UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Estudos bioanalíticos envolvendo a *Xylella fastidiosa*

Fayene Zeferino Ribeiro de Souza

*Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, como um
dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
(Química Analítica e Inorgânica)*

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos – SP
2013

Dedico:

*Aos meus pais, meus irmãos, meus
sogros e meu esposo Carlinhos.*

"Acho mesmo que os cientistas trabalham com o óbvio. O negócio deles - nosso negócio - é lidar com o óbvio. Aparentemente, Deus é treteiro, faz as coisas de forma tão recôndita e disfarçada que se precisa desta categoria de gente - os cientistas - para ir tirando os véus, desvendando, a fim de revelar a obviedade do óbvio. O ruim deste procedimento é que parece um jogo sem fim. De fato, só conseguimos desmascarar uma obviedade para descobrir outras, mais óbvias ainda. " Darcy Ribeiro, - Sobre o óbvio.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu força.

Aos meus pais queridos, sem eles não seria possível o desenvolvimento desse trabalho. Pai, Mãe vocês são a razão da minha vida, obrigada por tudo. Obrigada por acreditarem em mim e depositarem tanta confiança.

Ao meu esposo Carlos pelo incentivo, pela paciência, pelo carinho. Por ter me apoiado ao longo desse projeto, das escolhas que fiz e me ajudado a vencê-lo. Eu te amo muito. Meu tudo.

Aos meus dois irmãos Fábio e Mateus, mesmo longe estavam me apoiando e ajudando, amo vocês dois.

Aos meus sogros maravilhosos, Carlos e Adelaide, vocês são especiais para mim, me ajudaram muito nessa parte da minha vida, obrigada. Sem vocês esse trabalho também não seria possível.

Ao meu orientador pela oportunidade, paciência e pelo conhecimento obtido. Serei eternamente grata pela confiança depositada em mim.

Ao pessoal do BioMicS, Regiane, Juliane, Rubiane, Beatriz, Karina, Jenifer, Juliana A., Júlia, Patrícia, Sheila, Juliana O., Ana Carolina, Alessandra, Thiago Segato, Adriano, Paulo, Guilherme, Hélio, pela boa convivência diária, pelas horas de risadas, pelos passeios. Vocês são o melhor grupo ever.

Aos agregados do BioMicS, pela boa convivência e pelas risadas. Melhores agregados ever.

Aos amigos de Bauru, pelas imensas risadas, pelo convívio nos fins de semana. Adoro vcs.

Ao pessoal da TU Delft-BOC. Em especial a Bishuang e Kathrin.

A Camila, minha super amiga, que faz me dar risada, pelos passeios, pela amizade, por escutar as minhas histórias e me fazer rir das suas. Te adoro.

A Julieta, que me ensinou muitas coisas, pelo seu carinho e convivência em seu lab e pelas risadas do dia a dia no seu lab. Adoro vc de montão.

Ao prof. André, do IQSC, pela ajuda e me dar livre acesso em seu lab.

Ao grupo do prof. André, em especial as meninas: Nati, Ana Maria, Sandra e Marília.

As técnicas, Yara e Cidinha, muito prestativas em me ajudar.

As secretárias: Silvia e Andreia, e ao Gustavo.

À CAPES pela bolsa concedida.

À CAPES-PDEE pela bolsa de estágio no exterior.

Àqueles que de alguma forma contribuíram, meu muito obrigada!

Lista de Abreviaturas e Siglas

X.f - Xylella fastidiosa

CVC - Clorose variegada de citrus

HNL - hidroxinitrila liase

GX - goma xantana

QS - quorum sensing

DSF - fator de sinal difusível

HCN - ácido cianídrico

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS - PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida primeira dimensão

2DGE - eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional

XDM - Xylella defined medium

BCYE - buffered charcoal yeast extract

LB - luria bertani

CTS - camada de toner simples

CTD - camada de toner dupla

EC - Eletroforese Capilar

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução

CG - Cromatografia gasosa

CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

IEF – Focalização Isoelétrica

PMSF - fenilmetilsufonil fluoreto

AHL - acylhomoserine lactone

HD - histidine-aspartic

GYP - acid-glycine-tyrosine-proline

HD-GYP - histidine-aspartic acid-glycine-tyrosine-proline

PBS - tampão fosfato-salino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	2
1.2 Sistema "Quorum sensing".....	4
1.3 Biocatálise	9
1.3.1 Biocatálise na síntese de ésteres - Esterificação.....	11
1.3.2 Biocatálise na síntese de cianoidrinas.....	13
1.4 Informação geral sobre HNLs.....	14
1.4.1 Superfamílias.....	17
1.5 Atividade Enzimática de XfHNL.....	19
2.OBJETIVOS.....	20

CAPÍTULO 1

ANÁLISE PROTEÔMICA DE <i>Xylella fastidiosa</i>	21
Análise proteômica de <i>X. fastidiosa</i> nos meios XDM ₂ , XDM ₄ e XDM ₅ e BCYE modificados.....	22
Proteômica	22
3 Materiais e métodos.....	24
3.1 Crescimento da <i>Xylella fastidiosa</i> em meio XDM ₂ , XDM ₄ e XDM ₅ e BCYE.....	24
3.2 Extração de proteína extracelulares de <i>X. fastidiosa</i>	26
3.3 Extração de proteína total de <i>X. fastidiosa</i>	26
3.4 Detecção das proteínas por coloração com prata.....	27
3.5 Análise de OFFGEL	28
3.6 Análise das frações de OFFGEL por LC-MS.....	28
4 Resultados e Discussão	29
4.1 Extração de proteína total.....	37
4.2 Análise proteômica utilizando OFFGEL.....	41
4.3 Análise de Dados por LC-MS.....	50

5 Conclusão.....	54
------------------	----

CAPÍTULO 2

ANÁLISES DE SINAIS PUTATIVOS DSFs DA <i>Xylella fastidiosa</i> POR ELETROFORESE CAPILAR E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	55
Quorum sensing.....	56
3 Materiais e métodos.....	57
4 Resultados e Discussão.....	59
5 Conclusão.....	64

CAPÍTULO 3

ESPECIFICIDADE CATALÍTICA DE HIDROXINITRILA LIASE DE <i>Xylella fastidiosa</i> ...	65
--	----

SUBCAPÍTULO 3.1

SÍNTESE DE CIANOIDRINA CATALISADA POR HIDROXINITRILA LIASE PROVENIENTE DA BACTÉRIA <i>Xylella fastidiosa</i> E SUA SELETIVIDADE PELO SUBSTRATO.....	66
3 Materias e métodos.....	67
3.1. Reagentes.....	67
3.2. Enzima.....	68
3.2.1 Purificação da Proteína HNL por Cromatografia de Troca Iônica com Resina de Níquel:.....	69
3.3 Atividade enzimática.....	69
3.3.1 Influência do pH.....	70
3.3.2 Influência da composição do tampão.....	71
3.4 Análises por cromatografia gasosa.....	71
3.5 Análises por eletroforese capilar – Separação quiral de (±)-mandelonitrila.....	73
4. Resultados e discussões.....	74
4.1 Teste enzimático.....	74

4.2 Influência do pH.....	76
4.3 Influência da composição do tampão e a presença de ácido cítrico na atividade de XfHNL	77
4.4 Síntese de cianoidrina catalisada pela XfHNL.....	78
4.5 Análises por cromatografia gasosa (CG).....	84
4.6 Análises por Eletroforese capilar (EC).....	89
5. Conclusão.....	91

SUBCAPÍTULO 3.2

ESTUDO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DA PROTEÍNA HIDROXILANITRILA LIASE DE BACTÉRIA <i>Xylella fastidiosa</i> NA ESTERIFICAÇÃO DO (R,S)-IBUPROFENO.....	92
Estudo da atividade da proteína HNL frente a sua similaridade com esterases e lípases.....	93
3 Materiais e métodos.....	94
3.1 Estudo da atividade de esterificação de (R,S)-ibuprofeno por XfHNL.....	94
4 Resultados e discussão.....	95
5. Conclusão.....	99

SUBCAPÍTULO 3.3

SÍNTESE DE ÉSTER RACÊMICO E RESOLUÇÃO CINÉTICA DO ÉSTER CATALISADA PELA HIDROXINITRILA LIASE DE <i>Xylella fastidiosa</i>	100
3 Materiais e métodos.....	101
4 Resultados e Discussões.....	102
5 Conclusão.....	105
CONCLUSÃO GERAL.....	106

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE UM XILEMA BIOMIMÉTICO MICROFLUÍDICO NO ESTUDO DO PROCESSO DE COLONIZAÇÃO DA <i>Xylella fastidiosa</i>	107
Tecnologias de microfabricação de sistema microfluídico.....	108

3 Materiais e métodos.....	110
3.1 Fabricação do microchip de PT	110
3.2 Introdução da bactéria <i>X. fastidiosa</i> 9a5c ao microchip de PT.....	112
3.3 Medida da vazão dos nutrientes.....	113
4 Resultados e Discussões.....	113
4.1 Efeito da geometria do canal na velocidade do fluxo.....	115
4.2 Colonização de <i>X. fastidiosa</i> no microchip de PT.....	116
4.3 Observação do biofilme produzido por <i>X. fastidiosa</i>	118
5 Conclusão.....	121
6 REFERÊNCIAS	123

Resumo

Este trabalho apresenta estudos bioanalíticos envolvendo a bactéria *Xylella fastidiosa*. A *X. fastidiosa* é uma bactéria aeróbica, responsável pela doença Clorose Variegada dos Citros. Durante o projeto genoma foi possível mapear diversas proteínas, sendo uma das enzimas a hidroxinitrila liase (HNL). As indústrias de química fina, em especial a farmacêutica, vêm utilizando enzimas para produção de enantiômeros que visam à formação de novas drogas quirais com alto teor de pureza. As enzimas HNLs são proteínas presentes na superfamília α/β -hidrolases, da qual também fazem parte as lipases e esterases. As hidroxinitrilas são empregadas na síntese de compostos quirais, para melhores condições em biocatálise. HNLs são enzimas que catalisam a formação reversível de cianoidrinas utilizando ácido cianídrico (HCN) e aldeídos ou cetonas. Por esta razão, foi analisado o potencial de biocatálise enantiosseletiva da *Xf*HNL referente ao substrato (*R,S*)-ibuprofeno e a síntese do éster racêmico, α -metil benzil acetato, e também a síntese de cianoidrinas catalisadas pela *Xf*HNL. Pelas três reações estudadas neste trabalho foi possível observar que *Xf*HNL não possui enantiosseletividade em dois dos substratos testados. Também foi estudado neste trabalho a expressão proteica nos meios de cultura líquidos XDM₂, XDM₄ e XDM₅ até então não estudados por eletroforese OFFGEL, uma nova plataforma semi-preparativa para fracionamento de proteínas. Foi realizado um estudo preliminar desse meios, para avaliar a expressão proteica, e também o meio de cultura BCYE para visualizar possíveis fatores sinal difusível (DSF) por espectrometria de massas e seu comportamento em eletroforese capilar. Por fim, foi fabricado um microdispositivo de microfluídico feito em poliéster-toner (PT) para biomimetizar o xilema para o estudo *in vitro* de *X. fastidiosa* e seu comportamento na colonização. Assim sendo, foi possível visualizar o crescimento, a formação de biofilme e a presença de goma xantana dentro do microchip.

Abstract

This work involves bioanalytical studies of *Xylella fastidiosa*. The *X. fastidiosa* is an aerobic bacteria, responsible for the disease Citrus Variegated Chlorosis. During the genome project was possible to characterize several proteins, one of the enzymes hydroxynitrile lyase (HNL). Industries, especially pharmaceuticals, have been using enzymes for production of enantiomers aimed at the formation of new chiral drugs with high purity. Enzymes are proteins present in HNLs superfamily α / β -hydrolases, which are also part of lipases and esterases. The HNLs have been employed in the synthesis of chiral compounds for better conditions in biocatalysis. HNLs are enzymes that catalyze the reversible formation of cyanohydrins using hydrocyanic acid (HCN) and aldehydes or ketones. For this reason, we investigated the potential of enantioselective biocatalysis of *Xf*HNL respect to substrate (*R,S*)-ibuprofen and synthesis of racemic ester, α -methyl benzyl acetate. Also, the synthesis of cyanohydrins catalyzed by *Xf*HNL. By three reactions involved in this work, it was observed that there were not *Xf*HNL enantioselectivity in 2 of the substrates studied. Also, it was studied protein expression in liquid culture medium XDM2, XDM4 and XDM5 hitherto studied by electrophoresis OFFGEL, a new platform for semi-preparative protein fractionation. We conducted a quick study and through this liquid medium, BCYE, to view possible DSFs by mass spectrometry and their behavior in capillary electrophoresis. And finally, it was produced a PT microdevice in order to mimic the xylem vessels to study of *X. fastidiosa* in vivo and its behavior. Accordingly, it is possible to display the growth, biofilm formation and the presence of xanthan gum in the microchip.

1 Introdução

A laranja foi introduzida no Brasil durante a época da colonização, mas somente na década de 1920 foi criado o primeiro cinturão citrícola. Esse cinturão se encontra em São Paulo e no Triângulo Mineiro onde são produzidas mais de 80% das laranjas do território brasileiro, sendo o cultivo de laranja a mais expressiva, 66% (*Citrus sinensis*) (LOPES et al., 2010). O Brasil produz, atualmente, mais da metade da produção mundial de suco de laranja e 98% dela é destinada à exportação. Os principais Estados produtores são São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Bahia (LOPES et al., 2010).

Na cultura de citros é grande o número de pragas e doenças que as atacam, afetando a qualidade e a quantidade dos frutos, tornando a planta improdutiva. As principais fitossanidades dos citros são: Clorose Variegada dos Citros (CVC), Cancro Cítrico, Declínio, Gomose de *Phytophthora*, Greening, Leprose dos Citros, Mancha Alternaria, Morte Súbita dos Citros (MSC), Pinta Preta, Podridão Floral dos Citros, Rubelose e Tristeza – *Citrus Tristeza Virus* (CTV) (BALDASSARI et al., 2003; BELASQUE Jr. et al., 2005).

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) também conhecida como "amarelinho" é considerada a mais importante doença agrícola do território nacional, e foi primeiramente observada em 1987 no estado de São Paulo, na cidade de Colina, e em 1992 no estado do Paraná, na cidade de Paranavaí (PIERRY, 2012). Os frutos da planta afetada são pequenos, enrijecidos e amadurecem precocemente (Figura 1) (HOPKINS e PURCELL, 2002; PIO et al., 2001). A responsável por essa doença é uma bactéria Gram-negativa, a *Xylella fastidiosa* (SCARPARI et al., 2003). Ela obstrui o xilema, que conduz água e sais minerais da raiz à copa das árvores, através da produção de um biofilme, a goma xantana (MACHADO et al, 2007). Por mais que o fluxo de seiva seja intenso, o deslocamento da bactéria e sua colonização não se dá na mesma proporção, comparada ao fluxo de seiva, devido a formação de biofilme e principalmente devido ao tamanho dos poros dos vasos do xilema que não são largos para deslocarem os agregados celulares livremente (HOPKINS, 1989). Como esse movimento da bactéria dentro do xilema é pouco conhecido, é quase certo que a

degradação dos vasos xilemáticos é devido a produção de proteínas extracelulares pela bactéria, tais como, proteases, pectinases e celulasas (SILVA, 2004). A *Xylella fastidiosa* é transmitida através do aparelho bucal de insetos vetores, como as cigarrinhas da família Cicadellidae (RINGENBERG et al., 2010). Algumas hipóteses de patogenicidade da *X. fastidiosa* são descritas na literatura, no entanto, esse mecanismo não é totalmente conhecido (LEE et al., 1982, FRENCH e STASSI 1978, HAYARD e MARIANO, 1997).

Figura 1. Sintomas da CVC nos frutos e folhas de citrus. À esquerda folhas e frutos com CVC, à direita folhas e frutos sadios (HOPKINS e PURCELL, 2002).

Fonte: HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, n. 10, p. 1056-1066, 2002.

1.1 A bactéria *Xylella fastidiosa*

A *X. fastidiosa* possui características como: forma de bastonete, comprimento de 3 – 5 µm, 0,3 – 0,5 µm de diâmetro e coloração Gram-negativa. A *X. fastidiosa* é filogeneticamente muito parecida com a bactéria relatada *Xanthomonas* spp. (GUILHABERT e KIRKPATRICK, 2005). É uma bactéria aeróbica, no qual exige meios de cultivo especiais para um desenvolvimento pleno, como aminoácidos, micro e macronutrientes. Sua temperatura ótima para crescimento é em torno de 26 – 28 °C e o pH do meio de cultivo está em torno de 6,5 – 6,9, e as suas culturas podem ser lisas ou rugosas, opalescentes e circulares (CHANG e DONALDSON, 2000; WELLS et al., 1987).

A *Xylella fastidiosa* é responsável por causar várias doenças em diversas plantas, tais como: videiras, citros, cafeeiros, ameixeira, pessegueiro, alfafa, entre outras plantas (SIMIONATO et al., 2007; CARUSO et al., 2009; REDAK et al., 2004; DE LIMA et al., 1998; HENDSON et al., 2001; DAVIS et al., 1981). Ela é responsável pela Clorose Variegada dos Citros, que resulta em grandes prejuízos econômicos para o nosso país (CASERTA et al., 2010). A *X. fastidiosa* coloniza o xilema, e é transmitida pelo aparelho bucal dos insetos vetores, as cigarrinhas (YAMAMOTO et al., 2002). A Figura 2 ilustra a colonização da *X. fastidiosa* nos vasos xilemáticos; a bactéria é apontada pela seta (ALVES et al., 2009). O maior sintoma da *X. fastidiosa* está associado com a falta de água devido a redução do fluxo da seiva através do xilema, que é resultado da oclusão dos vasos xilemáticos pela bactéria pela produção de polissacarídeos extracelulares, gomas e tiloses (GUILHABERT e KIRKPATRICK, 2005). O genoma relativamente pequeno desta bactéria (2,5 Mb) pode explicar os nichos limitados de *X. fastidiosa*, ocupado pelo xilema da planta. Neste local, as bactérias são expostas a elevada turbulência, com um ambiente de baixo valor nutritivo. Estas condições tornam a formação do biofilme bacteriano um elemento-chave na sobrevivência e replicação da *X. fastidiosa* (VOEGEL et al., 2010).

Figura 2. Microscopia de luz de vasos xilemáticos de *Citrus sinensis* colonizados por *X. fastidiosa*. (ALVES et al., 2009)

Fonte: ALVES, E.; LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; ISHIDA, M. L.; ANDERSEN, P. C. *Citrus sinensis* leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. **Scientia Agricola Journal**, v.66, n.2, p.218-224, 2009.

A interação patógeno-hospedeiro pode ser observada por vários aspectos, tanto morfológicos, quanto moleculares. Grande parte dos fatores da colonização e como elas vivem no tecido são atribuídos às proteínas. A secreção de proteínas é considerado um dos principais meios da capacidade da bactéria em causar a doença

em relação ao mecanismo de defesa do hospedeiro (SANDKVIST, 2001). A *X. fastidiosa* possui um sistema de secreção tipo II (SIMPSON et al., 2000) provavelmente envolvidos na exportação de proteínas que degradam a parede celular (DOW e DANIELS, 2000). Dessa maneira é de grande interesse estudar suas funções e interações. Durante o projeto genoma foi possível identificar diversas proteínas, sendo algumas delas denominadas enzimas hidroxinitrila liase (HNL), corismato sintase (CS) e proteínas D da via de transporte e secreção Tat (TatD) (CARUSO, 2007).

1.2 Sistema "Quorum sensing"

O maior grupo de bactérias patogênicas associadas a plantas é a do gênero *Xanthomonas*. De acordo com Leyns et al., (1984), bactérias desse gênero são responsáveis por infestar pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 de dicotiledôneas. Por exemplo, a *Xanthomonas campestris* é responsável por infestar plantas de interesse agrônômico, tais como, repolho, couve-flor, brócolis, tomate, pimenta, algodão, soja e noz (HAYWARD, 1993).

Acreditava-se que bactérias não possuíam comunicação célula-célula. Hoje, sabe-se que essa habilidade é essencial para a sobrevivência bacteriana e interação com o meio produzindo a goma xantana (GX). Sensoriamento de quórum (QS – *quorum sensing*) é um mecanismo de comunicação entre células (WHITEHEAD et al., 2001). Estudos com *Xanthomonas campestris campestris* (X.c.c.) mostraram que essa bactéria evoluiu um único sistema de sensoriamento de quórum (QS). Esse sistema de QS regula a biossíntese de GX e a virulência bacteriana. Na X.c.c. o sistema de QS difere de outros já conhecidos, por exemplo, o sinal químico, a auto-regulação do sinal e maneiras de ativar a rede regulatória central da bactéria. Várias atividades vitais da bactéria são ligadas por sinais de QS (ZHANG e DONG, 2004).

Bactérias que apresentam esse sistema de QS produzem e liberam moléculas chamadas de autoindutores ou fatores de sinais difusíveis (DSF - *Diffusible Signal Factor*), que aumenta sua concentração de acordo com a densidade populacional. A X.c.c. realiza a síntese de DSF a qual é regulada por fatores de regulação de patogenicidades (*rpf*) (*rpfABCDEFGF*) (TANG et al., 1991). Para a X.c.c. a estrutura

química do DSF foi identificada como ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (WANG et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do DSF para a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Fonte: WANG, L. H.; HE, Y.; GAO, Y.; WU, J. E.; DONG, Y. H.; HE, C.; 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.

Atividades biológicas comparadas com uma série de derivados de DSF podem identificar poucos recursos que determina a atividade do sinal. A dupla ligação insaturada na posição α,β do DSF é o recurso mais importante. A configuração *cis* da dupla ligação α,β , o comprimento da cadeia e a substituição do carbono 11 (C-11) também estão incluídas para a atividade biológica do DSF (WANG et al., 2004).

No genoma da *X.c.c.*, *rpfG*, *rpfH* e *rpfC* são transcritos como o mesmo operon. Quando há uma supressão de *rpfC* ou *rpfG* ocorre uma diminuição da produção de exopolissacarídeo (EPS) e também de enzimas extracelulares. Slater et al. (2000) propuseram que os sistemas de transdução são sinais de RpfC/RpfG que unem a síntese de fatores patogênicos para sensoramento dos sinais do meio o qual pode estar incluído o DSF (SLATER et al., 2000). RpfG pertence a um subgrupo da família HD, (histidina-ácido aspartico). Essa família HD contém o GYP (glicina-tirosina-prolina). Ryan et al., (2006) demonstraram que o domínio HD-GYP do RpfG é a fosfodiesterase cíclica-GMP. Existem quatros fatores que explicam a afirmação anterior. Em primeiro lugar, a proteína purificada da HD-GYP é capaz de degradar o substrato fosfato bis(p-nitrofenila), mas não possui atividade contra o fosfato p-nitrofenila, o que evidencia que é uma fosfodiesterase e não uma fosfomonoesterase. Por segundo, a HD-GYP purificada tem a capacidade de gerar GMP através da degradação do dinucleotídico cíclico-GMP, c-di-GMP. Terceiro, essa proteína não possui atividade contra ATP, GTP,

GMP, cGMP ou cAMP. E por último, quando resíduos de H e D da proteína HD-GYP são substituídos há uma anulação da atividade enzimática contra o di-GMP-cíclico e também da atividade regulatória na produção do fator de virulência. Com essas informações conclui-se que RpfG depende da atividade enzimática contra o di-GMP-cíclico e que o segundo mensageiro, o di-GMP-cíclico, é amplamente envolvido na regulação de uma ampla gama de funções bacterianas (RÖMLING et al., 2005).

Na menor fase de densidade celular, cada célula bacteriana produz um nível de AHL (*acylhomoserine lactone* – lactona de homoserina acilada). Quando há uma grande densidade populacional ocorre um acúmulo de sinais de AHL, que interage com as proteínas LuxR, o resultado dessa união forma um complexo AHL-LuxR que gera uma produção impulsionada de sinais de AHL (DONG et al., 2007). Esse mecanismo de autoindução do sinal de QS permite à bactéria compreender sua densidade populacional, sincronizando a expressão de QS dentro da comunidade e permite uma redefinição do circuito QS inteiro a qual uma porção de células bacterianas é transferida para um novo ambiente.

