UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ANDRÉ GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE MOLÉCULAS SECRETADAS POR
POPULAÇÕES CELULARES UTILIZANDO
TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr5890
O original se encontra disponível na secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

14/11/2012

ANDRÉ GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE MOLÉCULAS SECRETADAS POR
POPULAÇÕES CELULARES UTILIZANDO
TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Química*

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Análise de moléculas secretadas por populações
celulares utilizando técnicas eletroanalíticas”**

ANDRÉ GUIMARÃES DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Lúcio Angnes
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Mauro Bertotti
IQ - USP

Prof. Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho
UFABC

SÃO PAULO
21 de dezembro de 2012

Dedicatória

Dedico essa dissertação aos meus Pais e Avós
Símbolos de como se criar e sustentar uma família
Símbolos do que é a fé, em Deus e nos seres humanos
Pessoas reais, se por acaso subi, esses foram os pilares

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lucio Angnes pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência dispensada, pelos conselhos e pela amizade.

Aos Prof. Dr. Mauro Bertotti e Profa. Dra. Maria Lourdes Leite de Moraes pelas críticas e sugestões fornecidas durante não só a qualificação.

Aos Profs. Ivano Gebhardt Rolf Gutz e Claudimir Lucio do Lago pelas longas conversas de laboratório que muito ensinaram.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah por permitir a utilização de seus equipamentos e espaço do seu laboratório assim como pelas discussões e interpretação de resultados.

Aos Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Profa. Dra. Lucia Helena Gomes Coelho, Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, Prof. Dr. Tiago Luiz Ferreira, Prof. Dr. Carlos A. Neves.

A todos os docentes do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos oferecidos durante toda a graduação e pós-graduação.

Ao Colégio Rio Branco e todo seu corpo docente por minha formação juvenil (especialmente às professoras Patricia e Lisete que me iniciaram no universo da química).

À Monitoria do Colégio Rio Branco, muito importante na minha formação pessoal onde fiz grandes amigos.

À Associação Atlética Acadêmica Ana Rosa Kucinski, pelos Interquímicas e BIFEs e todos os momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA) Eric (Pop), Renata, Iranaldo, Thiago (Baby), Guilherme (Splinter), Fernandinho (Ferds), Vinicius, Marcos (Marcão), Luís (Sensation), Johny, Fabiana (Fabs), Ivan, Fernando (Caracol),

Alexandre (Peixe), Thiago, Othon, Thiago (Rei), Mauro (Baiano), Denis (Pimenta) e Simone pelas conversas, discussões filosóficas (eternas), ajudas, cervejas e risadas.

Aos amigos do Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (LSEME) pelas conversas, ajudas, cervejas e risadas. Em especial ao Alex e o Gabriel (Capeta).

Aos amigos do Laboratório de Línguas Eletrônicas e Sensores Químicos.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Shaker Chuck Farah, principalmente ao Maxuel e o Maycon por toda ajuda oferecida durante o Mestrado.

Aos amigos do Areião: Fabão, Mario, Wanderson, Zé, Nivaldo (véio), Rodolfo, Braga, Lucas, Wellington, Caiçara, Igor, Bruno, Ronaldo, Zero, e todos os pernas de pau que já passaram por lá, pelas peladas e pelas risadas.

Aos amigos conquistados durante esses anos de faculdade Nelson, Alain, Débora, Virtu, Nadja, Marília, Gu, Renata, Ricardo, Luciane, Claudio, Ju, Zé, Butu, Gerson, Barba, Bambi, Dani Dan, Boi, Mikhael, Rod, Guga, Ana, Thaís, Amira, Bahr, Ana, Helena, Tati por tudo que passamos juntos, pelo apoio, risadas e cervejas.

Aos amigos dos tempos de Colégio Rio Branco, principalmente: Papa, Biel, Vi, Rafa e Lalá que estão sempre ao meu lado por mais que o tempo passe e os caminhos se diferenciem.

Aos amigos de infância condomínio Vila Panamericana: Dobsinho, Lucas, Lud, Leandro, Mateus, Bruno e Caíto.

À Monitoria do Colégio Rio Branco

À minha namorada Maiara pelo amor, carinho, apoio, conselhos, diversão e tantas outras coisas que daria outra dissertação.

À Julieta, Oscar, Sergio, Rodrigo, Laura, Fábio e a Laurinha

Aos meus avós, Benedito, Maria, Severino (*In memorian*) e Maria.

Um agradecimento muito especial a toda minha família que sempre esteve ao meu lado. Especialmente à Rosângela Fátima da Silva que considero uma irmã e ao meu afilhado Rafael Silva.

Ao meu amado irmão Arthur Guimarães de Oliveira, o Tuli!

Aos meus pais Moacir Marques de Oliveira e Marlene Gomes Guimarães de Oliveira que possuem meu amor e idolatria.

À todas as pessoas que me ajudaram durante todos esses anos direta ou indiretamente.

À FAPESP e CNPq e ao Instituto de Química pelo suporte financeiro.

Muito Obrigado.

Ao buscar o Bem também será Mau.

Ai será humano.

RESUMO

Oliveira A. G. **ANÁLISE DE MOLÉCULAS SECRETADAS POR POPULAÇÕES CELULARES UTILIZANDO TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS.** 2012. 105p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (DSF), substância utilizada como autoindutor nos sistemas de *Quorum Sensing* da bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, foi utilizado como um modelo de estudos para a análise de moléculas secretadas por populações celulares utilizando técnicas eletroanalíticas.

Cultivos celulares provenientes de três linhagens diferentes da bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. citri* foram utilizados para os estudos. Uma linhagem selvagem (WT), que produzia DSF em quantidades naturalmente observadas, e duas linhagens geneticamente modificadas. Em uma linhagem (ΔC) a modificação genética resultava em elevada produção de DSF, para a segunda (ΔF) o resultado era a anulação da produção do autoindutor.

As principais técnicas analíticas utilizadas foram: voltametria cíclica, eletroforese capilar e cromatografia líquida (com detecção UV-Vis e acoplada a espectrometria de massas), sendo a última para efeitos de comparação. Procedimentos de extração líquido-líquido com solventes orgânicos foram realizados como etapas de pré-tratamento de amostras, visando diminuir a quantidade de interferentes e realizar uma pré-concentração do analito.

Três metodologias principais foram adotadas. Uma primeira voltada para a diferenciação dos cultivos celulares, analisando-se ou os sobrenadantes provenientes dos cultivos ou os extratos resultantes dos pré-tratamentos desses sobrenadantes, tendo como

principal foco a identificação de um sinal diferencial entre os cultivos que correspondesse às quantidades de DSF, ou seja, inexistente para a linhagem ΔF , de alta intensidade para linhagem ΔC e de intensidade intermediária para a linhagem WT. A segunda metodologia foi baseada no uso de uma molécula modelo para realizar experimentos e obter dados como parâmetros físico-químicos, o ácido láurico (ácido dodecanóico) foi escolhido por sua semelhança estrutural e facilidade de obtenção, curvas de calibração e experimentos de separação de moléculas com estrutura semelhante foram realizados com a técnica de eletroforese capilar. Uma terceira metodologia foi desenvolvida utilizando o padrão do ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (DSF), curvas de calibração foram obtidas com o padrão isolado apresentando ótimas linearidades, tanto com a técnica de eletroforese capilar quanto com cromatografia líquida com detecção UV-Vis, experimentos de adição de padrão às amostras também foram executados.

Os experimentos realizados com as amostras não apresentaram os resultados esperados, os problemas foram associados principalmente à quantidade de interferentes na amostra e a baixa concentração do analito nos cultivos, sendo que os métodos de extração realizados não foram suficientes para solucioná-los. O insucesso da técnica de voltametria cíclica foi associado ao envenenamento do eletrodo, devido à alta quantidade de compostos orgânicos presentes na amostra, e dúvidas relacionadas à eletroatividade do DSF. As dificuldades encontradas com a técnica de eletroforese capilar foram associadas à alta força iônica da amostra, presença de interferentes e baixa concentração do analito nos cultivos.

Mesmo os experimentos realizados com cromatografia líquida acoplada a detecção com espectrometria de massas não atenderam às expectativas, dificultando a elucidação dos problemas encontrados até então e impossibilitando o desenvolvimento de uma metodologia que atendesse aos objetivos propostos.

Palavras-chave: Quorum Sensing, *Xanthomonas*, DSF, Eletroquímica, Eletroanalítica, Eletroforese Capilar.

ABSTRACT

Oliveira A. G. **CELL SECRETED MOLECULES ANALYSIS BY ELECTROANALYTICAL TECHNIQUES.** 2012. 105p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cis-11-methyl-2-dodecenoic acid, also known as DSF (autoinducer of the *Quorum Sensing* system used by the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) was explored as a study model for the cell secreted molecules analysis by electroanalytical techniques.

Cell cultures from three different cell lines of the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* were used for this study. A wild type (WT), which produced DSF in naturally observed quantities and two genetically modified ones. One of the lines (ΔC) had a genetic modification that resulted in an elevated production of DSF, and the other (ΔF) had a modification that stopped DSF production.

Main analytical techniques used were: cyclic voltammetry, capillary electrophoresis and liquid chromatography (with UV-Vis detection and coupled with mass spectrometry), this last one was used with comparison purposes. Liquid-liquid extractions with organic solvents were realized as sample pre-treatment steps aiming the reduction of interfering species and analyte pre-concentration.

Three main methodologies were adopted. One based in the differentiation of cell cultures analyzing or the cell culture supernatants or the resulting extracts from the pre-treatment steps. The main focus was the identification of a differential signal between the cultures that corresponded to the DSF quantities, in other words, null for the ΔF line, high intensity for the ΔC line and a intermediary intensity for the WT line. The second

methodology was based in experiments with a model molecule to obtain some data such as physical-chemistry parameters. Lauric acid (dodecanoic acid) was chosen for its structural similarity and easily acquisition. Calibration curves and similar structure molecules separation experiments were realized using capillary electrophoresis. Third and last methodology was developed using standard cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (DSF). Calibration curves were obtained with the isolated standard showing great linearities using both capillary electrophoresis and liquid chromatography with UV-Vis detection. Experiments of standard addition to the samples were also realized.

Experiments using the samples did not show the expected results. Problems found were mainly associated with high amount of interfering species and low analyte concentration at the cultures, extraction methods used were not enough to solve this. The failures with the cyclic voltammetric techniques were associated to electrode poisoning, due to the high amount of organic compounds present at the sample, and DSF lack of electroactivity. Difficulties found with capillary electrophoresis were associated with the samples high ionic strength, presence of interfering species and low analyte concentration.

Even liquid chromatography coupled with mass spectrometry experiments didn't attended the expectations. Making it difficult to elucidate the problems and not allowing the development of a methodology that could achieve the proposed objectives.

Keywords: Quorum Sensing, Xanthomonas, DSF, Electrochemistry, Electroanalysis, Capillary Electrophoresis.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Análise de moléculas secretadas por populações celulares	15
1.2 Quorum Sensing	16
1.2.1 O Fenômeno	16
1.2.2 Análise de autoindutores.....	16
1.3 Premissas Analíticas	18
1.4 Técnicas eletroanalíticas	18
1.5 Técnicas eletroanalíticas aplicadas ao Quorum Sensing.....	22
1.6 Quorum Sensing e o Cancro Cítrico.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Reagentes	27
3.2 Preparo das soluções de ácidos graxos e DSF	27
3.3 Cultivo das culturas e obtenção dos extratos	28
3.4 Extrações realizadas com os cultivos	30
3.4.1 Extração 1	31
3.4.2 Extração 2	31
3.4.3 Extração 3	31
3.4.4 Extração 4	32
3.5 Instrumentação	33

3.5.1	Voltametria Cíclica	33
3.5.2	Eletroforese Capilar	33
3.5.3	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	Análise dos padrões: Ácido Láurico e DSF.....	38
4.1.1	Ácido Laurico.....	38
4.1.1.1	NACE.....	39
4.1.1.2	Tampão Tris/Cl ⁻	42
4.1.2	DSF	49
4.2	Análise dos Sobrenadantes.....	53
4.2.1	Voltametria Cíclica	54
4.2.2	Eletroforese Capilar - NACE	60
4.2.3	Eletroforese Capilar - Tampão Tris/Cl	65
4.3	Comparação com LC-MS.....	76
5.	CONCLUSÕES	91
6.	REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Análise de moléculas secretadas por populações celulares

A análise de moléculas secretadas por populações celulares possui variados fins e as mais diversas aplicações, do diagnóstico de doenças relacionadas à produção de substâncias específicas ^{1; 2}, ao auxílio em pesquisas genéticas (correlacionando-se a análise de sinalizadores celulares com variações da expressão gênica ³). Sem dúvida um tema de grande relevância, fundamental para o grande avanço das pesquisas bioquímicas nas últimas décadas.

Tal tema possui grande abrangência e em muitos casos se mostra extremamente desafiador. Por abrangência devemos considerar tanto as diversas espécies celulares estudadas em laboratórios de pesquisa pelo mundo, quanto as moléculas estudadas em cada caso. Em geral não há um padrão específico do ponto de vista químico, o que leva a uma gigantesca variedade molecular. A complexidade do meio em que tais moléculas se encontram é um fator comum a todos os casos, iniciando-se pelos componentes do substrato em que as células são cultivadas e ampliando-se com a secreção de diferentes substâncias pela população celular, resultando em uma elevada quantidade de moléculas no meio. Tal complexidade gera dificuldades do ponto de vista analítico, refletindo-se em potenciais interferentes, tornando um grande desafio o desenvolvimento de métodos de análise nessas condições. A análise de moléculas envolvidas em sistemas de *Quorum Sensing* exemplifica tal desafio.

1.2 *Quorum Sensing*

1.2.1 *O Fenômeno*

Em meados das décadas de 60 e 70 estudos revelaram a existência de um sistema de intercomunicação entre bactérias, hoje chamado de *Quorum Sensing* ⁴. Tal sistema é baseado em moléculas sinalizadoras chamadas autoindutores, estes são secretados e reconhecidos (através de receptores) pelas próprias bactérias de modo que, dentro de uma mesma colônia, elas possam monitorar umas às outras e modificar a expressão de determinados genes dependendo dos sinais transmitidos. Em termos simples, quando um autoindutor atinge uma concentração crítica, evidenciando uma alta densidade populacional, é iniciada uma cascata de transdução que culmina na alteração da expressão gênica de toda uma população ⁵.

