

Universidade Estadual de Campinas Instituto de Física Gleb Wataghin

Duber Marcel Murillo Munar

Identificação de estruturas biológicas por microscopia de força atômica

Dissertação de mestrado apresentada ao IFGW da UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Duber Marcel Murillo Munar, e orientada pela Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta.

Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta - Orientadora. DFA/IFGW/UNICAMP.

Campinas, SP, Brasil Novembro de 2011

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

Murillo Munar, Duber Marcel, 1984-Identificação de estruturas biológicas por microscopia de força atômica / Duber Marcel Murillo Munar.-- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

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

 Microscopia de força atômica.
 Biofilme.
 Xylella fastidiosa.
 Éstrutura quadrúplex-G.
 Cotta, Mônica Alonso, 1963 Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Física "Gleb Wataghin".
 Título.

Informações para Biblioteca Digital

M945i

Título em inglês: Identification of biological structures by atomic force microscopy Palavras-chave em inglês:

Atomic force microscopy Biofilms Xylella fastidiosa G-quadruplex structure **Titulação:** Mestre em Física **Banca Examinadora:** Mônica Alonso Cotta [Orientador] Jefferson Bettini Omar Teschke **Data da Defesa:** 18-11-2011 **Programa de Pós-Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE **DUBER MARCEL MURILLO MUNAR – R.A. 098208** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN", DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 18/11/2011.

COMISSÃO JULGADORA:

nonderlow

Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta - Orientadora do Candidato DFA/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Jefferson Bettini – ABTLuS

Prof. Dr. Omar Teschke - DFA/IFGW/UNICAMP

Aos meus pais, Manuel e Leonor e aos meus irmãos, Ximena, Johan e Vanessa.

Agradecimentos

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Mônica Alonso Cotta pela excelente orientação, paciência e amizade.

Ao Dr. Richard Janissen por sempre estar disposto a me ensinar e principalmente pela amizade.

À Dra. Gabriela Simone Lorite, pela preparação das amostras, a colaboração e a amizade.

À Dra. Alessandra Alves de Souza, pesquisadora do centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, pelo fornecimento dos inóculos de Xf.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo fornecimento das amostras de G₄-DNA.

A Antônio Augusto de Godoy Von Zuben pela preparação dos substratos de silício recoberto com ouro.

À Dra. Taize Machado Augusto pela colaboração, ajuda e disponibilidade.

Ao engenheiro João Hermes pelo conhecimento transmitido, pelas inúmeras vezes que me ajudou e pela amizade.

A Hélio pelo conhecimento, colaboração e amizade.

A Murilo, Alberto e Douglas pela colaboração e amizade.

A meus pais e irmãos, pelo amor e apoio incondicional.

A Josué, Julio, Elkin, Yovanny, Tapia, Miguel, Leonardo, Hernán, Domingos, Vinicius, Cajuru, Vanessa e Kivia, pela amizade e os momentos de felicidade.

Agradeço especialmente a Mónica e Diana por estarem sempre comigo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Este trabalho tem como finalidade mostrar a importância dos diferentes modos da Microscopia de Varredura por Ponta de Prova (SPM) numa abordagem complementar para o estudo de dois diferentes sistemas biológicos.

O processo de formação de biofilmes da bactéria fitopatogênica Xylella fastidiosa (Xf) foi o primeiro sistema abordado neste trabalho. Neste caso nosso objetivo é levantar informações que possam complementar o modelo mais aceito atualmente e corroborar os resultados obtidos anteriormente em nosso grupo. As amostras foram preparadas sobre substratos de silício recoberto com ouro e cultivadas durante tempos de crescimento de 7, 14 e 21 dias. O principal modo utilizado foi a Microscopia de Força Atômica por Kelvin Probe por modulação de amplitude (AM-KPFM) que fornece o potencial de superfície com resolução nanométrica. Imagens por KPFM foram adquiridas simultaneamente com as de topografia e fase obtidas por Microscopia de Força Atômica no modo não-contato (NC-AFM).

Os resultados obtidos revelaram um processo de recobrimento gradual das bactérias por um filme de substância polimérica extracelular (EPS), concordando com os modelos propostos na literatura, porém ainda não comprovados. Imagens adquiridas por microscopia óptica (MO) mostram um desenvolvimento mais lento dos biofilmes (BF) em comparação aos resultados de G. S. Lorite para BF sobre substratos de silício obtidos anteriormente em nosso grupo. Isto está de acordo com a preferência das bactérias por superfícies com potenciais mais altos. Um resultado original está na observação de protuberâncias encontradas nas extremidades das bactérias, que mostram sinal elétrico diferenciado do

resto da célula. Acreditamos que estas estruturas estão relacionadas ao processo de reprodução, pois aparecem tanto em bactérias isoladas como nas que estão no BF para todos os tempos de crescimento.

O segundo sistema estudado foi a formação de estrutura quadrúplex-G de DNA. As amostras de DNA foram preparadas sobre mica e medidas no modo NC-AFM. Embora o DNA seja um sistema muito estudado em AFM, o protocolo de preparação das amostras muda segundo o tipo de estrutura que se queira visualizar. Assim, a maior parte do trabalho neste caso consistiu em desenvolver este protocolo de preparação que permitisse a visualização por AFM das estruturas de interesse. Usando concentrações altas de DNA (5ng/ μ L) as imagens apresentaram estruturas auto-organizadas que impedem a visualização da estrutura quadrúplex–G. Para concentrações menores que 0,5ng/ μ L conseguimos visualizar moléculas isoladas, mas ainda assim as moléculas não ficaram num estado relaxado. Um resultado interessante foi encontrado nas imagens de fase de moléculas isoladas (com concentração de DNA de 0,1ng/ μ L) onde se observam diferenças estruturais no interior das moléculas, possivelmente devido à formação da estrutura quadrúplex-G. Estas diferenças de fase representam um resultado original e mostram a importância da complementaridade dos modos AFM na observação de fenômenos biológicos.

Abstract

The aim of this work is to show the importance of different modes of Scanning Probe Microscopy (SPM) in a complementary approach to the study of two different biological systems.

The process of biofilm formation of the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* (Xf) was the first system discussed in this work. In this case our goal is to gather information that complements the currently most accepted model and corroborates the results obtained previously in our group. The samples were prepared on silicon substrates coated with gold and cultivated during 7, 14 and 21 days. The main results were obtained using Kelvin Probe Atomic Force Microscopy with amplitude modulation (AM-KPFM) which provides the surface potential with a nanometric resolution. Images were acquired by KPFM simultaneously with topography and phase images obtained by Atomic Force Microscopy in non-contact mode (NC-AFM).

The results revealed a process of gradual coating of the bacteria by a film of extracellular polymeric substance (EPS), in agreement with the models proposed in the literature, but not yet proven. Images acquired by optical microscopy (OM) show a slower development of the biofilms (BF) compared to the results of G. S. Lorite for BF on silicon substrates obtained previously in our group. This result agrees with the preference of the bacteria for surfaces with large potentials. An original result is the observation of lumps found at the extremities of the bacteria, which show electrical signal different from the rest of the cell. We believe that these structures are related to the reproduction process as they appear both in isolated bacteria and those on BF for all growth times.