Na bactéria *X.c.c.* foram identificados três genes *rpf* que estão associados com a produção de sinais de DSF. Pode citar entre eles, o *rpfF* e o *rpfB* que codifica um enol CoA hidratase putativa e uma ligase lipídeo CoA de cadeia longa putativa, respectivamente. E também o gene *rpfC* que codifica uma quinase (BARBER et al., 1997). A produção de DSF em *X.c.c.* aumenta proporcionalmente com população bacteriana (WANG et al., 2004; BARBER et al., 1997), a transcrição de *rpfF* continua praticamente constante em todo o crescimento e não é influenciada pela adição de DSF (BARBER et al., 1997; HE et al., 2006). Com o *rpfC* há uma diminuição da produção do fator de virulência por outro lado reforça a biossíntese do DSF. Algumas análises afirmam que o DSF pode auto-regular sua biossíntese através de um mecanismo pós-traducional que envolve a interação dos RpfC-RpfF. Com a proliferação da bactéria há um acúmulo de sinais de DSF, esses sinais então interagem com a auto-fosforilação do RpfC, resultando em uma conformação alterada permitindo a liberação de RpfF, gerando a biossíntese de DSF (HE et al., 2006a). Com isso, a biossíntese auto-induzida de DSF é alcançada sem a participação da transcrição do *rpfF*.

Outras bactérias, como a *Xanthomonas axonopodis* PV. *citri*, apresentam os genes que codificam RpfF, RpfC/RpfG (ANDRADE et al., 2006). Também apresentam o mesmo mecanismo de produção de DSF como o apresentado para a *X.c.c.* e que os RpfC e RpfG são capazes de regular subconjuntos de genes através das interações de proteína-proteína.

Com a disponibilidade das sequências completas dos genomas das bactérias, é possível estimar os sinais de DSF nessas bactérias, o qual tem se mostrado muito similar com algumas proteínas, que são encontradas nas bactérias *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xylella fastidiosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Com essas informações é possível sugerir que os sinais DSF-RpfC/RpfG podem ser conservados em *Xanthomonas*, *Xylella*, *Stenotrophomonas*, *Methylobacillus*, *Thiobacillus* e *Leptospirillum*.

Os sinais de DSF foram detectados em várias espécies do gênero *Xanthomonas* spp, e também foi encontrado na espécie *Xylella fastidiosa* (SCARPARI et al., 2003). Simionato et al. (2007), tem suposto que o DSF nas *X. fastidiosa* é um derivado de ácido graxo assim como para a *X.c.c.*, e caracterizaram o sinal de DSF como ácido 12-metil tetradecanóico (Figura 4) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Na *Xylella fastidiosa* os sinais de DSF foram encontrados pela influência das interações dos patógenos com os insetos vetores e plantas hospedeiras. Chatterjee et al. em 2008, mostraram que o DSF-RpfC é necessário para a virulência e para a transmissão do inseto para a *X. fastidiosa*.

Figura 4. Estrutura química do DSF para a bactéria *Xylella fastidiosa* (Simionato et al., 2007).

Na *X. fastidiosa*, o RpfC é envolvido na regulação negativa da biosíntese do DSF pela RpfF, assim como na *X.c.c.* (NEWMAN et al., 2004). Com a inativação do DSF, observado na *X.c.c.*, é possível reduzir severamente a doença também na *X.*

fastidiosa (NEWMAN et al., 2008). Pouco se sabe como o RpfC pode identificar o sinal de DSF, por isso é importante determinar como o RpfC pode interagir com RpfF e RpfG em várias condições.

X. fastidiosa foi a primeira bactéria patogênica que teve seu genoma sequenciado (SIMPSON et al., 2000; VOEGEL et al, 2010) e vários genes mostraram-se muito similares com os genes da *X.c.c.*, por exemplo, os genes associados com a síntese e a regulação de fatores patogênicos que degradam enzimas e polissacarídeos extracelulares (PURCELL e HOPKINS, 1996). É preciso de um mínimo de densidade celular do hospedeiro na *X. fastidiosa* para ser observada a doença clorose variegada do citrus (CVC), o qual é dependente de um QS (SCARPARI et al., 2003). Como já citado, o QS é um mecanismo que regula a expressão do gene de acordo com a densidade populacional, havendo esse QS as bactérias produzem sinais chamados autoindutores ou DSFs, e que são proporcionais à densidade populacional bacteriana (VON BODMAN et al., 2003).

Os genes *rpfB* e *rpfF* foram identificados como sendo aminoácidos. Esses genes podem ser expressos *in vitro*, assim sendo, essa bactéria é capaz de sintetizar DSF com características similares ao da *X.c.c* (SCARPARI et al., 2003; LAMBAIS et al., 2000). Comparada com a *X.c.c.*, a *X. fastidiosa* secreta uma quantidade menor de DSF, ou os sinais das moléculas são distintos, devido a estrutura química ser diferente.

1.3 Biocatálise

A Biotecnologia é uma área abrangente, que vem recebendo grande destaque nas pesquisas científicas, uma vez que pode ser aplicada em química, biologia, engenharia, entre outros. Uma importante ramificação da biotecnologia é a biocatálise, que abrange processos reacionais envolvendo enzimas para catalisar reações químicas, com o objetivo de produzir compostos de interesse industrial, tal como composto com alto grau de pureza enantiomérica (LILJEBLAD e KANERVA, 2006). A biocatálise pode ser empregada principalmente na indústria farmacêutica, mas também nas indústrias de cosméticos, polímeros, agroquímica e combustíveis (OLIVEIRA, 2012).

Desde meados da década de 70, as indústrias vêm utilizando enzimas para produção de compostos enantiomericamente puros, especialmente a farmacêutica, que visa a síntese de novos fármacos quirais com alto teor de pureza (DUCRET et al., 1998; ROURE et al., 1997). As enzimas estão presentes nos organismos vivos, como as bactérias, fungos filamentosos, algas, leveduras, em plantas e animais, e é possível utilizá-las a partir de suas formas isoladas adquiridas comercialmente. É conhecido que a mais de cem anos utilizam-se enzimas em reações envolvendo compostos orgânicos (MADAMWAR e NIDETZKY, 2012; COSTA e AMORIM, 1999). Esses biocatalisadores começaram a ser utilizados na química fina (LONG et al., 2005) e hoje suas aplicações envolvem diversas áreas, tais como, nutricional, ambiental, industrial e também a biotecnológica. No entanto, sua exploração em síntese orgânica só se deu recentemente (REETZ, 2002). E sua principal contribuição é a obtenção de compostos enantiomericamente puros através de rotas sintéticas estereocontroladas (COSTA e AMORIM, 1999).

As enzimas são macromoléculas (proteínas) possuindo longas sequências de L-aminoácidos sendo unidos pela ligação peptídica. As enzimas são muito seletivas quanto às reações que catalisam e geralmente são específicas a somente uma certa substância em uma certa reação. As enzimas são biocatalisadores e não só tem como características de aumentar a velocidade da reação como tem a capacidade de influência quiral. Esses biocatalisadores fazem isso, pois também são quirais e possuem um sítio ativo que é quiral, e apenas um enantiômero de um reagente quiral se ajusta apropriadamente a ele para então ocasionar a reação (NELSON e COX, 2002; BROWN et al, 1997; SOLOMONS e FRYHLE, 2001). Emil Fisher em 1894 propôs um modelo denominado "chave-fechadura" para demonstrar o processo da catálise enzimática e em 1958 Koshland propôs o modelo denominado de "encaixe por indução". Esse novo modelo sugere que, devido à complexidade entre enzima-substrato, o substrato induz uma pequena mudança de conformação na subunidade da enzima a qual interage, sendo transmitida para a subunidade vizinha. Devido a essa mudança, a enzima é induzida a conformação responsável pelo processo catalítico (FABER, 2011). A atividade de uma enzima pode ser inibida se uma molécula for

capaz de se ligar ao sítio ativo bloqueando a entrada de moléculas do substrato (BROWN et al, 1997).

Muitas enzimas vêm sendo utilizadas em laboratórios de química orgânica para a obtenção de reações enantiosseletivas, um exemplo de uma enzima muito utilizada neste caso é a lipase (SOLOMONS e FRYHLE, 2001). Algumas lipases vêm sendo usadas para resoluções quirais utilizando (*R,S*)-ibuprofeno em solvente orgânicos, tais como lipases de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger*. Outras lipases têm sido utilizadas em reações de sínteses de ésteres racêmicos. As lipases são estáveis em meio orgânico, podendo ser mais enantiosseletivas e apresentar uma melhor solubilidade em substrato hidrofóbico (XIE et al., 1998).

As classes de enzimas mais utilizadas são as oxidorreduções (oxidases, hidrogenases, peroxidases, redutases), as transferases, as hidrolases (esterases, lipases, amidases, fosfatases, epóxido hidrolases e nitrilases), e as liases (descarboxilases). Outras classes de enzimas são as isomerases e ligases, que, no entanto, são pouco utilizadas em rotas sintéticas (FABER, 2011).

A eficiência das enzimas para realizar reações químicas tem sido primordial para a sua utilização devido a seletividade apresentada por esses biocatalisadores naturais (SILVERMAN, 2000). A busca por novos biocatalisadores através de micro-organismos, células animais ou plantas são os métodos tradicionais para a descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise nos diversos setores industriais. O curto período de cultivo dos micro-organismos, a enorme diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas apresentam um interesse particular para a utilização dos micro-organismos em biocatálise. A grande diversidade de micro-organismos encontrados na natureza e que podem ser utilizados proporcionam a descoberta de enzimas com diferentes aplicações (CARVALHO et al., 2005; OLIVEIRA, 2012).

1.3.1 Biocatálise na síntese de ésteres - Esterificação

Os ésteres são compostos orgânicos que têm grande importância na indústria e sua síntese se dá a partir de reações químicas, envolvendo catalisadores ácidos ou

básicos, ou por reações enzimáticas (esterificação, transesterificação ou interesterificação). Existem vantagens na utilização da via enzimática, pois utilizando catalisadores químicos, o processo de purificação pode ser oneroso e o produto formado pode não possuir um alto grau de pureza como quando se utiliza biocatalisadores, como, por exemplo, a lipase. A reação ocorre com um gasto energético menor e evita também a degradação tanto de produtos quanto de reagentes. Além disso, as enzimas possuem a elevada especificidade ao substrato, riscos menores à saúde e menor ocorrência de reações laterais (ABBAS e COMEAU, 2003; MADALOZZO, 2011).

O processo de obtenção de um éster envolve a reação de substituição de uma hidroxila de um ácido carboxílico por um radical alcóxila (-OR). A Figura 6 ilustra um esquema para o processo de obtenção de ésteres (FABER, 2011; BROWN et al., 1997).

Figura 6. Esquema ilustrativo de uma reação de esterificação.

Reações de esterificação enantiosseletiva catalisada por lipases na resolução de ibuprofeno são comuns. O ibuprofeno (ácido (±)-2-(4-isobutilfenil) propiônico) (Figura 7), uma mistura racêmica, é pertencente à classe de fármacos anti-inflamatórias (LIU et al., 2009) e vem sendo utilizado devido sua atividade biológica, dando destaque para o S-ibuprofeno, que tem atividade 100 vezes maior que o R-ibuprofeno (HONGWEI et al., 2005). O isômero (R) não possui ação anti-inflamatória e embora o isômero (R) seja lentamente convertido no isômero (S) dentro do organismo, um medicamento contendo apenas o isômero (S) possui efeito mais rápido em comparação com o composto racêmico (SOLOMONS e FRYHLE, 2001). O S-ibuprofeno vem sendo estudado em sínteses assimétricas, resolução química, e também em biocatálise (YUCHUN et al.,

2000). As reações catalisadas envolvendo lipases foram estudadas em resoluções cinéticas apresentando bons rendimentos (WON et al., 2006).

Figura 7. Estrutura de ibuprofeno.

A reação de esterificação enantiosseletiva do ibuprofeno ocorre na presença de álcoois, tais como, 1-propanol ou octanol, em meio orgânico e biocatalisadores (CARVALHO et al., 2005). Já foi relatado o favorecimento de sínteses envolvendo solventes orgânicos com uma quantidade baixa de solução aquosa, porém, podendo afetar a estabilidade térmica (ZAKS e KLIBANOV, 1984), e também a atividade enzimática (ZAKS e KLIBANOV, 1988). No entanto, existe uma quantidade ótima de água para obter a estabilidade térmica e a atividade enzimática, condição que varia de enzima para enzima (FABER, 2011).

1.3.2 Biocatálise na síntese de cianoidrinas

A indústria farmacêutica e a química fina vêm utilizando enzimas para catalisar sínteses de compostos quirais com alta enantiosseletividade. Essas reações acontecem em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica, utilizando-se nitrogênio ou argônio para que possam ser evitados problemas indesejados, como por exemplo, vazamento de HCN (PARAVIDINO et al., 2010; OKROB et al., 2011; KLEMPIER et al., 1995; HOLT e HANEFELD, 2009). As enzimas hidroxinitrila liases (HNLs) foram empregadas na síntese de compostos quirais, apresentando rendimentos satisfatórios, melhores excessos enantioméricos e podendo introduzir novos substratos (DADASHIPOUR e ASANO, 2011; VEUM et al., 2005; SHARMA et al., 2005; BROVETTO et al., 2011).

Muitas cianoidrinas foram sintetizadas a partir de enzimas, as HNLs, tanto com especificidade *R*- quanto *S*-substrato, foram utilizadas para melhorar as condições das reações, tais como, melhorar rendimentos, além da porcentagem de excesso enantiomérico (ee), e não menos importante, para introduzir novos substratos. Um grande ponto a ser discutido é o substrato escolhido, que contém compostos carbonílicos, que podem não ser aceitos pela enzima.

As cianoidrinas se dividem em grupos: 1. grupo contendo nitrila, no qual pode ocorrer hidrólise; 2. grupo contendo hidroxila ou álcool, utilizado para evitar instabilidade, racemização, degradação, além de inverter a configuração no caso de grupo hidroxila, e 3. utilização do carbono central para a formação de cianoidrinas (DADASHIPOUR e ASANO, 2011). A utilização de solventes orgânicos ou reações em meio ácido pode aumentar o excesso enantiomérico (FECHTER e GRIENGL, 2004).

Alguns exemplos de meios reacionais envolvendo a síntese de cianoidrinas catalisadas por HNLs são descritos na literatura, entre eles o uso de enzimas imobilizadas, por exemplo, a HNL de *Hevea brasilienses* (*HbHNL*) na utilização de suportes sólidos, como celulose (FESNER e ANTHONSEN, 2009); na utilização de sistemas bifásicos (VON LANGERMANN et al., 2008) e na aplicação de líquidos iônicos em reações catalisadas com HNL de *Prunus amygdalus* (*PaHNL*) (KARA e LIESE, 2010). Outro método usado ultimamente é em reações envolvendo agregados de enzimas (CLEAs - *cross-linked enzyme aggregates*), sua grande vantagem é que são reutilizáveis (CABIROL et al., 2006).

As HNLs mais utilizadas são *PaHNL*, proveniente de amêndoas; HNL de *Sorghum bicolor* (*SbHNL*), do sorgo; HNL de *Manihot esculenta* (*MeHNL*), da mandioca e *HbHNL*, da seringueira. A *XfHNL*, é a única HNL proveniente de bactéria, e tem sido pouco estudada desde então (DADASHIPOUR e ASANO, 2011).

1.4 Informação geral sobre HNLs

A formação de cianoidrinas se dá pela reação de ácido cianídrico, que contém um grupo nucleofílico atacando o grupo eletrofílico de uma cetona ou aldeído catalisada por enzimas hidroxinitrila liases (Figura 8).

Figura 8. Síntese de cianoidrinas a partir de HCN e cetona ou aldeído

Oxinitrilases, também conhecidas como hidroxinitrila liase (HNL), são enzimas que catalisam a formação reversível de cianoidrinas (VEUM et al., 2005). Quando uma célula vegetal é danificada, tanto por ataque de fungos, herbívoros ou até mesmo um dano mecânico, a HNL entra em contato com as cianoidrinas resultando em uma clivagem e liberação de HCN e aldeído ou cetona correspondente. É desse modo que o sistema de defesa das plantas é acionado (Figura 9) (VEUM et al., 2005; SHARMA et al., 2005; BROVETTO et al., 2011).

Figura 9. Conversão reversível da cianoidrina pela HNL, resultando em aldeído e ácido cianídrico (FECHTER e GRIENGL, 2004).

Essa habilidade das plantas em produzir ácido cianídrico como agente de defesa é denominada cianogênese. A cianogênese é iniciada pela ação da enzima β -glicosidase, a qual hidrolisa glicosídeos cianogênicos à cianoidrinas correspondentes. Estas, por sua vez, são clivadas em HCN e aldeído ou cetona (Figura 10) (FESNER e ANTHONSEN, 2009).

Figura 10. Esquema da cianogênese em plantas. Hidrólise do glicosídeo cianogênico em cianoidrina, resultando em HCN e aldeído (FESNER e ANTHONSEN, 2009).

A síntese da mandelonitrila, a partir de benzaldeído e ácido cianídrico de amêndoas, foi um dos primeiros estudos da biocatálise envolvendo o uso da HNL. O interesse deste primeiro estudo baseou-se pela possibilidade de ter a HNL expressa, purificada, caracterizada e usada para preparar cianoidrinas enantiomericamente puras (VEUM et al., 2005). Sua classificação se dá pela especificidade aos enantiômeros (*R*) ou (*S*), e se há dependência ou não de coenzimas FAD (flavina-adenina dinucleotídeo). As HNLs isoladas de *Hevea brasiliensis* (VON LANGERMANN et al., 2008) (seringueira), *Manihot esculenta* (KARA e LIESE, 2010) (mandioca) e *Sorghum bicolor* (CABIROL et al., 2006) (sorgo) catalisaram a formação e a clivagem de (*S*)-cianoidrinas. Já as espécies *Prunus amygdalus* (GRIENGL et al., 2000) e *Linum usitatissimum* (HASSLACHER et al., 1997) apresentaram enzimas com seletividade ao enantiômero (*R*).

Em relação as enzimas relacionadas ao cofator FAD, as independentes são heterogêneas quanto à sua especificidade ao substrato, sua massa, e sua sequência. Essas HNLs são encontradas nas famílias Poaceae, Euphorbiaceae, Linaceae, Olacaceae e Filicaceae como, por exemplo, as espécies *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* e *Sorghum bicolor* e *Linum usitatissimum* (CARUSO et al., 2009; CABIROL et al., 2006). Já as enzimas dependentes de FAD são glicoproteínas de cadeia simples com especificidade a um substrato (*R*)-(+)-mandelonitrila. Essas HNLs foram isoladas de amêndoas (*Prunus amygdalus* - PaHNL) e de cerejas pretas (*Prunus serotina*), da

família Rosaceae (OGNYANOV et al., 1991). Essas enzimas são muito similares em suas massas moleculares ($M_r \sim 60.000$), mas são diferenciadas em suas sequências primárias e na glicosilação (FESNER e ANTHONSEN, 2009).

Como descrito previamente, a formação de cianoidrinas ocorre pela adição de HCN a uma fonte de carbono eletrofílico, cetona ou aldeído, catalisada pelas enzimas HNLs. Para evitar a utilização de ácido cianídrico—o qual é extremamente tóxico—como fonte de cianeto, é possível o uso de outras fontes de cianeto, tais como acetona cianoidrina (OGNYANOV et al., 1991; GREGORY, 1999) ou ($\pm$)-2-pentanona cianoidrina (FABER, 2011). Caso a enzima possa catalisar a reação, como é o caso daquela presente em *Prunus amygdalus* (PaHNL), uma adição de acetona cianoidrina será efetiva quando adicionada ao meio reacional. Por outro lado, a enzima presente em *Sorghum bicolor* (SbHNL) não aceita como substrato a acetona cianoidrina, tornando a reação lenta e o excesso enantiomérico pode ser prejudicado (GREGORY, 1999).

1.4.1 Superfamílias

As proteínas são substâncias presentes em todas as células vivas, sua estrutura são blocos de aminoácidos unidos por grupos amida, recebendo o nome de ligação peptídica. As proteínas apresentam quatro níveis de organizações estruturais, que são as estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (BROWN, 1997). Para determinar novas estruturas funcionais de proteínas um bom recurso é a classificação em famílias. A fim de facilitar a pesquisa dessas informações foi criado um banco de dados chamado SCOP (*Structural Classification of Proteins* – Classificação estrutural de proteínas) (NELSON e COX, 2002). A base SCOP é subdividida em níveis: classe, *fold*, superfamília, família, domínio e referência, seguindo esta ordem para os níveis hierárquicos. A Figura 11 ilustra um esquema da base de dados SCOP para a proteína hidroxinitrila liase, o fluxograma esquerdo ilustra os nomes dos níveis hierárquicos e o fluxograma direito ilustra um exemplo da proteína hidroxinitrila liase proveniente da seringueira (BISOGNIN, 2007; <http://scop.berkeley.edu/>).

Hidroxinitrila liases (HNLs), ou também oxinitrilases, são proteínas presentes na superfamília α/β -hidrolases. Nesta superfamília encontra-se também lipases e esterases. As superfamílias contêm proteínas com divergência funcional, mas que contêm características estruturais similares e resíduos de sítios ativos similares. Por esta razão, foi analisado o potencial de biocatálise enantiosseletiva da XfHNL referente ao substrato (*R,S*)-ibuprofeno e a síntese do éster racêmico, α -metil benzil acetato, além da síntese de cianoidrinas catalisadas pela XfHNL.

Apesar da sua similaridade estrutural tridimensional e de sítios ativos similares, as enzimas α/β -hidrolases catalisam reações com uma grande variedade de substratos contendo diversos grupos funcionais, tais como ésteres, amidas, tioésteres, epóxidos e também hidroxinitrilas. Ocorre ataque nucleofílico nas reações envolvidas. α/β -hidrolases são largamente utilizadas em biocatálises, especialmente Lipase B de *Candida antarctica* (JOCHENS et al., 2011).

A superfamília α/β -hidrolases catalisam reações com ataques nucleofílicas em compostos carbonílicos (PADHI et al., 2010; JOCHENS et al., 2011). A maioria das α/β -hidrolases são hidrolases usadas em catálises, utilizando um oxianion junto com o grupo nucleófilo-histidina-aspartato. Para as enzimas lipases e esterases o nucleófilo é a serina (PADHI et al., 2010).

Figura 11. Níveis de hierarquia SCOP.

Nessa superfamília α/β -hidrolases incluem-se as hidroxinitrila liases, HNLs, que também promovem a catálise, porém esta ocorre diferente da esterase de três maneiras distintas. Primeiro, nas reações com HNLs, não há a presença da enzima intermediária acil ou algum complexo covalente junto com a enzima. Segundo, o papel da serina é totalmente diferente, pois age como doador de hidrogênio ao invés de agir como nucleófilo. Terceiro, para ativar o grupo carbonil do substrato, as HNLs não utilizam ligações de hidrogênio dos oxiânions (PADHI et al., 2010).

Padhi e colaboradores, em 2010, converteram uma esterase de planta, SABP2, em uma hidroxinitrila liase usando apenas substituições de dois aminoácidos. Essa esterase perdeu a habilidade de catalisar hidrólise ésteres, e então após a conversão, foi capaz de catalisar a reação de liberação de cianeto da mandelonitrila, no entanto, com baixa enantiosseletividade (PADHI et al., 2010).

1.5 Atividade Enzimática de XfHNL

Para a obtenção efetiva da correlação da atividade é necessário que as enzimas estejam em sua conformação ativa. O princípio básico do teste enzimático é a remoção do grupo cianídrico da mandelonitrila, uma cianoidrina, formando aldeído ou cetona e ácido cianídrico (HANEFELD et al., 1999) a qual é catalisada pela enzima XfHNL. O teste se dá pelo aumento da formação de benzaldeído e HCN pela degradação da mandelonitrila, (Figura 9). Esse aumento é medido pela absorbância do benzaldeído em um comprimento de onda específico. A atividade enzimática foi determinada pela equação 1 (VEUM et al., 2004):

$$\text{Atividade} = \frac{V}{\epsilon_{280} \cdot l \cdot S} \Delta A / \text{min} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde $\epsilon_{280} = 1.376 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, V = volume total, l = caminho ótico (cubeta), S = volume da enzima e ΔA = variação de absorbância (VEUM et al., 2004).

2 Objetivos

Objetivo 1. Análise proteômica em meios de cultivo líquidos modificados

Objetivo 2. Identificação de DSFs em meio BCYE modificado

Objetivo 3. Entender o mecanismo da enantiosseletividade da proteína hidroxinitrila liase (HNL) proveniente da bactéria *X. fastidiosa*. Para tal, foram determinados outros objetivos específicos:

- a) A síntese de cianoidrina, mandelonitrila, catalisada pela HNL;
- b) A esterificação do (*R,S*)-ibuprofeno, produzindo um éster propílico de ibuprofeno catalisada pela enzima *XfHNL* em meio orgânico;
- c) A síntese do éster racêmico oriundo de (*R,S*)-1-fenil etanol, para em seguida estudar a resolução cinética catalisada pela *XfHNL*.

Objetivo 4. Fabricar um dispositivo microfluídico mimetizando o xilema para crescimento bacteriano. O objetivo deste trabalho foi a fabricação de um microdispositivo microfluídico biomimético para avaliar o comportamento *in vitro* da bactéria *X. fastidiosa*, simulando assim as condições obtidas quando presente nos vasos xilemáticos.