O fenômeno *Quorum Sensing* permite que uma colônia de bactérias se coordene para atuar como um só organismo multicelular ao invés de diferentes organismos unicelulares. Ao atuar em conjunto a população aumenta suas chances de sobrevivência, sendo que no caso de bactérias patogênicas a chance de dominar o hospedeiro também é aumentada. Diversos processos bacterianos são controlados por *Quorum Sensing* sendo alguns deles: simbiose, virulência, esporulação e formação de biofilmes ⁶.

1.2.2 *Análise de autoindutores*

Os métodos comumente utilizados para a análise de autoindutores são os desenvolvidos por *Barber et al* ⁷ e *Slater et al* ³. Ambos utilizam micro-organismos

geneticamente modificados como biosensores, os chamados “Engineered Biosensors”⁸. Tal estratégia realiza a detecção do analito de maneira indireta, ou seja, o biosensor produz um analito detectável após a interação com o autoindutor. Para isso, o micro-organismo utilizado é geneticamente modificado de modo que seu DNA contenha uma região promotora (região do DNA que na presença de um promotor inicia a transcrição da região adjacente a ela) cujo promotor é o analito de interesse (no caso o autoindutor), e acoplado a esse promotor há um gene responsável pela produção de um produto detectável (na maioria dos casos o gene leva a produção de uma enzima, a mesma hidrolisa determinada substância presente no meio de cultura gerando um produto facilmente detectável).

Após a modificação genética o biosensor é cultivado junto com o micro-organismo estudado (que produz o autoindutor). No caso dos biosensores que produzem enzimas, o meio de cultura deve conter o substrato hidrolisável pela mesma. Pela metodologia desenvolvida por *Slater et al*³ o biosensor produz a enzima β -glucuronidase na presença de DSF, a enzima hidrolisa a substância X-Glca (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico) que está presente no substrato. A hidrólise do X-Glca irá resultar na formação do produto “Cl Br-Indigo”, um corante insolúvel de coloração azul. Com isso halos azuis são observados ao redor das colônias produtoras de DSF.

A principal vantagem de tal procedimento é a alta seletividade do biossensor e a flexibilidade no desenvolvimento do gene (tanto da região promotora quanto do gene acoplado). No entanto, os custos e o tempo necessário para a realização de tal procedimento são elevados, o que leva a busca por metodologias analíticas mais simples, rápidas e menos dispendiosas.

1.3 Premissas Analíticas

Nas últimas décadas o desenvolvimento das técnicas instrumentais de análise foi impulsionado pelos avanços na área de eletrônica e computação, ampliando as opções do analista. Devido à vasta gama de técnicas e metodologias, a adoção de alguns critérios é necessária para a solução de determinado problema analítico, como: sensibilidade do analito ao método; quantidade de amostra disponível; faixa de concentração em que o analito se encontra; componentes da amostra potencialmente interferentes; dentre outros ⁹.

Dentre os problemas relacionados à análise de moléculas secretadas por populações celulares, destaca-se a baixa quantidade de amostra disponível e a grande quantidade de componentes potencialmente interferentes (características comumente encontradas em matrizes biológicas). Tais fatores influenciam diretamente a escolha da metodologia utilizada, o uso de algumas técnicas torna-se inviável devido ao alto consumo de amostra (como absorção atômica), já os componentes da matriz levam a necessidade de técnicas ou metodologias mais seletivas (como técnicas de separação ou etapas de preparo de amostra para eliminação de interferentes).

1.4 Técnicas eletroanalíticas

Nesse contexto uma possibilidade que desponta é o uso de técnicas eletroanalíticas. Técnicas eletroquímicas de análise vêm sendo amplamente empregadas nas mais diversas áreas, como por exemplo: análises clínicas, biológicas, ambientais e de alimentos ^{10; 11; 12}. Dentre as vantagens oferecidas pelos métodos que exploram tais técnicas destacam-se: elevada sensibilidade e seletividade; ampla faixa linear de concentração; curto tempo de

análise e a simplicidade de instrumentação requerida para as medidas, possibilitando análises em campo e miniaturização do sistema analítico ¹³.

De maneira simplificada, pode-se dizer que técnicas eletroanalíticas são baseadas em sinais gerados por um ou mais eletrodos, relacionados (direta ou indiretamente) com a concentração de uma determinada espécie em solução. Tais sinais podem provir de uma propriedade do meio em que o eletrodo se encontra (como condutividade) ou fenômenos gerados na superfície eletródica (exemplos: fenômenos de oxidação e redução monitorados por técnicas potenciométricas, voltamétricas ou coulométricas), os sinais geralmente coletados são diferença de potencial elétrico (E) e corrente elétrica (I) (que pode ser integrada em relação ao tempo da medida fornecendo um sinal de carga). Em alguns casos diferença de potencial e corrente elétrica não são coletados como sinais, mas aplicados ao sistema (com o uso de fontes ou potenciostatos) de modo que a aplicação e variação de um leva ao surgimento e variação do outro; em outras situações reações químicas levam ao surgimento desses sinais, bastando seu monitoramento para uso como técnica analítica.

Nesse aspecto técnicas eletroforéticas se diferenciam das demais técnicas eletroanalíticas, pois os eletrodos responsáveis pelo processo eletroforético não são utilizados para a obtenção do sinal analítico. Vista como a “eletroquímica da ponte salina” a técnica baseia-se na separação de espécies com carga, de acordo com suas mobilidades eletroforéticas, frente a um intenso campo elétrico ¹⁴. Sendo assim os eletrodos são responsáveis pela separação dos analitos e um sistema de detecção é necessário (seja instrumental ou com uso de um revelador apropriado).

Técnicas eletroforéticas são utilizadas nos laboratórios de bioquímica há muitos anos. A presença de cargas em diversas moléculas de interesse bioquímico (como proteínas e aminoácidos) controláveis através do pH do meio, e os diferentes volumes solvatados de tais moléculas podem levar a diferenciação de suas mobilidades eletroforéticas, permitindo uma fácil separação. A eletroforese em placa com géis (em geral agarose ou poliacrilamida) é o principal destaque, sendo utilizada tanto em procedimentos de purificação quanto com fins analíticos (identificação e quantificação de compostos). Recentemente os avanços da área de sequenciamento genético fizeram com que a eletroforese capilar também fosse introduzida aos laboratórios de bioquímica ¹⁵, uma vez que os aparelhos de eletroforese capilar trouxeram agilidade aos sequenciamentos, contribuindo significativamente para a conclusão do projeto genoma antes do prazo previsto. Diversos trabalhos na literatura demonstram a aplicação de técnicas eletroforéticas em meios biológicos ¹⁶, parte deles envolvendo a análise de substâncias secretadas por células ¹⁷. Destacam-se nessa área os trabalhos realizados com microchips, gerando uma simplificação da instrumentação necessária e trazendo outras vantagens como a portabilidade do sistema ¹⁸.

Dentre as técnicas eletroforéticas, a eletroforese capilar é a que mais se destaca como técnica instrumental de análise. O uso de capilares de sílica com diâmetros próximos de 360 µm externamente e 15-100 µm internamente promoveu um grande avanço na área, levando ao surgimento da técnica, cuja eficiência de separação chega a superar as normalmente observadas em técnicas cromatográficas convencionais. Parte desta eficiência se deve à alta razão entre a área superficial e o volume interno do capilar, permitindo o estabelecimento de maiores campos elétricos para a separação ¹⁹ com minimização do aquecimento da solução por efeito Joule. Uma segunda vantagem proporcionada é a contribuição do fluxo eletrosmótico, gerado devido à presença de grupos com carga negativa na parede interna do

capilar (quando preenchidos com eletrólitos em pHs geralmente acima de 2), o fluxo eletrosmótico (*FEO*) diminui o tempo das análises e permite a separação de moléculas com cargas positivas e negativas em uma mesma corrida.

Diversos detectores são utilizados em equipamentos de eletroforese capilar explorando diferentes propriedades como: absorbância; índice de refração; condutividade; fluorescência; dentre outras ¹⁹. A escolha do detector está relacionada a diferentes fatores: o analito possuir a propriedade medida pelo detector (existem métodos de detecção indireta, no entanto, métodos diretos são preferíveis sempre que possível); a concentração do analito na amostra (em eletroforese capilar esse fator pode se tornar crítico, tendo em vista que a reduzida quantidade de amostra injetada no interior do capilar diminui o limite de detecção de diversos tipos de detectores); o acoplamento do detector ao aparelho (devido ao tamanho reduzido do capilar pode haver dificuldades); e o intenso campo elétrico também gera dificuldades em alguns casos (como para o caso da detecção eletroquímica).

Focando-se em detectores eletroanalíticos os mais utilizados são: amperométrico e condutométrico. Enquanto o primeiro é considerado um detector específico (seu sinal é referente às espécies eletroativas em um determinado potencial) o segundo é comumente considerado universal (por medir uma propriedade do meio). Quanto aos limites de detecção os sistemas amperométricos apresentam melhores resultados, encontrando-se na faixa de 10^{-8} - 10^{-9} mol L⁻¹, enquanto detectores condutométricos estão na faixa de 10^{-5} - 10^{-6} mol L⁻¹ ¹⁹. Considerando o acoplamento do sistema, os detectores condutométricos se destacam por possibilitarem a detecção sem contato. Nesse caso, eletrodos externos ao capilar medem a condutividade da solução presente em seu interior ^{20; 21} causando interferências mínimas no

sistema. Em contrapartida, a detecção amperométrica requer que os eletrodos estejam em contato com a solução, levando à necessidade de sistemas de acoplamento (celas eletroquímicas na coluna capilar), ou então, o posicionamento de tais eletrodos após a coluna capilar, zona em que os processos de difusão passam a ser mais significativos podendo causar alargamento dos sinais e perda de resolução.

1.5 Técnicas eletroanalíticas aplicadas ao *Quorum Sensing*

O uso de técnicas eletroanalíticas para análise de moléculas relacionadas com fenômenos de *Quorum Sensing* é um tema pouco explorado, como mostra a literatura. Uma busca realizada no site *Web of Knowledge* em outubro de 2012 utilizando a combinação de “Quorum Sensing” com diferentes palavras-chave (como tópicos de busca) resultaram nos artigos indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das Buscas no Site Web of Knowledge em 15/10/2012

<i>Palavra-Chave</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referências</i>
<i>Electroanalysis</i>	0	
<i>Electrochemical</i>	7	22; 23; 24; 25; 26; 27; 28
<i>Electrophoresis</i>	75	17; 29; 30; 31
<i>Electrochem*</i>	9	22; 23; 24; 25; 26; 27; 28
<i>Electropho*</i>	104	17; 29; 30
<i>Capillary Electropho*</i>	4	17; 29; 30
<i>Voltam*</i>	4	22; 23; 24; 25
<i>Ampero*</i>	2	22; 23
<i>Coulo*</i>	0	
<i>Potentio*</i>	1	24

Obs: uso do asterisco expande a busca para qualquer terminação que essa palavra possua.

Vale ressaltar que muitos desses trabalhos utilizam técnicas eletroquímicas (principalmente as eletroforéticas) sem fins analíticos. Também se observa que diversos artigos relacionados ao fenômeno de *Quorum Sensing* não tratavam da análise do autoindutor em si. A maioria dos trabalhos envolve estudos na área de proteômica com o intuito de elucidar quais proteínas participam dos processos de *Quorum Sensing* e seus mecanismos de atuação. Tais fatos justificam o número elevado de resultados para as palavras *Electrophoresis*, e *Electropho**.

Além disso, analisando os artigos das buscas com as palavras *Electrophoresis* e *Electropho** observou-se que os únicos artigos focados na análise dos autoindutores foram os mesmos encontrados na busca *Capillary Electropho**, por esse motivo as referências apresentadas são as mesmas. A busca *Electrochem** resultou em apenas dois artigos adicionais à busca *Electrochemical*, no entanto nenhum deles tratava da análise de autoindutores. As buscas com as palavras-chave *Voltam**, *Ampero**, *Coulo** e *Potentio** tiveram como resultados artigos já encontrados na busca *Electrochemical*.

Em suma, a análise dos resultados obtidos com as buscas indica que apenas 9 artigos foram encontrados envolvendo o uso de técnicas eletroanalíticas para a análise de autoindutores em sistemas envolvendo *Quorum Sensing*. Desses o mais antigo foi publicado em 2003¹⁷. Indicando que o uso de técnicas eletroanalíticas para análise de moléculas envolvidas nos sistemas de comunicação celular por *Quorum Sensing* é um tema recente e ainda pouco explorado na comunidade científica.

1.6 *Quorum Sensing* e o Cancro Cítrico

O sistema de *Quorum Sensing* está relacionado com a patogenicidade do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ³², bactéria causadora do cancro cítrico, uma doença agrária que ocorre nos citros e em seus aparentados. Diagnosticado através da observação de pequenas pústulas circulares e oleosas com até 1cm de diâmetro nas folhas e frutos, sua infecção afeta todos os órgãos da planta acima do solo. Após sua detecção nos pomares as medidas de combate levam não só à erradicação das plantas infectadas, mas também de todas as plantas vizinhas a essas num raio de 30 metros ³³, causando grandes prejuízos aos produtores. Considerando-se a importância comercial dos citros (que também são muito comercializados na forma de sucos) o cancro gera grande impacto na economia de diversos países, sendo comum políticas governamentais voltadas para seu controle e erradicação em países produtores de cítricos como Brasil e Estados Unidos ³⁴.

Como acima citado, a patogenicidade da bactéria está diretamente associada ao sistema de *Quorum Sensing*, neste caso o autoindutor é o ácido cis-11-metil-2-dodecenóico, mais conhecido como DSF (Diffusible Signal Factor) ³⁵. Diversas pesquisas realizadas por todo o mundo (incluindo o Brasil) são focadas no estudo do sistema de *Quorum Sensing* das bactérias da classe *Xanthomonas*, procurando desvendar desde os genes relacionados ao sistema de comunicação até a atuação específica de cada proteína nessa atividade ^{36; 37}.

A análise dos resultados da Tabela 1, indicou que nenhum dos artigos encontrados utilizava a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* como alvo de estudos para análise de sistemas de *Quorum Sensing* explorando técnicas eletroanalíticas, motivando o desenvolvimento desse mestrado, cujos resultados estão aqui apresentados. Em suma, esse

trabalho buscou (sem o êxito esperado) formas de quantificação do ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (DSF) por via eletroanalítica nos cultivos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Serão apresentados resultados iniciais de experimentos exploratórios com a técnica de voltametria cíclica, resultados mais promissores com a técnica de eletroforese capilar e resultados obtidos com a técnica de espectrometria de massas para efeitos comparativos. Procedimentos de extração visando o preparo da amostra também foram realizados e serão apresentados ao longo dos experimentos.