The second system studied was the formation of G-quadruplex structure of DNA. DNA samples were prepared on mica and measured in the NC-AFM mode. Although DNA is a well studied system in AFM, the sample preparation protocol changes depending on the type of structure to be viewed. Thus, most of the work described here was to develop the preparation protocol that allows the visualization of the structures of interest by AFM. Using high concentrations of DNA (5ng/µL) the images showed self-organized structures that prevent visualization of G-quadruplex structure. For concentrations less than 0.5 ng/mL we got isolated molecules, but still the molecules were not in a relaxed state. An interesting result was found in the phase images of isolated molecules (with DNA concentration of 0.1 ng/mL) where structural differences are observed within the molecules, possibly due to the formation of G-quadruplex structure. These phase differences represent an original result and show the importance of the complementarity of AFM modes in the observation of biological phenomena.

Sumário

Capítulo 1	1
Introdução	1
Capítulo 2	3
Metodologia e Técnicas utilizadas	3
2.1 Microscopia óptica (MO)	3
2.2 Microscopia de forca atômica (AFM)	3
2.3 Modo não contato (NC-AFM): Imagens de topografia e fase	7
2.4 Modo Kelvin-Probe (KPFM): Imagens de potencial superficial, SP	8
Capítulo 3	12
Bactérias individuais e biofilmes de Xylella Fastidiosa	12
3.1 Preparação das amostras	16
3.2 Resultados e Discussões	18
Mapeamento das amostras por microscopia óptica	18
Medidas dos biofilmes por AFM	20
Bactérias Individuais: tamanho e protuberâncias	23
Fundo das amostras: Filme condicionante e EPS	27
Comparação dos materiais: filme condicionante, EPS, bactérias e protuberâncias	29
3.3 Conclusões	33
3.4 Perspectivas	34
Capítulo 4	35
DNA Estrutura quadrúplex-G	35
4.1 Preparação das amostras	39
4.2 Resultados e Discussões	42
Auto-montagem de DNA	42

Partículas isoladas de DNA	43
4.3 Conclusões	45
4.4 Perspectivas	46
Capítulo 5	47
Conclusão geral	47
Referências Bibliográficas.	48

Capítulo 1 Introdução

A microscopia de alta resolução é uma ferramenta indispensável no estudo de sistemas biológicos. Para trabalhar com amostras biológicas se requerem condições que garantam a sobrevivência do espécime analisado; deste modo, técnicas de microscopia eletrônica estão limitadas neste aspecto.

A microscopia de força atômica (AFM) é uma das técnicas que compõem a microscopia por varredura com ponta de prova (SPM). Esta técnica é não destrutiva e pode trabalhar tanto em amostras condutoras como isolantes (em contraste a outras técnicas SPM, como a microscopia por tunelamento, ou STM), e pode trabalhar em ar, vácuo e em ambientes líquidos. Além da alta resolução (~1nm no plano xy e ~1Å em z), os AFMs permitem obter imagens relativamente grandes, que podem chegar a áreas de $100x100\mu m^2$. Todas estas características fazem da AFM uma técnica adequada para a análise de sistemas biológicos.

Dependendo do tipo e módulo da força entre a ponta e a amostra, a técnica AFM apresenta diferentes modos de operação que fornecem diferentes informações sobre a amostra. Estas informações se complementam dando uma melhor descrição do sistema. Os sistemas biológicos geralmente apresentam interações elétricas importantes no seu comportamento; por este motivo nos últimos anos trabalhos sobre sistemas bioquímicos e biológicos tem utilizado modos AFM elétricos ^{1 2 3 4}. Utilizando substratos condutores para polarizar a amostra, pode-se adquirir imagens com modos elétricos tipo Kelvin Probe^{5 6} ou AFM

Condutivo^{6 7}. Estes modos de aquisição fornecem informações sobre a distribuição de cargas ou a condutância local nas amostras observadas.

O objetivo principal neste trabalho é mostrar como os diferentes modos de operação do AFM, em especial o modo elétrico Kelvin Probe, são uma ferramenta poderosa na análise de sistemas biológicos. Assim foram escolhidos dois sistemas para este estudo.

O primeiro sistema é a formação de biofilmes (BF) da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa (Xf)*. O estudo de biofilmes bacterianos é um tema trabalhado amplamente, mas ainda assim não se tem muita informação sobre seu processo de formação. O modelo mais aceito propõe que a etapa inicial da formação de biofilmes é mediada por interações eletrostáticas⁸, sugerindo assim o estudo do problema do ponto de vista elétrico. Como porém modos elétricos são uma aplicação SPM mais recente, estudos elétricos em biofilmes são escassos ⁴.

DNA é um tema mais trabalhado em AFM¹. Neste caso, nosso segundo sistema tratado é uma estrutura de DNA em particular, a formação de estrutura quadrúplex-G de DNA^{9 10 11} ^{12 13}, que é uma estrutura formada nas cadeias duplas de DNA (dsDNA) e que pode produzir bloqueio gênico. Para a formação da estrutura quadrúplex-G é preciso um sequenciamento com alta densidade de guanina e também a presença de íons metálicos tais como o potássio.

A seguir, no capítulo 2 descrevemos as técnicas utilizadas neste trabalho bem como a metodologia adotada. No capítulo 3 abordamos o primeiro sistema biológico, os biofilmes de Xf, começando por uma breve introdução ao tema, depois descrevemos a preparação das amostras, resultados e discussões e finalmente apresentamos as conclusões e algumas perspectivas para dar continuação ao trabalho. No capítulo 4 um procedimento similar é feito com o sistema de DNA quadrúplex-G e no capítulo 5 se apresentam as conclusões gerais do trabalho.

Capítulo 2

Metodologia e Técnicas utilizadas

Neste capítulo descrevemos brevemente a técnica AFM e os modos de operação utilizados neste trabalho. Antes disso, porém, fazemos uma pequena descrição da microscopia óptica (MO) e como esta pode facilitar nossas medidas AFM.

2.1 Microscopia óptica (MO)

A microscopia óptica é utilizada com a finalidade de adiantar a busca das zonas de interesse a serem medidas com AFM. Neste trabalho, utilizou-se MO para fazer um mapeamento total da superfície das amostras de BF de Xf, e assim, encontrar mais facilmente os BFs através do microscópio óptico acoplado ao AFM. No caso do DNA não é possível fazer este mapeamento devido ao tamanho das cadeias, as quais são de ~19,8nm enquanto a resolução máxima de um MO é de ~500nm.

Todas as imagens de MO neste trabalho foram adquiridas no microscópio Leitz ERGOLUX com uma magnificação de 5X.