Capítulo 1

ANÁLISE PROTEÔMICA DE *Xylella fastidiosa*

Análise proteômica de *X. fastidiosa* nos meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ e BCYE modificados

Proteômica

O termo proteoma foi introduzido em 1995 para descrever o conjunto de todas as PROTEÍNAS que são expressas em um genOMA (WILKINS, et al., 1995). Enquanto o genoma é estático, ou seja, representa a soma de todas as células de um organismo, o proteoma é dinâmico devido ao estado de desenvolvimento do tecido como estímulos internos e externos, recebidos pelo organismo ou sob condições ambientais (WILKINS, et al., 1995). Para entender o funcionamento das moléculas de um indivíduo sadio ou doente é preciso saber as proteínas e outros componentes celulares que estão presentes e como eles interagem no organismo. Desta maneira, o estudo da proteômica é fundamental para compreender os inúmeros processos celulares que ocorrem, onde se dá o início do processo infeccioso e como atuam os agentes de controle. Devido ao desenvolvimento de ferramentas para análises proteômicas foi possível à identificação de uma vasta gama de proteínas até então desconhecidas.

O preparo da amostra é uma etapa crucial em praticamente todas as análises, e, portanto é uma etapa importante para as análises proteômicas. O método de extração, precipitação e solubilização das proteínas deve ser estabelecido para cada tipo de amostra biológica. Para análise de proteínas intracelulares, a célula deve ser efetivamente rompida e a escolha do método de ruptura celular depende do tipo de amostra. Para a extração utilizam-se métodos de precipitação com reagentes orgânicos que permitem concentrar o extrato proteico, além de separar as proteínas dos compostos interferentes (ROCHA, et al., 2005). Há diversos métodos de quantificação de proteínas (LOWRY, et al., 1951; BRADFORD, 1976; SMITH, et al., 1985) e um dos mais utilizados é o método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

Diante da complexidade das proteínas em sistemas biológicos é necessário métodos de separação analítica que propiciem alta resolução. As técnicas analíticas mais utilizadas são cromatografia líquida (HPLC), eletroforese unidimensional (1-DE ou

SDS-PAGE), bidimensional (2-DE) e em OFFGEL, associadas à espectrometria de massas (MS) (JORRÍN-NOVO, et al., 2009).

A eletroforese unidimensional (1-DE ou SDS-PAGE) é uma técnica simples e eficiente para análises de extratos brutos de proteínas, fornecendo informações úteis na avaliação de um método de extração. Esta técnica combinada com a separação das bandas dos géis, seguida de digestão trípica e análise por LC-MS fornece um grande número de proteínas identificadas (GONZÁLEZ-FERNANDES, et al., 2010; TRIBL, et al., 2008). A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE) é uma técnica de separação amplamente utilizada quando amostras complexas de proteínas de diferentes amostras biológicas são analisadas. A separação das proteínas é realizada em duas dimensões. Na primeira dimensão, onde ocorre a focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com as massas moleculares relativas (GE Healthcare, 2013).

As proteínas possuem natureza anfótera, no qual suas características tanto ácidas quanto básicas são dependentes de sua composição de amino ácidos. Desse modo, em pHs diferentes, as proteínas apresentam estados de ionização distintos, possuindo carga global positiva, negativa ou neutra. A focalização isoeletrica das proteínas ocorre com um gradiente de pH e com a aplicação de uma diferença de potencial, onde as proteínas migram em direção ao pH correspondente com o seu ponto isoeletrico, onde a carga é neutralizada.

A segunda dimensão é desempenhada com as proteínas completamente desnaturadas e na forma linear, em géis de poliacrilamida. Antes da eletroforese, a proteína desnaturada tem a sua carga intrínseca anulada pela adição de SDS (dodecil sulfato de sódio) fazendo com que a separação ocorra apenas pela sua massa molecular (GE Healthcare, 2013). Após separação eletroforética bidimensional, a obtenção dos resultados é determinada a partir da coloração do gel, por corantes orgânicos ou de prata (CANDIANO, et al., 2004). A desvantagem da 2-DE é a sua baixa reprodutibilidade e em alguns casos, baixa repetibilidade, sendo comprometidas em análises quantitativas. A polimerização da acrilamida e a formação das malhas reticulares do gel dependem de alguns parâmetros como: a concentração de acrilamida

e de bisacrilamida; pH; temperatura, oxigênio dissolvido e do tempo de polimerização. Algumas variações, mesmo que pequenas, destes parâmetros influenciam a formação dos retículos fazendo com que as propriedades de separação do gel sejam suavemente deslocadas, interferindo na separação das proteínas (GUTERRES, 2011). Outro fator importante na reprodutibilidade é preparo da amostra. Para uma alta qualidade dos géis é necessário a solubilização, desnaturação e redução das proteínas, eliminação dos interferentes e evitar a degradação da amostra. Esse capítulo teve intuito de estudar o perfil proteico dos meios até então não estudados por OFFGEL.

3. Materiais e métodos

3.1 Crescimento da *Xylella fastidiosa* em meio XDM₂, XDM₄ e XDM₅ e BCYE.

A bactéria *X. fastidiosa* 9a5c foi cultivada em meios de cultura XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados descritos por Lemos et al., 2003 (Tabela 1) e BCYE (CAMPANHARO et al., 2003). A modificação dos meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ (LEMOs et al., 2003), (Tabela 1) foi feita pela retirada das vitaminas e vermelho de fenol. As células bacterianas foram retiradas de meio agarizado e transferidas para tubos contendo 5 mL de meio líquidos modificados (pré – inóculos) e mantidas por 3 dias. Um volume de 500 µL dos pré-inóculos foram transferidos para tubos contendo 200 mL de meios líquidos modificados e mantidos por 2, 4 e 6 dias a 28 °C em agitação orbital de 150 rpm para extração proteica. Para determinação de curvas de crescimentos, as células bacterianas foram mantidas por 16 dias, a 150 rpm, a 28 °C. O crescimento foi monitorado pela absorbância a 600 nm (DO₆₀₀) após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias após a inoculação.

A bactéria *X. fastidiosa* 9a5c foi cultivada em meio de cultura BCYE (Tabela 1). As células bacterianas foram transferidas do meio agarizado para tubos contendo 5 mL dos meio líquidos modificados e mantidas por 3 dias. Posteriormente, alíquotas foram transferidas desses meios para serem utilizadas como inóculos em tubos contendo

200 mL de meio BCYE líquido e mantidas por 6 dias a 28 °C em agitação orbital de 150 rpm.

Tabela 1. Componentes dos meios líquidos modificados desenvolvidos para *X. fastidiosa*

Componentes	BCYE	XDM ₂	XDM ₄	XDM ₅
Tampão Aces	+	-	-	-
KOH	+	-	-	-
Extrato de levedura	+	-	-	-
Ágar*	+	-	-	-
L-Cisteína	+	-	-	-
Carvão ativado*	+	-	-	-
Glicose (10g/L)	-	+	+	+
K ₂ HPO ₄ (2,1g/L)	-	+	+	+
KH ₂ PO ₄ (0,8g/L)	-	+	+	+
MgSO ₄ .7H ₂ O (0,4g/L)	-	+	+	+
Pirofosfato férrico (0,125g/L)	+	+	+	+
L-serina (0,4mg/L)	-	+	-	-
L-asparagina (1mg/L)	-	+	-	-
L-metionina (0,4mg/L)	-	+	-	+
L-glutamina (4,0mg/L)	-	+	+	+

* Utilizado em meio sólido

3.2 Extração de proteínas extracelulares de *X. fastidiosa*

As proteínas foram extraídas dos meios de cultura XDM₂, XDM₄ e XDM₅. A cada 2 dias, 20 mL de meio foram retirados por 6 dias e centrifugadas a 10.000 × g, por 10 min a 4 °C. Alíquotas de 10 mL dos sobrenadantes acelulares foram precipitadas com 20 mL de acetona:etanol (1:1; v:v) e 20 mL de acetona:etanol:ácido acético (1:1:0,1; v:v:v) durante 12 h a -20 °C. As proteínas foram recuperadas por meio de centrifugação a 10.000 × g, por 25 min a 4 °C e secas a vácuo. O *pellet* foi solubilizado em tampão ureia (ureia 7 mol L⁻¹, tiourea 2 mol L⁻¹, Tris-base 15 mmol L⁻¹ e CHAPS 4% m/v). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford e armazenadas em -80 °C para posterior análise de SDS-PAGE.

3.3 Extração de proteína total de *X. fastidiosa*

As células bacterianas foram lavadas com solução PBS 0,1 mol L⁻¹, tampão fosfato-salino pH 7,4, estéril gelada por 2 vezes e centrifugadas por 10 min a 700 × g e ressuspendidas em água ultra-pura estéril contendo inibidor de protease 1 mM de fenilmetilsufonil fluoreto (PMSF). Em seguida, foi realizado a lise celular por sonicação (6 pulsos de 1 min, com intervalo de 30 s, 20 de amplitude) e o lisado centrifugado por 10 min a 6000 × g. Os sobrenadantes foram então separados dos *pellets*, quantificados por Bradford e armazenados a -80 °C, para posterior análise por SDS-PAGE.

Aproximadamente 90 µg de proteínas extraídas de *X. fastidiosa* cultivada em meio BCYE líquido foram solubilizadas em tampão de reidratação (7 mol L⁻¹ uréia, 2 mol L⁻¹ tiouréia, 2% CHAPS, 0,5% IPG, 10 mg mL⁻¹ DTT, 0,005% azul de bromofenol) em um volume final de 125 µL. A solução foi agitada por 1 min e as fitas IPG de 7 cm com gradiente de pH 3-10 linear foram reidratadas durante 10 h em temperatura ambiente e focalizadas em um sistema Ettan IPGphor 3 (GE) com as seguintes condições de corrida: 500 V/ 1 h, 1000 V/ 1 h e 8000 V/ 10 h subindo gradualmente até 8000 V. As fitas foram retiradas do sistema e mantidas a -80 °C.

As fitas IPG foram equilibradas pela imersão em 2,5 mL de solução de equilíbrio (75 mmol L⁻¹ Tris pH 8,8, 6 mol.L⁻¹ ureia, 30% glicerol, 2% SDS e 0,002% de azul de bromofenol) e 0,025 g de DTT. A solução no qual a fita estava imersa foi agitada por 15 min e substituída por outra solução de equilíbrio com adição de 0,0625 g de iodoacetamida, e novamente agitada por mais 15 min.

A segunda dimensão da eletroforese foi realizada em gel vertical de acrilamida, conforme descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado com 12,5% de bis-acrilamida, 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônia e 0,05% TEMED. As fitas IPG equilibradas foram colocadas sobre o gel e cobertas com 0,5% de agarose em tampão Tris-glicina (25 mmol L⁻¹, 192 mmol L⁻¹ glicina e 0,1% SDS). O tampão de corrida foi de Tris - glicina. A separação eletroforética foi feita a 10 °C em cuba Mini-Protean Tetra Cell (BioRad). Utilizou-se uma corrente de 10 mA por 15 min e 15 mA até terminar a corrida, em aproximadamente 2 h.

3.4 Detecção das proteínas por coloração com prata

Em seguida os géis foram corados com nitrato de prata, como descritos a seguir. Inicialmente, os géis foram transferidos para uma solução de fixação (50% etanol e 5% de ácido acético) por 20 min. Em seguida os géis foram lavados com 50% etanol por 10 min, seguida de uma lavagem com água bidestilada por 5 min e outra por 20 min. Após as lavagens, os géis foram transferidos para uma solução de sensibilização (0,025% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por 1 min; seguida de duas lavagens rápidas com água bidestilada e corados em solução de impregnação (0,15% AgNO_3) por 20 min; duas lavagens rápidas com água bidestilada. A revelação dos géis foi realizada em solução reveladora (3% Na_2CO_3 e 0,05% de formaldeído) por 1-2 min e interrompida, após o aparecimento das bandas, em solução contendo 5% de ácido acético por 5 min.

3.5 Análise de OFFGEL

O sistema de fraccionamento do OFFGEL foi montado encaixando a fita e os poços onde as amostras foram colocadas. A fita foi então reidratada com 560 μL da solução de reidratação 1,25x *Protein OFFGEL Stock Solution* (0,6 g DTT, 9,1 g de tioureia, 25,2 g de ureia, 6 mL de glicerol, 600 μL de anfólito e água qsp 50 mL) e 140 μL de água. Dessa solução, 40 μL foram adicionados a cada poço seguido de imersão de quatro pedaços de papel filtro para fixar os lados da canaleta, mantendo assim por 15 min. Posteriormente, 150 μL da amostra foram adicionados em cada poço, no qual foram tampados e introduzidos no OFFGEL. Posteriormente as amostras foram mantidas por 24 h para a completa separação das proteínas de acordo com o pI. Foram utilizadas fitas de 13 cm linear, o padrão utilizado no gel SDS-PAGE foi de baixo peso molecular.

3.6 Análises das frações de OFFGEL por LC-MS

As frações coletadas de OFFGEL foram então sujeitas à análise de espectrometria de massas. As frações foram então tripsinizadas conforme o protocolo

abaixo. Em 100 µg de proteína, foram adicionados 100 µL de uma solução 50 mM de metanol/bicarbonato de amônio (MeOH/NH₄HCO₃)(60:40 v:v) e deixadas sob agitação de 300 rpm, por 5 min a 95 °C. Em seguida, foi adicionado DTT, em uma concentração final de 5 mmol/L e deixadas sob agitação de 300 rpm por 30 min a 37 °C. Então, foi adicionado iodoacetamida (IAA), com uma concentração final de 10 mmol/L e então armazenadas em local sem a presença de luz por 1,5 h. Após isso, foi adicionado 2 µg de tripsina em cada fração e deixadas sob leve agitação a 37 °C por 24 h. A reação foi interrompida com a adição de 56 µL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. As amostras então foram sujeitadas a coluna C18, para a retirada de qualquer interferente que possa conter a amostra.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por um sistema de cromatografia líquida NanoAcquity UPLC, da Waters, acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Maldi Q-ToF Premier, da Waters. A separação cromatográfica ocorreu em coluna C18 (Waters), 75 mm × 250 mm ACQUITY™ 1.7 µm. As fases móveis utilizadas foram a fase A contendo água:ácido fórmico (99,9:0,1 v/v) e fase B contendo ácido fórmico:acetonitrila. Foram injetadas 5 µL de amostras e as corridas foram de 10 minutos. Os espectros foram desconvoluídos, os compostos foram detectados automaticamente e os arquivos *mascot generic format* (MGF) foram criados. Os arquivos MGF foram pesquisados contra o banco de dados Swiss-Prot usando a ferramenta de busca Mascot. Foram fixados os seguintes parâmetros para a busca: *Xylella fastidiosa* para taxonomia, tripsina como enzima (máximo de uma clivagem perdida). Carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável foram definidas. Para ambos, tolerância massa de íons precursores e fragmento não foi mais do que 0,1 Da. A carga de peptídeo monoisotópico foi definida como 2+, 3+ e 4+.

4 Resultados e Discussão

As figuras 1 e 2 apresentam os meios de culturas XDM₂, XDM₄ e XDM₅ contendo a bactéria *X. fastidiosa* após 2 e 10 dias de cultivo.

Figura 1. Cultivo bacteriano de *X fastidiosa* nos meios XDM₂ (a), XDM₄ (b) e XDM₅ (c) após 2 dias de incubação.

Figura 2. Cultivo bacteriano de *X fastidiosa* nos meios XDM₂ (a), XDM₄ (b) e XDM₅ (c) após 10 dias de incubação.

Na Figura 3 foi observado que a fase logarítmica manteve-se até ao 8º dia, seguida da fase estacionária (até 12º dia) e fase de declínio no 14º dia. Observou-se um aumento rápido da população bacteriana após 4 dias e posterior decréscimo após 10 dias de cultivo. Este perfil foi notado para a bactéria cultivada nos meios XDM₄ e XDM₅, sendo no meio XDM₂ esse declínio observado após 8 dias.

Figura 3. Curva de crescimento bacteriano em meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados, com base na absorbância a 600 nm (A_{600}) a 28 °C por 16 dias.

Trabalho publicado por Feil e Pucell, em 2001, mostrou-se um pico populacional de *X. fastidiosa* causadora do mal de Pierce após 6 dias de cultivo bacteriano, o que condiz com nossos experimentos. Esses mesmos autores concluíram que o limite de temperatura para o crescimento está na faixa de 17 – 25 °C e que uma pequena variação entre as temperaturas diurna e noturna aumentou o crescimento quando comparado com variações altas de temperatura. Como no estado de São Paulo encontra-se temperaturas mais elevadas e também uma incidência maior da CVC, é muito provável que a *X. fastidiosa* causadora de CVC se beneficie em temperaturas mais elevadas na planta. Os sintomas da CVC demoram para serem observados após a infecção da bactéria, dessa maneira em temperaturas mais elevadas pode ocorrer uma multiplicação celular no xilema da planta, formando os biofilmes e consequentemente a sua estratégia de sobrevivência. Quando o biofilme entra no estado de maturação a bactéria passa para o estágio de células viável mais não cultivável (VMNC), que são células responsáveis pela manutenção da atividade metabólica porém sendo reduzidas em meios sólidos (DECKER, 2001), que desprende o biofilme das paredes do xilema bloqueando assim o vaso condutor, e por fim, a contribuição dos sintomas da doença CVC.

Uma hipótese sobre a patogenicidade e/ou virulência da *X. fastidiosa* pode ser atribuído a fatores extracelulares. Desta maneira, é de grande importância o estudo proteômico extracelular durante o cultivo de *X. fastidiosa in vitro*, no qual proteínas expressas podem estar associadas a doença CVC.

Nas Figuras 4, 5, 6 e 7 estão presentes os perfis protéicos extracelulares da bactéria estudada nos 3 meios líquidos modificados, durante 2, 4 e 6 dias após a inoculação. A retirada de vermelho de fenol favoreceu a extração de proteínas secretadas e evitou o escurecimento do meio de acordo com o crescimento da bactéria. Os géis foram corados por impregnação por prata e as imagens digitalizadas e tratadas pelo *software* Quantity One® (Bio Rad). Como as proteínas da fração extracelular não apresentaram alta complexidade, a maioria das bandas encontraram-se abaixo da região de 50 kDa resultados esses similares ao observado por Smolka et al., 2003, para *X. fastidiosa* cultivada em meio BCYE.

O perfil eletroforético apresentado das proteínas extracelulares da *X. fastidiosa* quando cultivadas em diferentes meio de cultivo mostrou a presença de bandas proteicas com massa molecular entre 53 a 220 kDa (Figura 4). Nota-se um perfil diferencial de bandas entre os meios e os períodos testados. Entretanto, uma banda específica foi verificada nos meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ após 2 dias de cultivo e XDM₅ após 4 dias. Um fato que deve ser considerado é que a expressão desta proteína é maior nos primeiros dias e diminui significativamente após os 6 dias de cultivo.

Figura 4. Eletroforese unidimensional para análise de proteínas extracelulares de *X. fastidiosa* cultivadas em meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados a 28 °C após 2, 4 e 6 dias de incubação, em duplicata. Extração acetona:etanol (1:1;v:v)

Figura 5. Eletroforese unidimensional para análise de proteínas extracelulares de *X. fastidiosa* cultivadas em meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados a 28 °C após 2, 4 e 6 dias de incubação, em duplicata. Extração acetona:etanol (1:1;v:v)

Figura 6. Eletroforese unidimensional para análise de proteínas extracelulares de *X. fastidiosa* cultivadas em meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados a 28 °C após 2, 4 e 6 dias de incubação, em duplicata (extração acetona/etanol/ac. acético (2 dias, 4 dias, 6 dias)).

Figura 7. Eletroforese unidimensional para análise de proteínas extracelulares de *X. fastidiosa* cultivadas em meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados a 28°C após 2, 4 e 6 dias de incubação, em duplicata (extração acetona/etanol/ac. acético (2 dias, 4 dias, 6 dias)).

A Tabela 3 apresenta-se o número de bandas observadas nos três meios testados. Como observado, o meio XDM₅ foi o que apresentou um maior número de proteínas, com 10 bandas após 2 dias e 15 bandas após 4 dias, Entretanto, os meios XDM₂ e XDM₄ apresentaram um perfil de expressão distinto do XDM₅. Na Tabela 3, também é possível comparar o número de bandas expressas nos diferentes meios de cultivo em relação ao método de extração. Como observado, um total de 64 bandas de proteínas foram identificadas após a extração por acetona/etanol, comparado a 54 bandas obtidas da extração por acetona/etanol/ácido acético. Quando há a presença de aminoácidos no meio, quando comparadas com meio pobre em aminoácidos, as enzimas que estão envolvidas na síntese de alguns aminoácidos se acumulam em uma menor quantidade (TAO et al., 1999 e KHORDUSKY et al., 2000), assim verificado no meio XDM₂ e comparado com o meio XDM₅, apresentando 2 aminoácidos a menos.

Isso explica o porque de algumas vias metabólicas expressas em meio pobre não serem observadas em meios mais complexos.

O SDS é usado apenas quando se quer que as proteínas migrem de acordo com a massa molecular, devido a isso, proteínas menores tendem a migrar mais rapidamente devido a menor retenção no gel. O uso de SDS-PAGE pode ajudar na visualização de proteínas com alta massa molecular que podem não ser resolvidas em 2D-PAGE. É possível observar que a maioria das proteínas detectadas foram de baixa massa molecular. Não houve uma diferença muito grande nas proteínas expressas nos dois métodos de extração, indicando que os dois métodos foram eficientes. Houve uma diferença nos meios XDM₂ após 2 dias de incubação, onde o método envolvendo ácido acético mostrou uma redução das proteínas. Neste mesmo meio após 4 dias de incubação houve um aumento na quantidade de proteína expressada quando envolvendo o método com ácido acético. Para o meio XDM₄ após 2 dias de incubação houve um aumento das proteínas expressadas para o método envolvendo ácido acético. No meio XDM₅ a maior diferença está após 4 dias de incubação, onde o ácido acético pode ter inibido a quantidade de proteína expressada. Estes dois meios podem ser vistos nas Figuras 4 a 7. Na Tabela 3 está descrita a quantidade de bandas detectadas nos géis para os dois métodos de extração.

De acordo com Cordwell et al., 2001, os meios utilizados para o cultivo da *X. fastidiosa* influenciam diretamente no metabolismo da bactéria e consequentemente no perfil protéico, o que explica as diferenças no número de proteínas observadas.

Tabela 3. Número de bandas identificadas para cada método de extração.

Meios de cultura/ dias após inoculação	Número de bandas no gel Extração acetona:etanol (1:1 v:v)	Número de bandas no gel Extração acetona:etanol:ácido acético (1:1:0,1 v:v:v)
XDM₂ / 2 dias	11	5
XDM₄ / 2 dias	4	11
XDM₅ / 2 dias	10	10
XDM₂ / 4 dias	1	5
XDM₄ / 4 dias	7	5
XDM₅ / 4 dias	15	1
XDM₂ / 6 dias	6	7
XDM₄ / 6 dias	6	8
XDM₅ / 6 dias	4	2
TOTAL	64	54

4.1 Extração de proteína total

A extração de proteína total seguiu o protocolo descrito em materiais e métodos. Para análises de proteínas de alta massa molecular foi utilizado gel SDS-PAGE de acrilamida 10% e as proteínas foram coradas por impregnação por prata. Houve uma grande quantidade de proteínas produzidas nesses meios, conforme mostrado na Figura 8

A expressão de proteínas totais da *X. fastidiosa* é mostrada na Figura 8. De acordo com o perfil eletroforético das amostras de *X. f.* cultivada após 2 dias os géis se mostraram idêntico nos diferentes meios testados, variando o peso de 36 a 97 kDa. Entretanto após 4 e 6 dias, observa-se que várias bandas estão presentes nestes intervalos de tempo e em concentrações mais abundantes que o intervalo de 2 dias.

Posteriormente, as proteínas totais foram submetidas a focalização isoeletrica em OFFGEL, permitindo assim uma maior resolução das proteínas. Neste caso, proteínas totais de *X. f.* após 4 dias de cultivo nos diferentes meios testados foram analisadas por OFFGEL. Observa-se que nos três meios de cultivo houve uma expressão abundante e diferenciada em todas as frações compreendidas entre os valores de pH de 3 a 10.

De acordo com a Figura 8, a extração de proteínas totais para os meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados a 28 °C após 2 dias apresentaram o mesmo perfil, evidenciando que, com apenas 2 dias de incubação, o perfil proteico pode ser considerado similares, mesmo utilizando meios contendo reagentes diferentes. Após 4 e 6 dias, esse mesmo perfil não foi observado, ou seja, a *X. fastidiosa* cresce igualmente até o segundo dia, porém no quarto dia o comportamento muda, e ela passa a se adaptar às condições diferentes dos meios. A Tabela 4 mostra a quantificação das proteínas extracelulares pelo método de Bradford com a extração acetona:etanol (1:1 v:v) e extração acetona/etanol/ac. acético (1:1:0,1 v:v:v), para os meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ com 2, 4 e 6 dias de crescimento. Nota-se que a concentração de proteínas para a extração acetona:etanol:ácido acético foi maior, o que pode ser atribuído à pequena proporção de ácido acético, que deve ter influenciado na extração de proteína. A Tabela 5 mostra a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford para os meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ com 2, 4 e 6 dias de crescimento.