2. OBJETIVOS

Com base no anteriormente exposto, esse trabalho buscou desenvolver metodologias empregando técnicas eletroanalíticas para quantificar o composto DSF (ácido cis-11-metil-2-dodecenóico), excretado pelas bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e responsável pelo sistema de *Quorum Sensing* do fitopatógeno. Os métodos de análise atualmente utilizados envolvem o emprego de organismos geneticamente modificados para realizar uma análise indireta do composto ^{3; 35; 38}. Por envolver o cultivo dos organismos o ensaio requer pelo menos dois dias. Sendo assim o desenvolvimento de metodologias mais rápidas é altamente desejável.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Com exceção das soluções contendo DSF e ácidos graxos, todas as soluções utilizadas foram preparadas através da diluição dos reagentes de pureza analítica em água deionizada (resistividade maior que 18 M Ω cm, purificada em sistema NANOpure, Barnstead/ThermolyneCo., Dubuque, Iowa, USA). Os reagentes de pureza analítica vieram de diferentes procedências. Acetonitrila, etanol, glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de amônio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, Tris(hidroximetil)aminometano foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha); monohidrogenofosfato de sódio, dihidrogenofosfato de potássio, tiamina (Synth/Diadema/Brasil); sulfato de potássio (Carlo Erba, Milão, Itália); acetato de etila, n-hexano, hidróxido de lítio, padrões dos ácidos graxos e DSF foram de procedência Sigma (St. Louis, MO, EUA).

3.2 Preparo das soluções de ácidos graxos e DSF

As soluções de ácidos graxos foram preparadas através da pesagem dos mesmos e posterior dissolução em etanol, sendo conservadas em geladeira a 5°C.

Em temperatura ambiente o DSF é um líquido com alta viscosidade, de aspecto “oleoso”. Não foram encontrados dados referentes à densidade do composto, de modo que

não foi possível calcular o número de mols por volume. Sendo assim, a maneira encontrada para o preparo das soluções foi realizar a pesagem total do conteúdo do frasco e solubilizá-lo num volume conhecido de solvente.

Primeiramente o frasco contendo o DSF foi pesado, em seguida etanol foi colocado dentro do frasco para a solubilização do composto, a solução obtida foi transferida para outro recipiente e o frasco original foi lavado com alíquotas de etanol. Na sequência o frasco lavado foi deixado aberto na capela para a evaporação dos resíduos de solventes presentes em seu interior, e após a secagem a massa do frasco vazio foi anotada. A massa inicial (frasco contendo DSF) foi subtraída da massa final (frasco vazio) e esse valor foi utilizado para calcular o número de mols presente na solução etanólica, assim obtendo a concentração de DSF.

Com isso uma solução estoque na concentração de 9 mmol L^{-1} de DSF foi preparada em etanol. A solução foi dividida em diversos frascos com o intuito de poder manipular parte da mesma, sem expor todo o estoque à variação de temperatura, evitando uma possível degradação do composto e perda do solvente por evaporação.

3.3 Cultivo das culturas e obtenção dos extratos

Os meios de cultura utilizados nos estudos foram: meio 2XTY (denominado meio rico) e meio M9 (denominado meio mínimo). O primeiro meio teve composição de 16 g de triptona (BD-Biosciences/Franklin Lakes/USA), 10 g de extrato de levedura (HIMEDIA/Mumbai/Índia) e 5 g de cloreto de sódio (Synth/Diadema/Brasil) para um 1 L de solução ajustados em pH 7,3.

O segundo (M9) constituía-se em: 7,78 g de monohidrogenofosfato de sódio; 3 g de dihidrogenofosfato de potássio; 0,5 g de cloreto de sódio; 0,24 g de sulfato de potássio; 4 g de glicose (adicionados através de 20 mL de solução 20% m/v filtrada com filtros de 22 μ m); 14,7 mg de cloreto de cálcio; 10 mg de tiamina (adicionados através de 1 mL de solução 10 mgmL^{-1} filtrada com filtros de 22 μ m); 1 g de cloreto de amônio, para 1 L de solução ajustados em pH 7,35.

Todos os cultivos bacterianos foram realizados no laboratório do Prof. Shaker Chuck Farah. Os estudos analíticos foram realizados com os sobrenadantes provenientes dos cultivos bacterianos em meio líquido, os quais foram realizados a partir de um estoque de cada linhagem bacteriana em meio sólido (meio rico com adição de ágar) que foi transferido para meio líquido rico (2XTY) ou mínimo (M9). Os cultivos tiveram um tempo de crescimento de 12 horas sob agitação com temperatura entre 28-30°C. Em seguida, foram centrifugados para a decantação das células, o sobrenadante obtido de cada linhagem foi transferido para frascos de 100 mL (1 frasco para cada linhagem totalizando 3 frascos), por último foram congelados a -15°C.

Os primeiros experimentos (Seção 4.2.1) foram realizados com os sobrenadantes provenientes de cultivo em meio rico. A utilização de meios mínimos de cultura se iniciou após os insucessos das primeiras tentativas de análises. A realização de cultivos celulares utilizando meio mínimo de cultura tem como objetivo um maior controle do meio em que as células são cultivadas, facilitando diversos estudos relacionados ao crescimento celular. A ideia é fornecer apenas as fontes de nutrientes essenciais para o crescimento celular, de modo

a ter um total controle não só da composição, mas também da quantidade de cada elemento do meio.

Estudos bioquímicos em geral são realizados com meios ricos de cultura (meios que em geral contém extrato de levedura em sua composição, fornecendo uma abundância de nutrientes para as células) e alguns motivos para isso são: a elaboração dos meios mínimos é mais demorada e trabalhosa e o comportamento das células pode não ser o mesmo em ambos os meios. Mesmo com as ressalvas apresentadas, experimentos com meio mínimo de cultura foram realizados, uma vez que o controle da composição do meio facilita estudos de interferência e auxiliam na resolução eventuais problemas.

Três linhagens de células foram estudadas, a linhagem selvagem (denominada WT) e duas linhagens mutantes. As linhagens mutantes possuem modificações genéticas nos genes: RpfF (codificador da enzima produtora de DSF) e RpfC (codificador dos receptores de DSF na membrana celular). A mutante RpfF (denominada ΔF) não produz o DSF, já a mutante RpfC (denominada ΔC) produz elevadas quantidades de DSF (comparada com a produção do composto pela linhagem WT).

3.4 Extrações realizadas com os cultivos

Ao longo dos experimentos realizados com os cultivos, quatro diferentes tipos de extrações foram empregadas e são descritas nesse item.

3.4.1 *Extração 1*

Nesse primeiro tipo de extração, utilizou-se 20 mL do sobrenadante do cultivo dos três diferentes tipos de linhagem de bactérias (ΔC , ΔF e WT). Cada uma das soluções foi acidificada com 2,2 mL de HCl 1 mol L⁻¹ com o objetivo de totalizar um volume de ácido equivalente a 10% do volume total. Em seguida 5 mL de acetato de etila foram adicionados à solução acidificada do sobrenadante. Essa solução resultante foi agitada vigorosamente com o objetivo de extrair os componentes orgânicos presentes no sobrenadante. Esse procedimento de extração com acetato de etila foi repetido mais duas vezes. As três soluções de acetato de etila resultantes das extrações foram então misturadas e evaporadas a temperatura ambiente. O sólidos remanescentes foram dissolvidos em 1 mL de etanol.

3.4.2 *Extração 2*

A extração 2 assemelha-se a extração 1, diferenciando-se pelo volume inicial de sobrenadante passar a 50 mL. Com isso, o volume de HCl utilizado teve que ser aumentado para 5,5 mL e ao invés de adicionar três alíquotas 5 mL de acetato de etila foram adicionadas três alíquotas de 15 mL para realizar a extração.

3.4.3 *Extração 3*

Nesse terceiro tipo de extração, foi utilizado o sobrenadante apenas da linhagem ΔC e o volume inicial foi de 1 L. Esse volume foi dividido em 2 partes de mesmo volume (500 mL) e,

em um deles foi adicionado DSF em uma concentração final igual a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. O procedimento de extração realizado foi idêntico tanto para a solução sem adição de DSF como para a solução com o DSF. A primeira etapa da extração consistiu em acidificar o meio adicionando 55,5 mL de HCl 1 mol L^{-1} . Cada um dos frascos contendo os sobrenadantes foi dividido em 5 partes iguais de 111 mL e com cada um desses 111 mL foi realizada a adição e consequente extração de componentes orgânicos com 3 alíquotas de 50 mL de acetato de etila, gerando um total de 750 mL de acetato de etila resultantes das extrações. Essa solução foi evaporada com o auxílio de um fluxo de ar comprimido. Os sólidos resultantes dos 500 mL iniciais foram dissolvidos em 1 mL de etanol cada um.

3.4.4 *Extração 4*

Nessa última extração, a solução final da extração anterior sem o acréscimo de DSF foi utilizada. O solvente escolhido para essa nova extração foi o n-hexano. Quatro alíquotas de 500 μL desse solvente foram usadas para fazer a extração dos componentes orgânicos. O volume final de n-hexano (2 mL) foi evaporado a temperatura ambiente e ao sólido remanescente foi adicionado 500 μL de LiOH 5 mmol L^{-1} , no entanto a solução ficou turva e o sólido não solubilizou. O sobrenadante foi então evaporado com auxílio de um fluxo de ar e o sólido remanescente foi dissolvido em etanol. A solução final foi dividida em duas partes iguais e a uma delas foi adicionada uma solução de DSF com concentração final de $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.5 Instrumentação

3.5.1 *Voltametria Cíclica*

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato PalmSens da PalmInstruments (Netherlands). Os experimentos foram realizados em celas voltamétricas (em acrílico) construídas no próprio laboratório. Os eletrodos de referência, auxiliar e trabalho foram: um eletrodo Ag/AgCl(sat) miniaturizado, um fio de platina e eletrodo de carbono vítreo comercial ($d = 2 \text{ mm}$), respectivamente.

Entre as séries de medidas, a superfície do eletrodo foi renovada por polimento com alumina ($1 \mu\text{m}$), seguido de um banho de ultrassom por 5 minutos para a remoção da sílica.

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados com dois eletrólitos distintos: KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH 1 mol L^{-1} . Ambas as soluções foram também usadas para diluir os sobrenadantes em 4 vezes antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados com uma velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} .

3.5.2 *Eletroforese Capilar*

Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar construído no próprio laboratório já descrito na literatura ³⁹, equipado com dois detectores C^4D (“capacitively coupled contactless conductivity detection”) posicionados a 10 cm e 50 cm da entrada do capilar, cuja resposta fornecida é proporcional à condutividade da solução inserida no capilar (nos gráficos indicada como UAbtr, unidades arbitrárias), os resultados aqui apresentados referem-se a resposta apenas do segundo detector (posicionado a 50 cm da

entrada). A temperatura interna do equipamento foi mantida em 20°C. Os experimentos foram realizados utilizando capilares de sílica fundida (J&W Scientific, Folson, USA) com 60 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno. Os capilares foram pré-condicionados através de lavagem com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (10 min), seguida de lavagem com água deionizada (10 min) e por último, lavagem com eletrólito de corrida (10 min).

Duas metodologias distintas foram desenvolvidas com a eletroforese capilar, uma em meio não aquoso (sigla em inglês, NACE de “non aqueous capillary electrophoresis”), na qual o solvente utilizado era constituído de acetonitrila (50% V/V), etanol (20% V/V) e tampão fosfato (30% V/V) (pH=7) 5 mmol L⁻¹ e outra em meio aquoso, utilizando tampão Tris/Cl (Tris 10 mmol L⁻¹ e HCl 5 mmol L⁻¹) como solvente. Em ambas as metodologias, o potencial aplicado para ocorrer a separação foi de +20 kV.

3.5.3 *Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)*

As análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da USP. Os experimentos foram realizados pelos técnicos da Central Analítica cabendo ao aluno a interpretação dos resultados. O equipamento utilizado foi um Esquire 3000 Plus – Bruker Daltonics com ionização electrospray e analisador de massas tipo íon-trap. A coluna utilizada foi de fase reversa C18 de dimensões 250 x 4,6 mm com tamanhos de partícula 5 µm da marca Phenomenex. Como eluente foi utilizada uma solução de metanol:água (80:20) a uma vazão de 4 mL min⁻¹.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão divididos em três partes: “Análises dos padrões: Ácido Láurico e DSF” (Seção 4.1); “Análises dos sobrenadantes” (Seção 4.2) e “Comparação com LC-MS” (Seção 4.3). Tal divisão foi realizada de modo a facilitar a compreensão e comparação dos resultados obtidos, no entanto, não reflete a cronologia dos experimentos realizados. Com o intuito de explicar o raciocínio realizado para a execução dos diferentes experimentos, segue abaixo uma descrição cronológica dos resultados.

Devido às dificuldades de obtenção e instabilidade do DSF (deve ser mantido a -20°C , quando exposto a temperatura ambiente torna-se um líquido oleoso, dificultando sua manipulação) o padrão do mesmo não foi adquirido nos primeiros semestres de mestrado. Para contornar tal situação, estratégias experimentais alternativas foram tomadas visando identificar o DSF nos sobrenadantes celulares: diferenciação experimental dos sobrenadantes obtidos a partir de três linhagens celulares distintas e uso de uma molécula modelo (com estrutura molecular semelhante ao DSF) para testes e obtenção de parâmetros físico-químicos (difíceis de serem encontrados para o DSF).

Os experimentos voltados para a diferenciação dos sobrenadantes celulares provenientes das três linhagens celulares (uma selvagem e duas mutantes, descritas na Seção 3.3), tiveram como base as quantidades diferenciadas de DSF produzidas por cada linhagem (a mutante ΔF não produz, a mutante ΔC produz quantidade elevada e a linhagem selvagem

WT produz quantidades intermediárias do composto). Propôs-se a identificação do autoindutor através da comparação dos gráficos obtidos nos experimentos, de modo que a presença de um sinal analítico diferencial relativo à molécula alvo fosse observado.

A molécula modelo utilizada para testes e obtenção de parâmetros físico-químicos foi o ácido dodecanóico (também conhecido como ácido láurico). Sua estrutura molecular é semelhante à estrutura do DSF, diferenciando-se pela ausência tanto da insaturação próxima à carboxila quanto da metila encontrada na extremidade oposta (Figura 1). Tendo como grande vantagem ser facilmente encontrado em laboratórios de bioquímica.

Figura 1. Fórmulas estruturais dos compostos: ácido láurico e DSF.