2.2 Microscopia de forca atômica (AFM)

A microscopia de força atômica é uma técnica que aproveita o fato que a força entre dois materiais está relacionada à distância entre eles. Uma ponta afilada localizada no extremo de uma alavanca com constante de mola conhecida se aproxima da amostra usando um

elemento de varredura (o *scanner*, que usa uma cerâmica piezoelétrica). Este último pode estar localizado na alavanca ou na amostra e a movimenta nos três eixos. A força entre a amostra e a ponta, quando em contato físico, produz uma deflexão na alavanca, a qual é detectada por um sistema óptico (e a transforma em um sinal elétrico) como é esquematizado na Figura 1.



Figura 1: Esquema de um sistema típico de detecção óptico AFM¹⁴.

Para fazer uma imagem topográfica o *scanner* faz uma varredura sistemática com a ponta na área selecionada da amostra. Para que o sinal do detector possa ser utilizado precisa-se de um ponto de referência; este valor é conhecido como ponto de ajuste e é o valor correspondente à deflexão do ponto inicial da varredura. O ponto de ajuste é um valor fixo, que se define quando a ponta está afastada da amostra, depois o *scanner* aproxima a ponta à amostra até que a deflexão da alavanca seja correspondente a este valor. A diferença entre o sinal do detector e o ponto de ajuste é o sinal de erro.

Para a maioria das aplicações os AFMs usam um sistema de retroalimentação (Figura 2). O método consiste na anulação permanente do sinal de erro; para isso, uma voltagem é aplicada ao *scanner* com a finalidade de movimentar a alavanca (ou a amostra quando ela

está montada sobre o *scanner*) em z até igualar o sinal do detector com o ponto de ajuste, zerando o sinal de erro.



Figura 2: Sistema de retroalimentação de um AFM.¹⁵

A varredura pode ser feita com o sistema de retroalimentação ligado ou não. Quando o sistema de retroalimentação está desligado (método de altura constante), a imagem topográfica é feita com os dados do sinal do detector e quando o sistema está ligado (método de força constante) a imagem é feita com os dados da voltagem aplicada ao *scanner*.

A distância entre a ponta e a amostra define a magnitude e direção da força entre elas segundo o modelo de Lennard Jones (ver Figura 3); a partir do intervalo de distância com que se trabalha, o AFM se divide em dois modos principais de operação:

Modo contato: Neste modo de operação a ponta fica a uns poucos (~2-3Å) angstrons da amostra e a força entre elas é repulsiva com magnitude da ordem de ~ 10^{-7} N. Pode funcionar em modo de altura constante (só para amostras planas), como em modo de força constante.

Modo não contato: Neste modo a ponta fica entre ~1-10nm da amostra e a força é atrativa com uma magnitude da ordem de ~ 10^{-11} N. Neste modo sempre se trabalha com o sistema de retroalimentação ligado (modo força constante). Detalhes de operação podem ser encontrados na secção 2.3.



Figura 3: Modelo de Lennard Jones para o potencial entre a ponta e a amostra, mostrando também os diferentes modos de operação do AFM em função da separação entre elas ¹⁴.

Existem controvérsias sobre qual é o melhor modo para trabalhar em amostras biológicas. Em princípio, o modo contato é bastante utilizado na literatura, apesar da pressão exercida pela ponta de dimensões nanométricas poder ser alta o suficiente para deformar estruturas menos rígidas associadas a materiais biológicos. Neste trabalho utilizamos o modo não contato por motivos relacionados com a técnica KPFM que explicaremos mais à frente na secção 2.4. A seguir descrevemos com mais detalhe o modo não contato.

2.3 Modo não contato (NC-AFM): Imagens de topografia e fase.

No modo de operação não contato a força atrativa entre a ponta e a amostra é pequena (~10^{-11N}), e o sinal registrado no foto detector é da mesma ordem do ruído (~1Å), portanto a amplificação do sinal torna-se necessária. Para isso se faz vibrar a alavanca numa frequência F_o um pouco maior que sua frequência própria, que depende da geometria da alavanca (tipicamente no intervalo ~70-400kHz). O fotodetector registra a amplitude de oscilação da alavanca, a qual varia com a distância ponta-amostra devido ao amortecimento da vibração induzido pela presença da superfície. O ponto de ajuste para as imagens topográficas é a amplitude do primeiro ponto na varredura. Neste caso o ponto de ajuste também é fixado antes da aproximação da ponta, definindo-o como uma porcentagem da amostra). Depois o *scanner* aproxima a ponta à amostra até que a deflexão da alavanca seja correspondente a este valor.



Figura 4: Esquema de funcionamento de um AFM no modo de operação NC¹⁵.

O responsável pela vibração é um oscilador localizado na base da alavanca, ao qual é aplicada uma diferença de potencial alternada como mostra a figura 4. Utilizando a diferença de fase φ , entre o sinal do detector e o sinal aplicado ao oscilador (ver figura 4), pode-se obter uma imagem de fase (simultaneamente à de topografia, obtida a partir da voltagem aplicada ao *scanner* para zerar o sinal de erro). Como ponto de referência utiliza-se a diferença de fase ϕ entre o sinal do detector e o primeiro ponto na varredura (ver figura 5).



Figura 5: Diferença de fase entre dois pontos sem diferença topográfica ¹⁶.

A figura 5 mostra como podem existir mudanças na fase, embora não existam mudanças na topografia; uma amostra plana que contenha dois materiais diferentes não aportará informações relevantes na imagem topográfica, mas a imagem de fase pode dar informação sobre dureza, elasticidade e viscosidade associadas aos dois materiais presentes na superfície da amostra.

2.4 Modo Kelvin-Probe (KPFM): Imagens de potencial superficial, SP

Dependendo da natureza da força entre a ponta e a amostra, o AFM pode medir diferentes características da amostra. KPFM é uma técnica derivada do modo NC-AFM, que utiliza a força eletrostática para medir a diferença entre as funções trabalho $\Delta \phi$ da amostra e a ponta (simultaneamente às medidas de topografia e fase). Esta diferença produz uma diferença de

potencial entre elas, conhecida como potencial superficial V_s e definido na equação (1), onde *e* é a carga do elétron.

$$V_s = \frac{\phi_{Amostra} - \phi_{Ponta}}{e} \tag{1}$$

Para calcular V_s , um potencial DC é aplicado à amostra e um potencial AC com frequência f_{AC} (~10-20kHz), que deve ser diferente da frequência de oscilação mecânica da alavanca, é aplicado à ponta. Assim o potencial total será:

$$V(t) = V_{DC} - V_S + V_{AC} sen(2\pi f_{AC} t)$$
⁽²⁾

O sistema é modelado como um capacitor de placas paralelas de distância d no eixo z. Deste modo a força eletrostática $F_{elet}(r)$ será dada por:

$$F_{elet}(r) = -\frac{1}{2} \frac{\partial C(r)}{\partial z} V(t)^2$$
(3)

Onde C(r) é a capacitância entre a ponta e uma posição r da superfície da amostra.

