within the orchards. The current strategy used in Brazil, the major producer of sweet oranges in the world, is the plantation of orange trees that are less susceptible to the pathogen (complete resistance to *X. citri* has not yet been found), the use of wind-shields (green barriers) to avoid lateral spreading of the bacterium due to the combined action of wind and rains, and the massive use of cupric formulations as a superficial bactericide to protect the aerial parts of the trees (Fundecitrus, Brazil). Copper is toxic to the environment, may be bio/accumulative, and there are reports of acquired resistance of *X. citri* to this metal (Canteros, 1999; Carpena, Andreani, & Isani, 2017). In this sense, the use of agricultural defensives based on less toxic compounds is a desirable alternative that deserves further investment.

## 4 | MATERIALS AND METHODS

### 4.1 | Synthesis and <sup>1</sup>H NMR spectra of compounds **2–8**

The general procedure for the synthesis of compounds **2–8** was the same as reported by Yadav et al. (2010). Briefly, an amount of 7 mmol acetone was added to a solution of 14 mmol of the respective benzaldehyde in ethanol (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 20 min, followed by dropwise addition of ethanolic solution of NaOH (1.5 mL, 1.0 mol/L). The mixture was stirred at room temperature and monitored by successive TLC analyses. When the reaction was finished, the residue was poured into crushed ice. The resulting precipitate of **2** was removed by filtration, washed with cold water, and purified by chromatography over

silica gel using mixtures of hexane and ethyl acetate as eluents. Precipitates of 3–8 were removed by filtration, washed with cold water and purified by recrystallization from ethanol. NMR spectra at 25°C were recorded at 600 MHz for  $^1\text{H}$  nucleus on Bruker Avance III spectrometer. Chemical shifts are given in ppm on the  $\delta$  scale referenced to residual  $\text{CHCl}_3$  signal at 7.28, and coupling constants ( $J$ ) are calculated in hertz (Hz).

## 4.2 | Strains and growth conditions

The strains *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (*E. faecalis*), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (*S. aureus*), *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli*), *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC13311 (*S. enterica*), and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (*P. aeruginosa*) were obtained from Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil). *Bacillus subtilis* 168 (*B. subtilis*), and *B. subtilis* expressing FtsZ-GFP (*amy::pspac-ftsZ-gfpmut1*) were gifts from Frederico Gueiros-Filho (Dept. of Biochemistry, IQ, Universidade de São Paulo, Brazil). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*X. citri*) was obtained from the Instituto Biológico, Seção de Bactérias Fitopatológicas (IBSBF-1594; Schaad et al., 2006). *B. subtilis* was cultivated in LB/LB-agar (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989) at 30°C; *E. coli* in Tryptic Soy Broth (TSB) or TSB-agar (Difco-211225) at 37°C; *X. citri* was cultivated in NYG/NYG-agar (Peptone 5 g, yeast extract 3 g and glycerol 20 g in 1.0 liter of distilled water) at 30°C; *E. faecalis* in Brain Heart Infusion (BHI) or BHI-agar (Difco-237500) at 37°C; *P. aeruginosa* and *S. enterica* were cultivated in Nutrient Broth (NB) or NB-agar (Difco-234000) at 37°C.

## 4.3 | Cell viability tests

The antibacterial activity of the compounds was evaluated using the Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) adapted to *X. citri* (Silva et al., 2013). Compounds, as dried powders, were diluted in 100% DMSO to a starting concentration of 10 mg/mL. Following, compounds were diluted in a twofold scheme using growth medium (according to the medium recommended for each strain), and aliquots were deposited directly into the wells of a 96-microtiter plate so to give the necessary concentration to be tested in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . Cells were standardized to  $10^5$  CFU/well. The negative control was media; the vehicle control was 1% DMSO, and as positive controls we used 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of kanamycin for *X. citri* and *B. subtilis*, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ampicillin for *E. coli* and *S. typhimurium*, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of gentamicin for *P. aeruginosa*, and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of vancomycin for *S. aureus* and *E. faecalis*, respectively (EUCAST/BrCAST, 2017). Bacteria were exposed to the compounds for a period of 12 hr. After the incubation time with the compounds, the metabolic activity of the cells was assessed by adding resazurin (0.1 mg/mL) to the samples to the final concentration of 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , followed by a further incubation of ~2 hr. Resazurin is a nonfluorescent blue dye that can be reduced in the presence of NADH to a reddish fluorescent compound known as resorufin (an indication of cell metabolism). The amount of resazurin reduced by NADH to its fluorescent

form is quantifiable in REMA, and it is directly proportional to the amount of cells with active metabolism (respiring); therefore, we can measure the proportion of the cells in a culture that are affected by a specific compound or treatment. Fluorescence scanning was conducted using a microplate reader Synergy H1 (Biotek). Three independent experiments were used to estimate the minimal inhibitory concentration (MIC) data. Statistics were carried out using Graphpad Prism version 6. To evaluate if compounds had bacteriostatic or bactericidal action, samples from REMA were plated on agar-media and incubated for 24 hr (48 hr for *X. citri*) in order to check for the ability of the cells to grow.

## 4.4 | Microscopy

Cells to be evaluated under the microscope were collected from REMA plates after the exposure to the compounds and immobilized in agarose-covered slides essentially as described by Martins et al. (2010). *B. subtilis* labeled for the septum was cultivated in the presence of 0.02 mM Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce the expression of FtsZ-GFP from the *pspac* promoter. Membrane integrity was assessed using the Live/Dead BacLight kit (Thermo-Scientific L7012) following the exposure to the compounds in REMA. All the visualizations were done using an Olympus BX-61 microscope, equipped with a monochromatic OrcaFlash-2.8 camera, and guided by the software CellSens version 11.

## 4.5 | FtsZ assays

*B. subtilis* FtsZ was expressed and purified using the ammonium sulfate precipitation method as described before (Krol & Scheffers, 2013; Mukherjee & Lutkenhaus, 1998). The FtsZ GTP hydrolysis rate was determined using the malachite green phosphate assay as described in (Król et al., 2015). Twelve  $\mu\text{M}$  FtsZ was incubated with 10 mM  $\text{MgCl}_2$  in the presence of various concentrations of 2 in 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM KCl at 30°C and the reaction was started with 1 mM GTP. As a control, 1% DMSO was used. FtsZ sedimentation assays were performed as described in (Król et al., 2015). Ten  $\mu\text{M}$  FtsZ and BSA (control) were incubated with 10 mM  $\text{MgCl}_2$  in the presence of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 2 0.5% DMSO (control) in 50 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl at 30°C and the reaction was started with 2 mM GTP or GDP (or a corresponding volume of buffer added where no nucleotide was present).

## 4.6 | FT-IR spectrophotometry

FT-IR spectroscopy was performed according Zeroual, Manfait, and Choisy (1995) with some modifications. Cells were analyzed before and after treatment with the compounds using the FT-IR spectrophotometer Shimadzu, Model 8300. Briefly, bacteria were cultivated in liquid medium up to the concentration of  $10^5$  cells/mL; after growth, cells were centrifuged at 10,000  $g$  for 2 min in order to form pellets at the bottom of 1.5 mL microcentrifuge tubes. Cells were dissolved in deionized water, centrifuged

and then washed two more times in water to remove traces of medium. After that, cell mass was mixed together with 149 mg of KBr. To obtain the FT-IR spectra of treated cells, compounds were added to the cultures at MIC<sub>90</sub> and allowed to react for 30 min before the centrifugation steps. Nisin was added as a control for membrane pore formation at 5 µg/mL. The dry samples with KBr were homogenized and compressed at 40 kN for 5 min in preparation for the FT-IR readings. Absorbance was analyzed over a range of 400 to 4000 cm<sup>-1</sup>, with 32 scans at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. Data treatment and analyses were performed using the software Origin 8.00.

## ACKNOWLEDGMENTS

LGM, CRP, GST and GMA received scholarships from CAPES (Brazil). This work was funded by the bilateral research program "Bio-based Economy" from the Netherlands Organization for Scientific research (NWO, 729.004.005), and the São Paulo Research Foundation (FAPESP/Brazil, grant number 2013/50367-8) to DJS and HF; we also received financial support from the INCT Citros (FAPESP 2014/50880-0 and CNPq 465440/2014-2), and FAPESP 2014/18330-0.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ORCID

Dirk-Jan Scheffers  <http://orcid.org/0000-0002-9439-9168>

Henrique Ferreira  <http://orcid.org/0000-0002-9183-9420>

## REFERENCES

Canteros, B. I. (1999). Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. Citri. In A. Mahadevan (Ed.), *Plant pathogenic bacteria. Proceedings of the international society of bacteriology, centre for advanced study in botany* (pp. 455–459). Chennai, India: University of Madras.

Carpene, E., Andreani, G., & Isani, G. (2017). Trace elements in unconventional animals: A 40-year experience. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 43, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.02.003>

Chen, J., He, Z. M., Wang, F. L., Zhang, Z. S., Liu, X. Z., Zhai, D. D., & Chen, W. D. (2016). Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. *European Journal of Pharmacology*, 772, 33–42.

Di Martino, R. M., Luppi, B., Bisi, A., Gobbi, S., Rampa, A., Abruzzo, A., & Belluti, F. (2017). Recent progress on curcumin-based therapeutics: A patent review (2012–2016). Part i: Curcumin. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27, 579–590. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1276566>

Erickson, H. P., Anderson, D. E., & Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: Cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 504–528. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-10>

Garip, S., Gozen, A. C., & Severcan, F. (2009). Use of fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of bacillus and micrococcus isolates. *Food Chemistry*, 113, 1301–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.063>

Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as "curcumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, 75, 787–809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>

Gordh, T. (2010). Lidocaine: The origin of a modern local anesthetic. 1949. *Anesthesiology*, 113, 1433–1437. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181fcef48>

Gottwald, T. R., Graham, J. H., & Schubert, T. S. (2002). Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 10, 32. <https://doi.org/10.1094/PHP-2002-0812-01-RV>

Grigg, M. J., William, T., Menon, J., Barber, B. E., Wilkes, C. S., Rajahram, G. S., ... Anstey, N. M. (2016). Efficacy of artesunate-mefloquine for chloroquine-resistant plasmodium vivax malaria in Malaysia: An open-label, randomized, controlled trial. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62, 1403–1411. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw121>

Guzman Prieto, A. M., van Schaik, W., Rogers, M. R., Coque, T. M., Baquero, F., Corander, J., & Willems, R. J. (2016). Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Frontiers in Microbiology*, 7, 788.

Hampannavar, G. A., Karpoornath, R., Palkar, M. B., & Shaikh, M. S. (2016). An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (dzh). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24, 501–520. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.12.049>

Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., & Michel, M. C. (2014). The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological Reviews*, 66, 222–307.

Hung, W. C., Chen, F. Y., Lee, C. C., Sun, Y., Lee, M. T., & Huang, H. W. (2008). Membrane-thinning effect of curcumin. *Biophysical Journal*, 94, 4331–4338. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.126888>

Hurley, K. A., Santos, T. M., Nepomuceno, G. M., Huynh, V., Shaw, J. T., & Weibel, D. B. (2016). Targeting the bacterial division protein ftsz. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 6975–6998. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01098>

Ingolfsson, H. I., Koeppe, R. E. 2nd, & Andersen, O. S. (2007). Curcumin is a modulator of bilayer material properties. *Biochemistry*, 46, 10384–10391. <https://doi.org/10.1021/bi701013n>

Janssen, P. A. J., & van der Eycken, C. A. M. (1968). *The chemical anatomy of potent morphine-like analgesics, in drugs affecting the central nervous system* (pp. 25–60). New York: Marcel Dekker.

Jebsen, C., Norici, A., Wagner, H., Palmucci, M., Giordano, M., & Wilhelm, C. (2012). Ftir spectra of algal species can be used as physiological fingerprints to assess their actual growth potential. *Physiologia Plantarum*, 146, 427–438. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01636.x>

Kaur, S., Modi, N. H., Panda, D., & Roy, N. (2010). Probing the binding site of curcumin in escherichia coli and *Bacillus subtilis* FtsZ—a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 4209–4214. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.06.015>

Król, E., de Sousa Borges, A., da Silva, I., Polaquini, C. R., Regasini, L. O., Ferreira, H., & Scheffers, D. J. (2015). Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–12.

Król, E., & Scheffers, D. J. (2013). FtsZ polymerization assays: Simple protocols and considerations. *Journal of Visualized Experiments*, 16, e50844. <https://doi.org/10.3791/50844>

Kumar, A., Dhamgaye, S., Maurya, I. K., Singh, A., Sharma, M., & Prasad, R. (2014). Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans*. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy*, 58, 167–175. <https://doi.org/10.1128/AAC.01385-13>
- Lock, R. L., & Harry, E. J. (2008). Cell-division inhibitors: New insights for future antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 324–338. <https://doi.org/10.1038/nrd2510>
- Lowe, J., & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391, 203–206. <https://doi.org/10.1038/34472>
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial mincd system and spatial regulation of the z ring. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 539–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652>
- Martins, P. M., Lau, I. F., Bacci, M., Belasque, J., do Amaral, A. M., Taboga, S. R., & Ferreira, H. (2010). Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiology Letters*, 310, 76–83.
- Michael, G. B., & Schwarz, S. (2016). Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal salmonella: An alarming trend? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22, 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.033>
- Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014, 186864.
- Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (1998). Purification, assembly, and localization of FtsZ. *Methods in Enzymology*, 298, 296–305. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)98026-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)98026-0)
- Murray, M. C., & Perkins, M. E. (1996). Chemotherapy of malaria. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 31, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60454-6](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60454-6)
- Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The essential medicinal chemistry of curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., & Panda, D. (2008). Curcumin inhibits FtsZ assembly: An attractive mechanism for its antibacterial activity. *The Biochemical Journal*, 410, 147–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20070891>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (pp 626). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., ... Vidaver, A. K. (2006). Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 690–695. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.08.001>
- Silva, I. C., Regasini, L. O., Petronio, M. S., Silva, D. H., Bolzani, V. S., Belasque, J. Jr, ... Ferreira, H. (2013). Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology*, 195, 85–94. <https://doi.org/10.1128/JB.01442-12>
- Strahl, H., & Hamoen, L. W. (2010). Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 12281–12286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005485107>
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., & Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal activity of curcumin i is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS ONE*, 10, 1–15.
- Valli, M., Altei, W., dos Santos, R. N., de Lucca, E. C. Jr., Dessoy, M. A., Pioli, R. M., ... Dias, L. C. (2017). Synthetic analogue of the natural product piperlongumine as a potent inhibitor of breast cancer cell line migration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28, 475–484. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160303>
- van Harten, R. M., Willems, R. J., Martin, N. I., & Hendrickx, A. P. (2017). Multidrug-resistant enterococcal infections: New compounds, novel antimicrobial therapies? *Trends in Microbiology*, 25, 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.004>
- Vishu Kumar, A. B., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R., & Tharanathan, R. N. (2005). Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 391, 167–175. <https://doi.org/10.1042/BJ20050093>
- Wiedemann, I., Benz, R., & Sahl, H. G. (2004). Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: A black lipid membrane study. *Journal of Bacteriology*, 186, 3259–3261. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.3259-3261.2004>
- Wotzka, S. Y., Nguyen, B. D., & Hardt, W. D. (2017). Salmonella Typhimurium diarrhea reveals basic principles of enteropathogen infection and disease-promoted DNA exchange. *Cell Host & Microbe*, 21, 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.009>
- Xiao, J., & Goley, E. D. (2016). Redefining the roles of the ftsz-ring in bacterial cytokinesis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.008>
- Yadav, B., Taurin, S., Rosengren, R. J., Schumacher, M., Diederich, M., Somers-Edgar, T. J., & Larsen, L. (2010). Synthesis and cytotoxic potential of heterocyclic cyclohexanone analogues of curcumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 6701–6707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.063>
- Zeroual, W., Manfait, M., & Choisy, C. (1995). FT-IR spectroscopy study of perturbations induced by antibiotic on bacteria (*Escherichia coli*). *Pathologie-Biologie*, 43, 300–305.

**How to cite this article:** Morão LG, Polaquini CR, Kopacz M, et al. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*. 2018;e683. <https://doi.org/10.1002/mbo3.683>

# CAPÍTULO III

### CAPÍTULO III

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO ANTIMICROBIANO DE HIDROXICHALCONAS E METOXICHALCONAS CONTRA O MICRORGANISMO *Bacillus subtilis*

### 1. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1.1. Síntese das Metoxichalconas e Hidroxichalconas (realizado pelos colaboradores de São José do Rio Preto)

A metodologia e as referências utilizadas para o processo de síntese das chalconas foi citada na página 45, item 2.1 (Capítulo I).

#### 1.2. Linhagens celulares e condições de crescimento

Para a avaliação da ação antimicrobiana dos compostos o grupo usufruiu do microrganismo *Bacillus subtilis* 168 selvagem obtida do nosso colaborador holandês Dr. Dirk-Jan Scheffers (University of Groningen, Dept. of Molecular Microbiology). Também foi utilizada a linhagem de *B. subtilis* expressando FtsZ-GFP (*amy: pspac-ftsZ-gfpmut1*) oferecida por Frederico Gueiros-Filho (Dept. de Bioquímica, IQ, Universidade de São Paulo, Brasil). As linhagens foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) à 29°C.

#### 1.3. Screening de Compostos

A metodologia e as referências utilizadas para o processo de triagem dos compostos foi citada na página 46, item 2.3 (Capítulo I).

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

A avaliação da inibição de crescimento bacteriano foi realizada utilizando-se o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) descrito por Palomino et al. (2002) e Martin et al. (2003) com algumas modificações sugeridas para *B. subtilis*, segundo *B. subtilis* Manual – Freiburg, 2016. O processo de execução do REMA foi o mesmo citado na página 47, item 2.4 (Capítulo I).

#### 1.5. Avaliação da Mínima Concentração Bactericida (MBC)

A metodologia de execução do MBC está referenciada na página 47, item 2.5 (Capítulo I). O tempo de incubação da placa foi de 24 horas.

#### 1.6. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos ativos

Para avaliar os possíveis mecanismos de ação dos compostos que apresentaram capacidade antimicrobiana, nosso grupo de pesquisa possui dois métodos comumente utilizados (1) Ensaio de permeabilidade de membrana (2) Ensaio de desestruturação de septo

de divisão celular, além de alguns ensaios complementares que comprovam esses dois ensaios citados: Análises com FT-IR e Avaliação da atividade GTPásica vinculada a FTsZ. Também foram realizados ensaios de síntese de macromoléculas e dosagem de ATP intracelular para avaliação do modo de ação dos compostos, em colaboração com o Laboratório de Bioquímica da Universidade de Groningen – Holanda.

#### 1.6.1. Ensaio de Permeabilidade de Membrana

Foi realizado seguindo o mesmo processo e referências já citados na página 48, item 2.6.1 (Capítulo I).

#### 1.6.2. Ensaio de Desestruturação de Septo de Divisão Celular

As células avaliadas ao microscópio foram coletadas de placas de REMA após 15 e 30 minutos de exposição aos compostos. Em seguida foram imobilizadas em lâminas com agarose, essencialmente como descrito por Martins, et al. (2010). *B. subtilis* com septo marcado foi cultivado na presença de IPTG 0,02 mM para induzir a expressão de FtsZ-GFP a partir do promotor pspac. Todas as visualizações foram feitas utilizando um microscópio Olympus BX-61, equipado com uma câmera monocromática OrcaFlash-2.8, e orientado pelo software CellSens versão 11, através do filtro GFP.

#### 1.7. Ensaio com FT-IR

Os espectros de FT-IR são como impressões digitais de moléculas químicas, pois ocorrem mudanças quando a estrutura química mudou devido a uma conexão, interação ou quebra com outra molécula. As células bacterianas apresentam espectros FT-IR únicos de acordo com cada diferente gênero bacteriano, podendo usar essa ferramenta para identificar e classificar espécies diferentes de bactérias (HELM et al. 1991). Com as bandas de absorbância dos espectros FT-IR é possível identificar picos e regiões singulares correspondentes à membrana e parede celular, entre outras estruturas presentes na bactéria (GARIP et al. 2009), sendo assim qualquer alteração ou degradação causada após o contato com os compostos avaliados serão identificados. A espectroscopia de FT-IR foi realizada de acordo com Zeroual, et al. (1995) exceto algumas modificações. As células foram analisadas antes e depois do tratamento com os compostos utilizando o espectrofotômetro de FT-IR Shimadzu, Modelo 8300. As bactérias foram cultivadas em meio LB líquido até a concentração de  $10^5$  células, nas mesmas condições do REMA. Para obter os espectros de FT-IR das células tratadas, adicionou-se os compostos, na MIC<sub>90</sub>, à suspensão bacteriana e deixou-se reagir durante 30 minutos. O controle negativo foram células não tratadas e para o controle positivo foi usada a nisina a  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Pellets de KBr contendo bactéria foram incubados a 60°C por 24 h. As amostras secas foram homogeneizadas e comprimidas a 40 kN durante 5 min em preparação

para as leituras de FT-IR. A absorvância foi analisada em uma faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 varreduras com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . O tratamento e as análises dos dados foram realizados utilizando o software Origin 8.0.

### 1.8. Avaliação da atividade GTPásica vinculada a FtsZ

*B. subtilis*-FtsZ foi expresso e purificado usando o método de precipitação com sulfato de amônio como descrito anteriormente por Mukherjee, et al. (1998) e Król, et al. (2013). A taxa de hidrólise FtsZ- GTP foi determinada usando o ensaio de fosfato verde malaquita como descrito em Król e colaboradores (2015). Doze  $\mu\text{M}$  de FtsZ foram incubados com 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  na presença de várias concentrações do composto avaliado em 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM KCl a 30°C e a reação foi iniciada com 1 mM de GTP. Como controle, utilizou-se DMSO 1%. Ensaio de sedimentação de FtsZ foram realizados como descrito em Król e colaboradores (2015). Foram incubados 10  $\mu\text{M}$  de FtsZ e soroalbumina bovina (BSA) (controle) com 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  na presença de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do composto avaliado 0,5% de DMSO (controle) em 50 mM de HEPES pH 7,5, 50 mM KCl a 30°C e a reação foi iniciada com 2 mM de GTP ou GDP (ou um volume correspondente de tampão adicionado onde não havia nucleotídeo).

### 1.9. Síntese de Macromoléculas

Essa análise foi feita apenas para dois dos compostos que apresentaram ação contra *B. subtilis*, sendo eles **BC1** e **T9A**. Quatro vias de síntese macromoleculares foram avaliadas através da monitorização da incorporação de precursores marcados radioativamente. [5- $^3\text{H}$ ] uridina, [metil- $^3\text{H}$ ] timidina, L-[3,4,5- $^3\text{H}(\text{N})$ ] leucina e D-[6- $^3\text{H}(\text{N})$ ] cloridrato de glucosamina (todos a 0,5  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ) foram utilizados para monitorar, respectivamente, a síntese de RNA, DNA, proteína e peptidoglicano. Durante este experimento, as células de *B. subtilis* foram cultivadas até a fase exponencial inicial em meio DMM. Utilizou-se 1 mM de precursor não marcado para RNA e peptidoglicano, e 10  $\mu\text{M}$  para DNA e proteína. Para incorporação de DNA, as células de *B. subtilis* foram cultivadas em meio LB em vez de DMM. As células foram incubadas na presença de precursores marcados durante 80 minutos com agitação a 30°C. *B. subtilis* foi testado na presença de 40  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de **BC1** e **T9A**, sem composto (controle negativo) e com antibióticos conhecidos por inibirem a via de cada síntese testada (controle positivo) - RNA: rifampicina 0,625  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , DNA: ciprofloxacina 0,625  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , proteína: tetraciclina 10  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e peptidoglicano: vancomicina 1,0  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

Pelo menos oito réplicas foram feitas por precursor testado. Durante a incubação, alíquotas foram retiradas e precipitadas com ácido tricloroacético 12% gelado, por 35 minutos e então foram filtradas através de membranas de nitrocelulose (tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ).

Os filtros foram lavados com ácido tricloroacético 12% gelado, transferidos para 2 mL de fluido de cintilação Ultima Gold MV (PerkinElmer) e medidos num analisador de cintilação líquida Tri-Carb 2000CA (Packard Instruments).

Para esses ensaios foi realizado um novo REMA com a finalidade de avaliar o impacto dos compostos na atividade respiratória após um curto período de tempo, comprovando que as bactérias não estavam mortas e o que ocorreu foi em detrimento do contato com os compostos. As células de *B. subtilis* foram incubadas em contato com resazurina em meio DMM, em placas de 96 poços. Os compostos **BC1** e **T9A** foram utilizados a uma concentração final de 40  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *B. subtilis*. Os mesmos antibióticos utilizados como controles no teste anterior foram utilizados neste ensaio bem como amostras sem adição de composto. A resazurina foi adicionada a uma concentração final de 0,1  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . A fluorescência (excitação 530 nm, emissão 560 nm, largura de banda 9 nm) foi registrada de 20 em 20 minutos até 120 minutos, num leitor de placas BioTek Synergy Mx 96-well plate reader.