Os primeiros experimentos realizados utilizaram a técnica de voltametria cíclica, seguindo a estratégia de diferenciação dos sobrenadantes (Seção 4.2.1), visando uma possível detecção do DSF através de eletrodos que poderiam ser futuramente utilizados como sensores eletroquímicos. Na sequência, experimentos com a técnica de eletroforese capilar foram

realizados, sendo que ambas as estratégias de análise (diferenciação dos sobrenadantes e uso de molécula modelo) foram utilizadas.

Inicialmente os cultivos celulares foram realizados utilizando meios de cultura ricos, no entanto, devido à alta quantidade de possíveis interferentes presentes, meios mínimos passaram a ser utilizados a partir dos experimentos com eletroforese capilar (Seção 4.2.2). Apesar da utilização dos meios mínimos, componentes dos sobrenadantes celulares continuaram gerando interferências, levando a realização de processos de extração líquido-líquido visando à eliminação de tais interferentes. Devido à baixa concentração de DSF (na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$)³⁸ nos sobrenadantes, as extrações foram seguidas de etapas de evaporação do solvente visando uma pré-concentração do analito.

Após a obtenção do padrão de DSF foram realizados experimentos com o padrão isolado (apresentados na Seção 4.1.2) e com os sobrenadantes dos cultivos celulares (Seção 4.2.3). Tais estudos serviram para confirmar o comportamento semelhante entre o DSF e o ácido láurico e realizar adições de padrão aos sobrenadantes de modo a confirmar a presença do DSF.

Visando confirmar a presença de DSF nos cultivos celulares e obter um método comparativo, um último cultivo celular foi realizado em quantidade maior que os estudos anteriores, procedimentos de extração foram realizados e as soluções obtidas foram analisadas por Eletroforese Capilar e LC-MS (sendo esses últimos experimentos feitos pela Central Analítica do Instituto de Química da USP).

4.1 Análise dos padrões: Ácido Láurico e DSF

4.1.1 Ácido Láurico

O ácido láurico (ácido dodecanóico) possui uma estrutura muito semelhante ao DSF (Figura 1). Trata-se de um ácido graxo de 12 carbonos com cadeia saturada e estrutura linear, diferenciando-se do DSF por não apresentar insaturação e grupamento metila. É difícil estimar o quanto essas diferenças afetam as mobilidades eletroforéticas dos compostos (fator que define a separação dos analitos em eletroforese capilar), porém como grande parte da molécula é semelhante não chega a ser um modelo grosseiro. Sabe-se que a presença da insaturação é de grande importância para a atividade biológica da molécula ³⁵, no entanto, pode não ser para a resposta do sistema analítico.

Diversos trabalhos são encontrados na literatura envolvendo o ácido láurico com os mais variados fins, sendo que os métodos cromatográficos são os principais utilizados em sua análise ^{40; 41; 42}. Ao contrário do DSF, parâmetros físico-químicos referentes ao ácido láurico podem ser facilmente encontrados na literatura, dentre eles o que mais se destaca é a baixa solubilidade do composto em solução aquosa ⁴³.

Tal fato é totalmente esperado, já que o composto é um ácido graxo com uma longa cadeia carbônica. De acordo com a literatura, o composto é muito solúvel em etanol e éter dietílico, solúvel em acetona e pouco solúvel em benzeno. O solvente escolhido para a solubilização do ácido láurico foi o etanol, por sua maior facilidade de manipulação e boa capacidade de dissolução do ácido láurico.

4.1.1.1 NACE

A eletroforese capilar em meio não aquoso (sigla em inglês, NACE de “non aqueous capillary electrophoresis”) é uma modalidade eletroforética baseada no uso de eletrólitos contendo solventes não aquosos ⁴⁴. Um eletrólito condutor é misturado a um ou mais solventes orgânicos, com o intuito de solucionar problemas como a separação de compostos pouco solúveis em meio aquoso (o que motivou a escolha da modalidade para o estudo do ácido láurico). A escolha do eletrólito de corrida foi baseada na metodologia desenvolvida por Oliveira et. al. ⁴⁵ para a análise de ácidos graxos, substituindo o uso de metanol por etanol e sem utilizar ciclodextrinas na composição do eletrólito, caracterizando-se numa metodologia NACE devido à presença de acetonitrila (50% V/V) e etanol (20% V/V).

A separação eletroforética baseia-se na separação de compostos com carga devido à diferença de suas mobilidades sob efeito de um intenso campo elétrico. Prever a mobilidade eletroforética de um íon é algo difícil e arriscado, tendo em vista a influência de diversos fatores como solvatação, equilíbrios ácido base, formação de complexos e temperatura. No entanto, é comum esperar mobilidades semelhantes para compostos com estruturas moleculares semelhantes. Baseando-se nesse fato, ácidos carboxílicos com cadeia de 13, 14 e 15 carbonos foram adicionados à solução de ácido láurico, visando simular moléculas com mobilidades eletroforéticas possivelmente semelhantes que poderiam causar alguma interferência na separação.

Os compostos analisados possuem pKa entre 7,5 e 8, sendo que quanto maior a cadeia carbônica maior o pKa do ácido graxo ⁴⁶. O fato do meio ser predominantemente não aquoso torna mais complexa a discussão sobre o pH (parâmetro geralmente medido em soluções

aquosas), no entanto, devido à composição apresentar 30% de tampão fosfato considerou-se que os ácidos estão parcialmente desprotonados nesse meio, concedendo cargas negativas aos compostos analisados. A análise de compostos com carga negativa pode ser realizada de duas maneiras em eletroforese capilar, utilizando o aparelho com polaridade normal (ânodo no reservatório de injeção) ou com a polaridade invertida (cátodo no reservatório de injeção). A escolha da polaridade deve ser baseada na diferença de mobilidade entre o fluxo eletrosmótico (FEO) e as espécies de interesse, isso porque (exceto na utilização de inversores de fluxo) o fluxo eletrosmótico desloca-se em direção ao eletrodo com polaridade negativa (cátodo), fazendo com que as espécies negativas de menor mobilidade sejam levadas consigo e restringindo o deslocamento em direção ao ânodo apenas às espécies de carga negativa de maior mobilidade. Experimentalmente observou-se que as moléculas estudadas possuem mobilidade eletroforética menor do que o fluxo eletrosmótico, por esse motivo as separações foram realizadas com polaridade normal, com o ânodo no reservatório de injeção.

A separação foi realizada através de aplicação de uma diferença de potencial de 20 kV com polaridade normal, utilizando-se o eletrólito já descrito. Os padrões foram hidrodinamicamente injetados com aplicação de 3.5 psi por 1 s. O eletroferograma obtido está apresentado na Figura 2.

Figura 2. Eletroferograma da mistura padrão de ácidos graxos: C15: ácido pentadecanóico (a), C14: ácido tetradecanóico (b), C13: ácido tridecanóico (c), C12: ácido dodecanóico (ácido láurico) (d). Condições: tampão fosfato (pH=7) 5 mmol L⁻¹, acetonitrila 50 % (v/v), etanol 20% (v/v). Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s; capilar de sílica fundida de 75 µm (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento. Padrões injetados na concentração de 0,5 mmol L⁻¹.

Os picos negativos presentes na região entre 12 e 13,5 minutos correspondem aos 4 padrões de ácidos graxos injetados. A separação apresentou uma boa resolução, ressaltando o potencial da metodologia para a separação de ácidos graxos com estrutura semelhantes.

Destaca-se ainda a ausência de ciclodextrinas no eletrólito, comparando-se com a metodologia desenvolvida por Oliveira et. al.⁴⁵, mostrando que a ausência das mesmas não impossibilitou a separação, porém o número de ácidos separados no presente experimento é

menor do que o realizado pelo autor. Os parâmetros aqui apresentados foram os mesmos utilizados para os primeiros trabalhos realizados com os sobrenadantes das culturas celulares, como será mostrado na Seção 4.2.2.

Apesar do sucesso na separação dos ácidos graxos com estruturas similares, diversas dificuldades surgiram ao se utilizar NACE com os sobrenadantes celulares, sendo a principal a baixa reprodutibilidade dos experimentos causada pelo alto ruído observado nos eletroferogramas e a instabilidade da linha base. A Seção 4.2.2 apresenta os resultados obtidos nesses experimentos e suas respectivas discussões. Baseando-se nesse fato uma segunda metodologia foi desenvolvida para a análise do ácido láurico utilizando-se um tampão sem a presença de solventes orgânicos (suspeita-se que eram os principais motivos para os insucessos).

4.1.1.2 *Tampão Tris/Cl⁻*

Apesar da solubilidade do ácido láurico ter sido a principal preocupação nos experimentos iniciais, algumas fontes indicaram que há certa solubilização do mesmo em soluções aquosas com meio ligeiramente alcalino (as únicas fontes onde se encontrou alguma informação sobre solubilidade em função do pH foram os sites chemicalize.org e Wikipédia). Mesmo estando na ordem de mili mols por litro, tal solubilidade pode ser o suficiente para a detecção da espécie utilizando-se eletroforese capilar.

Além da solubilização, um segundo fator necessário para a separação eletroforética é a ionização do composto, neste caso os dois fatores estão intimamente atrelados. A

desprotonação da carboxila terminal no ácido em soluções ligeiramente alcalinas é um dos principais fatores para a solubilização desta substância.

Tendo em vista essa nova perspectiva, outro eletrólito de corrida foi escolhido. Como os principais problemas encontrados com a metodologia envolvendo NACE foram relacionados ao elevado ruído e instabilidade da linha base, buscou-se um tampão que apresentasse alta estabilidade e um ruído menor. Outro fator necessário é a “leve” alcalinidade, de modo a ionizar o ácido láurico e possibilitar sua migração eletroforética.

Tendo em vista os itens discutidos acima, o tampão escolhido para os experimentos foi composto de Tris (tris(hidroximetil)aminometano) na concentração 10 mmol L^{-1} e HCl na concentração 5 mmol L^{-1} (denominado Tris/ Cl^-). Nessas concentrações temos a protonação de 50% de Tris e atingimos a condição de $\text{pH} = \text{pKa}$ descrita pela equação de Handerson-Hasselbach. Considerando-se que o pKa do Tris é 8,04 temos a condição necessária para a desprotonação do ácido láurico.

O mesmo experimento com a mistura de ácidos graxos apresentado na Figura 2 foi repetido utilizando-se o tampão Tris/ Cl^- , visando a comparação das duas metodologias e, assim como no experimento anterior, simular a presença de moléculas com mobilidades eletroforéticas semelhantes potencialmente interferentes junto com a molécula modelo.

A separação foi realizada através da aplicação de uma diferença de potencial de 20 kV com polaridade normal, utilizando-se o eletrólito já descrito. Os padrões foram hidrodinamicamente injetados. Como durante esses experimentos o aparelho utilizado apresentou problemas no sistema de pressurização, o tempo de injeção foi aumentado para 3

segundos de modo a se obter um volume de injeção semelhante ao utilizado nos experimentos com metodologia NACE. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Eletroferogramas da mistura padrão de ácidos graxos sem diluição (A) e com diluição de 10 (B) e 100 (C) vezes (diluições realizadas com LiOH 5 mmol L⁻¹). Condições: tampão Tris 10 mmol L⁻¹ e HCl 5 mmol L⁻¹. Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica; capilar de sílica fundida de 75 µm (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento. Padrões injetados na concentração de 0,5 mmol L⁻¹. Inseto: ampliação da região dos picos referentes aos ácidos.

Como se pode observar não houve uma separação satisfatória dos ácidos graxos. A primeira medida adotada para contornar tal problema foi utilizar a diluição, de modo que a redução dos sinais resultasse em picos com melhor resolução. O próprio gráfico apresenta os

eletroferogramas obtidos com duas diluições utilizando hidróxido de lítio (curvas B e C), nota-se que de fato houve uma melhora na separação dos sinais, no entanto, não suficiente para resolver o problema da sobreposição.

Dois motivos levaram a utilização de hidróxido de lítio para realizar a diluição: o primeiro, e principal, foi poder utilizar o lítio como um padrão interno, de modo a melhor monitorar o processo de injeção e posteriormente utilizá-lo na obtenção de curvas de calibração; o segundo motivo foi uma maior alcalinização do meio de modo a aumentar a ionização dos ácidos.

Outro aspecto que pode ser observado é a antecipação do fluxo eletrosmótico nos experimentos em que houve diluição com hidróxido de lítio. Tal efeito pode ser explicado pelo aumento da força iônica do plug injetado quando o mesmo contém solução aquosa de hidróxido de lítio, isso irá refletir em maior condutividade do plug de injeção, e como consequência a distribuição do campo elétrico no capilar será afetada. O capilar pode ser visto como uma associação de resistores, sendo que o campo será mais intenso nos pontos onde a resistividade elétrica é maior. Ao se adicionar o hidróxido de lítio, a intensidade do campo diminui no plug (em relação ao experimento sem o lítio) e se intensifica nas regiões adjacentes ao plug (preenchidas com tampão) afetando diretamente o fluxo eletrosmótico.

Apesar do resultado obtido na separação de ácidos graxos com estruturas moleculares semelhantes não ter sido satisfatório, os experimentos utilizando o tampão Tris/Cl⁻ apresentaram uma boa reprodutibilidade, fato que não ocorreu com o NACE. Tendo em vista que a metodologia utilizada para a análise dos extratos envolve a comparação dos eletroferogramas a reprodutibilidade do sistema se torna um fator essencial, caso contrário os

resultados obtidos não serão confiáveis tornando as comparações errôneas. Por tal motivo, experimentos continuaram a ser realizados com o tampão Tris/Cl⁻.

Um segundo experimento realizado utilizando o mesmo eletrólito consistiu na construção de uma curva de calibração com o padrão de ácido láurico. O intuito foi verificar a faixa de linearidade da curva e os limites de detecção da metodologia (fator importante tendo em vista que a concentração de DSF nos extratos está na faixa de $\mu\text{mol L}^{-1}$ ³⁸, valor situado próximo ao limite alcançado por técnicas eletroforéticas com detecção condutométrica em geral).

A separação foi realizada através de aplicação de uma diferença de potencial de 20 kV com polaridade normal, utilizando-se o eletrólito acima descrito. Os padrões foram hidrodinamicamente injetados por 3 s. A concentração dos padrões foi variada de 20 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sendo que as soluções continham hidróxido de lítio na concentração 5 mmol L⁻¹. As injeções referentes a cada concentração foram realizadas em triplicata. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 4 (cada curva mostrada foi escolhida entre as três replicatas).

Figura 4. Eletroferogramas obtidos com solução etanólica na presença de diferentes concentrações de ácido láurico: 20 (A), 37,5 (B), 75 (C), 150 (D) e 300 (E) $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições: tampão Tris 10 mmol L^{-1} HCl 5 mmol L^{-1} ; potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica; capilar de sílica fundida de 75 μm (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento. Inseto: ampliação da região referente aos picos do ácido láurico.