Substituindo (2) em (3) e resolvendo o quadrado do potencial, se obtém a força como a soma de três termos: um termo em DC com magnitude F_o , um termo em AC com frequência f_{AC} e amplitude F_I e outro termo em AC com frequência $2f_{AC}$ e amplitude F_2 .

$$F_{elet}(r) = -\frac{1}{2} \frac{\partial C(r)}{\partial z} V(t)^2$$
(4)

$$F_{elet}(r) = -\frac{1}{2} \frac{\partial C(r)}{\partial z} \left[\left(V_{DC} - V_S \right)^2 + \frac{1}{2} V_{AC}^2 \right] - \frac{\partial C(r)}{\partial z} \left(V_{DC} - V_S \right) V_{AC} sen(2\pi f_{AC} t)$$
$$+ \frac{1}{4} \frac{\partial C(r)}{\partial z} V_{AC}^2 \cos(2\pi (2f_{AC})t)$$
(5)

$$F_{elet}(r) = F_0 + F_1 sen(2\pi f_{AC}t) + F_2 \cos(2\pi (2f_{AC})t)$$
(6)

Devido à força eletrostática ocorrem mudanças no espectro de frequências de oscilação da alavanca (figura 6), aparecendo picos nas frequências f_{AC} (devido a F_1), $2f_{AC}$ (devido a F_2), $f_0 \pm f_{AC}$ (devido a $\partial F_1 / \partial z$) e $f_0 \pm 2f_{AC}$ (devido a $\partial F_2 / \partial z$).



Figura 6: Esquema do espectro de frequências da alavanca afetado pela força eletrostática¹⁷.

O termo F_1 depende de $V_{DC} - V_s$; assim, encontrando o valor de V_{DC} para o qual se anula F_1 , pode-se encontrar o valor de V_s . O método KPFM utilizado neste trabalho consiste em encontrar o valor de V_{DC} para o qual se anula o sinal com frequência f_{AC} , o que corresponde a anular F_1 . Para isso, isolamos o sinal com frequência f_{AC} com um amplificador *lock-in* e utilizamos um sistema de retroalimentação (similar ao que se usa nas imagens topográficas) para minimizar F_1 variando o valor de V_{DC} . Um esquema da técnica é apresentado na figura 7.

Quando se minimiza o sinal com frequência f_{AC} o método é chamado de amplitude modulada KPFM ou AM-KPFM. Outra técnica para o KPFM consiste em minimizar o sinal com frequência $f_0 + f_{AC}$. Neste caso o método é conhecido como frequência modulada KPFM ou FM-KPFM. Neste trabalho todas as medidas foram feitas no modo AM-KPFM¹⁸.



Figura 7: Esquema de funcionamento de um AFM no modo de operação KPFM¹⁵.

Neste trabalho, todas as imagens AFM, em seus vários modos de utilização, foram adquiridas no microscópio Agilent 5500, nas técnicas NC-AFM ou AM-KPFM, usando o módulo MACIII com 3 lockins. As imagens em NC-AFM foram obtidas com pontas de silício NSC14 da Mikro Masch, enquanto que as imagens feitas em AM-KPFM foram realizadas com pontas metalizadas NSC18/Ti-Pt feitas de silício e recobertas com uma camada de platina sobre uma camada de titânio ou com pontas NSC14/Cr-Au também feitas de silício e recobertas com uma camada de ouro sobre uma camada de cromo. Durante a aquisição das imagens elétricas, utilizamos atmosfera de nitrogênio puro na câmara do equipamento, com a finalidade de evitar oxidação e acumulação de carga na superfície da amostra. Como a literatura especializada chama a imagem feita por KPFM de imagem SP, de potencial superficial, usaremos também esta nomenclatura ao discutir nossos dados.

Capítulo 3

Bactérias individuais e biofilmes de Xylella Fastidiosa

Bactérias podem habitar quase qualquer lugar do planeta, inclusive meios ácidos, radioativos e organismos vivos. Embora a maioria de bactérias seja inofensiva ou benéfica, algumas bactérias patogênicas são responsáveis por doenças infecciosas, tanto em humanos como animais e vegetais; isso faz das bactérias um objeto importante de estudo.

As bactérias podem viver em vida livre (planctônicas) ou em simbiose com um hospedeiro. As bactérias patogênicas são parasitas, que, para habitar um hospedeiro, devem ser capazes de se adaptar a sistemas de defesa próprios do hospedeiro, além de mudanças na disponibilidade de nutrientes. Uma estratégia dessa adaptação é a formação de comunidades fixas encapsuladas por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), conhecidas como biofilmes (BF). A formação de biofilmes é um aspecto importante em muitas doenças^{19 20 21}, já que não só aumenta a resistência das bactérias ao sistema imunológico do hospedeiro, mas também aumenta a resistência a antibióticos e mudanças no pH. Por esta razão, o estudo da formação de biofilmes aumentou muito nos últimos anos a partir de sua identificação em 1978, mas ainda é um processo sobre o qual se sabe pouco.

O processo de reprodução acontece constantemente tanto em bactérias planctônicas como em bactérias que fazem parte de um biofilme. A reprodução bacteriana é um processo de divisão celular, no qual uma célula se divide em duas iguais; este processo é conhecido como fissão binária ou bipartição. Nos biofilmes o processo de reprodução se apresenta em uma taxa relativamente baixa em comparação com bactérias planctônicas. A baixa taxa de crescimento, assim como a heterogeneidade fisiológica de seus habitantes e a EPS que as envolve, estão relacionadas com o aumento na resistência do biofilme.

Biofilmes Bacterianos

Um biofilme bacteriano é uma comunidade organizada que pode estar aderida em superfícies bióticas ou abióticas. Estas comunidades estão caracterizadas pela excreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS).

A formação de biofilmes ainda não tem um modelo completamente desenvolvido²², no entanto, o modelo de Sauer é o modelo mais aceito atualmente⁸. Este modelo descreve a formação de BF através de cinco etapas. Na figura 8 esquematizamos o modelo de Sauer: na etapa 1 o processo começa com adesão reversível de bactérias planctônicas a uma superfície, nesta etapa já existe produção de EPS capsular^{*}, na etapa 2 a adesão torna-se irreversível e se caracteriza pelo início da produção de EPS²³, na etapa 3 inicia-se a maturação do biofilme e o desenvolvimento de sua arquitetura, na etapa 4 o biofilme está completamente maduro com uma alta densidade celular e uma estrutura complexa, e finalmente na etapa 5 o biofilme sofre uma desestruturação que dá lugar a dispersão de bactérias que começam o processo novamente.

^{*} Existem substâncias poliméricas que são produzidas por células isoladas (EPS capsular) e as que são produzidas por comunidades bacterianas (EPS). Assim, para diferenciá-las, sempre que se fale do primeiro tipo se usará o termo 'capsular'.



Figura 8: Modelo dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano.

A etapa inicial é a fase mais importante na formação do biofilme ^{8 23 24 25}. Imediatamente após a adesão inicial da bactéria na superfície, mudanças na regulação dos genes começam a ocorrer²⁶. Segundo o modelo, esta etapa está mediada por interações eletrostáticas.