#### *1.10. Ensaio da concentração de ATP intracelular*

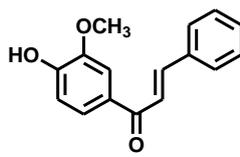
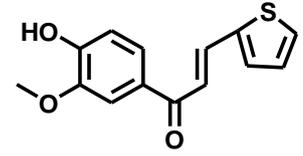
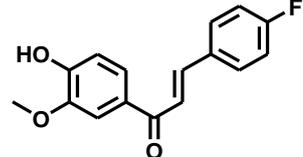
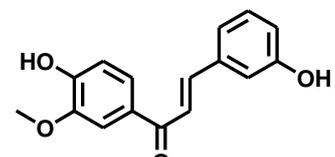
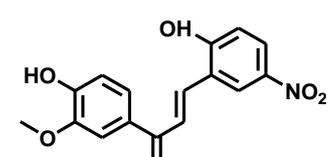
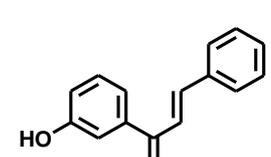
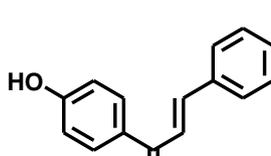
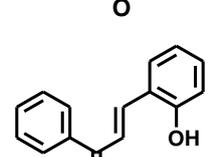
Os níveis de ATP foram medidos em *B. subtilis* utilizando o ensaio de Viabilidade Celular Microbiana BacTiter-Glo™ (Promega). Utilizou-se 7b-BF4 para *B. subtilis* (1,72  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) como controle positivo. As células foram incubadas numa placa de 96 poços (30° C, 1000 rpm), durante 30 minutos para *B. subtilis*. Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cultura de células a 100  $\mu\text{L}$  de Reagente BacTiter-Glo™, por 5 minutos, numa placa branca de 96 poços (26° C, 1000 rpm). A luminescência foi medida em um luminômetro Tecan Infinite F200 Pro, sendo a quantidade de luz emitida uma medida para a concentração de ATP intracelular.

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Compostos naturais são vistos como estruturas privilegiadas e selecionadas por pressões evolutivas para interagir com uma ampla variedade de proteínas e outros alvos biológicos e específicos. Atualmente, tem sido comum combinar as estratégias de compostos naturais com diversidades moleculares de bibliotecas combinatórias, podendo gerar modificações estruturais e resultar em uma estrutura bioativa existente de um produto natural, de forma paralela e sistemática. A partir desses projetos de bibliotecas combinatórias, pode haver sínteses baseadas em estruturas naturais existentes e/ou semi sínteses a fim de melhorar a atividade biológica inerente de um composto ou suas propriedades semelhantes a drogas, podendo ser realizada por semi-modificação da matriz, molécula ou por métodos totalmente

sintéticos (KOEHN et al., 2005). Este estudo comprovou que as hidroxichalconas e metoxichalconas derivadas de um composto natural foram modificadas e nove delas apresentaram ação antimicrobiana contra *B. subtilis* (Tabela 1) garantindo inibição do crescimento bacteriano superior a 90%.

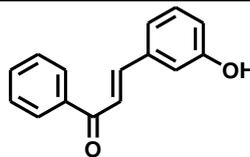
**Tabela 1.** Compostos selecionados via screening com ação contra *B. subtilis*

Hidroxichalconas e Metoxichalconas com ação contra <i>Bacillus subtilis</i>	
Código do Composto	Estrutura molecular
BC1	
A4	
A10	
A11	
A19	
MA1	
T4	
T9A	

---

**T10A**

---



Quimicamente os testes realizados possibilitaram a elaboração de análises comparativas a fim de compreender quais são os sítios mais ativos dos compostos que apresentaram potencial ação antimicrobiana frente a outros compostos da classe, que não foram ativos. Para maior entendimento e compreensão das análises feitas a classe das chalconas foram divididas em três subclasses: subclasse BC – metoxichalconas, subclasse A – hidroxichalconas derivadas de apocinina e subclasse T– hidroxichalconas. A atividade antimicrobiana de chalconas pode ser atribuída à subunidade cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, que pode funcionar como o acceptor de Michael; assim, a remoção desta subunidade atenua ou elimina a bioatividade (SINGH et al., 2014). No entanto o foco da discussão deste trabalho não engloba a importância da subunidade cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, que pode funcionar como o acceptor de Michael, uma vez que nenhuma das moléculas da classe obteve essa subunidade retirada. Em outras palavras, fica evidente que o potencial antimicrobiano aqui apresentado não ocorreu em detrimento da presença ou não da subunidade  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, uma vez que todas as moléculas, tanto ativas como inativas, possuíam essa subunidade.

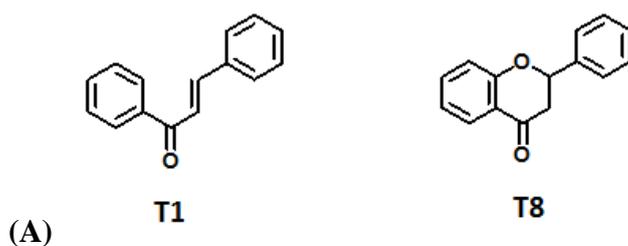
Foram testados 18 compostos pertencentes à subclasse BC e apenas um deles demonstrou ação antimicrobiana: **BC1**. Todos os compostos dessa subclasse apresentavam grupos metoxi como substituintes nos anéis A e/ou B, por isso o nome da subclasse foi designado como metoxichalcona. O grupo metoxi encontrava-se nas mais variadas posições da estrutura *orto*, *meta* ou *para* no anel A bem como *orto*, *meta* ou *para* no anel B. Algumas estruturas continham dois ou até três grupos metoxi em sua molécula, no entanto em nenhum dos casos foi registrada ação antibacteriana eficaz. Exceto com o composto **BC1**, que além do grupo metoxi na posição *meta* do anel A, também contém um grupo hidroxila na posição *para* do anel A. Esse resultado aponta a importância que o grupo hidroxila tem na estrutura molecular para que seja potencialmente ativa contra diversas espécies bacterianas.

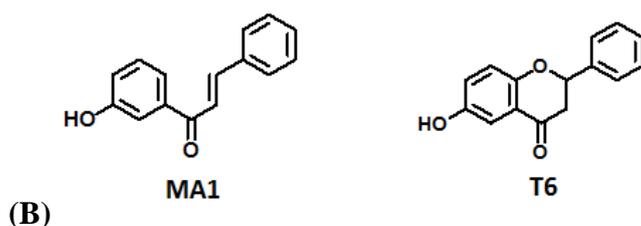
Seguindo nessa linha de raciocínio parte-se para as análises com a subclasse das hidroxichalconas derivadas de apocinina (subclasse A) cujas estruturas possuem, em comum, um grupo hidroxila na posição *para* do anel A. O que diferenciou as moléculas dessa subclasse foram os outros grupos ligantes tais como metoxi, aminas primárias ou terciárias, tioéter, éter, cloro, flúor, bromo, outra hidroxila, dentre outros ligados à variadas posições do

anel B. Porém as análises apontaram que o composto **A1**, que só possuía uma substituição hidroxila na posição *para* do anel A, não foi ativo. As moléculas desta subclasse que mostraram atividade possuem outros ligantes no anel B, além da *para*-hidroxila no anel A, tais como **A4** que possui um tioéter e um metoxi na posição *meta* do anel A, ou ainda **A10** que possui um flúor na posição *para* do anel B e um metoxi na posição *meta* do anel A. Também houve ação do composto **A11** que apresentava além da *para*-hidroxila do anel A, um metoxi na posição *meta* do anel A e outra hidroxila na posição *meta* do anel B. Finalmente o composto **A19** que também deixa clara sua ação antimicrobiana com uma *para*-hidroxila no anel A e metoxi na posição *meta* do anel A, bem como uma *orto*-hidroxila no anel B, além de um grupo nitro na posição *meta* do anel B.

Já a subclasse T das hidroxichalconas não deixa dúvidas sobre a importância de grupos hidroxila como substituintes nos anéis das chalconas, já que a chalcona **T1** dessa subclasse não era hidroxilada e não apresentou ação antimicrobiana (Figura 1A). Além disso, esta subclasse mostra uma interessante comparação entre a ação de flavonas e chalconas, uma vez que foi testada a ação da chalcona **T1** e da flavona **T8** (Figura 1A) bem como da hidroxichalcona **MA1** e da hidroxiflavona **T6** (Figura 1B). Foi possível notar que a ciclização das chalconas nas flavonas causou uma diminuição da atividade antibacteriana. Apesar de ambos os compostos não terem sido ativos (não possuem grupo hidroxila), a flavona **T8** demonstrou menos atividade (21,3%), ainda, que a chalcona **T1** (46,6%). Já a hidroxiflavona **T6** não apresentou atividade antimicrobiana (67,6%) comparada à hidroxichalcona **MA1** que apontou ser eficaz com relação a ação antibacteriana (96,6%). Tanto **T6** como **MA1** apresentam grupo hidroxila *m*-substituído no anel A, no entanto **T6** também tem um grupo éter ligado ao anel B, não observado em **MA1**. Esse resultado corrobora com o de Alcaráz et al. (2000) que relatam que chalconas são mais eficientes que flavonas contra *S. aureus*, por exemplo.

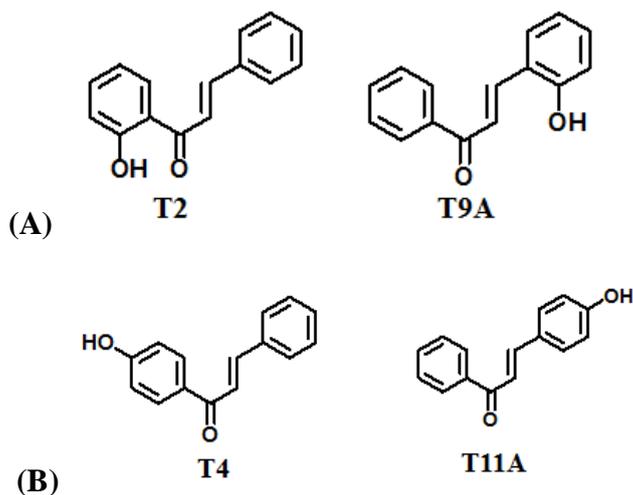
**Figura 1.** Análise comparativa do potencial antimicrobianos em função dos sítios ativos das moléculas entre (A) chalcona e flavona e (B) hidroxichalcona e hidroxiflavona





Contudo, a presença do grupo hidroxila tanto no anel A como em B também influencia na ação antibacteriana, uma vez que compostos contendo grupamento hidroxila na mesma posição, porém em anéis diferentes não apresentaram potência semelhante relacionada a atividade antibacteriana. Como exemplo disso tem-se o composto **T9A** que apresentou ação (96,35%) comparado a **T2** (31,1%), ambos com substituições *orto*, embora **T9A** seja no anel B e **T2** no anel A (Figura 2A). Essa mesma observação foi feita para os compostos **T4** e **T11A** (ambos com substituições *para*), onde **T4** foi ativo (anel A) (96,10%) em detrimento de **T11A** que não foi (anel B) – 78% (Figura 2B). Esses dados estão de acordo com Xie et al. (2015) que relataram, em seu, estudo que *o*-substituições no anel B potencializam a atividade antibacteriana, enquanto *o*-substituições no anel A não foram ativas. Cushnie and Lamb (2011) também afirmaram que *p*-substituições pelo grupo hidroxila no anel A melhoravam a potência antibacteriana das chalconas.

**Figura 2.** Análise comparativa do potencial antimicrobiano em função das hidroxilas ligadas em anéis diferentes entre posições (A) *orto* e (B) *para*



### 2.1. Avaliação da inibição de crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) – determinação de MIC e MBC

Na avaliação por REMA foi possível identificar que os nove compostos eficazes contra *B. subtilis* apresentaram ação de inibição de crescimento bacteriano na faixa de 93,34% para **A4** até 96,14% para **BC1**; na maior concentração testada (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A Tabela 2 apresenta os

valores obtidos das MIC's de cada composto, determinadas através de regressões polinomiais com auxílio do software Origin 8.0. A regressão polinomial de cada composto gerou uma equação da regressão que possibilitava calcular o valor das MICs.

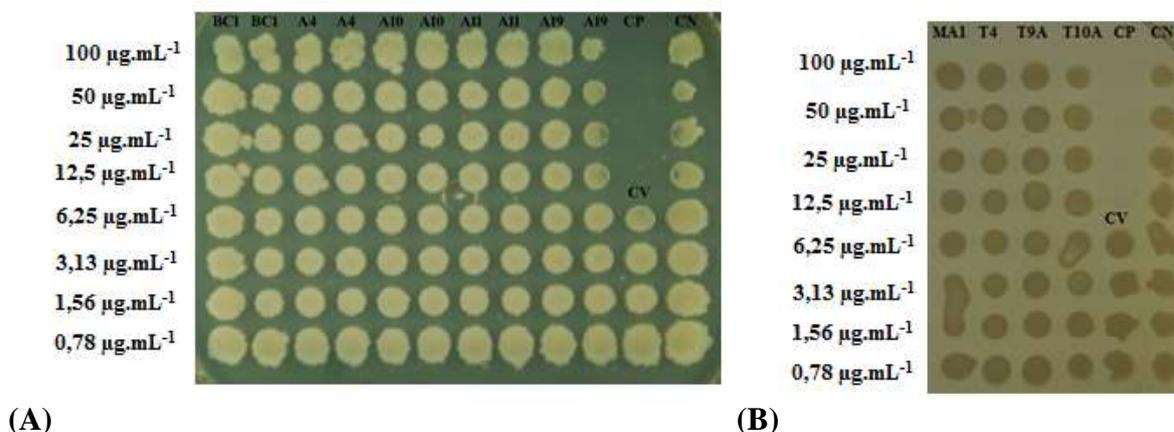
**Tabela 2.** Determinação de valores de MIC e (%) de inibição de crescimento

<b>Composto</b>	<b>(%) de inibição de crescimento (100 µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>MIC<sub>50</sub> <i>B. subtilis</i> (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>MIC<sub>50</sub> <i>B. subtilis</i> (µM)</b>	<b>MIC<sub>90</sub> <i>B. subtilis</i> (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>MIC<sub>90</sub> <i>B. subtilis</i> (µM)</b>
<b>BC1</b>	96.14 ± 0.46	38,47	151,46	49,88	196,38
<b>A4</b>	93,34 ± 0,94	61,61	236,96	96,88	372,62
<b>A10</b>	95.42 ± 0,99	18,75	68,93	24,72	90,88
<b>A11</b>	94.31 ± 0,54	80,81	300,41	98,72	366,99
<b>A19</b>	95.73 ± 0,13	80,39	255,21	98,19	311,71
<b>MA1</b>	96,58 ± 0,27	38,38	171,34	50,48	225,36
<b>T4</b>	96,10 ± 0,57	37,95	169,42	49,00	218,75
<b>T9A</b>	96,35 ± 0,97	17,59	78,53	38,99	174,06
<b>T10A</b>	96,83 ± 0,95	38,46	170,93	49,71	220,93
<b>Canamicina - CP</b>	24,22 ± 1,25	-	-	20	41,28

\* Controle positivo (CP) – Canamicina: 20 µg.mL<sup>-1</sup> (MIC)

Todos os compostos apresentaram caráter bacteriostático até a mais alta concentração testada neste trabalho (100 µg.mL<sup>-1</sup>), conforme apontou os testes apresentados na Figura 3. Mesmo assim, esse resultado não é um fator preocupante visto que, atualmente, existem inúmeras classes de compostos, comercialmente viáveis, que apresentam ação bacteriostática. Uma observação muito considerável é que os antibióticos classificados como bacteriostáticos como, por exemplo, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina e azitromicina é que são frequentemente inibidores de síntese proteica e, na maioria das vezes, atua associando-se aos ribossomos (GEMMELL E O'DOWD, 1983; DRUGS.COM, c2018). Os compostos que apresentaram maior potência, neste caso, foram **A10** e **T9A** visto que apresentaram os menores valores de MIC.

**Figura 3.** Avaliação de MBC para (A) Metoxichalconas e (B) Hidroxichalconas, contra *B. subtilis* em função de diversas concentrações de composto. CN: *B. subtilis* em meio LB; CV: *B. subtilis* em DMSO 1%; CP: *B. subtilis* em 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de canamicina



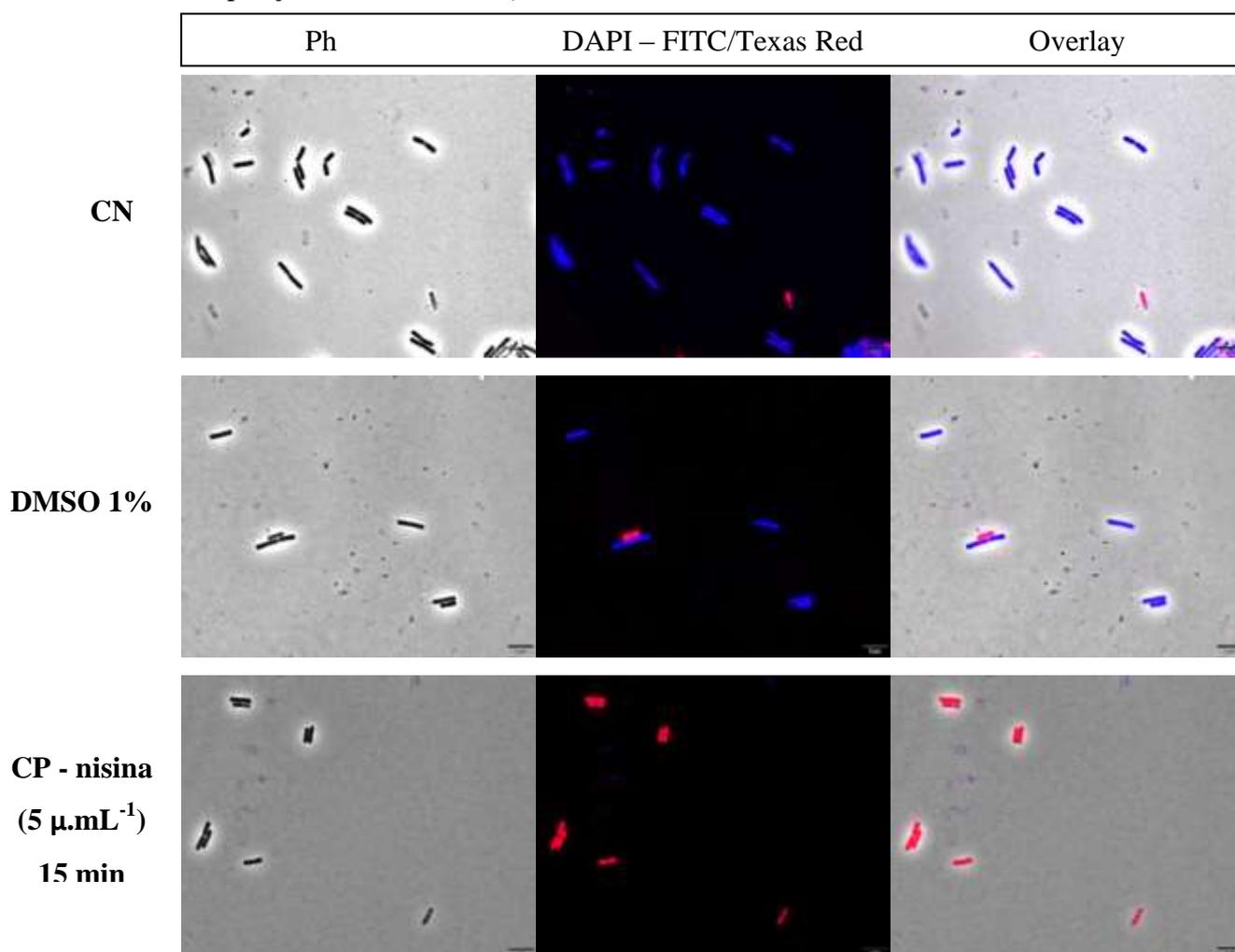
## 2.2. Microscopia de Permeabilidade de Membrana Citoplasmática

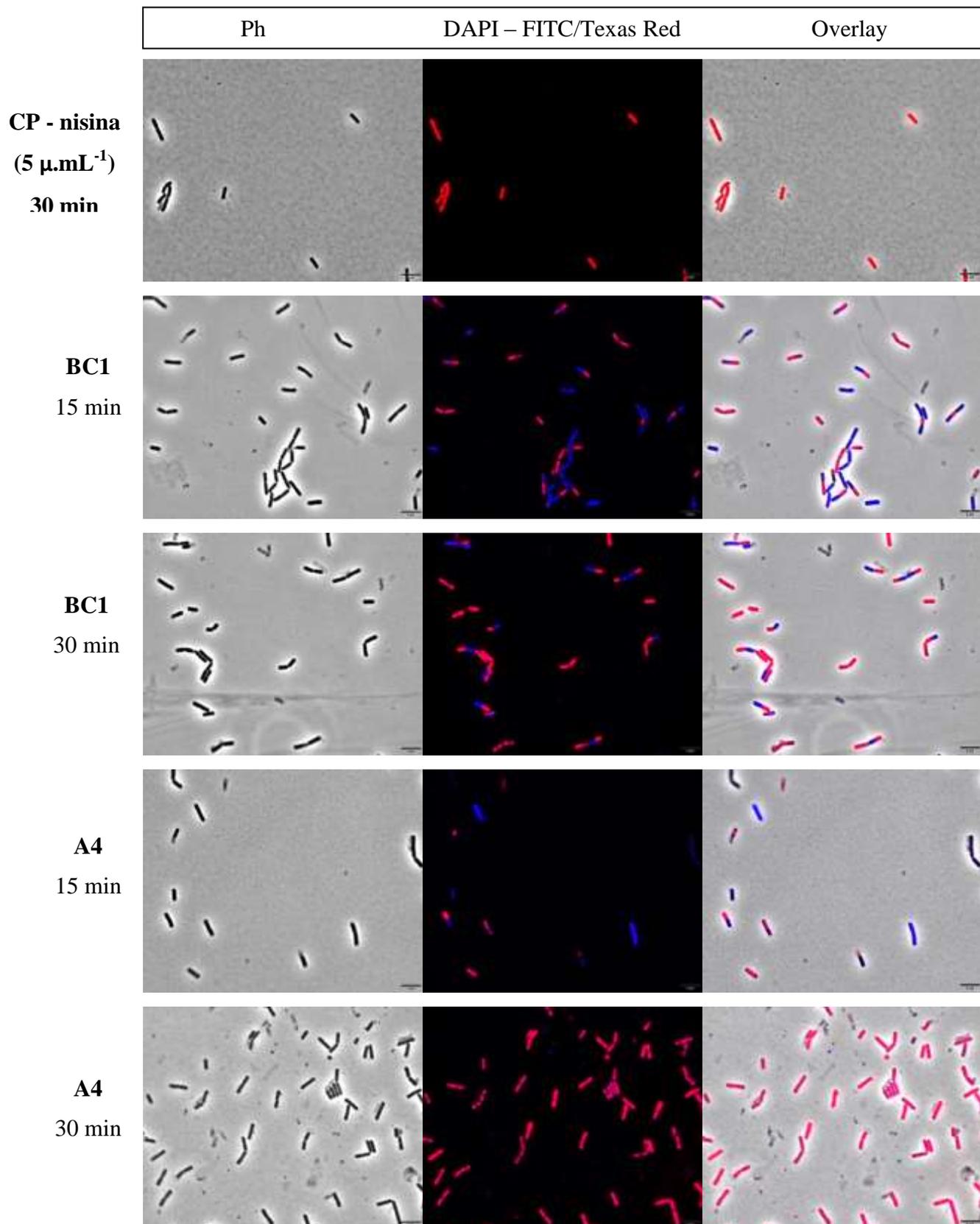
Conforme mencionado no Capítulo I, a maioria das chalconas, contidas na classe dos flavonoides, possuem mecanismo de ação, possivelmente, relacionados a três vias distintas: danos à membrana citoplasmática (IKIGAI et al., 1993); inibição da síntese de ácidos nucleicos (MORI et al., 1987) ou inibição do metabolismo energético (HARAGUCHI et al. al., 1998). Dessa forma foi extremamente importante a realização de alguns testes de mecanismo de ação desses compostos com a finalidade de estabelecer o verdadeiro modo de ação deles nas bactérias afetadas. O mecanismo de ação dos compostos foi avaliado utilizando técnicas previamente realizadas para investigar a atuação de compostos em *B. subtilis* e outros microrganismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CHERRINGTON et al., 1990; CHIRIAC et al.2015; ELNAKADY et al., 2016; MULLER et al. 2016). Também testou-se o modo de ação em *B. subtilis* devido ao nosso conhecimento prévio e à facilidade de trabalhar com este microrganismo em laboratório.