Figura 8. Eletroforese unidimensional para análise de extração de proteína total de *X. fastidiosa* após 2, 4 e 6 dias de incubação.

Tabela 4. Quantificação das proteínas extracelulares pelo método de Bradford. Extração acetona:etanol (1:1 v:v) e extração acetona/etanol/ac. acético (1:1:0,1 v:v:v)

Código da amostra	Conc. (µg/µL) ac:et	Conc. (µg/µL) ac:et:ac. acético
XDM ₂ -2d1	0,24	-
XDM ₂ -2d2	0,26	-
XDM ₄ -2d3	0,14	1,6
XDM ₄ -2d4	0,28	1,6
XDM ₅ -2d5	0,15	1,8
XDM ₅ -2d6	0,51	2,0
XDM ₂ -4d1	0,65	2,5
XDM ₄ -4d2	0,49	2,3
XDM ₄ -4d3	0,34	2,5
XDM ₅ -4d4	0,59	2,4
XDM ₅ -4d5	0,33	2,3
XDM ₂ -6d1	1,0	2,3
XDM ₂ -6d2	0,8	3,2
XDM ₄ -6d3	1,8	3,3
XDM ₄ -6d4	2,7	4,3
XDM ₅ -6d5	0,9	2,8
XDM ₅ -6d6	2,0	2,6

A extração de proteínas totais de *X. fastidiosa* foi realizada para o meio BCYE modificado e o gel de eletroforese bidimensional é mostrado na Figura 9. É possível observar que não houve uma grande quantidade de proteína expressas e ou quantitativamente extraída. A maioria encontrada se situa na região com baixa massa molecular, sendo algumas com pesos maiores. Geralmente a focalização isoeletrica é usada na primeira dimensão do 2DGE, para separar as proteínas de acordo com seu pI. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é usado na segunda dimensão para separar as proteínas de acordo com sua massa molecular (kDa). A detecção é feita comumente com coloração com prata ou então Comassie Blue. 2DGE é frequentemente utilizado nas análises de expressão proteica de um organismo ou de um tecido. 2DGE é utilizado frequentemente em combinação com a espectrometria de massas na identificação de proteínas em amostras complexas, porém 2DGE é uma técnica que demanda longo tempo de preparação e análise e treinamento extensivo.

Tabela 5. Quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford.

Amostras (Pellet)	Concentração (µg/µL)
XDM₂-2d	1,8
XDM₄-2d	1,5
XDM₅-2d	1,3
XDM₂-4d	3,5
XDM₄-4d	0,4
XDM₅-4d	1,6
XDM₂-6d	0,1
XDM₄-6d	4,9
XDM₅-6d	0,4

Figura 9. Eletroforese bidimensional para análise de extração de proteína total de *X. fastidiosa* após 6 dias de incubação para o meio BCYE modificado.

4.2 Análise proteômica utilizando OFFGEL

Eletroforese em gel bidimensional (2DGE) é um método de análise padrão de proteínas e que não tem sido modificado significativamente com o passar dos anos. No entanto, o grande crescimento dos estudos proteômicos necessitam de métodos e técnicas modernas e mais reprodutíveis. O uso de eletroforese em gel 2D requer uma quantidade de tempo grande, se comparada com o uso do OFFGEL. O OFFGEL é uma alternativa mais rápida e simples de analisar proteínas. A necessidade de um instrumento de fácil manipulação e que possuisse robustez, permitindo um fracionamento reprodutível de uma mistura complexa de proteínas em alta resolução e permitindo também detecção com alta sensibilidade foi suprida com o OFFGEL, utilizando o equipamento Agilent 3100 (Figura 10). Em contraste com a focalização isoeletrica convencional, o OFFGEL permite a utilização de amostras em fases líquidas. Este novo equipamento tem a vantagem de que não há a necessidade de recuperar amostras de dentro de um gel (MICHEL et al., 2003; HÖRTH et al., 2006). A eletroforese OFFGEL separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI).

Figura 10. Equipamento OFFGEL Agilent 3100.

O OFFGEL promove um fluxo nos canais pelo gel IPG. Quando um campo elétrico é aplicado ao longo do gradiente de pH imobilizado, algumas linhas de corrente entram no fluxo do canal e induz a migração das espécies carregadas por eletroforese. As proteínas de camada fina de solução próximas ao gel são carregadas de acordo com seu ponto isoelétrico e de acordo com o pH imposto pela capacidade de tamponamento do gel. O campo elétrico, portanto, separa as proteínas como se elas estivessem no gel. As proteínas com cargas positivas migram para o cátodo e penetram no gel seguindo as linhas de corrente, enquanto que as proteínas com cargas negativas migram para o ânodo. É certo que outros íons também migram com o campo elétrico. Espécies neutras não são afetadas pelo campo elétrico, e permanecem em solução, entre elas as proteínas com um pI igual ao pH imposto pelo gel IPG sobre o fluxo da solução.

As 12 frações de OFFGEL correspondentes ao pH 3-10 foram separadas de acordo com a sua massa molecular (kDa) na segunda dimensão por SDS-PAGE, ilustrado nas Figuras 11, 12, 13 e 14. A Figura 11 ilustra a separação das proteínas totais para o meio XDM₂ após 2 dias de incubação. A Figura 12 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₄ após 2 dias de incubação, a Figura 13 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₅ após 2 dias de incubação.

Figura 11. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₂ após 2 dias de incubação.

Figura 12. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₄ após 2 dias de incubação.

Figura 13. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₅ após 2 dias de incubação.

A Figura 14 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₂ após 4 dias de incubação. A Figura 15 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₄ após 4 dias de incubação. A Figura 16 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₅ após 4 dias de incubação.

Figura 14. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₂ após 4 dias de incubação.

Figura 15. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₄ após 4 dias de incubação.

Figura 16. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₅ após 4 dias de incubação.

A Figura 17 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₂ após 6 dias de incubação. A Figura 18 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₄ após 6 dias de incubação. A Figura 19 ilustra o fracionamento das proteínas totais para o meio XDM₅ após 6 dias de incubação.

Figura 17. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₂ após 6 dias de incubação.

Figura 18. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₄ após 6 dias de incubação.

Figura 19. Fracionamento de proteínas totais de *X. fastidiosa* em 12 frações (pH 3-10), meio XDM₅ após 6 dias de incubação.

As Tabelas 6, 7 e 8 mostram o número de bandas encontradas nas proteínas totais dos meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ das frações de OFFGEL após 2, 4 e 6 dias de incubação, analisadas pelo *software* Quantity One® (Bio Rad). Pela Tabela 6 podemos observar que a maior diferença da quantidade de bandas estão nas canaletas 1, 4 e 5, dos meios estudados. O meio XDM₅ apresentou nessas faixas de pH uma quantidade maior de bandas detectadas. Neste mesmo meio XDM₅, as canaletas 1, 3,

4, 5, 6 e 7 apresentaram uma quantidade maior de bandas detectadas, em comparação com os outros 2 meios. Também podemos observar que os meios XDM₂ e XDM₄ apresentam uma quantidade de bandas detectadas bastante similares, evidenciando que a bactéria apresenta um comportamento bem parecido para esses 2 meios. Já o meio XDM₅ apresenta semelhança em apenas algumas das canaletas.

Tabela 6. Número de bandas detectadas das proteínas totais para os meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ após 2 dias de incubação.

Canaleta / Faixa de pH	XDM₂ - 2d	XDM₄-2d	XDM₅-2d
1 / 3,0-3,6	3	3	8
2 / 3,6-4,2	1	2	2
3 / 4,2-4,8	3	2	6
4 / 4,8-5,4	3	1	8
5 / 5,4-6,0	4	3	9
6 / 6,0-6,6	6	3	7
7 / 6,6-7,2	4	2	7
8 / 7,2-7,8	4	3	2
9 / 7,8-8,4	5	6	3
10 / 8,4-9,0	5	6	2
11 / 9,0-9,6	8	7	1
12 / 9,6-10,2	4	2	3
Total	50	40	58

Pela Tabela 7 podemos observar que os meio XDM₄ não apresentou bandas detectadas na faixa de pH corresponde a 3 até 7,2 nesse meio após 4 dias de extração, uma justificativa é que a concentração de proteínas podem estar muito baixas não sendo detectadas por prata. Após 4 dias de incubação houve uma diferença significativa de bandas detectadas para esses 3 meios, não apresentando assim um comportamento similar aos demais, o que pode ser atribuído ao fato de que após 4 dias

de incubação a bactéria mostra estratégias de sobrevivência diferentes quando em meios diferentes.

Tabela 7. Número de bandas detectadas das proteínas totais para os meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ após 4 dias de incubação.

Canaleta / Faixa de pH	XDM₂ - 4d	XDM₄-4d	XDM₅-4d
1 / 3,0-3,6	8	-	8
2 / 3,6-4,2	10	-	6
3 / 4,2-4,8	7	-	15
4 / 4,8-5,4	9	-	7
5 / 5,4-6,0	2	-	15
6 / 6,0-6,6	7	-	9
7 / 6,6-7,2	5	-	12
8 / 7,2-7,8	5	14	12
9 / 7,8-8,4	12	12	10
10 / 8,4-9,0	15	14	16
11 / 9,0-9,6	10	18	18
12 / 9,6-10,2	6	14	18
Total	96	72	146

Pela Tabela 8 podemos observar uma quantidade maior de bandas detectadas para os meios estudados. Isso quer dizer que após 6 dias a bactéria libera para o meio uma quantidade e uma variedade de proteínas para o meio maior. É observado também que não houve grande semelhança nas bandas detectadas, porém nas canaletas 10, 11 e 12, onde a faixa de pH está entre 8,4 a 10 houve uma grande diferença nas bandas detectadas (no padrão de separação). O meio XDM₄ apresentou uma quantidade de bandas bem superior, se comparada com os outros 2 meios estudados, evidenciando assim que a bactéria possui um comportamento bem distinto para meios diferentes.

Tabela 8. Número de bandas detectadas das proteínas totais para os meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ após 6 dias de incubação.

Canaleta / Faixa de pH	XDM₂ - 6d	XDM₄-6d	XDM₅-6d
1 / 3,0-3,6	11	5	-
2 / 3,6-4,2	15	11	13
3 / 4,2-4,8	13	12	8
4 / 4,8-5,4	13	7	13
5 / 5,4-6,0	8	11	-
6 / 6,0-6,6	13	6	14
7 / 6,6-7,2	14	11	11
8 / 7,2-7,8	5	10	8
9 / 7,8-8,4	19	19	7
10 / 8,4-9,0	2	28	3
11 / 9,0-9,6	11	27	3
12 / 9,6-10,2	9	17	6
Total	133	164	86

4.3 Análise de Dados de LC-MS

Na Tabela 9 encontram-se as proteínas identificadas por eletroforese em fracionador OFFGEL após 2, 4 e 6 dias de cultivo nos meios XDM estudados.

Tabela 9. Lista das proteínas da bactéria *X. fastidiosa* identificadas após eletroforese em OFFGEL.

Nome de entrada (UniProtKB)/ (amostra)	Proteína	MM	N de peptídeos encontrados	Condições de cultivo
Q9PAD2_XYLFA	<i>Outer membrane export factor</i>	49522	20	XDM ₂ -2d
Q9PAD2_XYLFA	<i>Outer membrane export factor</i>	49522	1	XDM ₄ -2d
Q9PD52_XYLFA	<i>Type I secretion outer membrane protein, TolC</i>	49464	3	XDM ₄ -2d
Q9PFF4_XYLFA	<i>Phage related protein</i>	94524	2	XDM ₂ -4d
Q9PGQ4_XYLFA	<i>Membrane fusion protein</i>	39375	1	XDM ₄ -4d
Q9PH65_XYLFA	<i>Outer membrane usher protein precursor</i>	98445	3	XDM ₅ -4d
Q9PC19_XYLFA	<i>Hypothetical protein</i>	93547	2	XDM ₅ -4d
ATPB_XYLFA	<i>ATP synthase, beta chain</i>	50747	2	XDM ₄ -6d
DSBB_XYLFA	<i>Disulfide oxidase</i>	21406	3	XDM ₅ -6d
Q9PGQ4_XYLFA	<i>Membrane fusion protein</i>	39375	1	XDM ₅ -6d
Q9PDJ7_XYLFA	<i>Conserved hypothetical protein</i>	22551	1	XDM ₅ -6d
Q87ES7	<i>6-phosphofructokinase</i>	46763	1	XDM ₅ -4d

Os genes diferencialmente expressos nos meios estudados estão descritos na Tabela 10. As 11 proteínas identificadas foram distribuídas em diferentes categorias como: componente de membrana, estruturas de superfície, metabolismo de energia, proteínas hipotéticas e conservada, relacionadas ao fago, transporte e toxinas.

Gene relacionado com as proteínas hipotéticas não apresentou homologia com seqüências depositadas no banco de dados. Gene relacionado com transporte refere-se ao transporte de ânions, cátions, carboidratos, peptídeos, proteínas e de

substâncias que são relacionadas com as vias de secreção (TRAVERNSOLO et al, 2009b).

A proteína TolC, codificada pelo gene *tolC*, é essencial na secreção do tipo-I de uma variedade de enzimas degradativas e também da virulência, algumas das quais são antibióticos e outras estão envolvidas na patogenicidade de animais e também em plantas. Em uvas atacadas pela *X. fastidiosa*, o gene *tolC* apresentou ser uma vantagem seletiva, e provavelmente ser um meio de sobrevivência essencial da bactéria no xilema de plantas de uvas (REDDY et al, 2007; CHATTERJEE et al, 2008b). Estudo da expressão dos padrões de genes do cluster *rpf*, e genes de virulência, como por exemplo o gene *tolC*, e os que codificam a enzima poligalacturonase e adesinas indicaram que a regulação do gene pode ocorrer por dois diferentes meios que envolve a formação de DSFs na bactéria estudada (CHATTERJEE et al, 2008b).

Foi identificada a proteína 6-fosfofrutoquinase, relacionado com a via glicolítica (metabolismo de energia). Também foi observada a expressão da ATP sintase. Desta maneira, é possível afirmar que esta via glicolítica está ativa e portanto, a glicose é degradada à piruvato, isto é demonstrado na via metabólica denominada via de Entner-Doudoroff. (TRAVERNSOLO, 2004).

Foi expresso gene que codifica proteínas relacionadas com fímbria, a qual foi detectada a fimD que consiste de proteínas que estão envolvidas na biogênese fimbrial (SMOLKA et al 2003).

As proteínas que envolvem as toxinas podem ser secretadas e estar envolvidas nos sintomas da doença. Algumas proteínas podem estar localizadas na membrana como é o caso das proteínas hipotéticas, e também estar envolvidas na adesão da bactéria à planta, assim proteínas que não apresentam homologia com o banco de dados são classificadas como proteínas hipotéticas. Os fatores de virulência detectados em bactérias patógenas são frequentemente classificados como toxinas. Como o nome da bactéria já diz, o seu crescimento é fastidioso, ou seja, lento, e necessita assim, de nutrientes especiais, desta maneira, a falta de um sistema

otimizado para a utilização do tRNA, provavelmente, pode ser a causa do lento crescimento da bactéria devido a produção lenta de proteínas (SMOLKA et al, 2003).

Não foi possível correlacionar as outras amostras do OFFGEL com proteínas encontradas no banco de dados. Uma vez que pode ter ocorrido uma pequena quantidade de proteína a qual não foi possível que a enzima tripsina digerisse. Porém, podemos concluir que as proteínas encontradas condizem com *X. fastidiosa*.

Tabela 10. Genes diferencialmente expressos da *X. fastidiosa* cultivada nos meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅.

CATEGORIA	GENE	ORF	DESCRIÇÃO
Toxina	<i>TolC</i>	XF2586	Outer membrane export factor
Transporte	<i>TolC</i>	XF1527	Outer membrane export factor
	<i>TolC</i>	XfasaDRAFT_1599	Type I secretion outer membrane protein
Phage-related	None	XF0705	Phage related protein
Toxina	<i>mexC</i>	XF0244	Membrane protein fusion
Estruturas de superfície	<i>fimD</i>	XF0081	Outer membrane usher protein precursor
Proteínas hipotéticas	None	XF1966	Hypothetical protein
Metabolismo de energia	<i>atpD</i>	XF1143	ATP synthase, beta chain
Proteínas hipotéticas conservadas	SLR1894	XF1382	Conserved hypothetical protein
Metabolismo de energia	<i>pfkA</i>	XF0274	6-phosphofructokinase
Componente da membrana	<i>dsbB</i>	XF0340	Disulfide oxidoreductase

5. Conclusão

O estudo de proteínas extracelulares e totais nos meios XDM₂, XDM₄ e XDM₅ modificados foram realizados pela primeira vez sendo o uso de SDS-PAGE muito relevante para a detecção de proteínas que podem não ser detectadas por 2-DE,

especialmente proteínas envolvendo alta massa molecular. O método de extração contendo apenas acetona/etanol apresentou uma maior quantidade de proteínas extraídas e detectadas no gel. O meio XDM₅ foi o que se mostrou mais promissor para o crescimento da bactéria. A enorme quantidade de informação genética é muito importante para a explicação de como a bactéria coloniza o hospedeiro com diferentes meios de tecidos estruturais de organização. A utilização das análises por OFFGEL provaram ter uma boa resolução e também pode reduzir a complexidade das amostras, sendo possível a detecção de pequenas diferenças da proteína por OFFGEL. Pelas análises de OFFGEL notou-se que houve uma maior quantidade de proteínas com o passar do tempo, porém para o meio XDM₅ ao passar de 4 dias houve uma diminuição da quantidade de proteínas.

Capítulo 2

ANÁLISES DE SINAIS PUTATIVOS DSFs DA *Xylella fastitiosa* POR ELETROFORESE CAPILAR E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Quorum sensing

Bactérias podem sintetizar uma variedade pequena de moléculas sinalizadoras que regulam a densidade celular, processo chamado de *quorum-sensing* (QS). *X. fastidiosa* abriga um sistema de sinalização celular que requer um conjunto de fatores de genes de regulação de patogenicidade (genes *rpf*), que é altamente homólogo aos observado em *X.c.c.* (CHATTERJEE et al., 2008a).

Quorum-sensing tem se mostrado como um importante papel na regulação de virulência nos patógenos tanto Gram-negativos quanto Gram-positivos. QS foi sugerido como um importante alvo para o desenvolvimento de agentes para tratamento ou para prevenção de infecções bacterianas (SIFRI, 2008).

Vários tipos de mecanismos de QS são conhecidos por desenvolver regulação na formação de biofilmes. A caracterização dos mecanismos associados com a formação de biofilmes mostra ser promissor no controle e prevenção de infecções e contaminações bacterianas (TAO et al., 2010).

A síntese de DSF é feita por RpfB e RpfE, sua percepção e tradução do sinal é mediada pelo RpfC/RpfG, que é codificado pelo operon *rpfGHC*. Mutações em *rpfC*, conduz uma produção acima do normal de DSF e uma diminuição de enzimas extracelulares e um polissacarídeo extracelular (EPS). As condições de crescimento são conhecidas por influenciar os aspectos do comportamento bacteriano, o qual inclui a formação de biofilmes (TORRES et al., 2007).

Ao contrário do sistema de comunicação celular ser bem conhecido, a molécula sinalizadora de *X. fastidiosa* é referente como sendo um DSF, e é um ou mais ácidos graxos baseados na similaridade dos sinais produzidos por *X.c.c.* (ALMEIDA et al., 2012). O meio PW (periwinkle wilt) é o meio mais utilizado para crescimento de *X. fastidiosa*, encurtando o tempo de incubação (SILVA, 2004).

Foi notificado que alguns organismos podem produzir moléculas múltiplas de DSF, como observado em *X. oryzae* pv. *oryzae*, que produz 3 sinais de DSFs (GUO et al., 2011).

3. Materiais e métodos

A bactéria *X. fastidiosa* 9a5c foi cultivada em meio de cultura BCYE modificado (Tabela 1), todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As células bacterianas foram retiradas de meio agarizado e transferidas para tubos contendo 5 mL de meio líquidos modificados e incubadas por 3 dias. Alíquotas foram retiradas desses meios, utilizados como inóculo e transferidas para tubos contendo 200 mL de meio BCYE e incubados por 2, 4 e 6 dias a 28 °C sob agitação orbital de 150 rpm.

Tabela 1. Componentes do meio de cultura BCYE.

Componentes	BCYE
Tampão Aces	10 g/L
KOH	40 mL/L
Extrato de levedura	10 g/L
Ágar*	17 g/L
L-Cisteína	0,4 g/L
Carvão ativado*	2 g/L
Pirofosfato férrico (0,125 g/L)	0,25 g/L

* uso em meio sólido

A extração de DSF foi realizada segundo Barber et al. (1997). Vinte e cinco mililitros do sobrenadante das culturas de *X. fastidiosa* em meio BCYE dos diferentes dias de coleta foram adicionados a 0,3 volumes de acetato de etila previamente equilibrado com 0,5 mol L⁻¹ de carbonato de sódio anidro. A extração foi realizada à temperatura ambiente sob agitação por um período de 50 min. Os extratos foram evaporados e ressuspensos em 200 µL água autoclavada. Essas amostras foram analisadas por eletroforese capilar. Um meio de cultura foi extraído e usado como controle. Foi utilizado um equipamento P/ACE System MDQ da Beckman MDQ (Figura 1). As condições de análise foram:

- Capilar de sílica 75 µm, 60 cm de comprimento total, 50 cm comprimento efetivo.
- Tampão fosfato de sódio monobásico 20 mmol L⁻¹, pH 4.
- Pressão de injeção a 0,3 psi por 4 segundos.
- voltagem constante de 15 kV.
- temperatura de 20 °C.
- Detecção à 210, 250 e 280 nm.

Figura 1. Equipamento P/ACE System MDQ da Beckman MDQ.

Outra extração do meio BCYE modificado foi realizada, partindo de 0,3 volumes de acetato de etila previamente equilibrado com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de carbonato de sódio anidro, a extração foi realizada à temperatura ambiente sob agitação por um período de 50 min. Esses extratos foram analisados por espectrometria de massas. Os extratos foram evaporados e ressuspensos em $500 \text{ }\mu\text{L}$ de metanol grau espectrometria para injeção direta em espectrômetro de massas. O espectrometro foi um LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) operando com vazão de infusão de $5 \text{ }\mu\text{L/ min}$. Os reagentes utilizados para análises de massas foram todos de grau espectrometria.

4. Resultados e Discussão

De acordo com Mariño e Bedmar, 2001, o nível de moléculas sinalizadoras de quorum produzidas sofrem influência do estágio de crescimento bacteriano e também da composição do meio de cultivo. Alguns autores utilizaram meios mínimos para a produção de moléculas sinalizadoras para percepção de quorum em bactérias, sendo a extração no final da fase exponencial de crescimento ou no início da fase estacionária (CHA et al., 1998; SHAW et al., 1997; PEARSON et al., 1994). Eberhard, em 1972, verificou a presença de um inibidor da sinalização celular em *V. fischeri* em meio

complexo, sugerindo que somente ocorre o fenômeno de autoindução em meio mínimo.

Desta maneira, houve um estudo envolvendo o meio BCYE modificado, que não é um meio pobre, pois há a presença de aminoácidos e sais, suficientes para o crescimento de *X. fastidiosa*. De acordo com os resultados obtidos, houve a presença de diversas moléculas produzidas pela bactéria, porém suas concentrações foram baixas. Há a necessidade de um equipamento extremamente sensível para a visualização desses sinais.

A Figura 2 ilustra um dos espectros de massas obtidos da extração para a visualização dos possíveis sinais de DSFs.