Xylella fastidiosa

A maioria dos estudos sobre biofilmes bacterianos se concentra em bactérias patogênicas que causam doenças em humanos e animais. Sabe-se muito pouco sobre a formação de biofilmes de bactérias fitopatogênicas. Também deve-se levar em consideração que as plantas não têm sistema imunológico específico, o que traz como conseqüência limitações nos tratamentos de plantas infectadas.

O modelo escolhido para este estudo é a bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* (Xf). Esta bactéria causa diferentes doenças como a doença do pêssego falso nos Estados Unidos, a queimadura bacteriana da folha em mais de trinta espécies de árvores em tudo o mundo²⁷ ²⁸ e a clorose variegada dos citros (CVC) no Brasil. Só no Brasil a Xf é responsável pela perda de 280 a 320 milhões de dólares ao ano para a agroindústria dos citros. Por este motivo a Xf foi o primeiro fitopatógeno a ter o genoma completamente sequenciado, num trabalho de pesquisadores brasileiros²⁹.

A Xf habita no xilema das plantas³⁰ e produz oclusão vascular, levando a planta a estresse hídrico. O fato que a Xf forma BFs é um fator importante para sua patogenidade.

A Xf foi escolhida para este trabalho porque, além de ter o genoma sequenciado, apresenta outras vantagens importantes. Como a Xf é uma bactéria que só ataca plantas não requer condições estritas de biossegurança. Isso faz da Xf um bom elemento de trabalho em um laboratório não especializado para agentes biológicos. Por outro lado, seu processo de reprodução é lento³¹, o que facilita a análise do processo de evolução dos biofilmes. Qualquer contaminação da cultura por outro micro-organismo, será aparente em pouco tempo pela mudança de cor no meio. Obviamente, em caso de dúvida, sempre podemos recorrer ao sequenciamento genético da amostra uma vez que o genoma da Xf é conhecido.

De um ponto de vista mais geral, vale ressaltar que o estudo de biofilmes de *Xylella fastidiosa* pode fornecer também informações sobre os processos de biofilmes de bactérias em geral.

Objetivos

Estudos anteriores de G.S. Lorite³² de BF de Xf sobre superfícies com diferentes potenciais elétricos (entre eles o silício que foi usado como referência) revelaram que as bactérias preferem superfícies com potenciais altos. Também conseguiu mostrar a presença de um filme condicionante³³ formado pelo meio de cultura e visualizar o EPS em imagens SEM.

Com a finalidade de dar sequência ao trabalho de G.S. Lorite, nosso objetivo é identificar diferentes materiais na superfície da amostra usando a técnica KPFM, a partir de diferenças na resposta elétrica, e como estas respostas mudam em função do tempo de maturação dos BFs.

3.1 Preparação das amostras

Nesta seção descrevemos a estirpe de Xf escolhida, assim como o processo de obtenção das bactérias. Também se descreve a preparação das amostras e os critérios de escolha dos tempos de crescimento e substratos.

A estirpe utilizada neste estudo foi a 9a5c de Xf da subespécie *pauca*. As bactérias foram extraídas da planta *Citrus sinensis* (laranja doce), isoladas e cultivadas. O meio de cultura escolhido foi *Periwinkle Wilt* (PW), o mais utilizado para o cultivo de todas as estirpes de Xf. No entanto este meio tem uma composição complexa devido à presença de peptídeos (*phytone peptone* e *trypticase peptone*). O PW também contém água, fontes de fosfato e potássio (K₂HPO₄ e KH₂PO₄) e aminoácidos (glutamina).

As células bacterianas são extraídas diretamente das plantas contaminadas e cultivadas em uma placa de PW sólido com *albumina de soro bovino* (BSA) por cerca de 20 a 25 dias de crescimento. A seguir são colocadas em PW líquido onde são cultivadas sob agitação, o resultado é chamado inóculo. O inóculo com que trabalhamos foi fornecido pelo grupo da Dra. Alessandra Alves de Souza do Centro APTA Sylvio Moreira/IAC.

Uma alíquota de inóculo juntamente com novo PW (líquido) é depositada sobre substratos, esterilizados por autoclavagem, em placas de Petri estéreis individuais (próprias para o crescimento de bactérias) e mantidas em estufa bacteriológica com temperatura controlada a 28°C (as amostras foram preparadas com inoculação de 20% em um volume total de 3mL). No processo de crescimento as amostras não tiveram reposição de meio de cultura. Após 7, 14 e 21 dias de crescimento a solução foi removida da placa de Petri. As amostras foram lavadas uma única vez com água deionizada para a remoção de biofilmes não aderidos e excesso de meio de cultura. As amostras foram secas e armazenadas em temperatura ambiente, depois um fio de cobre foi colado na amostra para servir como contato elétrico entre a amostra e o controlador do AFM. Por último as amostras foram raspadas em um canto com a finalidade de remover o filme condicionante formado pelo meio de cultura e assim obter um ponto de referência (ouro) para as medidas de potencial superficial. Finalmente foram obtidas três amostras, uma com cada tempo de crescimento.

Todas as amostras neste trabalho foram feitas pela Dra. Gabriela Simone Lorite.

O motivo da escolha do tempo de crescimento está relacionado diretamente com nosso objetivo o qual é identificar por modo elétrico a presença da substância polimérica extracelular (EPS), distinguindo-a do filme condicionante presente em toda a amostra. O tempo escolhido foi de 7 dias já que neste momento os biofilmes já têm um tamanho adequado para identificação no microscópio óptico e assim facilitar a procura deles no AFM. Com 14 dias o BF está em uma etapa intermediária e com 21 dias o biofilme está na sua etapa final e o EPS deveria aparecer claramente.

Os substratos utilizados foram de silício recoberto com ouro. Necessitamos de substratos condutores para o desenvolvimento da técnica KPFM, com a finalidade de polarizar a amostra. O ouro foi depositado em substratos de silício através de evaporação por feixe de elétrons (EBPVD), a uma pressão de 5×10^{-7} mbar, usando o equipamento ULS600 Balzers. A espessura do filme de Au tem 150nm. Uma camada de titânio de 10nm é depositada previamente sobre o silício para melhorar a aderência do filme de Au.

3.2 Resultados e Discussões

Nesta seção se apresentam e discutem os resultados experimentais, comparando-os com os resultados da literatura atual. Também se mostram as contribuições originais obtidas com o desenvolvimento deste trabalho.

Mapeamento das amostras por microscopia óptica

Com a finalidade de poder fazer um mapeamento e uma busca sistemática das colônias de interesse foram adquiridas imagens das amostras de 7, 14 e 21 dias, no microscópio óptico Leitz ERGOLUX (as imagens foram tomadas antes que as amostras fossem raspadas e o fio metálico fosse colado nelas). Estas imagens foram combinadas para formar imagens panorâmicas (Figura 9).

