Universidade Estadual de Campinas Instituto de Física "Gleb Wataghin"

# Investigação de Processos Físico-Químicos na Adesão e Desenvolvimento de Biofilmes de *Xylella fastidiosa*

**Gabriela Simone Lorite** 

# Orientadora: Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta

Tese apresentada ao Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna Gabriela Simone Lorite e aprovada pela comissão julgadora.

monicalourst

Campinas, Junho de 2011

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR VALKÍRIA SUCCI VICENTE – CRB8/5398 - BIBLIOTECA DO IFGW UNICAMP

Lorite, Gabriela Simone, 1983-Investigação de processos físico-químicos na adesão e desenvolvimento de biofilmes de *Xylella fastidiosa /* Gabriela Simone Lorite -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Mônica Alonso Cotta. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

 Biofilme. 2. Xylella fastidiosa. 3. Hidrofobicidade.
Superfície de celulose. 5. Microscopia de força atômica. 6. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier com reflexão atenuada total.
Cotta, Mônica Alonso. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

L892i

Título em inglês: Investigation on physico-chemical processes during adhesion and biofilm development of Xylella fastidiosa Palavras-chave em inglês: Biofilms Xylella fastidiosa Hydrophobicity Cellulose surface Atomic force microscopy Attenuation total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy Área de Concentração: Biofísica Titulação: Doutor em Ciências Banca Examinadora: Mônica Alonso Cotta [Orientador] Ângela Maria Moraes Fábio de Lima Leite Ricardo Meurer Papaléo Mario Noboru Tamashiro Data da Defesa: 28-06-2011 Programa de Pós-Graduação em: Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE GABRIELA SIMONE LORITE – RA 8769, APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN" DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 28/06/2011.

#### COMISSÃO JULGADORA:

mon al a lat

Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta – DFA/IFGW/UNICAMP

(Orientadora da Candidata)

Profa. Dra. Angela Maria Moraes – DPB/FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite - UFSCAR

Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo - FAFIS/PUCRS

Prof. Dr. Mario Noboru Tamashiro – DFA/IFGW/UNICAMP

A Deus, Nosso Pai, que nos concede a inteligência e a oportunidade diária do aprendizado para nosso aprimoramento e sua aplicação no bem.

Aos meus pais, por serem exemplo de luta diária na conquista de nossos objetivos, pelo apoio e carinho, com todo meu amor DEDICO esta vitória.

A minha sempre AMIGA e orientadora Mônica Cotta pela oportunidade da conclusão deste trabalho e pelo aprendizado da vida OFEREÇO.

# Agradecimentos

Agradeço a Deus por cada oportunidade singular da vida.

Em especial, à minha Orientadora de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado, a professora Mônica Alonso Cotta, por cada oportunidade de aprender e evoluir como profissional e pessoa, pelas discussões e apoio, pela persistência e, sobretudo, pela amizade que existirá para todo sempre.

À pesquisadora Dra. Alessandra Alves de Souza (Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC) pela produtiva colaboração, pela paciência, por me fornecer as 'ferramentas' e o conhecimento prático da microbiologia, pelo incentivo e amizade.

Aos Professores Dr. Boris Mizaikoff e Dra. Christina Kranz (Universidade de Ulm, Alemanha) pela colaboração, oportunidade e experiência adquirida em seus laboratórios.

Aos Professores Dr. Mario Noboru Tamashiro (DFA/IFGW/UNICAMP), Dra. Ângela Maria Moraes (DPB/FEQ/UNICAMP), Dr. Ricardo Meurer Papaléo (FAFIS/PUCRS) e Dr. Fábio de Lima Leite (UFSCAR – Sorocaba) por participarem como membros da comissão julgadora deste trabalho e contribuírem para a melhora desta tese.

Ao Professor Dr. José Roberto Bortoleto (UNESP – Sorocaba) pelo uso do goniômetro e, principalmente, pela grande amizade que me acompanha desde os tempos da Iniciação Científica quando ele ainda realizava seu doutorado com a Profa. Mônica.

Aos amigos do Centro APTA Citros Sylvio Moreira pelo apoio, amostras e medidas, em particular, a incrível Carol que sempre esteve disposta a me ensinar e auxiliar pessoalmente ou à distância e ao Juarez que pacientemente me ensinou desde da preparação das amostras até a realização dos experimentos de expressão gênica.

Aos meus colegas de laboratório da Universidade de Ulm pela ajuda, paciência e pelas experiências culturais.

Ao João Hermes pelo apoio, incentivo, aprendizado, 'quebra-galhos', medidas, discussões e amizade destes 10 anos de convívio no laboratório.

Aos Professores Dr. Varlei Rodrigues e Dr. Daniel Ugarte que sempre acompanharam, motivaram e contribuíram para minha formação profissional ao longo destes anos.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Douglas, Murilo, Richard, Alberto, Duber, Thalita, Ângela e Antônio (Totó) pela agradável convivência, apoio, ajuda e amizade.

À querida Márcia por me ensinar as 'burocracias' da pesquisa e, sobretudo, pela inestimável amizade.

À Flávia e Helô da secretaria do DFA por toda ajuda e dedicação.

À Maria Ignez, Armando, Gilvani e João da secretaria de pós-graduação do IFGW pela simpatia, incentivo e todos os serviços eficientemente prestados.

Aos meus amados pais, Roberto e Isabel, pela motivação, paciência, valores morais e éticos, por me ensinarem que o conhecimento é o único patrimônio que ninguém poderá 'roubar' de mim, pelo amor incondicional dedicado.

À irmã que escolhi, minha inestimável amiga Janaína, por todos os incríveis momentos que temos compartilhado desde a Graduação, pelo apoio, incentivo e 'quebra-galhos', que esta amizade perdure para sempre.

Ao meu querido Samuli, por ter me encontrado, pelo apoio nesta fase final e pela paciente espera do final do doutorado para o nosso reencontro em terras distantes.

À minha adorável família pela torcida, apoio e carinho de todo sempre.

Às minhas amigas Cris e Zezé pelo apoio, carinho e por me acolherem em seus lares amorosamente quando precisei.

À querida Isabella Cotta pelo exemplo de força e superação que me acompanhará sempre.

À minha amiga Renata Rodrigues pela torcida, pela companhia nos congressos, pelas ótimas e construtivas conversas.

Às minhas amigas Ana Cláudia, Ludmila, Lilian, Magali e Ritinha pela forte torcida e apoio.

A todos àqueles que aqui não estão citados, mas de uma forma ou outra foram importantes, e sabem disso, durante este período.

Ao IFGW e UNICAMP pelo aprendizado, apoio e infra-estrutura.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro na manutenção e infra-estrutura do laboratório.

Em especial, à FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e pelo convênio FAPESP-DAAD que viabilizou meu estágio na Universidade de Ulm, Alemanha.

Nenhum campo da ciência é passível de ser esgotado, de modo que sempre há lacunas a serem preenchidas pelos estudiosos.

(pelo espírito Ângelo Inácio, psicografado por Robson Pinheiro)

#### Resumo

Apresentamos nesta tese uma investigação dos processos físico-químicos da adesão e desenvolvimento de biofilmes da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* (Xf) em diferentes superfícies. Este estudo visa corroborar ou complementar diferentes aspectos dos modelos atualmente em discussão para biofilmes bacterianos, além de, num caráter tecnológico, fornecer subsídios para um eventual controle da formação dos biofilmes de Xf. Para isso utilizamos uma abordagem diferenciada à comumente empregada em biologia - e mais próxima à ciência dos materiais - visando isolar e quantificar a relevância dos parâmetros que contribuem na formação de um biofilme em diferentes superfícies, tentando aproximá-las do xilema da planta.

Nossos resultados mostram uma semelhança de desenvolvimento (forma, tamanho e quantidade) nos biofilmes de Xf cultivados em superfícies de vidro e Si, e um melhor desenvolvimento dos biofilmes em Si do que nas superfícies de etil celulose, EC, e acetato de celulose, AC. De um ponto de vista fenomenológico, os biofilmes apresentam diferentes estruturas, taxa de desenvolvimento e tendências na expressão gênica entre superfícies com e sem presença de celulose derivatizada.

Na caracterização das superfícies utilizadas consideramos o efeito do meio de cultura em suas propriedades. Nas superfícies de vidro e Si, constatamos a formação de um filme condicionante devido à adsorção dos constituintes deste meio. O grau de hidrofobicidade das superfícies de vidro e Si diminui significativamente após contato com o meio de cultura enquanto as superfícies de celulose derivatizada apresentam pouca (EC) ou nenhuma alteração (AC); observamos também um aumento do potencial de superfície (PS) para Si e EC e, ainda, uma diminuição de PS em AC. Estas evidências sugerem uma correlação entre PS mais altos e grau de hidrofobicidade baixos com a presença de biofilmes de Xf em maior número e tamanho. Além disso, medidas de espectroscopia de força utilizando ponta funcionalizada com a proteína de adesão XadA1 evidenciam também um comportamento distinto na superfície de AC. Estes resultados apontam para a importância da interação eletrostática no processo inicial de adesão da bactérias às superfícies estudadas. Por fim, a presença de material extracelular ao redor dos biofilmes e células de Xf em superfícies de vidro e Si foi observada indicando a presença de uma matriz exopolimérica protetora. Espectroscopia de infravermelho mostra a presença de polissacarídeos - constituinte da matriz polimérica - desde o estágio inicial de formação do biofilme, indicando uma possível contribuição dessa matriz para o processo de adesão que precede o desenvolvimento do biofilme.

#### Abstract

In this work, we report an investigation on relevant physicochemical processes of bacterial surface adhesion and biofilm development for the phytopathogen *Xylella fastidiosa* (Xf) on different surfaces. This study aims to corroborate or supplement different aspects of the bacterial biofilms models currently under discussion and, in a technological point of view, provides experimental input for an eventual control of Xf biofilm formation. For this purpose, we have used an approach not commonly found in biology – and more similar to materials science – in order to isolate and quantify the relevance of the parameters that contribute to the formation of a biofilm on different surfaces, as well as trying to make these surfaces closer to the plant xylem.

Our results show a similar development (shape, size and quantity) for Xf biofilms grown on Si and glass surfaces, and an improved development of biofilms grown on Si than on ethyl cellulose, EC, and cellulose acetate, AC. Under a phenomenological point of view, biofilms present different structures, rate of development and trends in gene expression between surfaces with and without the presence of derivatized cellulose.

In order to characterize the surfaces, we considered the effect of culture medium on their properties. In Si and glass surfaces, we observe the formation of a conditioning film due to adsorption of the constituents of the culture medium. The degree of hydrophobicity of glass and Si surfaces decreases significantly after contact with this medium. On the other hand, cellulose derivatized surfaces present lower (EC) or no (AC) modifications of this property. In addition, we observed an increase in the surface potential (SP) for Si and EC and also a SP decrease for AC. These evidences suggest a correlation between higher SP values and lower degree of hydrophobicity with the presence of biofilms of Xf in larger numbers and size. Furthermore, force spectroscopy measurements using a functionalized tip with the adhesion protein *XadA1* also show a different behavior on the AC surface. These results reveal the importance of electrostatic interaction in the initial bacterial adhesion for the surfaces studied here. Finally, the presence of extracellular material around the Xf cells and biofilms on glass and Si surfaces was observed indicating the presence of a protective exopolymeric matrix. Infrared spectroscopy shows the presence of polysaccharides - a constituent of the polymeric matrix from the very initial stages of biofilm formation, indicating a possible contribution of this matrix for the adhesion process which precedes biofilm development.

# Abreviações

AC	Superfície recoberta com acetato de celulose		
AFM	Microscopia de Força atômica (do inglês Atomic Force Microscopy)		
ATR – FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com		
	Reflexão Atenuada Total (do inglês Attenuated Total Reflection-Fourier		
	Transform Infrared)		
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês bovine serum albumin)		
cDNA	Fita complementar de RNA		
CVC	Clorose Variegada dos Citros		
DEPC	Dietil - Pirocarbonato		
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)		
EC	Superfície recoberta com etil celulose		
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares (do inglês extracellular polymeric		
	substances)		
FIB	Feixe de Íons Focalizados (do inglês Focused Ion Beam)		
GOPTS	3-(glycidoxypropyl)trimethoxysilane		
МО	Microscopia Óptica		
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)		
PS	Potencial de Superfície		
PW	Periwinkle Witt (meio de cultura)		
qPCR-RT	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real (do inglês		
	quantitative Polymerase Chain Reaction – Real Time)		
RNA	Ácido Ribonucleico (do Inglês Ribonucleic Acid)		
SEM	Microscopia de Varredura Eletrônica (do inglês Scanning Electron		
	Microscopy)		
Si	Substrato de silício		
XadA1	Proteína de adesão afimbrial da Xylella fastidiosa		
Xf	Xylella fastidiosa		

# Sumário

Capítulo I: Introdução Geral	01
Capítulo II: Adesão celular e biofilmes bacterianos	
2.1 Adesão Celular	04
2.2 Biofilme Bacteriano	06
2.3 Xylella fastidiosa (Xf)	08
Capítulo III: Materiais e Métodos	
3.1 Substratos e Filmes de Celulose Derivatizada	10
3.2 Estirpe bacteriana e condições de cultivo	10
3.3 Cultivo de biofilmes de Xf	11
3.4 Microcopia Óptica	12
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	12
3.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)	14
3.6.1 Imagens de Topografia e Fase	15
3.6.2 Espectroscopia de Força	17
3.6.3 Potencial de Superfície (Kelvin Force Probe Microscopy)	22
3.7 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	
com Reflexão Atenuada Total – (ATR-FTIR)	23
3.8 Ângulo de Contato	25
3.9 Análise da Expressão Gênica	26
Capítulo IV: Resultados e Discussões	
4.1 Formação inicial do biofilme de Xf	30
4.2 Formação do biofilme de Xf em diferentes superfícies	
4.2.1 Morfologia e Estrutura	32
4.2.2 Expressão Gênica	39

Referências Bibliográficas		
Capítulo VI: Conclusões e Perspectivas Futuras	83	
Capítulo V: Discussão geral dos resultados obtidos	79	
4.5.2 Contribuição Química: ATR-FTIR	69	
4.5.1 Evidências Morfológicas: Imagens Topográficas e SEM	66	
4.5 Produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS)		
4.4.2 Interação com XadA1	61	
4.4.1 Experimento controle: ausência de XadA1	56	
4.4 Adesão específica: proteína de adesão XadA1		
4.3.3 Potencial de Superfície	49	
4.3.2 Caracterização química por ATR-FTIR	45	
<ul><li>4.3 Propriedades físico-químicas das superfícies</li><li>4.3.1 Rugosidade, hidrofobicidade e filme condicionante</li></ul>	41	

#### **Capítulo I**

#### Introdução Geral

Muitas espécies de bactérias podem viver tanto em vida livre (planctônicas) quanto parasitando um hospedeiro. Além disso, apresentam capacidade de se adaptar a mudanças súbitas de disponibilidade de nutrientes e a sistemas de defesa do hospedeiro. Em particular, um exemplo relevante de adaptação bacteriana é seu crescimento em comunidades fixas, encapsuladas por uma matriz exopolimérica, na forma de biofilmes. Hoje se reconhece que a formação de biofilmes é um aspecto importante em diferentes áreas incluindo biotecnologia, biocorrosão, agricultura, imunologia e desenvolvimento de biomateriais. O crescimento microbiano associado a biofilmes apresenta maior resistência contra fatores externos como biocidas, detergentes, tratamentos antibióticos e sistemas de defesa do hospedeiro que células planctônicas. Contudo, os mecanismos de formação dos biofilmes não são elucidados. O conhecimento destes mecanismos permitiria várias aplicações tecnológicas, como rotas de prevenção de doenças e, ainda, o desenvolvimento de biomateriais que inibam a formação dessas comunidades. Por essas razões, o interesse científico no processo de formação de biofilmes aumentou muito nos últimos anos.

Sob aspecto geral, o processo de formação do biofilme é mediado por uma série de fatores, dentre os quais podemos citar a expressão gênica, as condições nutricionais do meio em que se encontra (temperatura, pH, nutrientes) e as propriedades da superfície disponível para adesão. Por essa complexidade, as investigações em biofilme envolvem diferentes áreas de pesquisa, das quais podemos mencionar microbiologia, química, física e engenharia, tornando o problema de cunho interdisciplinar e, ainda, de interessante motivação acadêmica. A maioria das investigações sobre biofilmes tem sido realizada através de ensaios bioquímicos, expressão gênica e descrições fenomenológicas da formação dessas comunidades. Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho é contribuir para uma melhor compreensão da formação de biofilmes em geral através de uma abordagem mais completa e diferenciada à comumente aplicada em microbiologia. Para esta finalidade, neste trabalho, empregamos uma série de técnicas experimentais visando isolar e quantificar os fatores externos de influência ao longo de todo processo de formação do biofilme bacteriano.

Em particular, este trabalho tem por objetivo um estudo da formação do biofilme da bactéria fitopatógena *Xylella fastidiosa* (Xf) abordando diferentes fatores de influência não apenas dos estágios iniciais (adesão celular) bem como no próprio desenvolvimento do biofilme. A bactéria Xf é

causadora da clorose variegada dos citros (CVC), doença economicamente importante na indústria de citros no Brasil. O fator patógeno da Xf está associado à formação de biofilmes no interior do xilema impedindo a distribuição de água e nutrientes na planta. Desta forma, o entendimento do processo de formação do biofilme e seus fatores de influência poderiam permitir o desenvolvimento de rotas de prevenção da doença no citros. Como detalharemos no próximo capítulo, a Xf é caracterizada por um crescimento lento em comparação a outras bactérias, facilitando seu estudo em termos da identificação de possíveis contaminações e a utilização de técnicas mais específicas como microscopia de força atômica (AFM).

Outro aspecto original deste trabalho é a utilização de superfícies recobertas com celulose derivatizada na investigação da formação do biofilme de Xf. A maioria dos estudos sobre biofilmes de Xf realizados *in vitro* tem utilizado vidro como substrato. Contudo, a celulose é constituinte majoritário (90%) na composição do habitat natural da Xf. Desta forma, a utilização de superfícies de celulose, mesmo que artificiais, torna o estudo *in vitro* mais próximo do problema real. Neste trabalho, os substratos empregados foram analisados sob diferentes aspectos de suas propriedades físico-químicas com a finalidade de verificarmos possíveis modelos para a adesão bacteriana e a subseqüente formação de biofilmes do microrganismo Xf.

Além disso, outros mecanismos específicos utilizados pelos microorganismos como organelas, proteínas de adesão e a produção/secreção de substâncias poliméricas não devem ser desprezados na formação do biofilme. Neste sentido, apresentamos um estudo da interação entre uma proteína de adesão da Xf e cada uma das superfícies previamente caracterizadas e, ainda, uma investigação da produção de polissacarídeos desde o inicio da formação do biofilme.

Com a finalidade dessa ampla abordagem do problema descrito acima, os biofilmes de Xf foram cultivados em substratos de vidro, silício (Si), etil celulose (EC) e acetato de celulose (AC). A formação dos biofilmes nestas condições foi caracterizada por diferentes técnicas de microscopia (óptica, SEM, AFM). Ainda para este caso, a avaliação dos níveis de expressão de genes relacionados à degradação de celulose também foi realizada através de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real (qPCR). As propriedades das superfícies empregadas e suas possíveis modificações após contato com meio de cultura foram caracterizadas por AFM (rugosidade), ângulo de contato (hidrofobicidade), espectroscopia de infravermelho (grupos funcionais) e, ainda, AFM no modo *Kelvin Probe* (potencial de superfície). Além disso, medidas de espectroscopia de força (usando AFM) foram realizadas para estudo de adesão específica mediada por proteína. Por fim, a contribuição de substâncias exopoliméricas na formação inicial do biofilme foi investigada utilizando Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Atenuada Total (ATR-FTIR).

Com o objetivo de dar uma seqüência lógica para os pontos discutidos neste primeiro capítulo, esta tese está estruturada como segue. No capítulo 2, discutimos alguns conceitos fundamentais para o trabalho nesta área, bem como as lacunas existentes na literatura que visamos preencher. No capítulo 3, apresentamos a descrição de materiais e métodos utilizados para a preparação das amostras observadas, bem como as técnicas empregadas para todas as abordagens mencionadas acima. No capítulo 4, descrevemos os resultados experimentais e discussões situando nossos resultados no contexto da literatura atual. No capítulo 5, apresentamos uma discussão geral de todos os resultados apresentados no capítulo anterior. Por fim, as conclusões e perspectivas futuras são apresentadas no capítulo 6.

### **Capítulo II**

### Adesão celular e biofilmes bacterianos

#### 2.1 Adesão Celular

O processo de adesão é fundamental para o desenvolvimento e organização multicelular tanto em organismos pluricelulares (animais e plantas) quanto em unicelulares (bactérias). Para o primeiro caso, a adesão celular é essencial na formação dos tecidos, além de afetar várias funções das células. Além disso, as células de organismos pluricelulares podem apresentar até cinco diferentes tipos de moléculas de adesão (imunoglobulinas, caderinas, integrinas, selectinas e mucinas) responsáveis por este processo [1]. Por outro lado, em organismos unicelulares a adesão pode ser determinante na patogenicidade (por exemplo, no desenvolvimento de infecções). As bactérias podem utilizar diferentes mecanismos durante seu processo de adesão. Dentre estes mecanismos podemos mencionar interações eletrostáticas e hidrofóbicas<sup>1</sup> (não-específicas), assim como organelas (pili, flagelo) e proteínas (adesinas fimbriais e afimbriais) específicas para adesão [3]. A produção de substâncias exopoliméricas também tem sido citada como fator influente no processo de adesão bacteriana [4-6].

Em particular, a adesão de células microbianas em uma superfície sólida é considerada uma etapa crucial para a formação de biofilme bacteriano [3, 7-9]. A literatura tem mostrado que a formação de biofilmes está relacionada com inúmeras infecções médico-hospitalares, problemas industriais (devido à corrosão) e doenças em diferentes tipos de plantas [3, 10, 11]. No entanto, as interações moleculares e físico-químicas que estão envolvidas no processo de adesão ainda são objeto de intenso debate. Os diferentes mecanismos utilizados pelas bactérias para a adesão envolvem vários fatores, incluindo propriedades físico-químicas das superfícies, condições do meio em que se encontram e características próprias da espécie bacteriana [10, 11].

Rugosidade, hidrofobicidade, carga elétrica e grupos funcionais são propriedades físicoquímicas que tem sido consideradas como fatores determinantes na adesão de células bacterianas [11-22]. Alguns autores mostram que o número de células aderidas e, ainda, a extensão da colonização microbiana aumentam em superfícies de maior rugosidade [18, 19]. Outros estudos apontam que

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Estas interações, que ocorrem apenas para moléculas imersas em água, têm sua origem no denominado efeito hidrofóbico. Neste efeito, as moléculas de água se organizam ao redor de uma molécula hidrofóbica inserida em meio aquoso através de pontes de hidrogênio, de forma a excluir esta molécula do meio [2].

também a hidrofobicidade do substrato é determinante na adesão bacteriana [13-17]. O conceito de hidrofobicidade se contrapõe ao de molhabilidade<sup>2</sup>; superfícies hidrofóbicas apresentam baixa molhabilidade. Embora vários estudos [13, 17-19] considerem hidrofobicidade e rugosidade como propriedades fundamentais na adesão celular, apenas alguns deles [21, 22] têm questionado como diferentes grupos funcionais na superfície podem influenciar no processo de adesão. Gubner e colaboradores [21] estudaram o efeito de diferentes substâncias exopoliméricas (produzidas pelo próprio microorganismo) na adesão da bactéria marinha *Pseudomonas species*. Eles sugerem que a composição química e a concentração destes exopolímeros na superfície são mais importantes no processo de adesão do que hidrofobicidade e rugosidade.