O eletroferograma apresentado na Figura 4 apresenta os picos referentes ao ácido láurico na região por volta de 5,5 minutos de corrida e os picos referentes ao Li na região por volta de 2,5 minutos de corrida. Como discutido anteriormente o Li^+ foi utilizado como padrão interno para a construção da curva de calibração, tendo como principal objetivo compensar erros ocasionados no processo de injeção (etapa considerada crítica em eletroforese capilar).

Uma curva de calibração foi construída com a razão entre as áreas dos picos de ácido láurico e lítio em relação a concentração de ácido láurico. O resultado encontra-se na Figura 5.

Figura 5. Curva de calibração obtida com os valores de área dos picos apresentados na Figura 4 sendo a equação da reta: $Y = -0,004 + 0,00134 \cdot X$ (Y = Razão Ác. Láurico/Li; X = Concentração) e o coeficiente de correlação $R = 0,99935$ (as barras se referem às incertezas entre 3 medidas na mesma condição).

A Figura 5 mostra que a curva construída apresenta uma ótima linearidade ($R=0,99935$), indicando que a metodologia desenvolvida apresenta um bom potencial para a quantificação da espécie.

Estes foram os resultados obtidos utilizando o ácido láurico como molécula modelo. As principais conclusões obtidas foram: a metodologia desenvolvida com NACE mostrou um ótimo potencial para a separação de substâncias com estruturas moleculares semelhantes ao ácido láurico e como as mesmas representavam possíveis interferentes para as análises tal metodologia seria a mais adequada. No entanto, a baixa reprodutibilidade dos experimentos levou a desistência desse método; a metodologia utilizando o tampão Tris/ Cl^- não se mostrou capaz de separar as substâncias que representavam o DSF e seus possíveis interferentes, no entanto, seus experimentos apresentaram uma boa reprodutibilidade levando inclusive a construção de uma curva de calibração muito satisfatória.

4.1.2 DSF

A metodologia desenvolvida com o tampão Tris/ Cl^- foi utilizada para a realização dos experimentos com o padrão de DSF. As soluções de padrão utilizadas foram obtidas através da diluição da solução estoque (descrita na Seção 3.2) com hidróxido de lítio 5 mmol L^{-1} .

As separações foram realizadas através de aplicação de uma diferença de potencial de 20 kV com polaridade normal, utilizando-se como eletrólito o tampão Tris/ Cl^- . Os padrões foram hidrodinamicamente injetados por 3 s. A concentração dos padrões foi variada de 18 a $270 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de hidróxido de lítio 5 mmol L^{-1} . Novamente as injeções foram realizadas em triplicata. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 6 (cada curva mostrada foi escolhida entre três injeções).

Figura 6. Eletroferogramas obtidos com solução etanólica na presença de diferentes concentrações de DSF: 18 (A), 33,8 (B), 67,5 (C), 135 (D) e 270 (E) $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições: tampão Tris 10 mmol L^{-1} e HCl 5 mmol L^{-1} . Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica; capilar de sílica fundida de 75 μm (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento. Inserto: ampliação da região referente aos picos de DSF.

A análise dos eletroferogramas da Figura 6 revela que o DSF apresentou um comportamento semelhante ao ácido láurico. Observa-se que todos os picos saíram em tempos menores em relação ao experimento da Figura 4, a provável causa desse efeito é o deslocamento do fluxo eletrosmótico. Como todos os pré-condicionamentos realizados nos dois experimentos foram os mesmos, o mesmo tampão foi utilizado e a composição do plug de injeção é muito semelhante (incluindo a estrutura dos analitos) a causa mais provável para

esse efeito foi a modificação da parede do capilar por algum processo desconhecido, de modo a causar uma mudança na dupla camada elétrica afetando o fluxo eletrosmótico.

Tal resultado indica que o uso do ácido láurico como molécula modelo para desenvolvimento do método analítico foi uma decisão acertada, confirmando que a semelhança entre estruturas moleculares pode ser um indicativo de mobilidades eletroforéticas semelhantes. Levando-se em consideração o custo elevado e a dificuldade de manipulação do padrão de DSF é muito interessante possuir uma molécula modelo cujo acesso é muito mais facilitado.

Novamente uma curva de calibração foi construída com a razão entre as áreas dos picos de DSF e lítio em relação à concentração de DSF. Verificou-se que uma boa linearidade pode ser alcançada quando o sinal correspondente à concentração mais elevada era eliminado como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7. Curva de calibração obtida com os valores de área dos picos apresentados na Figura 6. A Curva A apresenta os pontos referentes à todas as concentrações apresentadas na Figura 6; a Curva B exclui o ponto referente à concentração 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Equações das retas: (A- com o ponto referente à concentração 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $Y = -0,001808 + 0,0014 * X$ ($Y = \text{Razão DSF/Li}$; $X = \text{Concentração}$), coeficiente de correlação $R = 0,95427$; (B- sem o ponto referente à concentração 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $Y = -0,00197 + 0,00107 * X$ ($Y = \text{Razão DSF/Li}$; $X = \text{Concentração}$), coeficiente de correlação $R = 0,99938$ (reta sem 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

As duas curvas apresentadas na Figura 7 foram obtidas com o mesmo conjunto de eletroferogramas apresentados na Figura 6, diferenciando-se apenas pela ausência do ponto referente à concentração $270 \mu\text{mol L}^{-1}$ na curva B. As duas curvas apresentaram linearidades distintas como pode ser observado por seus valores de coeficiente de correlação (R). A curva B apresentou um valor de coeficiente de linearidade superior sugerindo que a concentração de $270 \mu\text{mol L}^{-1}$ pode não estar dentro da região de linearidade.

Do ponto de vista quantitativo a metodologia apresentou um bom desempenho, permitindo estimar a concentração $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ está próxima ao limite de detecção (como se pode observar na Figura 6 o primeiro sinal, referente à concentração de $18 \mu\text{mol L}^{-1}$, possui área bem reduzida). Os experimentos apresentaram boa reprodutibilidade, comprovada pela efetuação das injeções em triplicata. Como ponto negativo, experimentos com ácidos graxos indicaram que pode haver problemas no caso da presença de moléculas com estruturas moleculares semelhantes, como mostrado na Seção 4.1.1.2.

4.2 Análise dos Sobrenadantes

Como explicado no início da apresentação dos resultados a ordenação dos experimentos apresentados não reflete a cronologia de realização dos mesmos.

Os experimentos de voltametria cíclica apresentados a seguir (Seção 4.2.1) foram os primeiros realizados no mestrado. Na sequência estão apresentados os experimentos com eletroforese capilar, em que foram aplicadas as metodologias discutidas na Seção 4.1 aos sobrenadantes celulares com o intuito de realizar a diferenciação descrita no início da

apresentação dos resultados (Seção 4). O uso das metodologias eletroforéticas está dividido nas Seções: 4.2.2 (NACE) e 4.2.3 (Tampão Tris/ Cl^-).

4.2.1 *Voltametria Cíclica*

Por ser uma técnica exploratória a voltametria cíclica foi escolhida para a primeira tentativa de diferenciação dos três sobrenadantes de meio rico. Como eletrodo de trabalho utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo, tendo em vista sua maior janela de potencial quando comparado aos eletrodos metálicos. As varreduras realizadas sempre exploraram a maior faixa de potencial permitida pelo eletrólito, tratando-se de meios aquosos tal limitação correspondia às ondas de formação de hidrogênio em potenciais negativos e a geração de oxigênio em potenciais positivos.

Foram realizadas medidas: diretamente nos sobrenadantes de meio rico (Figura 8); diluindo-se 4 vezes os sobrenadantes em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 9) e diluindo-se os sobrenadantes 4 vezes em NaOH 1 mol L^{-1} (Figura 10). Sabendo-se que a concentração do DSF nas amostras é na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ ³⁸, as diluições foram evitadas o máximo possível. O volume total utilizado nas celas sempre foi de 2 mL.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos registrados com os sobrenadantes das três linhagens celulares: ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio rico. Volume total da cela: 2 mL. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Inseto: 4 ciclos consecutivos do sobrenadante da linhagem ΔF .

A Figura 8 mostra os voltamogramas obtidos com os sobrenadantes das três linhagens (ΔF , ΔC , WT) sem nenhuma diluição prévia. Observa-se um perfil semelhante para as três linhagens com um sinal eletroquímico intenso na região de 0,6 a 1,2 V, nota-se também a variação de posição e intensidade do sinal entre os sobrenadantes. Tal sinal seria capaz de diferenciar os sobrenadantes, porém, esse sinal observado e consequentemente sua variação não se deve a diferença de concentração do DSF, já que a

linhagem mutante ΔF não produz o analito e mesmo assim um sinal pode ser observado, sendo inclusive maior que o sinal obtido para a linhagem selvagem (WT – curva B). Outro fator evidenciado no gráfico é o envenenamento da superfície eletródica. O inserto nos mostra 4 ciclos consecutivos (sem polimento) de uma análise do sobrenadante proveniente da mutante ΔF , onde podemos ver uma rápida supressão do sinal de corrente em apenas 4 ciclos.

O sinal observado encontra-se em uma ampla faixa de potencial, uma possível consequência de sobreposição de sinais devido à presença de uma alta quantidade de variadas espécies orgânicas no meio. Uma possível solução para tal problema é a diluição da amostra, de modo a reduzir a concentração das espécies para se obter uma melhor resolução. Diluindo-se a amostra também é possível reduzir problemas de envenenamento. Com esse intuito KCl 0,1 mol L⁻¹ foi utilizado para a diluição. Optou-se por solução de KCl para evitar problemas de resistividade do meio (que poderia advir caso fosse utilizada apenas água deionizada para o mesmo fim). A Figura 9 mostra os voltamogramas obtidos com os sobrenadantes das três linhagens celulares diluídas 4 vezes, o gráfico mostra uma triplicata de cada linhagem sendo que as cores representam cada linhagem e a ordem em que os ciclos foram realizados está representada no eixo Z.

Figura 9. Voltamogramas cíclicos registrados com os sobrenadantes das três linhagens celulares: ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio rico. Os sobrenadantes foram diluídos 4 vezes em KCl 0,1 mol L⁻¹. Volume total da cela: 2 mL. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.

Observa-se na Figura 9 novamente a presença de um sinal em uma ampla faixa de potencial (melhor observável na linhagem WT), ou seja, se há problema de sobreposição de sinais o mesmo persistiu. A análise comparativa das diferentes linhagens (representadas por diferentes cores) também mostra que o envenenamento foi ainda mais

acentuado, considerando-se uma etapa de polimento e ultrassom entre as medidas realizadas com as diferentes linhagens, houve uma grande queda do sinal analítico, que era bem intenso para a linhagem WT e se tornou quase imperceptível para a linhagem ΔF .

Explorando o extremo da região de pH em que as moléculas de DSF encontram-se totalmente desprotonadas, voltamogramas foram registrados utilizando NaOH 1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Os sobrenadantes foram diluídos na mesma proporção dos experimentos com KCl 0,1 mol L⁻¹. Os voltamogramas obtidos encontram-se na Figura 10.

Figura 10. Voltamogramas cíclicos registrados na ausência (A) e presença dos sobrenadantes referentes às três linhagens celulares: ΔF (B), WT (C) e ΔC (D) cultivadas em meio rico e diluídas 4 vezes em NaOH 1 mol L⁻¹. Volume total da cela: 2 mL. Eletrodo de Carbono Vítreo. Velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹.

A análise dos voltamogramas indica que em meio alcalino os problemas relativos ao envenenamento do eletrodo foram resolvidos (ou significativamente minimizados), não se observa queda do sinal de corrente entre as medidas dos extratos. No entanto, também não se observa um sinal analítico diferencial entre as três linhagens, a única região com algum sinal encontra-se entre 0 e 0,8 V e pode ser melhor observada no inserto.

Os problemas encontrados ao utilizar a técnica de voltametria cíclica foram associados principalmente à composição do meio da amostra. A presença de elevada quantidade de material orgânico no sobrenadante pode ser apontada como fator responsável tanto pelo envenenamento do eletrodo, quanto pelo encobrimento de um possível sinal relativo ao DSF. Outra hipótese considerada foi a não eletroatividade do DSF.

Uma solução para esse problema seria testar a eletroatividade do DSF puro (padrão) apenas na presença do eletrólito, no entanto, como explicado no início da apresentação dos resultados o padrão não foi adquirido no início do mestrado, optando-se por diferentes estratégias de análise antes da aquisição do mesmo.

Com isso, os esforços foram direcionados no sentido de solucionar o problema da presença de diferentes compostos orgânicos (potencialmente interferentes) presentes no

meio. Duas possíveis soluções foram avaliadas: realização de pré-tratamento das amostras visando à diminuição dos interferentes; utilização de uma técnica de separação que possibilite a separação do analito alvo de maneira eficiente. Dois fatores levaram a escolha do uso de uma técnica de separação: primeiramente a possibilidade de que mesmo com uma separação eficiente dos interferentes pelo pré-tratamento das amostras, ainda haveria dúvida em relação a eletroatividade do DSF; o segundo foi o fácil acesso a equipamentos de eletroforese capilar no laboratório devido à presença do grupo do Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago, especialista na área, com experiência na análise de compostos com composição semelhante ao DSF ⁴⁵.

Além da mudança de técnica, decidiu-se utilizar meios mínimos de cultura para o crescimento das bactérias, com o objetivo de diminuir a presença de interferentes e ter um maior controle da composição da amostra, como descrito na Seção 3.3 a composição de tais meios é muito mais controlada. Dúvidas em relação às espécies orgânicas produzidas pelas bactérias e liberadas no meio de cultura persistirão, no entanto, o conhecimento exato da composição inicial do meio já é um passo na direção da identificação de possíveis interferentes.

4.2.2 *Eletroforese Capilar - NACE*

O primeiro experimento realizado com os sobrenadantes celulares constituiu na injeção direta dos mesmos sem nenhuma diluição prévia, evitando assim diluições que poderiam reduzir a concentração já baixa de DSF.

A separação foi realizada através de aplicação de uma diferença de potencial de 20 kV com polaridade normal, utilizando o eletrólito descrito na Seção 4.1.1.1. Os sobrenadantes

foram hidrodinamicamente injetados com aplicação de 3.5 psi por 1s. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Eletroferogramas registrados com os sobrenadantes das três linhagens celulares: ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio mínimo. Condições: tampão fosfato (pH=7) 5 mmol L⁻¹, acetonitrila 50 % (v/v), etanol 20 % (v/v). Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s; capilar de sílica fundida de 75 μ m (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento. Inseto: ampliação da região entre 6 e 18 minutos.