Figura 2. Espectro de massas dos possíveis sinais de DSF da bactéria *X. fastidiosa* para o meio BCYE após 4 dias de incubação. (Espectrômetro: LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany))

A Tabela 2 apresenta as fórmulas dos possíveis sinais de DSFs produzidas pela *X. fastidiosa* no meio de cultivo BCYE após 2, 4 e 6 dias de incubação. A presença de sódio (Na) das possíveis moléculas sinalizadoras é devido a presença deste componente ao meio de cultivo, presente no tampão aces. As possíveis moléculas de

DSFs detectáveis encontram-se em concentrações baixas, dando destaque para a molécula encontrada em 6 dias, que se assemelha a mesma molécula de DSF produzida pela bactéria *X.c.c.*, porém o nível de concentração dessa molécula é baixo. Isso pode demonstrar a proximidade genética da *X. fastidiosa* e *X.c.c.*

Tabela 2. Medidas de massas para os sinais de metabólitos em 2, 4 e 6 dias de incubação no meio BCYE

Íon / [M + Na] ⁺	Fórmula	Massa medida (m/z)	Erro (ppm)
6 dias	C₁₃H₂₄O₂	235,17	4,78
6 dias	C ₂₅ O ₁₀ Na	689,84	-6,87
4 dias	C ₁₀ H ₁₉ O ₆	235,12	6,36
4 dias	C ₅ H ₁₁ ONa	110,07	6,27
4 dias	C ₇ H ₁₁ O ₃ Na	166,06	5,90
4 dias	C ₉ H ₁₉ O ₅	207,12	6,32
4 dias	C ₄ H ₉ O ₂	89,06	-5,71
4 dias	C ₆ H ₁₁ O ₂ Na	138,07	6,08
4 dias	C ₂₃ H ₁₅ Na ₂	337,10	-1,87
2 dias	C ₃ H ₈ O ₃ Na	115,04	-6,94
2 dias	C ₄ H ₁₀ O ₃ Na	129,05	-5,90
2 dias	C ₈ H ₁₆ O ₂ Na	167,10	-4,85
2 dias	C ₉ H ₂₀ O ₂ Na	183,14	-4,53
2 dias	C ₁₀ H ₁₇ O ₅	217,11	-3,91
2 dias	C ₁₀ H ₁₆ O ₅ Na	239,09	-4,17
2 dias	C ₁₁ H ₂₀ O ₆ Na	271,11	-3,28
2 dias	C ₂₉ H ₂₇ O ₅	455,19	5,04
2 dias	C ₁₇ H ₂₆ Na ₅	345,15	-1,99

Na Tabela 2 é possível observar que há a presença maior de metabólitos após 2 dias de extração, isso pode ocorrer devido a adaptação da bactéria ao meio. Essas

moléculas sinalizadoras diminuem com o tempo, como pode-se observar após 6 dias de experimento, apresentado no gráfico da Figura 3. Foi após 6 dias que houve a presença bem pequena do mesmo metabólito presente na bactéria *X.c.c*. É possível observar que não houve nenhum metabólito que se repetiu, o que permite inferir que a bactéria usa uma estratégia de sobrevivência que varia com os dias, pois DSF é produzido e detectados pelos componentes da regulação dos fatores de patogenicidade (ALMEIDA, et al., 2012). Contudo, a presença desses metabólitos foram de concentração muito baixa. Pode ocorrer que com o passar dos dias a bactéria se adapte melhor ao meio de cultura e produza apenas os metabólitos específicos para sua comunicação. Segundo GUO et al., 2011, algumas bactéria produzem mais de um DSF, sendo assim, é provável que *X. fastidiosa* produza mais de um DSF, além do já detectado por Simionato e colaboradores em 2007.

Figura 3. Gráfico ilustrando a quantidade de metabólitos produzidos por *X. fastidiosa* após 2, 4 e 6 dias.

A Figura 4 ilustra o eletroferograma da extração de DSF em meio BCYE em diferentes dias de coleta, 2, 4 e 6 dias. A Figura ilustra que os DSFs têm possivelmente um tempo de migração entre 30-40 min. A concentração de amostra para 6 dias de incubação é 4 vezes maior comparada com 2 e 4 dias de incubação. A corrida tem um longo tempo de duração, mas é possível otimizar o tempo utilizando um capilar com comprimento pela metade ou então aumentar a voltagem. O comprimento de onda utilizado foi de 210 nm. Como há a presença de vários sinais em baixas concentrações,

pela Figura 4, é observado que o sinal de possível DSF é um somatório de todas as moléculas, e que possuem cargas parecidas. Para essas análises foram utilizados três comprimentos de onda, sendo 210 nm o melhor comprimento de onda para a detecção. Os outros comprimentos de onda apresentaram uma absorbância menor que a 210 nm. O tempo de imigração se desloca após 6 dias pois pode ocorrer presenças de moléculas com pesos moleculares maiores comparadas com 2 e 4 dias, deslocando para maiores tempos de migração, algumas moléculas são mostradas na Tabela 1.

Figura 4. Eletroferograma de extração de DSF em meio BCYE modificado. Condições: equipamento P/ACE System MDQ da Beckman MDQ. Capilar de sílica 75 µm, 60 cm de comprimento total, 50 cm comprimento efetivo. Tampão fosfato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 4. A 0,3 psi por 4 segundos, 15 kV e 20 °C. Detecção à 210 nm.

Posteriormente, as amostras foram injetadas em um espectrômetro de massas, mostradas na Tabela 1, onde foi possível observar que uma das moléculas encontradas foi a mesma molécula sinalizadora de *X.c.c.* que é o ácido cis-11-metil-2-dodecanóico, encontrada após 6 dias de incubação, $C_{13}H_{24}O_2$. De acordo com Almeida et al., 2012, testes revelaram que o mutante *rpfB* de *X. fastidiosa* não difere para a indução de DSF em *X.c.c.* e que indução de biosensor de *X.c.c.* pelo extrato do mutante *rpfB* de *X. fastidiosa* indica que é possível ser capaz de produzir ácidos graxos

de *X.c.c.* Porém, a concentração observada é extremamente baixa, sendo possível um erro ao gerar essa molécula no banco de dados do computador.

5. Conclusão

Os sinais de DSFs de *X. fastidiosa* encontrados no meio BCYE apresentaram uma concentração baixa, uma razão deste acontecimento pode ter sido o meio utilizado. Estas moléculas sofrem influência do estágio de crescimento bacteriano e também da composição do meio de cultivo, uma vez que o meio BCYE é um meio mais complexo que o meio utilizado nos testes por Simionato. Também foi encontrada uma molécula de DSF idêntica a molécula produzida pela *X.c.c.* Desta maneira, é possível que a *X. fastidiosa* possa produzir diferentes DSFs quando cultivadas em meios de cultivos diferentes. Também é possível notar que há uma maior quantidade de metabólitos produzidos com 2 dias de incubação.

Capítulo 3

*ESPECIFICIDADE CATALÍTICA DE HIDROXINITRILA
LIASE DE Xylella fastidiosa*

Subcapítulo 3.1

Síntese de ($\pm$)-mandelonitrila catalisada por hidroxinitrila liase recombinante proveniente da bactéria *Xylella fastidiosa* e sua seletividade pelo substrato

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Acetona cianoidrina é um composto orgânico com um grupo CN, a presença deste grupo faz com que seja uma substância perigosa, porque em contato com água ela se decompõe em acetona e cianeto de hidrogênio, que é extremamente perigoso. Acetona cianoidrina (Sigma-Aldrich), grau analítico, foi destilado previamente a vácuo e sob atmosfera de nitrogênio (2% do volume destilado contém ácido fosfórico para evitar decomposição em acetona e cianeto de hidrogênio).

Benzaldeído é um composto orgânico formado por um anel benzênico e um grupo aldeído. É encontrado em amêndoas e usado como flavorizante artificial em alimentos. Esse composto, de grau analítico (Sigma-Aldrich), foi previamente destilado a vácuo e sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, benzaldeído foi analisado por HPLC quiral (coluna Chiralcel OB-H - Daicel, 4,5 μm x 250 mm) a 40 °C utilizando um sistema Waters (Sistema Waters: detector Waters 486 UV, bomba: Waters 515 e Waters 717 + injetor). As análises utilizaram heptano/isopropanol (9:1) com 1 mL de ácido trifluoracético filtrado como fase móvel a 1 mL min⁻¹.

Mandelonitrila é um composto orgânico, racêmico, e incluído na classe das cianoidrinas. Em grau analítico esse composto contém traços de benzaldeído. Mandelonitrila racêmica (Sigma-Aldrich) foi purificada em uma coluna cromatográfica (éter de petróleo PE/EtOAc 9:1 à 3:7) e estocada a 4 °C por 1 ou 2 semanas. Após purificação, foi injetado em HPLC quiral (coluna Chiralcel OB-H - Daicel, 4,5 μm x 250 mm) à 40 °C utilizando um sistema Waters (Sistema Waters: detector Waters 486 UV, bomba: Waters 515 e Waters 717 + injetor), sendo as condições de análise as mesmas do benzaldeído.

Os reagentes utilizados, éter de petróleo, acetato de etila, triisopropilbenzeno, tert-butil metil éter (MTBE) foram de grau p.a. Os reagentes para o teste de atividade fosfato de sódio, fosfato de potássio, cloreto de sódio e ácido cítrico também foram de grau p.a, enquanto que os solventes heptano, isopropanol, ácido trifluoracético foram de grau HPLC.

3.2. Enzima

A enzima HNL de *X. fastidiosa* é a única HNL proveniente de bactéria até então estudada (DADASHIPOUR e ASANO, 2011). A HNL de *X. fastidiosa* foi expressada heterologicamente. Como primeiro processo da etapa de expressão (pré-inóculo), os clones positivos foram repicados em tubos estéreis para cultivo de bactérias contendo meio LB (Luria Bertani) e 50 mg mL⁻¹ de kanamicina. Os tubos foram incubados a 37 °C, por 12 h, 250 rpm até uma OD_{600 nm} entre 1 e 2. Como segundo processo (inóculo) uma alíquota da cultura pré-inóculo foi adicionada a um novo tubo estéril contendo 500 mL de meio LB suplementado com kanamicina e incubada em estufa até uma OD_{600 nm} de aproximadamente 0,6.

Colônias transformantes da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) cultivadas em meio LB contendo kanamicina (50 mg mL⁻¹) e crescidas até uma OD_{600 nm} de aproximadamente 0,6 foram induzidas com a adição de 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG e mantidas por 4 h a 37 °C com agitação. Após esse período, retirou-se uma segunda alíquota para análise por SDS-PAGE. Passadas 4 h de indução, a suspensão restante de bactérias foi centrifugada a 7000 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante estocado a -20 °C até a etapa de purificação. Os extratos proteicos brutos (totais) que possuíam uma banda de expressão adicional após a indução (pela análise em SDS-PAGE) foram avaliados quanto à solubilidade da proteína recombinante. Para tanto, células provenientes dos 500 mL de cultura foram ressuspendidas em 10 mL de solução tampão (25 mmol L⁻¹ Tris - HCl, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 5% glicerol, pH 8,0). Após 30 min de incubação em gelo, foram lisadas por ultrassom usando um aparelho sonicador (Thornton) por 30 s num total de 7 vezes. Após a etapa de lise celular, a amostra foi centrifugada por 20 min a 16000 x g a 4 °C. Uma alíquota das frações solúvel e insolúvel foi retirada análise por SDS-PAGE.

3.2.1 Purificação da Proteína HNL por Cromatografia de Troca Iônica com Resina de Níquel:

Para purificar as proteínas de interesse, que foram expressas com a presença de uma cauda de histidina (6x His) oriunda do vetor de expressão pET28a (Novagen), foi utilizado uma solução tampão de ligação (25 mmol L^{-1} Tris - HCl, 20 mmol L^{-1} NaCl, 5% glicerol, pH 8,0) pela coluna para equilibrá-la. Em seguida o extrato bacteriano foi adicionado à coluna cuja matriz é a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) e mantido por 30 min sob agitação 160 rpm. A cauda de histidina da proteína foi ligada ao Ni^{+2} (ligante) que faz parte da matriz. A eluição das proteínas foi realizada utilizando o tampão de ligação com gradiente de concentração de imidazol (5 mmol L^{-1}). O eluído foi recolhido e para a retirada do imidazol foi realizada diálises (12 h em 500 mL de tampão sem imidazol, repetido por 3 vezes). Na sequência, a HNL foi concentrada utilizando concentradores centriprep em uma rotação de 4000 rpm por 20 min.

Na etapa de purificação da proteína, que contém cauda de histidina, foi utilizado o método por afinidade em metal, em coluna de níquel. A coluna foi equilibrada com solução tampão 6 mL da amostra contendo 5 mL de imidazol. A amostra foi colocada na coluna e incubada por 30 min com agitação a 4°C . O eluído puro recolhido foi lavado com tampão de equilíbrio nas concentrações de 5, 40, 100 e por último de 250 mmol L^{-1} .

A determinação quantitativa da proteína foi realizada em um equipamento espectrofotométrico Nanodrop (Thermo Scientific). Este equipamento requer um volume de 1 - 2 μL de amostra não havendo necessidade de diluição. O tempo de duração da medida não ultrapassa 10 s, sendo então uma medida rápida e que utiliza uma quantidade pequena de amostra. A quantidade obtida por espectrometria foi de $1,35 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína.

3.3. Atividade enzimática

Para uma efetiva correlação de atividade enzimática é necessário que a proteína esteja em sua conformação ativa. Reação padrão de ensaio enzimático de HNL é desenvolvida pela degradação da mandelonitrila, uma cianoidrina, a benzaldeído e

HCN. O aumento da concentração de benzaldeído foi medido em cubetas de quartzo a 280 nm. Tampão fosfato/citrato (50 mmol L⁻¹, pH 5) foi misturado à enzima com tampão fosfato de potássio (5 mmol L⁻¹, pH 6,5). A reação foi iniciada pela adição de mandelonitrila em solução (0,06 mol L⁻¹) e monitorado por 10 min. A mandelonitrila (40 µL) foi dissolvida em 5 mL de tampão citrato/fosfato (3 mmol L⁻¹, pH 3,5). Uma unidade de atividade de HNL é definida como quantidade de enzima, que converte 1 mmol de mandelonitrila por minuto em tampão de citrato/fosfato, pH 5, 25 °C. As análises foram realizadas em triplicata.

Outro teste de atividade foi realizado usando uma mistura de XfHNL, solução de mandelonitrila em tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl, em pHs 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5 e monitorado por 2 min. As análises foram realizadas em triplicata.

Subsequentemente, a atividade foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do benzaldeído ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1.376 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O teste foi realizado em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC. A amostra foi introduzida ao dispositivo a uma temperatura de 25 °C.

3.3.1 Influência do pH

Foram testados dois tampões, tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl à 25 °C, na qual a enzima foi incubada em pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5, e tampão citrato/fosfato de potássio a pH 5. As análises foram realizadas em triplicata. Para estes experimentos, um volume de 21 µL (concentração de 0,05 µmol L⁻¹) da solução contendo a enzima foi misturada com 49 µL de solução de mandelonitrila e 630 µL de tampão 50 mmol L⁻¹ fosfato de sódio contendo 150 mmol L⁻¹ NaCl. Essa solução foi medida à 280 nm por 2 min em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC a 25 °C (ver Tabela 2). A atividade enzimática foi determinada pela equação 1.

$$\text{Atividade} = \frac{V}{\epsilon_{280} \text{ IS}} \Delta A / \text{min}$$

Eq. 1

Para este experimento, envolvendo ácido cítrico, a mandelonitrila purificada (40 µL) foi dissolvida em 5 mL de tampão citrato/fosfato de potássio 3 mmol L⁻¹, pH 3,5. Um

volume de 21 μL da solução (concentração de 0,05; 0,06; 0,07 e 0,08 μM) (contendo a enzima foi misturada com 49 μL de solução de mandelonitrila e 630 μL de tampão 0,05 mmol L^{-1} citrato/fosfato de potássio. Essa reação foi medida a 280 nm por 10 min em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC a 25 °C.

3.3.2 Influência da composição do tampão

A enzima foi incubada em tampão fosfato de sódio contendo NaCl, e fosfato de potássio, contendo ácido cítrico como um aditivo ao tampão. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Análises por cromatografia gasosa

A mistura reacional foi preparada utilizando 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} contendo 150 mmol L^{-1} de NaCl em pH 5 com 5 μL de mandelonitrila dissolvido em 25 μL de DMSO. A concentração de HNL foi de 5 $\mu\text{g/mL}$. Foi utilizado seis tubos de ensaio com a mistura reacional e foi colocado sobre agitação orbital por 30 minutos, 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas à 28 °C. As reações foram então submetidas a uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 5 mL), junto as fases orgânicas foi adicionado Na_2SO_4 anidro para eliminar qualquer resquício de água e por último analisadas por cromatografia a gás (GC). Depois de extraídas, cada reação sofreu esterificação. A reação foi realizada em um balão de 25 mL sob agitação magnética, contendo anidrido acético (0,5 mL) e piridina (0,5 mL). Essa reação foi mantida sob agitação por 48 h. Em seguida, foi realizada uma cromatografia em camada delgada e quando o término da reação foi constatado, foi adicionado HCl 10% (5 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 5 mL) e seca com Na_2SO_4 anidro, e por fim, analisada por GC.

A reação de esterificação foi efetuada num frasco de 25 mL com agitação magnética, adicionando sequencialmente anidrido acético (1,0 mL), piridina (1,0 mL) e ($\pm$)-mandelonitrila (100 μL , 0,84 mmol). A reação manteve-se sob agitação magnética durante 48 h. Posteriormente, foi realizada a análise por TLC e GC-FID. Após a

esterificação completa de (±)-mandelonitrila foi adicionado HCl a 10% (2 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL), secou-se sobre Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se sob vácuo. O produto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica (50% de rendimento) (Esquema 1).

Esquema 1. Preparação do acetato (1a) pela (±)-mandelonitrila (1).

A reação enzimática foi analisada utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu GC 2010 equipado com um injetor automático COA 20i, um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna quiral Varian CP-Chiralsil-DEX (β-ciclodextrina) (25 m x 0,25 mm x 0,39 mM). As condições das análises cromatográficas foram as seguintes: N₂ (60 kPa) como gás de arraste, temperatura do injetor de 200 °C, injetor dividido proporção de 1:20, e temperatura do detector de 200 °C. A temperatura do forno foi programada de 100 °C seguido por um aumento linear de 10 °C min⁻¹ a 175 °C durante 2 min, e um aumento linear de 5 °C min⁻¹ a 180 °C durante 5 minutos, tempo de análise de 15,5 min. Como também foi utilizada uma coluna capilar (J & W Scientific DB-5, 30 m x 0,25 milímetros x 0,25 mm). As condições seguintes foram utilizadas na análise de cromatografia a gás: Gás de arraste N₂ (60 kPa), temperatura do injetor 250 °C, razão de divisão do injetor, 01:20; temperatura do detector, 250 °C, estufa (temperatura inicial), com 100 °C (2 min), (temperatura final), a 160 °C (2 min), taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹, e o tempo de análise de 16 minutos. O excesso enantiomérico (ee) de acetato de (S)-mandelonitrila foi determinado por análises cromatográficas a gás com a fase estacionária quiral utilizando os tempos de retenção obtidos para ambos os enantiômeros: (R)-enantiômero = 7,54 min e (S)-enantiômero = 7,82 min. A (±)-mandelonitrila não mostrou a separação enantiomérica em análise GC FID. O excesso enantiomérico do que não reagiu (R)-mandelonitrila (1) foi determinado após derivação com anidrido acético/ piridina (Ac₂O/Pi).

As reações foram esterificadas, após a extração. A reação foi realizada num balão de 25 mL sob agitação, adicionando sequencialmente anidrido acético (0,5 mL) e piridina (0,5 mL), e a reação manteve-se durante 48 h em agitação magnética. Após 48 h, as reações foram analisadas por GC-FID

Cada extrato foi dissolvido em 10 mL de acetato de etilo. As reações de esterificação foram realizadas num balão 50,0 mL, sob agitação magnética, adicionando sequencialmente anidrido acético (0,5 mL) e piridina (0,5 mL). As reações permaneceram durante 48 horas em agitação magnética. A fase orgânica foi extraída com acetato de etilo (3 x 30,0 mL), secou-se com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se sob vácuo e estas foram analisadas por GC-FID.

3.5 Análises por eletroforese capilar – Separação quiral de (±)-mandelonitrila

(±)-mandelonitrila foi utilizada para separação quiral por eletroforese capilar (CE). Foi utilizado como solução tampão borato (20 mmol L⁻¹) e SDS (50 mmol L⁻¹), o seletor quiral usado neste experimento foi a β e α-ciclodextrina em uma concentração de 20 mmol L⁻¹, foi utilizado 10 µL (±)-mandelonitrila e 10 µL de acetona utilizada como marcador de fluxo. Também foi utilizado 0,5% de β-ciclodextrina sulfatada (HS-β-CD) como agente quiral, solução tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e 50 mmol L⁻¹. O comprimento de onda foi de 254 nm.

4. Resultados e discussões

4.1 Teste enzimático

A atividade enzimática para HNLs diminui em pHs ácidos. Em valores de pH altos a enzima se torna mais estável, mas acima de pH 8 ocorre degradação da mandelonitrila (CARUSO et al., 2009). A formação de benzaldeído juntamente com HCN se torna maior com o aumento do pH (ver Figura 1), se benzaldeído é adicionado ele poderá diminuir a atividade, como um inibidor de produto, por esta razão a mandelonitrila precisa ser purificada para evitar concentração inicial de benzaldeído. Na Tabela 1, encontram-se os valores da atividade para diversos valores de pH

realizados em triplicata. Nesta tabela, nota-se que a atividade é considerável, para esta proteína, acima de pH 6,5. Pela Figura 1, é possível observar que o melhor pH para esta proteína é o pH 6,5, pois acima de 7 a velocidade de reação química é muito rápida, quase impossibilitando a medição da atividade. Para estes experimentos, um volume de 21 μL (concentração de 0,05 μM) da solução contendo a enzima foi misturada com 49 μL de solução de mandelonitrila e 630 μL de tampão 50 mmol L^{-1} fosfato de sódio contendo 150 mmol L^{-1} NaCl. Essa solução foi medida a 280 nm por 2 min em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC a 25 °C. A atividade enzimática foi determinada pela equação 1.

Tabela 1. Atividade específica da XfHNL em diferentes pHs realizados em triplicata.

<i>pH</i>	<i>Atividade específica (U mL⁻¹)</i>
5.0	0,34
5.5	0,25
6.0	1,77
6.5	8,73
7.0	26,1
7.5	26,8

Figura 1. Atividade enzimática realizada em triplicata da proteína XfHNL em diferentes pHs. (Linha vermelha referente a enzima, linha preta referente ao branco). Condições: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl à 25 °C, na qual a enzima foi incubada em pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5.

4.2 Influência do pH

A influência do pH foi estudada com um intervalo de pH de 5 até 7,5 e tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl a 25 °C. O aumento do pH para valores acima de 5 aumenta a atividade de XfHNL, e acima de pH 6,5 a enzima é estável mas a velocidade de reação é muito rápida, o que pode gerar erros nos cálculos da atividade. Acima de valores de pH em 7,5 é quase impossível calcular a atividade nestas condições experimentais. Acima de pH 8 ocorre a degradação da mandelonitrila, portanto não foram realizados experimentos para valores de pH acima de 7,5. Em pH 5 a atividade de XfHNL é baixa, e abaixo deste valor fica difícil de medir sua atividade, pois a enzima pode se degradar em pH muito ácidos. Na Figura 2, é possível observar a otimização da atividade da enzima em função do pH. Dados da literatura reportam que HNLs é ativa em pH entre 4 e 5, (HOLT e HANEFELD, 2009) no entanto, nossos resultados mostraram que para pH ácidos a reação pode ser inibida, resultando em uma atividade menor para XfHNL e os substratos utilizados.

Figura 2. Efeito do pH na atividade enzimática. Condições: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl à 25 °C, na qual a enzima foi incubada em pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5.

4.3 Influência da composição do tampão e a presença de ácido cítrico na atividade de XfHNL

A atividade enzimática e a estabilidade são diretamente afetadas com a escolha da composição do tampão (BAUER et al., 1998). É sabido que a adição de ácido cítrico, como aditivo, inibe a XfHNL (BAUER et al., 1998). Os dados da Tabela 3 mostram que a enzima é mais estável em tampão fosfato de sódio que tampão citrato/fosfato de potássio. É possível também observar como a velocidade de reação é afetada por este meio reacional. Neste gráfico, nota-se que para esse sistema de tampão contendo aditivo, houve uma inibição da atividade da XfHNL.

Para este experimento, a mandelonitrila purificada (40 μL) foi dissolvida em 5 mL de tampão citrato/fosfato de potássio 3 mmol L^{-1} , pH 3,5. Um volume de 21 μL da solução (concentração de 0,05; 0,06; 0,07 e 0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (contendo a enzima foi misturada com 49 μL de solução de mandelonitrila e 630 μL de tampão 0,05 mmol L^{-1} citrato/fosfato de potássio. Essa reação foi medida a 280 nm por 10 min em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC a 25 °C. Pela Figura 3 é possível observar que não houve atividade enzimática nas condições estudadas envolvendo tampão com aditivo. O ácido cítrico pode ser um inibidor na atividade enzimática como observado também em 1998 por Bauer e colaboradores. Mesmo utilizando concentrações diferentes de enzima não houve atividade enzimática. Um outra explicação é que o resquício de benzaldeído ainda esteja influenciando na reação

Tabela 3. Atividade da XfHNL em dois diferentes sistemas de composição a valores de pH diferentes.