Outra consideração importante é a possibilidade de mudanças nas propriedades das superfícies devido à formação de filme condicionante pela adsorção de biomoléculas na superfície. A adsorção de moléculas na superfície, neste caso, é um processo que ocorre natural e inevitavelmente. Mittelman [23] menciona que, sob condições *in vivo*, a formação de filmes condicionantes compostos por proteínas e polissacarídeos provenientes de sangue, lágrimas, urina e saliva ocorre rapidamente em biomateriais implantados e, ainda, que esse filme pode ser determinante na adesão e colonização bacteriana. Por exemplo, o filme condicionante formado por proteínas do sangue favorece a adesão da bactéria *Staphylococcus aureus* enquanto inibe a adesão da bactéria *Staphylococcus epidermidis* [24]. Embora a formação do filme condicionante tenha sido considerada como primeira etapa na adesão bacteriana e subseqüente formação de biofilme inclusive em trabalhos de revisão [3, 10, 25, 26], as mudanças das propriedades das superfícies após a formação deste filme e as possíveis conseqüências na adesão bacteriana não têm sido abordadas.

Como mencionamos anteriormente, o meio em que o microorganismo se encontra também é fator influente no processo de adesão. Fletcher [27] observou que o aumento na concentração de cátions no meio de cultura afeta a adesão da bactéria *Pseudomonas fluorescens* em superfícies de vidro. Deve-se considerar ainda que as propriedades da célula bacteriana, além de fator influente na adesão, podem ser afetadas pelo meio que envolve o microrganismo, incluindo as características do substrato disponível para adesão. A célula bacteriana apresenta a capacidade de expressar organelas, proteínas, enzimas e substâncias poliméricas que atuam e auxiliam em diferentes funções, incluindo as relacionadas à adesão. Essa expressão ocorre através de regulação gênica; esta regulação é responsável por fornecer o controle sobre a estrutura e função celular e, ainda, permitir a adaptação de um organismo a diferentes condições. Alguns autores [28, 29] demonstraram que a presença/ausência de fosfato inorgânico no meio pode regular a secreção, ativação e localização de

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Tendência de determinado líquido (por exemplo, água) se espalhar na superfície sólida.

proteínas de adesão. De maneira semelhante, o microrganismo pode produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS)<sup>3</sup> para contribuir na adesão celular. Marshall e colaboradores [9] sugerem que o EPS está envolvido na fase irreversível de adesão microbiana formando uma matriz protetora ao redor das células.

É importante ainda mencionar que, tradicionalmente, os processos de adesão têm sido investigados por métodos de contagem utilizando simples análise de imagens de microscopia, células marcadas com reagentes ou através da quantificação de células removidas das superfícies. Além disso, os fatores de influência da adesão mencionados acima têm sido abordados individualmente através de observações fenomenológicas, desprezando-se a influência do conjunto.

#### 2.2 Biofilme Bacteriano

Após o processo de adesão, diversas espécies bacterianas apresentam a capacidade de se desenvolver como parte de um biofilme. Estas comunidades podem tolerar agentes antimicrobianos em concentrações 10-1000 vezes maiores que as necessárias para matar bactérias planctônicas (livres em solução) geneticamente equivalentes, tornando-os muito difíceis de serem erradicados em hospedeiros vivos [30]. Além disso, em condições não ideais, a formação do biofilme apresenta vantagens em termos de defesa contra o meio e colonização em um hospedeiro. Bactérias em biofilmes podem suportar diminuição de nutrientes, mudanças no pH, temperatura, presença de antibióticos, etc., bem melhor que organismos planctônicos. Uma das características do biofilme é a formação de uma matriz exo-polimérica (predominantemente composta de exo-polissacarídeos) que as envolve. A literatura sugere que essa matriz contribui de maneira importante nos estágios iniciais e finais do biofilme [31-33], proporcionando a agregação e eventualmente a sua estrutura final; pode também estar envolvida na tolerância a agentes antimicrobianos [30]. Porém são poucos os trabalhos onde esta sugestão é avaliada através de métodos experimentais.

A formação de biofilme é composta por diferentes estágios, iniciando-se pela adesão na superfície, seja de natureza biótica ou abiótica, proliferação bacteriana dentro de microcolônias e expansão, formando estruturas altamente organizadas. O modelo mais aceito atualmente divide a formação do biofilme em cinco diferentes etapas (figura 2.2.1) [7]. A etapa 1 corresponde a adesão reversível das células na superfície (onde as células podem ser facilmente removidas por simples processos de lavagem); a etapa 2 é referente à adesão irreversível mediada principalmente por

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> A matriz EPS é composta por uma série de constituintes dos quais podemos citar polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e fosfolipídios.

interações moleculares específicas; na etapa 3 inicia-se a primeira fase de maturação do biofilme, caracterizada pelo início do desenvolvimento de sua arquitetura; a segunda fase de maturação, etapa 4, corresponde ao biofilme totalmente maduro, com alta densidade celular, e arquitetura de forma complexa; e, por fim, a etapa 5 é referente à fase de desestruturação do biofilme, normalmente por falta de nutrientes no interior do mesmo, resultando na dispersão das células.



Figura 2.2.1: Esquema para modelo mais aceito dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano. (1) Adesão reversível. (2) Adesão irreversível. (3) Início da maturação do biofilme. (4) Biofilme totalmente maduro com arquitetura complexa. (5) Desestruturação do biofilme e dispersão das células que darão início à novos biofilmes. [7].

Em recente trabalho de revisão, Monds e O'Toole [28] apresentam uma avaliação crítica dos recentes estudos sobre a formação de biofilmes, discutindo se esses dados satisfazem os critérios do modelo aceito atualmente, considerado por eles um modelo ainda em desenvolvimento. Eles afirmam que o modelo proposto acima deve ser abordado como um modelo que necessita de validação experimental, uma vez que vários de seus critérios não são compatíveis com evidências experimentais. Os autores discutem uma preocupação em particular: que o apoio ao modelo da formação do biofilme é baseado principalmente nas descrições fenomenológicas das mudanças morfológicas e estruturais do biofilme ao invés de uma compreensão detalhada da causa dessas alterações ao longo de seu desenvolvimento.

Vale mencionar que os mesmos fatores de influência no processo de adesão microbiana, descritos na seção anterior, podem ser determinantes para o desenvolvimento estrutural e genético do biofilme. Murga, Miller e Dolan [24], por exemplo, sugerem que o filme condicionante formado por

constituintes de sangue humano promovem a formação de biofilmes. Outros autores observam uma colonização bacteriana mais extensa em superfícies de maior rugosidade e hidrofóbicas. Além disso, diferentes estirpes bacterianas podem apresentar diferentes regulações gênicas e morfologias. Marques e colaboradores [34] prepararam biofilmes de Xf utilizando diferentes estirpes da bactéria. Eles observaram biofilmes com características morfológicas distintas; por exemplo, estirpes do citros formam biofilmes mais dispersos, com células menores e com espessa camada de material exopolimérico, enquanto estirpes da uva apresentam biofilmes com células mais alongadas imersas em material exopolimérico. Desta forma, deve-se considerar ainda que os fatores externos, a regulação gênica e a morfologia/estrutura do biofiolme podem estar correlacionados, tornando a investigação relativa à formação de biofilmes um assunto de extrema complexidade.

### 2.3 Xylella fastidiosa

Com a finalidade de investigar a formação de biofilmes sob diferentes aspectos, escolhemos como modelo a bactéria *Xylella fastidiosa* (Xf). Esta bactéria Gram-negativa e, habitante do xilema, é responsável por doenças economicamente importantes em várias culturas como citros, uva, café, ameixa e pêssego [35-37]. No Brasil, ela causa a clorose variegada do citros (CVC), uma doença que causa perdas anuais de aproximadamente US\$100 milhões para a agro-indústria do citros. Por esta razão, a Xf foi o primeiro fitopatógeno com genoma completo sequenciado, atividade realizada por consórcio de pesquisadores brasileiros [38]. A causa geralmente aceita para os sintomas induzidos por esta bactéria nas plantas é a oclusão vascular, levando a planta a estresse hídrico. Foi demonstrado que esta bactéria cresce como biofilme [34] e que este pode ser um fator importante para sua patogenicidade [39].

A *Xylella fastidiosa* apresenta formato de bastonete reto a ligeiramente curvo e de tamanho variável  $(0,3 - 0,5 \ \mu\text{m}$  de diâmetro e  $3 - 5 \ \mu\text{m}$  de comprimento) [40]. Além disso, essa bactéria é aeróbica e não apresenta motilidade devido à falta de flagelos [41]. A condição ideal de crescimento ocorre em temperaturas entre  $26 - 28^{\circ}$ C com pH entre 6,5 - 6,9 [42]. Outra consideração relevante é que ela se caracteriza pelo crescimento lento (processo de divisão 5 - 48 horas), sendo seus biofilmes circulares e discretos com tamanhos variáveis decorrentes das condições nutricionais utilizadas [43].

A Xf é transmitida naturalmente para as plantas por cigarrinhas (*Hemiptera: Cicadellidae*) que se alimentam da seiva bruta do xilema das plantas infectadas [43, 44]. Contudo, ela é uma bactéria limitada ao xilema (cujo maior constituinte é celulose); por essa razão, sua sobrevivência depende essencialmente da sua translocação pelo sistema vascular da planta hospedeira [37]. O

mecanismo pelo qual a Xf se movimenta no interior dos vasos do xilema não é conhecido. Simpson e colaboradores [38], após identificarem genes precursores de celulases<sup>4</sup> no genoma da Xf de citros (estirpe 9a5c), sugeriram que estes genes poderiam estar envolvidos na migração inter-vasos através destas membranas; porém até o momento esse processo de migração não foi confirmado.

Do ponto de vista de adesão, dois modelos foram propostos para explicar a adesão da Xf nos vasos do xilema, considerado negativamente carregado. Leite e colaboradores [45] propuseram que cátions divalentes presentes no meio (por exemplo, Mg<sup>+2</sup>) formem pontes com substratos negativamente carregados e a superfície da Xf (considerada negativamente carregada pelos autores). Por outro lado, Osiro e colaboradores [46] propuseram um modelo cujo processo de adesão depende da atração eletrostática; neste caso eles assumem que a superfície da Xf é positivamente carregada, alegando que esta possui um número maior de amino ácidos com carga positiva que negativa na superfície. Devemos considerar que, como mencionamos na seção 2.1, vários mecanismos podem estar envolvidos no processo de adesão. Desta forma, é importante mencionar aqui o papel relevante das adesinas na formação inicial do biofilme de Xf. No genoma da Xf foram encontrados vários genes responsáveis pela adesão [38]. As adesinas encontradas na Xf podem ser classificadas em dois tipos: afimbrial e fimbrial. Adesinas fimbriais incluem pili de vários tipos, aparecendo como filamentos nas extremidades da célula e, podem apresentar 0,4 a 1µm de comprimento. Por outro lado, as adesinas afimbriais são consideradas proteínas de superfície que contribuem na adesão da célula a superfície [47]. Entre as adesinas afimbriais podemos mencionar a XadA1. Feil e colaboradores [47] realizaram ensaios de adesão com mutantes de *XadA1* (ou seja, que não produzem a proteína) para Xf da estirpe de Temecula 1; para essa mutante, eles não observam formação de biofilme, indicando a inibição da adesão célula-superfície. Além disso, Caserta [48] observou que a proteína XadA1 para Xf da estirpe de citros apresenta alta expressão durante toda a formação do biofilme, inclusive em estágios iniciais, indicando o envolvimento desta proteína tanto na adesão da célula à superfície quanto na adesão célula-célula.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Enzimas responsáveis por degradação de celulose na parede vegetal celular.

#### **Capítulo III**

#### Materiais e Métodos

### 3.1 Substratos e Filmes de Celulose Derivatizada

Lamínulas de vidro redondas (15mm de diâmetro, 0,13 - 0,17 mm de espessura - Waldemar Knittel Glasbearbeitungs - GmbH Alemanha) foram utilizadas como substrato para experimentos de AFM onde o uso da célula líquida e controle de temperatura foi necessário (biofilmes cultivados no AFM). Placas de petri (35mm) estéreis com lamínulas de vidro (10mm de diâmetro, espessura 0,13 -0,16 mm - Mattek Corporation Ashland, MA, EUA) foram utilizadas para todos os outros casos de cultivos de biofilmes em vidro.

Substrato de silício (<100>, *wafers* com 10cm de diâmetro) cortados em quadrados de aproximadamente 2x2cm<sup>2</sup> também foram utilizados no cultivo de biofilmes de Xf. Tanto as lamínulas de vidro redondas e substratos de silício (Si) foram lavados com acetona, iso-propanol e água deionizada para remover a contaminação orgânica; estes substratos foram posteriormente esterilizados por autoclavagem. Esse procedimento não remove a camada OH formada naturalmente na superfície de Si; desta forma, apesar de tratarmos ao longo desta tese como superfície de Si, devese formalmente considerar uma superfície de óxido de silício.

Substratos de Si foram recobertos com filmes finos de acetato de celulose (AC) e etil celulose (EC). Para obter os filmes de AC, tipicamente 0,7g de acetato de celulose em pó (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em uma solução contendo 7,4mL de ácido acético, 13,8mL acetona e de 7,4mL de água deionizada. Para os filmes de EC, uma solução de 0,3g de etil celulose em pó (Sigma-Aldrich) dissolvido em 30mL de etanol foi preparada. Ambas as soluções foram espalhadas por *spin coating* (3000rpm para AC e 1000rpm para EC) por 30s no substrato de Si após o mesmo procedimento de limpeza descrito acima. Os filmes foram secos em temperatura ambiente por toda a noite. Todas as superfícies foram também previamente esterilizadas por autoclavagem.

### 3.2 Estirpe bacteriana e condições de cultivo

Neste estudo, utilizamos a estirpe bacteriana 9a5c de Xf da subespécie *pauca* [49]. As células bacterianas foram extraídas e isoladas da planta *Citrus sinensis* (laranja doce) e cultivadas em meio

de cultura *Periwinkle Wilt* (PW) [50]. O meio de cultura PW é considerado de composição complexa e não definida devido à presença de *phytone peptone* e *trypticase peptone*; ainda assim é o mais utilizado para o cultivo de todas as estirpes de Xf. Este meio também contém os compostos K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO4 e MgSO<sub>4</sub> e, ainda, o aminoácido glutamina e a proteína albumina de soro bovino (BSA). Vale mencionar que existem controvérsias na literatura sobre a necessidade da presença de BSA no meio de cultura para o crescimento da Xf. Davis e colaboradores [50] relataram que esta proteína é necessária para este processo; Galvani e colaboradores [51], no entanto, observaram apenas um crescimento mais lento de Xf na ausência de BSA, concluindo que seu papel não é essencial. Além disso, esta proteína é conhecida por adsorção espontânea em diferentes superfícies [52, 53]. Por essas razões e, para um melhor entendimento da influência da presença de BSA nos nossos resultados, experimentos foram realizados com e sem BSA no meio de cultura PW conforme descrito em cada caso.

#### 3.3 Cultivo de biofilmes de Xf

A preparação do biofilme consiste em depositar uma alíquota do inóculo<sup>5</sup> juntamente com novo meio de cultura (líquido) sobre o substrato e manter em temperatura controlada (28°C). O inóculo é obtido segundo um protocolo de preparação a partir de bactérias extraídas diretamente de planta contaminada; essas bactérias são cultivadas primeiramente em placa de meio de cultura PW sólido e, após cerca de 20-25 dias de cultivo, são re-inoculadas em meio de cultura PW líquido onde são cultivadas sob agitação, resultando no inóculo líquido final. Vale mencionar que, durante estágio realizado na Universidade de Ulm (Alemanha), as bactérias de origem para preparação do inóculo se encontravam congeladas, em maior concentração do que um inóculo usual. Devido a limitações técnicas, nem sempre foi possível a preparação do inóculo sob agitação. Neste caso, utilizamos um método não usual de inoculação, preparando os biofilmes diretamente da solução de bactérias descongeladas em temperatura ambiente [54].

As condições iniciais de inoculação, ou seja, a proporção inóculo:meio de cultura, podem influenciar no ciclo de desenvolvimento do biofilme. Embora diferentes proporções de inoculação tenham sido utilizadas ao longo desse trabalho, deve-se considerar que todas as amostras utilizadas na comparação do desenvolvimento do biofilme nas diferentes superfícies (seção 4.2) foram preparadas a partir de mesmas condições iniciais (inclusive preparadas no mesmo dia).

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Bactéria em meio de cultura líquido rico em nutrientes.

Outra consideração relevante é a confirmação experimental de termos biofilmes de Xf em nossas amostras. Para isso, coletamos o DNA proveniente de diferentes biofilmes (experimentos distintos) para posterior análise via PCR e corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Os resultados confirmam que os biofilmes observados são compostos por células de Xf. Este experimento foi realizado pela doutoranda Carolina Munari Rodrigues (Centro APTA Citrus Sylvio Moreira/IAC).

# 3.4 Microscopia Óptica (MO)

Para a aquisição de imagens dos biofilmes cultivados em superfície de vidro foi utilizado o microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TE2000U), possibilitando a realização dessas medidas em meio líquido no interior da placa de petri onde as amostras foram preparadas. Para biofilmes cultivados em todas as outras superfícies, o mapeamento das amostras foi realizado utilizando microscópio óptico marca *Zeiss* (modelo AXIO Scope A1, Universidade de Ulm, Alemanha).

Nessa técnica os biofilmes podem ser identificados pelo contraste com a superfície e, também por apresentarem predominantemente forma circular. Vale mencionar que para mapeamento completo das superfícies após o cultivo dos biofilmes em diferentes intervalos de tempo foi utilizada a lente de menor magnificação (5x). Nessas condições, estabelecemos como menor filme observado aqueles com diâmetro de 30µm, uma vez que, nesta magnificação, fica difícil determinar se os pontos circulares para diâmetros inferiores a este valor são efetivamente biofilmes ou contaminação presente na superfície.

#### 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

No microscópio eletrônico de varredura um feixe eletrônico é focalizado na superfície da amostra; quando um elétron do feixe interage com um átomo (na superfície da amostra), ele sofre tanto espalhamento elástico com o núcleo atômico quanto inelástico com os elétrons deste átomo. Essas interações resultam em elétrons retro-espalhados ou na emissão de elétrons secundários, respectivamente. A aquisição de imagens de SEM consiste na detecção desses elétrons em função da posição do feixe eletrônico. No caso dos elétrons retro-espalhados, os elétrons primários (do feixe) apenas mudam sua trajetória, sem perda de energia cinética e, por essa razão apresentam energia da ordem da energia do feixe. Por outro lado, na colisão inelástica com os elétrons, ocorre a perda de energia pelo elétron primário (do feixe) que é transferida para o elétron na superfície; o elétron emitido nesse caso é denominado elétron secundário. Neste caso, os elétrons apresentam energia

menor que 50eV. A imagem adquirida pela detecção de elétrons secundários é o sinal mais comumente utilizado; este sinal varia com a topografia da superfície da amostra, gerando diferenças em contraste na imagem.

As imagens de microscopia eletrônica apresentadas nesse trabalho foram adquiridas pela detecção de elétrons secundários através de um sistema de duplo feixe (feixe de íons focalizado, FIB e SEM) modelo *Quanta 3D FEG ou Hélios Nanolab*<sup>TM</sup> (*FEI Company*, Universidade de Ulm, Alemanha). Neste sistema, o feixe de íons (Ga), embora possa ser utilizado também na aquisição de imagens, é normalmente usado para criar microestruturas em superfícies através da remoção ou deposição de material. No presente trabalho, algumas imagens foram adquiridas utilizando o feixe de íons na tentativa de diminuir o acúmulo de carga na superfície; estes casos serão especificados na legenda na figura. Para a aquisição das imagens, as amostras foram lavadas gentilmente com água e secas em temperatura ambiente. Uma vez que nenhum tratamento ou cobertura foi realizado na preparação das amostras antes de sua inserção em ambiente de vácuo, algumas células podem apresentar efeitos de desidratação devido às condições de vácuo do sistema. Posteriormente, algumas amostras foram metalizadas com filme fino de Pt (5nm) para otimizar as imagens SEM.

O objetivo das imagens de SEM é caracterizar o crescimento da Xf em forma de biofilme sob o aspecto fenomenológico. Neste sentido, os diferentes tempos de cultivo da Xf apresentam aglomerados/biofilmes com diferentes dimensões, de maneira que as imagens apresentam diferentes magnificações. Com a finalidade de facilitar a comparação das imagens, as barras de escala foram uniformizadas. Para cada amostra foram adquiridas cerca de 100 imagens e várias regiões foram mapeadas. As células podem ser identificadas por sua forma bastão e tamanhos típicos (seção 2.3) como ilustra a figura 3.5.1A. Assim como na microscopia óptica, os biofilmes podem ser identificados pelo contraste e forma circular; é também pelo contraste que podemos distinguir se o biofilme é composto de única camada como mostra a figura 3.5.1B onde o biofilme aparece todo em preto, ou múltiplas camadas onde identificamos três tonalidades de cinza (figura 3.5.1C) – ainda mais evidente na imagem de maior magnificação na borda do biofilme (figura 3.5.1D). Outra consideração relevante é o fato que para biofilmes cultivados em superfícies de celulose, o biofilme, na maioria das vezes, não é tão evidente (figura 3.5.2A, C). Ainda que se observe algum contraste, existe a dúvida se este é por conta da morfologia do filme ou pela existência de biofilme de Xf; nestes casos, a aquisição de imagem de maior magnificação foi realizada no topo da morfologia que acreditamos ser biofilme, sendo confirmada pela existência de camada de células bacterianas (figuras 3.5.1E e 3.5.2B, D).



Figura 3.5.1: Imagens de SEM adquiridas para células e biofilmes de Xf aderidos em superfície de Si. (A) células individuais ou em pequenos aglomerados; (B) biofilme de única camada; (C) biofilmes com múltiplas camadas; (D) borda do biofilme em (C); (E) topo do biofilme em (C). A sigla BF indica biofilme na superfície. Números indicam as diferentes tonalidades de contraste.



Figura 3.5.2: Imagens de SEM adquiridas para células e biofilmes de Xf aderidos em superfícies de AC (A, B) e EC (C, D). (A, C) biofilme em superfície de celulose. (B, D) topo do biofilme.

## 3.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) faz parte do conjunto de técnicas de microscopia de varredura por sonda e envolve diferentes modos de operação. Neste estudo, utilizamos a técnica para aquisição de diferentes dados: topografia, fase, espectroscopia de força e potencial de superfície, como descrevemos a seguir. Todos os dados de AFM foram adquiridos utilizando o microscópio *Agilent AFM system Model 5500 (Agilent Technologies, Chandler, AZ, USA)*.

#### 3.6.1 Imagens de Topografia e Fase

A base da técnica de AFM consiste em monitorar a força entre uma ponta de prova e a superfície da amostra. Existem várias forças de interação entre ponta-amostra. Dependendo do regime de forças envolvido, repulsiva ou atrativa, existem três modos de operação para a microscopia de força atômica (figura 3.6.1A). Num regime de força repulsivo, a ponta e a amostra estão em contato, por essa razão denominamos modo contato. Devido à delicadeza de amostras biológicas, esse modo de operação pode causar deformações e danos na superfície analisada, uma vez que a força e área envolvidas na medida são pequenas (na ordem de 10<sup>-7</sup>N e nm<sup>2</sup>, respectivamente) provocando uma grande pressão no local da medida. Por outro lado, no modo não contato não existe um contato físico direto entre ponta e superfície (regime de força atrativo) preservando a qualidade dos resultados. As medidas ainda podem ser realizadas no modo contato intermitente onde existe a inversão no tempo entre os regimes atrativo e repulsivo.

Para monitorar a força de interação entre ponta e amostra, utilizamos uma ponta de prova situada na extremidade de uma alavanca. No modo não contato (figura 3.6.1B), a alavanca vibra na sua freqüência de ressonância através de um oscilador, por exemplo, um bimorfo. Ao aproximar a ponta da superfície da amostra ocorre um amortecimento na amplitude de vibração da alavanca que é medido por meio de um feixe *laser* que incide sobre a alavanca e atinge um fotodetector sensível a posição (PSPD). A amplitude modificada é comparada com uma referência no sistema que deve ser mantida constante. Uma vez alcançada a distância ponta-amostra que fornece a amplitude de vibração de referência, um piezoelétrico (PZT) produz o movimento da superfície em relação à ponta ou da ponta em relação à superfície (dependendo do equipamento), realizando varreduras nas direções x e y.

Durante a varredura em x e y, a alavanca sofre variações na amplitude de vibração medida pelo PSPD devido à mudança na força de interação entre ponta e amostra, provocada pelas diferenças de alturas encontradas na superfície. O sinal de erro gerado (em relação ao *set point* estabelecido para a medida) re-alimenta o movimento do PZT na direção z (modo de força constante). O número de passos relativo a esse movimento é gravado em uma matriz que é convertida em alturas para a imagem topográfica através de um fator de conversão proveniente de calibração.