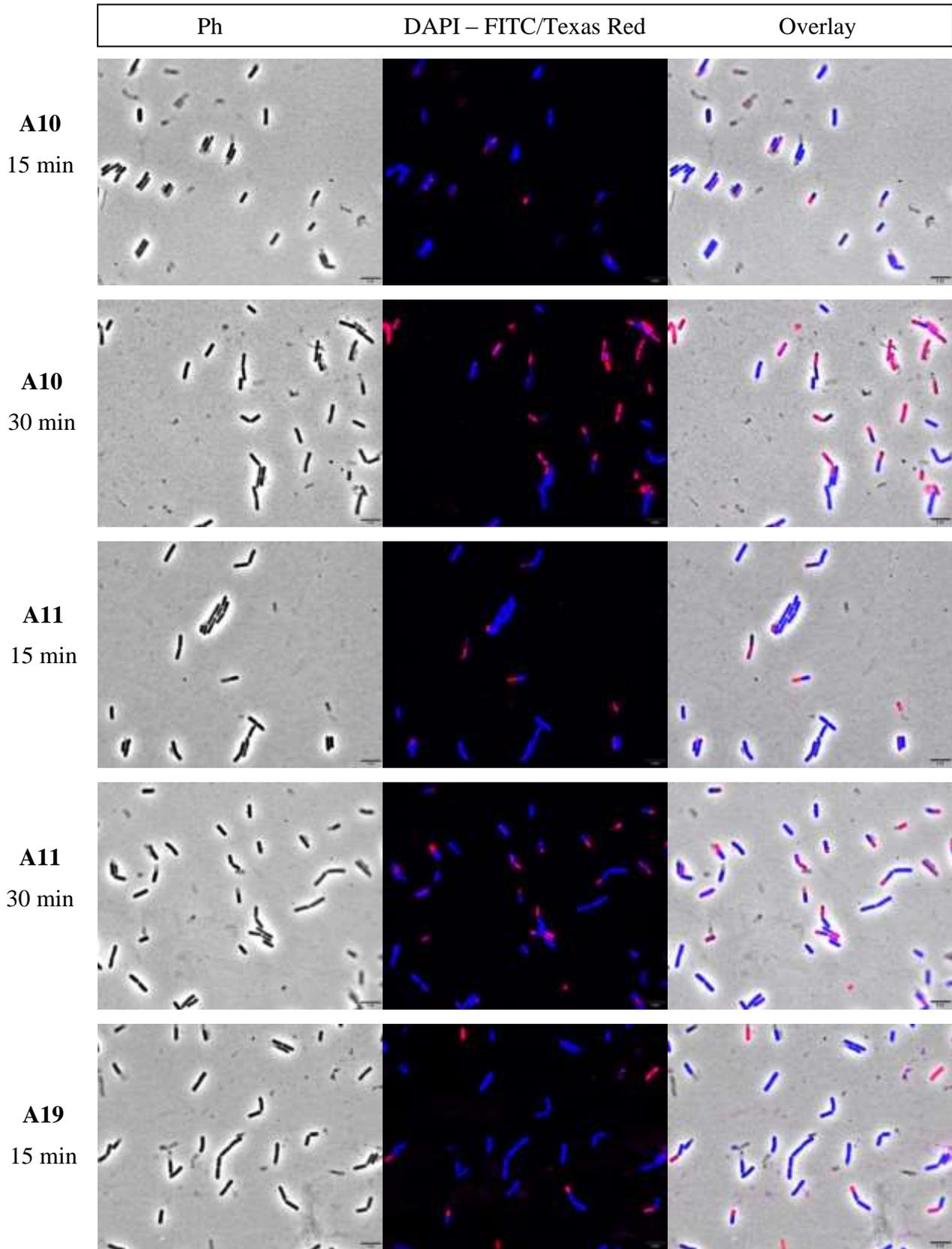
Na Figura 4, observa-se células bacterianas não tratadas (controle negativo) e tratadas com DMSO 1%. Ambas possuem membrana intacta e, conseqüente, impermeabilidade ao iodeto de propídio (IP). Quando as células de *B. subtilis* são tratadas com 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de nisina (controle positivo) (Figura 4) observa-se o coloração avermelhada nas células, devido à sua capacidade de promover poros na membrana citoplasmática, tornando-se permeável ao IP (KRÓL et al., 2015). Dos nove compostos selecionados que apresentaram ação contra *B. subtilis*, três mostraram permeabilidade significativa ao IP, comparado aos controles no ensaio de microscopia com o kit Live/Dead. A Figura 4 mostra, também, que para o tratamento com o compost **BC1** nos primeiros 15 minutos quase não há perturbação de membrana bacteriana.

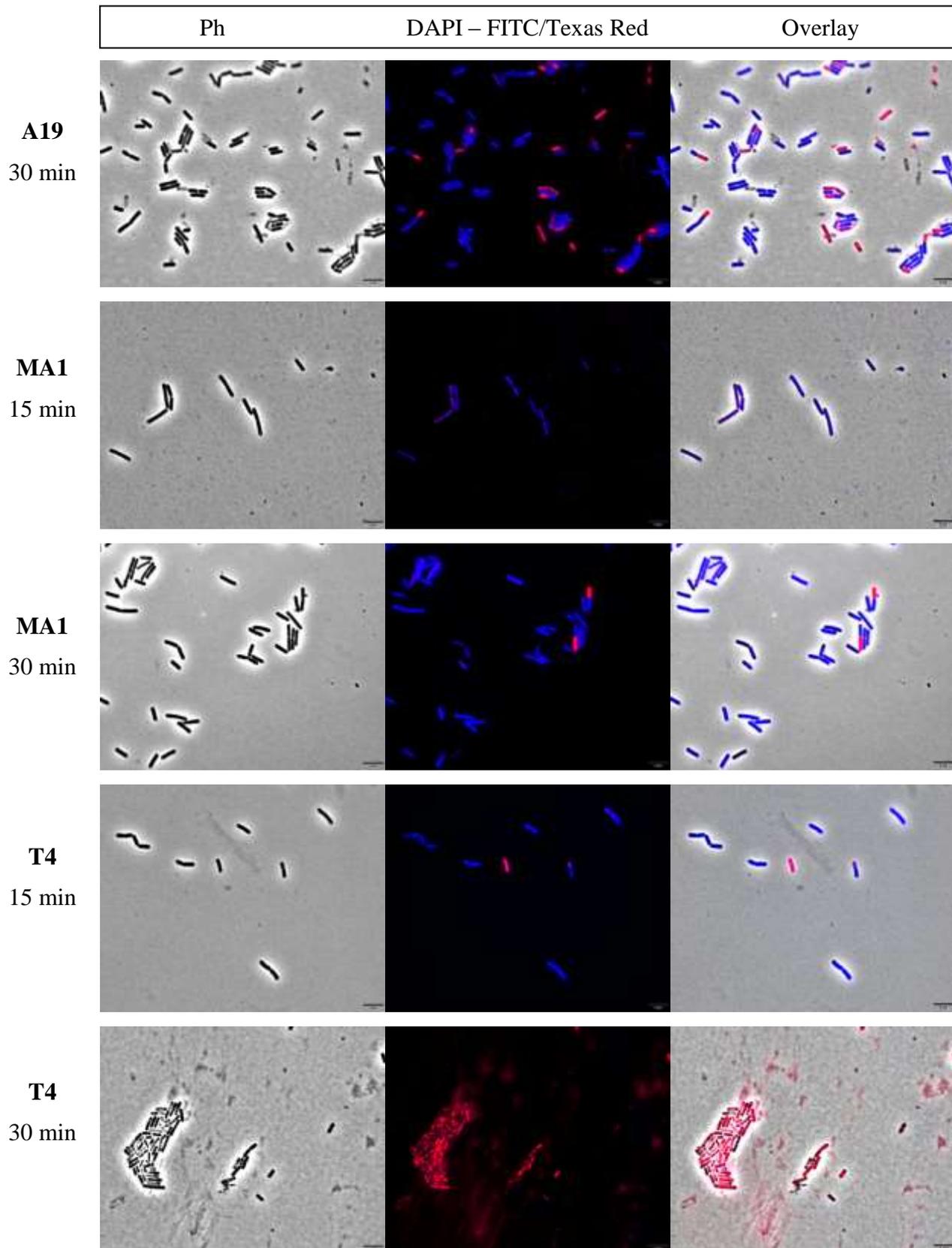
No entanto, nos 15 minutos consecutivos notou-se que um percentual maior de células foram permeabilizadas com IP, ou seja, possivelmente células bacterianas sofreram lesões na membrana citoplasmática permitindo a entrada de IP em detrimento de seu contato com o composto **BC1**. Esse mesmo comportamento é notado para os compostos **A4** e **T4**, onde nota-se que em 30 minutos quase todas as células foram permeáveis ao IP, provavelmente, pela formação de poros na membrana, decorrente do contato com o composto. Para os demais compostos houve aumento crescente na permeabilidade ao IP proporcional ao tempo de contato composto-microrganismo. No entanto esse aumento na permeabilidade ao IP não parece ter sido significativo quando comparado aos controles (Figura 4).

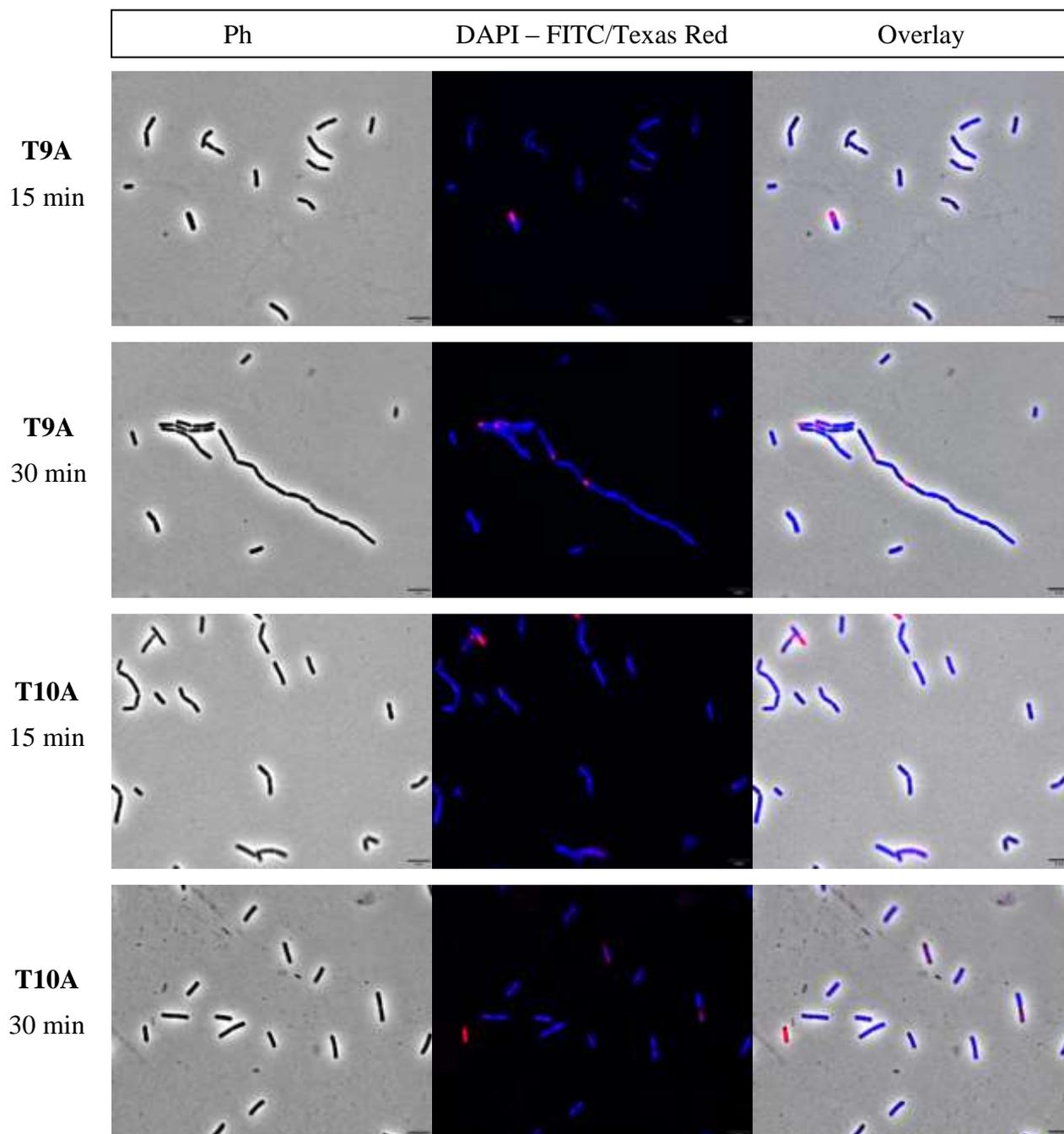
**Figura 4.** Avaliação de permeabilidade de membrana para *B. subtilis* com células sem tratamento (controle negativo); tratadas com DMSO 1% (controle do veículo); tratadas com nisina – 15 e 30 min (controle positivo) (KRÓL et al., 2015) e tratadas com os compostos que foram bioativos contra *B. subtilis* na MIC<sub>90</sub>, nos tempos de contato de 15 e 30 min. Ampliação: 100 x. Barra: 5µ







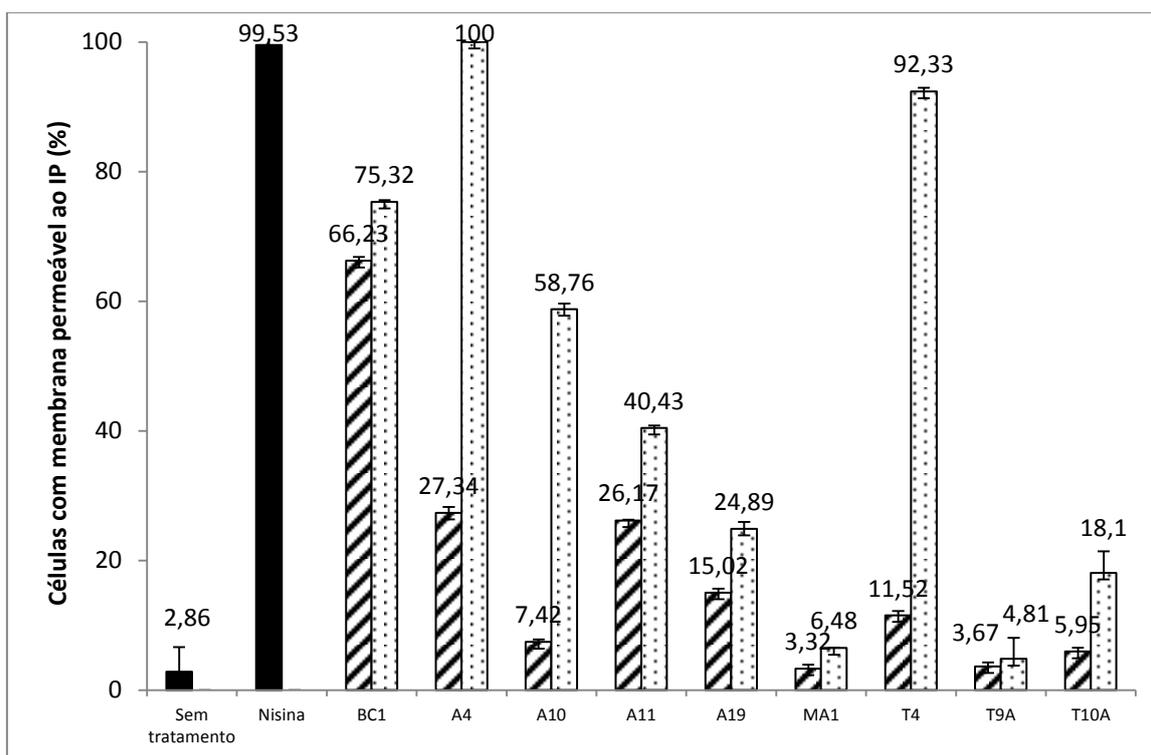




Análises estatísticas indicadas na Figura 5 mostraram 75, 100 e 92,33% de permeabilização da membrana para o tempo de 30 minutos de análise, para **BC1**, **A4** e **T4**, respectivamente. Esse resultado sugere que tais compostos podem atuar em membrana citoplasmática bacteriana assim como alguns compostos já consolidados. A Daptomicina, por exemplo, liga-se à membrana bacteriana e causa uma rápida despolimerização no potencial de membrana, determinando a inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, além do extravasamento de conteúdo citoplasmático e morte bacteriana (MICKLEFIELD, J., 2004). Além do ataque a membrana, esses três compostos poderiam ser utilizados, em sinergismo,

com outros, uma vez que apresentam ação bacteriostática e perturbadora de membrana podendo ser vinculados a um composto, supostamente bactericida, que agiria em outro alvo bacteriano de forma mais rápida e eficaz. Tal estratégia poderia ser imensamente promissora no cenário atual de emergência contínua de microrganismos resistentes e crise de antibióticos (SINGH et al., 2013). Para os demais compostos, houve uma leve alteração na permeabilização da membrana, podendo esta ser considerada tempo-dependente. Ou seja, conforme aumenta-se, gradualmente, o tempo de contato entre composto-microrganismo aumenta, também, o percentual de células com membrana alterada. No entanto esse aumento gradual na permeabilidade ao IP, para os demais compostos, não foi significativo comparado aos controles do ensaio (Figura 5).

**Figura 5.** Porcentagem de células bacterianas com membrana permeável após tratamento com hidroxichalconas/metoxichalconas na MIC<sub>90</sub> durante 15 e 30 minutos. Células sem tratamento: controle negativo; Nisina: Controle positivo. A barra de tiras representa a análise em 15 minutos e a barra pintada representa a análise em 30 minutos.



### 2.3. Análise de FT-IR

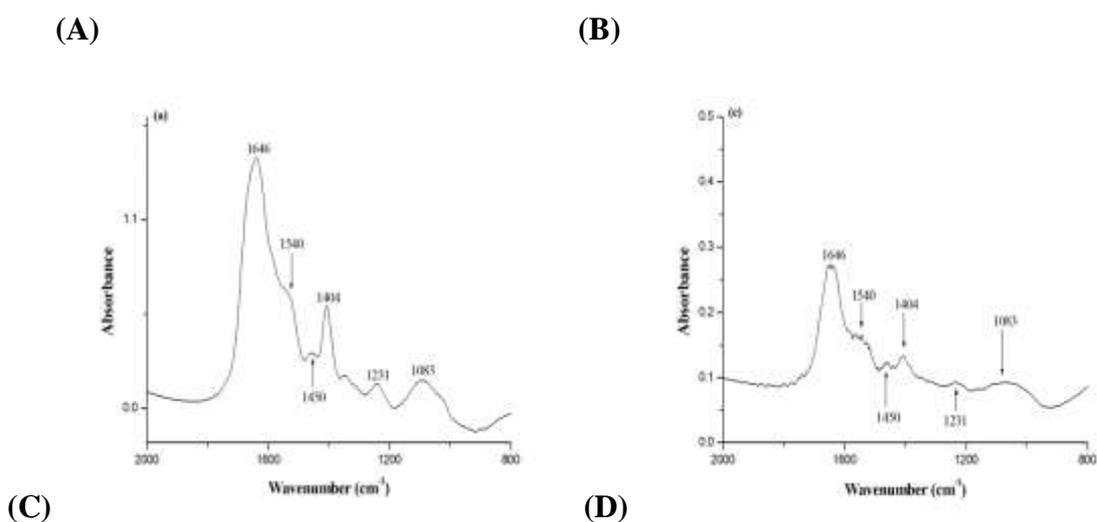
Os dados complementares e qualitativos de FT-IR apontaram picos correspondentes a diferentes grupos funcionais pertencentes às moléculas encontradas na célula bacteriana (Figura 6). Os picos representam o estiramento das ligações C – O encontradas no glicogênio ( $1083\text{ cm}^{-1}$ ); alongamento de grupos  $-\text{PO}_2-$  pertencentes a fosfolípidos da membrana citoplasmática ( $1231\text{ cm}^{-1}$ ); vibrações dos grupos  $-\text{SO}_2$  presentes principalmente na parede

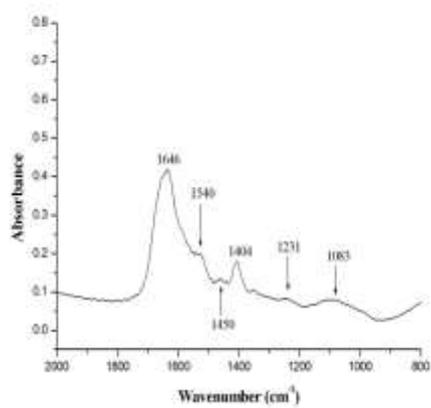
celular bacteriana ( $1404\text{ cm}^{-1}$ ); limita as vibrações dos grupos  $-\text{CH}_2$  dos lípidos ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ); o estiramento C – N encontrou estruturas  $\alpha$  helicoidais da amida II ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ) e alongamento C = O pertencentes às estruturas  $\alpha$  helicoidais da amida I ( $1646\text{ cm}^{-1}$ ), ambas encontradas em proteínas (Garip et al., 2009). Para o espectro de **BC1** (Figura 6C) notou-se diminuição de intensidade nos picos de  $1646$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , comparado ao controle (Figura 6A). Os picos  $1083$  e  $1231\text{ cm}^{-1}$  desaparecem do espectro, indicando que as estruturas relacionadas ao glicogênio e membrana citoplasmática foram afetadas após o contato com o composto. Além disso, os picos de  $1540$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  também foram aniquilados do espectro sugerindo que a região de grupos de ligações lipídicas e amidas II também foram prejudicadas em detrimento do contato com o composto **BC1**.

Para as Figuras 6D e 6F observou-se que o espectro se comportou comumente como o controle negativo exceto pela diminuição da intensidade dos picos bem como no final, onde dois novos picos apareceram na região de  $1020$  e  $960\text{ cm}^{-1}$ . De acordo com Silverstein et al. (1994) esses dois picos representam ligações de fosfato sendo a primeira representada por P-OH e a segunda  $\text{PO}_4^{3-}$ , respectivamente. Conforme foi observado no ensaio de integridade de membrana plasmática com o kit Live/Dead nota-se que em 30 minutos as células tratadas com **A4** ficaram totalmente coradas com IP, comprovando sua alteração na estrutura de membrana. No entanto para **A11** não houve permeabilidade significativa ao IP embora tenha similaridade entre os dois espectros. Isso pode ser um indicativo de que o modo de ação do composto **A4** não está diretamente relacionado com a alteração na integridade de membrana. Além disso, conforme mencionado inúmeras vezes, o teste de FT-IR com células tratadas é uma análise qualitativa indicando uma possível ação do composto em superfície bacteriana. Porém o teste com Live/Dead é mais significativo, uma vez que considera a relação dose-resposta e volume de células presentes. Para as Figuras 6E, 6G, 6J e 6K observou-se espectros normais assim como o controle negativo, porém apenas com diminuição na intensidade dos picos corroborando com o que foi observado no teste de integridade da membrana com o kit Live/Dead, onde não há alteração na estrutura de membrana para **A10**, **A19**, **T9A** e **T10A**. Também foi observada uma diferença no espectro de *B. subtilis* após contato com o composto **MA1** (Figura 6H) que apresentou 2 novos picos de baixa intensidade na região de  $1380$  e  $1522\text{ cm}^{-1}$  pertencentes ao COO estirado simétrico de ácidos graxos e à vibração C-O – H ligada a polissacarídeos ou proteínas, respectivamente. A aparência destes dois picos é indicativa de que o composto **MA1**, provavelmente, afetou os ácidos graxos e os polissacarídeos ou proteínas das células de *B. subtilis*, gerando uma quebra dessas estruturas e permitindo a captura dessas bandas por FT-IR. Apesar do aparecimento destes picos, devido

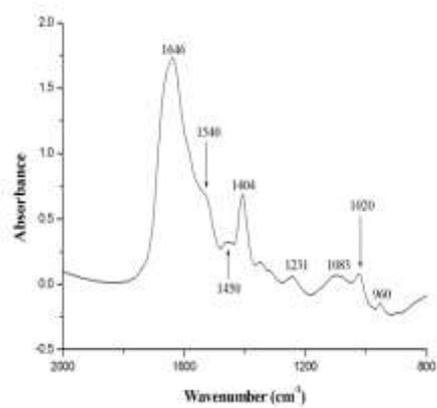
à sua baixa intensidade, é possível afirmar que não está relacionado a alguma perturbação que o composto tenha causado na célula, sendo provavelmente um pico residual, uma vez que o espectro de **MA1** registrou muitos ruídos. No entanto, ao observar o espectro de *B. subtilis* antes e depois do contato com o composto **T4**, foi possível observar várias alterações (Figura 6I). Os picos 1083, 1231 e 1540  $\text{cm}^{-1}$  desaparecem do espectro, indicando que estruturas relacionadas a glicogênio e membrana citoplasmática foram afetadas após o contato com o composto. Outros picos que também foram afetados estão nas regiões 1404, 1450 e 1646  $\text{cm}^{-1}$ . Tais regiões estão associadas à parede celular, lipídeos pertencentes à membrana citoplasmática e proteínas. As alterações observadas no espectro de *B. subtilis* após contato com o composto **T4** foram semelhantes àsquelas observadas após o contato com a nisina (Figura 6B), cujos picos de 1083 e 1231  $\text{cm}^{-1}$  desapareceram e a intensidade de todos diminuiu muito. Todas essas regiões afetadas pela nisina também estão relacionadas ao glicogênio, proteínas e outras estruturas pertencentes à membrana citoplasmática. Contudo, os dados corroboram com as microscopias onde alterações brandas vistas nos espectros não geraram grandes mudanças nas microscopias. Apenas para **BC1**, **A4** e **T4** foram vistas mudanças significativas tanto nos espectros quanto nas microscopias de Live/Dead.