<i>Tampão</i>	<i>pH</i>	<i>Atividade enzimática específica (U mL⁻¹)</i>
Fosfato de sódio	5	0,34
Fosfato de sódio	6.5	8,73
Fosfato de potássio/citrato	5	0,0

Figura 3. Atividade enzimática da proteína XfHNL em solução tampão contendo ácido cítrico como aditivo para diferentes concentrações de enzima (amostra 1 concentração de $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$; amostra 2 concentração de $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$; amostra 3 concentração de $0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$; amostra 4 concentração de $0,08 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.4 Síntese de cianoidrina catalisada pela XfHNL

Benzaldeído, grau analítico, foi previamente destilado, conforme as condições do item 2.1. A Figura 4 ilustra o cromatograma do composto destilado. Mandelonitrila, grau analítico, foi previamente purificada conforme condições do item 2.1 e em seguida injetada em HPLC. A Figura 5 ilustra o cromatograma do composto purificado. Devido a alta conversão da mandelonitrila em benzaldeído, esse composto deve ser purificado, pois o excesso de benzaldeído interfere nas reações de atividade. A mandelonitrila tem tempo de retenção para (*R*)-mandelonitrila em 8,166 min e (*S*)-mandelonitrila em 8,573 min. Nesta figura, ainda é possível visualizar pico de benzaldeído perto de 6 min, no entanto, sua concentração é menor que 10% e sua interferência não foi perceptível. No tempo de retenção 3,5 min se encontra o volume morto.

Essa reação se dá em um sistema de duas fases (aquoso-orgânico), onde um mínimo de água é requerido para garantir a atividade de XfHNL (PARAVIDINO et al., 2010; NANDA et al., 2005). Com uma quantidade pequena de água, o substrato racêmico e os produtos formados são altamente solúveis. Vale a pena lembrar que a

reação pode ser afetada pelo pH e concentração do tampão aquoso, e o solvente utilizado (BROVETTO et al., 2011). O experimento consistiu em 185 μ L de acetona cianoidrina com 50 μ L de benzaldeído em MTBE (ter-butil metil éter) como solvente, e 10 μ L de triisopropilbenzeno como padrão interno. A síntese inicia-se pela adição de 50 μ L de *Xf*HNL em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) sob agitação e temperatura ambiente. Aliquotas de 10 μ L foram retiradas em diferentes intervalos (5, 30 min e 1 hora) e monitoradas em HPLC quiral, as amostras foram diluídas em heptano/2-propanol (9:1) e filtradas antes da injeção.

Figura 4. Cromatograma de benzaldeído padrão por HPLC quiral usando sistema Waters.

Figura 5. Cromatograma da ($\pm$)-mandelonitrila padrão por HPLC quiral usando sistema Waters.

Na Figura 7, encontram-se os cromatogramas da síntese de cianoidrina (mandelonitrila) com o esquema de reação mostrada na Figura 6, catalisada pela

XfHNL em sistema bifásico. Pelos cromatogramas é possível ver que houve a formação do produto, mas não houve especificidade da proteína por esse substrato. O pico (banda cromatográfica) referente ao benzaldeído é bem visível e de grande concentração, o que pode ser um fator de inibição à formação de mandelonitrila. Uma outra característica observável é que o tempo de reação não foi relevante, pois coletando amostras do início da reação e após 1 h, não houve diferença na reação. A formação de mandelonitrila se dá em baixíssima concentração, e o que pode ter acontecido é a concentração de XfHNL estar em excesso o que resulta a formação dos 2 enantiômeros em concentrações iguais.

Figura 6. Esquema de reação para a síntese de mandelonitrila catalisada por XfHNL.

Figura 7. Cromatogramas da reação de síntese de mandelonitrila catalisada por X⁺HNL, (a)branco, (b) 5 min, (c)30 min, (d) 1 h.

Uma outra alternativa para investigar a enantiosseletividade de *XfHNL* foi a reação seguindo o procedimento realizado para a atividade enzimática. A enzima foi incubada em tampão de fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl, em pH 6,5, a temperatura ambiente sob agitação por 24 horas, contendo solução de mandelonitrila.

A Figura 8 ilustra o cromatograma para a condição inicial. A Figura 9 ilustra o cromatograma da reação após 24 horas. É possível observar uma formação em maior quantidade tanto do benzaldeído, quanto da (±)-mandelonitrila, pois há um equilíbrio dinâmico entre benzaldeído e mandelonitrila (RIBEIRO e al., 2012).

Figura 8. Cromatograma da condição inicial da reação.

Figura 9. Cromatograma do produto após 24 horas de reação.

Para esta reação, (±)-mandelonitrila está presente no início da reação, de tal forma que é possível observar os seus picos na Figura 8. No entanto, após ser acrescentado *XfHNL* e esperado por 24 h, não ocorre a enantiosseletividade da *XfHNL*.

pelo substrato estudado. Como esta reação envolve a formação de benzaldeído e HCN, que é a indicação que a proteína está ativa, ver Figura 9, a concentração de benzaldeído se torna maior. Isto pode ocorrer pelo fato de esta HNL ser de origem bacteriana, diferenciando das HNLs relatadas na literatura que mostram enantiosseletividade para esse tipo de substrato estudado.

Uma outra alternativa, no entanto, seria a utilização de diferentes substratos, solventes e, também concentrações, tanto de substrato quanto da enzima, e até mesmo valores de pH diferentes.

4.5 Análises por cromatografia gasosa

A proteína hidroxinitrila liase (HNL) expressa na bactéria *Xylella fastidiosa* foi utilizada em ensaios enzimáticos, nos quais apresentou atividade. A atividade enzimática foi determinada para benzaldeído. Após essa etapa, deu-se início na etapa da especificidade da HNL. A mistura reacional foi preparada utilizando 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl em pH 5, com 5 µL de mandelonitrila dissolvido em 25 µL de DMSO. A concentração de HNL foi de 5 µg mL⁻¹. Foi utilizado seis tubos de ensaio com a mistura reacional e foi colocado sobre agitação orbital por 30 minutos, 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas à 28 °C. As reações foram então submetidas a uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3 × 5 mL), junto as fases orgânicas foram adicionado Na₂SO₄ anidro para eliminar qualquer resquício de água e por último analisadas em GC. Depois de extraídas, cada reação sofreu esterificação. A reação foi realizada em um balão de 25 mL sob agitação magnética, contendo anidrido acético (0,5 mL) e piridina (0,5 mL). Essa reação foi mantida sob agitação por 48 h. Em seguida, foi realizada uma cromatografia em camada delgada e quando o término da reação foi constatado, foi adicionado HCl 10% (5 mL). A fase orgânica foi extraída com acetato de etila (3 × 5 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro, e por fim, analisada por CG. A atividade enzimática da HNL frente à mandelonitrila foi observada pela conversão ao benzaldeído, resultado comparado com o padrão. Após observar este resultado, as reações foram submetidas à esterificações (Figura 10) e

analisadas novamente por GC, ilustrada na Figura 11. Com isso, não foi observado enantiosseletividade, quando comparado com os padrões racêmicos da mandelonitrila.

Pela Figura 11a é possível observar o padrão ($\pm$)-mandelonitrila. Pelas Figuras 11b, c e d, são os cromatogramas da reação de XfHNL em tempos diferentes. É possível observar pela Figura 11 que a técnica de GC não separou o composto racêmico ($\pm$)-mandelonitrila, desta maneira foi preciso realizar a esterificação deste composto (Figura 10). Mesmo realizando as reações de estudo, não foi possível observar a enantiosseletividade desta proteína, visto que a técnica de CG não separou os enantiômeros, sendo assim não sendo possível distinguir se houve reação de enantiosseletividade.

Para avaliar a enantiosseletividade XfHNL em ($\pm$)-mandelonitrila, esta foi realizada por um método de modo a determinação do excesso enantiomérico e a configuração absoluta do substrato. Em seguida, a resolução enzimática era necessário (RIBEIRO et al., 2012), bem como, para acetilar ($\pm$)-mandelonitrila, mantendo-se a oxidação de benzaldeído por XfHNL, uma vez que apenas o acetato mandelonitrila foi resolvido por CG quiral.

É possível observar pela Figura 12 que não houve enantiosseletividade de XfHNL pelo substrato estudado. Mesmo realizando as esterificações para observar a enantiosseletividade em GC não foi possível observar a enantiosseletividade desta proteína no estudo, pois aparece nos cromatogramas os dois enantiômeros do acetato. Também é possível observar que mesmo em maiores tempos de reação, a enantiosseletividade não foi observada, portanto o tempo não foi um fator seletivo para esta reação.

Utilizando-se GC-FID para análise das reações foi possível observar que XfHNL não foi enantiosseletiva para ($\pm$)-mandelonitrila. Adicionalmente, foi realizada a reação de síntese de ($\pm$)-mandelonitrila catalisada por XfHNL para verificar a enantiosseletividade XfHNL. Esta reação ocorre num sistema de duas fases (aquosa-orgânica), neste sistema é necessário um mínimo de água para assegurar a atividade XfHNL. Com uma pequena quantidade de água do substrato racêmico e do produto são extremamente solúveis.

Não houve enantiosseletividade provavelmente para este substrato devido que esta HNL é de uma bactéria e não como as outras HNLs que são provenientes de plantas. Além disso, as condições de atividade da enzima não são as mesmas, a presença de ácido cítrico, na maioria dos testes de atividade para diferentes HNLs, na composição do tampão inibe a atividade X^fHNL. Dados da literatura mostram que HNLs são ativas em pHs baixos, e podem ser inibidas com a presença de ácido cítrico (BAUER, 1998). Outros parâmetros, tais como meio de reação, a fonte de cianeto, a quantidade de água, o pH do tampão e o solvente influenciam na enantiosseletividade de X^fHNL (KANERVA 1996; ZACKS 1988; BAUER, 2002; GRIENGL 1997; PARAVIDINO, 2010). Por outro lado, usando um sistema bifásico para aumentar a concentração do substrato não ajudou a conseguir a enantiosseletividade.

Figura 10. Cromatogramas de reação de esterificação (a) padrão de (±)-mandelonitrila (1). (b) Padrão do acetato racêmico. (c) Padrão do álcool benzílico. (d) Padrão do ácido 2-hidroxifenilacético. (e) Reação de esterificação ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$) do extrato correspondente a reação de (±)-mandelonitrila (20.0 μL). (f) Reação de esterificação ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$) do extrato correspondente a reação de (±)-mandelonitrila (40.0 μL). (g) Reação de esterificação ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pi}$) do extrato correspondente a reação de (±)-mandelonitrila (60 μL).

Condições: $T_i = 100\text{ }^\circ\text{C}$ até $175\text{ }^\circ\text{C}$, $r = 10\text{ }^\circ\text{C}/2\text{min}$; $T_f = 180\text{ }^\circ\text{C}$; $r = 5\text{ }^\circ\text{C}/5\text{min}$, $t_c = 15,5\text{ min}$.

Coluna capilar CP – Chirasil DEX CB Varian (0,25 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Figura 11. Cromatogramas das reações com a enzima HNL de *X. fastidiosa*: (a) Padrão da (±)-mandelonitrila, (b) Reação com HNL após 1 h, (c) Reação com HNL após 12 h, (d) Reação com HNL após 24 h. Condições: idem figura 10.

Figura 12. Cromatogramas das esterificações das reações com a enzima HNL de *X. fastidiosa*: (a) Padrão da (±)-mandelonitrila, (b) Padrão do acetato racêmico, (c) Esterificação da reação com HNL após 1h com Ac_2O/Pi , (d) Esterificação da reação com HNL após 12h com Ac_2O/Pi , (e) Esterificação da reação com HNL após 24h com Ac_2O/Pi . Condições: idem figura 10.

4.6 Análises por eletroforese capilar

Para se obter a separação de compostos quirais por eletroforese capilar (CE) há a necessidade da utilização de seletores quirais, como por exemplo, a ciclodextrina, éteres coroa, sais de bile, etc (TAVARES, 1997; GÜBITZ e SCHMID, 2008). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose (SHIBUKAWA et al., 2005) e possuem uma cavidade hidrofóbica capaz de complexar moléculas de tamanho e polaridade apropriados. Compostos solúveis ou insolúveis em água podem se encaixar na cavidade quiral hidrofóbica da ciclodextrina, gerando complexos (LURIE, 1997) que devido a interação do grupo hidrofóbico do analito com a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, são separados com seletividade quiral. Assim, a interação da ciclodextrina com o analito gera diferentes tempos de migração e com isso a separação dos estereoisômeros.

A Figura 13a e 13b ilustra eletroferogramas sem a presença de agente quiral. Foi utilizado como solução tampão borato (20 mmol L^{-1}) e SDS (50 mmol L^{-1}), o seletor quiral usado neste experimento foi a β e α -ciclodextrina em uma concentração de 20 mmol L^{-1} , foi utilizado $10 \mu\text{L}$ do composto de interesse e $10 \mu\text{L}$ de acetona utilizada como marcador de fluxo, mostrado na Figura 13c e 13d utilizando β -ciclodextrina, e Figuras 13e e 13f com α -ciclodextrina. Foi realizado, primeiramente, análise com a β -ciclodextrina, onde não foi possível obter a separação. O que pode ter ocorrido é que a mandelonitrila não deve ter sido encaixada pela β -ciclodextrina. Numa segunda análise foi utilizada como seletor quiral a α -ciclodextrina, onde também não foi observada a separação. A troca do seletor quiral foi devido ao tamanho entre eles, pois como a mandelonitrila é um composto pequeno, acredita-se que ela se encaixaria melhor na α -ciclodextrina, que é um composto menor comparada ao outro seletor utilizado. Foi notado que o melhor agente quiral foi HS- β -CD, neste experimento a concentração do agente quiral foi 0,5% do total da solução tampão. Realizadas as condições iniciais, foi feito o experimento com a mandelonitrila, mas não houve separação do composto. Nos testes realizados o melhor comprimento de onda foi de 254 nm. Para o tampão de corrida foi realizado diversos testes, incluindo o tipo de tampão e sua concentração. Primeiramente, foi utilizado tampão borato e SDS em diversas concentrações, em

seguida tampão fosfato, também em diversas concentrações, e concluiu-se que o melhor tampão é de fosfato, pois houve uma estabilização melhor da corrente comparando com o borato. Em seguida, foi verificada que a melhor concentração encontrada foi de 50 mmol L⁻¹. A Figura 14 ilustra o eletroferograma de mandelonitrila racêmica utilizando β -ciclodextrina sulfatada (HS- β -CD). Por esta figura é possível observar que mesmo utilizando um agente quiral, não foi possível obter a separação do composto racêmico por EC.

Figura 13. Eletroferograma de mandelonitrila racêmica sem a presença de um agente quiral e utilizando agente quiral.

Figura 14. Eletroferograma de mandelonitrila racêmica utilizando β -ciclodextrina sulfatada (HS- β -CD).

5. Conclusão

A *XfHNL* é ativa apenas em solução tampão que não contenha inibidores, como o citrato. Pelos resultados mostrados, ocorre a formação de cianoidrina catalisada por *XfHNL*, no entanto, sua enantiosseletividade pelo substrato utilizado não foi observada para o mesmo. Uma explicação para isso é que pode ser provável que a *XfHNL* não aceita a acetona cianoidrina como substrato, o mesmo acontece para *SbHNL*, no entanto para *HbHNL* e *MeHNL* acetona cianoidrina é o substrato natural e ocorre enantiosseletividade (GREGORY, 1999), acetona cianoidrina também pode resultar em pouca ou nenhuma enantiosseletividade (KOBAYASHI, et al., 1986; GREGORY, 1999). Uma alternativa para a reação seria a utilização de diferentes solventes, como tolueno ou di-isopropil éter (DIPE), e também a utilização de diferentes concentrações de substrato e até mesmo diferentes concentrações de enzima em diferentes pHs. A melhor técnica para esse tipo específico de análise foi HPLC, pois separa os enantiômeros da mandelonitrila, não sendo observado em GC e EC.

Subcapítulo 3.2

Estudo da enantiosseletividade da proteína hidroxinitrila liase de bactéria *Xylella fastidiosa* na esterificação do (R,S)-ibuprofeno

Estudo da atividade da proteína HNL frente a sua similaridade com esterases e lipases.

Devido a sua similaridade estrutural a lipases e esterases (JOCHENS, et al., 2011; PADHI et al., 2010), *XfHNL* foi submetida a um teste de atividade usando 10 μL de *p*-nitrofenil acetato 0,1 mmol L^{-1} em DMSO, 940 μL de tampão Tris-HCL 25 mmol L^{-1} contendo 20 mmol L^{-1} de NaCl em pH igual a 8. A enzima foi adicionada a esse meio (50 μL) e monitorada por 5 min. O resultado é mostrado na Figura 14, o qual é possível observar que há atividade da *XfHNL* frente a este substrato. Foi monitorada também a atividade em diferentes concentrações de *p*-nitrofenil acetato, 0,1 mmol L^{-1} ; 0,3 mmol L^{-1} ; 0,5 mmol L^{-1} e 1 mmol L^{-1} . No entanto, nas concentrações acima de 0,1 mmol L^{-1} não é possível observar atividade e nas soluções mais concentradas há ainda o problema de solubilização. Por isso, foram testadas apenas para concentração de 0,1 mmol L^{-1} . Por este motivo, foram realizadas as duas outras reações mostradas neste subcapítulo 2 e a reação do subcapítulo 3.

Figura 14. Gráfico da atividade de *XfHNL* frente ao substrato *p*-nitrofenil acetato. Condições: espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC, 25 °C.

3 Materiais e métodos

3.1 Estudo da atividade de esterificação de (*R,S*)-ibuprofeno por XfHNL

Esse estudo foi realizado utilizando dois sistemas reacionais distintos:

1. O primeiro sistema reacional foi composto de (*R,S*)-ibuprofeno (0,1361g), 1-propanol (39,66 g), isoctano (10 mL), 1 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 2% de peneira molecular 4 Å (m/m), para retirar qualquer resquício de água, e de 0,1 g de XfHNL sob agitação. 1-Propanol foi utilizado como acceptor de acila.
2. A segunda mistura reacional foi composta de ciclohexano (625 µL), (*R,S*)-ibuprofeno (2,58 mg) e 1-propanol (5,64 µL) como acceptor de acilas. A reação foi iniciada com a adição de 10 mg de XfHNL.

A Figura 15 ilustra o esquema da reação de esterificação do (*R,S*)-ibuprofeno racêmico catalisada pela enzima HNL, sendo como acceptor de acila o 1-propanol.

Figura 15. Esquema ilustrativo da reação de esterificação do (*R,S*)-ibuprofeno racêmico catalisada pela enzima HNL.

Os reagentes utilizados neste experimento, *p*-nitrofenil acetato, DMSO, Tris-HCL, NaCl, (*R,S*)-ibuprofeno, 1-propanol, isoctano, fosfato de sódio, peneira molecular 4 Å (m/m), ciclohexano, foram de grau p.a. Heptano, isopropanol, ácido trifluoracético foram de grau HPLC.

Para as análises dos resultados foi utilizada a técnica HPLC. A coluna utilizada foi de fase estacionária quiral tris-(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose Chiralcel OD (Daicel Chemical Industries, LTD) utilizando um sistema Waters (Sistema Waters:

detector Waters 486 UV, bomba: Waters 515 e Waters 717 + injetor). A fase móvel usada foi heptano/isopropanol/ácido trifluoracético (100/1/0,1), vazão de 1,0 mL/min, à 254 nm. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 20 min, onde o tempo de retenção do (*R*)-ibuprofeno foi de 16,820 min e do (*S*)-ibuprofeno 19,846 min, o padrão pode ser visualizado na Figura 16.

4 Resultados e discussão

A capacidade enantiosseletiva da *XfHNL* foi avaliada através da reação de esterificação do (*R,S*)-ibuprofeno racêmico com o 1-propanol na presença de isoctano e ciclohexano, é possível visualizar que há o consumo de um dos enantiômeros do éster-propílico de ibuprofeno. Nas alíquotas recolhidas nos diversos tempos foi possível detectar a formação do (*R,S*)-éster de ibuprofeno nas reações catalisadas pela *XfHNL*. Pode-se considerar que após 24 h de reação com a *XfHNL* inicia-se a esterificação nos dois sistemas reacionais aqui apresentados. As reações que transformam um composto que é opticamente ativo em sua forma racêmica é chamada de reações de racemização (SOLOMONS, 2001).

A Figura 16 ilustra o cromatograma do padrão de (*R,S*)-ibuprofeno. Foi observado que nestes meios reacionais houve a enantiosseletividade da proteína *XfHNL* envolvendo como substrato o (*R,S*)-ibuprofeno. E concomitantemente há a reação de racemização, onde o ibuprofeno passou por racemização.

A esterificação diminui com o tempo de reação, ou seja, ocorre uma redução da quantidade de éster formado (Figuras 17b, 17c e 17d e 18b, 18c, 18d). As misturas reacionais foram colocadas dentro de um balão e submetidas à agitação magnética à temperatura ambiente. As alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos e posteriormente analisadas em HPLC. As Figuras 17 e 18 contêm os cromatogramas referentes às reações estudadas.

Figura 16. Cromatograma do padrão (*R,S*)-ibuprofeno. (Condição: Coluna Chiralcel OD (Daicel Chemical Industries, LTD) (Sistema Waters: detector Waters 486 UV, bomba: Waters 515 e Waters 717 + injetor). Fase móvel: heptano/isopropanol/ácido trifluoracético (100/1/0,1), vazão de 1,0 mL/min, à 254 nm).

Figura 17. Cromatogramas da reação de esterificação do (*R,S*)-ibuprofeno referente a primeira reação, com 24 h (a), 45 h (b), 95 h (c) e 120 h (d).

Na Figura 18 é possível observar nos cromatogramas a formação do éster propílico de ibuprofeno, e há o consumo de um dos ésteres propílico de ibuprofeno. É possível notar também que a quantidade de produto formado é muito pequena e que com o tempo de reação a quantidade se torna muito pequena. Como há a formação de produtos racêmicos e pelos cromatogramas houve o consumo de um dos enantiômeros produzidos devido a racemização do (R,S)-ibuprofeno desta maneira, pode-se dizer que a *XfHNL* foi enantiosseletiva para esse substrato.

Pela figura 18, os cromatogramas apresentados observam-se o mesmo perfil que o apresentado nas análises da figura 17. O que revela que mesmo utilizando alguns solventes e quantidades de reagentes diferentes, não houve diferença nas análises estudadas. Sendo o que pode mudar seria o acceptor de acila, mudando de 1-propanol para 2-propanol que também é bastante estudado na literatura (SIÓDIAK et al., 2012).

Figura 18. Cromatogramas da reação de esterificação do (R,S)-ibuprofeno referente a segunda reação, com 24 h (a), 47 h (b), 74 h (c) e 99 h (d).

5. Conclusão

Podemos concluir que a proteína XfHNL catalisa a reação envolvendo o composto ibuprofeno. Ocorre a racemização do substrato ibuprofeno, e o consumo de um dos enantiômeros do produto. Com isso, pode-se dizer que XfHNL foi enantiosseletiva para esse substrato sendo enantiosseletiva para um dos enantiômeros.

Subcapítulo 3.3

Síntese de éster racêmico e resolução cinética do éster
catalisada pela hidroxinitrila liase de *Xylella fastidiosa*

3 Materiais e métodos

Os reagentes utilizados (*R,S*)-1-fenil etanol, anidrido acético, piridina, dietil éter, HCl, (*S*)-1-fenil etanol, NaHCO₃, MgSO₄, NaOH, NaCl foram de grau p.a. Este experimento realizou-se em duas etapas. A primeira consistiu da síntese do éster racêmico oriundo de (*R,S*)-1-fenil etanol (Figura 19), e o segundo passo foi a resolução cinética catalisada pela *XfHNL*. No primeiro passo, (*R,S*)-1-fenil etanol foi convertido em α -metil benzil acetato pela adição de anidrido acético em piridina em dietil éter à temperatura ambiente (em apenas 2 horas é possível obter um rendimento de 99%). Na primeira reação, 12 g de 1-fenil etanol racêmico foi dissolvido em 25 mL de dietil éter e cuidadosamente foi adicionado 15 g de anidrido acético e 16 g de piridina, e colocado em um condensador de refluxo por 2 horas sob agitação. Em seguida, foi adicionado HCl 1 mol L⁻¹ e agitado por mais 2 min. Essa mistura foi transferida para um funil de separação e coletado a fase orgânica, para ser retirado todo o ácido acético formado a camada contendo éter foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ (2 x 20mL). Em seguida, foi adicionado MgSO₄ anidro para que não houvesse nenhum resquício de água. Após isso, foi filtrado e evaporado em um rota evaporador. O produto foi então destilado a vácuo.

Figura 19. Síntese do éster racêmico, acetato de α -metil benzil.