O microscópio pode adquirir vários canais durante a varredura da amostra, simultaneamente à imagem topográfica. Em particular, no modo não contato, pode-se adquirir a imagem de fase. Mudanças no amortecimento da oscilação da alavanca geram uma diferença de fase entre o sinal proveniente da alavanca (medido pelo PSPD) em relação ao sinal aplicado ao oscilador (figura

3.6.1C). Deste modo, podemos detectar a presença de materiais com diferentes propriedades mecânicas como, por exemplo, viscosidade e elasticidade numa mesma amostra usando a imagem de fase. Desta forma, a imagem de fase permite abordar qualitativamente as propriedades elásticas da amostra observada.



Figura 3.6.1: (A) Comportamento qualitativo do potencial de força interatômica em função da distância entre ponta de prova e a superfície da amostra. (B) Esquema geral de montagem e funcionamento do AFM em modo não contato. (C) Esquema geral para aquisição de imagem de fase [56]. (D) Imagem de SEM para ponta NSC19 *MicroMash* (imagem disponível em www.spmtips.com; acesso em 15 de agosto de 2011).

Todas as aquisições de topografia e fase apresentadas neste trabalho foram realizadas em modo não-contato utilizando pontas de Si com raio aproximadamente de 10nm e comprimento de  $20 - 25 \ \mu m$  (NSC14 ou NSC19 *MicroMash*, Tallin, Estônia, figura 3.6.1D). Essas alavancas apresentam constante de mola tipicamente entre  $1,8 - 12,5 \ Nm^{-1}$  e freqüência de ressonância entre  $110 - 220 \ kHz$  (em ar). As medidas foram realizadas em ar e também em líquido (conforme será descrito em cada experimento); neste último caso, célula líquida e controlador de temperatura foram utilizados. A morfologia das amostras foi analisada de maneira qualitativa, onde as informações de

topografia e fase se completam. Em alguns casos, a rugosidade quadrática média (RMS) foi obtida diretamente das imagens através da seguinte equação [56]:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N} (h_n - \overline{h})^2}{(N-1)}}$$
(3.6.1)

onde h é a altura e N o número de pontos (pixels) na imagem.

Além disso, experimentos de indentação na amostra com a ponta do AFM também foram realizados. A indentação é uma maneira de identificar a deposição de material na superfície. Esse método não é preciso para sabermos a espessura do filme, uma vez que a indentação não necessariamente alcança a superfície do substrato. Contudo, padronizando as condições em que a indentação foi realizada, podemos comparar a espessura do filme formado ao longo do tempo. Para estes experimentos imagens de menor área  $(5x5\mu m^2, cinco imagens por indentação)$  foram adquiridas com *set point* em 0V (ponta-superfície em contato) seguida de nova imagem de maior área  $(20x20\mu m^2)$ .

#### 3.6.2 Espectroscopia de Força

Outra interessante aplicação do AFM é o uso da alavanca como sensor de força. Neste caso, a deflexão da alavanca é monitorada durante o ciclo de aproximação e retração da ponta em relação à superfície da amostra (figura 3.6.2); conhecendo a constante de mola da alavanca, torna-se possível converter a deflexão sofrida pela alavanca em força.

Numa curva de força típica (figura 3.6.2), podemos observar um ou mais saltos no valor da força durante o ciclo de retração. Esse salto ocorre no momento que a ponta se desprende da superfície e corresponde à força de adesão ou ruptura entre os grupos funcionais na ponta e superfície. Desta forma, a espectroscopia de força via AFM torna possível medir forças entre diferentes grupos moleculares através da funcionalização química da ponta. Com a finalidade de caracterizar a interação da proteína de adesão XadA1 e as diferentes superfícies, curvas de força foram adquiridas utilizando pontas de Si sem funcionalização e funcionalizadas com a proteína de adesão  $XadA1^6$ .

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Este método de funcionalização das pontas com *XadA1* foi realizado pelo Dr. Richard Janissen (pós-doutorando) baseado em literatura da área [57, 58].



Figura 3.6.2: Desenho esquemático para curva de força típica em líquido [59]: (1) Aproximação da ponta que ainda está longe da superfície; (2) A uma pequena distância, a ponta é atraída pela superfície; (3) A alavanca acompanha movimento linear da amostra sofrendo deflexão; (4) Retração da ponta em relação à amostra; (5) Ponta sofre desprendimento da superfície; (6) ponta totalmente afastada da superfície.

Para a realização de medidas de espectroscopia de força, todas as pontas de Si (NSC19  $\mu$ mash, k = 0,17 – 1,7 N/m) foram mantidas em solução contendo ácido sulfúrico e água oxigenada na proporção 3:1 (solução piranha) por 5 minutos. Em seguida, as pontas foram lavadas com água deionizada. No caso das pontas funcionalizadas, após o procedimento de limpeza com solução piranha, as pontas foram imersas em *3-(glycidoxypropyl)trimethoxysilane* (GOPTES) por 30 minutos; em seguida, as pontas foram lavadas duas vezes com etanol e água deionizada. As pontas foram então secas em fluxo de N<sub>2</sub> e imersas em solução contendo proteína *XadA1* em tampão PBS por 30 minutos; em seguida, as pontas foram lavadas duas vezes com tampão TBSTT<sup>7</sup> e tampão TBS<sup>8</sup> por 1 minuto cada. Por fim, as pontas foram lavadas em tampão PBS padrão por 1 minuto e estocadas no mesmo tampão em temperatura ambiente até a realização do experimento. Vale mencionar que a interação entre a adesina *XadA1* e as superfícies em estudo ocorrerá através de sua extremidade COOH.

Para verificar a eficiência da funcionalização com *XadA1*, imagens de fluorescência foram adquiridas para pontas distintas após o procedimento de funcionalização descrito acima. Desta forma, após a imobilização da proteína na ponta de Si, a proteína foi, primeiramente, ligada a um anticorpo específico para *XadA1* (denominado primeiro anticorpo); em seguida, um segundo anticorpo marcado

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> O tampão TBSTT é composto de 20mM do tampão TRIS/HCl com 150mM de NaCl, pH 7,5, 0,1% (v/v) *Tween* 20, 0,5%(v/v) TritonX-100.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> O tampão TBS é composto de 20mM do tampão TRIS/HCl com 150mM NaCl, pH 7,5.

com fluoróforo se liga ao primeiro anticorpo permitindo validar a funcionalização através de microscopia de fluorescência. O mesmo procedimento foi realizado com a ponta de Si na ausência da proteína *XadA1* como medida de referência. As figuras 3.6.3 A e B mostram imagens de fluorescência evidenciando a eficiência no processo de funcionalização utilizado de maneira reprodutível. Além disso, imagens de fluorescência das pontas funcionalizadas com *XadA1* foram adquiridas depois da aquisição das curvas de força na superfície de interesse, como ilustra a figura 3.6.3C. As imagens adquiridas indicaram a presença da proteína *XadA1* mesmo após a aquisição das curvas de força.



Figura 3.6.3: Imagens de fluorescência para ponta de Si (A) sem funcionalização - controle negativo, e (B) funcionalizada com a adesina *XadA1* – controle positivo. (C) ponta funcionalizada com a adesina *XadA1* – imagem adquirida após sequência de aquisição das curvas de força em superfície de etil celulose e Si. Imagens adquiridas com microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TE2000U).

A figura 3.6.4 mostra curvas típicas de força, que se assemelham às descritas na literatura [60-63]. Para medidas realizadas em ar (figura 3.6.4A), comumente se observa um salto também na curva de aproximação. Esse comportamento ocorre devido à força atrativa de van der Waals entre ponta e superfície; essas forças são consideradas fracas (~nN) e surgem devido à interação entre dipolos induzidos. Em medidas realizadas em líquido (figura 3.6.4B-D), a presença de íons na solução blinda esta interação e, assim, não observamos o salto na curva de aproximação. Vale mencionar que, para todos os experimentos realizados, podemos separar as curvas de força adquiridas em três tipos: (1) ausência de adesão, quando nenhuma força é observada na curva de retração (figura 3.6.4B), (2) interações não-específicas, que podem ter origem hidrofóbica, eletrostática e van der Waals (figura 3.6.4C) e (3) múltiplos eventos de ruptura (figura 3.6.4D). Este último caso foi observado em casos que a ponta estava funcionalizada e, eventualmente em experimento controle (ponta de Si sem XadA1) na presença de meio de cultura com BSA como discutiremos na seção 4.4.1.



Figura 3.6.4: Curvas de força para (A) ponta de Si e superfície de Si em ar; (B-D) ponta com *XadA1* e superfície de Si em tampão PBS. Todas as curvas mostram medidas realizadas nesse trabalho.

No método utilizado para a funcionalização da ponta de AFM com a proteína de adesão *XadA1*, não é possível controlar o número de proteínas imobilizadas na ponta. Considerando o raio de curvatura da ponta, várias proteínas podem interagir com a superfície em cada ciclo completo da curva de força (aproximação e retração) ocasionando uma dispersão das forças medidas. Para nossos experimentos, foram adquiridas cerca de 200 curvas de força num mesmo ponto em cinco regiões distintas de cada uma das superfícies (Si, EC e AC), totalizando aproximadamente 1000 curvas. Considerando que utilizamos pontas com *XadA1* diferentes para cada superfície de Si antes e após a aquisição das curvas de forças nestas superfícies; contudo, para esta caracterização utilizamos uma estatística de apenas 100-200 curvas para preservar a integridade da proteína na ponta. Esse controle

garante o uso de pontas com mesmo comportamento para todas as superfícies, uma vez que pontas com *XadA1* distintas foram utilizadas para cada experimento.

Vale mencionar que para experimentos que envolvem proteínas, como é o caso, é necessário a utilização de meio líquido apropriado para a preservação da conformação da molécula. Desta forma, experimentos controle foram realizados utilizando pontas não funcionalizadas (NSC19 *MicroMash*, Tallin, Estônia) em tampão PBS e meio de cultura PW com BSA. Estes experimentos permitem uma caracterização da ponta sem *XadA1* em cada uma das superfícies e, também seu comportamento em ambas as soluções.

Outra consideração relevante é como os espectros foram analisados. Primeiramente, as curvas de deflexão versus o deslocamento da ponta em Z foram convertidas em curvas de força; na prática para converter essa força utilizamos a seguinte relação:

#### Força (N) = Deflexão (V) x Sensibilidade (nm/V) x Constante de Mola da Alvanca (N/m) (3.6.2)

onde a sensibilidade é dada pela derivada da curva de deflexão versus distância ponta-amostra (ou deslocamento Z do *scanner*) no regime linear da curva de força. A constante de mola para cada alavanca foi calibrada experimentalmente utilizando o método de flutuação térmica [64, 65]. Em seguida, foi criada uma linha base utilizando como referência a parte da curva onde a ponta já se encontra suficientemente afastada para não interagir com a superfície (figura 3.6.5A); a partir dessa linha de referência cada degrau observado na curva de retração foi medido. O conjunto de medidas para cada experimento gerou uma distribuição de forças representada por histogramas. Ajuste gaussiano foi realizado para determinação da força média em cada caso.

Devemos mencionar também que, em princípio, esta técnica pode medir tanto forças intermoleculares fracas (~>pN) quanto ligações covalentes fortes (~100nN) [66]. Contudo, ruídos eletrônicos gerados no sistema óptico do microscópio e pela excitação térmica da vibração da alavanca devem ser considerados na resolução da força medida. Desta forma, medimos o nível de ruído (pico-vale) para cerca de 200 e 800 curvas em experimentos sem e com *XadA1* na ponta, respectivamente. A dispersão das medidas de força assim obtidas pode ser observada no histograma da figura 3.6.5B, e associada ao nível de ruído em nosso equipamento. Desta forma, consideramos como nulos (F=0N) os valores de força inferiores à esse nível de ruído (9±5pN).



Figura 3.6.5: (A) curva de força típica para interação *XadA1* com superfície de Si ou EC. (B) Histograma de forças correspondente ao nível de ruído observado.

### **3.6.3** Potencial de Superfície (*Kelvin Force Probe Microscopy*)

Com a finalidade de caracterizar as superfícies em termos de distribuição de carga, imagens de Potencial de Superfície (PS) foram adquiridas através do modo *Kelvin Probe Force Microscopy* (figura 3.6.6). Nesta técnica, diferenças de potencial AC e DC são aplicadas entre uma ponta metalizada e amostra, de modo a cancelar a força elétrica entre elas. Num modelo capacitivo simples [67-69], isso ocorre quando a tensão DC é igual ao potencial de superfície (PS, ou diferença entre funções trabalho) dos materiais que compõem a amostra e o revestimento da ponta.

Imagens do potencial de superfície foram adquiridas simultaneamente às imagens de topografia e fase para os filmes de celulose (AC e EC) antes e após contato com meio de cultura PW e também de filme condicionante sobre Si. No caso das superfícies em contato com PW, as amostras foram lavadas e secas sob fluxo de N<sub>2</sub>. O contato elétrico entre a amostra e o controlador do AFM foi feito utilizando cola prata e um pequeno fio metálico; esse procedimento permite manter a amostra em potencial fixo (ou aterrada). As medidas foram realizadas sob baixo fluxo de N<sub>2</sub> evitando efeitos devido à umidade. Para todas as aquisições foram utilizadas pontas recobertas com platina (NSC19/Pt *Micro Mash*, Tallin, Estônia). Todas as imagens de PS apresentadas nesta tese foram realizadas pelo engenheiro João Hermes Clerici.

De maneira geral, os valores absolutos de PS não podem ser comparados entre amostras diferentes. Desta forma, com a finalidade de comparar o PS nas duas superfícies, os filmes foram parcialmente raspados para expor a superfície do substrato de Si gerando um degrau. Neste caso utilizamos o bisturi no lugar da indentação, uma vez que a preservação da cobertura metálica da

ponta é importante para a medida elétrica de boa qualidade. Após a raspagem parcial do filme, estabelecemos uma diferença de PS entre Si e o filme de celulose correspondente, eliminando a dependência com a ponta e realizando uma comparação quantitativa das diferentes amostras, comparando os valores de  $PS^* = PS(celulose) - PS(Si)$  [68]. O mesmo método foi utilizado para as amostras após contato com o meio de cultura PW com BSA.



Figura 3.6.6: Esquema para funcionamento do AFM para aquisições simultâneas de PS e topografia em modo não-contato [69]. Neste modo, oscilação mecânica e elétrica são aplicadas na alavanca em diferentes freqüências ( $\omega_m$  e  $\omega_e$ , respectivamente). A oscilação da alavanca é gravada em função da posição; essa oscilação é composta dos dois sinais (mecânico e elétrico). Dois *lock in's* são responsáveis por separar o sinal mecânico (*Lock in 1*) do elétrico (*Lock in 2*); o primeiro isola a amplitude de oscilação da freqüência mecânica ( $\omega_m$ ) e o sistema de realimentação mantém a amplitude de oscilação mecânica no *set point* adquirindo a imagem de topografia. O segundo, por sua vez, isola a amplitude de oscilação da freqüência elétrica ( $\omega_e$ ); o sistema de realimentação aplica um potencial DC para anular (ou minimizar) a força eletrostática entre a ponta e superfície. Esse potencial aplicado é registrado, compondo a imagem de PS.

# **3.7 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Atenuada Total – (ATR-FTIR)**

A técnica de espectroscopia de infravermelho permite a identificação química das espécies em solução ou, ainda, filmes finos sobre a superfície. A base da técnica consiste na incidência de feixe de luz de intensidade  $I_0$  sobre a amostra e a detecção da intensidade do feixe refletido ou transmitido

(dependendo da configuração do equipamento) pela amostra (*I*); esse procedimento é repetido para diferentes comprimentos de onda, gerando o espectro no infravermelho. Dependendo da composição química da amostra, a radiação será absorvida para determinados comprimentos de onda; a absorção representa vibrações de ligações químicas específicas sendo possível identificar o grupo de átomos envolvidos na vibração.

Espectros de ATR-FTIR foram adquiridos com um espectrômetro *Vector 70 (Bruker Optics, Ettlingen,* Alemanha) equipado com célula líquida e controlador de temperatura (*BioATRCell II, Bruker Optics, Ettlingen,* Alemanha). A célula líquida é montada sobre um cristal de reflexão atenuada total de ZnSe com uma fina camada de silício no topo; esta camada de Si permite a comparação dos dados obtidos para os biofilmes cultivados em superfície de Si. Para a aquisição dos espectros, um volume de 20µL foi adicionado na célula líquida (mantida a 28°C) com meio de cultura PW ou inóculo conforme será descrito. Pelo menos 100 varreduras foram realizadas para cada espectro com uma resolução espectral de 4cm<sup>-1</sup>; o espectro foi adquirido entre 4000 e 800 cm<sup>-1</sup>.

Vale mencionar que diferentes espectros de referência (*background*) foram utilizados para cada experimento. O espectro de referência é medido antes do início do experimento e, posteriormente, é subtraído do espectro da amostra. Como nossas medidas são realizadas em solução, devemos subtrair o espectro da água (figura 3.7.1); ele possui banda larga na região de interesse das nossas amostras (1800 - 1470 cm<sup>-1</sup>). Por essa razão, devemos considerar que pequenas evaporações de água podem interferir no espectro da amostra. Em alguns casos, utilizamos o primeiro espectro como referência, contudo, considerando que água também está contida nesta medida, devemos ser cuidadosos na análise de bandas ao longo do tempo nesta região, conforme discutido ao longo desta tese na apresentação dos resultados.



Figura 3.7.1: Espectro de ATR-FTIR para água autoclavada, PW com BSA e Xf em meio de cultura PW (com BSA).
Os espectros adquiridos foram analisados qualitativamente, onde as bandas foram associadas aos modos vibracionais dos grupos químicos e, também quantitativamente, onde a altura das bandas de interesse foi observada em função do tempo. Para este último caso, um número de onda onde não há absorção e próximo à região de interesse ( $2061 \text{ cm}^{-1}$ ) foi utilizado como referência para cálculo da altura. Nas curvas de altura em função do tempo, a taxa de absorção ( $\alpha$ ) para cada banda foi calculada através do coeficiente angular. Deslocamentos das bandas ao longo do tempo, ou ainda, entre diferentes experimentos foram analisados considerando a resolução espectral utilizada (4 cm<sup>-1</sup>). Deve-se considerar ainda que, geralmente, as vibrações ocorrem num intervalo espectral e não para número de onda específico. Sob as mesmas considerações, a deconvolução das bandas foi realizada, através de ajuste gaussiano, quando necessário.

# 3.8 Ângulo de Contato

A caracterização do grau de hidrofobicidade das superfícies pode ser obtida através de medidas de ângulo de contato pelo método da gota séssil (*sessile drop method*). Nesse método, utilizamos um goniômetro automatizado (Ramé-Hart, 100-00, UNESP-Sorocaba) que, através de uma câmera CCD, captura a imagem da gota depositada sobre o material. Um programa de tratamento de imagens determina o perfil desta gota e então calcula o ângulo de contato (figura 3.8.1A); o ângulo é calculado no lado esquerdo e direito (20 vezes) e uma média fornece o valor para o ângulo de contato final.

Todas as medidas apresentadas nesse trabalho foram adquiridas em temperatura ambiente. Consideramos o ângulo medido menor que 10° para as medidas em que houve espalhamento significativo da gota, impossibilitando o cálculo do ângulo de contato devido às limitações no programa de análise, sendo estas superfícies consideradas completamente hidrofílicas. Vale mencionar que a superfície é considerada hidrofóbica para ângulos maiores que 90° e hidrofílicas para menores que 90° (figura 3.8.1B). Contudo, neste trabalho, utilizamos o conceito de grau de hidrofobicidade que é geralmente utilizado na literatura da área. O grau de hidrofobicidade das superfícies foi avaliado antes e depois de contato com meio de cultura PW . Neste último caso, o erro provém do erro da medida; enquanto para as superfícies sem PW o erro foi obtido pelo desvio padrão da média de um conjunto maior de amostras. Para a aquisição das medidas após contato com PW, todas as superfícies (vidro, Si, AC e EC) foram esterilizadas por processo de autoclavagem e, em seguida, colocadas em contato com meio de cultura PW com e sem BSA por intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 horas. O meio de cultura foi removido com micropipeta no dia anterior às medidas; as

amostras foram gentilmente lavadas com água deionizada e vedadas (para evitar poeira) e permaneceram em temperatura ambiente até o momento da medida.



Figura 3.8.1: (A) Imagem de gota (água deionizada) sobre superfície de Si onde  $\theta$  representa o ângulo de contato medido. (B) Desenho esquemático para ilustrar o grau de hidrofobicidade; em superfícies com menor grau de hidrofobicidade se observa um melhor espalhamento da gota de água.

# 3.9 Análise da Expressão Gênica<sup>9</sup>

Neste trabalho, realizamos a análise dos níveis de expressão de três genes relacionados à degradação de parede celular vegetal através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR-RT). A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste num método de amplificação<sup>10</sup> de DNA (ou cDNA) a partir de volumes pequenos de amostra (~ µL). Esse método consiste na repetição de um ciclo de temperatura que atua juntamente com uma série de reagentes e, ainda, os primers do gene de interesse. O primer é um fragmento de ácidos nucléicos que serve como ponto de partida para síntese de DNA. Desta forma, ele reconhece o gene de interesse na fita dupla de DNA e, apenas esse fragmento de DNA é amplificado via PCR. Na primeira fase do ciclo, a denaturação do DNA é induzida pela elevação da temperatura a 95°C; a seguir, numa condição de temperatura mais baixa, os primers identificam o fragmento de DNA para amplificação. Através da atuação de uma enzima de polimerização, a dupla fita para aquele fragmento é criada (figura 3.9.1A). O ciclo é repetido inúmeras vezes amplificando os fragmentos exponencialmente (figura 3.9.1B). Em complemento a esta técnica, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR), de maneira simplificada, consiste no monitoramento dos repetidos ciclos de PCR através de fluorescência. Para esta finalidade, é necessário o uso de compostos fluorescentes que se liguem ao gene de interesse. O resultado é um

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Procedimento realizado em conjunto com a doutoranda Carolina Munari Rodrigues e Dr. Juarez Pires Tomaz sob a

supervisão da Pesquisadora Dra. Alessandra Alves de Souza (Centro APTA Citrus Sylvio Moreira/IAC). <sup>10</sup> Criação de múltiplas cópias.

aumento na intensidade da fluorescência proporcional ao logaritmo do número inicial de genes. Por outro lado, o número de ciclos é inversamente proporcional ao número inicial de genes. Para aquisição destes dados, utilizamos RT-PCR modelo *ABI PRISM 7000 Sequence Detector System* (*Applied Biosystems*, Centro APTA Citrus Sylvio Moreira/IAC).



Figura 3.9.1: Esquema para: (A) ciclo da PCR para amplificação de DNA e (B) comportamento exponencial da amplificação via PCR [70].

Como mencionado acima, a análise de expressão gênica via qPCR-RT é necessário o uso de *primer* que reconhecerá o gene de interesse na fita de DNA (ou cDNA). Os *primers* para amplificação dos genes associados com degradação de parede celular vegetal foram desenhados pelo Dr. Juarez Pires Tomaz (Centro APTA Citrus Sylvio Moreira/IAC) e são apresentados na tabela

3.9.1. Como controle endógeno, foi utilizado o gene petC (XF0910), que codifica para *ubiquinol cytochrome C oxidoreductase* (tabela 3.9.1). Os *primers* foram utilizados para PCR usando DNA da Xf como molde. O *amplicon*<sup>11</sup> do tamanho correspondente aos fragmentos dos genes avaliados foi verificado por corrida eletroforética em gel de agarose 2% (figura 3.9.2). Por este gel, podemos observar que todos os *primers* apresentam forte banda em 100 pares de base. Considerando a largura da banda e o limite de resolução da medida, os *primers* apresentam tamanho do fragmento esperado (tabela 3.9.1).

Tabela 3.9.1: Genes avaliados e seqüências dos nucleotídeos dos *primers* usados para o qPCR-RT. Siglas: F (*forward*) significa *primer* direto enquanto R (*reverse*) representa o *primer* reverso. Os genes XF0810, XF0818 e XF2708 são responsáveis pela degradação de parede celular vegetal; o gene XF0910 representa o controle endógeno.