**Figura 6.** Espectro de FT-IR de *B. subtilis* antes e após tratamento com (A) células não tratadas; (B) nisina a 5  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ; (C) **BC1**; (D) **A4**; (E) **A10**; (F) **A11**; (G) **A19**; (H) **MA1**; (I) **T4**; (J) **T9A** e (K) **T10A**

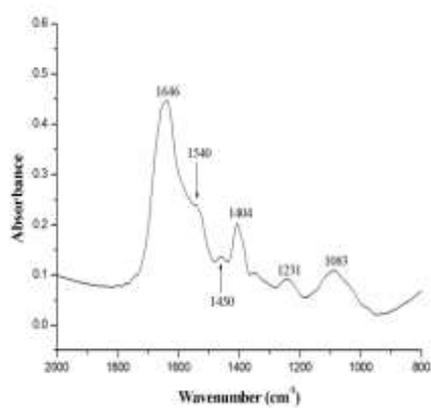




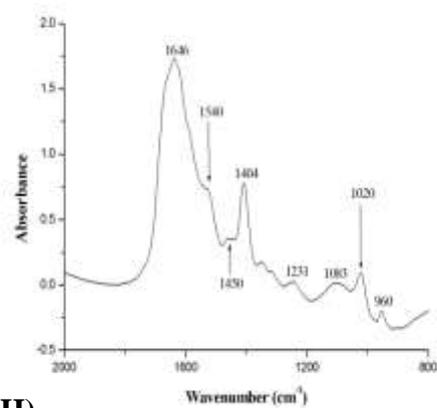
(E)



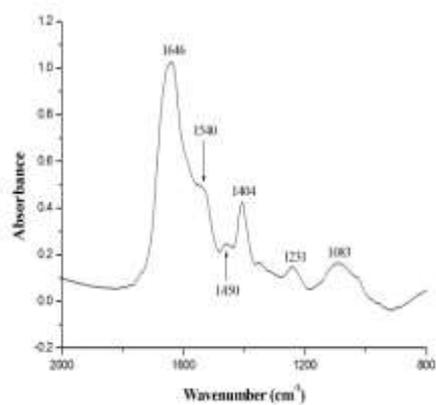
(F)



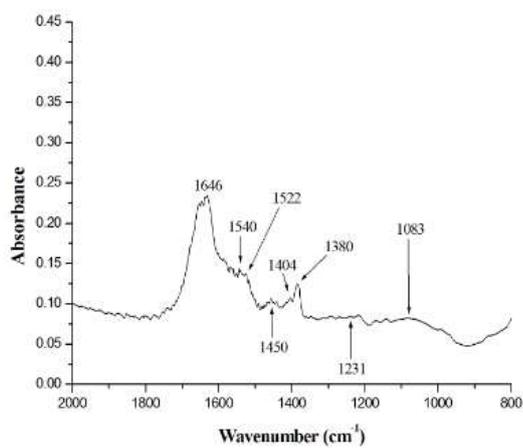
(G)



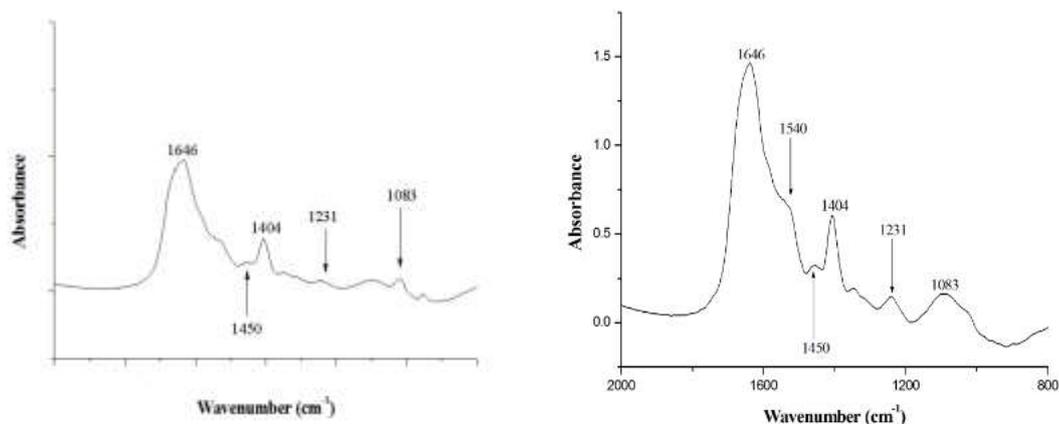
(H)



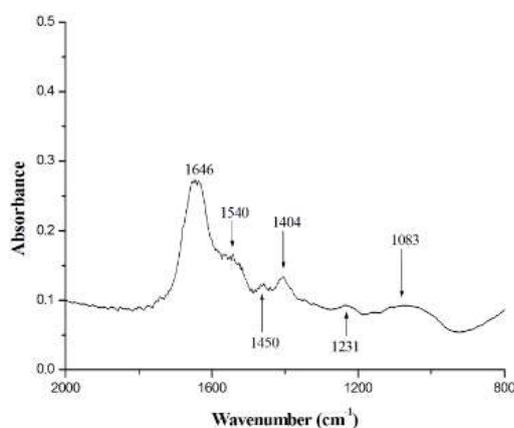
(I)



(J)



(K)



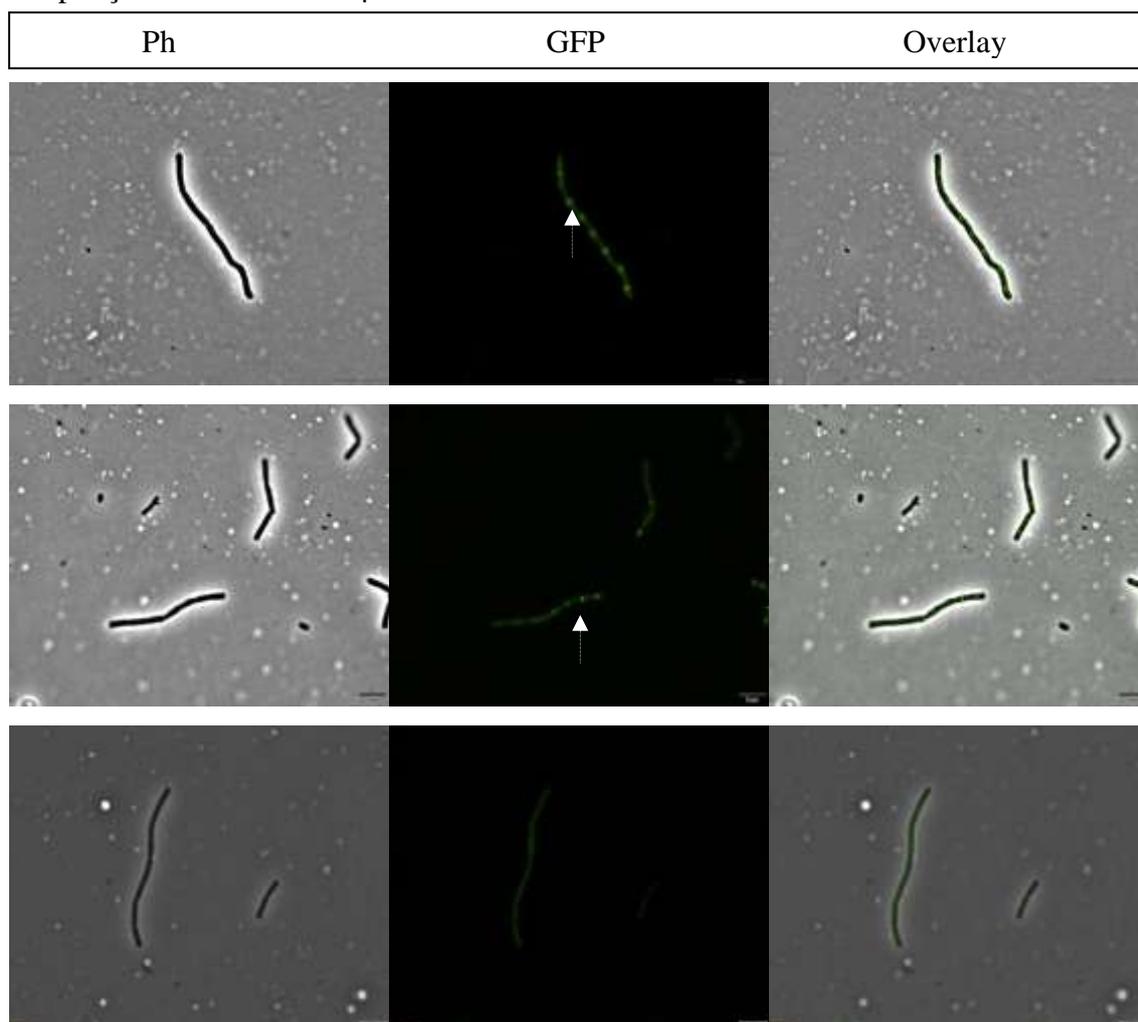
#### 2.4. Microscopia de Desestruturação de Septo de Divisão Celular

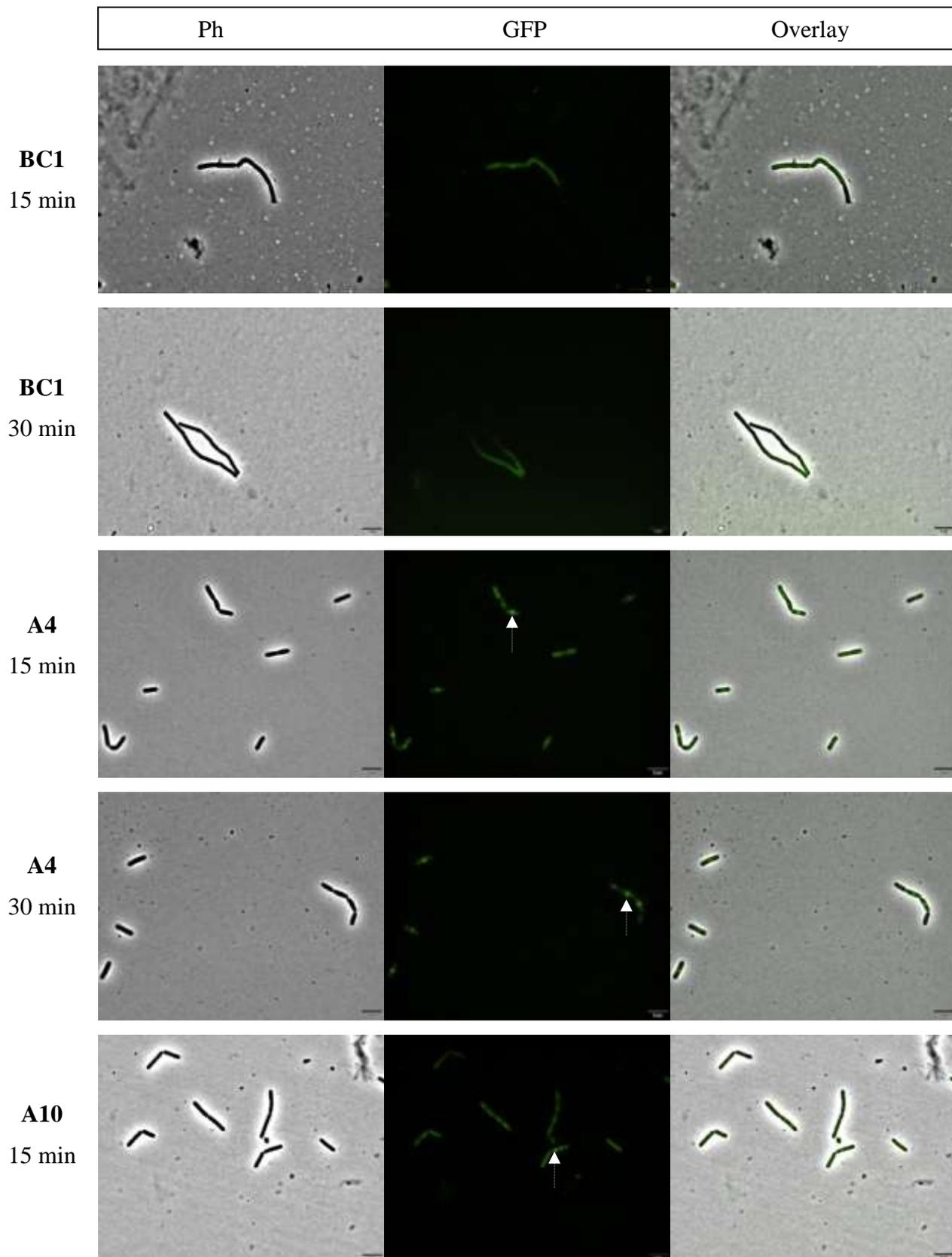
Neste teste foi possível observar a presença ou não do septo de divisão celular no centro da célula bacteriana através de microscopia de fluorescência, uma vez que uma das proteínas (FtsZ) que é essencial na montagem e recrutamento da formação do anel Z foi marcada com GFP, proteína que expressa cor verde fluorescente quando induzida.

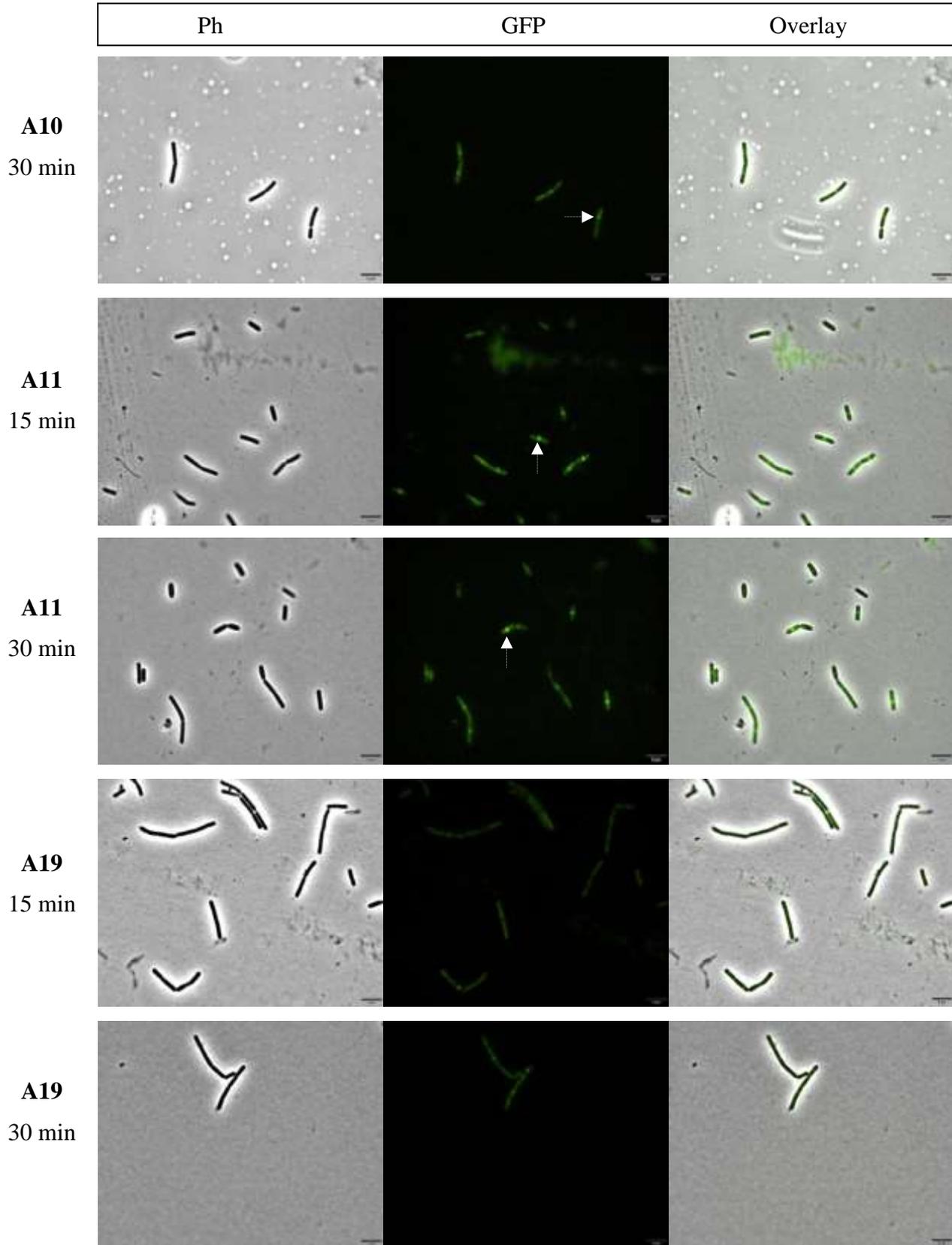
Na Figura 7, observa-se células não tratadas em divisão celular (controle negativo) bem como células tratadas com DMSO1% (controle do veículo), onde o septo divisional ocupa a porção central da célula, representado por uma barra verde brilhante – formado por FtsZ-GFP - perpendicular ao longo do eixo do bastonete (indicado pela seta). Quando as células de *B. subtilis* são tratadas com galato de hexila, usado como controle positivo, devido à sua capacidade de causar desestruturação no septo de *B. subtilis*, há acúmulo de fluorescência FtsZ-GFP no citoplasma das células (KRÓL et al., 2015) (Figura 7). A microscopia de fluorescência que visou a observação de FtsZ - proteína utilizada na formação de anel Z, para divisão celular –, indicou que houve desestruturação de septo de divisão celular quando células foram tratadas com os compostos **BC1**, **A19**, **MA1**, **T4**, **T9A** e **T10A**, dentro de 15

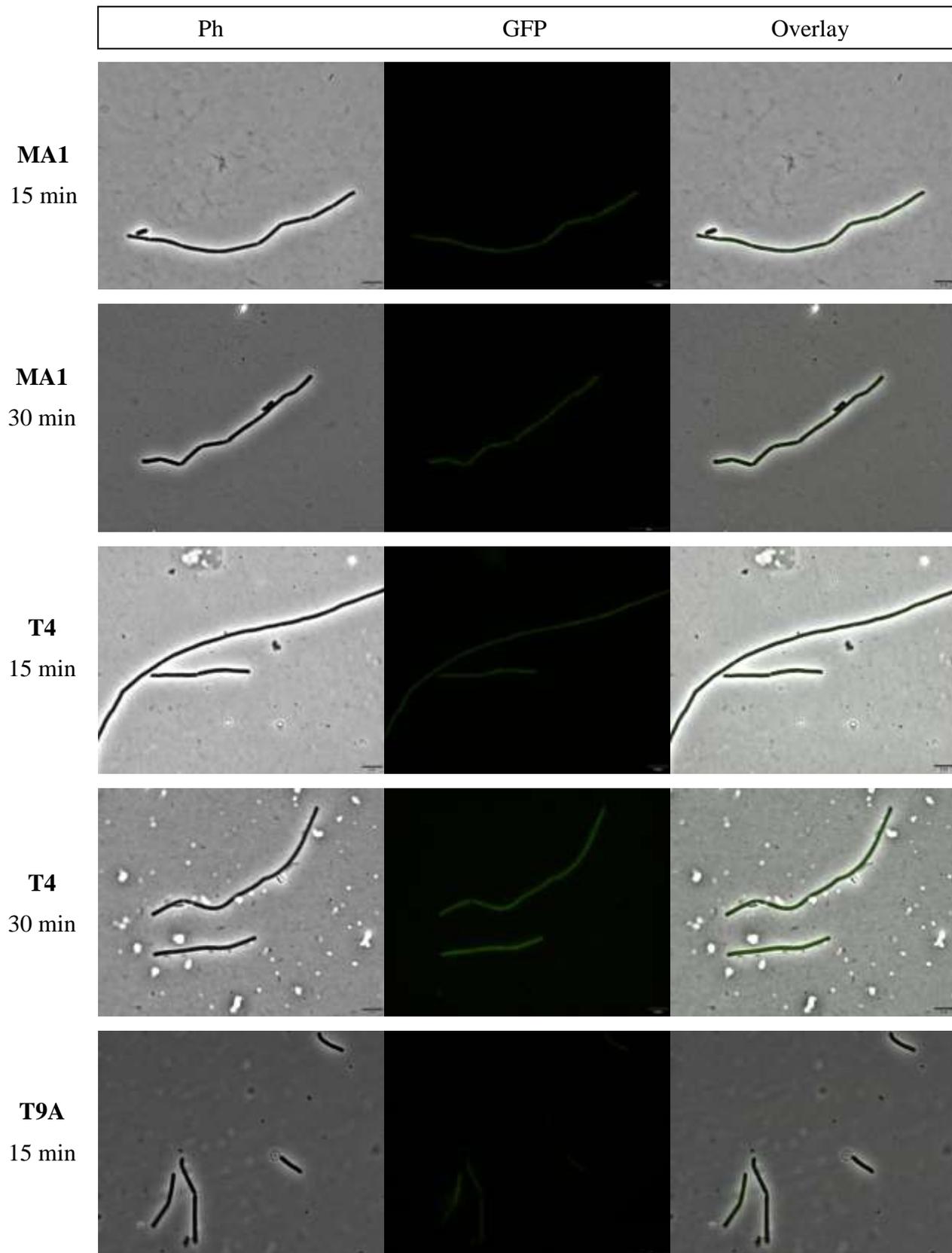
minutos, estendendo-se até os 30 minutos finais de análise e evidenciando que há perturbação na formação deste, para a MIC<sub>90</sub> estudada. Para os demais compostos foi observada presença de septo durante toda a análise, conforme apontam as setas nas figuras que registraram as observações com os compostos avaliados. Há, então, um indicativo de que o alvo dos compostos **BC1**, **A19**, **MA1**, **T4**, **T9A** e **T10A** seja na perturbação da divisão celular. Porém para confirmar se os compostos que foram avaliados e causaram ruptura de septo de divisão celular realmente estão associados a esse modo de ação alvo na bactéria, é possível realizar um ensaio que aponta o nível da atividade GTPásica vinculada à proteína que participa da divisão celular: FtsZ. Este ensaio foi realizado apenas para os compostos **BC1** e **T9A**.