A análise da Figura 11 indica que não houve presença de um sinal diferencial entre os sobrenadantes na região de interesse (após o fluxo eletrosmótico). Os eletroferogramas apresentam um comportamento muito semelhante na região anterior ao fluxo eletrosmótico

(referente às espécies de carga positiva), porém há uma grande variação de linha base na região referente às espécies com carga negativa, dificultando a análise comparativa dos mesmos.

O provável motivo para tal insucesso é a alta força iônica da amostra, devido à presença de uma elevada quantidade de íons no sobrenadante celular. Com isso teremos um campo elétrico com intensidade muito inferior no plug em relação ao restante do eletrólito, resultando numa má separação dos analitos. Tal conclusão é embasada pelo perfil apresentado pelo fluxo eletrosmótico, um alto sinal de condutividade, indicando que praticamente não houve separação de espécies neutras e com carga no plug de injeção.

Sendo assim, optou-se por realizar um pré-tratamento da amostra através de um procedimento de extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos, seguido de uma etapa de evaporação do solvente e redissolução dos sólidos remanescentes. A realização de tal procedimento visou diminuir a força iônica, reduzir a concentração de possíveis interferentes e realizar uma pré-concentração do analito.

A escolha do solvente foi baseada na metodologia desenvolvida por Wang *et. al.*³⁵ ao isolar e caracterizar a molécula de DSF em cultivos celulares, no caso as técnicas analíticas utilizadas foram HPLC e Espectrometria de Massas. Assim como na metodologia mencionada, acetato de etila foi escolhido para as extrações. Uma primeira etapa (não existente na metodologia de Wang *et. al.*) prévia às extrações foi a adição de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ num volume correspondente à 10% do volume total de sobrenadante, com o intuito de favorecer a protonação do DSF e aumentar sua afinidade pela fase orgânica no processo de extração.

A descrição das extrações realizadas para esses experimentos encontra-se na Seção 3.4.1 (Extração 1). As soluções etanólicas foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar e os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Eletroferogramas registrados com as soluções etanólicas obtidas da extração 1 (Seção 3.4.1): ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio mínimo. Condições: tampão fosfato (pH=7) 5 mmol L⁻¹, acetonitrila 50 % (v/v), etanol 20% (v/v). Potencial +25 kV; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s; capilar de sílica fundida de 75 μ m (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento.

Observa-se na Figura 12 que o procedimento de extração gerou uma melhora na linha base (comparando-se com a apresentada na Figura 11), indicando que a etapa de extração foi relativamente benéfica no sentido da remoção de interferentes.

A região entre 10 e 11 minutos apresenta um pico para o extrato proveniente da linhagem ΔC que a princípio foi interpretado como um sinal relativo à presença de DSF. O sinal não é observado para os outros sobrenadantes, o que seria plausível, pois a quantidade de DSF produzida por essa linhagem é a maior de todas podendo o procedimento de pré-concentração ter funcionado para essa quantidade e não ter sido suficiente para as quantidades menores.

No entanto, tal resultado foi observado uma única vez (novamente a metodologia NACE apresentou uma baixa reprodutibilidade como já mostrado na Seção 4.1.1.1). Verificou-se que injeções realizadas com o mesmo sobrenadante apresentaram diferentes resultados, impossibilitando a diferenciação dos extratos baseada na comparação gráfica dos mesmos.

Os experimentos com NACE levantam dúvidas como: de que maneira as espécies estão solvatadas? Qual será o pKa das espécies no meio? Qual será o grau de ionização delas no experimento? Como está se comportando o FEO? Kenndler elucida algumas dúvidas em um trabalho publicado recentemente ⁴⁷, no entanto na maioria dos casos abordados é discutido o comportamento ao utilizar apenas um solvente no tampão. No caso dos experimentos realizados no presente trabalho, muitas dúvidas persistem devido ao uso da mistura etanol, acetonitrila e tampão fosfato.

Outros motivos levantados como possíveis causas dos insucessos foram: impureza presentes nos solventes ou vidrarias utilizados e eventual entrada de produtos da eletrólise provocada pelos eletrodos na coluna capilar.

Sendo assim, a metodologia NACE foi abandonada e passou-se a realizar os experimentos de eletroforese capilar com tampão Tris/ Cl^- .

4.2.3 Eletroforese tampão Tris/Cl

Após os insucessos da metodologia NACE experimentos visando a diferenciação dos sobrenadantes foram realizados utilizando a metodologia desenvolvida com tampão Tris/Cl⁻ (Seção 4.1.1.2). Novamente os primeiros experimentos realizados envolveram a injeção direta dos sobrenadantes celulares sem nenhuma diluição prévia.

A separação foi realizada através de aplicação de uma diferença de potencial de 20 kV, utilizando-se o eletrólito composto por Tris 10 mmol L⁻¹ e HCl 5 mmol L⁻¹. Os sobrenadantes foram hidrodinamicamente injetados com aplicação de 3.5 psi por 3s. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Eletroferogramas registrados com os sobrenadantes das três linhagens celulares: ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio mínimo. Condições: tampão Tris 10 mmol L⁻¹ e HCl 5 mmol L⁻¹.

Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s; capilar de sílica fundida de 75 μm (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento.

Podemos observar que os eletroferogramas apresentados na Figura 13 apresentam o mesmo problema em relação ao fluxo eletrosmótico observado na Figura 11. Novamente a alta força iônica da amostra pode ser apontada como causadora desse efeito, levando a uma diminuição do campo elétrico na região do volume injetado e gerando uma má separação das espécies neutras e com carga.

Como ocorreu anteriormente, procedimentos de extração líquido-líquido foram realizados objetivando a redução da força iônica e pré-concentração do analito. As extrações foram executadas como descrito na Seção 3.4.2 (Extração 2). As soluções etanólicas foram injetadas e os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Eletroferogramas registrados com as soluções etanólicas obtidas da extração 2 (seção 3.4.2): ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio mínimo. Condições: tampão Tris 10 mmol L⁻¹ e HCl 5 mmol L⁻¹. Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s; capilar de sílica fundida de 75 μ m (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento.

A análise dos eletroferogramas nos indica novamente que o processo de extração foi satisfatório para a diminuição da força iônica da amostra (observável pelo comportamento do fluxo eletrosmótico semelhante ao observado nos experimentos da Seção 4.1.1.2).

Observa-se a presença de alguns picos na região por volta de 4,5 minutos, onde é esperado o aparecimento do sinal relativo ao DSF, como mostrado na Seção 4.1.2. No entanto, tal sinal não deveria aparecer para o sobrenadante proveniente da cepa ΔF (curva preta) e ter intensidades diferentes para as cepas WT (menos intenso) e ΔC (mais intenso). Indicando que não só o DSF não está presente como há a possibilidade de haver um possível interferente no sobrenadante com mobilidade semelhante.

Devido à presença de diversas espécies desconhecidas no cultivo celular, a molécula de DSF pode sofrer alterações em sua solvatação e no seu grau de ionização, resultando em possíveis alterações na mobilidade eletroforética da mesma. O resultado dessas possíveis modificações seria um deslocamento do sinal observado para o DSF. Com isso duas situações poderiam se apresentar: i) caso tal efeito não ocorra (ou não seja relevante) a mobilidade eletroforética do DSF se mantém semelhante e o método está sujeito a interferência com a sobreposição do sinal do DSF com outros picos localizados

em 4,5 minutos; ii) caso esse possível deslocamento do sinal ocorra poderá acarretar em um auxílio para a separação, fazendo com que o tempo de saída do DSF não coincida com o tempo de outras espécies.

A maneira encontrada para testar esta hipótese foi a adição de DSF (a partir da solução estoque) aos sobrenadantes celulares de modo a atingir uma concentração de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os sobrenadantes foram novamente injetados e os eletroferogramas obtidos encontram-se na Figura 15 que também contém os resultados apresentados na Figura 14 para uma comparação facilitada.

Figura 15. Eletroferogramas registrados com as soluções etanólicas obtidas da extração 2 (Seção 3.4.2): ΔF (A), WT (B) e ΔC (C) cultivadas em meio mínimo na ausência (linhas sólidas) e presença de DSF $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linhas segmentadas). Condições: tampão Tris 10 mmol L^{-1} e HCl 5 mmol L^{-1} .

Potencial +20 kV; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s; capilar de sílica fundida de 75 μ m (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento.

Os eletroferogramas apresentados na Figura 15 foram deslocados (apenas no eixo y) de modo a tornar sua visualização mais fácil. Observa-se que ao adicionar o DSF houve uma diminuição na velocidade do fluxo eletrosmótico, perceptível pelo seu deslocamento para tempos maiores. Compensando-se tal deslocamento pode-se afirmar que os picos observados na região de 4,5 minutos para os sobrenadantes sem a adição de DSF (linhas sólidas) encontram-se na mesma região que os picos observados para o DSF na região de 5 minutos nos eletroferogramas dos sobrenadantes aos quais o DSF foi adicionado.

A principal conclusão desse experimento foi confirmar a presença de interferentes nas amostras, indicando que o processo de separação não foi capaz de eliminá-los. Os sinais apresentam-se na mesma região em que o sinal de DSF é observado ao se realizar a adição do padrão. O principal motivo para a conclusão que tais sinais não se referem ao próprio DSF é o fato de que os sinais estão presentes em todos os eletroferogramas, e sabe-se que linhagem ΔF não é capaz de produzir o analito. A baixa concentração do DSF nos sobrenadantes celulares e as etapas de extração seguidas de evaporação do solvente também foram consideradas como possíveis motivos para os insucessos desses últimos experimentos. Considerando que mesmo com os devidos cuidados que o analista deve tomar em cada uma dessas etapas uma eventual perda de analito pode acabar acontecendo.

Visando minimizar esse efeito, um último cultivo celular foi realizado em proporções maiores que os ensaios anteriores (1 L de cultivo celular). Dessa maneira uma eventual perda de analito durante as etapas de pré-tratamento (extrações) é menos crítica

na concentração final do analito. Os procedimentos iniciais de centrifugação para separação das células (como descrito na Seção 3.3) e obtenção apenas dos sobrenadantes foram realizados da mesma maneira que os ensaios anteriores. A cepa cultivada pertencia à linhagem ΔC , que produz a maior quantidade de DSF.

Com o intuito de avaliar a perda de analito nas etapas de tratamento de amostra, o cultivo celular foi dividido em duas alíquotas de mesmo volume e o padrão de DSF foi adicionado a uma dessas alíquotas, de modo a se obter uma concentração de DSF de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na alíquota enriquecida. Com isso, a comparação dos gráficos dos experimentos realizados permitiria avaliar tanto a perda de analito nos processos de extração, quanto ter uma ideia da real quantidade de DSF no sobrenadante proveniente da cepa ΔC .

As etapas de extração estão descritas na Seção 3.4.3 (Extração 3). A solução etanólica final foi injetada e o eletroferograma obtido encontra-se na Figura 16.

Figura 16. Eletroferogramas registrados com as soluções etanólicas obtidas da extração 3 (Seção 3.4.3) com a linhagem celular ΔC cultivada em meio mínimo na ausência (A) e presença de DSF $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B). Condições: tampão Tris 10 mmol L^{-1} e HCl 5 mmol L^{-1} . Potencial $+20 \text{ kV}$; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s ; capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento.

Diferentemente dos eletroferogramas registrados com amostras após o processo de extração nos ensaios anteriores, observa-se que o gráfico apresenta o mesmo perfil dos eletroferogramas referentes às injeções diretas dos sobrenadantes (sem passar por processo de extração), e que foram relacionados com a alta força iônica da amostra (Seções 4.2.2 e 4.2.3). Um indicativo que dessa vez o processo de extração não se mostrou efetivo, o que já havia sido cogitado, pois após o processo de extração a solução apresentou uma coloração castanha não observada nas extrações anteriores.

O principal motivo apontado para tal insucesso foi justamente o uso de elevada quantidade de sobrenadante para o ensaio. Durante a extração a solubilidade da maior parte dos sais ionizados é maior na fase aquosa do que na fase orgânica (acetato de etila), no entanto uma pequena solubilidade dos sais na fase orgânica é esperada, ao utilizar volumes maiores a quantidade total de sais dissolvida na fase orgânica também aumenta, tal fator se torna crítico quando o processo seguinte à extração é um processo de evaporação do solvente, fazendo com que a concentração desses sais aumente ao realizar a redissolução com 1 mL de etanol.

Também podemos observar que há diferenças entre os eletroferogramas apresentados na Figura 16, no entanto, como tais diferenças não parecem ser significativas, não é possível afirmar que correspondem à adição do padrão de DSF a um dos extratos, sendo mais provável que corresponda a pequenas diferenças no processo de extração.

Procurando reduzir o problema da força iônica, uma segunda extração foi realizada utilizando n-hexano, já que este solvente apresenta menor polaridade do que o acetato de etila. Devido ao reduzido volume, a extração foi realizada dentro do próprio eppendorf e as fases foram retiradas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. O processo de extração está descrito na Seção 3.4.4 (Extração 4), sendo importante ressaltar a adição de LiOH 5 mmol L⁻¹, que passou a ser utilizado como padrão interno.

Durante a segunda etapa de extração a amostra enriquecida com o padrão de DSF se perdeu no processo de manipulação das soluções com o eppendorf. Com isso não foi possível continuar o monitoramento da perda de DSF durante os processos de extração.

Visando ainda ter uma amostra de referência para visualizar a presença do DSF no extrato, a amostra de sobrenadante sem adição de DSF foi dividida em duas alíquotas e o padrão de DSF foi adicionado a uma delas de modo a atingir a concentração de $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, tal concentração foi escolhida baseada na curva de calibração obtida com o padrão de DSF (Figura 7), considerando que os pontos referentes às primeiras concentrações da curva de calibração apresentaram picos muito próximos a linha base (observável nos eletroferogramas apresentados na Figura 6) e por ser comum uma leve perda de estabilidade da linha base ao injetar a amostra real, optou-se por essa concentração intermediária da curva de calibração.

As soluções etanólicas foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar e os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 17.

Figura 17. Eletroferogramas registrados com as soluções etanólicas obtidas da extração 4 (Seção 3.4.4) com a linhagem celular ΔC cultivada em meio mínimo na ausência (A) e presença de DSF $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B). Condições: tampão Tris 10 mmol L^{-1} e HCl 5 mmol L^{-1} . Potencial $+20 \text{ kV}$; injeção hidrodinâmica pela aplicação de 3.5 psi por 1 s ; capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento. Inseto: Ampliação da região entre 6 e 10 minutos onde se acredita estar o sinal do DSF (pico 1).