Nas imagens das três amostras podemos ver biofilmes com diferentes tamanhos com forma aproximadamente circular. Os diâmetros dos biofilmes de maior e menor tamanho são apresentados na tabela 1, onde o limite inferior é imposto pelo aumento da lente usada (5X) no microscópio óptico.

para tempos de cresennento de 7, 14 e 21 días.			
Tempo de	Tamanho dos Biofilmes		
crescimento	Diâmetro Máximo (µm)	Diâmetro Mínimo (µm)	
7 dias	270 ± 5	10 ± 5	
14 dias	220 ± 5	10 ± 5	
21 dias	330 ± 5	10 ± 5	

Tabela 1: comparação do Tamanho dos Biofilmes para tempos de crescimento de 7, 14 e 21 dias.

Os biofilmes maiores nas amostras de 7 e 14 dias apresentam um contorno bem definido, enquanto o biofilme maior na amostra de 21 dias está menos definido. Isso pode se relacionar com o fato de que as amostras não tiveram reposição de nutrientes. Assim aos 21 dias os biofilmes maiores podem começar um processo de desestruturação ocasionado pela falta de nutrientes.



Figura 9: Imagens das amostras de biofilmes de Xf com diferentes tempos de crescimento (adquiridas no MO com aumento 5X). À esquerda temos imagens panorâmicas tipo mosaico, e à direita imagens dos biofilmes de maior tamanho.

O modelo mais aceito para o desenvolvimento dos biofilmes⁸ propõe que a adesão na primeira etapa é devida a interações eletrostáticas. Em trabalho anterior realizado em nosso grupo, G. S. Lorite^{32 33} mostra que o desenvolvimento dos biofilmes está relacionado com o SP da superfície; quanto maior for o SP, maior será a taxa de desenvolvimento dos biofilmes (quantidade e tamanho). Ela registra um desenvolvimento maior (no sentido da amostra apresentar os maiores BFs em menor tempo) para amostras sobre silício com 14 dias de crescimento onde os biofilmes apresentam um diâmetro máximo de 660nm.

Neste estudo as amostras foram cultivadas sobre filmes de ouro depositados sobre substratos de Silício. O ouro apresenta valor de SP aproximadamente 140 mV menor que o do silício³⁴; os biofilmes crescidos neste substrato têm tamanho máximo de 330nm de diâmetro na amostra de 21 dias. Esse resultado concorda qualitativamente com a observação de G. S. Lorite, de que substratos com SP mais baixos proporcionam crescimento mais lento e menores tamanhos dos biofilmes.

Medidas dos biofilmes por AFM.

Utilizando o mapeamento obtido por MO procuramos os biofilmes e adquirimos imagens AFM de topografia e fase usando o microscópio Agilent 5500. Imagens que contenham a superfície total de biofilmes grandes, em geral são mais difíceis de obter, devido à grande diferença de altura (superior a 500nm) entre o filme condicionante e o centro do biofilme (ver figura 10), pelo qual a varredura tem que se fazer com uma velocidade muito baixa para evitar que a ponta entre em contato com a amostra. Além disso, os biofilmes de maior tamanho têm diâmetros que superam os 200µm, enquanto o scanner utilizado tem um deslocamento máximo de 100µm no plano paralelo à superfície da amostra. Por este motivo as imagens de biofilmes só mostram biofilmes pequenos ou partes de biofilmes maiores (figura 11).



Figura 10: À esquerda se tem a imagem topográfica de um biofilme na amostra de 7 dias de crescimento. À direita se tem um corte transversal apresentando a altura do biofilme.

Nosso objetivo é conseguir visualizar diferenças entre as características das bactérias, EPS e filme condicionante, no processo de formação dos biofilmes. Contudo, olhando a figura 11 vemos que as mudanças significativas na fase, que representam variação na natureza do material, só se fazem visíveis na borda do biofilme onde estão as bactérias individuais[†]. Este fato provavelmente está relacionado à matriz (EPS) que recobre o biofilme nas amostras de 7 dias ou mais, utilizadas neste estudo. Assim, daqui para diante vamos analisar características de bactérias isoladas próximas aos biofilmes e não das que estão neles inseridas.

[†] Quando falamos de bactérias individuais ou isoladas neste trabalho, nos referimos a bactérias que embora não façam parte do biofilme, ficam perto e provavelmente estão se comunicando com ele .



Figura 11: Imagens de topografia e fase dos biofilmes nas diferentes etapas de crescimento, 7, 14 e 21 dias.

7 dias

14 dias

22

Bactérias Individuais: tamanho e protuberâncias

O tamanho das bactérias de Xf varia constantemente devido ao contínuo processo de bipartição[‡] (Figura 12). O processo de divisão sempre acontece através do eixo mais longo da bactéria, pelo qual as mudanças no comprimento são muito maiores que as mudanças na largura.



Figura 12: (A) Esquema do processo de bipartição, (B) Imagens de bactérias de Escherichia Coli correspondentes às etapas de (A). A cor azul representa os pontos de partição e a cor vermelha representa os extremos opostos ao ponto de partição³⁵.

Contudo, fazendo uma análise estatística (Tabela 2) nas imagens de bactérias individuais que ficam perto dos biofilmes (Figura 13), vemos que o comprimento médio nas amostras de 7 e 14 dias é similar, enquanto na amostra de 21 dias esse valor é notavelmente maior (~40%). Assim, na amostra de 21 dias predominam bactérias mais longas, embora ainda dentro da faixa de valores reportada na literatura³⁶.

^{*} A fissão binária ou bipartição é o processo típico de reprodução nas bactérias do tipo bacilo ou bastonete.



Figura 13: Imagem topográfica AFM de bactérias individuais perto dos biofilmes. Observa-se o aumento no comprimento e a diminuição na quantidade de bactérias na amostra de 21 dias.

tempes de cresemiente de 7, 11 e 21 dius.			
Tempo de crescimento	Comprimento (µm)	Largura (µm)	
7 dias	$2,80 \pm 0,80$	0,70 ±0,10	
14 dias	$2,80 \pm 0,70$	0,70 ±0,10	
21 dias	$3,90 \pm 1,80$	0,70 ±0,10	

Tabela 2: Comparação do tamanho da Xf para tempos de crescimento de 7, 14 e 21 dias.

A diferença no comprimento de bactérias isoladas da amostra de 21 dias pode estar relacionada com a falta de nutrientes, lembrando que as amostras não tiveram reposição de meio de cultura. Assim, o processo de fissão binária pode ter sido interrompido durante o alongamento das bactérias. Além de apresentar comprimentos significativamente maiores, as bactérias na amostra de 21 dias também se apresentam em menor quantidade, o que dá suporte à hipótese da interrupção no processo de reprodução.



Figura 14: Imagens comparativas dos extremos das bactérias, nas diferentes etapas de crescimento, 7, 14 e 21 dias. As setas vermelhas indicam como as protuberâncias aparecem tanto na topografia como na fase e no SP.