Gene	Seqüência do <i>Primer</i>	Tamanho do Fragmento (em pares de base)
XF0810	F - 5' CATTGTGTCCCGTTACGCAT - 3'	88
	R - 5' CAAGCGCAGCTTCAGTATCA – 3'	
XF0818	F - 5' GATGTCTACGTACAGCCGTA – 3'	<b>99</b>
	R - 5' GTAGCCGGCTTTCGCAAAAT – 3'	
XF2708	F - 5' – CTTACGTGGTCAAAAAGGGC – 3'	87
	R - 5' – CGTCCAGTGCATCATTCAGT – 3'	
XF0910	F - 5' TCCAGCCAGGTCAGCAGAAC 3'	151
(petC)	R - 5' ACCAAAAAAGTCAACAACACTAGGAA 3'	



Figura 3.9.2: Validação dos primers após amplificação por PCR e corrida eletroforética em gel de agarose 2%.

Para este estudo em particular, biofilmes de Xf foram cultivados por 7, 14 e 21 dias em superfícies de Si, AC e EC sob as mesmas condições. Após cada período de cultivados, o meio de

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Pedaço de DNA formado como produto de eventos de amplificações naturais ou artificiais.

cultura foi removido juntamente com as células livres em solução; as amostras foram lavadas gentilmente com água tratada com DEPC (Dietil-Pirocarbonato). Os biofilmes foram coletados por raspagem seguida de centrifugação a 12000 rpm por 10min a 4°C também em água tratada com DEPC. Após essa etapa, as células bacterianas foram armazenadas a -80°C para posterior extração do RNA total.

O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) e tratado com DNase utilizando o sistema de coluna da Qiagen (Rnase-Free Dnase Set). A concentração e a integridade dos RNAs foram analisadas no "RNA Nano Labchips" através do aparelho *Bioanalyzer* 2100 (*Agilent Technologies*) utilizando o RNA Nano Labchips kit. Para síntese de cDNA foram utilizados 15 µL do RNA total e adicionados: 1µL de *random primer* e 1µL dNTp (10mM) em água tratada com DEPC (Invitrogen). A mistura foi mantida a 65°C por 5 min. Após esta etapa, foram adicionados os seguintes reagentes: 4µL de tampão da 5X (Invitrogen), 2µL do 0,1M DTT (dithiothreitol), 1µL do inibidor da RNase (Invitrogen) e 1µL de SuperScript II reverse transcriptase (200U/µL Invitrogen). A síntese do cDNA foi conduzida a 42°C por 60 min no termocilador para realização da PCR.

Por fim, a seguinte reação foi submetida ao qPCR-RT: 2µL de cDNA, 1µL de cada *primer* (direto e reverso) e 12,5 µL do "*SYBR green PCR master mix*" (Applied Biosystems), o volume final foi ajustado para 25 µL com água autoclavada. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C. Em todas as reações foram utilizadas uma amostra controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações. A detecção dos produtos de PCR foi medida por monitoramento do aumento da fluorescência emitida pelo marcador *SYBR green* que está intercalado na fita dupla de DNA. O controle endógeno (petC) foi utilizado para normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA.

As medidas foram analisadas pelo método Ct comparativo ou método  $\Delta\Delta$ Ct [71]. Neste método, duas normalizações são realizadas. Na primeira, normalizamos a amostra através de um gene que expressa igualmente para todas as amostras, independentemente das condições experimentais, garantindo que o resultado final não seja conseqüência de diferentes concentrações das amostras, mas da expressão do gene de interesse. A segunda normalização é realizada através de uma amostra de referência (calibrador), uma vez que esse método prevê a análise da mudança de expressão gênica em relação a outra (calibrador). A partir dos resultados obtidos, duas análises foram feitas: (1) níveis de expressão dos genes versus o tempo, onde como calibrador foi escolhida a amostra com 7 dias de cultivo e, (2) comparação da expressão gênica entre as superfícies, onde a superfície de Si foi utilizada como calibrador, como será descrito na seção 4.2.2.

### **Capítulo IV**

#### **Resultados e Discussões**

#### 4.1 Formação inicial do biofilme de Xf

Superfícies de vidro foram inoculadas com Xf e meio de cultura PW no interior da célula líquida do AFM com temperatura controlada a 28°C e, a partir desse momento, aquisições de topografia foram realizadas em meio líquido. Biofilmes iniciais de Xf, ocupando uma área aproximada de  $15 \times 15 \mu m^2$ , foram encontrados após apenas 6 horas da inoculação (figura 4.1.1). As imagens foram adquiridas sem remover ou danificar o biofilme, sugerindo uma adesão irreversível. Vários estudos [4, 6, 72, 73] realizam imagens de AFM de células bacterianas utilizando procedimentos de imobilização artificial das células na superfície ou amostras secas onde efeitos de desidratação podem ser observados na superfície da bactéria. Auerbach [73] realizou um estudo morfológico do biofilme da bactéria *Pseudomonas putida* por AFM. Ele mencionou que imagens de melhor qualidade e estáveis são adquiridas em amostras lavadas e secas, e ainda, que amostras com mais dias de cultivo são mais instáveis. Gamby e colaboradores [72] mencionam que a realização de imagens de bactérias é mais facilmente adquirida em ar do que em meio líquido, apesar da segunda opção implicar em várias precauções como garantir a sobrevivência da bactéria. Desta forma, consideramos que a aquisição de imagens de topografia dos biofilmes de Xf in vitro, onde processos artificiais de imobilização não foram utilizados, representa um resultado original em termos do que vem sendo apresentado na literatura.

Feil e colaboradores [47] alegam não haver evidências da formação de agregados célulacélula, exceto após a célula aderir à superfície. Considerando o fato do processo de crescimento e divisão da bactéria Xf levar pelo menos 5 horas (seção 2.3), seria impossível a formação de biofilme com as dimensões observadas (figura 4.1.1) após apenas 6 horas de inoculação. Esse biofilme inicial é provavelmente conseqüência da presença de agregados de Xf previamente formados na solução aderidos na superfície e, portanto, não um evento de adesão de única célula. De maneira consistente com as imagens de AFM, imagens de SEM adquiridas em superfícies de Si inoculadas com Xf mostram aglomerados celulares após 4 horas de inoculação e, além dos aglomerados, biofilmes já formados após 6 horas de inoculação (figura 4.1.2). Em amostras após 2 horas de inoculação, nenhuma célula, aglomerado ou biofilme foi observado, sugerindo que adesões irreversíveis não ocorrem antes de 2 horas de inoculação. Além disso, não observamos células individuais aderidas para esse intervalo de tempo, sugerindo uma adesão mais rápida via aglomerados presentes na solução. Além de considerar o tempo de crescimento e divisão da bactéria Xf, outro indício da adesão do aglomerado é a direção na qual as células se encontram aderidas na superfície (figura 4.1.2); note que as células se encontram paralelas uma as outras e não alinhadas longitudinalmente – o que indicaria o processo de divisão. Desta forma, embora agregados celulares não sejam normalmente considerados responsáveis pela origem da formação de biofilmes [28, 47], essa possibilidade não deveria ser desprezada, uma vez que a adesão poderia ser facilitada pelo aglomerado.



Figura 4.1.1: Imagens de topografia (AFM) para biofilme em estágio inicial observado após 6 horas de inoculação em superfície de vidro no interior de célula líquida do AFM. As aquisições em (A) e (B, C) foram realizadas em experimentos distintos indicando reprodutibilidade.



Figura 4.1.2: Imagens de SEM para aglomerados aderidos em superfície de Si após 4 horas (A, B) e 6 horas (C) de inoculação. Para 6 horas de inoculação também observamos biofilmes já formados (D). Células apresentam aspecto granular devido ao processo de desidratação.

### 4.2 Formação de biofilme de Xf em diferentes superfícies

### 4.2.1 Morfologia e Estrutura

Biofilmes de Xf foram cultivados em superfícies de vidro e silício (Si), como mostra a figura 4.2.1. Para ambas as superfícies, os biofilmes apresentam forma circular e diferentes tamanhos. Além disso, biofilmes em estágio inicial (pequenos aglomerados, fig. 4.2.1 setas pretas) também são observados, evidenciando a continuidade no processo de formação de novos biofilmes. Biofilmes com múltiplas camadas e diâmetros largos (150-250µm) são observados em ambas as superfícies após 7 dias de cultivo. Como mencionado no capítulo 1, a superfície de vidro é largamente utilizada nos estudos de formação e desenvolvimento de biofilmes *in vitro*. Por este motivo o desenvolvimento de biofilmes de Xf cultivados neste tipo de superfície foi previamente caracterizado pelo nosso grupo [74]. No presente estudo, caracterizamos o desenvolvimento do biofilme de Xf *in vitro* em superfície de Si por MO e SEM como detalharemos adiante. Devemos mencionar aqui que os biofilmes cultivados em vidro e Si com mesmas condições iniciais apresentam similaridade não apenas em relação à forma e tamanho ao longo do tempo, como também à quantidade de biofilmes de Xf (figura 4.2.1). Desta forma, devido a essa similaridade e também a facilidade de preparação da amostra para SEM, a superfície de silício foi utilizada como referência na caracterização do desenvolvimento do biofilme em diferentes superfícies apresentada a seguir.



Figura 4.2.1: Imagens de MO de biofilmes de Xf cultivados por 7 dias em superfície de vidro (A) e silício (B). As setas brancas representam biofilmes com diâmetro em torno de 220µm. Já as setas pretas representam biofilmes em estágio inicial com diâmetro em torno de 30µm, indicando a formação de novos biofilmes.

A figura 4.2.2 mostra biofilmes de Xf predominantemente encontrados para cada tempo de cultivo analisado (7, 14, 21, 28 e 35 dias) em superfície de Si. Os biofilmes foram cultivados em duas condições: com reposição de meio de cultura PW a cada 7 dias e sem reposição do mesmo. Para ambas as condições observamos uma maior quantidade de biofilmes em estágio inicial<sup>12</sup> (figuras 4.2.2A, E, H, I e L) em amostras com 7 e 21 dias, enquanto para amostras cultivadas por 14 dias ocorre uma predominância de biofilmes volumosos<sup>12</sup> (figuras 4.2.2C, D, G, J, K). Por outro lado, diferenças são observadas após 28 dias de cultivo. Para biofilmes cultivados por 28 dias sem reposição de meio de cultura, podemos observar a predominância de biofilmes em estágio inicial (fig. 4.2.2L), biofilmes de única camada (fig. 4.2.2M) e, ainda, marcas indicando regiões onde havia biofilmes que, possivelmente, foram totalmente desestruturados (fig. 4.2.2N, O, setas brancas). Essas marcas ocorrem ainda mais freqüentemente em amostras após 35 dias de cultivo. A ausência ou a diminuição do número de biofilmes volumosos nessas amostras indicam que a evolução dos biofilmes foi interrompida, provavelmente devido à falta de nutrientes para o processo de divisão celular. Já para amostras com reposição de meio de cultura, ainda que o mesmo comportamento descrito acima seja observado, biofilmes em estágio inicial e também volumosos são encontrados na superfície tanto para amostras com 28 dias quanto para amostras com 35 dias de cultivo, indicando que os biofilmes continuam evoluindo.

A formação de novos biofilmes será determinada pela disponibilidade de nutrientes e seu desenvolvimento pela difusão de nutrientes no interior do biofilme. Matsushita e Fujikawa [75] sugerem que o cultivo do biofilme ocorre primariamente pela difusão de nutrientes. No caso da Xf em particular, estudos prévios [74] indicam que a difusão de nutrientes se torna lenta em biofilmes volumosos, não apenas pelo tamanho dos biofilmes, como também pela presença de matriz polimérica extracelular envolvendo o biofilme, que serve como barreira extra na difusão de nutrientes. Quando realizamos a reposição de meio de cultura, o experimento simula as condições na planta do ponto de vista de manutenção de nutrientes. Desta forma, as amostras cultivadas nestas condições apresentam as mesmas características de amostras *in situ*, onde uma única amostra apresenta biofilmes em todos os estágios de formação [76]. Em geral, o estudo do biofilme *in vitro* busca um entendimento de cada estágio de formação do biofilme, de forma que se torne possível a determinação de um ciclo com etapas bem caracterizadas. Sendo esse também o objetivo do presente

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Como mencionamos na seção 2.2, as etapas de formação do biofilme não são bem elucidadas. Assim, não há conhecimento de modelo experimentalmente validado para sua descrição. Baseado no modelo mais bem aceito atualmente [7], optamos por utilizar o termo 'estágio inicial do biofilme' para nos referir aos aglomerados de duas ou mais células com até 80μm de diâmetro independente do número de camadas celulares (fig. 4.2.2A, E, H, I e L); já o termo 'biofilme volumoso' será utilizado para denominar multicamadas celulares com diâmetro maior que 80μm (fig. 4.2.2C, D, G, J, K).

trabalho, concentramos nossos estudos nos biofilmes cultivados sem reposição de meio de cultura. Considerando estas amostras, vale mencionar que ainda podemos observar biofilmes em estágio inicial para amostras com 7 (figura 4.2.2D), 14 (figura 4.2.2F) e 21 dias (figuras 4.2.2H-K), geralmente nas proximidades de biofilmes volumosos, indicando o desprendimento de células e início de novos biofilmes. Por essa razão, a caracterização de cada amostra é sempre realizada considerando os biofilmes predominantes.



Figura 4.2.2: Imagens de SEM de biofilmes cultivados em superfície de Si por 7 dias (A-D), 14 dias (E-G), 21 dias (H-K) e 28 dias (L-O). Setas brancas em (D, F, G, I, J) indicam biofilmes em estágio inicial; setas brancas em (N,O) indicam regiões onde havia biofilmes. Setas pretas: presença de algum resíduo.

Os biofilmes cultivados nas superfícies de Si, EC e AC foram mapeados por MO. Para todas as superfícies podemos encontrar biofilmes circulares e, ainda, um número significativamente maior de biofilmes (cerca de 10 vezes) em superfície de Si que nas superfícies de EC e AC (representado na figura 4.2.3 A). Além disso, notamos a presença de biofilmes com diferentes intervalos de tamanhos para cada tempo de cultivo (tabela 4.2.1). Este resultado também mostra que os biofilmes atingem tamanhos maiores quando cultivados na superfície de Si, como ilustra a figura 4.2.3B. Vale mencionar que o maior biofilme encontrado na superfície de AC com 21 dias de cultivo (350µm de diâmetro) corresponde à metade do tamanho do biofilme encontrado na superfície de Si com apenas 14 dias de cultivo (660µm de diâmetro). Para amostras após 28 dias de cultivo, células espalhadas sobre a superfície e alguns biofilmes em estágio inicial são predominantes para todas as amostras.

No modelo proposto para a formação do biofilme [7], o início do processo se dá no momento de adesão, ainda reversível; por sua vez, o ciclo é finalizado quando ocorre a desestruturação do biofilme e as células migram para outras regiões. Não podemos afirmar que o ciclo do biofilme da Xf é de 28 dias, uma vez que, para amostras com reposição de meio de cultura, existe uma continuidade na formação de biofilmes após esse tempo de cultivo. Esse resultado sugere apenas que, a partir das condições iniciais utilizadas, após 28 dias não há nutrientes suficientes para a continuidade na evolução e cultivo dos biofilmes. O tamanho máximo observado para o biofilme de Xf em cada superfície poderia indicar o ciclo do biofilme, uma vez que sua desestruturação deve começar quando há falhas na difusão de nutrientes por conseqüência de seu tamanho. Desta forma, na superfície de Si observa-se o maior biofilme com 14 dias (~660µm de diâmetro) o mesmo ocorrendo para superfície de EC (~375µm de diâmetro). Já para a superfície de AC, o maior biofilme encontrado surge com 21 dias (~350µm de diâmetro). Para nenhuma superfície encontramos biofilmes maiores que os mencionados, mesmo para amostras com reposição de meio de cultura.

Os resultados apresentados nesta seção sugerem diferentes taxas de desenvolvimento do biofilme de Xf para cada superfície, sendo que os biofilmes apresentam desenvolvimento mais rápido na superfície de Si, ocorrendo de forma intermediária na superfície de EC e lentamente na superfície de AC. A maior quantidade de biofilmes na superfície de Si poderia indicar uma adesão facilitada em mais pontos nesse substrato que nas superfícies com celulose; experimentos para a investigação da influência da superfície na adesão serão apresentados na seção 4.3.



Figura 4.2.3: Biofilmes cultivados em superfícies de Si, EC e AC por 7 dias e observados por microscopia ótica (A) e microscopia eletrônica de varredura (B).

Tabela 4.2.1: Intervalo de diâmetros dos biofilmes observados para cada uma das superfícies após 7, 14 e 21 dias de cultivo. O diâmetro mínimo representa o aglomerado que já apresenta forma circular. Desta forma, aglomerados de poucas células (2-5) aderidos na superfície não foram considerados nesse intervalo.

Tempo de	Intervalo de Diâmetro do biofilme (µm)			
Cultivo	Si	EC	AC	
7 dias	20 - 220	20 - 160	20 - 100	
14 dias	20 - 660	20 - 375	20 - 200	
21 dias	20 - 540	20 - 350	20 - 350	

Do ponto de vista estrutural, os biofilmes também apresentam diferenças dependendo da superfície que se desenvolvem. Podemos observar biofilmes mais uniformes, e com bordas bem definidas nas superfícies de Si e EC (figura 4.2.4A-B, D-E, respectivamente); na superfície de AC, contudo, isso não acontece (figura 4.2.4G).

Células individuais de Xf aderidas nas superfícies foram freqüentemente observadas em todas as superfícies (figura 4.2.4C, F, H e J). Na superfície de EC (fig. 4.2.4F), as células se apresentam sobre o filme com contorno bem definido e fácil visualização na superfície. Contudo, também observamos em poucas imagens células em depressões na superfície e, ainda, células penetrando defeitos presentes no filme de EC (fig. 4.2.4F). Por outro lado, na maioria das imagens observadas para superfície de AC, as células se apresentam entrelaçadas ao filme, muitas vezes dificultando a visualização das mesmas por SEM (fig. 4.2.4H). Essa característica pode ser melhor visualizada nas imagens de topografia representadas pela figura 4.2.4(I). Além disso, notamos depressões ao redor de algumas células de Xf também na superfície de AC (figura 4.2.4J).

Desta forma, tanto a taxa de desenvolvimento do biofilme de Xf, como a estrutura do biofilme ocorrem de maneira diferenciada para cada superfície. Esses resultados sugerem um fator de dependência no desenvolvimento do biofilme em relação ao substrato. O desenvolvimento mais lento dos biofilmes nas superfícies de celulose sintética e, principalmente no caso da superfície de AC, a observação de uma estrutura diferenciada poderiam estar relacionados com o processo de degradação de celulose. Diante destes resultados, investigamos a produção de enzimas de degradação de parede celular vegetal pela Xf (seção 4.2.2), com a finalidade de relacionar a expressão gênica com o ciclo de desenvolvimento do biofilme.



Figura 4.2.4: Células aderidas e biofilmes em superfície de Si (A-C), EC (D-F) e AC (G-J). (A, D) biofilme com única camada; (B, E) borda de biofilmes; (C, F, H-J) células individuais ou pequenos aglomerados celulares; (G) biofilme em superfície de AC. Com exceção da imagem em (I) adquirida por AFM, todas as outras imagens foram adquiridas por SEM.

## 4.2.2 Expressão Gênica

Como mencionado na seção 2.3, a bactéria Xf apresenta a capacidade de degradar a parede celular vegetal através da expressão das celulases XF0810, XF0818 e XF2708. Nesta seção avaliamos os níveis de expressão gênica para esses genes dos biofilmes de Xf cultivados durante 7, 14 e 21 dias em superfícies de Si, EC e AC.

A figura 4.2.5 mostra os níveis de expressão gênica ao longo do tempo para biofilmes cultivados em cada uma das superfícies em estudo. Neste caso, amostras com 7 dias de cultivo foram utilizadas como calibrador. Podemos notar que, nas amostras preparadas em ambos os filmes de celulose (figura 4.2.5A, B), identificamos que os níveis de expressão gênica diminuem para biofilmes com 14 dias e aumentam para biofilmes com 21 dias – ainda que, neste caso, não seja maior que a expressão em biofilmes com 7 dias. Por outro lado, comportamento oposto é observado para biofilmes cultivados em superfície de Si (figura 4.2.5C).

Para avaliar as variações dos níveis de expressão gênica entre as diferentes superfícies, utilizamos as amostras cultivadas em superfície de Si como calibrador (figura 4.2.6). Nesta análise, podemos observar que os biofilmes cultivados por 7 dias apresentam uma maior indução da expressão gênica em superfícies de celulose do que na superfície de Si; enquanto para biofilmes cultivados por 14 dias a expressão dos mesmos genes é reduzida nas superfícies AC e EC. Estes resultados indicam que a presença de celulose na superfície não induz maior expressão desses genes durante todo o ciclo.

Vale mencionar que, a princípio, a expressão dessas celulases na superfície de Si (sem filme de celulose) não era esperada. Em geral, a regulação da expressão de um gene específico está associada a sistemas de sensores que detectam determinada substância no meio em que a bactéria se encontra. Como exemplo, podemos citar o sensor *PhoR*-quinase encontrado em várias espécies bacterianas. Resumidamente, em condições repletas de fosfato inorgânico, esse sensor diminui a atividade quinase; enquanto que em limitação de fosfato inorgânico, de alguma forma, a atividade quinase é estimulada e ativa o gene regulador *PhoB* que, por sua vez, ativa uma série de genes associados a diferentes funções [77]. A regulação dos genes XF0810, XF0818 e XF2708 não é conhecida. A expressão dessas celulases em biofilmes de Xf cultivados em superfície de Si pode indicar que a ativação desses genes não está associada à presença de celulose, mas de algum outro composto. Deve-se considerar que outros experimentos seriam necessários para elucidar a razão da expressão de celulases na superfície de Si, contudo, este não é o foco no presente trabalho.

Sob um aspecto não tão específico, observamos uma diferença de fase na indução/repressão da expressão das celulases XF0810, XF0818 e XF2708 entre a superfície de Si e as superfícies contendo celulose (AC e EC). Deve-se notar, contudo, que o comportamento da expressão é similar para as superfícies com celulose (AC e EC). Esses resultados sugerem possíveis mudanças na expressão gênica para diferentes superfícies, evidenciando novamente as características do substrato como fator de dependência no desenvolvimento geral do biofilme, ou seja, morfológico, estrutural e genético. Desta forma, com a finalidade de entendermos quais características das superfícies podem influenciar ou serem determinantes na formação do biofilme de Xf, apresentamos na seção 4.3 um estudo abordando as propriedades físico-químicas das superfícies utilizadas.



Figura 4.2.5: Expressão Gênica das celulases para amostras coletadas nas superfícies de AC (A), EC (B) e Si (C) versus o tempo. Neste caso amostras coletadas com 7 dias de cultivo foram utilizadas como calibrador (referência).



Figura 4.2.6: Expressão Gênica das celulases para (A) amostras com 7 dias e (B) amostras com 14 dias. Neste caso amostras coletadas da superfície de Si foram utilizadas como calibrador (referência).

### 4.3 Propriedades físico-químicas das superfícies

### 4.3.1 Rugosidade, hidrofobicidade e filme condicionante

A figura 4.3.1 mostra imagens de topografia de cada um dos substratos utilizados para o desenvolvimento de biofilmes de Xf e sua respectiva rugosidade quadrática média (equação 3.3.1). Qualitativamente, estas imagens mostram diferentes morfologias para cada uma das superfícies. Sob esse aspecto, ambas as superfícies de celulose derivatizada apresentam morfologia do tipo grão. Contudo, a superfície de EC também apresenta estruturas do tipo fibras e regiões com depressões, formando um filme não homogêneo sobre o substrato de Si. As diferentes morfologias observadas resultam em diferentes valores de RMS para cada superfície. Characklis e colaboradores [18] observaram uma maior extensão da colonização microbiana em superfícies com maior rugosidade. De maneira semelhante, Oh e colaboradores [19] notaram um número menor de células da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* aderidas na superfície e, ainda, biofilmes menores quando a rugosidade do substrato diminui. Entretanto, no presente estudo, o substrato de menor rugosidade (superfície de Si) apresenta um melhor desenvolvimento do biofilme de Xf tanto em relação à quantidade quanto ao tamanho (seção 4.2).