Observa-se nos gráficos que o perfil relacionado à alta força iônica da amostra não foi apresentado, levando à conclusão que a extração com n-hexano foi efetiva. Comparando o eletroferograma da Figura 17 com os resultados anteriores obtidos com o tampão Tris/ Cl^- nota-se um grande deslocamento do fluxo eletrosmótico, enquanto nos estudos com o padrão, o fluxo era comumente localizado na região por volta de $3,5$ minutos, neste experimento teve um tempo de saída por volta de 5 minutos. Um possível motivo para tal fenômeno pode ser novamente a composição do plug injetado, pois a solubilidade dos sais é menor em n-hexano do que em acetato de etila, o que faria com que a condutividade do plug injetado fosse menor do que nas amostras anteriores, consequentemente temos uma distribuição diferenciada do campo elétrico dentro do capilar, provavelmente com maior intensidade na região do plug injetado. Nesse caso a intensidade do campo é menor no resto da coluna resultando em uma diminuição do fluxo eletrosmótico. Tal suposição é lógica, porém, ressalta-se que devido a grande diferença nos volumes de sobrenadantes utilizados nas extrações é difícil comparar a quantidade de sais que se solubilizariam em n-hexano nesse caso, com a quantidade de sais solubilizada em acetato de etila nas extrações anteriores.

A análise comparativa dos eletroferogramas das duas amostras (com e sem adição do padrão de DSF) indica que a região por volta de 7 e 8 minutos (pico 1 no inseto) é aonde se

localiza o pico referente ao DSF. A Tabela 2 apresenta os dados que levaram a tal conclusão, nela estão os valores das áreas e alturas referentes aos picos 1, 2 e ao padrão de Lítio injetado.

Tabela 2. Áreas e Alturas referentes à Figura 17

Pico	Área	Alturas
Li (B)	977,08	10479
Li (A)	980,41	9943,1
Razão (B)/(A)	0,99	1,05
1 (B)	1977,9	4387,1
1 (A)	1339	2165,5
Razão (B)/(A)	1,47	2,02
2 (B)	3211,1	7429,7
2 (A)	3393,5	7050,7
Razão (B)/(A)	0,95	1,05

**(A) e (B) correspondem aos gráficos da Figura 17*

As linhas “Razão” correspondem sempre à razão dos sinais obtidos com as amostras acrescidas de padrão dividindo pelos sinais das amostras sem acréscimo de DSF. Pela razão observa-se que houve um aumento de 47% na área e 102% na altura do pico 1, indicando que nessa região o DSF está presente. Observa-se que tanto o pico referente ao lítio quanto o pico 2 (indicado no gráfico) apresentaram variações menores, podendo ser considerados praticamente constantes.

No entanto, uma análise mais detalhada do pico 1 leva a crer que o mesmo é formado por diversos picos menores sobrepostos, indicando que a separação dessa região não foi realmente efetiva. O aumento do pico (tanto em área quanto altura) indica que o analito pode

estar presente nessa região de picos sobrepostos, mas há a possibilidade dos picos serem apenas sinais de espécies interferentes.

Com o intuito de comprovar a presença de DSF nos sobrenadantes, e possivelmente ter uma estimativa de sua quantidade, os mesmos extratos utilizados nesse ensaio foram analisados por LC-MS. As amostras foram enviadas para a Central Analítica do Instituto de Química da USP para que tal análise fosse realizada, os resultados obtidos encontram-se na Seção 4.3.

4.3 Comparação com LC-MS

As análises por LC-MS foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da USP. Os experimentos foram realizados pelos técnicos da Central Analítica cabendo ao aluno a interpretação dos resultados. Como descrito na Seção 3.5 as amostras passavam primeiramente pela coluna de cromatografia líquida antes de serem injetadas no espectrômetro de massas por electrospray. A metodologia utilizada foi a mesma desenvolvida por Wang *et al.*³⁵, diferenciando pelo tamanho da coluna utilizada (utilizou-se coluna de dimensões 4,5 x 250 mm ao invés de 7,8 x 150 mm).

O principal objetivo destes experimentos foi obter um dado experimental que comprovasse a presença do DSF nos extratos, e se possível, ter uma estimativa de sua concentração, permitindo avaliar se a baixa concentração do analito foi o fator determinante para os insucessos dos ensaios eletroforéticos.

O princípio de separação das técnicas cromatográficas difere do eletroforético. Na eletroforese temos a separação dos analitos devido à diferença de mobilidade eletroforética

das espécies sob a influência de um campo elétrico. Já nas técnicas cromatográficas o princípio se baseia na diferença de interação das espécies com a fase móvel e a fase estacionária, um equilíbrio entre as duas fases que é resultante de diferentes processos (partição, adsorção, atração eletrostática, dentre outros).

Sabendo-se dessa diferença entre os mecanismos de separação de cada técnica, as soluções padrões de DSF em etanol (nas concentrações entre 18 e 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$) utilizadas nos experimentos da Figura 6 (Eletroferogramas com tampão Tris 10 mmol L^{-1} e HCl 5 mmol L^{-1}) também foram enviadas para análise, possibilitando avaliar o desempenho da nova metodologia e comparar com os experimentos realizados. Previamente ao espectrômetro de massas o cromatógrafo possuía um detector UV-Vis. A Figura 18 apresenta os sinais do detector UV-Vis (ajustado em 210 nm) relativos às injeções com os padrões de DSF.

Figura 18. Cromatogramas registrados com solução etanólica obtida na ausência (A) e presença de concentrações crescentes de solução padrão de DSF: 18 (B), 34 (C), 67,5 (D), 135 (E) e 270 (F) $\mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min^{-1} , coluna: fase reversa C18, detector: UV ajustado em 210 nm. Inseto: Ampliação da região entre 25 e 30 minutos onde se encontra o sinal do DSF.

Os picos referentes ao DSF encontram-se na região entre 26,5 e 29 minutos (melhor visualizadas no inserto). O resultado está de acordo com o esperado, tendo em vista que a molécula apresenta uma grande cadeia carbônica e a coluna C18 tem uma grande interação com moléculas de baixa polaridade, refletindo em um alto tempo de retenção na coluna. Tal fato pode ser interessante para a análise de DSF nas amostras, tendo em vista que um maior tempo de retenção significa maior tempo de interação do analito com a fase estacionária, podendo facilitar a separação de espécies interferentes, caso esse tempo seja suficiente para a interação diferencial das espécies com a fase estacionária separar os interferentes do DSF.

Assim como nos experimento de eletroforese capilar a área do pico referente ao DSF nos cromatogramas foi calculada (dessa vez não foi utilizado padrão interno) e uma curva de calibração foi construída (Figura 19), observa-se uma ótima linearidade $R = 0,99921$, indicando um excelente desempenho da técnica para a quantificação do DSF.

Figura 19. Curva e calibração obtida a partir dos cromatogramas mostrados na Figura 18. Equação da reta $Y = 0,55 + 0,149 * X$ ($Y = \text{UAbtr}$; $X = \text{Concentração}$) e o coeficiente de correlação $R = 0,99921$.

Após a detecção UV as soluções eluídas eram ionizadas por um processo Electrospray e inseridas no espectrômetro de massas. Abaixo estão apresentados os cromatogramas de íons da região entre 25 e 33 minutos (Figura 20), região em que aparece o pico referente ao DSF. Na sequência o espectro de massas no tempo de eluição 27,8-28,2 min indica a relação massa/carga do fragmento detectado, referente à injeção da solução padrão de concentração $135 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 21).

Figura 20. Cromatogramas de íons (região entre 25 e 33 minutos) do padrão de DSF em diferentes concentrações. Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min⁻¹, coluna: fase reversa C18, detecção por espectrometria de massas com injeção electrospray e detector íon-trap.

Figura 21. Espectro de massas referente ao padrão de DSF na concentração $135 \mu\text{mol L}^{-1}$ na região entre 27,4-28,2 minutos do cromatograma de íons apresentado na Figura 20. Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min^{-1} , coluna: fase reversa C18, detecção por espectrometria de massas com injeção electrospray e analisador íon-trap.

A Figura 21 mostra que o fragmento detectado referente aos picos indicados na Figura 20 possui relação massa/carga 211,2. Tal relação está de acordo com a massa da molécula de DSF após perda de um átomo de hidrogênio (provavelmente o hidrogênio da carboxila), sem nenhuma fragmentação posterior.

Assim como realizado com os cromatogramas registrados pelo detector UV-Vis, curvas de calibração foram traçadas para os picos presentes na Figura 20. Diferentemente dos resultados anteriores, as planilhas de dados dos gráficos referentes aos cromatogramas de íons e os espectros de massas não puderam ser acessadas (os resultados foram enviados como

arquivos de imagem). Com isso o cálculo de áreas e alturas dos cromatogramas de íons foram realizados através de um software de tratamento de imagens (ImageJ®). Como consequência o erro embutido em tais cálculos é maior (a altura dos picos foi calculada de maneira manual, tendo como referência a escala no eixo y, e a área dos mesmos foi determinada pela quantidade de pixels na imagem). A Figura 22 apresenta tais curvas de calibração.

Figura 22. Curvas de calibração obtidas a partir dos espectros de massas mostrados na Figura 20. Equações das retas: Altura: $Y = -1,1e5 + 9,7e3 * X$ ($Y = \text{Altura}$; $X = \text{Concentração}$), coeficiente de correlação $R = 0,9733$; Área: $Y = -1,0e11 + 2,6e9 * X$ ($Y = \text{Área}$; $X = \text{Concentração}$), coeficiente de correlação $R = 0,9625$.

A linearidade das curvas provenientes dos cromatogramas de íons é inferior às observadas para os métodos anteriores. Tendo em vista que a ideia da utilização de espectrometria de massas é a identificação do DSF nos extratos provenientes dos sobrenadantes, confirmando que os picos observados nas amostras correspondiam de fato ao DSF e não a uma molécula interferente, tal fato não foi crítico para o ensaio planejado.

Na sequência, foram injetadas as amostras utilizadas nos experimentos de eletroforese capilar referentes aos eletroferogramas apresentados na Figura 17 (sobrenadantes provenientes da linhagem ΔC após passarem pelo processo de Extração 4 descrito na Seção 3.4.4). Novamente os resultados apresentados estão divididos na parte do detector UV-Vis ajustado em 210 nm (Figura 23) e resultados de espectrometria de massas (Figura 24).

Figura 23. Cromatogramas registrados com as soluções etanólicas obtidas da extração 4 (Seção 3.4.4) com a linhagem celular ΔC cultivada em meio mínimo na ausência (A) e presença de DSF $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B). Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min^{-1} , coluna: fase reversa C18, detector: UV ajustado em 210nm.

A Figura 23 mostra o cromatograma referente ao extrato sem adição de padrão em preto e com a adição do padrão na concentração de $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em vermelho. Comparando-se os dois gráficos observa-se que os mesmos são praticamente idênticos com a exceção do pico presente por volta de 26 minutos. Esse foi o mesmo tempo de retenção observado para as

soluções padrões de DSF (Figura 18), indicando que o pico que aparece apenas para o extrato ao qual o DSF foi adicionado posteriormente à extração é realmente referente ao DSF. A partir desse ponto podemos concluir que a detecção espectrofotométrica não foi capaz de detectar nem o analito na amostra, nem possíveis interferentes com características semelhantes ao DSF e que consequentemente tivessem tempos de retenção similares.

O próximo objetivo foi verificar se o espectrômetro de massas conseguiria detectar algum vestígio de DSF na amostra, baseando-se no fato de que a técnica possui, em geral, limites de detecção menores. A Figura 24 apresenta os resultados obtidos com o espectrômetro de massas, os gráficos A e B referem-se à amostra em que foi adicionado o padrão de DSF na concentração de $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. O gráfico C representa o cromatograma de íons da amostra em que o DSF não foi adicionado. A Figura 24A representa o cromatograma de íons e a Figura 24B representa o espectro de massas da região 26,3 min (onde se encontra o pico do DSF, como mostrado na Figura 20).

Figura 24. Cromatogramas de íons registrados com a solução obtida após a extração 4 (Seção 3.4.4) com a linhagem celular ΔC cultivada em meio mínimo antes (C) e após a adição de $67,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DSF (A); e espectro de massas (B) referente a região entre 26,3 minutos do cromatograma de íons com adição do padrão de DSF (A). Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min^{-1} , coluna: fase reversa C18, detecção por espectrometria de massas com injeção electrospray e detector íon-trap.

Os gráficos A e B comprovam que o pico apresentado nos cromatogramas com detecção UV na região por volta de 26 minutos é realmente o DSF. O espectro de massas (gráfico B) apresenta a relação massa/carga do fragmente como 213,8, um valor próximo ao observado na Figura 21 referente à injeção do padrão de DSF (211,2) e a massa do composto (212 g). Durante a análise da amostra sem a adição do padrão de DSF (gráfico C), o espectrômetro de massas apresentou algum defeito justamente na região em que era esperado o pico do DSF (região destacada no gráfico), com isso o equipamento teve que ser reparado e a amostra só pode ser injetada novamente após 2 meses.

Durante o conserto do equipamento, as amostras foram armazenadas a -10°C . Após o equipamento voltar à sua rotina de operação as amostras foram novamente injetadas. A Figura 25 apresenta os gráficos referentes ao detector UV e a Figura 26 os gráficos referentes ao espectrômetro de massas ambos da amostra sem adição de DSF.

Figura 25. Cromatograma registrado com a solução etanólica obtida da extração 4 (Seção 3.4.4) com a linhagem celular ΔC cultivada em meio mínimo sem adição de DSF. Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min⁻¹, coluna: fase reversa C18, detector: UV ajustado em 210 nm.

Figura 26. Cromatograma de íons registrado com a solução obtida após a extração 4 (Seção 3.4.4) com a linhagem celular ΔC cultivada em meio mínimo sem adição de DSF (A). Parâmetros: eluente: 80% metanol / 20% água (v/v), vazão: 4 mL min^{-1} , coluna: fase reversa C18, detecção por espectrometria de massas com injeção electrospray e detector íon-trap.