Figura 15: Imagens SEM de aglomerados aderidos em superfície de Si após 4 horas (A, B) e 6 horas (C) de inoculação ³².

Outra característica interessante é a protuberância observada nas extremidades das bactérias em todas as etapas de crescimento (Figura 14). Esta região apresenta valores, tanto na topografia como de fase e SP, mais elevados que o resto da bactéria, mas esta diferença varia com os diferentes tempos de inoculação. A observação destas protuberâncias não foi registrada antes na literatura e representa um resultado original.

Para verificar nossos resultados, procuramos imagens obtidas anteriormente por pesquisadores de nosso grupo, encontrando que em imagens SEM de G.S. Lorite (figura 15) com apenas 4 horas de inoculação as protuberâncias também estavam presentes.

As protuberâncias aparecem tanto nas bactérias individuais como nas bactérias nos biofilmes e sempre aparecem no extremo oposto ao ponto de partição, o que sugere que podem estar associadas ao processo de reprodução.

Fundo das amostras: Filme condicionante e EPS



Figura 16: Imagens tipo mosaico das bactérias que ficam perto do biofilme na amostra de 14 dias. O biofilme fica na parte inferior da primeira coluna, as setas indicam a direção de afastamento do biofilme, assim, a parte mais afastada do biofilme corresponde à borda superior da segunda coluna.

Para encontrar a distância da borda do biofilme na qual as mudanças entre o EPS e o filme condicionante são mais evidentes, adquirimos imagens das bactérias à medida que se afastam do biofilme (Figura 16). Estas imagens foram adquiridas na amostra de 14 dias, pois foi a amostra em que se observou um maior contraste entre o filme condicionante e o EPS.

Em zonas mais afastadas do biofilme, pode-se encontrar bactérias isoladas e também uma maior variação entre o EPS e o filme condicionante formado pelo meio de cultura nas imagens de fase e SP. A distância ótima para distinguir os materiais fica entre 30 e 50µm do biofilme.

Observando a superfície ao redor das bactérias na figura 17, pode-se ver claramente que a superfície ao redor da borda do biofilme e bactérias individuais (que chamaremos de fundo), na amostra de 7 dias, apresenta-se homogênea, indicando ser composta por um único material; embora apareçam pequenas mudanças na topografia, a fase e SP ficam



Figura 17: Imagens comparativas do fundo ao redor das bactérias, nas diferentes etapas de crescimento, 7, 14 e 21 dias. **14 dias** 2

7 dias





Figura 18: Representação do avanço do EPS até recobrimento total do meio de cultura e o recobrimento parcial das bactérias.

invariantes. Na amostra de 14 dias as mudanças no fundo sugerem a presença de dois materiais, um mais próximo das bactérias enquanto o outro começa a aparecer ao se afastar das mesmas. Por último, a amostra de 21 dias volta a apresentar um comportamento similar à amostra de 7 dias, ou seja, um fundo homogêneo, indicando a presença de um único material. Este comportamento está de acordo com a hipótese de que inicialmente temos somente as bactérias sobre o filme condicionante relacionado ao meio de cultura (7 dias), embora não possamos excluir a presença de EPS capsular associado ao maior valor de SP sobre as bactérias. Posteriormente, as bactérias começam a excretar o EPS que vai recobrindo gradativamente a superfície ao seu redor (14 dias); finalmente este EPS recobre totalmente recoberto. Na figura 18 se ilustra este comportamento em imagens com cores, onde a cor vermelha representa o filme condicionante, a cor verde o EPS e a cor azul a bactéria. A figura é só uma representação já que as três imagens não têm a mesma escala de alturas.

Comparação dos materiais: filme condicionante, EPS, bactérias e protuberâncias.

Podemos comparar os materiais ao redor e sobre a bactéria através da medida de rugosidade nestas regiões, tal como mostra a tabela 3. Existe uma diferença de rugosidade apreciável entre os diferentes pontos na amostra de 7 dias quando se supõe que a bactéria só excreta EPS capsular, o qual fica muito perto da bactéria. Esta diferença se faz menor aos 14 dias quando a bactéria está excretando EPS, e finalmente volta a aumentar aos 21 dias, devido possivelmente à diminuição ou suspensão da excreção de EPS.

Tempo de crescimento	Área	Valor RMS da topografia (nm)	Valor RMS da fase (°)	Valor RMS do SP(mV)
	Fundo	$1,4 \pm 0,5$	$0,05 \pm 0,02$	20 ± 2
7 dias	Bactéria	$7,5 \pm 1,4$	$0,50 \pm 0,07$	50 ± 5
	Ponta	$8,2 \pm 3,0$	$0,50 \pm 0,11$	70 ± 13
	Fundo	$1,7 \pm 0,4$	$0,09 \pm 0,02$	35 ± 2
14 dias	Bactéria	$7,3 \pm 0,8$	$0,30 \pm 0,06$	44 ± 4
	Ponta	$10,0 \pm 2,1$	$0,50 \pm 0,13$	50 ± 15
	Fundo	$1,0 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,7$	42 ± 1
21 dias	Bactéria	11,0 ± 3,8	$5,0 \pm 1,1$	60 ± 18
	Ponta	$13,0 \pm 2,9$	$7,0\pm 2,1$	80 ± 10

Tabela 3: comparação das medidas de rugosidade nos diferentes pontos da Xf e no seu redor para tempos de crescimento de 7, 14 e 21 dias.

Um problema nas imagens KPFM é que cada imagem tem um ponto de ajuste próprio. Assim, não tem sentido comparar duas imagens diferentes a menos que tenham um ponto de referência em comum, isto é, um ponto com características elétricas similares nas duas imagens. Para poder comparar os valores de topografia, fase e SP nas diferentes amostras, tivemos que raspar a amostra até chegar ao filme de ouro (Figura 19), o qual servirá como ponto de referência. Por este motivo, analisaremos o valor de SP* = SP (ponto de interesse) – SP (ouro). Com isso também eliminamos a dependência do valor de SP com a função trabalho da ponta AFM, uma vez que este valor se cancela na expressão acima. Processando estas imagens conseguimos relacionar os valores de cada região com respeito ao ouro para assim poder ter uma relação entre as amostras (Tabela 4). A diferença entre a bactéria e o fundo, assim como entre a extremidade e o resto da bactéria é maior na amostra de 7 dias. As diferenças diminuem na amostra de 14 dias, tanto na fase como no SP. Isso sugere um processo de homogeneização da superfície. Estas diferenças continuam diminuindo no SP da amostra de 21 dias, mas aumentam na fase.



Figura 19: Amostras raspadas nas quais se mostra o filme de ouro no substrato (linhas pretas). Para diferentes etapas de crescimento, 7, 14 e 21 dias.