Além disso, uma preocupação presente em estudos deste tipo é a formação do filme condicionante pela adsorção natural de moléculas no substrato. Bakker e colaboradores [78] observaram que o filme condicionante formado pela adsorção de componentes orgânicos

provenientes da água do oceano modifica a rugosidade e hidrofobicidade de diferentes substratos, afetando a adesão inicial do biofilme de três diferentes espécies bacterianas. No presente estudo, imagens de topografia mostram alterações na morfologia e uma diminuição significativa no valor de RMS para superfícies de vidro após 3 horas em contato com meio de cultura PW sem BSA, independente da presença de Xf na solução (figura 4.3.2). Neste caso, a diminuição da rugosidade do substrato de vidro não afeta o desenvolvimento do biofilme, que é similar ao da superfície de Si. A mudança morfológica também foi observada em superfície de Si após 2 horas em contato com meio de cultura PW com BSA, ainda que, para este caso, o valor de RMS não tenha apresentado alterações significativas. Por outro lado, a superfície de AC, onde o biofilme apresenta lento desenvolvimento e tamanhos menores que nas outras superfícies, apresenta valor de RMS menor que a superfície de EC. Embora alguns autores sugiram que, em geral, superfícies de maior rugosidade favoreçam a adesão e colonização bacteriana [18, 19], Li e Logan [20], ao estudarem 11 superfícies e 8 espécies bacterianas, não observam diferença significativa no efeito da rugosidade na adesão bacteriana. De maneira semelhante, nossos resultados sugerem que, no caso da Xf, uma relação direta de dependência da rugosidade com adesão/desenvolvimento do biofilme não é estabelecida.

As mudanças morfológicas mencionadas acima indicam a formação do filme condicionante através da adsorção dos componentes do meio de cultura nos substratos de vidro e Si. Através de indentações provocadas com a ponta de AFM na superfície da amostra, observamos inicialmente que existe uma camada de cobertura macia sobre o substrato original, mais rígido. Podemos também observar um aumento da espessura de poucos (até 10) nanômetros após 2 horas para aproximadamente 50-100nm depois de alguns dias<sup>13</sup>. A diferença relativamente pequena (~50nm) observada após este período indica que uma maior adsorção de moléculas ocorre durante os primeiros dias atingindo, então, uma saturação. No caso dos filmes de celulose derivatizada (AC e EC), não observamos alterações morfológicas após contato com o meio de cultura PW por AFM. Contudo, considerando que, inicialmente, estes filmes apresentam diferentes características morfológicas do vidro e Si, a interação com o meio de cultura não deve ser desprezada ainda que não se observe a formação de ma filme contínuo. A interação dos constituintes do meio de cultura com o substrato, independente da formação de filme condicionante homogêneo, pode modificar outras propriedades da superfície além da rugosidade.

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Experimentos foram realizados para 5, 15 e 20 dias, como descrito na seção 3.3.1.



Figura 4.3.1: Imagens de topografia (AFM) das superfícies de Si (A), vidro (B), AC (C) e EC (D) adquiridas em ar.



Figura 4.3.2: Imagens de topografia (AFM): superfície de vidro (A); superfície de vidro após 3 horas em contato com meio de cultura PW sem BSA (B); superfície de vidro após 3 horas em contato com meio de cultura PW sem BSA na presença de Xf (C). Com exceção da superfície de vidro (A), as imagens foram adquiridas em solução (próprio meio de cultura).

Outra propriedade relevante na adesão bacteriana que tem sido mencionada na literatura é a hidrofobicidade do substrato [13, 17]. Oliveira e colaboradores [79] observaram uma diminuição do número de células da bactéria *Staphyloccocus epidermis* quando o grau de hidrofobicidade do substrato diminui. Comportamento similar foi observado quanto à adesão das bactérias *Alcaligenes* 

*denitrificans* em superfícies poliméricas [13]. Sheng, Ting e Pehkonen [17] observam que a diminuição na hidrofobicidade em superfícies de metal enfraquece a adesão bacteriana. Todas as superfícies utilizadas nesse trabalho apresentam formalmente caráter hidrofílico (ângulo de contato < 90°). Notamos que a superfície de vidro apresenta maior grau de hidrofobicidade que as demais superfícies (tabela 4.3.1). Contudo, a formação do filme condicionante leva as superfícies de vidro e Si de um grau hidrofílico moderado para completamente hidrofílico após 3 horas de contato com PW com BSA como mostra a tabela 4.3.1. Para PW sem BSA, também se observa a mesma tendência, embora a mudança no grau de hidrofobicidade dessas superfícies seja menos significativa no intervalo de tempo analisado. Devemos lembrar que os primeiros aglomerados aderidos foram observados após 4 horas de contato do inóculo e superfície de Si, ocorrendo o mesmo com a superfície de vidro após 6 horas (seção 4.1), sugerindo que a adesão ocorre após a formação do filme condicionante.

Tabela 4.3.1: Valores do ângulo de contato para cada um dos substratos utilizados para o cultivo de biofilme de Xf sem contato com meio de cultura PW e após contato com o meio de cultura por 3, 6, 12 e 24 horas. No caso das superfícies após contato com meio de cultura PW o erro provém do erro da medida; enquanto para as superfícies sem PW o erro é obtido pelo desvio padrão da média de um conjunto maior de amostras (seção 3.5).

Composição	Tempo de	Ângulo de Contato (º)			
do meio de	exposição ao meio	Vidro	Si	EC	AC
imersão	de cultura				
Controle (ar)	-	79±2	53±6	69±4	63±8
PW sem BSA	3hs*	74±1	33±1	72±3	60±1
	6hs*	71±1	45±1	75±1	52±1
	12hs*	63±1	34±1	70±4	51±1
	24hs*	59±1	<b>48±1</b>	76±1	
PW com BSA	3hs*	<10	<10	26±1	63±1
	6hs*	<10	<10	32±1	45±1
	12hs*	<10	<10	30±1	70±1
	24hs*	<10	<10	21±1	67±1

A tabela 4.3.1 também mostra os valores de ângulo de contato para as superfícies contendo celulose derivatizada antes e após contato com meio de cultura PW. Para PW sem BSA não observamos alterações significativas no grau de hidrofobicidade de ambas as superfícies, AC e EC. Já no caso de PW com BSA, apenas a superfície de EC apresenta uma diminuição no grau de hidrofobicidade ainda que não se torne totalmente hidrofílica como as superfícies de Si e vidro.

Esses resultados sugerem que a formação do biofilme de Xf é favorecida em superfícies com baixo grau de hidrofobicidade, ou seja, mais hidrofílicas. Em contraste a este resultado, a literatura tem normalmente atribuído uma maior adesão bacteriana e melhor formação do biofilme em superfícies com terminações hidrofóbicas [13, 17-19]. Kefford e colaboradores [80], por exemplo, observaram que a adesão da bactéria *Leprospira biflexa serovar patoc 1 (L. patoc)* foi significativamente maior em superfícies hidrofóbicas que hidrofílicas. Contudo, eles observaram que, apesar da redução do grau de hidrofobicidade em substratos recobertos com a proteína BSA ou soro fetal bovino, a adesão bacteriana aumentou. De maneira semelhante ao reportado por esses autores, nossos resultados sugerem que a natureza dos grupos funcionais na superfície pode ser mais determinante na formação do biofilme de Xf que outras propriedades da superfície. Desta forma, o efeito do meio de cultura PW sobre as superfícies de vidro e Si pode ser a razão da similaridade observada no desenvolvimento dos biofilmes de Xf que forma, sob esse aspecto, das superfícies de celulose derivatizada.

### 4.3.2 Caracterização química por ATR-FTIR

Com a finalidade de investigar as diferenças nas superfícies do ponto de vista químico, espectros no infravermelho foram obtidos para cada uma das superfícies de celulose (AC e EC), assim como para o filme condicionante formado pelo meio de cultura PW com BSA sobre a superfície de Si como mostra a figura 4.3.3. Os espectros obtidos para as superfícies de AC e EC são compatíveis com a literatura [81, 82]. Podemos observar que as superfícies de celulose são semelhantes pela presença de grupos CH<sub>3</sub> e C–O–C, contudo diferem pela presença dos grupos C=O e C–O na superfície de AC. Por outro lado, o filme condicionante formado pela adsorção das moléculas do meio de cultura PW na superfície de Si apresenta grupos funcionais diferentes das superfícies de celulose, com exceção dos grupos CH. Embora o contato com meio de cultura PW produza efeitos diferentes nas superfícies em relação às mudanças do grau de hidrofobicidade, não podemos desconsiderar a possibilidade que o meio de cultura PW altere ou acrescente grupos funcionais nas superfícies de celulose.

A figura 4.3.4 mostra os espectros no infravermelho para o meio de cultura PW com e sem BSA e, também, para alguns dos seus componentes individuais. Para ambos os casos, as bandas de infravermelho relevantes foram encontradas entre 1700 e 950 cm<sup>-1</sup>. É evidente que as contribuições dominantes no espectro de PW são provenientes de aminoácidos e proteínas (glutamina e BSA,

quando presente) e do grupo fosfato. As bandas observadas em 1656,8 cm<sup>-1</sup> e 1666,4 cm<sup>-1</sup> são associadas a estruturas de proteína enovelada e helicoidal, respectivamente [83]; as bandas em 1578,6 cm<sup>-1</sup> e 1547,8 cm<sup>-1</sup> são atribuídas às ligações N – H, C – N e vibrações assimétricas para COO<sup>-</sup> deprotonado, enquanto a banda em 1408,9 cm<sup>-1</sup> corresponde a vibrações simétricas para COO<sup>-</sup> deprotonado [84]. A vibração P = O relacionada aos produtos fosfodiester e polifosfato aparecem ao redor de 1077,2 cm<sup>-1</sup> [83]. As bandas em 1454,9 cm<sup>-1</sup> e 1300,9 cm<sup>-1</sup> correspondem as ligações CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> e vibrações C – N, respectivamente. A vibração simétrica dos grupos fosforil normalmente surge com banda ao redor de 989,4 cm<sup>-1</sup>.



Figura 4.3.3: Espectros de IR adquiridos em cristal de ZnSe com superfície de Si. Os filmes de celulose, AC (A) e EC (B), assim como o filme condicionante pelo PW (C) foram preparados no topo do cristal.



Figura 4.3.4: Espectros de IR adquiridos em cristal de ZnSe com superfície de Si para os compostos BSA, glutamina e  $K_2$ HPO<sub>4</sub> e, ainda, para PW com e sem BSA foram obtidos em solução sobre mesmo cristal através da célula líquida.

Diante da evidência da formação do filme condicionante, as alturas de cada banda de absorção foram registradas ao longo do tempo na superfície do cristal (Si), como ilustra a figura 4.3.5 para as bandas em 1077,2 cm<sup>-1</sup> e 1578,6 cm<sup>-1</sup>. A tabela 4.3.2 mostra as taxas de absorção média para cada uma dessas bandas. Embora algumas bandas apresentem baixa taxa de absorção (1578,6 cm<sup>-1</sup>, 1454.9/1456.2 cm<sup>-1</sup> e 1408.9 cm<sup>-1</sup>, tabela 4.3.2), um aumento na intensidade de absorção ao longo do tempo é observado independente da presença de BSA no meio de cultura PW, fornecendo evidência adicional da formação do filme condicionante. A maioria das bandas apresenta dois regimes de crescimento, como indicado na figura 4.3.5. O primeiro regime, não linear e que corresponde às duas primeiras horas de aquisição dos espectros, revela taxas de absorção mais altas que no segundo regime, indicando uma maior taxa de adsorção das moléculas na superfície neste período; esse resultado coincide com a observação da formação do filme com espessura estimada em alguns nanômetros por AFM, permitindo, assim, associar o primeiro regime à cobertura inicial da superfície do cristal. Após esse período, a taxa de absorção estabiliza (regime 2) indicando que um equilíbrio dinâmico é alcançado para a concentração dos constituintes no filme formado inicialmente. Além disso, é importante notar que a taxa de absorção é sempre maior para as bandas atribuídas ao grupo fosfato e independe da presença de BSA no meio de cultura.



Figura 4.3.5: Evolução temporal para altura das bandas 1077,2 cm<sup>-1</sup> (vermelho) e 1578,6 cm<sup>-1</sup> (azul) na presença (símbolo fechado) e ausência (símbolo aberto) de BSA no meio de cultura PW.

	Taxa de Absorção (α) [10 <sup>-6</sup> ]			
Número de	PW com BSA		PW sem BSA	
Onda (cm <sup>-1</sup> )	Regime 1	Regime 2	Regime 1	Regime 2
1656,8 / 1666,4	6,8±0,4	1,9±0,1	8,3±0,2	3,9±0,1
1578,6	1,3±0,1	-	9,1±0,4	3,9±0,1
1454,9/1456,2	1,06±0,01	-	3,6±0,4	0,9±0,1
1408,9	2,2±0,1	-	8,1±0,4	3,8±0,1
1300,9	4,9±0,2	1,8±0,2	9,1±0,4	3,7±0,1
1077,2	15,5±0,1	4,1±0,1	16,2±0,1	4,9±0,1
989,4	8,7±0,6	2,4±0,3	15±1	4,6±0,5

Tabela 4.3.2: Taxas de absorção ( $\alpha$ ) para cada banda observada no espectro do PW na presença e ausência de BSA.

Considerando todas as superfícies utilizadas nesse estudo, os resultados obtidos sugerem fortemente que os grupos funcionais presentes na superfície desempenham papel importante na formação inicial e desenvolvimento do biofilme. Em particular, a presença de grupos fosfato no filme condicionante e a consequente diminuição de sua concentração no meio de cultura poderiam afetar

diretamente o desenvolvimento do biofilme de Xf, uma vez que, de uma maneira geral, o fosfato pode atuar como regulador na adesão e desenvolvimento de biofilmes. Danhorn e colaboradores [77] observaram que a ausência de fosfato livre no meio de crescimento aumenta a formação de biofilmes da bactéria fitopatógena *Agrobacterium tumafaciens*. Por outro lado, na mesma condição de baixa concentração de fosfato livre, a formação de biofilme da bactéria *Pseudomonas aureofaciens* é inibida [85]. No caso da Xf, ainda que a bactéria apresente o gene *PhoR* [86], considerado responsável pela sinalização de outros genes via concentração de fosfato, não temos conhecimento sobre nenhuma atuação dos grupos fosfato na regulação gênica. Mesmo assim, de modo especulativo, podemos sugerir, que um estímulo à formação do biofilme de Xf possa ocorrer devido à adsorção de grupos fosfato na superfície ou por diminuir a concentração de fosfato livre no meio pela deposição desta espécie na superfície.

Além disso, o fosfato parece também atuar como regulador no mecanismo de adesão de algumas bactérias. Wolf e colaboradores [29] demonstraram que a presença de acetil-fosfato pode atuar como sinal que permite, ordenadamente, ativar/desativar diferentes organelas que atuam diretamente na adesão reversível (flagelo-dependente) e irreversível (fimbria tipo IV-dependente) durante a formação de biofilmes de *E-coli*. Monds e colaboradores [28] em recente trabalho de revisão mencionam o papel do fosfato inorgânico na regulação da secreção e/ou localização da adesina LapA, uma proteína necessária para adesão e formação do biofilme de *Pseudomonas fluorescens*. Como já mencionamos, não há conhecimento do mecanismo regulatório dependente de fosfato no caso da Xf, tornando difícil qualquer especulação sobre uma possível regulação das adesinas via fosfato. Independente disso, um estudo do papel de adesinas na adesão deve ser considerado. Neste sentido, apresentamos o estudo de espectroscopia de força realizado para a adesina *XadA1* na seção 4.4.

### 4.3.3 Potencial de Superfície (PS)

A figura 4.3.6 mostra imagens de topografia e PS para áreas completamente recobertas com filmes de EC e AC. Podemos observar variações de PS sobre a superfície de ambas as celuloses indicando uma distribuição de carga não homogênea na superfície. Como mencionado na seção 3.6.3, os filmes de celulose derivatizada foram raspados para estabelecer medidas de PS\* a partir do substrato de Si como referência (figura 4.3.7). Associando as imagens de topografia e PS, podemos notar que o PS é sempre mais alto para a superfície de Si em relação a ambos os filmes de celulose. Em particular nas bordas do degrau notamos novamente a inomogeneidade do PS na celulose que

atinge valores mais baixos em algumas das estruturas tipo 'grão'. As figuras 4.3.7(E, F) ilustram o perfil do degrau formado após a raspagem do filme; para calcular PS\*, utilizamos cerca de cinco perfis por imagem, considerando a região mais homogênea dos filmes de celulose. Os valores médios obtidos para PS\* foram: (-97±13)mV para filmes de AC e (-343±87)mV para filmes de EC. Desta forma, o filme de EC apresenta uma maior diferença em relação à superfície de Si, mostrando um PS mais negativo. Contudo, em várias imagens das amostras de EC depositado sobre Si, notamos que a região correspondente ao fundo da topografia aparece na imagem de PS com valores próximos ao do Si, como mostra a figura 4.3.7(C). Mesmo na região não raspada do filme de EC, vemos que o PS apresenta valores próximos ao do Si em vários pontos das imagens adquiridas. Este comportamento se repete mesmo em regiões mais espessas do filme, indicando que o recobrimento do substrato pela EC não é uniforme.



Figura 4.3.6: Imagens de Topografia (A, B) e PS (C, D) de filmes de EC (A, C) e AC (B, D). A variação média para o sinal de PS são (80±17)mV e (48±5)mV, respectivamente. Note-se as diferentes escalas e a variação mais abrupta de PS associada à mudança na morfologia da superfície no caso da EC.



Figura 4.3.7: Imagens de Topografia (A, B) e PS (C, D) de bordas dos filmes de EC (A, C) e AC (B, D) sobre Si. (E) e (F) mostram perfil traçados na imagem de PS para superfície de EC e AC, respectivamente.

Os resultados apresentados nas seções anteriores evidenciam mudanças nas superfícies devido à interação com o meio de cultura. Desta forma, para relacionar o PS das superfícies à formação do biofilme, devemos considerar os efeitos do meio de cultura PW sobre as superfícies. A figura 4.3.8 mostra imagens de topografia e PS para superfície de Si após 24 horas em contato com meio de cultura PW com BSA No microscópio óptico notamos que a cobertura do substrato de Si era não homogênea; algumas regiões mostravam a presença de um filme mais espesso que associamos ao processo de remoção e lavagem do meio de cultura. Por este motivo, optamos novamente por raspar o filme e adquirir imagens na interface entre as duas regiões. A imagem de topografia na figura 4.3.8A mostra um degrau por volta de 1nm (figura 4.3.8B). Associamos o filme observado na figura à região do filme condicionante que se encontra mais próxima do substrato, pois é mais fino que os observados nos experimentos de indentação realizados em solução. Ainda assim, observamos nitidamente uma diferença de PS associada ao degrau observado na imagem de topografia (figuras 4.3.8A, C). Podemos notar pela imagem de PS (figura 4.3.8C) que o filme condicionante aumenta o nível de PS da superfície de Si; além disso, os perfis para os degraus observados (figura 4.3.8D) fornecem um valor médio de PS\* de (245±33)mV.



Figura 4.3.8: Imagens de Topografia (A) e PS (C) de filme condicionante formado pelo meio de cultura PW com BSA sobre Si com correspondentes perfis em (B) e (D), respectivamente.

De maneira semelhante à superfície de Si, os filmes de celulose derivatizada também apresentam mudanças no PS após contato com o meio de cultura (figura 4.3.9). Neste caso, o filme

foi raspado após contato da superfície com PW, consequentemente causando a remoção pelo menos parcial do meio de cultura na região de referência (Si). Associando as imagens de topografia e PS, notamos que, novamente, a região ausente de filme de celulose apresenta PS mais alto. Quantificando PS\* dos filmes de EC e AC (figuras 4.3.9 E, F), obtemos os valores médios de (-153±11)mV e (-195±36)mV, respectivamente. Em particular, o filme de AC torna-se menos homogêneo do ponto de vista elétrico após a exposição ao PW.



Figura 4.3.9: Imagens de Topografia (A, B) e PS (C, D) na região do degrau dos filmes de EC (A, C) e AC (B, D) após contato com meio de cultura PW. (E) e (F) mostram perfis traçados na imagem de PS para superfícies de EC e AC, respectivamente.

O diagrama na figura 4.3.10(A) resume os níveis de PS\* para as várias amostras analisadas. De maneira geral, o PS está associado a função trabalho ou nível de Fermi local, ou ainda ao HOMO - highest occupied molecular orbital, ou orbital molecular ocupado de mais alta energia - de um material; variações desta grandeza ao longo de um mesmo filme, como as observadas em nossos resultados, indicam a presença de estados localizados ou distribuição não homogênea de carga. Desta forma, as mudanças de PS\* após a exposição ao meio de cultura evidenciam modificações na distribuição de carga tanto na superfície de Si como nos filmes de celulose derivatizada. Essas modificações podem ser interpretadas levando em conta o efeito de dupla camada elétrica (EDL) [87]. A EDL ocorre devido à formação de dupla camada de cargas sobre uma superfície quando imersa em meio líquido; a primeira camada é resultado da adsorção de íons diretamente no substrato devido a interações químicas. A carga desta primeira camada sobre a superfície dependerá do PS inicial da superfície e sua afinidade com os íons presentes no meio líquido. Devido à presença desses íons na superfície surge um novo potencial, atraindo íons de cargas opostas e dando origem a uma segunda de camada de carga. Esta, porém, não está ligada diretamente à superfície, uma vez que os íons se apresentam livres. Sob esse aspecto, devemos considerar que, durante o processo de formação do biofilme, existe um processo dinâmico de interação entre o substrato e constituintes do meio de cultura utilizado. Ainda que as medidas de PS sejam realizadas em ar, nossos resultados evidenciam mudanças na distribuição de carga em todas as superfícies devido à interação com os constituintes do meio de cultura PW, uma vez que os valores de PS\* são significativos quando consideramos um efeito de blindagem pelos íons presentes na solução.



Figura 4.3.10: Diagrama ilustrando (A) níveis de PS para os diferentes filmes observados em relação à superfície de Si e (B) taxa de crescimento (em número e tamanho) dos biofilmes de Xf.

Neste sentido, a influência do pH do meio líquido poderia ser determinante na interação entre célula e superfície, uma vez que o pH está diretamente relacionado com a natureza dos íons presentes no meio de cultura e, consequentemente, nas variações de PS\*. Wulff e colaboradores [88] investigaram a formação de biofilmes de Xf em vidro em função do pH do meio de cultura. Eles observaram a formação de biofilme em solução com pH entre 6,6 e 7,5, sendo que um aumento significativo ocorre em pH 6,8. Ainda neste trabalho, eles observaram uma inibição drástica na formação de biofilmes e agregados em pH entre 6,0 e 6,6; entretanto, as células livres ainda sobrevivem e voltam a formar biofilmes quando novo meio de cultura com pH 6,8 é adicionado na amostra. Baseados nesses resultados, os autores sugerem que a mudança de pH pode sinalizar a necessidade da expressão de genes responsáveis pela adesão. Podemos, porém, entender também este resultado considerando que o pH altera a concentração de íons na solução e, portanto, variações de PS em ambas as superfícies (substrato e célula) podem ocorrer, influenciando os processos de agregação.

Do ponto de vista da adesão (e colonização) da Xf em superfícies expostas ao PW, nossos resultados mostram uma preferência por superfícies com PS\* médio mais alto (figura 4.3.8B), principalmente se considerarmos que a amostra de EC contém frações da superfície de Si expostas ao meio de cultura. De fato, interações eletrostáticas poderiam mediar a adesão bacteriana bem como o crescimento do biofilme. Como já mencionado (seção 2.3), Osiro e colaboradores [46] propuseram um modelo de adesão da Xf dependente de atração eletrostática. Esse modelo foi proposto baseado apenas na quantificação da produção de polissacarídeos pelas bactérias e na argumentação de que a célula bacteriana é positivamente carregada devido ao maior número de amino ácidos positivos na superfície. Por outro lado, através de medidas experimentais, Leite e colaboradores [45] sugerem que a superfície da Xf é carregada negativamente. As contradições na literatura mostram que a superfícia Xf e, ainda, a capacidade das proteínas modificarem sua conformação, podemos ter variações na distribuição de carga superfícial que permitiriam sua adesão em quaisquer superfícies. No entanto, a adesão seria facilitada em superfícies com um potencial mais adequado em função da carga nativa da bactéria no meio de cultura considerado.