Na Figura 25 podemos observar que há diferenças no cromatograma em relação à Figura 23. Os picos presentes na região por volta de 5 minutos apresentaram algumas diferenças, podendo indicar alterações na composição da amostra, possivelmente por algum processo de degradação que não pôde ser evitado mesmo com o armazenamento refrigerado. Tal fato se confirma ao analisarmos a Figura 26, o cromatograma de íons apresenta diversos picos que não estavam presentes no espectro apresentado no gráfico C da Figura 24. Devido à quebra do aparelho durante o processo de análise é difícil fazer uma estimativa de qual seria o resultado mais confiável, o sinal de intensidade apresentado no eixo y varia muito entre os dois resultados, estando na ordem de 10^8 na Figura 24 e 10^6 na Figura 26. Porém, em ambos

os resultados mostrados, o sinal referente ao DSF em 26,3 min não esteve presente, tanto pela detecção UV quanto pela detecção de massas para a análise da amostra do sobrenadante sem a adição do DSF.

Com isso, novamente não foi possível obter um dado confiável que confirmasse a presença do DSF nos sobrenadantes, impedindo consequentemente qualquer tentativa de quantificação do mesmo.

5. CONCLUSÕES

Essa dissertação apresenta os resultados obtidos na tentativa de análise do ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (DSF) nos sobrenadantes celulares provenientes dos cultivos da bactéria *Xanthomonas axonopodis pv citri*, durante o período em que foi realizado esse mestrado.

Duas metodologias foram desenvolvidas utilizando a técnica de eletroforese capilar, sendo que tanto eletrólitos aquosos quanto contendo solventes orgânicos foram utilizados. O potencial de ambas as metodologias foi demonstrado com o uso de padrões analíticos. No entanto, ao aplicar as mesmas para a análise dos sobrenadantes celulares não se obteve o resultado desejado.

A análise direta dos sobrenadantes é impossibilitada pela alta força iônica da amostra, um problema comumente observado em eletroforese capilar. A adoção de procedimentos de extração se mostrou benéfica para a redução da referida força iônica, no entanto, não se mostrou efetiva na remoção de interferentes.

Análises utilizando a técnica de LC-MS também foram realizadas, porém, também sem o sucesso esperado. A complexidade do meio celular acabou se mostrando a maior dificuldade para o cumprimento dos objetivos propostos.

6. **REFERÊNCIAS**

- ¹ COOKSON, M. R. The biochemistry of parkinson's disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 29-52, 2005.
- ² STORGA, D.; VRECKO, K.; BIRKMAYER, J. G. D.; REIBNEGGER, G. Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of alzheimer patients. **Neuroscience Letters**, v. 203, n. 1, p. 29-32, Jan 1996.
- ³ SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. A two-component system involving an hd-gyp domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in xanthomonas campestris. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 986-1003, 2000.
- ⁴ BASSLER, B. L.; LOSICK, R. Bacterially speaking. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 237-246, 2006.
- ⁵ CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113-1116, 2006.
- ⁶ MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.
- ⁷ BARBER, C. E.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; PAN, M. Q.; WILSON, T. J. G.; SLATER, H.; DOW, J. M.; WILLIAMS, P.; DANIELS, M. J. A novel regulatory

system required for pathogenicity of *xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 555-566, 1997.

- ⁸ KHALIL, A. S.; COLLINS, J. J. Synthetic biology: Applications come of age. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 5, p. 367-379, May 2010.
- ⁹ SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th. Orlando, Fla.: Harcourt Brace College Publishers, 1998.
- ¹⁰ WANG, J. **Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine**. 1st. New York: VCH Publishers, Inc., 1988.
- ¹¹ ASHLEY, K. Developments in electrochemical sensors for occupational and environmental health applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 102, n. 1, p. 1-12, 2003.
- ¹² MARTINS, P. R.; POPOLIM, W. D.; NAGATO, L. A. F.; TAKEMOTO, E.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; ANGNES, L.; PENTEADO, M. D. C. Fast and reliable analyses of sulphite in fruit juices using a supramolecular amperometric detector encompassing in flow gas diffusion unit. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 249-255, 2011.
- ¹³ BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: Fundamentals and applications**. 2nd. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- ¹⁴ JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. Capillary zone electrophoresis. **Science**, v. 222, n. 4621, p. 266-272, 1983.

- ¹⁵ HUANG, X. H. C.; QUESADA, M. A.; MATHIES, R. A. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 2149-2154, Sep 1992.
- ¹⁶ VIDAL, D. T. R.; AUGELLI, M. A.; HOTTA, G. M.; LOPES, F. S.; DO LAGO, C. L. Determination of fluoroacetate and fluoride in blood serum by capillary zone electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 32, n. 8, p. 896-899, Apr 2011.
- ¹⁷ FROMMBERGER, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; MENZINGER, F.; ALBRECHT, V.; SCHMID, M.; EBERL, L.; HARTMANN, A.; KETTRUP, A. Analysis of n-acyl-l-homoserine lactones produced by burkholderia cepacia with partial filling micellar electrokinetic chromatography - electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 24, n. 17, p. 3067-3074, Sep 2003.
- ¹⁸ CHENG, H.; HUANG, W. H.; CHEN, R. S.; WANG, Z. L.; CHENG, J. K. Carbon fiber nanoelectrodes applied to microchip electrophoresis amperometric detection of neurotransmitter dopamine in rat pheochromocytoma (pc12) cells. **Electrophoresis**, v. 28, n. 10, p. 1579-1586, May 2007.
- ¹⁹ TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
- ²⁰ BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA, J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, Jul 2005.

- ²¹ DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. An oscillometric detector for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, Oct 15 1998.
- ²² BALDRICH, E.; XAVIER MUNOZ, F.; GARCIA-ALJARO, C. Electrochemical detection of quorum sensing signaling molecules by dual signal confirmation at microelectrode arrays. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 6, p. 2097-2103, Mar 15 2011.
- ²³ ZHOU, L.; GLENNON, J. D.; LUONG, J. H. T.; REEN, F. J.; O'GARA, F.; MCSWEENEY, C.; MCGLACKEN, G. P. Detection of the pseudomonas quinolone signal (pqs) by cyclic voltammetry and amperometry using a boron doped diamond electrode. **Chemical Communications**, v. 47, n. 37, p. 10347-10349, 2011 2011.
- ²⁴ XIE, X.-H.; LI, E. L.; TANG, Z. K. Sudden emergence of redox active escherichia coli phenotype: Cyclic voltammetric evidence of the overlapping pathways. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 8, p. 1070-1081, Aug 2010.
- ²⁵ SHARP, D.; GLADSTONE, P.; SMITH, R. B.; FORSYTHE, S.; DAVIS, J. Approaching intelligent infection diagnostics: Carbon fibre sensor for electrochemical pyocyanin detection. **Bioelectrochemistry**, v. 77, n. 2, p. 114-119, Feb 2010.
- ²⁶ BUKELMAN, O.; AMARA, N.; MASHIACH, R.; KRIEF, P.; MEIJLER, M. M.; ALFONTA, L. Electrochemical analysis of quorum sensing inhibition. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2836-2838, 2009 2009.
- ²⁷ CIANI, I.; SCHULZE, H.; CORRIGAN, D. K.; HENIHAN, G.; GIRAUD, G.; TERRY, J. G.; WALTON, A. J.; PETHIG, R.; GHAZAL, P.; CRAIN, J.; CAMPBELL, C. J.; BACHMANN, T. T.; MOUNT, A. R. Development of immunosensors for direct detection of three wound infection biomarkers at point of

care using electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 413-418, Jan 15 2012.

- 28 SERVINSKY, M. D.; ALLEN, P. C.; TSAO, C. Y.; BYRD, C. M.; SUND, C. J.; BENTLEY, W. E. Construction of a cell based sensor for the detection of autoinducer-2. In: KIM, M. S.; TU, S. I., *et al* (Ed.). **Sensing for agriculture and food quality and safety iv**, v.8369, 2012. (Proceedings of spie).
- 29 KUBESOVA, A.; HORKA, M.; RUZICKA, F.; SLAIS, K.; GLATZ, Z. Separation of attogram terpenes by the capillary zone electrophoresis with fluorometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7288-7292, Nov 12 2010.
- 30 FROMMBERGER, M.; HERTKORN, N.; ENGLMANN, M.; JAKOBY, S.; HARTMANN, A.; KETTRUP, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Analysis of n-acylhomoserine lactones after alkaline hydrolysis and anion-exchange solid-phase extraction by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1523-1532, Apr 2005.
- 31 LV, D.; MA, A.; BAI, Z.; ZHUANG, X.; ZHUANG, G. Response of leaf-associated bacterial communities to primary acyl-homoserine lactone in the tobacco phyllosphere. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 119-124, Feb-Mar 2012.
- 32 DENG, Y. Y.; WU, J. E.; TAO, F.; ZHANG, L. H. Listening to a new language: Dsf-based quorum sensing in gram-negative bacteria. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 1, p. 160-173, 2011.
- 33 AMARAL, A. M. D. Cancro cítrico: Permanente preocupação da citricultura no brasil e no mundo. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF**, v. Comunicado Técnico 86, Novembro, 2003 2003.

- ³⁴ GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri: Factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, Jan 2004.
- ³⁵ WANG, L. H.; HE, Y. W.; GAO, Y. F.; WU, J. E.; DONG, Y. H.; HE, C. Z.; WANG, S. X.; WENG, L. X.; XU, J. L.; TAY, L.; FANG, R. X.; ZHANG, L. H. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 903-912, 2004.
- ³⁶ ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; DA SILVA, A. C. R.; 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. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2315-2325, Apr 2005.
- ³⁷ ANDRADE, M. O.; ALEGRIA, M. C.; GUZZO, C. R.; DOCENA, C.; ROSA, M. C. P.; RAMOS, C. H. I.; FARAH, C. S. The hd-gyp domain of rpfG mediates a direct linkage between the rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *xanthomonas axonopodis* pv citri. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 537-551, Oct 2006.
- ³⁸ CHENG, Z. H.; HE, Y. W.; LIM, S. C.; QAMRA, R.; WALSH, M. A.; ZHANG, L. H.; SONG, H. W. Structural basis of the sensor-synthase interaction in autoinduction of the quorum sensing signal dsf biosynthesis. **Structure**, v. 18, n. 9, p. 1199-1209, 2010.

- ³⁹ VIDAL, D. T. R.; NOGUEIRA, T.; SAITO, R. M.; DO LAGO, C. L. Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 32, n. 8, p. 850-856, Apr 2011.
- ⁴⁰ BOLDINGH, J. Fatty acid analysis by partition chromatography. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 69, n. 2, p. 247-261, 1950.
- ⁴¹ METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 363-364, 1961.
- ⁴² PAN, L.; ADAMS, M.; PAWLISZYN, J. Determination of fatty acids using solid phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 23, p. 4396-4403, 1995.
- ⁴³ **Handbook of chemistry and physics : A ready-reference book of chemical and physical data.** 60th. Cleveland: CRC Press, 1979.
- ⁴⁴ STEINER, F.; HASSEL, M. Nonaqueous capillary electrophoresis: A versatile completion of electrophoretic separation techniques. **Electrophoresis**, v. 21, n. 18, p. 3994-4016, 2000.
- ⁴⁵ OLIVEIRA, M. A. L.; DO LAGO, C. L.; TAVARES, M. F. M.; DA SILVA, J. A. F. Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Quimica Nova**, v. 26, n. 6, p. 821-824, 2003.
- ⁴⁶ KANICKY, J. R.; SHAH, D. O. Effect of premicellar aggregation on the pKa of fatty acid soap solutions. **Langmuir**, v. 19, n. 6, p. 2034-2038, Mar 18 2003.

- ⁴⁷ KENNDLER, E. Organic solvents in ce. **Electrophoresis**, v. 30, n. S1, p. S101-S111, 2009.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: André Guimarães de Oliveira

Local e data de nascimento: São Paulo, 14 de julho de 1988.

EDUCAÇÃO

Ensino Fundamental e Médio: Fundação de Rotarianos de São Paulo Colégio Rio Branco
Unidade II Granja Viana, Cotia-SP, 2005.

Graduação: Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo-SP, 2009 (Bacharel
em Química com atribuições Tecnológicas e Biotecnológicas).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Mini-Cursos:

2010: Perfil Químico: fraudes bebidas e rotas de drogas. (Carga horária: 4h). II Encontro
Nacional de Química Forense

2010: Treinamento Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 128N (Carga horária: 16h). Instituto
de Química - USP.

2012: Treinamento Potenciostato/Galvanostato μ AUTOLAB Tipo III (Carga horária:
16h), software NOVA 1.8. Instituto de Química - USP.

Monitorias realizadas:

2009: QFL1200 – Fundamentos de Química Analítica

2010: QFL2241 – Princípios de Análise Química

2011: QFL2242 – Química Analítica Instrumental (Bolsista PAE)

Extensão Universitária:

2010: Supervisão de aulas práticas da 5ª Escola de Eletroquímica (Carga horária 16h).

OCUPAÇÃO

Bolsa de iniciação científica CNPq, 2008

Bolsa de iniciação científica, FAPESP, 2008-2009 (processo n. 2008/53566-3).

Bolsista do Projeto Piloto de Iniciação Científica nos EUA, FAPESP/NSF, 2009.

Bolsa de mestrado, CNPq, 2010

Bolsa de mestrado, FAPESP, 2010-2012 (processo n. 2010/04540-1).

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigo completo publicado em periódico:

Oliveira, A. G.; Muñoz, Rodrigo A. A.; ANGNES, Lúcio. Disposable Graphite Foil Based Electrodes and Their Application in Pharmaceutical Analysis. *Electroanalysis* (New York, N.Y.), v. 22, p. 1290-1296, 2010.

Trabalhos completos publicados em anais de congresso:

Oliveira, A. G.; Muñoz, Rodrigo A. A.; ANGNES, Lúcio. Eletrodos Baseados Em Folhas De Grafite Para A Determinação De Zinco Em Amostras Farmacêuticas Empregando Técnica De Redissolução Voltamétrica. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza. *Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*, 2009.

Resumos publicados em anais de congresso:

Oliveira, A. G.; Muñoz, Rodrigo A. A.; ANGNES, Lúcio. Folhas de Grafite como Eletrodo de Trabalho em Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com detecção Amperométrica: Análise de Fármacos. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. *Anais da 31ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, 2008.

Oliveira, A. G.; Muñoz, Rodrigo A. A.; ANGNES, Lúcio. Folhas de Grafite como Eletrodo de Trabalho em Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com detecção Amperométrica: Análise de Fármacos. In: 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2008, São Paulo. *Anais do 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP*, 2008.

Oliveira, A. G.; Muñoz, Rodrigo A. A.; ANGNES, Lúcio. Graphite Foils As Working Electrode Source in Amperometric Flow Injection Analysis of Pharmaceutical Molecules. In:

12th International Conference on Electroanalysis, 2008, Praga. ChemickeListy - Abstract Book, 2008. v. 102. p. 123-124.