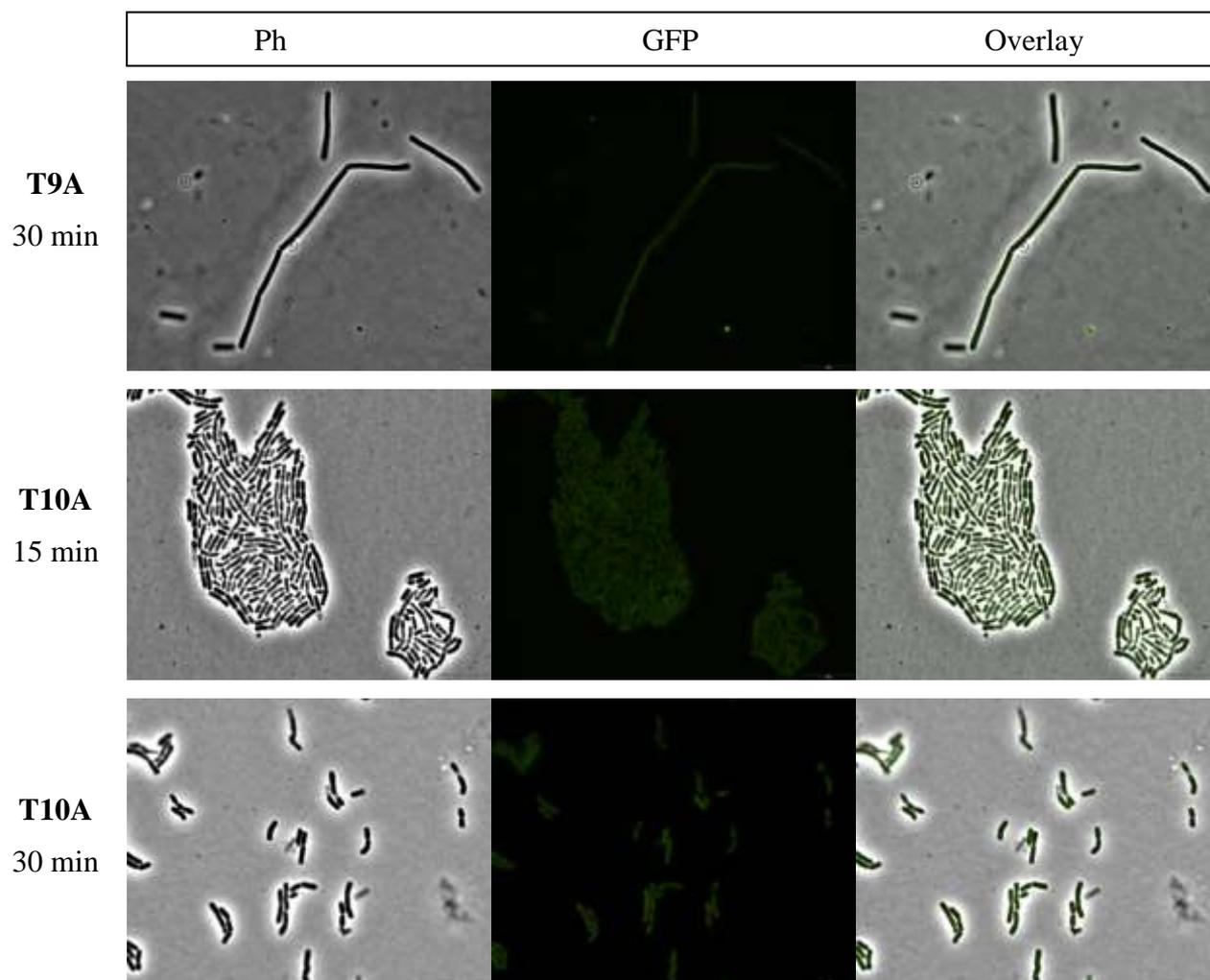
**Figura 7.** Avaliação de desestruturação de septo com *B. subtilis* FtsZ-GFP com células sem tratamento (controle negativo - CN); tratadas com DMSO 1% (controle do veículo); tratadas com galato de hexila (controle positivo - CP) (KRÓL et al., 2015) e tratadas com todos os compostos bioativos contra *B. subtilis* na MIC<sub>90</sub>, durante 15 e 30 minutos de contato. Ampliação: 100 x. Barra: 5μ











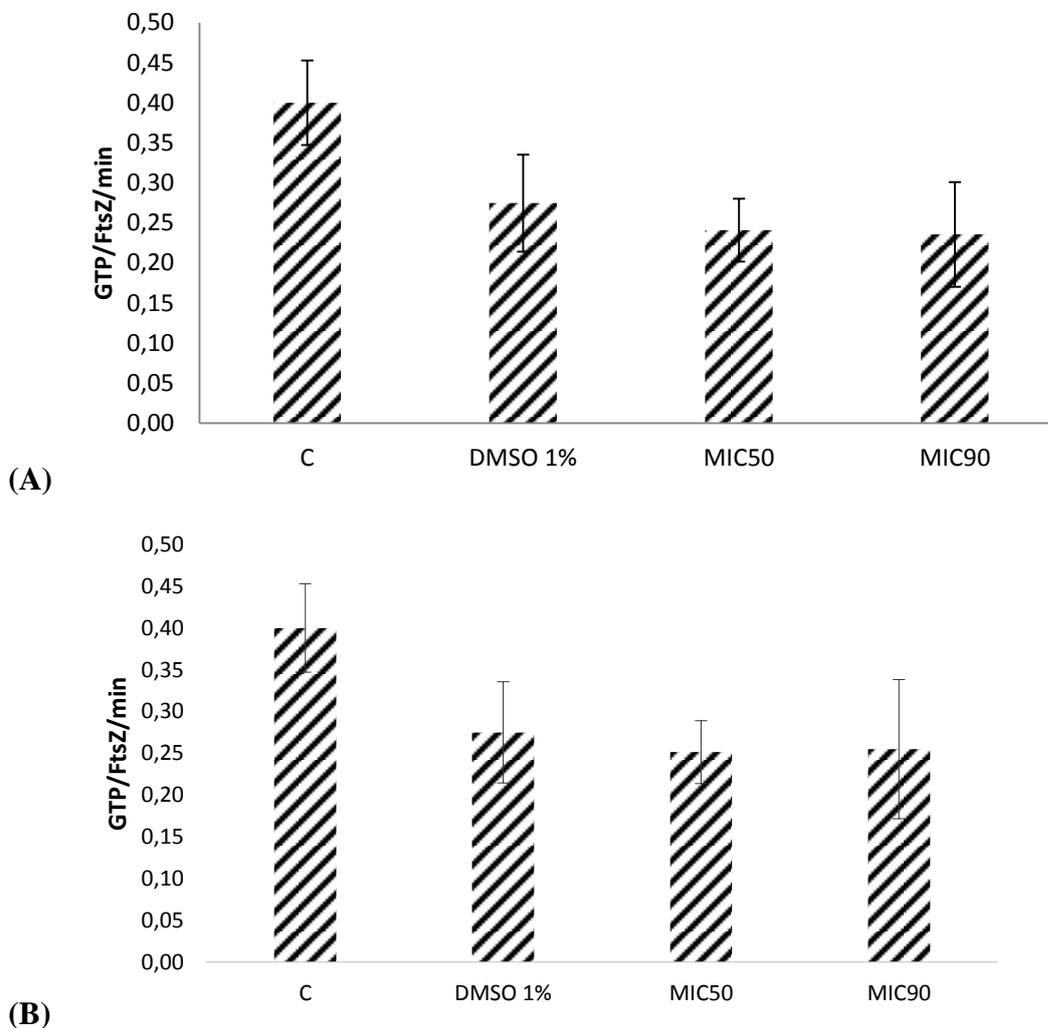
### 2.5. Ensaio da atividade GTPásica vinculada a FtsZ

A fim de verificar se o rompimento do septo divisional de *B. subtilis* estava relacionado à inibição da montagem de FtsZ, **BC1** e **T9A** foram avaliados quanto à capacidade de afetar a atividade GTPásica associado a FtsZ de *B. subtilis*. A hidrólise do GTP é usada para investigar os inibidores de FtsZ, porque a dinâmica de montagem de FtsZ é regulada pela atividade da GTPase (RAI et al., 2008). Assim, a redução na hidrólise de GTP é uma indicação de polimerização reduzida de FtsZ (RAMESHKUMAR et al., 2017). Para a determinação da atividade de GTPase de FtsZ, **BC1** e **T9A** foram testados nas MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> bem como 1% de DMSO foram usados como controle de veículo e C foram células não tratadas (controle negativo). A Figura 8 apresenta essas análises. Para os demais compostos não foi possível a realização desta análise até o presente momento.

A Figura 8 demonstra que quase não houve alteração na atividade de GTPase comparado ao veículo, uma vez que houve redução, porém, pouco significativa nos níveis da atividade GTPásica vinculada à ação de FtsZ. Dados estatísticos apontaram que essa pequena redução

na atividade não tem significância estatística, portanto, esta atividade não é dependente da concentração porque a porcentagem de inibição da montagem de FtsZ do composto é, praticamente, a mesma em MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>. Este dado confirma que a atividade da disrupção de septo não é devida à inibição da atividade GTPásica de FtsZ, no caso de **BC1** e **T9A**. Ambos compostos podem atuar em outra via, como **BC1** que demonstrou alteração na permeabilidade e estrutura da membrana citoplasmática, ou ainda os compostos podem atuar em outra proteína que auxilia na divisão celular ou até mesmo a disrupção de septo pode ser um alvo secundário dos compostos devido à perturbações específicas iniciais de um outro alvo.

**Figura 8.** Atividade GTPásica de FtsZ de *B. subtilis* tratados com (A) **BC1** e (B) **T9A**



Contudo pode-se afirmar que a célula bacteriana tem um citoplasma bem organizado e a localização correta das proteínas é essencial para a sua função, particularmente, para aquelas envolvidas em processos morfogenéticos (STRAHL et al., 2010). O aparelho de divisão celular e os elementos citoesqueléticos bacterianos são essencialmente estruturas ancoradas com a membrana citoplasmática (ADAMS et al., 2009). A fixação da membrana também desempenha um papel crítico na segregação cromossômica (MARSTON et al., 1998) e na regulação da divisão celular pelo sistema Min (MARSTON et al., 1998; LUTKENHAUS, J., 2007). FtsZ também têm mostrado ser essencial para a divisão e viabilidade celular bacteriana (RAI et al., 2008). FtsZ, é um homólogo procariótico da tubulina eucariótica que polimeriza para formar um anel Z no meio da célula bacteriana, orquestrando a divisão celular desta (MARGOLIN, W., 2005). O anel Z só deve ser formado no centro celular entre os cromossomos filhos recém-formados e este processo é cuidadosamente regulado. Em bactérias em forma de bastonete, o sistema Min evita a polimerização de FtsZ próximo aos pólos celulares (LUTKENHAUS, J., 2007) e as proteínas MinC e MinD, em *B. subtilis*, se acumulam nos devidos locais de divisão celular e pólos celulares (MARSTON et al., 1998). A proteína FtsA interage diretamente com FtsZ e estimula a montagem do anel Z (ADAMS et al., 2009). No entanto, FtsA também tem associação com a membrana citoplasmática e esta é conduzida por uma hélice anfipática de ligação à membrana em seus C-terminais (SZETO et al., 2003; PICHOFF et al., 2002). As hélices anfipáticas podem se ligar às membranas, enterrando seu lado apolar na bicamada lipídica. A ligação de lipídeos é ainda estabilizada por resíduos carregados que interagem eletrostaticamente com os grupos da cabeça lipídica carregada. Como consequência, isso permite uma ligação reversível e regulada que é influenciada tanto pela composição lipídica quanto pelas propriedades físicas da membrana (JOHNSON et al., 1999; CORNELL et al., 2006). Segundo Strahl et al. (2010), dados revelam que o potencial de membrana interfere na organização espacial das proteínas do citoesqueleto e na divisão celular, para ensaios com MinD. Acredita-se que para FtsA seguisse o mesmo processo, estimulando a interação entre a hélice anfipática C-terminal e a bicamada lipídica. Como muitos antibióticos visam a membrana celular, é possível que eles possam atuar dissipando o potencial de membrana (LOHNER, K., 2009). Possivelmente, os compostos **BC1** e **T4** podem atuar dessa maneira, causando deslocalização de proteínas de importância morfogenética, resultante da dissipação do potencial de membrana, visto que tanto septo quanto membrana bacteriana são danificados com a presença e contato desses compostos. No entanto não foi detectada atividade GTPásica significativa vinculada a FtsZ para **BC1** (Figura 8A), ou seja, não há indicativo de que **BC1** atue em septo de divisão

celular, sendo este um alvo secundário que foi perturbado em decorrência de alguma parada causada pela atuação primária que **BC1** gerou. Para **T4** não foi realizado o teste de atividade GTPásica, o que seria extremamente importante para observar se **T4** tem como sítio alvo a membrana citoplasmática e a divisão celular bacteriana, indicando ser um composto de ação multitarget, ou ainda se a atuação em membrana, primariamente, afeta o processo de divisão celular, secundariamente.

Para **A4**, foi observada alta permeabilidade de membrana citoplasmática no teste com o kit Live/Dead, mas o espectro de FT-IR sugeriu pouca alteração na estrutura da membrana, embora esse último teste seja qualitativo. Também não houve desestruturação de septo de divisão celular. Sendo assim, esse resultado pode inferir que o mecanismo de ação de **A4**, provavelmente, esteja associado à membrana citoplasmática bacteriana ou a algum outro mecanismo de ação que não tenha sido investigado e que a alteração na permeabilidade e desestruturação da membrana citoplasmática bacteriana possa ser um alvo secundário da atuação do composto. Já os compostos **A19**, **MA1**, **T9A** e **T10A** não apresentaram permeabilidade de membrana significativa no ensaio com o kit Live/Dead, embora tenham apresentado desestruturação de septo de divisão celular nos primeiros 15 minutos, estendendo-se até 30 minutos finais de análise. Na Figura 7 foi possível observar apenas pontuações fluorescentes espalhadas pela célula bacteriana, evidenciando a desestruturação na formação do septo de divisão celular. É provável que o mecanismo de ação desses quatro compostos esteja associado com a perturbação em divisão celular, prejudicando a polimerização do anel Z. Para verificar se esses compostos atuam, especificamente, em FtsZ, ou ainda em alguma outra proteína constituinte do arcabouço do septo divisional seria necessário a realização do ensaio de atividade GTPásica a fim de comprovar a ação desses compostos associado a FtsZ ou não. No entanto o ensaio de atividade GTPásica foi realizado apenas para **T9A** e **BC1**, como descrito anteriormente e, assim como o resultado obtido em **BC1**, não foi detectada atividade GTPásica significativa vinculada a FtsZ para **T9A** (Figura 8B), ou seja, não há indicativo de que **T9A** atue em septo de divisão celular. Sugere-se, então, que a perturbação em divisão celular causada por **T9A** é um alvo secundário que foi perturbado em decorrência de alguma parada causada pela atuação primária gerada por esse composto. Para **A19**, **MA1** e **T10A** não foi realizado o teste de atividade GTPásica o que seria extremamente importante pois seria possível notar se esses compostos têm como sítio alvo a divisão celular bacteriana, especificamente em FtsZ ou se pode-se inferir que essa perturbação está associada a outra proteína participante da divisão celular. Também pode-se

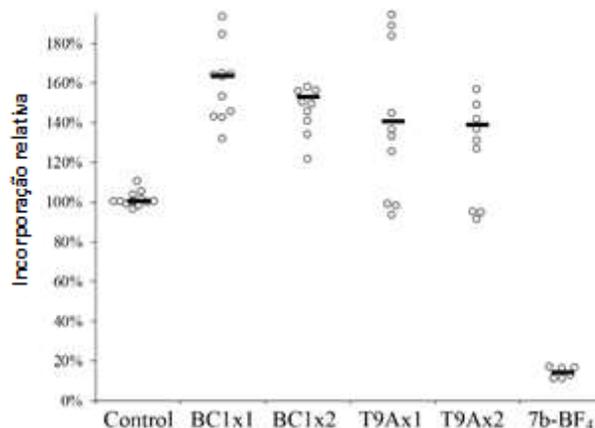
sugerir, com a realização deste teste, se algum outro mecanismo primário afetado por esses compostos pode alterar o processo de divisão celular, secundariamente.

Para os dois compostos **A10** e **A11**, que também apresentaram ação antibacteriana contra *B. subtilis*, não foi observada ação de ruptura de septo de divisão celular e nem permeabilidade de membrana citoplasmática significativa. Seria de extrema importância a realização do ensaio de síntese de macromoléculas bem como dosagem de ATP intracelular para, possivelmente, desvendarmos o modo de ação desses dois compostos. No entanto tal teste não foi realizado para esses compostos até o presente momento. Sendo assim, seguiu-se para o teste de síntese de macromoléculas apenas com os compostos **BC1** e **T9A**.

### 2.6. Síntese de Macromoléculas

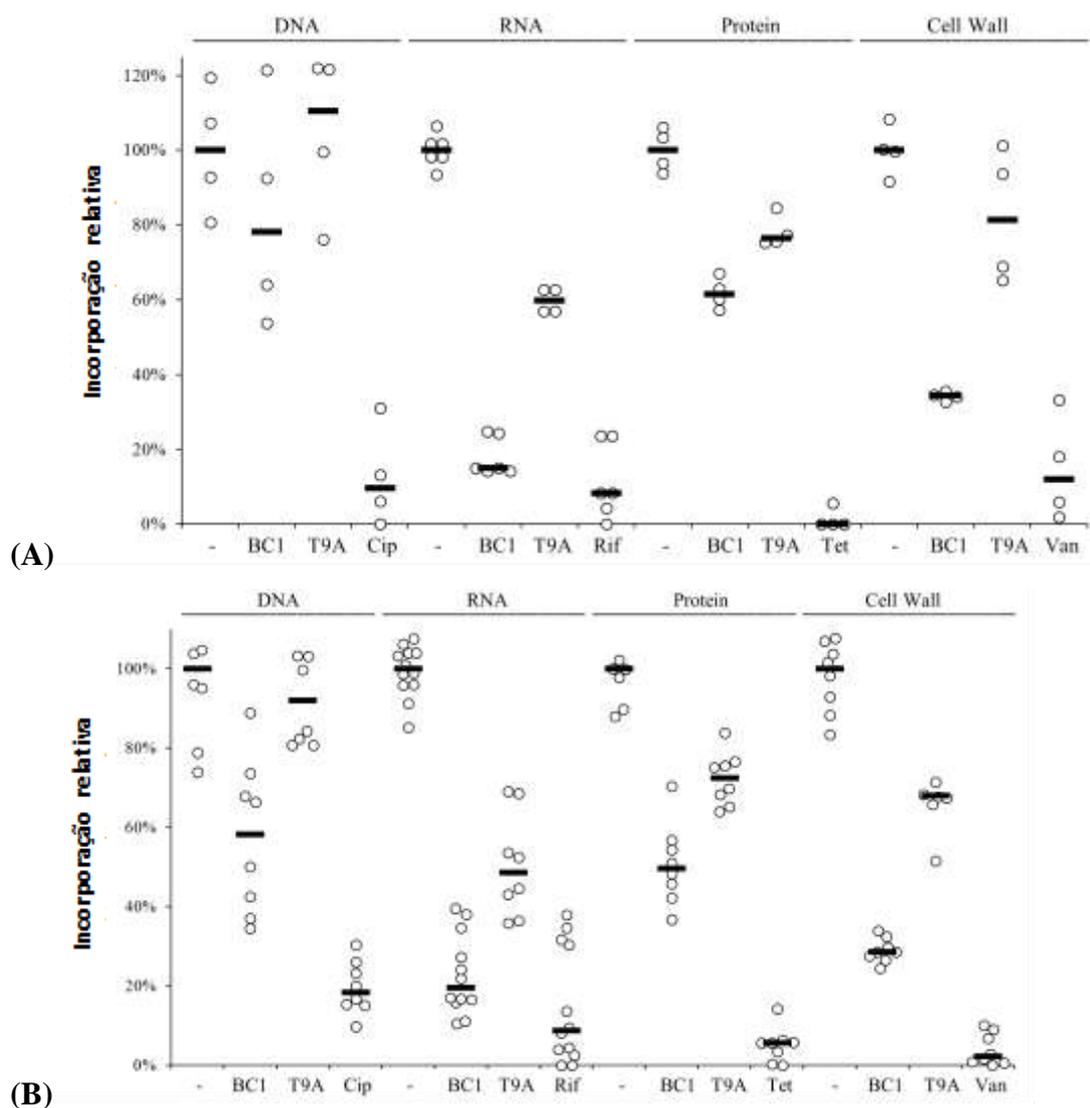
Para a avaliação da concentração de ATP intracelular em *B. subtilis*, após 80 min de tratamento com os compostos, não houve alterações comparadas aos controles. Considerando que 100% indica que não houve quaisquer perturbações na via avaliada e 0% indica que houve perturbação na via em detrimento da adição de composto, nota-se, na Figura 9, que a concentração de ATP em *B. subtilis*, após 30 min de tratamento com **BC1** e **T9A** aumentou em comparação com a amostra controle negativa (Figura 9). Isto pode ser devido a processos como a síntese de parede celular e RNA sendo inibida ou bloqueada, causando uma diferença entre produção e consumo. Este efeito foi observado anteriormente para os inibidores de proteínas cloranfenicol e estreptomicina (OHWADA E SAGISAKA, 1987). Mesmo assim, conforme nota-se nos resultados, fica evidente que os compostos **BC1** e **T9A** não afetam diretamente a síntese de ATP em *B. subtilis*, ou seja, não afetam a via metabólica energética.

**Figura 9.** Concentração de ATP (unidades relativas de luz) após 30 minutos de tratamento de células de *B. subtilis* com 1x e 2xIC de **BC1** e **T9A**; 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 7b-BF<sub>4</sub>. 100% foi definido como a mediana da luminescência da amostra controle sem qualquer composto adicionado, cada círculo representa uma réplica e barras indicam a mediana de cada condição testada



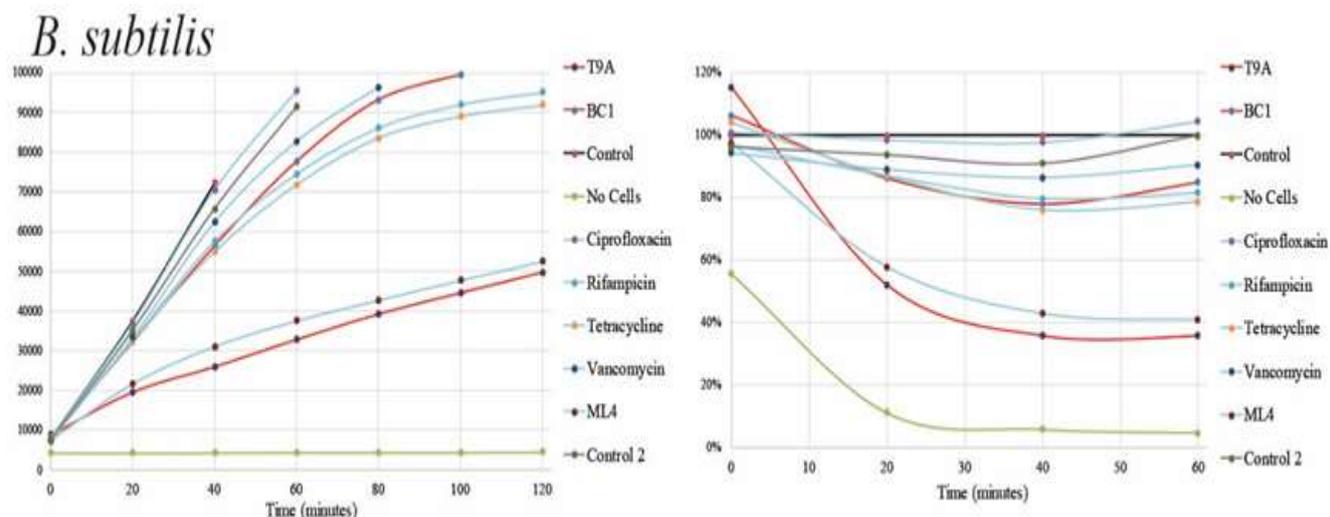
A Figura 10 indica o que ocorreu quando as quatro vias analisadas foram avaliadas frente aos compostos **BC1** e **T9A**. Foi possível observar, também, uma análise comparativa de **BC1** e **T9A** com os antibióticos comercialmente existentes, que apresentam diferentes alvos de ação nas bactérias (controles positivos). Vale ressaltar que para esse teste o valor de 100% indica que não houve quaisquer perturbações na via avaliada, sendo que o controle negativo (-) assumiu valores igual ou o mais próximo possível de 100%. Já para o caso de ocorrer alteração na via avaliada o valor de incorporação relativa assume percentuais mais próximos de 0%. O ensaio de síntese de macromoléculas apontou que algumas vias metabólicas de *B. subtilis* foram afetadas pelo composto **BC1** nos 80 minutos monitorados, tais como a via da síntese de RNA e a de parede celular (peptioglicano). Para a síntese de RNA com atuação de **BC1** nota-se que houve cerca de 20% de incorporação, apenas, e para a parede celular houve cerca de 40%, evidenciando a perturbação/bloqueio na síntese dessas vias comparadas aos controles negativo (-) e positivo. Para as análises com **T9A** observou-se alterações nas mesmas vias, porém de forma mais branda.

**Figura 10.** Efeitos em *B. subtilis* para as quatro principais vias de síntese macromolecular aplicando **BC1** e **T9A**, tanto em comparação com controlos negativos (-) como antibióticos com atividades específicas direcionadas para DNA, RNA, proteína e síntese de peptidoglicano: Ciprofloxacina (Cip), Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tet) e Vancomicina (Van); respectivamente. **(A)** tratamento em 60 minutos **(B)** tratamento em 80 minutos. Cada círculo representa uma réplica experimental, barras indicam a incorporação relativa mediana em cada condição testada



Finalmente a Figura 11 apresenta apenas os resultados avaliados pelo REMA em curto período, objetivando mostrar que as células bacterianas não estavam mortas, ou seja, havia atividade respiratória e o que estava ocorrendo nas vias de síntese de macromoléculas era, realmente, devido à adição de composto.

**Figura 11.** Resultados de REMA (controle 2 para *B. subtilis* é a mediana dos replicados que geram overflow após 60 minutos; o controle é a mediana incluindo os replicados que geram overflow após 40 minutos) note que 100% ocorre em 60 minutos



Finalmente é possível afirmar que nove compostos apresentaram ação antimicrobiana contra *B. subtilis* sendo que há um indicativo de que **BC1** atue na estrutura da membrana citoplasmática bem como no bloqueio das sínteses de RNA e parede celular. Em outras palavras, há indícios de que **BC1** tenha atuação multi target, ou ainda, segundo Micklefield (2004) afirmou para a daptomicina, **BC1** pode ligar-se à membrana bacteriana e causar uma rápida despolimerização no potencial de membrana, determinando a inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, além do extravasamento de conteúdo citoplasmático e morte bacteriana, assim como a daptomicina o faz. Já o composto **A4** aponta, aparentemente, agir na estrutura da membrana citoplasmática de *B. subtilis*, embora o espectro FT-IR não aponte fortes alterações. No entanto sabe-se que a análise com FT-IR é qualitativa e a quantidade de células pode ter afetado o resultado. Não foi encontrado o modo de ação para os compostos **A10** e **A11** sendo a realização do ensaio de síntese de macromoléculas bem como dosagem de ATP intracelular um teste que poderia indicar a ação de ambos. Em contrapartida os compostos **A19**, **MA1** e **T10A** causaram disrupção no septo de divisão celular e avaliar a atividade GTPásica vinculada a FtsZ parece ser o melhor caminho para certificar o modo de ação desses compostos.