Na segunda etapa, *XfHNL* foi utilizada como catalisador para a resolução cinética. O produto racêmico formado na primeira etapa foi adicionado a uma solução de tampão fosfato 100 mmol L⁻¹, pH 7. *XfHNL* foi adicionada gentilmente e agitada na mistura de duas fases, a temperatura ambiente. Foi mantido sob agitação com monitoramento do pH, caso o pH diminuísse era adicionado algumas gotas de NaOH 1 mol L⁻¹ para reajustar o pH a 7. A reação acabou quando o valor de pH se torna

estável. Essa etapa tem um tempo de duração de aproximadamente 3 a 4 horas. Cessada a reação, foi filtrada a mistura e em seguida extraída com éter, e após isso lavada com solução de NaCl saturada. O produto então foi secado com MgSO_4 anidro e em seguida filtrado e evaporado em rota-evaporador. O produto da reação deveria conter possivelmente um dos enantiômeros do éster formado e um dos enantiômeros do 1-fenil etanol não reagido caso a X^*HNL apresentasse enantiosseletividade.

Os produtos foram analisados por cromatografia a gás quiral, coluna Chirasildex CB (50 m x 0,32 mm x 0,25 μm), injetor split/splitless, detector FID, da Shimadzu, com um tempo de corrida total de 20 min, para determinar o excesso enantiomérico (ee) da reação.

4 Resultados e Discussões

A síntese do acetato de α -metil benzil racêmico foi obtida com sucesso, uma vez que a esterificação ocorre de maneira eficaz e simples, sendo observado pela cromatografia de camada delgada.

A reação cinética foi estudada injetando-se a amostra em um cromatógrafo a gás. Foi possível verificar que a X^*HNL estudada não obteve conversões e nem excessos enantioméricos. Pela Figura 23 é possível observar que não ocorreu conversão enantiosseletiva do éster formado. O (*R*)-1-fenil etanol tem tempo de retenção igual a 12,043 min, enquanto (*S*)-1-fenil etanol tem tempo de retenção 12,187 min. O éster formado se encontra nos tempos de retenção 13,788 e 13,923 minutos.

A Figura 20 ilustra o cromatograma do padrão (*R,S*)-1-fenil etanol. A Figura 21 ilustra o cromatograma do padrão (*S*)-1-fenil etanol. A Figura 22 ilustra o cromatograma da síntese do éster racêmico, acetato de α -metil benzil.

Figura 20. Cromatograma do padrão (*R,S*)-1-fenil etanol. Condição cromatográfica: coluna Chirasildex CB (50 m x 0,32 mm x 0,25 μ m), injetor split/splitless, detector FID, tempo de corrida total de 20 min.

Figura 21. Cromatograma do padrão (*S*)-1-fenil etanol. Condição cromatográfica: idem Figura 20.

Figura 22. Cromatograma da síntese do éster racêmico, acetato de α -metil benzil. Condição cromatográfica: idem figura 20.

Figura 23. Cromatograma da reação cinética de α -metil benzil acetato catalisada por HNL. Condição cromatográfica: idem figura 20.

A reação cinética de (*R,S*)-1-feniletanol com piridina na presença de anidrido acético à temperatura ambiente catalisada pela *Xf*HNL não mostrou resultados para a conversão do éster, excesso enantiomérico do substrato e excesso enantiomérico do produto. O desempenho desta reação usando lipases mostraram bons rendimentos e possuem enantiosseletividade (STETCA et al., 2002; HOFFMANN et al., 2011) mas para *Xf*HNL, que possui características similares à lipases, o desempenho para enantiosseletividade não foi alcançado. Devido esta reação levar uma série de etapas,

e conseqüentemente alguns dias, 3 ou 4 dias, talvez os enantiômeros deste éster podem ter sido hidrolisados e assim ter produzido o álcool racêmico.

5 Conclusão

A proteína HNL proveniente da bactéria *Xylella fastidiosa* mostrou-se ativa frente às condições realizadas para esterases. Todavia, os dados apresentados neste capítulo mostra-se que a XfHNL não possui enantiosseletividade para tal substrato. Estudos envolvendo diferentes substratos e condições de reações foram sugeridos na tentativa de obter alguma especificidade para essa proteína, mas não foi obtida.

CONCLUSÃO GERAL

- A enzima *XfHNL* é ativa para tampão sem adição de ácido cítrico como aditivo.
- A *XfHNL* catalisa as reações sugeridas e há a produção dos produtos esperados.
- Porém, não há a observação de enantiosseletividade nos substratos estudados.
- Contudo, no substrato contendo ibuprofeno há o consumo de um dos enantiômeros.

Capítulo 4

DESENVOLVIMENTO DE UM XILEMA BIOMIMÉTICO MICROFLUÍDICO NO ESTUDO DO PROCESSO DE COLONIZAÇÃO DA *Xylella fastidiosa*

Tecnologias de microfabricação de sistema microfluídico

Para a fabricação de dispositivos microfluídicos pode ser utilizadas tecnologias convencionais e alternativas. Entre as tecnologias convencionais, os processos litográficos são os mais utilizados e proporcionam a produção de microestruturas com alta resolução e definição. No entanto, nestes processos são requeridos o uso de instrumentação com um alto custo e salas “limpas” para a fabricação dos microcanais (COLTRO et al., 2007a; COLTRO et al., 2007b). Desta maneira, tem-se buscado o desenvolvimento e utilização de métodos alternativos que sejam economicamente viáveis para a microfabricação (COLTRO et al., 2007a).

Lago e colaboradores em 2003 propuseram um processo alternativo para produção de dispositivos de baixo custo feitos a partir de poliéster-toner. A impressão direta é um método que se baseia na impressão de imagens com uma impressora a laser em um filme de poliéster (transparência para retroprojeção) seguido por uma etapa de laminação a quente. Os softwares Corel Draw, Adobe Illustrator ou AutoCad, entre outros, são utilizados para desenhar as estruturas que venham a serem produzidas. O toner tem a seguinte composição: 45-55% de poliestireno e poli(metilmetacrilato) e 45-55% óxido de ferro, já o filme de poliéster tem composição de polietileno tereftalato (PET) revestido com uma camada de sílica. Os canais presentes nos microdispositivos são definidos por camadas de toner depositadas em filmes de poliéster, sendo utilizado como adesivo para a vedação desse dispositivo durante a etapa de laminação. O microcanal criado através da laminação tem uma profundidade que é determinada pela altura da camada de toner, possuindo 6 μm de toner por filme de poliéster (DUARTE, 2010; DUARTE et al.; 2010). Diz-se camada de toner simples (CTS) quando o dispositivo impresso é laminado contra apenas a um filme de poliéster branco, ou seja, sem toner, possuindo 6 μm de profundidade, e camada de toner dupla (CTD) para dispositivos que são laminados com sua imagem especular, com profundidade de 12 μm . Esses dois métodos que possuem canal de filme de poliéster e parede de toner são chamados de impressão direta (COLTRO et al.; 2010). O método proposto por Lago é um dos métodos mais simples, rápidos e de menor custo para a fabricação de dispositivos microfluídicos de poliéster-toner. A

impressão direta tem sido utilizada como método para fabricação de microchips com detecção amperométrica (COLTRO et al., 2004) e outros métodos de detecção eletroquímica (HE et al., 2005). Já se tem publicado também a utilização de toner em etapas intermediárias na produção de outros tipos de dispositivos (DANIEL e GUTZ, 2003; LIU et al., 2005; DO LAGO et al., 2004; COLTRO et al., 2007; DE JESUS et al., 2006; DUARTE et al., 2010).

A bomba é um instrumento necessário para sistemas microfluídicos (LI et al., 2011). No caso de plantas, o movimento da água através dos vasos xilemáticos se dá por diferença de potencial químico. A teoria que parece ser a melhor para explicar o fluxo de água na planta é a tensão-coesão-adesão. Quando as células das plantas perdem água, há na parte superior da planta um déficit de água, criando, assim, uma pressão negativa (ZIMMERMANN e MILBUM, 1982), chamada tensão. Devido a diminuição do potencial hídrico nas células, a concentração de soluto nessas células aumenta, e dessa maneira aumenta a pressão osmótica. Essas células ficam hipertônicas, comparadas ao xilema, e então novas moléculas de água migram para essas células. Pela força de coesão-adesão das moléculas de água, elas se mantêm unidas umas as outras, formando uma coluna e aderindo nas paredes dos vasos. O movimento da água faz mover essa coluna e se a transpiração for mais rápida, mas rápida é a ascensão da água. Desta maneira, cria-se um déficit de água no xilema da raiz, e assim há a absorção da água pela raiz e conseqüentemente ao restante da planta (CRUZ, 2006; LI et al., 2011; ZIMMERMANN et al., 1994).

A bactéria *X. fastidiosa* causadora da doença CVC, obstrui os vasos xilemáticos devido a adesão e agregação das células ao xilema. A presença de goma xantana é importante para a adesão das bactérias uma as outras e a formação do biofilme (ALVES, 2003). A produção de biofilme pela bactéria é um importante fator da patogenicidade. Esse biofilme é uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície. Estudos demonstraram que a bactéria *X. fastidiosa* pode crescer em biofilme (SOUZA et al., 2004).

Devido a escassez de estudos envolvendo biofilmes, este capítulo da tese visou a observação da formação do mesmo na superfície do microdispositivo. Buck e

Andrews, em 1999 utilizaram poliestireno e observaram que houve a produção de biofilme de *Rodospirium toruloides* sobre essa superfície.

Esse capítulo apresenta pela primeira vez o uso de microchips de PT para mimetizar os vasos condutores de seiva, xilema, para estudar o comportamento da bactéria *X. fastidiosa* dentro de um microdispositivo microfluídico.

3. Materiais e métodos

3.1 Fabricação do microchip de PT

O desenho dos dispositivos microfluídicos com intuito de simular o xilema foi feito utilizando o software gráfico Corel Draw X5. Primeiramente, foi desenvolvida uma configuração destinada exclusivamente para otimizar a passagem de líquido dentro dos reservatórios com diferentes gramaturas, produzidas com a delimitação de tons diferentes de cinza. As gramaturas foram examinadas e analisadas quanto a adesão da bactéria nestes compartimentos. A Figura 1 mostra os materiais e equipamentos utilizados para a produção do microchip de PT multicamadas.

Figura 1. Materiais e equipamentos utilizados para a produção e utilização do microchip de PT multicamadas. a) Bomba de seringa, b) Furador de papel, c) pipetadores e cortador, d) transparência, e) impressora a laser, f) laminadora.

O primeiro dispositivo (Figura 2a) foi desenvolvido com um modelo gradual de gramaturas, onde um lado não possui nenhum obstáculo e do outro os grânulos estão em intensidade máxima. Para este modelo utilizou-se camada simples de toner, que delimitou a altura do canal em μm . O segundo dispositivo (Figura 2b) também foi desenvolvido com modelo gradual de gramaturas, porém, em ambos os lados, com passagem mais fácil e sendo gradativamente preenchido pelos grânulos até completar, no meio, um espaço totalmente preenchido. Neste modelo, no entanto, utilizou-se camada dupla de toner. O terceiro modelo (Figura 2c) foi feito em camada simples de toner e quantidade de grânulos não tão intensos como os dois primeiros.

Figura 2. Representação da geometria dos dispositivos desenvolvidos. A) Gradiente de 10 a 100%. B) Gradiente de 10 a 100 a 10%. C) Gradiente de 10 a 60%.

Para a fabricação destes microchips, os microcanais de poliéster toner foram feitos por um processo de impressão direta, empregando uma impressora a laser e filmes de poliéster, utilizando camada de toner simples. Os orifícios de acesso aos microcanais foram feitos com a utilização de um perfurador de papel. Para a selagem das estruturas foi empregado uma plastificadora de documento (marca Gazela). Para a introdução dos meios, bases de ponteiros de pipetadores foram coladas com resina epóxi nos orifícios dos microchips, sendo estes os reservatórios do meio. Os canais de poliéster toner foram desenhados utilizando o software Corel Draw X5 sendo impressos diretamente sobre um filme de poliéster, para tal foi utilizado uma impressora HP Laserjet 1200 com resolução ajustada pra 600 dpi. As larguras dos microcanais foram 2 mm para os 2 microcanais pequenos e 3 mm o microcanal onde se injeta o líquido e a

profundidade depende da camada de toner depositada na transparência. As dimensões totais do microchip é de 73 mm x 25 mm x 0,4 mm (Figura 2).

3.2 Introdução da bactéria *X. fastidiosa* 9a5c ao microchip de PT

Os microdispositivos depois de fabricados foram autoclavados para a introdução da bactéria.

A bactéria *X. fastidiosa* 9a5c foi cultivada em meio de cultura BCYE (WELLS et al., 1981). As células bacterianas foram retiradas de meio agarizado, transferidas para tubos contendo 5 mL de meio BCYE líquido modificado (TRAVERNSOLO et al., 2009a) e incubadas por 3 dias a 28 °C, em agitação orbital de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas desses meios, utilizados como inóculo, e transferidas para tubos contendo 200 mL de meio BCYE e incubados por 6 dias, também a 28 °C e 150 rpm. Para introdução do meio líquido no biochip foi utilizado uma bomba de seringa com uma vazão de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$.

A introdução do meio com bactéria dentro do dispositivo microfluídico foi realizado tomando as devidas precauções de esterilização, utilizando capela de fluxo laminar, sistema fechado para não haver contaminação e mantida à temperatura ambiente.

3.3 Medida da vazão dos nutrientes

A medida da vazão foi realizada pela observação dos corantes por um microscópio ótico (Olympus). A velocidade do fluxo foi calculado pela distancia, em mm, percorrida pelo corante ao atravessar todo o microcanal, até chegar a outra extremidade pelo tempo, em segundos. Também foi realizado experimentos para o controle da vazão, no intuito de evitar grandes pressões dentro do microcanal e este poder passar livremente sem oferecer danos ao microchip. Foram analisadas diversas vazões, e o que melhor se aproximou de um fluxo de água dentro de plantas foi de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$.

4 Resultados e Discussões

Primeiramente, foi desenhada uma configuração destinada exclusivamente para avaliar a passagem de líquido dentro dos reservatórios com diferentes gramaturas (tonalidades de cinza). O primeiro dispositivo realizado, CTS, apresentou um modelo gradual de gramaturas variando as escalas de cinza de 0 a 100%, (cada escala de cinza com 1 mm de espessura) margem inferior a superior (Figura 2A). O segundo dispositivo foi produzido em CTD em ambos os lados com preenchimento gradativo das laterais para o centro do canal, variando as escalas de cinza de 0 a 100% (Figura 2B). O terceiro modelo foi feito em CTS com gradiente de cinza menos intenso em comparação com os outros modelos descritos anteriormente, em ambos os lados com preenchimento gradativo variando as escalas de cinza de 0 a 60% (Figura 2C).

Os microdispositivos foram testados inicialmente com corantes azul de metileno 10 mmol L^{-1} e/ou corante de caneta (Waterman) para padronizar as condições técnicas do modelo (Figura 1). Primeiramente os microdispositivos foram testados com corante para otimizar as condições antes de injetar meio de cultura. A Figura 3 ilustra o microchip com a solução de corante sendo percolada. É visível a preferência do líquido para as paredes do toner, dando preferência pela capilaridade, porém quando utilizado uma bomba com pequenas vazões (com $1 \mu\text{L min}^{-1}$) há o preenchimento primeiramente das partes vazias seguido do preenchimento das laterais (Figura 3).

Figura 3. Microchip sem a utilização de bomba de seringa, movimento passivo

Entretanto, quando aplicou-se uma vazão contínua de $1 \mu\text{L min}^{-1}$ por uma bomba de seringa, observou-se a deslocamento do corante primeiro para a porção central e posteriormente para as laterais, como mostrado na Figura 4 abaixo.

Figura 4. Microchip com a utilização de bomba de seringa a uma vazão ativa

Baseado nesses resultados, é possível afirmar que a fabricação do microchip no tamanho de aproximadamente 3 mm está de acordo com a anatomia dos vasos xilemáticos, uma vez que o tamanho das células vegetais encontradas no xilema tem um diâmetro médio de 2 mm para as traqueídes e de 1 a 3 mm para os elementos de vaso.

Em relação à velocidade de fluxo nos microcanais, tanto o corante quanto o meio BCYE líquido foram aplicados numa vazão constante de $1 \mu\text{L min}^{-1}$ (percorrendo $750 \mu\text{m min}^{-1}$). Meng et al. (2005) estudaram a migração da *X. fastidiosa* em microcanais de PMDS e observaram que a bactéria *X. fastidiosa* migra numa velocidade acima de $5 \mu\text{m min}^{-1}$ contra uma velocidade média de $20.000 \mu\text{m min}^{-1}$, velocidade similar ao fluxo de seiva no xilema de plantas de videira, sob transpiração intensa. A partir desses resultados, concluiu-se que a velocidade está de acordo com o experimento estudado.

Foi utilizado um fluxo constante de $1 \mu\text{L min}^{-1}$ por 24 h ininterruptas e não foi observado nenhum dano mecânico ao microdispositivo, ou seja, nestas condições o microchip funciona sem qualquer prejuízo.

4.1 Efeito da geometria do canal na velocidade do fluxo

Foi observado que a velocidade do fluxo dentro do canal preenchido com toner em alguns dos microcanais foi mais lenta quando comparada com o microcanal que não tinha obstáculos. As dimensões foram de 2 mm para cada microcanal, variando a quantidade de gramaturas preenchidas. As gramaturas com porcentagem acima de 60% de preenchimento foram descartadas, pois não houve entrada de líquido nestes microcanais. A Figura 5 ilustra o interior do microchip visto de um microscópio óptico (40x) e através dela é possível observar a dificuldade que o líquido tem para se

deslocar dentro dos microcanais, pois com 30% de preenchimento já há uma grande quantidade de toner impressos.

Figura 5. Visualização interna do microchip por microscópio Olympus, aumento de 40x.

4.2 Colonização de *X. fastidiosa* no microchip de PT

Células da bactéria *X. fastidiosa* foram cultivadas em meio BCYE agarizado e inoculado em meio BCYE líquido modificado por dois dias, D.O. observada a 600 nm de 0,3. Após dois dias de cultivo, estas células foram então introduzidas no interior do microchip através de uma bomba seringa numa velocidade de $1 \mu\text{L min}^{-1}$. Foi então feito uma perfusão por 3 horas, observada na Figura 6, e após 72 horas de perfusão, ilustrada na Figura 7. Foi observado que a *X. fastidiosa* se concentrou nos canais sem a presença de gramaturas. A *X. fastidiosa* é uma bactéria de crescimento lento, como o nome já diz, fastidioso, e como as condições dentro do canal simulam um vaso xilemático, o crescimento está de acordo com crescimento dentro do hospedeiro. Após 72 horas não foi possível observar a presença de aglomerados. As células foram aderidas no momento que entraram em contato com a superfície.

A bactéria *X. fastidiosa* foi então introduzida dentro do microdispositivo utilizando uma bomba seringa com velocidade de $1 \mu\text{L min}^{-1}$. As Figuras 6 e 7 ilustram o interior de um microchip após 3 horas de perfusão e após 72 horas de perfusão respectivamente. A *X. fastidiosa* foi introduzida com D.O. de 0,3, ou seja, ainda em crescimento, na Figura 6 percebe-se que a bactéria ainda está em fase de crescimento,

e após 72 horas, já é possível detectar alguns bastonetes, no entanto, não foi observado colônias e sim bactérias isoladas, isso pode ser devido ao fluxo contínuo de meio injetado dentro do microchip, ou então o crescimento da bactéria dentro do microdispositivo é lento e as condições presentes na planta são diferentes das condições dentro do microchip.

Figura 6. Microdispositivo biomimetizando o vaso xilemático colonizado por *X. fastidiosa* após 3 h de perfusão, (aumento de 40 x). A bactéria é apontada pela seta.

Figura 7. Microdispositivo biomimetizando o vaso xilemático colonizado por *X. fastidiosa* após 72 h de perfusão, (aumento de 40 x). A bactéria é apontada pela seta.

4.3 Observação do biofilme produzido por *X. fastidiosa*

De acordo com Stoodley, (2002), a formação do biofilme é composta por diferentes estágios, o primeiro correspondente à adesão das células na superfície, o segundo refere-se a adesão irreversível mediante a formação das substâncias de exopolissacarídeo (EPS), o terceiro pelo desenvolvimento da arquitetura do biofilme, no quarto estágio o biofilme se encontra de forma complexa com alta densidade celular, e o quinto estágio é referente à fase de dispersão das células do biofilme. A Figura 8 ilustra o biofilme produzido por *X. fastidiosa* em meio BCYE líquido modificado. Biofilme é descrito como uma comunidade bacteriana vivendo aderidas uma às outras e a uma superfície (COSTERTON e IRWIN, 1981).

Figura 8. Biofilme produzido por *X. fastidiosa* em meio BCYE líquido modificado.

X. fastidiosa tem como característica crescimento lento em meio de cultura, o diâmetro da bactéria varia de 0,6 mm após 10 dias de incubação a 28°C, podendo alcançar 1,5 mm após 30 dias, apresentando variações decorrentes do meio de cultura utilizado (COLETTA-FILHO, 2002). Pela visualização através de microscópio verificou-se a presença do biofilme aderida no microdispositivo, após 5 dias de perfusão com meio de cultura. A Figura 9 ilustra as colônias apontadas pelas setas. Podemos observar que há a formação do biofilme, pois vemos colônias de *X. fastidiosa* vivendo aderidas umas às outras. Podemos observar também colônias envolvidas numa espécie de cápsula, a goma xantana (Figuras 9a e 9b). A Figura 9c ilustra as várias colônias de *X. fastidiosa* sem a goma xantana. Assim, podemos verificar que as células de *X. fastidiosa* crescem unidas entre si com e sem a presença de exopolissacarídeo.

Desta maneira, foi possível crescer células de *X. fastidiosa* em microchip de PT e observar a formação de biofilme e a presença de goma (exopolissacarídeo - EPS).

Figura 9. Visualização da formação do biofilme no interior do microchip através de microscópio óptico.

Pela Figura 10, é possível observar a bactéria vivendo aderida uma às outras, após 7 dias com perfusão, porém é possível observar colônias menores, em comparação com 5 dias de perfusão, onde vemos colônias maiores (Figura 9c).

Após alguns dias sem a injeção de meio líquido houve a presença de algumas estruturas na forma de círculos, indício de ser a goma (Figura 11, seta amarela), ainda é possível observar a goma produzida pela bactéria (Figura 11, seta vermelha).

Figura 10. Microchip após 7 dias com perfusão do meio de cultura.

Figura 11. Microchip após 5 dias sem a injeção de meio de cultura.

5 Conclusão

De acordo com os resultados observados, os microdispositivos desenvolvidos foram eficientes para a passagem do corante entre os canais, em uma vazão constante de $1 \mu\text{L min}^{-1}$. Isso também ocorreu utilizando o meio de cultura. Estudos realizados com a inoculação da *X. fastidiosa* em meio BCYE líquido para avaliar o comportamento desta bactéria nas condições *in vitro* similares ao do xilema da plantas (*in vivo*) mostraram ser o primeiro a ser realizado em microchip de PT, e desta maneira, foi possível visualizar com clareza e de uma forma simples como a bactéria se adere e coloniza o microchip. A bomba de seringa é importante, pois simula o transporte de seiva através do xilema a uma velocidade de fluxo constante.

6 Referências

- ABBASS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.
- ALMEIDA, R. P. P.; KILLINY, N.; NEWMAN, K. L.; CHATTERJEE, S.; IONESCU, M.; LINDOW, S. E. Contribution of *rpfB* to Cell-to-Cell Signal Synthesis, Virulence, and Vector Transmission of *Xylella fastidiosa*. **The American Phytopathological Society MPMI**, v. 25, n. 4, p. 2012, pp. 453–462, 2012.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa* - adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. 122f. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ALVES, E.; LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; ISHIDA, M. L.; ANDERSEN, P. C. *Citrus sinensis* leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. **Scientia Agricola Journal**, v.66, n.2, p.218-224, 2009.
- ANDRADE, M. O.; ALEGRIA, M. C.; GUZZO, C. R.; DOCENA, C.; ROSA, M. C.; RAMOS, C. H.; 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, 2006.
- BALDASSARI, R. B.; GOES, A.; TANNURI, F. Declínio dos citros: algo a ver com o sistema de produção de mudas cítricas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 357-360, 2003.
- Banco de dados SCOP. Disponível em: <http://scop.berkeley.edu/> Acesso em 22/08/2012.
- 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 *anthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 556–566, 1997.
- BAUER, M.; GEYER, R.; BOY, M.; GRIENGL, H.; STEINER, W. Stability of the enzyme (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 343–347, 1998.
- BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; RIBEIRO, L. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; AMORIM, L. Escalas Diagramáticas para Avaliação da Severidade do Cancro Cítrico. **Fitopatologia. brasileira**, v. 30, n. 4, p.387-393, 2005.