Ainda sob o aspecto de adesão, a teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) tem sido empregada para descrever a adesão bacteriana à superfície em recentes pesquisas [89-91]. De maneira simplificada, esta teoria descreve a interação entre duas superfícies carregadas como uma combinação de van der Waals e dupla camada elétrica. A expressão para essa interação é dada por [92]:

$$V_{Total} = \frac{\varepsilon a_1 a_2 (\psi_{01}^2 + \psi_{02}^2)}{4(a_1 + a_2)} \left[ \frac{2\psi_{01}\psi_{02}}{(\psi_{01}^2 + \psi_{02}^2)} \ln \left( \frac{1 + \exp(-\kappa H_0)}{1 - \exp(-\kappa H_0)} \right) + \ln(1 - \exp(-2\kappa H_0)) \right] - \frac{Aa_1 a_2}{6(a_1 + a_2)H_0}$$
(4.3.1)

onde A é a constante de *Hamaker*,  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio,  $\kappa$  é o parâmetro *Debye Hückel*, a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub> são o raio de curvatura das superfícies, H<sub>0</sub> é a distância entre elas e, por fim,  $\psi_{01} e \psi_{02}$  são os potenciais de superfície.

Note que esta expressão é proporcional ao PS das superfícies envolvidas no problema (substrato e membrana da bactéria). Nossos resultados mostram uma tendência de formação do biofilme com dependência do PS em termos de estrutura e desenvolvimento, indicando que a teoria DLVO poderia descrever não somente a adesão, mas também como o biofilme vai se expandir pela superfície. Vale mencionar que interações específicas via organelas e proteínas de adesão não são previstas na teoria DLVO. Neste sentido, alguns modelos em extensão à teoria DLVO têm sido propostos na literatura - como o XDLVO [89, 93]. Esta abordagem tem sido bem sucedida para prever interações entre colóides não-carregados e superfícies em meio aquoso. Contudo, em muitos casos, o modelo XDLVO não descreve satisfatoriamente a adesão bacteriana [94]; essa discordância entre modelo e dados experimentais tem sido atribuída à presença de exopolímeros produzidos pelas bactérias.

## 4.4 Estudo de adesão específica: proteína de adesão XadA1

### 4.4.1 Experimento controle: ausência de XadA1

Medidas de espectroscopia de força foram realizadas entre a ponta de Si na ausência da proteína de adesão *XadA1* e cada uma das superfícies de Si, EC e AC. As curvas de força tipicamente observadas nestes experimentos foram apresentadas na seção 3.6.2. Vale lembrar que a aquisição dessas curvas foi realizada em tampão PBS ou meio de cultura PW com BSA (seção 3.6.2). As curvas de retração para cada ciclo mostram a ausência de forças na interação entre a ponta de silício e cada uma das superfícies independentemente da solução utilizada, embora, em menor porcentagem, se observe forças associadas a interações não-específicas. No caso das medidas realizadas em tampão PBS, interações não específicas com variações entre 35 - 375 pN foram observadas algumas vezes em superfícies de Si e EC, representando menos de 3% das medidas realizadas (figuras 4.4.1A e B,

respectivamente). Por outro lado, na superfície de AC este tipo de interação com a ponta de Si ocorre com mais freqüência, correspondendo a 21% das medidas realizadas (figura 4.4.1C). Neste caso, com o ajuste gaussiano para forças entre 15 - 75pN (intervalo onde se concentram essas interações), observamos uma força média em (32±13)pN. A figura 4.4.2 mostra a sequência temporal dos valores obtidos a partir das curvas de força realizadas nestas condições experimentais. Podemos observar que para Si e EC, as interações não-específicas ocorrem apenas eventualmente (figuras 4.4.2A e B, respectivamente). No caso da superfície AC, as interações não-específicas ocorrem de maneira diferenciada em cada região, como mostra a figura 4.4.2C, indicando uma dependência com a região; por exemplo, para a terceira e quarta região, as interações ocorrem em menor freqüência. Estes resultados podem ser correlacionados à presença de domínios com grande variação de PS no filme de AC exposto ao PBS (supondo um efeito similar ao observados para o meio PW, uma vez que apresentam composições similares).



Figura 4.4.1: Histogramas obtidos para as forças de interação entre a ponta de Si e as superfícies de Si (A), EC (B) e AC (C). As medidas foram realizadas em solução tampão PBS. Em todas as distribuições podemos observar uma predominância de força nula. Os *insets* em (A) e(B) representam dispersão na região de forças não-nulas (não-específicas). Note as diferentes escalas utilizadas nos gráficos.



Figura 4.4.2: Sequência temporal dos valores de força de ruptura medidos para superfícies de Si (A), EC (B) e AC (C) em tampão PBS.

Por outro lado, na presença do meio de cultura PW com BSA, observamos que as interações não específicas nas superfícies de EC e AC representam menos de 4% das curvas de força adquiridas (figuras 4.4.3A e B, respectivamente). Contudo, na superfície de Si observamos este tipo de interação com mais freqüência, representando 19% para forças entre 20-100 pN e 8% para forças maiores que 100 pN (figura 4.4.3C). O ajuste gaussiano para o primeiro intervalo fornece uma força média de (52±14) pN. Esse resultado pode ser conseqüência da interação entre a ponta de Si e as proteínas já adsorvidas na superfície ou, ainda, entre proteínas adsorvidas na ponta e na superfície. Ainda neste caso, algumas curvas de força apresentam forma típica para interações na presença de proteína, como ilustra a figura 4.4.4. Atabek [95] apresenta em sua tese um estudo da interação entre a porteína BSA e as superfícies de Si e vidro. Neste estudo, ele observou uma força de ruptura entre BSA e superfície de Si da ordem de 30 pN. Wang e colaboradores [62] estudaram a interação da proteína BSA com superfícies funcionalizadas com BSA e anticorpo-BSA, além de superfícies quimicamente modificadas. Para a interação BSA-BSA eles observam uma força de ruptura da ordem de 70 pN. Desta forma, a presença de uma solução com proteínas – como o meio de cultura PW com BSA –

poderia fornecer um resultado equivocado no estudo da adesão específica com a proteína *XadA1*. Por essa razão e considerando que para ambas as soluções observamos uma predominância de força nula, optamos pela utilização do tampão PBS para as medidas realizadas com a ponta funcionalizada com a proteína de adesão *XadA1*, como apresentaremos na seção seguinte. Enfatizamos que, nestes experimentos controle, curvas de força típicas para interações com proteínas foram observadas somente para o caso de Si em meio de cultura PW com BSA.



Figura 4.4.3: Histogramas obtidos para as forças de interação entre a ponta de Si e as superfícies de EC (A), AC (B) e Si (C). As medidas foram realizadas em meio de cultura PW com BSA. Em todas as distribuições podemos observar uma predominância de força nula. Os *insets* representam dispersão na região de forças não-nulas (não-específicas). Note as diferentes escalas utilizadas nos gráficos.



Figura 4.4.4 Curva de força observada para interação entre ponta de Si e superfície de Si em meio de cultura PW com BSA.

A figura 4.4.5 mostra a sequência temporal das medidas de força; podemos observar que as interações observadas na superfície de Si são independentes da região (figura 4.4.5A) e, ainda, que apenas interações eventuais são observadas para as superfícies EC e AC nestas condições (figura 4.4.5B, C) – já previamente observado nos histogramas. Esse resultado garante um bom controle de nossas medidas com proteína específica (seção 4.4.2); contudo, também indica que o meio de cultura PW causa menor efeito nas superfícies de celulose que na superfície de Si, corroborando a discussão dos resultados anteriormente apresentados.



Figura 4.4.5: Sequência temporal dos valores de força de ruptura medida para superfícies de Si (A), EC (B) e AC (C) em meio de cultura PW com BSA.
#### 4.4.2 Interação com XadA1

Para as curvas de força entre ponta funcionalizada com XadA1 e as superfícies de Si e EC, observamos curvas de retração com a presença de vários degraus na curva de retração, indicando a existência de múltiplas rupturas entre as proteínas na ponta e a superfície, como previsto na seção 3.6.2. Eventualmente também observamos força nula e interações não-específicas em ambas as superfícies. A dispersão gerada pelas medidas de força para cada superfície pode ser observada nos histogramas na figura 4.4.6.

O ajuste gaussiano para a distribuição encontrada no sistema proteína *XadA1*- superfície de Si (figura 4.4.6A) fornece uma força de ruptura média de (50±35)pN. De maneira semelhante, na superfície de EC (figura 4.4.6B) o ajuste gaussiano nos fornece uma força de ruptura média de (57±22)pN e, ainda, um segundo valor em (125±54)pN indicando a presença de dupla ruptura. Este último fenômeno também pode ser observado para a superfície de Si (figura 4.4.7A). Esse resultado pode indicar um número maior de proteínas na ponta, uma vez que não temos controle do número de proteínas aderidas (seção 3.6.2). De maneira semelhante aos nossos resultados, forças de ruptura da ordem de 60pN são comumente encontradas na literatura para sistemas com interações específicas [96-99]. Verbelen e colaboradores [98] realizaram um estudo da interação entre moléculas da adesina hemaglutinina ligante de heparina (HBHA), encontrando o valor de força de ruptura média em (68±2) pN. Além disso, eles concluem que a ligação HBHA-HBHA ocorre na superfície da bactéria *Mycobacterium bovis* via extremidade N terminal, favorecendo a agregação entre células. Touhami e colaboradores [99] também encontram valores similares para a força de interação (59 - 64 pN) entre imunoglobulina G (IgG) e a proteína A (PA) encontrada na superfície da bactéria *Staphylococcus aureus*.



Figura 4.4.6: Histogramas obtidos para as forças de ruptura entre a ponta funcionalizada com *XadA1* e as superfícies de Si (A) e EC (B). Note a diferença nas escalas utilizadas para mostrar cada distribuição.

Vale lembrar que curvas de forças com pontas funcionalizadas com *XadA1* foram adquiridas na superfície de Si antes (figura 4.4.7A) e depois (figura 4.4.7B) das aquisições das curvas de força na superfície de EC (figura 4.4.6B). Os histogramas gerados por essas medidas de referência (superfície de Si) fornecem valores para força média compatíveis com o valor obtido na superfície de Si (~50pN), evidenciando a presença da proteína *XadA1* na ponta durante todas as aquisições na superfície de EC. Esse resultado também indica reprodutibilidade dos resultados, uma vez que utilizamos pontas distintas para a aquisição na superfície de Si e para a seqüência de superfícies Si – EC –Si (seção 3.6.2).



Figura 4.4.7: Histogramas obtidos para as forças de ruptura entre a ponta funcionalizada com *XadA1* e superfície de Si antes (A) e depois (B) das aquisições das curvas na superfície de EC (figura 4.4.6B). Neste caso, foi utilizada a mesma ponta funcionalizada com *XadA1* que para as medidas em EC. Em particular, as medidas na superfície de Si foram realizadas com menor estatística para evitar o desgaste da ponta funcionalizada, como descrito na metodologia. Note a diferença nas escalas utilizadas para mostrar cada distribuição.

Outra consideração relevante sobre a interação entre a ponta *XadA1* e as superfícies de Si e EC é a reprodutibilidade em todas as regiões onde as curvas foram adquiridas e, ainda, a preservação da ponta que é mantida como mostra a figura 4.4.8A e B, respectivamente. Devemos considerar aqui que estas superfícies (Si e EC) apresentam resultados similares não somente para a interação com a *XadA1* como também para a estrutura do biofilme de Xf (seção 4.2). Essa similaridade pode estar correlacionada com o PS mais alto das superfícies (seção 4.3.3) após contato com meio líquido e, ainda, à exposição de Si na superfície de EC indicando novamente um papel importante do PS na adesão e desenvolvimento do biofilme.



Figura 4.4.8: Sequência temporal dos valores de força de ruptura medida com ponta funcionalizada com *XadA1* para superfícies de Si (A) e sequência Si – EC – Si (B). Pontos em vermelho correspondem a superfície de Si; pontos em azul correspondem a superfície de EC.

As curvas de força tipicamente observadas para a interação entre a proteína *XadA1* e superfície de AC mostram características distintas das curvas apresentadas para as outras superfícies (Si e EC). A primeira diferença a ser destacada é a predominância de forças nulas, como mostram os histogramas nas figuras 4.4.9. Neste sistema (*XadA1*-AC), não foram observadas curvas que indiquem múltiplas rupturas. Além disso, interações não-específicas compõem cerca de 20% dos histogramas. O ajuste gaussiano para a região dessas interações retornam um valor para a força média por volta de 30pN.



Figura 4.4.9: Histogramas obtidos para as forças de interação entre a ponta funcionalizada com *XadA1* e superfície de AC para duas pontas distintas. Note a diferença nas escalas utilizadas em cada distribuição.

Seguindo o procedimento anterior para a amostra EC, curvas de força com a mesma ponta funcionalizada com *XadA1* utilizada para a superfície de AC foram adquiridas em superfície de Si antes (figuras 4.4.10A, B) e depois (figuras 4.4.10C, D) das aquisições em AC. Os histogramas correspondentes às curvas de força entre a ponta com *XadA1* e superfície de Si adquiridas inicialmente retornam uma força de ruptura média de 60pN, compatível com os resultados anteriores. Contudo, após as aquisições na superfície de AC, as curvas de força na superfície de Si apresentam predominantemente força nula e, em menor proporção interações não-específicas similares às curvas obtidas em AC; a distribuição dos valores medidos gera um histograma para a superfície de Si (figuras 4.4.10C, D) idêntico ao observado para a superfície de AC (figura 4.4.9) sugerindo alguma mudança na ponta inicialmente funcionalizada com *XadA1*. Vale mencionar que esse resultado é reprodutível para duas pontas distintas funcionalizadas com a proteína.



Figura 4.4.10: Histogramas obtidos para as forças de interação entre a ponta funcionalizada com *XadA1* e superfície de Si antes (A, B) e depois (C, D) das aquisições das curvas na superfície de AC (figura 4.4.9) (A-C) e (D-F) para duas pontas com *XadA1* distintas. Note a diferença nas escalas utilizadas em cada distribuição.

Devemos considerar ainda que as curvas de força observadas entre a ponta com XadA1 e as superfícies de AC e Si (neste último, somente após aquisições em AC) apresentam forma típica para interação não-específica. Além disso, não podemos descartar o fato que no experimento controle para a superfície de AC em PBS, também observamos interações não-específicas da mesma ordem da força observada aqui (~30pN). Contudo, ao contrário do experimento controle onde ocorre uma dependência dessas interações com a região, podemos notar uma oscilação entre força nula e não nula ao longo das aquisições das medidas (figura 4.4.11) e, principalmente que sempre ocorrem interações não-específicas na superfície de Si, porém com valores menores que os encontrados inicialmente (~60pN). Esse resultado poderia estar relacionado à não homogeneidade elétrica da superfície AC após contato com meio líquido (efeito observado para meio de cultura PW na seção 4.3.3). Ainda que a espectroscopia de força com a XadA1 não tenha sido realizada em meio de cultura PW, o tampão PBS apresenta constituintes similares ao meio de cultura podendo gerar efeitos similares no PS das superfícies. Desta forma, a distribuição de cargas em AC (PS mais baixo) poderia modificar a conformação da proteína, alterando sua capacidade de adesão; porém, não podemos testar a validade desta hipótese porque o conhecimento atual sobre a estrutura da XadA1 ainda é limitado. Sob o aspecto geral, este resultado sugere que uma menor força de interação entre a superfície de AC e XadA1 ocorre em relação às outras superfícies e, ainda que alguma alteração ocorra na XadA1, reduzindo também sua capacidade de interação com a superfície de Si.

Ainda que esses resultados não sejam conclusivos sobre o que ocorre com a proteína *XadA1* ao interagir com a superfície de AC, de maneira geral, nossos resultados indicam um comportamento diferenciado na superfície de AC também no processo de adesão da Xf na superfície, sugerindo que outros mecanismos devem ser ativados para a adesão celular na superfície de AC.



Figura 4.4.11: Sequência temporal dos valores de força obtidos com ponta funcionalizada com *XadA1* numa sequência das superfícies Si – AC – Si para duas pontas distintas. Pontos em vermelho correspondem a superfície de Si; pontos em verde correspondem a superfície de AC.

# 4.5 Produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS)

#### 4.5.1 Evidências Morfológicas: Imagens Topográficas e SEM

A figura 4.5.1 mostra imagens de topografia e fase de biofilmes de Xf cultivados no interior da célula líquida do AFM. Podemos notar a presença de alguma substância depositada ao redor do biofilme, evidente principalmente através das variações de contraste observadas na imagem de fase (figuras 4.5.1B, D). A presença deste material também é observada nitidamente nas imagens de SEM ao redor de células individuais, aglomerados de algumas células e, ainda, biofilmes já formados (figura 4.5.2). Outra observação interessante dessas imagens é que em biofilmes ainda em primeira camada, onde não houve o recobrimento completo da área pelas células bacterianas, notamos regiões onde esse material não recobriu totalmente a superfície interna delimitada pelo contorno do biofilme (figuras 4.5.2B e D, setas), indicando que essa substância deve ser excretada pela bactéria Xf. Vários autores [4-6] atribuem esse material depositado ao EPS.



Figura 4.5.1: Imagens de topografia (A, C) e fase (B, D) de biofilmes de Xf cultivados em superfície de vidro na célula líquida do AFM por 6 horas. Sigla (BF) indica presença do biofilme em formação (primeira camada).



Figura 4.5.2: Imagens de SEM de biofilme de Xf após 7 dias de cultivo em superfície de Si. Setas indicam variações de contraste que associamos às regiões que não foram ainda recobertas por substância produzida pela bactéria; sigla (BF) indica presença do biofilme em formação (primeira camada).

Outra evidência da presença de EPS ao redor do biofilme é o recobrimento observado sobre as bactérias na borda de um biofilme, como mostram as imagens de topografia e fase na figura 4.5.3(A-D). Para a aquisição dessas imagens os biofilmes foram lavados e secos. Beech e colaboradores [5] observaram recobrimento sobre biofilme similar ao nosso utilizando mesmo procedimento quando a amostra estava na presença do biocida glutaraldeído. Notamos ainda nas imagens (figura 4.5.3C, D) que o recobrimento tem uma textura diferente da superfície ao redor (RMS~3nm); ainda, uma maior granulação é observada sobre a bactéria (RMS~5nm). Tal granulação poderia, por exemplo, estar associada à presença de proteínas ou polissacarídeos sobre a superfície celular bem como ao seu redor. Além disso, destacamos a borda 'reta' do recobrimento, podendo sugerir a deposição de material cristalino; porém, recobrimento com essa característica foi observado também para outras amostras incluindo biofilmes crescidos em AC (figura 4.5.4).



Figura 4.5.3: Imagens de topografia (A, C, E) e fase (B, D, F) de borda de biofilme (A-D) e células (E-F) de Xf cultivadas em superfície de vidro.



Figura 4.5.4: Imagens de SEM para biofilme cultivados por 7 dias em superfície de Si (A) e AC (B). Setas indicam recobrimento do biofilme. Essas imagens foram adquiridas com feixe de íons.

Em algumas imagens, foi possível observar também um halo ao redor das bactérias (figura 4.5.3 D-F – setas), indicando um encapsulamento individual da bactéria. Teschke [4] observou um tipo similar de encapsulamento após procedimento de lavagem em bactérias individuais de *Acidithiobacillus ferroxidans*. Essas bactérias foram crescidas em biofilmes e transferidas para substratos para aquisição de imagens de AFM. O autor considera que o procedimento de lavagem elimina a presença de outros materiais, restando apenas a presença de material insolúvel – que considera se tratar do EPS produzido pelas bactérias. O EPS contribui na arquitetura e proteção do biofilme e, ainda, pode estar fundamentalmente envolvido no estágio de adesão irreversível. Ivanova e colaboradores [6] concluem que EPS produzido pela bactéria *S. Guttiformis* modulam a adesão do biofilme. Alguns autores atribuem essa substância polimérica extracelular à exopolissacarídeos [5, 6], ainda que outros constituintes como proteínas, ácidos nucléicos e fosfolipídios estejam presentes na matriz EPS . Com a finalidade de investigar a produção de polissacarídeos pela bactéria em estudo, realizamos medidas de espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR) durante a formação do biofilme como apresentaremos na seção a seguir.

### 4.5.2 Contribuição Química: ATR-FTIR

Com o objetivo de avaliar as contribuições químicas durante o estágio inicial de formação do biofilme de Xf, espectros de ATR-FTIR foram obtidos para quatro experimentos sob diferentes condições (tabela 4.5.1). Devido à boa reprodutibilidade dos resultados, vamos descrever em detalhes

apenas dois deles que representam o comportamento observado. A figura 4.5.5 mostra espectros típicos para solução contendo Xf em meio de cultura PW com BSA para cada um dos experimentos após 24 horas. As bandas foram identificadas conforme método descrito na seção 3.7.

Experimento 1	PW com BSA foi mantido em contato com o cristal do ATR-FTIR por 21 horas,			
	tempo suficiente para a formação do filme condicionante; o meio de cultur			
	removido e uma solução de Xf descongelada (0.1mL) em PW com BSA (2mL			
	adicionada na célula líquida do ATR-FTIR (BioUnit). Espectro da água utilizado			
	como espectro de referência.			
Experimento 2	Solução de Xf descongelada (0.1mL) em PW com BSA (2mL), sem a formação			
	prévia do filme condicionante. Espectro do meio de cultura PW com BSA utilizado			
	como espectro de referência.			
Experimento 3	Solução de Xf descongelada (0.1mL) em PW com BSA (2mL), sem a formação			
	prévia do filme condicionante. Primeiro espectro obtido (t=0min) foi utilizado			
	como espectro de referência.			
Experimento 4	Inóculo de Xf em PW com BSA em agitação por 8 dias, sem a formação prévia do			
	filme condicionante. Primeiro espectro obtido (t=0min) foi utilizado como espectro			
	de referência.			

Tabela 4.5.1: Descrição de cada um dos experimentos realizados no ATR-FTIR (BioUnit). Note diferenças no espectro de referência e solução usada como fonte de bactéria em cada experimento



Figura 4.5.5: Espectros de infravermelho típico para solução contendo Xf em meio de cultura PW e para meio de cultura PW com BSA. Os experimentos 1- 4 são descritos na Tabela 4.5.1. As curvas foram deslocadas para permitir melhor visualização.

Para todos os casos, as bandas de absorção relevantes para o presente estudo foram encontradas na região entre 1800 e 950 cm<sup>-1</sup> (figura 4.5.5) assim como as bandas observadas para o meio de cultura PW previamente descritas na seção 4.3.2. Contudo, podemos notar pequenos deslocamentos das bandas em 1454,9 cm<sup>-1</sup> e 1547,8 cm<sup>-1</sup> para as posições 1460,0 cm<sup>-1</sup> e 1549,8 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando a largura dos picos e a resolução espectral, essas bandas ainda podem ser atribuídas às ligações  $CH_2/CH_3$  e N – H, C – N e vibrações assimétricas COO<sup>-</sup>, respectivamente [100-104].

No experimento 1, podemos observar nitidamente que a banda em 1578,6 cm<sup>-1</sup> aparece convoluída com a banda em 1549,8 cm<sup>-1</sup>, similarmente ao espectro do filme condicionante formado pelo PW (seção 4.3.2). Essas bandas, principalmente ao redor de 1550 cm<sup>-1</sup>, são associadas ao grupo amida (N – H) das proteínas e, por essa razão são freqüentemente usadas como indicativo da presença e aumento da massa de biofilme na superfície [46, 102, 83]. Desta forma, espera-se um aumento significativo desta banda ao longo do tempo devido à formação do biofilme; porém uma banda bem definida não é observada mesmo 48hs após o início do experimento, independente do espectro de referência utilizado como mostra a figura 4.5.6. Devemos considerar que esta região de absorção coincide com a do espectro da água que apresenta banda localizada em 1638 cm<sup>-1</sup> com largura significativa (1800-1470 cm<sup>-1</sup>, seção 3.7). Como mencionado na seção 3.7, apesar da montagem experimental apresentar célula líquida bem vedada, um efeito de evaporação é inevitável como pode ser observado através da diminuição da banda em 1620,1 cm<sup>-1</sup> para os quatro experimentos apresentados (tabela 4.5.1). Esta diminuição interfere ainda no comportamento da banda em 1549,8 cm<sup>-1</sup>.