O composto **T4** mostrou ação similar a **BC1** quando, além de alterar a estrutura da membrana citoplasmática, também afetou a montagem do septo de divisão celular. Sendo assim, esses resultados podem sugerir que **T4** seja um composto multi target, no entanto seria necessária a realização do ensaio da atividade GTPásica vinculada a FtsZ e, possivelmente,

ensaios de síntese de macromoléculas e ATP intracelular a fim de concluir se a ação primária é em membrana, afetando proteínas que ancoram nela e também participam da construção do septo de divisão celular, como por exemplo FtsA, ou se o composto atua em várias outras vias, sem apresentar especificidade.

Finalmente, o composto **T9A** mostrou atuar em disrupção de septo de divisão celular, porém o ensaio de atividade GTPásica associado a FtsZ foi realizado e não foi resgistrada alteração significativa. Sendo assim, os testes de síntese de macromoléculas indicaram uma leve alteração/bloqueio na síntese de RNA e parede celular, sugerindo ser um composto multi target, também. Uma vez que há parada de transcrição todas as outras vias são afetadas e bloqueadas, explicando o porquê da perturbação da via de divisão celular ter sido observada para o composto **T9A**.

### 3. CONCLUSÃO

Conclui-se que a síntese e modificação realizada nas chalconas foi eficaz com relação a atividade antibacteriana e nove compostos foram ativos contra *Bacillus subtilis*. Há indicativos de que alguns compostos tenham ação multi target, tais como **BC1**, **T4** e **T9A**, já para outros sugere-se que novos estudos sejam realizados para certificação de seu modo de ação. Porém os nove compostos demonstraram ser promissores para possíveis investimentos e novas etapas de estudos vinculados à ação farmacológica.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. W.; ERRINGTON, J. Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. **Nat. Rev. Microbiol.** 7:642–653, 2009.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. of Ethnopharmacol.** 74:113-123, 2001.
- ALCARÁZ, L. E.; BLANCO, S. E.; PUIG, O. N.; TOMÁS, F.; FERRETTI, F. H. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Theor. Biol.** 21;205(2) :231-40, 2000.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **J. Agric. Food Chem.** 49: 4168-4170, 2001.

- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JOGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. Química Orgânica, 2ª ed., LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, Rio de Janeiro, 962 p, 1976.
- ALMEIDA, L. P. Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa L.*, avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese in vitro na produção de curcuminóides e óleos essenciais. Tese de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.79-85, 2008a.
- ALVAREZ M.; ZARELLI, E.P.; PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. **Biocell.**, v. 28, p. 31-34, 2004.
- ANAND, P.; THOMAS, S. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B.; THARAKAN, S. T.; MISRA, K.; PRIYADARSINI, I. K.; RAJASEKHARAN, K. N.; AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochem Pharmacol** , v. 76, p. 1590-1611, 2008.
- ANAND, N.; SINGH, P.; SHARMA, A.; TIWARI, S.; SINGH, V.; SINGH, D. K.; SRIVASTAVA, K. K.; SINGH, B. N.; TRIPATHI, R. P. Synthesis and evaluation of small libraries of triazolylmethoxy chalcones, flavanones and 2-aminopyrimidines as inhibitors of mycobacterial FAS-II and PknG. **Bioorg. Med. Chem.**, 20, 5120–5163, 2012.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R.; “Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications”. **New York: Taylor & Francis Group**, 1ª ed., 2006.
- ANDRADE, C. L. **Histopatologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte**. 62 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Med. Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2005.
- ANDRIOLO, A. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. São Paulo: Editora Manole, 2005.

- AARESTRUP, F. M.; BUTAYE, P.; WOLGANG, W. Nonhuman Reservoirs of *Enterococci*. In: GILMORE, M. S. The *Enterococci* – **Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, DC: ASM Press, 2002.
- APIFARMA. **Quanto custa desenvolver um medicamento**. Disponível em: <https://www.apifarma.pt/salaimpresa/Infografias/Documents/Quanto%20custa%20desenvolver%20um%20medicamento.pdf>. Acesso em 19/11/2018.
- ARNOW, P. M.; FLAHERTY, J. P. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: C. Glenn Mayhall (ed). Hospital Epidemiology and Infection Control, 1st ed. Williams & Wilkins. Galvestone, p. 366-387, 1996.
- ARQUÉS, J.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. **European Food Research and Technology**, v.227,p. 77-82. 2008.
- ASAI, A.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 63, n. 12, p. 2118 - 2122, 1999.
- ASSIS, A. C. B.; SANTOS, B. M. Patogenicity In Vivo and In Vitro of *Escherichia coli* Samples from Avian Origin. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.3 n.2, 2001.
- ATTAR, S.; O'BRIEN, Z.; ALHADDAD, H.; GOLDEN, M. L.; CALDERÓN-URREA, A.; Ferrocenylchalcones versus organic chalcones: A comparative study of their nematocidal activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 19, 2055–2073, 2011.
- BANDGAR, B. P.; GAWANDE, S. S.; BODADE, R. G.; TOTRE, J. V.; KHOBRADE, C. N.; “Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazole chalcones as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents”. **Bioorgan. Med. Chem.** v.18, p. 1364-1370, 2009.
- BANO, S.; JAVED, K.; AHMAD, S.; RATHISH, I. G.; SINGH, S.; CHAITANYA, M.; ARUNASREE, K. M.; ALAM, M. S. Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. **Eur. J. Med. Chem.**, 65, 51–59, 2013.

- BANNERMAN, T.M. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R. (Ed.). Manual of clinical microbiology. 8.ed. Washington, DC: ASM. V.1, p.384-404, 2003.
- BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Trends Ecol Evol.**, 12:482-7, 1997.
- BARCELOS, A. S. **Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária.** 83 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF W. M. Diseases of poultry. (11<sup>a</sup> ed.). Iowa, p. 138-144, 2003.
- BARREIRO, E.; VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V.; FRAGA, C. Molecular Hybridization: An useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 14, p. 1829-1852, 2007.
- BARTH, A. L.; PITT, T. L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 2, p. 43-61, 1998.
- BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, AEM. 03043-10, 2011.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. (Ed.). Doenças das aves. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 435-454.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: FACTA, p.455-469. 2009.
- BERNDT, A. et al. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.
- BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. **J. Microbiol. Meth.** v. 57, p. 231-9, 2004.

- BIEBER, L. M. Química Orgânica Experimental: integração da teoria, experimento e análise. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 605-610, 1999.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. *O Biológico* 23, p. 101-111, 1957.
- BITENCOURT, H. R.; SANTOS, L. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; “Allelopathic of synthetic chalcone, its precursors and of related cetones and aldehydes”. **Revista Planta Daninha**. v.25, n.4, p.747-753, 2007.
- BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbiol.** 13, 42–51, 2015.
- BONTEN, M.K.M.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R.A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **Lancet. Infect. Dis.** v. 1, p. 314-325, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm)>. Acesso em: 07/10/2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Brasília. 2012. 171 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 07/10/2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (MS/SVS/DEVIT). Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE – DTA. São Paulo, SP, 2014. Disponível em:<[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlves\\_VigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlves_VigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)> Acesso em: 08/10/2018.
- BRASIL, RESOLUÇÃO SAA Nº 10, DE 20 DE FEV. DE 2017. Delimita e oficializa todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco, relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e institui procedimentos fitossanitários. São Paulo – SP, fev. 2017. Disponível em <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=337839>. Acesso em 01/10/2018.

- BRAUNWALD, E. et al. *Harrison Medicina Interna*. 15. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.
- BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.
- BRUNINGS, A. M; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 3, 141-157, 2003.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BURT, S. A.; VAN DER ZEE, R.; KOETS, A. P.; GRAAFF, A. M.; VAN KNAPEN, F.; GAASTRA, W.; VELDHUIZEN, E. J. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Appl Environ Microbiol**, v.73, n.14, p.4484-4490. 2007.
- BUSH, K. Metallo  $\beta$ -lactamases: a class apart. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. S48-S53, 1998.
- BUSH, K. New  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085, 1089, 2001.
- BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G.; DAVIES, J.; EISENSTEIN, B.; HUOVINEN, P.; JACOBY, G. A.; KISHONY, R.; KREISWIRTH, B. N.; KUTTER, E.; LERNER, S. A.; LEVY, S.; LEWIS, K.; LOMOVSKAYA, O.; MILLER, J. H.; MOBASHERY, S.; PIDDOCK, L. J.; PROJAN, S.; THOMAS, C. M.; TOMASZ, A.; TULKENS, P. M.; WALSH, T. R.; WATSON, J. D.; WITKOWSKI, J.; WITTE, W.; WRIGHT, G.; YEH, P.; ZGURSKAYA, H. I. Tackling antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbiol.** 9, p. 894–896, 2011.
- CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In.: TRABULSI, L.R. et al. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo : Atheneu, p.215-228, 2000.
- CAMPOS, T. A. **Caracterização clonal e biológica de linhagens de *Escherichia coli* de origem aviária**. 125 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- CANTAS, L., SHAH; S. Q., CAVACO; L. M.; MANAIA, C. M.; WALSH, F., POPOWSKA, M.; SØRUM, H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial

resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Front Microbiol**, v.4, p.96, 2013.

- CARATTOLI, A. et al. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strain isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5 p. 1269-1272, 2002.
- CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J. Pediatr.** v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.
- CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**. v.5,p.26-32. 2007.
- CARPENTER, C. F.; CHAMBERS, H. F. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. **Clin Infect Dis.** 1;38(7):994-1000, 2004.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz. J. Infect. Dis.** v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.
- CAVALCANTI, S. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 9, n. 1, p. 56- 63, 2005.
- CDC. Interim guidelines for prevention and control of stafilococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. **MMWR**, v. 46, n. 26, p. 626-7, 1997.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Braenderup infections linked to nut butter: Clinical Features/ Signs and Symptoms. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella*. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 08/10/2018.

- CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. Cúrcuma: medicinal, condimentar e outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.171-175, 2000.
- CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; BRAZ, R. F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 604- 611, 2001.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin. Microbiol. Rev** v.13, p.686–707, 2000.
- CHATTERJEE, C.; PAUL, M.; XIE, L.; VAN DER DONK, W. A. Biosynthesis and mode of action of antibiotics. **Chem. Rev.** 105:633-684, 2005.
- CHERNAKI-LEFFER, A.M.; BIESDORF, S.M.; ALMEIDA, L.M.; LEFFER, E.V.B; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, vol. 4, núm. 3, pp. 243-247, 2002.
- CHERRINGTON, C. A.; HINTON, M.; CHOPRA, I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology** 68, 69-74, 1990.
- CHIRIAC, A. I.; KLOSS, F.; KRÄMER, J.; VUONG, C.; HERTWECK, C.; SAHL, H. G. Mode of action of closthioamide: the first member of the polythioamide class of bacterial DNA gyrase inhibitors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, dkv161, 2015.
- COLLABORATION A. *Bacillus subtilis*. (2016).
- CONNELLY, M. B.; YOUNG, G. M.; SLOMA, A. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 186:4159-4167, 2004.
- CORNELL, R. B.; TANEVA, S. G. Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties. **Curr. Protein. Pept. Sci.** 7:539–552, 2006.
- CRISTINA, A.G.; COSTERTON, J. W. Bacteria –laden biofilms – a hazard to orthopedic prostheses. **Infect. Surg.** v.3, p. 655-662, 1984.
- CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature**, 8: 20-38, 2010.

- CUONG, N. V. et al. Preparation, characterization and antibacterial curcumina encapsulated chitosan-PAA silver nanocomposite films. In: **5th International Conference on Biomedical Engineering in Vietnam**. Springer International Publishing. p. 58-61, 2015.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 38, 99–107, 2011.
- D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. Salmonella species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Ed). *Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers*. Washington: ASM Press, 2007.
- DASGUPTA, M. K; COSTERTON, J. W. Significance of biofilm adherent bacterial microcolonies on Tenckhoff catheters in CAPD patients. **Blood Purif.** v. 7, p. 144-155, 1989.
- DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. **Int. Med. J.** v. 35, p. 79S-96S, 2005.
- DE BOER, A. S.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36:1–4, 1991.
- DE LAS HERAS, B. et al. Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, n. 2, p. 171-185, 2003.
- DEVASAHAYAM, G.; SCHELD, M.; HOFFMAN, P. S. Newer antibacterial drugs for a new century. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 19, 215–234, 2010.
- DEVIA, A. C.; FERRETTI, F. A.; PONCE, C. A.; TOMÁS, F. Conformational equilibrium and intramolecular hydrogen bond of 4'X and 4X substituted 2'(OH) chalcones. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 493, p. 187-197, 1999.
- DHAR, D. N.; “The Chemistry of Chalcones and Related Compounds”. **New York: Wiley**, 1981.
- DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M.; “Bioactivities of chalcones”. **Curr. Med. Chem**, v. 6, p. 1125-1149, 1999.
- DOAN, T. N.; TRAN, D.T. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of a novel series of chalcones, pyrazolic chalcones, and allylic chalcones. **Pharmacol. & Pharm.**, 2, p. 282–288, 2011.
- DONÁDIO, S. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 175-185, 2002.

- DOUBLET, B. et al. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the floR and blaCMY-2 genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 2, p. 301–305, 2004.
- DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clin Microbiol Rev.** 1993 6(4): 324-38, 1993.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.26, n.4, p. 527-31, 2003.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **J. of Ethnopharmacol.** 97: 305-311, 2005.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, 2006.
- DUC, L. E. H.; DONG, T. C.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D.; TAYLOR, J.; CUTTING, S. M. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. **Int. J. Food. Microbiol.** 102:245-251, 2005.
- <<https://www.drugs.com/>> Acesso em: 02 de out. de 2018.
- EFSA - European Food Safety Authority. EFSA explains zoonotic diseases: Salmonella. 2014. Disponível em: <[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheetsalmonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf)>. Acesso em 08/10/2018.
- EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T. Chemical Compositions and Antioxidant/Antimicrobial Activities of Various Samples Prepared from *Schinus terebinthifolius* Leaves Cultivated in Egypt. **J. Agric. Food Chem.** 57, 12, p. 5265-5270, 2009.
- ELNAKADY, Y. A.; CHATTERJEE, I.; BISCHOFF, M.; ROHDE, M.; JOSTEN, M.; SAHL, H.; HERRMANN, M.; MÜLLER, R. Investigations to the antibacterial mechanism of action of kandomycin. **PloS one** 11, e0146165, 2016.
- EL PAÍS. **Desenvolver novos medicamentos não é tão caro como dizem farmacêuticas.** Disponível em:

<[https://brasil.elpais.com/brasil/2017/09/13/ciencia/1505318927\\_965642.html](https://brasil.elpais.com/brasil/2017/09/13/ciencia/1505318927_965642.html)>.

Acesso em 19/11/2018.

- EPAND, R. M.; WALKER, C.; EPAND, R. F.; MAGARVEY, N. A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochim. Biophys. Acta**, 1858, 980–987, 2016.
- ESATBEYOGLU, T.; REHBERG, C.; ULBRICH, K.; RIMBACH, G.; ROHN, S. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. **Food & Function**, 6(3), 2015.
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, p. 1-54, 2002.
- FAVERO, M.S.; CARSON, L.A.; BOND, W.W. *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals. **Science**, v. 173, p. 836-838, 1971.
- FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ, 2005.
- FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p. 329-338, 2008.
- FLICK, M. R.; CLUFF, L. E. *Pseudomonas* bacteremia. **Am J Med**, v. 60, p. 501-508, 1976.
- FILHO, A. B. C.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES M. **Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais**. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 171-175. 2000.
- FOSTER, T. J.; HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, v. 6, p. 484-8, 1998.
- FRECH, G.; SCHWRAZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 633-641, 2000.

- FREITAS C. C.; FONSECA, A. Aspectos genéticosbioquímicos da resistência bacteriana aos antibióticos. In: ZANON, U.; NEVES, J. Infecções hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 207-49, 1987.
- FUNDECITRUS. Fundo De Defesa Da Citricultura. Disponível em:
  - <http://www.fundecitrus.com.br/> - Acesso em 10/05/2018.
  - <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7-> Acesso em 10/05/2018.
- GAN, X.; HU, D.; LI, P.; WU, J.; CHEN, X.; XUE, W.; SONG, B. Design, synthesis, antiviral activity and three-dimensional quantitative structure–activity relationship study of novel 1,4-pentadien-3-one derivatives containing the 1,3,4-oxadiazole moiety. **Pest Manag Sci.** 72:534–543, 2016. doi: 10.1002/ps.4018.
- GARIP, S.; GOZEN, A. C.; SEVERCAN, F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. **Food Chemistry**, 113: 1301-1307, 2009.
- GAY, K. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 297–304, 2006.
- GEMMELL, C. G.; O'DOWD, A. Regulation of protein A biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by certain antibiotics: its effect on phagocytosis by leukocytes. **J. Antimicrob. Chemother.** 12(6):587-97, 1983.
- GOODMAN, G. A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 2148, 2003.
- GÓES, A. J. S. *et al.* Síntese e atividade antiedematogênica de derivados n-triptofil-5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona e n-triptofil-5-benzilideno-rodanina, **Quím. Nov.** 27 (6), 905-910, 2004.
- GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p.982-989. 2009.
- GRUNDMANN, H; SHNEIDER, C.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F. D.; PITT, T. L. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbio**, v. 33, p. 528-34, 1995.
- GUIDO, R. V. C. *et al.* virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr. Med. Chem.**, v.15, n.1, p.37-46, 2008.

- GUL, N.; MUJAHID, T. Y.; JEHAN, N.; AHMAD, S. Studies on the antibacterial effect of diferente fractions of *Curcuma longa* against urinary tract infection isolates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 12, p. 2055-2060, 2004.
- HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; KINOSHITA, T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**. 48 (1): 125±9, 1998. PMID: 9621457.
- HARVEY, A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.
- HELM, D.; LABISCHINSKY, H.; SCHALLEHN, G.; NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of General Microbiology** 137: 69-79, 1991.
- HENTSCHEL, U; HACKER, J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes and Infection**, n. 3, 545–548, 2001.
- HIGGINS, D. L.; CHANG, R.; DEBABOV, D. V.; LEUNG, J.; WU, T.; KRAUSE, K. M.; SANDVIK, E.; HUBBARD, J. M.; KANIGA, K.; SCHMIDT, D. E.; JR. GAO, Q.; CASS, R. T.; KARR, D. E.; BENTON, B. M.; HUMPHREY, P. P. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 49, 1127–1134, 2005.
- HOFEMEISTER, J.; CONRAD, B.; ADLER, B.; HOFEMEISTER, B.; FEESCHE, J.; KUCHERYAVA, N.; STEINBORN, G.; FRANKE, P.; GRAMMEL, N.; ZWINTSCHER, A.; LEENDERS, F.; HITZEROTH, G.; VATER, J. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. **Mol. Genet. Genomics**. 272:363-378, 2004.
- HOLT, J. G. et al. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins,. 787p, 1994.
- HSIEH C. T.; HSIEH T.J.; EL-SHAZLY M.; CHUANG D. W.; TSAI Y. H.; YEN C. T.; WU S. F.; WU Y. C.; CHANG F. R.; “Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents.” **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3912- 3915, 2012.
- HU, Y. Q.; ZHANG, S.; XU, Z.; LV, Z. S.; LIU, M. L.; FENG, L. S. 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities. **Eur J Med Chem**. 1;141:335-345, 2017.
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

Microrganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens. London: Blackie Academic and Professional, 514 p, 1996.

- IKIGAI, H.; NAKAE, T.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochim Biophys Acta.** 1147 (1): 132±6, 1993. Epub 1993/04/08. PMID: 8466924.
- JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, an alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 924-929, 1995.
- JOHNSON, J. E.; CORNELL, R. B. Amphitropic proteins: Regulation by reversible membrane interactions (review). **Mol. Membr. Biol.** 16:217–235, 1999.
- JURCSAK, N. W.; ZANINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. **J. Chem. Ed.**, v. 76, n. 5, p. 653-654. 1999.
- KAUR, S., MODI, N. H., PANDA, D.; ROY, N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ—a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4209–4214, 2010.
- KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB24® *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality Pflanzenschutz-Nachrichten 1:72-93, 2000.
- KINSINGER, R. F.; SHIRK, M. C.; FALL, R. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. **J. Bacteriol.** 185: 5627-5631, 2003.
- KIRKHAM, S.; CASTELLETTO, V.; HAMLEY, I. W.; INOUE, K.; RAMBO, R.; REZA, M.; RUOKOLAINEN, J. Self-Assembly of the Cyclic Lipopeptide Daptomycin: Spherical Micelle Formation Does Not Depend on the Presence of Calcium Chloride. **Chem. Phys. Chem.** 17, 2118–2122, 2016.
- KISS, T.; GRATWOHL, A.; FREI, R.; OSTERWALDER, B.; TICHELLI, A.; Speck, B. *Bacillus subtilis* infections. **Schweiz. Rundsch. Med. Prax.** 77:1219–1223, 1988.
- KNÖBL, T.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.A.; BOTTINO, J.A.; FERREIRA, A.J.P. OCCURRENCE OF ADHESIN-ENCODING OPERONS IN *Escherichia coli*

ISOLATED FROM BREEDERS WITH SALPINGITIS AND CHICKS WITH OMPHALITIS. **Brazilian Journal of Microbiology** 37:140-143. 2006.

- KNOWLES, M. R.; GILLIGAN, P. H.; BOUCHER, R. C. Cystic fibrosis. In: MANDELL, D.; BENNETHS, J; DOLIN, R. (eds) Principles and practice of infectious diseases. **Churchil**, 1995.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. 4: 206 – 220, 2005.
- KONEMAN, E. et al. Diagnóstico microbiológico. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- KOWALESWSKA-GROCHOWSKA, K. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. **Chest**, v.100, p. 1090-1095, 1991.
- KRÓL, E.; SCHEFFERS, D.J. Ftsz polymerization assays: Simple protocols and considerations. **Journal of visualized experiments : JoVE**. e50844, 2013.
- KRÓL, E.; BORGES, A. S.; SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Front. Microbiol.** 6, 1–12, 2015.
- KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **Fems Microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.
- LAO, C. D.; RUFFIN, M. T. T.; NORMOLLE, D.; HEATH, D. D.; MURRAY, S. I.; BAILEY, J. M.; BOGGS, M. E.; CROWELL, J.; ROCK, C. L.; BRENNER, D. E. **BMC Complem Altern Med.** 6:10, 2006.
- LEE, W.; LEE, D. G. Antifungal Mechanism of Curcumin Lies in Membrane-Targeted Action Within *Candida albicans*. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life.** 66(11), 2014.
- LEITE JUNIOR, R. P.; MOHAM, S. K.; PEREIRA, A. L. G.; CAMPACCI, C. A. Controle integrado de cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação da bactericidas. **Fitopatologia Brasileira** 12, p. 257-263, 1987.
- LENTZ, D. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C. M.; CORDERO, J.; IBRAHINI, O.; OKUNADE, A. L.

- Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants, **J. of Ethnopharmacol.** 63: 253-263, 1998.
- LEVIN, A. S.; BARONE, A. A.; PENCO, J.; SANTOS, M. V.; MARINHO, I. S.; ARRUDA, E. A. G.; MANRIQUE, E. I.; COSTA, S. F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 28, p. 1008-1111, 1999.
  - LEVY, S. B. Antibiotic availability and use: consequences to man and his environment. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 11, p. 835-875, 1991.
  - LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.999-1007, 2001.
  - LI, Z.; ZHAN, P.; LIU, X. 1,3,4-Oxadiazole: A Privileged Structure in Antiviral Agents. **Mini Rev Med Chem.** 11:1130, 2011.
  - LIARAS, K.; GERONITAKI, A.; GLAMOCLIIA, J.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M. Thiazole-based chalcones as potent antimicrobial agents. Synthesis and biological evaluation. **Bioorg. Med. Chem.**, 19, p. 3135–3140, 2011.
  - LIMA, D. C. et al. Snake venom: any clue for antibiotics and cam? **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.
  - LIN, C.L.; LIN, J.K. Curcumin: a Potential Cancer Chemopreventive Agent through Suppressing NF- $\kappa$ B Signaling. **J. Cancer Mol.** v.4, n.1, p.11-16, 2008.
  - LIN, D.; CHEN, S. First detection of conjugative plasmid-borne fosfomycin resistance gene fosA3 in *Salmonella* isolates of food origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1381-1383, 2015.
  - LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 7, 324–338, 2008.
  - LOHNER, K. New strategies for novel antibiotics: Peptides targeting bacterial Cell membranes. **Gen Physiol Biophys** 28:105–116, 2009.
  - LOWY, F. D. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. **N Eng J Med**, v. 339, p. 520-32, 1998.
  - LUTKENHAUS, J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annu. Rev. Biochem.** 76: 539–562, 2007.