BISOGNIN, Gustavo. Utilização de máquinas de suporte vetorial para predição de estruturas terciárias de proteínas. 2007. 101f. Dissertação (Computação Aplicada) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROVETTO, M.; GAMENARA, D.; MÉNDEZ, P.S.; GUSTAVO A. SEOANE, G. A. C-C Bond-Forming Lyases in Organic Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 4346-4403, 2011.

BROWN, T. L.; LEMAY JR., H. E.; BURSTEN, B. E. **Química ciência central**. Rio de Janeiro: LTC, 1997, 702 p.

BUCK, J. W.; ANDREWS, J. H. Localized, positive charges mediate adhesion of *Rhodospirium toruloides* to barley leaves and polystyrene. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2179-2183, 1999.

CABIROL, F. L.; HANEFELD, U.; SHELDON, R. A. Immobilized Hydroxynitrile Lyases for Enantioselective Synthesis of Cyanohydrins: Sol-Gels and Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 12-13, p. 1645-1654, 2006.

CAMPANHARO J.C.; LEMOS M.V.F.; LEMOS E.G.M. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v. 46, p. 99–102, 2003.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARUSO, C. S. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa***. 159f. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CARUSO, C. S.; TRAVENSOLO, R. F.; BICUDO, R. C.; LEMOS, E. G. M.; ARAÚJO, A. P. U.; CARRILHO, E. α -Hydroxynitrile lyase protein from *Xylella fastidiosa*: Cloning, expression, and characterization. **Microbial Pathogenesis**, v.47, p. 118-127, 2009.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CASERTA, R.; TAKITA, M. A.; TARGON, M. L.; ROSSELLI-MURAI, L. K.; SOUZA, A. P.; PERONI, L.; STACH-MACHADO, D. R.; ANDRADE, A.; LABATE, C. A.; KITAJIMA,

E. W.; MACHADO, M. A.; SOUZA, A. A. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4250-4259, 2010.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y.C.; SHAW, P.D.; FARRAND, S.K. Production of acyl-homoserina lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 11, n. 11, p. 1119-1129, 1998.

CHANG, C. J.; DONALDSON, R. C. Nutritional requirements of *Xylella fastidiosa*, which causes Pierce's disease in grapes. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46,n.3, p.291-293, 2000.

CHATTERJEE, S.; NEWMAN, K. L.; LINDOW, S. Cell-to-Cell Signaling in *Xylella fastidiosa* Suppresses Movement and Xylem Vessel Colonization in Grape. **The American Phytopathological Society**, v. 21, n. 10, pp. 1309–1315, 2008a.

CHATTERJEE, S.; WISTROM, C.; LINDOW, S. E. A cell–cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7. p. 2670–2675, 2008b.

COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Evaluation genetic structural of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.

COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; DA SILVA, H. D. T.; RICHETER, E. M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; DO LAGO, C. L.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21, p. 3832-3838, 2004.

COLTRO, W.K.T.; DE JESUS, D. P.; DA SILVA, J.A.F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**, v. 31, p. 2487-2498, 2010.

COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, JESUS, D. P.; DA SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L. E. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007a.

COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E., A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 931–934, 2007b.

CORDWELL, S. J.; NOUVENS, A. S.; BRADLEY, J. Comparative proteomics of bacterial pathogens. **Proteomics**, v. 1, n.2, p. 461-472, 2001.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.

COSTERTON, J. W.; IRWIN, R. T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 299-324, 1981.

CRUZ, G. S. APONTAMENTOS DE FISIOLOGIA VEGETAL Capítulo I: As Plantas e a Água. UNIVERSIDADE DE COIMBRA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA, 2006.

DADASHIPOUR, M.; ASANO, Y. Hydroxynitrile Lyases: Insights into Biochemistry, Discovery, and Engineering. **American Chemical Society Catalysis**, v. 1, p. 1121-1149, 2011.

DANIEL, D., GUTZ, I. G. R., Quick production of gold electrode sets or arrays and of microfluidic flow cells based on heat transfer of laser printed toner masks onto compact discs. **Electrochemistry Communication**, v. 5 n. 9, p. 782–790, 2003.

DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic culture of the bacteria associated with Phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 309-314, 1981.

DECKER, E. M. The ability of direct fluorescence-based, two color assays to detect different physiological states of oral streptococci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 188-192, 2001.

DE JESUS, D. P.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Microchip free-flow electrophoresis on glass substrate using laser-printing toner as structural material. **Electrophoresis**, v. 27, n. 24, p. 4935–4941, 2006.

DE LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v. 82, p. 94-97, 1998.

DO LAGO, C. L.; DE JESUS, D. P.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; DA SILVA, J. A. F., Microfluidic devices obtained by thermal toner transferring on glass substrate. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3825–383, 2004.

DO LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.

DONG, Y. H.; WANG, L. H.; ZHANG, L. H. Quorum quenching microbial infections – mechanisms and implications. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 362, p. 1201–1211, 2007.

DOW, J. M.; DANIELS, M. J. Xylella genomics and bacterial pathogenicity. **Yeast**, v. 17, n. 1, p. 263-271, 2000.

DUARTE, G. R. M. **Análises Genéticas em Sistemas Microfabricados**. 158 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP, 2010.

DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; LITTLEWOOD, J. L.; HAVERSTICK, D. M. FERRANCE, J. P.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads, **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 531-537, 2010.

DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 212-216, 1998.

EBERHARD, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 109, n. 3, p. 1101-1105, 1972.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 6^a ed., Springer, 2011.

FECHTER, M. H.; GRIENGL, H. Hydroxynitrile lyases: biological sources and application as biocatalysts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 287-294, 2004.

FEIL, H.; PURCELL, A. H. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. **Plant Disease**, v. 85, n. 12, p. 1230-1234, 2001.

FESNER, W-D.; ANTHONSEN, T. **Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions**. Wiley-VCH, p. 26, 2009.

FRENCH, W. I.; STASSI, D. L. Response of phony-infected peach trees with gibberelic acid. **HortScience**, v. 13, n. 2, p. 158-159, 1978.

Fundecitrus. Disponível em: www.fundecitrus.com.br - Manual de CVC 2008. Acesso em 02/09/2012.

GONZÁLEZ-FERNANDES, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jbb/2010/932527/>. Acesso em: 29 abr. 2013.

GUILHABERT, M. R.; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xylella fastidiosa* Antivirulence Genes: Hemagglutinin Adhesins Contribute to *X. fastidiosa* Biofilm Maturation and Colonization and Attenuate Virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 8, p. 856-868, 2005.

GUO, Y.; ZHANG, Y.; LI, J. L.; WANG, N. Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **The American Phytopathological Society MPMI**, v. 25, n. 2, p. 165–179, 2011.

GREGORY, R. J. H. Cyanohydrins in Nature and the Laboratory: Biology, Preparations, and Synthetic Applications. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 3649-3682, 1999.

GRIENGL, H.; SCHWAB, H.; FECHTER, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. **Tibtech**, v.18, p. 252-256, 2000.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. G. Chiral separation principle. **Methods in Molecular Biology**, v. 243, p. 1-28, 2008.

GUTERRES, S. B. **Busca de biomarcadores para esquizofrenia em plaquetas utilizando eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE) e espectrometria de massas**. 2011. 186 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press. 2002. 345 p.

HANEFELD, U.; STRAATHOF, A. J. J.; HEIJNEM, J. J. Study of the (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: mechanistic implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1432, p. 185-193, 1999.

HASSLACHER, M.; KRATKY, C.; GRIENGL, H.; SCHWAB, H.; KOHLWEIN, S. D. Hydroxynitrile Lyase from *Hevea brasiliensis*: Molecular characterization and Mechanism of enzyme catalysis. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 27, p. 438-449, 1997.

HAYWARD, A. C. **The hosts of Xanthomonas. Xanthomonas** (Swings G & Civerolo EL, eds), p. 1–119. Chapman and Hall, London, 1993.

HAYWARD, A. .C; MARIANO, R. L. Mecanismos de patogenicidade e virulência de procariotos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 199-234, 1997.

HE, F. Y.; LIU, A. L.; YUAN, J. H.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; XIA, X. H. Electrokinetic control of fluid in plastified laser-printed poly(ethylene terephthalate)-

toner microchips. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 192– 197, 2005.

HE, Y. W.; XU, M.; LIN, K.; ALVIN NG, Y. J.; WEN, C. M.; WANG, L. H.; LIU, Z. D.; ZHANG, H. B.; DONG, Y. H.; DOW, J. M.; ZHANG, L. H. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell–cell communication-dependent genes and functions. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 610–622, 2006.

HE, Y. W.; WANG, C.; ZHOU, L.; SONG, H.; DOW, J. M.; ZHANG, L. H. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain–protein interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 33414–33421, 2006a.

HENDSON, M.; PURCELL, A. H.; CHEN, D.; SMART, C.; GUILHABERT, M.; KIRKPATRICK, B. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. **Applied Environmental Microbiology** ; v. 67, p. 895-903, 2001.

HOFFMANN, I.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G. Enantioselective Resolution of (*R,S*)-1-Phenylethanol Catalyzed by Lipases Immobilized in Starch Films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1559-1567, 2011.

HOLT, J.; HANEFELD, U. Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins. **Current Organic Synthesis**, v. 6, p. 15-37, 2009.

HONGWEI, Y.; JINCHUAN, W.; BUN, C. C. Kinetic Resolution of Ibuprofen Catalyzed by *Candida rugosa* Lipase in Ionic Liquids. **Chirality**, v. 17, p. 16–21, 2005.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, p. 271-290, 1989.

HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, n. 10, p. 1056-1066, 2002.

HÖRTH, P.; MILLER, C. A.; PRECKEL, T.; WENZ, C. Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics* v. 5, p. 1968-1974, 2006.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAIER, B.; DONOSO, G.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007–2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 285-314, 2009.

KARA, S.; LIESE, A. Enzymatic C-C formation asymmetric. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**, John Wiley, 2010, p. 1-16.

KHORDUSKY, A. B.; PETER, B. J.; COZZARELLI, N. R.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O.; YANOFSKY, C. DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escheria coli*. **Proceedings of National Academic of Sciences USA**, v. 97, n. 22, p. 12170-12175, 2000.

KLEMPER, N.; PICHLER, U.; GRIENGL, H. Synthesis of α,β -unsaturated (S)-cyanohydrins using the oxynitrilase from *Hevea brasiliensis*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 6, n. 4, p. 845-848, 1995.

KOBAYASHI, Y.; HAYASHI, H.; MIYAJI, K.; INOUE, S. Asymmetric Transcyanohydration. **Chemistry Letters**, p. 931-934, 1986.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. Chiral separation by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v. 34, n. 9-10, p. 505-512, 1992.

LAMBAIS, M. R.; GOLDMAN, M. H. S.; CAMARGO, L. E. A.; GOLDMAN, G. H. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Current Opinion Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 459-462, 2000.

LEE, B.; RAJU, B. C. ; NYLAND, G.; GOHEEN, A.C. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v. 72, n. 7, p. 886-888, 1982.

LEMOIS, E. G. M.; ALVES, L. M. C.; CAMPANHARO, J. C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiology Letters**, v. 219, p. 39-45, 2003.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review** v. 50, n. 3, p. 308-355, 1984.

LI, M. J.; LIU, C.; ZHANG, K. P.; KE, X.; XU, Z.; LI, C. Y.; WANG, L. D. A micropump based on water potential difference in plants. **Microfluid Nanofluid**, v. 11, p. 717-724, 2011.

LILJEBLAD, A.; KANERVA, L. T. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure β -amino acids. **Tetrahedron**, v. 62, n. 25, p. 5831-5854, 2006.

LIU, A. L.; HE, F. Y.; WANG, K.; ZHOU, T.; LU, Y.; XIA, X. H. Rapid method for design and fabrication of passive micromixers in microfluidic devices using a directprinting process. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 9, p. 974-978, 2005.

LIU, Y.; WANG, F.; TAN, T. Cyclic Resolution of Racemic Ibuprofen via Coupled Efficient Lipase and Acid-Base Catalysis. **Chirality**, v. 21, p. 349–353, 2009.

LONG, W. S.; KAMARUDDIN, A. H.; BHATIA, S. Enzyme kinetics of kinetic resolution of racemic ibuprofen ester using enzymatic membrane reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 4957 – 4970, 2005.

LOPES, F. F.; NEVES, M. F.; KALAKI, R. B.; TROMBIN, V. G. **O retrato da citricultura brasileira**. CitrusBr, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LURIE, I. S. Separation selectivity in chiral and achiral capillary electrophoresis with mixed cyclodextrins. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1-2, p. 297-307, 1997.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; PAVANI, L. C. Deficiência híbrida agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'natal' Bragantia, **Campinas**, v.66, n.3, p.373-379, 2007.

MADALOZZO, Aline Dutra. **SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS UTILIZANDO UMA LIPASE RECOMBINANTE DE *Rhizopus oryzae***. 2011.149f. Dissertação (Ciências Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MADAMWAR, D.; NIDETZKY, B. Preface – Biocatalysis. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 1, 2012.

MARIÑO, G. B.; BEDMAR, E. J. Detection, purification and characterization of quorum-sensing signals molecules in plant-associated bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 197-209, 2001.

MENG, Y.; LI, Y.; GALVANI, C. D.; HAO, G.; TURNER, J. N.; BURR, T. J.; HOCH, H. C. Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven Twitching Motility. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5560-5567, 2005.

MICHEL, P. E.; REYMOND, F.; ARNAUD, I. L.; JOSSERAND, J.; GIRAULT, H. H.; ROSSIER, J. S. Protein fractionation in a multicompartiment device using OFFGEL isoelectric focusing. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3-11, 2003.

MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A. P.; GINÉ, M. F. Sistemas interfaciados de análise por injeção de fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): Desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 412-419, 2002.

NANDA, S.; KATO, Y.; ASANO, Y. A new (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Prunus mume*: asymmetric synthesis of cyanohydrins. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10908–10916, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. Worth Publisher, 2002.

NEWMAN, K. L.; ALMEIDA, R. P. P.; PURCELL, A. H.; LINDOW, S. E.; Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Proc Natl Acad Sci USA v. 101, n. 6, p. 1737–1742, 2004.

NEWMAN, K. L.; CHATTERJEE, S.; HO, K. A.; LINDOW, S. E. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 326–334, 2008.

OGNYANOV, V. I.; DATCHEVA, V. K.; KYLER, K. S. Preparation of Chiral Cyanohydrins by an Oxynitrilase-Mediated Transcyanation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 18, p. 6992-6996, 1991.

OKROB, D.; PARAVIDINO, M.; ORRU, R. V. A.; WIECHERT, W.; HANEFELD, U.; POHL, M. Hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of reaction parameters for enantiopure cyanohydrin synthesis by pure and immobilized catalyst. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2399-2408, 2011.

OLIVEIRA, J. R. **Hidrólise enzimática de nitrilas pelo fungo de origem marinha *Aspergillus sydowii* CBMAI 934**. 147f. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PARAVIDINO, M.; SORGEDRAGER, M.J.; ORRU, R.V.A.; HANEFELD, U. Activity and enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase MeHNL in dry organic solvents. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, p. 7596-7604, 2010.

PEARSON, J. P.; GRAY, B. H.; GREENBERG, E. P. The structure of the autoinducer molecule required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. **Proceedings of National Academic of Sciences USA**, v. 91, n. 1, p. 179-201, 1994.

PIERRY, P. M. **Pirosequencia e análise comparativa de genomas do fitopágeno *Xylella fastidiosa***. 144 f. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PIO, R. M.; MINAMI, K.; FIGUEIREDO, J. O. Características do fruto da variedade span amareicana (*Citrus reticulata* Blanco): Uma tangerina do tipo 'poncã' de maturação precoce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 325-329, 2001.

PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, p. 131-151, 1996.

REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZELL III, R. F.; ANDERSEN, P. C. The Biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology, **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 243–70, 2004.

REDDY, J.D.; REDDY, S. L.; HOPKINS, D. L.; GABRIEL, D. W. TolC is Required for Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* Grapevines. **The American Phytopathological Society**, v. 20, n.4, p. 403-410, 2007.

REETZ, M.T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology** v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

RIBEIRO, S. S.; OLIVEIRA, J. R.; PORTO, A. L. M. Lipase-catalyzed kinetic resolution of (±)-mandelonitrile under conventional condition and microwave irradiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society** , v. 23, p. 1395-1399, 2012.

RINGENBERG, R.; LOPES, J. R. S.; BOTTON, M.; AZEVEDO-FH, W. S.; CAVICHIOLI, R. R. Análise Faunística de Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) na Cultura da Videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 187-193, 2010.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃE, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. p. 1-12. (Comunicado Técnico 136).

RÖMLING, U.; GOMELSKY, M.; GALPERIN, M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 629–639, 2005.

ROURE, F.; DUCRET, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. Enantioselective esterification of racemic ibuprofen in solvent media under reduced pressure. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 266-270, 1997.

RYAN, R. P.; FOUHY, Y.; LUCEY, J. F.; CROSSMAN, L. C.; SPIRO, S.; HE, Y. W.; ZHANG, L. H.; HEEB, S.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P.; DOW, J. W. Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 17, p. 6712–6717, 2006.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 3523-3535, 2001.

SCARPARI, L. M.; LAMBAIS, M. R.; SILVA, D. S.; CARRARO, D. M.; CARRER, H. Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 1, p. 83–92, 2003.

SHARMA, M.; SHARMA, N. N.; BHALLA, T. C. Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 279–294, 2005.

SHAW, P. D.; PING, G.; DALY, S.; CHA, C.; CRONAN JR., J. E.; RINEHART, K. L.; FARRAND, S. K. Detecting and characterizing acyl-homoserine lactone signal molecules by thin layer chromatography. *Proceedings of National Academic of Sciences USA*, v. 94, n. 12, p. 6036-6041, 1997.

SHIBUKAWA, A.; LLOYD, D. K.; WAINER, I. W. Simultaneous chiral separation of leucovorin and its major metabolite 5-methyl-tetrahydrofolate by capillary electrophoresis using cyclodextrin as quiral selectors: Estimation of the formation constant and mobility of the solute-cyclodextrin complexes. **Chromatographia**, v. 35, n. 7/8, p. 419-429, 2005.

SIFRI, C. D. Quorum sensing: Bacteria talk sense. **Healthcare Epidemiology**, v. 47, p. 1070-1076, 2008.

SILVA, D. S. **Análise dos proteomas extracelulares e do acúmulo de moléculas sinais durante o crescimento de *Xylella fastidiosa* 9a5c in vitro**. 93f. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SILVERMAN, R. B. The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions. San Diego: **Academic Press**, 2000. 717 p.

SIMIONATO, A. V. C.; DA SILVA, D. S.; LAMBAIS, M. R.; CARRILHO, E. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. **Journal of Mass Spectrometry** v. 42, p. 490–496, 2007.

SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P. F.; ABREU, A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M. C.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J. M.; BRIONES, M. R. S.; BUENO, M. R. P.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E. A.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C. R.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, V. C. A.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANÇA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C. C.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MADEIRA, H. M. F.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A. L.; MARTINS, E. M. F.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F. M.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; NETTO,

L. E. S.; NHANI, A.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A. G.; PEREIRA, H. A.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; ROSA, A. J. M.; ROSA JR, V. E.; SÁ, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C. R.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, F. R.; SILVA JR, W. A.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L. Z.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCE, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKE, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000.

SIÓDZIAK, T.; RUMINSKI, J. K.; MARSZA, M. P. Application of Lipases from *Candida rugosa* in the Enantioselective Esterification of (*R,S*)-Ibuprofen. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1-6, 2012.

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 signaling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 986-1003, 2000.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bichinchonic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

SMOLKA, M. B.; MARTINS, D.; WINCK, F. V.; SANTORO, C. E.; CASTELLARI, R. R.; FERRARI, F.; BRUM, I. J. GALEMBECK, E.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics**, v. 3, p. 224-237, 2003.

SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica 1**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SOUZA, A. A. Análise comparativa da expressão de genes de *Xylella fastidiosa* associados à patogenicidade e formação de biofilme. 100f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

STETCA, D.; ARENDS, I. W. C. E.; HANEFELD, U. Synthesis of a racemic ester and its lipase-catalyzed kinetic resolution. *Journal of Chemical Education*, v. 79, n. 11, p. 1351-1352, 2002.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v.56, p.187-209, 2002.

TANG, J. L.; LIU, Y. N.; BARBER, C. E.; DOW, J. M.; WOOTTON, J. C.; DANIELS, M. J. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular and General Genetics**, v. 226, n. 3, p. 409–417, 1991.

TAO, F.; SWARUP, S.; ZHANG, L. H. Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 3159–3170, 2010.

TAO, H.; BAUSH, C.; RICHMOND, C.; BLATTNER, F. R.; CONWAY, T. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimum and rich media. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6425-6440, 1999.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TORRES, P. S.; MALAMUD, F.; RIGANO, L. A.; RUSSO, D. M.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; ZORREGUIETA, A.; BOUARAB, K.; DOW, J. M.; VOJNOV, A. A. Controlled synthesis of the DSF cell–cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 2101-2109, 2007.

TRAVERNSOLO, R. F. Análise da expressão gênica de *Xylella fastidiosa* por microarranjos de DNA. 116f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Jaboticabal, 2004.

TRAVERNSOLO, R. F.; CARARETO-ALVES, L. M.; COSTA, M. V. C. G.; LOPES, T. J. S.; CARRILHO, E.; LEMOS, E. G. M. *Xylella fastidiosa* gene expression analysis by DNA microarrays. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 2, p. 340-353, 2009a.

TRAVERNSOLO, R. F. ; COSTA, M. V. C. G.; CARARETO-ALVES, L. M.; CARRILHO, E. ; LEMOS, E. G. M. Production of DNA microarray and expression analysis of genes from *Xylella fastidiosa* in different culture media. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 555-566, 2009b.

TRIBL, F.; LOHAUS, C.; DOMBERT, T.; LANGENFELD, E.; PIECHURA, H.; WARSCHIED, B.; MEYER, H. E.; MARKUS, K. Towards multidimensional liquid chromatography separation of proteins using fluorescence and isotope-coded protein labelling for quantitative proteomics. **Proteomics**, v. 8, p. 1204–1211, 2008.

VEUM, L.; HANEFELD, U.; PIERRE, A. The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol-gel matrix. **Tetrahedron**, v. 60, p. 10419-10425, 2004.

VEUM, L.; KANERVA, L. T.; HALLING, P. J.; MASCHMEYER, T.; HANEFELD, U. Optimisation of the Enantioselective Synthesis of Cyanohydrin Esters. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 347, p. 1015-1021, 2005.

VOEGEL, T. M.; WARREN, J. G.; MATSUMOTO, A.; IGO, M. M.; KIRKPATRICK, B. C. Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* haemagglutinin adhesins. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 2172-2179, 2010.

VON BODMAN, S. B.; BAUER, W. D.; COPLIN, D. L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 455-482, 2003.

VON LANGERMANN, J.; GUTERL, J-K.; POHL, M.; WAJANT, H.; KRAGL, U. Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 155-161, 2008.

WANG, L. H.; HE, Y.; GAO, Y.; WU, J. E.; DONG, Y. H.; HE, C.; 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.

WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H.-Y.; WEISBERG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J.; W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.

WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; NYLAND, G.; LOWE, S. K. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach disease. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 357-63, 1981.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J.; SALMOND, G. P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiological Review** v. 25, n. 4, p. 365-404, 2001.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1995.

WON, K.; HONG, J-K.; KIM, K-J.; MOON, S-J. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 264-269, 2006.

XIE, Y-C.; LIU, H-Z.; CHEN, J-Y. *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification of racemic ibuprofen and chemical hydrolysis of S-ester formed. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 5, p. 455-458, 1998.

YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R.; DALLA PRIA JR, W.; FELIPPE, M. R.; MIRANDA, V. S.; TEIXEIRA, D. C.; LOPES, J. R. S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 178-181, 2002.

YUCHUN, X.; HUIZHOU, L.; JIAYONG, C. Kinetics of base catalyzed racemization of ibuprofen enantiomers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 21–26, 2000.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. **Science**, v. 224, n. 4654, p. 1249-1251, 1984.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

ZHANG, L. H.; DONG, Y. H. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Molecular Microbiology** v. 53, n. 6, p. 1563–1571, 2004.

ZIMMERMANN, U.; MEINZER, F. C.; BENKERT, R.; ZHU, J.J.; SCHNEIDER, H.; GOLDSTEIN, G.; KUCHENBROD, E.; HAASE, A. Xylem water transport: is the available evidence consistent with the cohesion theory? **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 1169-11, 1994.

ZIMMERMANN, M. H.; MILBUM, J. A. Transport and storage of water. **Physiological Plant Ecology II Encyclopedia of Plant Physiology**, v. 12/B, p. 135-151, 1982.

2-D ELECTROPHORESIS, using immobilized pH gradients, principles and methods – GE Healthcare. Disponível em:
<http://genomics10.bu.edu/jtullai/proteomics_resources/2D-Principles-2nd_edition.PDF
> Acesso em: 27 abr. 2013.