Monitorando a altura da banda em 1549,8 cm<sup>-1</sup> ao longo do tempo (figura 4.5.7), podemos notar um aumento de intensidade mesmo considerando o efeito de evaporação ao redor de 1620,1 cm<sup>-1</sup>. Esse resultado pode indicar a presença de bactérias na superfície. Entretanto, a contribuição do filme condicionante para o aumento dessa banda também deve ser considerada. Podemos observar na figura 4.5.7(A) um aumento significativo da banda em 1549,8 cm<sup>-1</sup> para o meio de cultura PW na ausência de bactérias; no momento em que removemos o meio de cultura e adicionamos Xf (figura 4.5.7A – seta) ocorre uma queda no valor da altura da banda indicando a remoção de parte das proteínas da superfície do cristal. Ainda assim, nas primeiras 20 horas, um aumento desta banda continua sendo observado após a adição de solução contendo Xf em PW com BSA. Além disso, considerando o intervalo de tempo inicial, um aumento desta banda também é observado para os outros experimentos, como ilustra a figura 4.5.7B. No intervalo seguinte, observamos uma instabilidade na curva ao longo do tempo; isso ocorre pela evaporação passar a ser

mais significativa após 24 horas. Desta forma, poderíamos obter conclusões equivocadas ao utilizar essa banda como indicador da presença de biofilme, como é feito comumente na literatura [46, 83, 102] e, portanto, não o faremos neste trabalho.



Figura 4.5.6: Espectros de infravermelho ao longo do tempo para os experimentos 1(A) e 4(B) na presença de Xf conforme descritos na Tabela 4.5.1. Os gráficos no *inset* mostram a deconvolução dos picos localizados na região entre 1150 - 950 cm<sup>-1</sup> incluindo a contribuição da banda em 1077,2 cm<sup>-1</sup> para os espectros obtidos em t=48hs. As curvas foram deslocadas para permitir melhor visualização.



Figura 4.5.7: Altura do pico 1549,8 cm<sup>-1</sup> versus o tempo para os experimentos 1(A) e 4 (B), na presença de Xf conforme descritos na Tabela 4.5.1.

Devemos lembrar que para cada experimento foi utilizado um espectro de referência diferente (tabela 4.5.1). Por essa razão, observamos alturas iniciais diferentes nos gráficos apresentados na figura 4.5.7. No experimento 1, utilizamos o espectro da água como referência; assim toda substância diferente da composição da água surge em banda evidente desde o primeiro espectro em t=0 como mostra a figura 4.5.6A (Xf t=0). Já para o experimento 4, o primeiro espectro de Xf foi utilizado como referência, anulando a altura de todos os picos em t=0 (figura 4.5.6B, Xf t=0). Desta forma, observamos apenas as bandas relacionadas às moléculas que se depositam na superfície do cristal a partir do espectro seguinte a t=0. Como estamos interessados em mudanças no espectro a partir deste instante inicial, o valor absoluto da altura não é significativo, mas sim como ocorre a variação de altura para as bandas de interesse.

Conforme reportado na seção 4.3.2, a composição do filme condicionante formado pelo meio de cultura PW apresenta forte contribuição dos grupos fosfato representados pela banda em 1077,2 cm<sup>-1</sup>. Na presença de Xf, podemos observar claramente que a banda em 1077,2 cm<sup>-1</sup> – associada à ligação  $PO_3^{-2}$  [83, 105] – aparece convoluída à banda 1043,2 cm<sup>-1</sup> no espectro do experimento 1 (figura 4.5.6A). A figura 4.5.6(B) mostra que, mesmo com a evolução temporal, esta banda (1077,2 cm<sup>-1</sup>) não surge no experimento 4 de forma clara. Contudo, podemos observar um alargamento da banda em 1043,2 cm<sup>-1</sup> apenas do lado esquerdo, nas proximidades da banda em

1077,2 cm<sup>-1</sup> (figura 4.5.6B). Deconvoluindo a região entre 1150 – 970 cm<sup>-1</sup> em picos localizados em 1111,9 , 1077,2 , 1043,2 e 989,4 cm<sup>-1</sup>, podemos notar contribuição do pico em 1077,2 cm<sup>-1</sup> para este alargamento (figura 4.5.6, *inset*). A banda em 1111,9 cm<sup>-1</sup>, não observada no espectro do meio de cultura PW, está associada a outras ligações relacionadas ao grupo fosfato (P–OC, P=O) [105], indicando contribuição adicional desse grupo na presença da Xf na solução. Além disso, a banda em 1043,2 cm<sup>-1</sup>, atribuída aos polissacarídeos [100, 102, 103], é observada para todos os espectros onde há presença de Xf, ao contrário do que ocorre em experimentos realizados apenas com meio de cultura PW, com ou sem BSA.

A figura 4.5.8 mostra a altura das bandas associadas aos grupos fosfato (1111,9 cm<sup>-1</sup> e 1077,2 cm<sup>-1</sup>) e aos polissacarídeos (1043,2 cm<sup>-1</sup>) ao longo do tempo. Essas bandas foram escolhidas para análise, uma vez que ambas podem influenciar o processo de adesão da Xf e, portanto, a formação inicial do biofilme, como discutido em seções anteriores. Um aumento na altura das bandas com o tempo é observada para todos os experimentos, independente das condições iniciais e do espectro de referência utilizado.

No intervalo correspondente às primeiras horas, observamos um aumento quase linear da altura das bandas para todos os experimentos, indicando uma adsorção contínua de moléculas relacionadas a estes grupos funcionais ao longo do tempo na superfície do cristal. Após esse intervalo, mudanças na inclinação ao longo das curvas são observadas. No experimento 1, uma tendência na estabilização da taxa de absorção ocorre após 15 horas da troca de PW por solução contendo Xf na célula líquida. Essa tendência não é observada para o experimento 4, onde um aumento na altura da banda continua sendo observado, ainda que ocorram mudanças na inclinação da curva ao longo do tempo. Podemos atribuir essa diferença ao filme condicionante previamente formado no experimento 1 pelo meio de cultura PW. A quase-saturação observada nesse experimento pode ser atribuída à cobertura total da superfície do cristal. Na figura 4.5.8(A) podemos observar um aumento linear das bandas associadas a grupos fosfato (em 1077,2 cm<sup>-1</sup>) durante a formação do filme condicionante e, ainda, que após a troca da solução esta banda continua aumentando, indicando que não houve remoção de grupos fosfato da superfície e que estes continuam sendo depositados. Além disso, podemos notar que, para o intervalo inicial, a taxa de absorção das bandas apresenta valores similares independente das condições iniciais de cada experimento e, ainda, o valor para a banda em  $1043.2 \text{ cm}^{-1}$  é sempre maior que para as outras bandas (tabela 4.5.2).



Figura 4.5.8: (A) Altura da banda em 1077,1 cm<sup>-1</sup> versus o tempo para os experimentos: formação do filme condicionante pelo meio de cultura PW seguido da adição de solução contendo Xf em PW. (B-C) Altura das bandas associadas aos grupos fosfato – 1111,9 cm<sup>-1</sup> (cinza) e 1077,2 cm<sup>-1</sup> (preto) – e aos polissacarídeos – 1043,2 cm<sup>-1</sup> (vermelho) versus tempo para experimentos na presença de Xf conforme descritos na Tabela 4.5.1. Note que o gráfico (B) corresponde ao experimento 1, onde foi considerado t=0 o momento em que removemos o meio de cultura e adicionamos solução com Xf em PW mantendo o filme condicionante previamente formado por 21h.

Tabela 4.5.2: Valores para taxa de absorção ( $\alpha$ ) para as bandas associadas aos grupos fosfato – 1111,9 cm<sup>-1</sup> e 1077,2 cm<sup>-1</sup> – e aos polissacarídeos – 1043,2 cm<sup>-1</sup> correspondentes ao primeiro intervalo de cada experimento ( $\Delta$ t). (\*) Considerando t=0 o momento em que solução contendo Xf com PW foi adicionada após a formação prévia do filme condicionado.

Experimento	$\Delta t(min)$	$\alpha(10^{-5}) - 1111,9 \text{ cm}^{-1}$	$\alpha(10^{-5}) - 1077,3 \text{ cm}^{-1}$	$\alpha(10^{-5}) - 1043,2 \text{ cm}^{-1}$
#1 PW	0 - 1050		1,29±0,01	
#1 Xf	0 – 740*	0,91±0,2	0,98±0,02	1,71±0,02
#2 Xf	0 - 330	1,20±0,06	1,21±0,06	2,26±0,07
#3 Xf	0 - 290	0,84±0,05	0,83±0,04	1,78±0,06
#4 Xf	0 - 1040	1,02±0,01	1,02±0,01	1,69±0,07

Como discutido na seção 4.3.2, a presença do fosfato pode atuar como regulador na secreção de proteínas ou ativação de estruturas que contribuam para o processo de adesão [77, 85]. Schmitt e colaboradores [83] observaram que a presença da bactéria *Caulobacter crescentus* diminui a taxa de formação do filme condicionante pelo meio de cultura monitorando a banda associada ao grupo fosfato. Eles atribuíram essa diminuição ao consumo de fosfato como nutriente pela bactéria durante a formação do biofilme. Os resultados aqui apresentados não indicam consumo de fosfato, ao contrário, as bandas associadas aos grupos fosfato descrevem comportamento similar à banda atribuída aos polissacarídeos apresentando apenas taxas de absorção diferentes. Essa similaridade de comportamento pode sugerir que a presença de fosfato atue como regulador na produção dos polissacarídeos ou, ainda, que a deposição de fosfato do meio de cultura na superfície do cristal atue como facilitador da adesão (ver seção 4.3.2).

Não podemos ignorar a possibilidade de simples deposição tanto do grupo fosfato quanto dos polissacarídeos - produzido e liberado em solução pela bactéria livre - na superfície do cristal. Para avaliar essa possibilidade, espectros de infravermelho para bactérias e meio de cultura provenientes de amostra de Xf cultivadas por 10 dias foram obtidos como mostra a figura 4.5.9. Podemos notar que os espectros obtidos para Xf após 48 horas de cultivo na célula líquida e os biofilmes secos após 10 dias de cultivo apresentam formas diferentes. Novamente devemos considerar o efeito de evaporação da água na região entre 1800-1470 cm<sup>-1</sup> para o espectro obtido com 48 horas e, ainda, a diminuição do sinal nas amostras em solução – uma vez que a presença de solução absorve parte da energia do feixe. Concentrando a análise na região dos grupos fosfato e polissacarídeos, podemos observar que as bandas encontradas para o espectro com 48 horas são diferentes do espectro do biofilme seco (Figura 4.5.9); entretanto, também nota-se um alargamento ao redor da banda em 1043.4 cm<sup>-1</sup>. Deconvoluindo as bandas nessa região (Figura 4.5.10) obtemos bandas compatíveis para ambos os espectros. Contudo, uma observação relevante é o deslocamento mais significativo presente no espectro de bactérias livres (de 1043,2 cm<sup>-1</sup> para 1035,4 cm<sup>-1</sup>). A banda em 1035,4 cm<sup>-1</sup> está associada à ligação P-OH [105] indicando alguma diferença entre as células livres em solução e as provenientes do biofilme. O surgimento da banda em 1043,2 cm<sup>-1</sup> na solução (figura 4.5.10C) pode ser proveniente de polissacarídeo dos próprios biofilmes, uma vez que biofilmes podem se soltar da superfície durante o processo de centrifugação, liberando os polissacarídeos. Desta forma, a compatibilidade das bandas do espectro para biofilme com 10 dias e Xf em meio PW após 48 horas de crescimento sugere a presença de formação de biofilme no cristal de ATR-FTIR. Além disso, temos evidências da formação inicial do biofilme e presença de material extracelular em superfície de silício (mesma do cristal ATR-FTIR) apenas após 4 horas do momento de inoculação (seção 4.1).

Como mencionado na seção 2.1, resultados da literatura [5, 6, 103, 106] sugerem que o EPS pode estar fundamentalmente envolvido no estágio de adesão irreversível do biofilme. Flemming e Wingender, em recente trabalho de revisão sobre o papel do EPS no biofilme [106], consideram o EPS como responsável pela adesão e coesão do biofilme. Eboigbodin e colaboradores [100] classificam o EPS em EPS livre, que envolve o biofilme, e EPS capsular, de caráter protéico, envolvendo as células individualmente. Através da adição de EPS livre na solução durante o crescimento da bactéria E. coli, eles observaram um aumento da agregação célula-célula indicando que o EPS livre induz processos de adesão celular. Lembrando que o EPS é composto principalmente por polissacarídeos [100], a banda em 1043,2 cm<sup>-1</sup> indica a presenca de EPS desde o estágio inicial da formação do biofilme de Xf. As imagens de SEM e AFM apresentadas nesse trabalho para estágios iniciais (seção 4.1) e avançados (seção 4.2) de formação do biofilme também mostram a presença de material extracelular ao redor das células aderidas irreversivelmente. Outros autores também não somente observaram material extracelular ao redor de biofilmes utilizando técnicas de imagens como também atribuíram essa substância ao EPS, ainda que nenhuma análise química da amostra fosse realizada [5, 6]. Desta forma, os resultados apresentados nessa seção evidenciam quimicamente a presença de polissacarídeos durante o processo de adesão do biofilme sugerindo sua contribuição nessa etapa.



Figura 4.5.9: Espectros de ATR-FTIR para biofilmes cultivados por 48hs (aquisição em solução) e cultivados por 10 dias (lavados e secos), células livres de Xf (lavadas e secas) e solução onde foram cultivados biofilmes.



Figura 4.5.10: Deconvolução dos espectros de ATR-FTIR das bandas ao redor de 1111,9, 1077,2 e 1043,2 cm<sup>-1</sup> nos gráficos de Intensidade de Absorção (u.a.) versus Número de Onda (cm<sup>-1</sup>). (A) Biofilmes de Xf cultivados por 48hs no interior da célula líquida do ATR-FTIR. (B) Biofilmes de Xf cultivados por 10 dias em estufa, lavados, secos e transferidos para o cristal do ATR-FTIR. (C) Células livres de Xf em solução cultivadas por 10 dias em estufa, centrifugadas, transferidas para o cristal do ATR-FTIR. (D) Solução livre de células onde o biofilme foi cultivado por 10 dias.

# Capítulo V

# Discussão geral dos resultados obtidos

Nossos resultados sugerem que as características da superfície, principalmente em termos de grupos funcionais e potencial de superfície, influenciam não somente o desenvolvimento morfológico e genético do biofilme de Xf, como também o seu processo de adesão.

Um ponto original deste trabalho é a utilização de superfícies de celulose derivatizada na observação da formação do biofilme de Xf in vitro. Considerando que a celulose é o maior constituinte do xilema, a utilização dessas superfícies aproxima o estudo in vitro ao problema real. Killiny e colaboradores, em recentes publicações [107, 108], tem destacado a presença dos constituintes tanto da parede do xilema quanto do vetor<sup>14</sup> transmissor como fatores importantes na regulação gênica e morfologia do biofilme de Xf. Neste sentido, os autores investigaram a expressão gênica, adesão (via ensaios bioquímicos) e o volume do biofilme formado<sup>15</sup> (através de MO) em frascos de vidro na presença de pectina e quitina. Para ambos os casos, eles observaram mudanças na expressão gênica, além de um aumento na adesão e volume do biofilme formado; em particular, a expressão gênica ainda mostra uma alta expressão de adesinas afimbriais na presença de pectina. Contudo, um fator importante não discutido pelos autores e que devemos considerar é que, tanto no xilema quanto no vetor, esses constituintes estão empacotados na estrutura da parece celular vegetal ou da superfície do *foregut* do vetor, tornando o acesso a esses constituintes mais complexo. Mesmo do ponto de vista genético, foco principal abordado pelos autores, o fato da pectina e quitina se encontrarem livres em solução poderia influenciar a adesão e desenvolvimento do biofilme de forma distinta justamente devido à necessidade de enzimas para extração desses constituintes. Nossas observações fenomenológicas por SEM e MO mostram diferentes estruturas e taxas de desenvolvimento do biofilme (em número e tamanho) para as três superfícies analisadas, sendo que em superfícies de celulose, principalmente em AC, o processo ocorre de maneira mais lenta. Além disso, nossos resultados mostram mudanças na expressão gênica de celulases para as diferentes superfícies, evidenciando novamente as características do substrato como fator de dependência no desenvolvimento geral do biofilme.

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> Termo usado para os insetos responsáveis pela transmissão bacteriana.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Em geral os trabalhos consideram o anel de biofilme formado em frascos de vidro sob agitação, diferentemente dos nossos biofilmes cultivados em lamínulas.

Outra consideração importante sob o aspecto da influência da superfície é o efeito do meio de cultura sobre a superfície. Embora alguns estudos, incluindo alguns trabalhos de revisão [3, 10, 25, 26], considerem a formação do filme condicionante importante fator na adesão, apenas poucos trabalhos levam em conta as possíveis mudanças causadas por este filme na superfície e sua conseqüência na formação de biofilmes. Através de imagens de topografia, espectroscopia de IR e medidas de ângulo de contato, nossos resultados mostram a formação de filme condicionante transformando superfícies a princípio abióticas em bióticas. Essa é a provável razão da similaridade da formação do biofilme de Xf em superfícies de Si e vidro (abióticas) sugerindo que a presença do filme condicionante cria as mesmas condições de crescimento em termos das propriedades do substrato. Além disso, também observamos mudanças nas propriedades físico-químicas das superfícies de celulose após contato com o meio de cultura. As medidas de ângulo de contato mostram que as superfícies de vidro, Si e EC diminuem seu grau de hidrofobicidade após contato com o meio de cultura, enquanto a superfície de AC não foi alterada significativamente, indicando um melhor desenvolvimento do biofilme de Xf em superfícies hidrofílicas. Na literatura encontramos vários estudos relacionando o grau de hidrofobicidade como fator determinante no processo de adesão microbiana [13, 17-19]. Em geral, estes trabalhos têm reportado um favorecimento do processo de adesão em superfícies mais hidrofóbicas. Cao e colaboradores [109] investigaram a adesão da bactéria E. coli em superfícies de silicone modificadas com diferentes biopolímeros utilizando SEM, curvas de força (AFM) e ângulo de contato. Eles concluem que a hidrofobicidade não pode ser utilizada como único critério para predizer a adesão bacteriana; contudo, a natureza do grupo funcional na superfície parece ser o principal fator de definição da interação entre substratos e bactérias. Sob este aspecto, um efeito do meio de cultura nas superfícies de celulose não pode ser descartado. Neste sentido, nossas medidas elétricas mostram a modificação no PS da amostra após contato com meio de cultura, indicando alterações de carga também nos filmes de celulose. Em particular, a superfície de AC mostra uma maior variação nos valores de PS após a exposição ao meio de cultura PW. Isso poderia explicar a morfologia dos biofilmes cultivados nesta superfície, pois estes se apresentam menos uniformes e com bordas menos definidas que os cultivados em substratos de Si e EC.

Considerando este último resultado, nossas medidas elétricas correlacionam os biofilmes de Xf com melhor desenvolvimento com superfícies de PS mais alto. Além disso, nossos experimentos de espectroscopia de força indicam que a deposição dos constituintes do meio de cultura apresenta menor efeito nas superfícies de celulose e, ainda, que a adesina *XadA1* apresenta interação menor com a superfície de AC que com as outras superfícies. Wang e colaboradores [62] realizaram um

estudo da interação entre proteínas BSA e superfícies modificadas com diferentes grupos funcionais utilizando a mesma técnica. Neste trabalho, eles sugerem que a composição química, empacotamento ou orientação das moléculas da superfície em solução devem estar mais envolvidos no processo de adesão do que a hidrofobicidade da superfície (medida por ângulo de contato). Considerando que hidrofobicidade e potencial de superfície dependem da natureza dos grupos funcionais presentes nas superfícies, nossos resultados mostram, de forma quantitativa, uma correlação entre essas propriedades e todo processo de formação do biofilme (da adesão ao desenvolvimento). Neste sentido, nossos resultados apresentam boa concordância (qualitativa) com a teoria DLVO que tem sido utilizada como modelo para adesão bacteriana a superfícies, ainda que este modelo não inclua os mecanismos de adesão específica (via adesinas) e produção de material polimérico pela bactéria.

Ainda do ponto de vista de adesão, através de imagens de SEM e biofilmes cultivados no interior de célula líquida do AFM, nossos resultados sugerem uma adesão via aglomerados de células. A ausência de células únicas aderidas e a observação de aglomerados no período de apenas 4 – 6 horas da inoculação também indicam uma adesão facilitada via aglomerados. Caserta e colaboradores [109] realizaram um estudo da expressão gênica de quatro adesinas (fimbriais e afimbriais). Neste estudo, eles não observaram expressão para nenhuma destas proteínas quando a Xf se encontrava em estado planctônico; contudo, observam altos níveis de expressão, principalmente para *XadA1* durante todos os estágios do biofilme, corroborando com nossa sugestão de processo de adesão facilitado por aglomerados celulares. Por fim, o cultivo do biofilme de Xf no interior de célula líquida de ATR-FTIR mostrou que a produção de polissacarídeos ocorre desde o início da formação do biofilme. Associado a esse resultado, imagens de AFM e SEM indicam a presença de matriz exopolimérica ao redor de células, aglomerados e biofilmes. Esses resultados sugerem a presença desta matriz como fator contribuinte na adesão e evolução do biofilme.

Em resumo, nossos resultados evidenciam que a natureza química da superfície em termos de grupos funcionais e, conseqüentemente, sua distribuição de carga, são fatores determinantes na adesão e desenvolvimento geral do biofilme. Ainda que seja inviável propor um modelo de formação do biofilme de Xf apenas baseado nesses resultados, podemos sugerir, de maneira especulativa, que a adesão deva ser mediada inicialmente por interações eletrostáticas, onde a distribuição de carga em ambas as superfícies (substrato e célula), assim como a presença de íons no meio possam favorecer ou inibir este processo; em seguida, as adesinas e a produção de exo-polissacarídeos devem tornar a adesão irreversível. E, por fim, o desenvolvimento do biofilme pode estar relacionado aos grupos funcionais da superfície, podendo estes servirem de sinalizadores para uma regulação gênica. Além disso, nosso trabalho alerta para a necessidade do uso de superfícies mais próximas ao problema *in* 

*situ* nas investigações realizadas *in vitro*. Outra preocupação que deve ser considerada nos experimentos *in vitro*, abordada de forma ampla neste trabalho, é o meio de cultura utilizado e como a presença de seus constituintes afeta a superfície.

# **Capítulo VI**

#### **Conclusões e Perspectivas Futuras**

Neste trabalho, várias técnicas experimentais foram empregadas numa abordagem ampla na análise da formação do biofilme de Xf e dos fatores de influência em seu desenvolvimento com ênfase nas propriedades físico-químicas das superfícies. Em particular, e de forma original, biofilmes de Xf foram cultivados em superfícies de celulose derivatizada.

Imagens de microscopia (MO e SEM) mostram um desenvolvimento mais lento (em quantidade e tamanho) dos biofilmes de Xf em superfícies de celulose do que Si e vidro, apresentando também diferentes estruturas. A avaliação dos níveis de expressão de celulases por qPCR mostra mudanças na expressão desses genes para cada superfície e também em relação à evolução temporal do biofilme. As propriedades das superfícies empregadas foram caracterizadas em termos de rugosidade (AFM), hidrofobicidade (ângulo de contato), grupos funcionais (ATR-FTIR) e potencial de superfície (AFM no modo *Kelvin Probe*). A rugosidade da superfície não apresenta relação direta com a formação do biofilme. Contudo, características relacionadas à química da superfície como hidrofobicidade, grupos funcionais e PS são fatores de influência na formação do biofilme de Xf, sendo que a distribuição de carga na superfície sugere ser fator determinante, tanto na adesão quanto no desenvolvimento dos mesmos. Além disso, medidas de espectroscopia de força (AFM) realizadas para estudo de adesão específica mediada pela proteína *XadA1* mostram uma interação mais fraca com a superfície de AC corroborando a interpretação dos resultados de PS. Por fim, medidas de ATR-FTIR associadas a imagens de SEM e AFM indicam a contribuição de substâncias exopoliméricas na formação inicial do biofilme de Xf.