- LUTZ, L. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 224-8, 2003.
- LYNNE, A. M. et al. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* sorovar newport isolates from food animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 353-356, 2008.
- MA, J.; LI, P.; LI, X.; SHI, Q.; WAN, Z.; HU, D.; JIN, L.; SONG, B. Synthesis and antiviral bioactivity of novel 3-((2-((1E,4E)-3-oxo-5-arylpenta-1,4-dien-1-yl)phenoxy)methyl)-4(3H)-quinazolin-one derivatives. **J Agric Food Chem.** 62:8928–8934, 2014.
- MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, n.3, p. 551-559. 2009.
- MAHADY, G. B., PENDLAND, S. L., YUN, G.; LU, Z. Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helico bacter pylori*, a group 1 carcinogen. **Anticancer Research**, v.22, p. 4179–4181, 2002.
- MAHAPATRA, D. K; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **Bioorg. Med. Chem.**, 20, 5150–5163, 2015.
- MAHASNEH, A. M. A.; ADEL, M. A.; EL-OQLAH, A. A. B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **J. of Ethnopharmacol.** 64(3): 271-276, 1999.
- MAI, G. T.; SCOW, W. K.; PIER, G. B.; McCORMACK, J. G.; THONG, Y. H. Supression of lymphocyte and neutrophil function by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. **Infect Immun**, v. 61, p. 559-564, 1993.
- MAI, C. W.; YAEGHOBI, M.; ABD-RAHMAN, N.; KANG, Y. B.; PICHKA, M. R. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure e activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. **Eur. J. Med. Chem.**, 77, 378–387, 2014.

- MACHADO, A. et al. Cost-effectiveness of linezolid versus vancomycin in mechanical ventilation-associated nosocomial pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 3, p. 191-200, 2005.
- MAJHENIĆ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guaraná seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n.3, p.1258-1268. 2007.
- MAMISUKA, E. Projeto de resistência microbiana em serviços de saúde, *Staphylococcus*. ANVISA, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>
- MARGOLIN, W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. **Nat. Rev.Mol. Cell Biol.** 6, 862–871, 2005.
- MARRIE, T. J.; SUNG, J. Y.; COSTERTON, J. W. Bacterial biofilm formation on nasogastric tubes. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 503-506, 1990.
- MARSTON, A. L.; THOMAIDES, H. B.; EDWARDS, D. H.; SHARPE, M. E.; ERRINGTON, J. Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. **Genes Rev.** 12: 3419–3430, 1998.
- MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs : Rapid , Simple , and **Inexpensive Method**. 47(11), 3616–3619, 2003.
- MARTINS, P. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE, J.; DO AMARAL, A. M.; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: Targeting the division septum. **FEMS Microbiol. Lett.** 310, 76-83, 2010.
- MARTÍNEZ M.J., BETANCOURT J., ALONSO-GONZÁLEZ N., JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, *J. of Ethnopharmacol.* 52(3): 171-174, 1996,
- MATIAS, V. R.; BEVERIDGE, T. J. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. **Mol Microbiol.**, 56:240–251, 2005.
- MESSI, P. et al., Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. **Int J Food Microbiol.** v.107, n.2, p.218-22, 2006.
- MEUNIER, D. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 antibiotic resistance genomic island 1 in serotype paratyphi B. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 430–433, 2002.

- MICHAEL, G. B. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914, 2006.
- MICKLEFIELD, J. Daptomycin structure and mechanism of action revealed. **Chem Biol.**11(7): 887-8, 2004.
- MIKKOLA, R. Food and indoor air isolated *Bacillus* non-protein toxins: structures, physico-chemical properties and mechanisms of effects on eukaryotic cells. Dissertação acadêmica, Helsinki, 2006.
- MINAGAWA, C. W. **Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpe de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios.** 108 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MISHRA, A.; DAS, B. C. Curcumin as an anti-human papillomavirus and anti-cancer compound. **Future Oncol.**;11(18):2487-90, 2015 doi: 10.2217/fon.15.166. Epub 2015 Aug 17.
- MOLECULAR PROBES I. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. *LIVE/DEAD® BacLight™ Bact. Viability Kits.* , 1–8, 2004.
- MOOLENAR, R. L.; CRUTCHER, J. M.; SAN JOAQUIN, V. H.; SEWEL, S. V.; HUTWAGNER, L. C.; CARSON, L. A.; ROBISON, D. A.; SMITHEE, L. M.; JARVIS, W. R. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 80-85, 2000.
- MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**. 26 (8): 2231±4, 1987 [http://dx. doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84689-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84689-0).
- MOSZER, I.; JONES, L. M.; MOREIRA, S.; FABRY, C.; DANCHIN, A. SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. **Nucleic Acids Res**, 1;30(1):62-5, 2002.
- MUKHERJEE, A.; LUTKENHAUS, J. Purification, assembly, and localization of FtsZ. **Methods in enzymology** 298, 296-305, 1998.
- MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiol.** 54: 479-489, 2005.

- MÜLLER, A.; WENZEL, M.; STRAHL, H.; GREIN, F.; SAAKI, T. N. V.; KOHL, B.; SIERSMA, T.; BANDOW, J. E.; SAHL, H. G.; SCHNEIDER, T.; HAMOEN, L. W. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *PNAS*, 113 (45), 7077–7086, 2016.
- MURRAY B.E. Life and times of the enterococcus. *Clin Microbiol Rev*, v.3, p.46-65, 1990.
- MURRAY, P.R. Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis. In: Manual of Clinical Microbiology 6th ed., 1995.
- MURTHY, Y. L. N.; SUHASINI, K. P.; PATHANIA, A. S.; BHUSHAN, S.; NAGENDRA SASTRY, Y. Synthesis, structure activity relationship and mode of action of 3-substitutedphenyl-1-(2,2,8,8-tetramethyl-3,4,9,10-tetrahydro-2H,8H-pyrano[2,3f]chromen-6 yl)-propenones as novel anticancer agents in human leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Med. Chem.*, 62, 545–555, 2013.
- MUTO, C. A. et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 24, p. 362-86, 2003.
- NAMEKATA, T. Cancro cítrico. In: Rodriguez O, Viégas F, Pompeu Jr J and Amaro AA (eds) Citricultura Brasileira. 2nd edition. Fundação Cargill, Campinas, p. 775-786, 1991.
- NASSAR, E.; ABDEL-AZIZ, H. A.; IBRAHIM, H. S.; MANSOUR, A. M. Synthesis of diarylpyrazoles containing a phenylsulphone or carbonitrile moiety and their chalcones as possible anti-Inflammatory agents. *Sci. Pharm.*, 79, 507–524, 2011.
- NATIONAL COMITEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th – Approved standard M7-A5., 2000.
- NATIONAL COMITEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Twelfth informational supplement. NCCLS. USA. Publication M100-S12; 2003.
- NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) REPORT. Data summary from October 1986/April, Issued May 1996. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, EUA. 1996.

- NAVARRO V.; VILLARREAL M. L.; ROJAS G.; XAVIERB L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J. of Ethnopharmacol** 53(3): 143-147, 1996.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: MARKESTRAT - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 137 p., 2010.
- NICKEL, J.C.; DOWNEY, J. A.; COSTERTON, J. W. Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters. **Urology**, 34(5):284-291, 1989.
- NOVICK, R. P. Pathogenicity factors and their regulation. In: FISCHETTI, V. A. et al. (eds.). Washington DC: ASM Press, p. 392-407, 2000.
- OGGIONI, M. R.; POZZI, G.; VALENSINM, P. E.; GALIENI, P.; BIGAZZI, C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. **J. Clin. Microbiol.** [Internet]. 36(1), 325–6, 1998.
- OHWADA, T.; SAGISAKA, S. An immediate and steep increase in ATP concentration in response to reduced turgor pressure in *Escherichia coli* B. **Archives of biochemistry and biophysics** 259, 157-163, 1987.
- O'LEARY, D. et al. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 & DT104b cultured from the modern pork chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 1-15, p. 36-43, 2013.
- OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **J Bras Patol**, v. 37, n. 4, p. 239-46, 2001.
- OLIVEIRA, W.F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **RPCV**, 99 (552) 211-214, 2004.
- OPLETALOVA, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceska Slov. Farm.**, vol. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.
- PALLERONI, N.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 23, p. 333-339, 1973.

- PALLERONI, N. J. Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier, L.; Balows, A.; Sussman, M. (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections – Systematic bacteriology. v. 2 , p. 1091-1108, 1998.
- PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents Chemother.** 46(8), 2720–2722, 2002.
- PATIL, P.S.; SHETTIGAR, V.; DHARMAPRAKASH, S. M.; “Synthesis and crystal structure of 1-(4-fluorophenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-one”. **Mol. Cryst. Liq. Cryst.**, v. 461, p. 123-130, 2007.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J Ethnopharmacol** 77, p. 37-40, 2001.
- PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C. C.; NUNAN, E. A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. B. A. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciênc. agrotec.**, v. 32, n. 3, p. 875-881, 2008.
- PÉREZ, C. N.; HENRIQUES, C. A.; MEDEIROS, K. C. F.; MEDEIROS, L. C. F.; “Catalisadores heterogêneos para a síntese de chalconas com interesse farmacológico”. **Revista Estudos**, v. 32, p. 2111-2130, 2005.
- PICHOFF, S.; LUTKENHAUS, J. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. **EMBO J.** 21:685–693, 2002.
- PINHO, M. G.; KJOS, M.; VEENING, J. W. How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. **Nat. Reviews Microbiol.**, 11, 601–614, 2013.
- PITT, T. L. *Pseudomonas*, Burkholderia and related genera. P1115-1138. In: Collier, L.; Balows, A., Sussman, M. (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. **Systematic bacteriology**. v. 2, 1998.

- POGLIANO, J.; POGLIANO, N.; SILVERMAN, J. A. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. **J. Bacteriol.** 194, 4494–4504, 2012.
- POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). Principles and practice of infections diseases, 1995.
- POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. Genus Salmonella. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2. New York: Springer Science + Business Media Inc., p. 764-799, 2005.
- PUKALL, R.; SCHUMANN, P.; GRANUM, P, E. Toxin-Producing Ability among *Bacillus* spp. Outside the *Bacillus cereus* Group. **Appl. Andenvironmentalmicrobiology.** 71(3), 1178–1183, 2005.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1ª ed. Porto Alegre: editora Artmed 512p, 2005.
- RAI, D.; SINGH, J. K.; ROY, N.; PANDA, D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **Biochem. J.**, 410, 147-155, 2008.
- RAMESHKUMAR, K. B.; NANDU, T. G.; ANU ARAVIND, A. P.; MATHEW, S. P.; SHIBURAJ, S. Chemical composition and FtsZ GTPase inhibiting activity of the essential oil of *Piper sarmentosum* from Andaman Islands, India. **J. Essent. Oil.** 29 (5), 430–435, 2017.
- RANDALL, L. P. et al. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 208-216, 2004.
- RAO, Y. K.; FANG, S.; TZENG, Y. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.
- RECENO, C.; BENSON, M.; DERUISSEAU, K. Effects of Curcumin on the Expression of Antioxidants in Single Myofibers from Aged Mice. **Physiology**, 2015.
- RICE, E. W. et al. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 46, p. 155–158, 2003.

- RICHARD, V.; VAN DER AUWERA, P.; SNOECK, R.; DANEAU, D.; MEUNIER, F. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 7:783–785, 1988.
- RICHARDS, M.J.; EDWARDS J.R.; CULVER D.H.; GAYNES R.P. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the Unites States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Pediatric**, v. 103, p. 39- 43, 1999.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1. ed. Em Português. Editorial Premier, 372, 1997.
- ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Intern Med J**, v. 35, p. 97S-105S, 2005.
- ROCHA, S.L.S. **Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do MultiplexPCR**. Dissertação de Mestrado. 68 f. Universidade do Rio Grande do Sul, 2008.
- ROJAS, G.; LÉVARO, J.; TORTORIELLO, J.; NAVARRO, V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases, *J. of Ethnopharmacol.* 74(1): 97-101, 2001.
- ROSSETTI, V.V.; FEICHTENBERGER, E.; SILVEIRA, M. L. Cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. citri): bibliografia analítica. São Paulo: Instituto Biológico. p. 203, 1981.
- ROSSETTI, V. V.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. Fundação Cargill, p. 84, 1993.
- ROUGHLEY, P. J.; WHITING, D. A. Experiments in the biosynthesis of curcumin. **Journal of Chemical Society**, v, 20, p. 2379 – 2388, 1973.
- RUDRAPPA, T.; BAIS, H. P. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1955–1962, 2008.
- SADER, H. S.; MENDES, R. E.; GALES, A. C.; JONE, R. N.; PFALLER, M. A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros. **J. Pneumol.** 27(2), 2001.
- SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R.E.; ZOCOLLI, C.;

- BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Bras J Infect Dis**, v. 5, p. 200-214, 2001.
- SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas em psitacédeos com diferentes manifestações clínicas**. 76 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2008.
  - SANTOS, R.I. Farmacognosia: da planta ao medicamento, Ed. Universidade 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 821, 2000.
  - SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35: 273- 280, 2004.
  - SANTOS, A. L., et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
  - SATO, M., TANAKA, H., YAMAGUCHI, R., OH-UCHI, T., ETOH, H. *Erythrina poeppigiana*-derived phytochemical exhibiting antimicrobial activity against *Candida albicans* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 37, p. 81-85, 2003.
  - SAVIOLLI, J.Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**. 84 f. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, 2010.
  - SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.
  - 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**, 28,6 494-518, 2005.
- SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. Doenças infecciosas: conduta, diagnóstico e terapêutica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
  - SHARMA, R. A.; EUDEN, S. A.; PLATTON, S. L.; COOKE, D. N.; SHAFAYAT, A.; HEWITT, H. R.; MARCZYLO, T. H.; MORGAN, B.; HEMINGWAY, D.; PLUMMER, S. M.; PIRMOHAMED, M.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. **Clin Cancer Res.**10:6847, 2004.
  - SHARMA, H.; PATIL, S.; SANCHEZ, T. W.; NEAMATI, N.; SCHINAZI, R. F.; BUOLAMWINI, J. K. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of 3-keto salicylic acid chalcones and related amides as novel HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorg. & Med. Chem.**, 19, 2030–2045, 2011.
  - SHARMA, P. K.; SANGWAN, N. S.; BOSE, S. K.; SANGWAN, R. S. Biochemical characteristics of a novel vegetative tissue geraniol acetyltransferase from a monoterpene oil grass (Palmarosa, *Cymbopogon martinii* var. *Motia*) leaf. **Plant Sci.**, v. 203, p. 63-73. 2013.
  - SORDILLO P. P.; HELSON L. Curcumin suppression of cytokine release and cytokine storm. A potential therapy for patients with *Ebola* and other severe viral infections. **In Vivo**. 29:1–4, 2015.
  - SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 201-222, 1995.
  - SILVA, R. M. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* proveniente de lesões de celulite de frangos de corte**. 63 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, 2011.
  - SILVA-FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v.19, n.4, p. 919-923, 2009.
  - SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clin. Microbiol. Rev.**, 24, 71–109, 2011.

- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânico*, 5 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p. 460, 1994.
- SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P. M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, v.83, n. 6, p. 737-740, 2002.
- SINGH, M.; GADEPALLI, R.; DHAWAN, B.; MUKHOPADHYAY, K. Combination of alpha melanocyte stimulating hormone with conventional antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Plos One**. 8(9): 73815, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0073815 PMID: 24040081.
- SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *Eur. J. Med. Chem.*, 85, 758–777, 2014.
- SIVAKUMAR, P. M.; IYER, G.; NATESAN, L.; DOBLE, M. 3'-Hydroxy-4-methoxychalcone as a potential antibacterial coating on polymeric biomaterials. **Applied Surface Science**, 256, p. 6018–6024, 2010.
- SIVAKUMAR, P. M.; COMETA, S.; ALDERIGHI, M.; PRABHAWATHI, V.; DOBLE, M.; CHIPELLINI, F. Chalcone embedded polyurethanes as a biomaterial: Synthesis, characterization and antibacterial adhesion. **Carbohydr. Polym.**, 87, 353–360, 2012.
- SOLOMON, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; “Organic Chemistry”. USA: **John Wiley and Sons**, 9<sup>a</sup> ed., 2008.
- SORUM et al. Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcina. **Appl Environ Microbiol**, Jan; v.72, n. 1, p. 516–21, 2006.
- SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycine resistance in staphylococci. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 3, p. 430-8, 2002.
- STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v.45, n.2, p.502-531, 2012.
- STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactives products. **Crit. Rev. Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.
- STRAHL, H.; HAMOEN, L. W. Membrane potential is important for bacterial cell division. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 6; 107(27): 12281–12286, 2010.

- STROHL, W.R. The role os natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.
- SWANSON, C. L.; LAUGHLIN, L. T.; FINLAY, D. ; ROBINSON, M. K.; REICHLING, T. D.; MATHENY, H. E.; BUSHNELL, D. S. Biomarker analysis confirms the anti-oxidant and antiinflammatory activity of a colorless turmeric extract, in vitro. **American Academy of Dermatology**. 68th Annual Meeting, 2010.
- SYDOW, A. C. M. D.G. V. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes**. 89 f. Dissertação de Mestrado.Universidade de São Paulo, 2005.
- SZETO, T. H.; ROWLAND, S. L.; HABRUKOWICH, C. L.; KING, G. F. The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. **J. Biol. Chem.** 278: 40050–40056. 24, 2003.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1999.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, caps. 1 e 5., 2002.
- THOMAS, M.; WHITTET, H. Atypical meningitis complicating a penetrating head injury. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 54:92–93, 1991.
- TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infect Dis**, v. 6, n. 156, 2006.
- TÖNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 76, p. 373-373, 1987.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.
- UNGPHAIBOON, S.; SUPAVITA, T.; SINGCHANGCHAI, P.; SUNGKARAK, S.; ITHARAT, A.; RATTANASUWAN, P. Study on antioxidant and antimicrobial activities of turmeric clear liquid soap for wound treatment of HIV patients. **Songklanakarín Journal of Science and Technology (SJST)**. 27(Suppl.2):569-578, 2005.

- VELASCO, E.; DE SOUSA MARTINS, C. A.; TABAK, D.; BOUZAS, L. F. *Bacillus subtilis* infection in a patient submitted to a bone marrow transplantation. **Rev. Paul. Med.** 110:116–117, 1992.
- VELÁQUEZ, J. et al. Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de coresistencia. **Rev Per Soc Med Intern**, v. 15, n. 4, 2002.
- VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.
- VOLLMER, W. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 73, p. 37–47, 2006.
- WALLET, F.; CRUNELLE, V.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; FURCHARD, A.; SAUNIER, P.; COURCOL, R. J. *Bacillus subtilis* as a cause of cholangitis in polycystic kidney and liver disease. **Am. J. Gastroenterol.** 91:1477–1478, 1996.
- WANG, J.; WANG, H.; ZHU, R.; LIU, Q.; FEI, J.; WANG, S. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 $\beta$  transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials.** 53: 475-83, 2015. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.116.
- WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferible imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, p. 147- 151, 1991.
- WENZLER, E.; RODVOLD, K. A. Telavancin: the long and winding road from discovery to food and drug administration approvals and future directions. **Clin. Infect. Dis.** 61 (Suppl 2), S38–47, 2015.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Salmonella*. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 21 outubro 2015.
- WU, T.; HE, M.; ZANG, X.; ZHOU, Y.; QIU, T.; PAN, S.; XU, X. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1828, p. 2751-2756, 2013.
- YADAV, N.; DIXIT, S. K.; BHATACCARYA, A.; MISHRA, L. C.; SHARMA, M; AWASTHI, S. K.; BHASIN, V. K. Antimalarial activity of newly synthesized chalcone derivatives *in vitro*. **Chem. Biol. Drug Des.**, 80, p. 340–347, 2012.

- YAYLI, N.; ÜÇÜNCÜ, O.; AYDIN, E.; GÖK, Y.; YASAR, A.; BALTACI, C.; YILDIRIM, N.; KÜCÜK, M. Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in solution and the oxidant activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, v. 169, p. 229-234, 2005.
- YOUNG, M. L.; BAINS, M.; BELL, A.; HANCOCK, R. W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 2566-2568, 1992.
- XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. **Curr. Med. Chem.**, 22, 132–149, 2015.
- ZACARIAS, N. A.; COSTA, C. E.; CAMPIOTI, D. A.; VIERTLER, H.; SUMODJO, T. A. Comportamento potenciodinâmico da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (chalcona) e 1,3- difenil-3-fenitio-2-propen-1-ona em DMF. Disponível em: <http://www.sbjq.org.br>. Acesso em 15 de maio de 2018.
- ZAIDI, S. N. F.; MAHBOOB, T. Effect of curcumin supplementation on antioxidant enzymes in liver cirrhosis : study in rats. **Pak. J. Biochem. Mol. Biol.**, 48(1): 3-6, 2015.
- ZHAO, H. P.; CUI, Z. P.; GU, Y. C.; LIU, Y. X.; WANG, Q. M. **Pest Manage Sci.** 1059:67, 2001.
- ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* CAV. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 450-456, 2005.
- ZEROUAL, W.; MANFAIT, M.; CHOISY, C. FT-IR spectroscopy study of perturbations induced by antibiotic on bacteria (*Escherichia coli*). **Pathologie-biologie** 43, 300-305, 1995.
- ZHOU, J.; TAO, Q. Q.; WANG, P. Y.; et al. Antimicrobial evaluation and action mechanism of pyridinium-decorated 1,4-pentadien-3-one derivatives. **Bioorganic Med. Chem. Lett. [Internet]**. 28(10), 1742–1746, 2018.
- ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al.. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 4<sup>a</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 499-526, 2002.

# CAPÍTULO IV

## CAPÍTULO IV

### COMPOSTOS SINTÉTICOS PROMISSORES CONTRA MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO

#### 1. MATERIAL E MÉTODOS

##### 1.1. Linhagens celulares e condições de crescimento

Para a avaliação da ação antimicrobiana dos compostos o grupo usufruiu de um amplo painel de microrganismos, tanto Gram - positivos como Gram - negativos, fornecidos pela Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz – Brasil/RJ) e certificados pela ATCC. Os microrganismos utilizados para as análises foram *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enterica* patovar *Typhimurium* ATCC13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. As linhagens foram cultivadas da seguinte maneira: *S. enterica* sorovar *typhimurium* e *P. aeruginosa* em meio nutriente; *E. coli* e *S. aureus* em meio TSB (Tryptic Soy Broth) e *E. faecalis* em meio BHI (Brain Heart Infusion). A temperatura de crescimento foi de 37° C.

Os antibióticos utilizados como controles positivos foram: 8 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina para *E. coli* e *S. typhimurium*, 4 µg.mL<sup>-1</sup> de gentamicina para *P. aeruginosa*, 2 µg.mL<sup>-1</sup> e 4 µg.mL<sup>-1</sup> de vancomicina para *S. aureus* e *E. faecalis*, respectivamente (EUCAST/BrCAST, 2017).

##### 1.2. Screening de Compostos

Os compostos da série hidroxichalconas e metoxichalconas foram submetidos à Screening inicial que consistiu da mesma metodologia descrita e referenciada na página 46, item 2.3 (Capítulo I).

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

A avaliação da inibição de crescimento bacteriano foi realizada utilizando-se o método Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) descrito por Palomino et al. (2002) e Martin et al. (2003) com algumas modificações padrão sugeridas pelos protocolos Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) e BrCAST/EuCAST, para microrganismos de interesse clínico. O processo de execução do REMA foi o mesmo citado na página 47, item 2.4 (Capítulo I).

##### 1.4. Avaliação da Mínima Concentração Bactericida (MBC)

A metodologia de execução do MBC está referenciada na página 47, item 2.5 (Capítulo I). A temperatura de incubação foi a 37° C, durante 24 horas.

### *1.5. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática*

Apenas o ensaio de avaliação da integridade de membrana bacteriana foi realizado para os compostos bioativos contra os patógenos afetados. O ensaio foi realizado de acordo com o mesmo processo e referências já citados na página 48, item 2.6.1 (Capítulo I).

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O surgimento, e/ou recrudescimento, de doenças vinculadas à toxicidade de inúmeros antibióticos fez aumentar a busca e desenvolvimento de estudos a fim de que novas substâncias com potencial ação antimicrobiana sejam descobertas. A maior fonte de substâncias bioativas e de inúmeras aplicações biológicas, promissoras para futuros fármacos, está nos compostos naturais, principalmente os que são de origem vegetal e/ou microbiana e de espécies vegetais (NGO et al., 2013). Por outro lado, sabe-se que a resistência bacteriana é, tipicamente, um processo ecológico e evolutivo, cuja bactéria responde diante do uso frequente do composto bem como diante de sua presença, comum, no ambiente (LEVY, 1991). No entanto, a utilização incorreta de fármacos, além da dosagem frequente, tem feito aumentar a resistência de maneira desenfreada e rápida. Sendo assim, a pesquisa por novas classes de agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento desses microorganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais (PENNA et al., 2001).

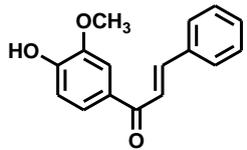
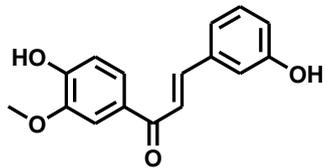
Desta forma, a pesquisa atinge uma contribuição em nível mundial, uma vez que visa, além de um novo composto com ação antimicrobiana, também com toxicidade reduzida, efeitos colaterais em menores taxas e maior especificidade frente ao microrganismo patogênico (MENG et al., 2000; HO et al., 2001; MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES E FARIA, 2007). Vale ressaltar que muitos protótipos acabam sendo descartados durante as avaliações, uma vez que apresentam problemas relacionados à farmacocinética e tornam-se inadequados para desenvolvimento de futuros fármacos.

Este trabalho encontrou dois compostos com potencial ação antimicrobiana contra *S. aureus* que podem, futuramente, serem desenvolvidos e tornar-se fármacos com nova atuação, inovando as classes de fármacos e oferecendo alternativas para o setor farmacêutico.

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

As análises de Screening inicial selecionaram dois compostos da classe de hidroxichalconas e metoxichalconas com potencial ação contra *S. aureus*, sendo eles **BC1** e **A11**. A estrutura molecular dos dois compostos selecionados está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Chalconas e Metoxichalconas selecionadas via Screening

Hidroxichalconas e Metoxichalconas com ação contra <i>Bacillus subtilis</i>	
Código do Composto	Estrutura molecular
<b>BC1</b>	
<b>A11</b>	

A bactéria Gram - positiva *S. aureus* foi a mais sensível aos compostos. Com exceção de *P. aeruginosa* que atingiu níveis equiparados de inibição, embora não tenham sido significativos como nas Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas apresentaram baixíssimos níveis de sensibilidade aos compostos testados, conforme mostra os valores de Screening para 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de composto utilizado (Tabela 2). A membrana externa é o principal fator responsável pela menor sensibilidade das bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos quando comparadas às bactérias Gram-positivas, já que essas últimas possuem uma parede celular mais permeável. Esta membrana externa representa uma barreira à passagem de pequenas moléculas hidrofílicas, reduzindo a permeabilidade e, conseqüentemente, aumentando a resistência à antibacterianos (LAMBERT, P., 2002).

Nestas análises somente **BC1** e **A11** apresentaram inibição de aproximadamente 90% tendo como dose máxima 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para *S. aureus*. Note que adotamos a concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  como a máxima promissora para que um composto seja selecionado para estudos subsequentes.

Há uma lista que contém os nomes de 12 famílias bacterianas que representam grande ameaça para a saúde humana, segundo registros da Organização Mundial da Saúde (OMS). Todas as bactérias desta lista são Gram-negativas e sugere-se que o maior motivo seja pela sua alta resistência associada à presença de membrana externa (WILLYARD, 2017).

A membrana externa é uma estrutura que age como uma barreira seletiva e de permeabilidade. Além disso, nessa estrutura existem diversos aparatos além de bombas de efluxo que são responsáveis por reduzir a concentração de antibiótico no interior da célula bacteriana, tornando-se um ambiente atóxico, novamente (BLAIR et al., 2014; LI et al., 2015; ARZANLOU et al., 2017; MAIS et al., 2017). Acredita-se que o que garante resistência para as bactérias Gram-negativas, geralmente, são complexos macromoleculares formados pela tríade: membrana dupla e periplasma. O exemplo mais frequente é o sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli* que é constituído por uma proteína da membrana interna (AcrB), associada com uma de membrana externa (TolC) e uma proteína periplasmática (AcrA) (POOLE, 2011; LI et al., 2015; DAVIN-REGLI et al., 2016; ALIBERT et al., 2017; CHITSAZ E BROWN, 2017; TIPTON et al., 2017). AcrB é da divisão de nodulação por resistência (RND) e tem função de reconhecer e se ligar à droga (TAKATSUKA et al., 2010; OHENE-AGYEI et al., 2014).

**Tabela2.** Screening de hidroxihalconas/metoxihalconas contra microrganismos patógenos para 100 µg.mL<sup>-1</sup> de composto

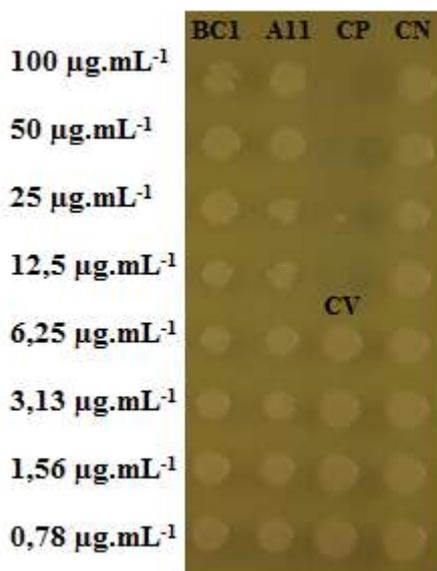
SÉRIE	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Chalconas</b>					
A1	26,41	40,26	8,25	0	55,44
A3	15,64	56,97	22,73	5,32	40,09
A4	19,57	37,80	10,85	0,47	62,16
A5	11,58	52,93	5,66	2,57	44,36
A6	26,47	0,95	7,04	0,43	47,57
A7	41,31	38,59	19,54	0	38,49
A8	26,03	10,87	14,99	0	55,05
A9	6,97	25,36	14,05	4,27	18,18
A10	0	71,73	1,97	0	57,11
A11	0	<b>89,62</b>	21,35	3,40	63,06
A12	19,59	25,75	11,39	2,62	36,57
A14	29,15	5,61	14,21	0	58,66
A15	32,61	33,06	12,45	5,91	56,74
A17	34,52	14,64	9,84	10,08	52,13
A18	41,43	41,33	17,58	0,31	24,89
A19	5,32	64,55	26,38	0	45,79
APO	18,24	16,26	14,59	3,48	50,91
BC1	0	<b>91,55</b>	19,58	10	53,06

<b>BC2</b>	1,84	44,97	22,21	15,22	32,48
<b>BC3</b>	15,42	41,49	18,55	10,02	16,18
<b>BC4</b>	41,68	0	28,58	17,19	15,28
<b>BC6</b>	27,47	0	40,48	8,46	9,53
<b>BC7</b>	0	42,82	14,44	0	42,37
<b>BC8</b>	21,26	8,24	19,34	0	61,09
<b>BC9</b>	3,87	5,54	17,47	0	34,63
<b>BC10</b>	0	5,20	13,50	0	60,48
<b>BC11</b>	11,88	0	16,74	5,08	62,57
<b>BC12</b>	9,47	64,15	3,94	1,99	49,06
<b>BC13</b>	16,87	45,01	5,27	0	56,64
<b>BC14</b>	22,59	58,03	0,09	0	57,02
<b>BC15</b>	13,55	58,64	13,45	5,45	44,68
<b>BC16</b>	23,64	42,48	14,59	13,99	34,12
<b>BC17</b>	20,69	0	17,71	4,58	62,52
<b>BC18</b>	18,01	59,04	17,33	0	50,57
<b>BC19</b>	19,67	49,14	18,85	4,67	64,82
<b>BC20</b>	39,38	7,05	11,93	0	18,47
<b>*Ampicilina</b>	-	-	95,77 ± 0,34	91,60 ± 1,17	-
<b>*Gentamicina</b>	-	-	-	-	95,87 ± 0,40
<b>*Vancomicina</b>	93,47 ± 0,15	91,27 ± 0,53	-	-	-

\*Para o controle positivo foram utilizados os antibióticos padrão, Segundo BrCAST na MIC (item 1.1)

Dentre os compostos que apresentaram ação contra *S. aureus*, todos tiveram ação bacteriostática até a maior concentração testada no ensaio MBC ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), conforme mostra a Figura 1.

**Figura 1.** Ensaio MBC para *S. aureus* com os compostos bioativos em diversas concentrações. CP: controle positivo; CV: controle do veículo – DMSO 1%; CN: controle negativo



A MIC dos compostos selecionados pôde ser obtida após análises de REMA e elaboração de relações dose-resposta, gerando regressões polinomiais e as equações dessas regressões possibilitaram o cálculo das MICs, apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Determinação das MICs dos compostos bioativos contra *S. aureus*

Composto	MIC <sub>50</sub> <i>S. aureus</i> (µg.mL <sup>-1</sup> )	MIC <sub>50</sub> <i>S. aureus</i> (µM)	MIC <sub>80</sub> <i>S. aureus</i> (µg.mL <sup>-1</sup> )	MIC <sub>80</sub> <i>S. aureus</i> (µM)
<b>BC01</b>	38,66	152,20	99,97*	393,58*
<b>A11</b>	11,05	41,08	46,10	171,38

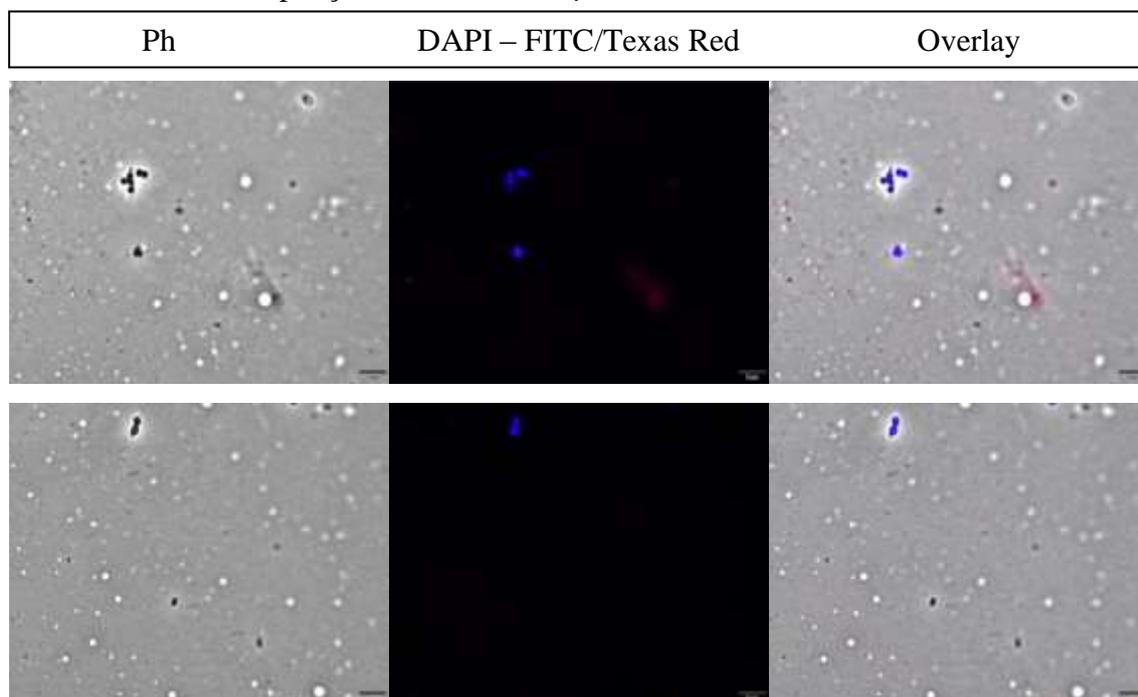
\*Para BC1 foi determinada MIC<sub>90</sub>, uma vez que o percentual de inibição bacteriana foi maior que 90%

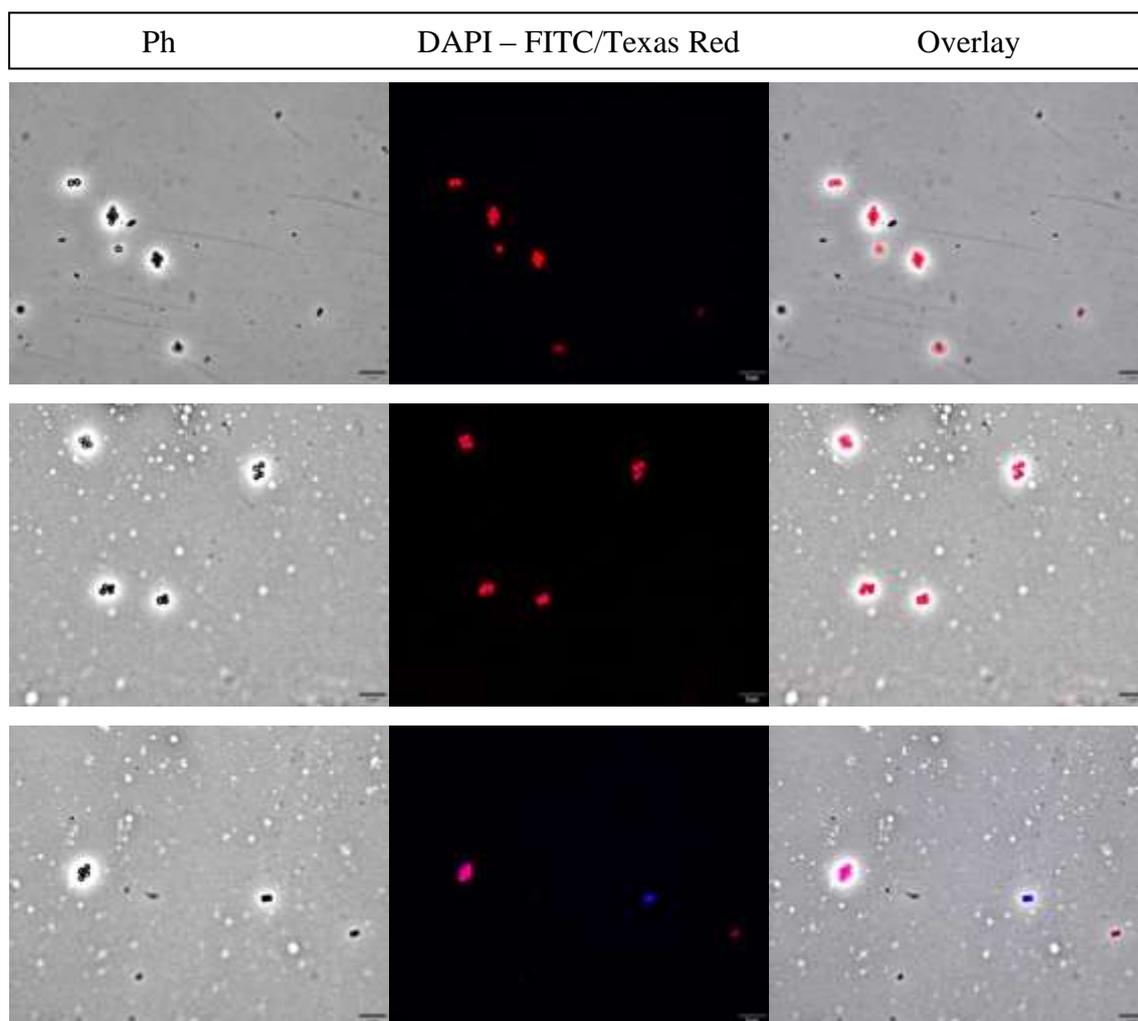
## 2.2. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática

As hidroxichalconas e metoxichalconas foram avaliadas quanto à sua capacidade de alterar a integridade da membrana citoplasmática de *S. aureus*, devido à possível formação de poros. Na Figura 2, observa-se células bacterianas não tratadas (controle negativo) que possuem membrana intacta e consequente impermeabilidade ao iodeto de propídio (IP). Quando as células de *S. aureus* são tratadas com 5 µg.mL<sup>-1</sup> de nisina (Figura 2) observa-se coloração avermelhada nas células, devido à sua capacidade de promover poros na membrana citoplasmática, tornando-se permeável ao IP (KRÓL et al., 2015). Nota-se que em 30 minutos

a maior parte das células de *S. aureus*, no ensaio com **BC1**, apresentaram alteração de permeabilidade de membrana citoplasmática enquanto que para **A11** pouco mais da metade das células bacterianas adquiriram coloração avermelhada, conseqüentemente, apresentaram alteração na permeabilidade e estrutura membranar (Figura 2). Esse resultado indica que o modo de ação de **BC1** pode estar atrelado ao mecanismo alvo de perturbação da estrutura de membrana citoplasmática. No entanto, ficou comprovado que **BC1** parece apresentar ação multi target contra as bactérias afetadas, conforme já foi discutido no Capítulo III. Os testes de síntese de macromoléculas, utilizando radiomarcadores, não foram realizados para os microrganismos patogênicos. Também não foram realizados ensaios para avaliar perturbação na divisão celular bacteriana de *S. aureus*, uma vez que nosso grupo de pesquisa não possui mutante com septo marcado com a finalidade desta avaliação. No entanto é possível estimar seu modo de ação observando os mesmos resultados obtidos com *B. subtilis*, bactéria Gram-positiva modelo de ensaios biológicos.

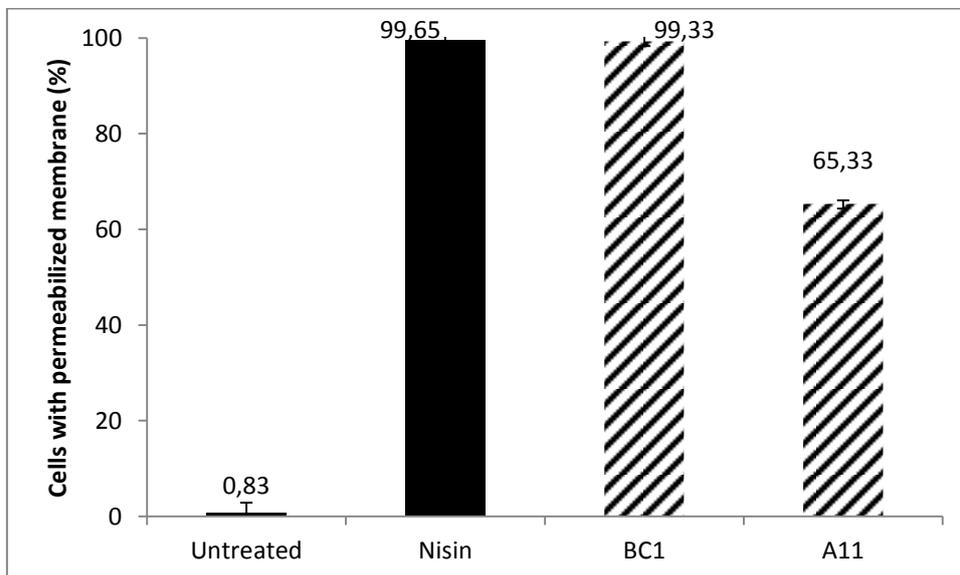
**Figura 2.** Avaliação de permeabilidade de membrana para *S. aureus* com células sem tratamento (controle negativo - CN); tratadas com DMSO 1% (controle do veículo); tratadas com nisina -  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$  (controle positivo - CP) e tratadas com os compostos **BC1** e **A11** na  $\text{MIC}_{90}$  - 30 min. Ampliação: 100 x. Barra  $5\mu$





A Figura 3 aponta que houve 99% de perturbação na permeabilização da membrana bacteriana de *S. aureus* quando colocada 30 minutos em contato com **BC1**, na  $\text{MIC}_{90}$ .

**Figura 3.** Porcentagem de células bacterianas com membrana danificada após tratamento com hidroxichalconas e metoxichalconas na MIC<sub>90</sub> durante 30 minutos. Células não tratadas: controle negativo; Nisina: Controle positivo



Como foi discutido no Capítulo III, o composto **BC1** foi testado contra a bactéria Gram-positiva modelo, *Bacillus subtilis*. Embora não tenha sido possível a realização dos diversos testes de modo de ação para *S. aureus*, estima-se que os dados obtidos para *B. subtilis* possam ser similares aos de *S. aureus*, com relação a este composto, já que trata-se de ambas Gram-positivas. Os dados do ensaio de integridade de membrana citoplasmática apontaram que **BC1** atuou de maneira eficaz na perturbação da desestruturação da membrana de *S. aureus*, assim como foi visto no Capítulo III para *B. subtilis*. Embora não tenha sido realizado o teste de síntese de macromoléculas para *S. aureus*, esse resultado obtido sugere que **BC1** deve agir da mesma forma nesta bactéria. Conclui-se que **BC1** é um composto de ação multi target e que afeta diferentes espécies de bactérias Gram-positivas. Apesar de **BC1** ter sido eficaz contra *Xac* (Capítulo I) nota-se que para patógenos clínicos Gram-negativos, sua ação não foi bem sucedida. Isso pode ser devido a esses microrganismos apresentarem inúmeros genes de resistência bem como diversos mecanismos de destruição de sítios ativos de compostos, além de aparatos de bombas de efluxo que devem ser mais complexos e eficazes do que os existentes em *Xac*.

Para **A11** notou-se baixa taxa de permeabilidade nos ensaios de integridade de membrana e nenhum outro teste pôde ser realizado. Sugere-se que testes futuros relacionados ao modo de ação sejam realizados para designar o alvo deste composto frente a *S. aureus*.

Contudo, fica evidente a importância da membrana externa para garantir a maior resistência das bactérias Gram-negativas, o que também explica porque os compostos testados contra esses microrganismos não apresentaram resultado significativo.

### 3. CONCLUSÃO

Dois compostos da classe das chalconas foram ativos contra a bactéria *S. aureus*. Porém o mecanismo de ação de um deles não foi completamente elucidado, necessitando de futuras análises para certificação e complemento desses resultados. Mesmo assim, as análises evidenciam que as chalconas **BC1** e **A11** são promissoras para futuros ensaios e desenvolvimento de novos fármacos.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; ATHAYDEFILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p.141-148, 2007.
- BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing <<http://brcast.org.br/>> Acesso em 09/03/2017.
- DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.26, n.4, p. 527-31, 2003.
- HO K.Y.; TSAI, C. C.; HUANG, H. S.; CHEN, C. P.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 187-191, 2001.
- KRÓL, E.; BORGES, A. S.; SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Front. Microbiol.**, 6, 1–12, 2015.
- LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol.**, 92, 46S–54S, 2002.
- LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. M.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R. T.; VIEIRA, R. C.; OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA Y.; PINHEIRO, D. P. G.; SILVA, P. E. A.; TEIXEIRA, D. F.; LOURENÇO, M. C. S. Screening of Central and South American plant extracts for

antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Rev Bras Farmacogn.** v. 16, p. 6-11, 2006.

- LEVY, S. B. Antibiotic availability and use: consequences to man and his environment. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 11, p. 835-875, 1991.
- LIMA I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 16, p. 197- 201, 2006.
- MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. **Antimicrobial agents and Chemotherapy.** p. 3616–3619, 2003.
- MENG, J. C.; ZHU, Q. X.; THAN, R. X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soro-seris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. **Planta Med**, v. 66, p. 541-544, 2000.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. **Nat Prod Rep.**, v.30, n.4, p. 584-592. 2013.
- PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents Chemother.** 46, 2720–2722, 2002.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacol.** v. 77, p. 37-40, 2001.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 455-465, 2007.

## CONCLUSÃO GERAL

Contudo, fica evidente que a modificação e derivação de chalconas é eficaz, uma vez que diversas moléculas modificadas adquiriram maior potencial antimicrobiano do que a estrutura precursora. Seis compostos foram ativos contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, demonstrando também redução e eliminação de sintomas de cancro cítrico nos testes em planta. Nove compostos foram bioativos contra *B. subtilis*, bactéria Gram-positiva modelo de ensaios biológicos. Os ensaios de mecanismo de ação puderam indicar que alguns compostos podem ter ação multi target enquanto outros podem ter maior especificidade, agindo apenas em divisão celular bacteriana ou apenas em desestruturação da membrana citoplasmática. Duas das chalconas modificadas também foram eficazes contra o patógeno *S. aureus* e, possivelmente, podem ser promissoras para desenvolvimento de novos fármacos. Este trabalho abriu possibilidades de futuras análises e novas etapas de ensaios biológicos para que os compostos avaliados possam ter aplicabilidade tanto na área agrícola como na área farmacêutica.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Acredita-se que, além da realização de ensaios biológicos mencionados no trabalho, que possam completar e comprovar o verdadeiro modo de ação de alguns compostos avaliados, as novas etapas que podem ser feitas objetivando a aplicabilidade dos compostos mostrados neste trabalho, assumem a exploração no âmbito da toxicidade dessas moléculas. Uma vez que sabe-se que o cobre é altamente tóxico, carcinogênico e mutagênico, o interesse é explorar a toxicidade das moléculas que foram bioativas tanto em termos de citotoxicidade e genotoxicidade para células eucarióticas, mas também avaliando a fitotoxicidade em sementes e zootoxicidade com animais essenciais no campo, tais como alguns polinizadores. Espera-se que esses testes possam mostrar menor toxicidade dos compostos avaliados comparados ao cobre, uma vez que são derivados de metabólitos secundários de plantas. Isso incentivaria ainda mais, a consolidação, uso e aplicação desses compostos substituindo o uso de cúpricos. Além disso, se a citotoxicidade dos compostos for baixa, pode-se partir para outras etapas associadas na consolidação de uma nova substância com aplicação farmacológica.

---

Ms. Luana Galvão Morão

---

Prof. Dr. Henrique Ferreira