Desta forma, consideramos que esta tese trata de um sistema complexo, biofilme bacteriano, de maneira diferenciada à comumente empregada em biologia resultando em fortes contribuições de interesse científico, não somente para Xf, como também para o estudo de biofilmes em geral. Além disso, consideramos que o trabalho abre novas direções para estudos na área.

Diante dos resultados apresentados nesta tese para a Xf, vários parâmetros poderiam ser modificados nas condições experimentais com a finalidade de um melhor entendimento na formação do biofilme em termos da superfície. Poderíamos destacar, por exemplo, a mudança nos constituintes no meio de cultura e seu efeito no filme condicionante na superfície. Em particular, o fosfato parece ser regulador gênico para outros biofilmes; desta forma, variações na concentração de fosfato para as mesmas superfícies empregadas neste trabalho e uma análise paralela do desenvolvimento do biofilme, desde as etapas iniciais, juntamente com as superfícies aqui empregadas poderiam elucidar o papel do fosfato na formação do biofilme de Xf. Seguindo o mesmo estudo, a adição de cátions em diferentes concentrações na solução poderia contribuir para o esclarecimento do comportamento do biofilme nestas superfícies em relação às condições do meio. Outras superfícies com constituintes próximos ao xilema poderiam também ser desenvolvidas e testadas com a finalidade de um melhor entendimento do problema *in vivo* através de experimentos *in vitro*. Durante este estudo, tentamos desenvolver filmes finos compostos apenas de pectina (dados não mostrados); contudo, não obtivemos filme com boa adesão. Uma possibilidade seria a mistura de constituintes, por exemplo, superfícies de celulose com pectina. Por fim, outras adesinas poderiam ser estudadas através da espectroscopia de força para a determinação das forças envolvidas e, ainda, soluções inibidoras de adesão poderiam ser injetadas durante as medidas para avaliar as mudanças na força de interação entre as proteínas e superfície.

### **Referências Bibliográficas**

[1] C. Selhuber, "Biological Adhesion on Nanopatterned Substrates Studied with Force Spectroscopy and Microinterferometry" (tese de doutorado apresentada na Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Alemanha, 2006).

[2] C.J. van Oss, "Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions", J. Mol. Recognit. 16 (2003) 177-190.

[3] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions", European Cells and Materials 8 (2004) 37-57.

[4] O. Teschke, "Volume of Extracellular Polymeric Substance Coverage of Individual Acidithiobacillus ferrooxidans Bacterium Measured by Atomic Force Microscopy", Microscopy Research and Technique 67 (2005) 312-316.

[5] I. B. Beech, J. R. Smith, A. A. Steele, I. Penegar, S. A. Campbell, "*The use of atomic force microscopy for studying interaction of bacterial biofilms with surfaces*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23 (2002) 231-247.

[6] E. P. Ivanova, N. M. Dineva, J. Wang, D. K. Pham, J. P. Wright, D. V. Nicolau, R. C. Mocanasu, R. J. Crawford, "*Staleya guttiformis attachment on poly(tert-butylmethacrylate) polymeric surfaces*", Micron 39 (2008) 1197-1204.

[7] K. Sauer, "The genomics and proteomics of biofilm formation", Genome Biology 4 (2003) 219-223.

[8] H. H. M. Rijnaarts, W. Norbe, E.J. Bouwer, J. Lyklema, A.J.B. Zehnder, "*Reversibility and mechanism of bacterial adhesion*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 4 (1995) 5-22.

[9] K.C. Marshall, R. Stout, R. Mitchell, "Mechanism of the initial events in the sortion of marine bacteria to surfaces", J. General Microbiol. 68 (1971) 337-348.

[10] R.M. Dolan, "Biofilms: Microbial Life on Surfaces", Emerging Infectious Diseases 8 (2002) 881-890.

[11] E. Denkhaus, S. Meisen, U. Telgheder, J. Wingender, "*Chemical and physical methods for characterisation of biofilms*", Microchimica Acta 158 (2007) 1-27.

[12] C.J. van Oss, "Hydrophobicity of biosurfaces- origin, quantitative determination and interaction energies", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 5 (1995) 91-110.

[13] P. Texeira, R.Oliveira, "Influence of surface characteristics on the adhesion of Alcaligenes denitrificans to polymeric substrates", J. Adhesion Sci. Technol. 13 (1999) 1287-1294.

[14] M. Fletcher, G.I. Loeb, "Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine Pseudomonad to Solid Surfaces", Appl. Environ. Microbiol. 37 (1979) 67-72.

[15] J.H. Pringle, M. Fletcher, "Influence of Substratum Wettability on Attachment of Freshwater Bacteria to Solid Surfaces", Appl. Environ Microbiol. 45 (1983) 811-817.

[16] B. Bendinger, H.H.M. Rijnaarts, K. Altendorf, A.J.B. Zehnder, "*Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids*", Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993) 3973-3977.

[17] X. Sheng, Y.P. Ting, S.O. Pehkonen, "*The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals*", J. Colloid Interface Sci. 321 (2008) 256-264.

[18] W.G. Characklis, G.A. McFeters, K.C. Marshall, "*Physiological ecology in biofilm systems*", John Wiley & Sons, New York: (1990) p. 341.

[19] Y.J. Oh, N.R. Lee, W. Jo, W.K. Jung, J.S. Lim, "Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy", Ultramicroscopy 109 (2009) 874-880.

[20] B. Li, B.E. Logan, "Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 36 (2004) 81-90.

[21] R. Gubner, I.B. Beech, "The effect of extracellular polymeric substances on the attachment of Pseudomonas NCIMB 2021 to AISI 304 and 316 stainless steel", Biofouling 15 (2000) 25-36.

[22] V. Zinkevich, L. Hanjangsit, R. Avci, "Characterisation of conditioning layers formed by exopolymeric substances of Pseudomonas NCIMB 2021 on surfaces of AISI 316 stainless steel", Biofuling 16 (2000) 93-104.
[23] M.W. Mittelman, "Adhesion to biomaterials", Wiley-Liss, New York (1996) p. 89.

[24] R. Murga, J. M. Miller, R. M. Donlan, "Biofilm Formation by Gram-Negative Bacteria on Central Venous Catheter Connectors: Effect of Conditioning Films in a Laboratory Model", J. Clinical Microb. 39 (2001) 2294-2297.

[25] I. Ofek, R. J. Doyle, "Bacterial Adhesion to cells and tissues", Chapman & Hall, New York (1994).

[26] B.C. van der Aa, Y.F. Dufrêne, "In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23 (2002) 173-182.

[27] M. Fletcher, "Attachment of Pseudomonas fluorescens to glass and influence of electrolytes on bacteriumsubstratum separation distance", J. Bacteriol. 170 (1988) 2027–2030.

[28] R.D. Monds, G.A. O'Toole, "*The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*", Trends in Microbiology 17 (2009) 73-87.

[29] A.J. Wolfe, D. Chang, J. E. Seitz-Partridge, C. F. Lange, J. C. Larkin, B. M. Prüß, J. D. Walker, M. D. Vidaurri, M. C. Henk, T. Conway, "Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm developmentMol", Microbiology 48 (2003) 977-988.

[30] K. Lewis, "Riddle of biofilm resistance", Antimicrob. Agents Chemother. 45 (2001) 999–1007.

[31] G. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter, "*Biofilm formation as microbial development*", Annu. Rev. Microbiol. 54 (2000) 49-79.

[32] Prigent-Combaret, P. Lejeune, "Monitoring expression in biofilms", Methods Enzymol. 310 (1999) 56-79.
[33] D.G.Davies, A.M. Chakrabarty, G.G.Geesey, "Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa", Appl.Environ. Microbiol. 59 (1993) 1181-1186.

[34] L.L.R. Marques, H. Ceri, D.M. Reid, M.E. Olson, "*Characterization of Biofilm Formation by Xylella Fastiodisa In Vitro*", Plant Dis. 86 (2002) 633-638.

[35] E.L. Barnard, E.C. Ash, D.L. Hopkins, R.J. McGovern, "Distribution of Xylella fastidiosa in oaks in Florida and its association with growth decline in Quercus laevis", Plant Dis. 82 (1998) 569-572.

[36] J.E.O. Lima, V.S. Miranda, J.S. Hartung, R.H. Brlansky, A. Coutinho, S.R. Roberto, "*Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with Xylella fastidiosa of citrus*", Plant Dis. 82, (1998) 94-97.

[37] A.H. Purcell, D.L. Hopkins, "Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens", Annu. Rev. Phytopathol 34 (1996) 131-151.

[38] A.J.G.Simpson, F.C. Reinach, P. Arruda, "*The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa*", Nature 406 (2000) 151-157.

[39] A.A. de Souza, M.A. Takita, H.D. Coletta-Filho, C.Caldana, G.H. Goldman, G.M.Yanai, "Analysis of gene expression in two growth states of Xylella fastidiosa and its relationship with pathogenicity", Mol. Plant Microb. Interact. 16 (2003) 867-875.

[40] H.J. Wells, B.C. Raju, H.Y. Hung, "*Xylella fastidiosa: gram-negative, xylem- limited, fastidious plant bacteria related to Xanthomonas ssp*", Int. J. Syst. Bacteriol 37 (1987) 136-143.

[41] C.M. Chagas, V. Rosseti, M.J.G Beretta, "*Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil*", J. Phytopathol 134 (1992) 306-312.

[42] P.M. Lacava, V.S. Miranda, "*Utilização de provas bioquímicas na caracterização da bactéria Xylella fastidiosa dos citros*", Summa Phytopathology 26 (2000) 124-125.

[43] H. D. Colleta-Filho, "Diversidade e estrutura genética de populações de Xylella fastidiosa analisadas através de RAPD e VNTR" (tese de doutorado apresentada no Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002).

[44] D.L. Hopkins, "*Xylella fastidiosa xylem-limited bacterial pathogen of plants*", Annu. Rev. Phytopathol. 27 (1989) 271-290.

[45] B. Leite, M.L. Ishida, E. Alves, H. Carrer, S.F. Pascholati, E.W. Kitajima, "Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca2+ and thiols mediate the aggregation and adhesion of Xylella fastidiosa.Brazilian", J. of Medical Biol. Research 35 (2002) 645-650.

[46] D. Osiro, L.A. Colnago, A.M.M.B. Otoboni, E.G.M Lemos, A.A. de Souza, H.D.C. Filho, M.A. Machado, "A kinetic model for Xylella fastidiosa adhesion, biofilm formation, and virulence", FEMS Microbiology Letters 236 (2004) 313-318.

[47] H. Feil, W. William, S. E. Steven, "Contribution of Fimbrial and Afimbrial Adhesins of Xylella fastidiosa to Attachment to Surfaces and Virulence to Grape", Phytopathology 97 (2007) 3188-324.

[48] Raquel Caserta, "*Expressão, caracterização e purificação de adesinas envolvidas na formação do biofilme de Xylella fastidiosa*" (tese de mestrado apresentada no *Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008*).

[49] N. W. Schaad, E. Postnikova, G. Lacy, M. B. Fatmi, C. J. Chang, "*Xylella fastidiosa subspecies: X. fastidiosa subsp. piercei, subsp. nov., X. fastidiosa subsp. multiplex subsp. nov., and X. fastidiosa subp. pauca subsp. nov*", Syst. Appl. Microbiology 27 (2004) 290-300.

[50] M. J. Davis, A.H. Purcell, S.V. Thomson, "Isolation media for the Pierce's disease bacterium", Phytopathology 73 (1981) 1510-1515.

[51] C.D. Galvani, Y. Li, T.J. Burr, H.C. Hoch, "Twitching motility among pathogenic Xylella fastidiosa isolates and the influence of bovine serum albuminon twitching-dependent colony fringe morphology", FEMS Microbiology Letters 268 (2007) 202-208.

[52] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, "Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes", J. Am. Chemical Soc. 127 (2005) 8168-8173.

[53] H. Stadler, M. Mondon, C. Ziegler, "Protein adsorption on surfaces: dynamic contact-angle (DCA) and quartz-crystal microbalance (QCM) measurements", Anal. Bioanal. Chem 375 (2003) 53-61.

[54] L. Marcotte, G. Kegelaer, C. Sandt C, J. Barbeau, M. Lafleur, "An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples", Anal. Biochem. 361 (2007) 7-14.

[55] K.L. Babcock, C.B. Prater, Phase Imaging: Beyond Topography, Veeco Instruments Inc., 2004 ( www.veeco.com.tw/pdfs.php/5/?showPDF=true).

[56] K. Boussu, B. Van, A. der Bruggen, J. Volodin, C. Snauwaert, C. Van Haesendock, C. Vandecasteele, *"Roughness and hydrophobicity studies of nanofiltration membranes using different modes of AFM"*, J. Colloid Interface Sci. 286 (2005) 632-638.

[57] M. Seitz, C. Friedsam, W. Jöstl, T. Hugel, H. E. Gaub, "*Probing Solid Surfaces with Single Polymers*", ChemPhysChem 4 (2003) 986-990.

[58] Y. Nama, D.W. Branch, B.C. Wheeler, "*Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures*", Biosensors and Bioelectronics 22 (2006) 589-597.

[59] ver JPK Instruments (*www.jpk.com/*) AG, Germany.

[60] E. Dague, D.T. L. Le, S. Zanna, P. Marcus, P. Loubière, M. Mercier-Bonin, "*Probing in vitro interactions between Lactococcus lactis and mucins using AFM*", Langmuir 26 (2010) 11010-7.

[61] D. P. Allison, N. Mortensen, C. J. Sullivan, M. J. Doktycz, "Atomic force microscopy of biological samples", Nanomedicine and nanobiotechnology, 2 (2010) 618-634.

[62] M. S. Wang, L. B. Palmer, J. D. Schwartz, A. Razatos, "*Evaluating Protein Attraction and Adhesion to Biomaterials with the Atomic Force Microscope*", Langmuir 20 (2004) 7753-7759.

[63] O. H. Willemsen, M.M. E. Snel, A. Cambi, J. Greve, B. G. De Grooth, C. G. Figdor, "*Biomolecular Interactions Measured by Atomic Force Microscopy*", Biophysical J. 79 (2000) 3267-3281.

[64] N.A. Burnham, X. Chen, C.S. Hodges, G.A. Matei, E.J. Thoreson, C.J. Roberts, M.C.Davies, S.J.B. Tendler, "*Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers*", Nanotechnology 14 (2003) 1-6.

[65] J. L. Hutter, J. Bechhoefer, "*Calibration of atomic force microscopy tips*", Rev. Sci. Instrum. 64 (1993) 1868-1873.

[66] A. Noy, D. V. Vezenov, C. M. Lieber, "Chemical Force Microscopy", Annu. Rev. Mater. Sci. 27 (1997) 381-21.

[67] M. Nonnenmacher, M.P. O'Boyle, H.K. Wickramasinghe, "*Kelvin Probe Force Microscopy*", Appl. Phys. Lett. 58 (1991) 2921-2923.

[68] A.C.N. González, "Nanofios semicondutores: análise de propriedades elétricas e estruturais por *microscopia no modo Kelvin Probe*" (tese de mestrado apresentada no Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, 2008).

[69] L. Liu, G. Li, "Electrical characterization of single-walled carbon nanotubes in organic solar cells by *Kelvin probe force microscopy*", Appllied Physics Letters 96 (2010) 083302.

[70] ver http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html.

[71] K.J. Livak, T.D. Schimttgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method", Methods 25 (2001) 402-408.

[72] I. D. Auerbach, C. Scorensen, H. G. Hansma, P. A. Holden, "*Physical Morphology and Surfaces Properties of Unsaturated Pseudomonas putida Biofilms*", Journal of Bacteriology 182 (2000) 3809-3815.

[73] J. Gamby, A. Pailleret, C. B. Clodic, C. M. Pradier, B. Tribollet, "In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods", Electrochimica Acta, 54 (2008) 66-73.

[74] A.L.D. Moreau, G.S. Lorite, C.M. Rodrigues, A.A. Souza, M.A. Cotta, "Fractal analysis of Xylella fastidiosa biofilm formation", J. Applied Physics 106 (2009) 024702.

[75] M. Matsushita, H. Fujikawa, "*Diffusion-limited growth in bacterial colony formation*", Physica A 168 (1990) 498-506.

[76] E. Alves, "Xylella Fastidiosa – Adesão e Colonização em Vasos do Xilema de Laranjeira Doce, Cafeeiro, Ameixeira, Fumo e Espécies de Cigarrinhas Vetoras e Formação de Biofilme em Poliestireno", (Tese de doutorado apresentada a Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003).

[77] T. Danhorn, M. Hentzer, M. Givskov, M. R. Parsek, C. Fuqua, "*Phosphorus Limitation Enhances Biofilm Formation of the Plant Pathogen Agrobacterium tumefaciens through the PhoR-PhoB Regulatory System*", J. of Bacteriology 186 (2004) 4492-4501.

[78] D. P. Bakker, H. J. Busscher, J. van Zanten, J. de Vries, J. W. Klijnstra, H.C.van der Mei, "Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment", Microbiology 150 (2004) 1779-1784.

[79] R. Oliveira, J. Azeredo, P. Texeira, A.P. Fonseca, "In Biofilm Community Interactions: Chances or Necessity", BioLine, Cardiff, UK, (2001) p.11.

[80] B. Kefford, K.C. Marshall, "The role of bacterial surface and substratum hydrophobicity in adhesion of Leptospira biflexa Serovar patoc 1 to inert surfaces", Micro. Ecol. 12 (1986) 315-322.

[81] J. Desaia, K. Alexander, A. Riga, "*Characterization of polymeric dispersions of dimenhydrinate in ethyl cellulose for controlled release*", Int. J. of Pharmaceutics 308 (2006) 115-123.

[82] L. M. Ilharco, R. Brito de Barros, "Aggregation of Pseudoisocyanine Iodide in Cellulose Acetate Films: Structural Characterization by FTIR", Langmuir 16 (2000) 9331-9337.

[83] J. Schmitt, D. Nivens, D.C. White, H.C. Flemming, "Changes of biofilm properties in response to absorbed substances an FTIR-ATR study", Wat. Sci. Tech. 32 (1995) 149-155

[84] J.J Ojeda, M.E. Romero-Gonzalez, H.M. Pouran, S.A. Banwart, "In sity monitoring of the biofilm formation of Pseudomonas putida on hematite using flow-cell ATR-FTIR spectroscopy to investigate the formation of inner-sphere bonds between the bacteria and the mineral", Mineal. Magazine 72 (2008) 101-106.

[85] R.D. Monds, M.W. Silby, H. K. Mahanty, "*Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by Pseudomonas aureofaciens PA147-2*", Mol. Microb. 42 (2001) 415-426.

[86] A.A. de Souza, M. A. Takita, H.D. Coletta-Filho, C. Caldana, G.M. Yanai, N.H. Muto, R.C. de Oliveira, L.R. Nunes, M. A. Machado, "*Gene expression profile of the plant pathogen Xylella fastidiosa during biofilm formation in vitro*", FEMS Microbiology Letters 237 (2004) 341-353.

[87] J.N. Israelachvili, "Intermolecular and Surfaces Forces", Academic Press (1991).

[88] N.A. Wulff, A. G. Mariano, P. Gaurivaud, L. C. A. Souza, A. C. D. Virgílio, P. B. Monteiro, "*Influence of Culture Medium pH on Growth, Aggregation, and Biofilm Formation of Xylella fastidiosa*", Curr Microbiol 57 (2008) 127-132.

[89] J. Azeredo, J. Visser, R. Oliveira, "*Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 14 (1999) 141-148.

[90] M. Hermansson, "The DLVO theory in microbial adhesion", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 14 (1999) 105-119.

[91] L.S. Dorobantu, S. Bhattacharjee, J.M. Foght, M. R. Gray, "Analysis of Force Interactions between AFM Tips and Hydrophobic Bacteria Using DLVO Theory", Langmuir 25 (2009), 6968-6976.

[92] R. Hogg, T. W. Healy, D. W. Fuerstka, "*Mutual Coagulation of Colloidal Dispersions*", Transactions of the Faraday Society 66 (1966) 1638-1651.

[93] C.J. van Oss, "Interfacial Forces in Aqueous Media", Marcel Dekker, New York, 1994.

[94] M. Boström, D. R.M. Williams, and B.W. Ninham, "Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems", Physical Review Letters 87 (2001) 1-4.

[95] A. Atabek, "Investigating bacterial outer membrane polymers and bacterial interaction with organic molecules using atomic force microscopy" (Tese de mestrado apresentada na Faculty of Worcester Polytechnic Institute, MA, USA).

[96] G. Francius, S. Lebeer, D. Alsteens, L. Wildling, H.J. Gruber, P. Hols, S. De Keersmaecker, J. Vanderleyden, Y. F. Dufrêne, "*Detection, Localization, and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria*", ACS Nano 2 (2008) 1921-1929.

[97] M. Taranta, A.R. Bizzarria, S. Cannistraro, "*Probing the interaction between p53 and the bacterial protein azurin by single molecule force spectroscopy*", J. Mol. Recognit. 21(2008) 63-70.

[98] C. Verbelen, D. Raze, F. Dewitte, C. Locht, Y. F. Dufrêne, "Single-Molecule Force Spectroscopy of Mycobacterial Adhesin-Adhesin Interactions", J. of Bacteriology 189 (2007) 8801-8806.

[99] A. Touhami, M.H. Jericho, T.J. Beveridge, "Molecular Recognition Forces between Immunoglobulin G and a Surface Protein Adhesin on Living Staphylococcus aureus", Langmuir 23 (2007) 2755-2760.

[100] K. E. Eboigbodin, C. A. Biggs, "Characterization of the Extracellular Polymeric Substances Produced by Escherichia coli Using Infrared Spectroscopic, Proteomic, and Aggregation Studies", Biomacromolecules 9 (2008) 686-695.

[101] J. Haa, A. Gélabert, A. M. Spormann, G.E. Brown Jr, "Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on Shewanella oneidensis: Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study", Geochimica et Cosmochimica Acta 74 (2010) 1-15.

[102] A. Delille, F. Quilés, F. Humbert, "In Situ Monitoring of the Nascent Pseudomonas fluorescens Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy", Appl. Env. Microbiology 73 (2007) 5782-5788.

[103] N. Bhosle, P. A. Suci, A. M. Baty, R. M. Weiner, G. G. Geesey, "*Influence of Divalent Cations and pH on Adsorption of a Bacterial Polysaccharide Adhesin*", J. Colloid Interface Sci. 205 (1998) 89-96.

[104] F. Quilès, F. Humbert, A. Delille, "Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of Pseudomonas fluorescens from planktonic state to nascent biofilm state", Spectrochimica Acta Part A 75 (2010) 610-616.

[105] S. J. Parikh, J. Chorover, "ATR-FTIR Spectroscopy Reveals Bond Formation During Bacterial Adhesion to Iron Oxide", Langmuir 22 (2006) 8492-8500.

[106] H. C. Flemming, J. Wingender, "The biofilm matrix", Nature Reviews Microbiology 8 (2010) 623-633.

[107] N. Killiny, S. S. Prado, R.P.P. Almeida, "*Chitin utilization by the insect-transmitted bacterium Xylella fastidiosa*", Appl. Environ. Microbiol. 76 (2010) 6134-6140.

[108] N.Killiny, R. P. P. Almeida, "Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial plant pathogen", PNAS 106 (2009) 22416-22420.

[109] T. Cao, H. Tang, X. Liang, A. Wang, G. W. Auner, S. O. Salley, K.Y. Simon Ng, "*Nanoscale Investigation on Adhesion of E. coli to Surface Modified Silicone Using Atomic Force Microscopy*", Biotechnology and Bioengineering 94 (2006) 167-176.

[110] R. Caserta, M. A. Takita, M. L. Targon, L. K. Rosselli-Murai, A. P. de Souza, L. Peroni, D. R. Stach-Machado, A. Andrade, C. A. Labate, E. W. Kitajima, M. A. Machado, A. A. de Souza, "*Expression of Xylella fastidiosa Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation*", Appl. Env. Microbiology 76 (2010) 4250-4259.