Tempo de crescimento	Área	<i>Topografia</i> (nm)	Fase ($^{\circ}$)	SP* calculado a partir do SP do ouro (mV)
	Fundo	160 ± 12	4,4 ± 1,2	340 ± 43
7 dias	Bactéria	280 ± 22	5,6 ± 1,2	600 ± 76
	Ponta	320 ± 14	5,9 ±1,3	640 ± 70
	Fundo	150 ± 9	$3,2 \pm 0,9$	460 ± 50
14 dias	Bactéria	260 ± 11	$3,8 \pm 0,9$	580 ± 49
	Ponta	280 ± 19	$4,0 \pm 0,9$	600 ± 49
	Fundo	170 ± 5	$11,4 \pm 4,2$	400 ± 40
21 dias	Bactéria	270 ± 17	$22,2 \pm 4,8$	420 ± 42
	Ponta	340 ± 14	21,9 ± 5,1	470 ± 30

Tabela 4: comparação dos valores de topografia, fase e SP* nos diferentes pontos da Xf e ao seu redor para tempos de crescimento de 7, 14 e 21 dias.

3.3 Conclusões

Neste capítulo descrevemos como, através de medidas KPFM, se obtém informações importantes na análise da formação de BF de Xf.

Imagens de MO revelaram o menor desenvolvimento dos BF cultivados sobre silício recoberto com ouro, em relação aos resultados obtidos no substrato de Si por G. S. Lorite. Este comportamento concorda qualitativamente com a preferência da bactéria (BF maiores) por superfícies com SP mais elevado (uma vez que a superfície de ouro tem SP ~140mV abaixo do Si) o que pode ser consequência da etapa inicial da formação de BF que envolve adesão através de interação eletrostática.

Um resultado original neste trabalho são as protuberâncias encontradas nos extremos das bactérias, as quais não só apresentam uma diferença topográfica considerável, mas também diferenças de fase e SP sugerindo uma composição diferente do resto da bactéria. Devido à presença destas protuberâncias em bactérias em todos os tempos de crescimento analisados, tanto em bactérias isoladas como no BF, supomos que podem estar relacionadas ao processo de reprodução celular. A menor quantidade e o maior tamanho das bactérias isoladas na amostra de 21 dias sugerem uma interrupção ou diminuição no processo de reprodução bacteriana, o que pode acontecer pela falta de nutrientes, lembrando que em nossas amostras não houve reposição destas substâncias.

Os valores de rugosidade, assim como os de topografia, fase e SP, permitiram mostrar diferenças entre os materiais que compõem a amostra, indicando um processo de recobrimento gradual das bactérias pelo EPS excretado por elas.

3.4 Perspectivas

Este trabalho mostrou resultados que podem ser estudados com maior profundidade. Um deles é o tamanho das bactérias em função da disponibilidade de nutrientes, pelo qual poderíamos fazer experiências mudando a quantidade de PW nas amostras.

Fazendo análises estatísticas em amostras com diferentes tempos de crescimento – além dos já aqui utilizados - poderíamos conseguir informações mais concretas sobre a presença das protuberâncias nos extremos das bactérias e sua relação com a reprodução bacteriana.

Tomando imagens de bactérias com poucas horas de crescimento se pode complementar o estudo acerca das diferenças elétricas entre os materiais da amostra. Isso seria importante, pois as mudanças mais significativas na formação do filme condicionante ocorrem nas primeiras horas após a deposição do inóculo. Além disso, nesta etapa as bactérias só excretam EPS capsular.

Capítulo 4

DNA Estrutura quadrúplex-G

A ontogenia é o estudo da formação e desenvolvimento de um organismo vivo, e pode-se dividi-la em duas sub-áreas, a genética e a epigenética. Por um lado, a genética está relacionada com a sequência de nucleotídeos do DNA, enquanto a epigenética é o conjunto de características fenotípicas que se mantêm estáveis na reprodução celular, mas não estão diretamente relacionadas com a sequência do DNA.

As mudanças na estrutura tridimensional da hélice do DNA representam um exemplo da epigenética, pois podem evitar a transcrição de genes no DNA pelo RNA mensageiro (mRNA) por bloqueio estérico da polimerase que representa um dos modos de bloqueio gênico. Um exemplo desse fenômeno de bloqueio por mudança da conformação da estrutura é a formação de estrutura quadrúplex-G⁹¹⁰¹¹¹²¹³.

Formação da estrutura quadrúplex-G

Os ácidos nucléicos (DNA e RNA) são formados por cadeias de nucleotídeos, e cada nucleotídeo é constituído por três partes: um ácido fosfórico, um açúcar e uma base nitrogenada. Cada nucleotídeo contém uma (monofosfato) molécula de ácido fosfórico H_3PO_4 ; o açúcar é um monossacarídeo de 5 átomos de carbono (pentose) que no caso do DNA é a desoxirribose $C_5H_{10}O_4$, e, por último, a base nitrogenada que pode ser de dois tipos, as purinas (adenina 'A' e guanina 'G') e as pirimidinas (citosina 'C' e timina 'T').

A desoxirribose e os ácidos fosfóricos são comuns em todos os nucleotídeos, assim a parte que caracteriza cada um deles é a cadeia nitrogenada; por isso o sequenciamento do DNA se escreve normalmente em termos delas. A ligação entre o ácido fosfórico de um nucleotídeo e o açúcar de outro, forma as cadeias simples de DNA (ssDNA), enquanto as ligações entre bases nitrogenadas (ponte de hidrogênio) de duas cadeias simples formam a cadeia dupla do DNA (dsDNA), como se apresenta na figura 20.



Figura 20: Estrutura de dupla hélice do DNA³⁷.

Quando uma estrutura é rica em guanina, pode ocorrer a formação de estruturas planas de 4 guaninas em cujo centro se encontra um íon metálico, em geral potássio. Estas estruturas são conhecidas como estruturas quadrúplex-G ou G_4 -DNA. As estruturas G_4 se empilham uma sobre a outra formando colunas e assim adquirindo uma maior estabilidade, como se mostra na figura 21.



Figura 21: No lado esquerdo se tem uma estrutura quadrúplex-G, enquanto no lado direito se apresenta as estruturas empilhadas uma acima da outra formando uma coluna ³⁷.

A estrutura quadrúplex-G é formada em uma ssDNA após o rompimento das ligações de ponte de hidrogênio com a outra ssDNA. A cadeia que tem alta concentração de guaninas faz a estrutura quadrúplex-G, enquanto a outra fica num estado relaxado. Como a G_4 é formada por 4 e não por duas bases nitrogenadas (como acontece normalmente) o mRNA mensageiro não pode transcrevê-la. Os diferentes tipos de G_4 são denominados segundo a forma que toma a cadeia^{38 39}. A parte superior da figura 22 apresenta algumas imagens topográficas AFM de diferentes tipos de estrutura G_4 , enquanto a parte inferior mostra os diagramas representativos correspondentes, onde a linha vermelha representa a ssDNA que forma a estrutura G_4 , a linha azul representa a ssDNA que fica relaxada, e a linha verde representa o mRNA.



Figura 22: Imagens AFM dos diferentes tipos de estrutura G_4 e suas respectivas representações ³⁸. As amostras foram depositadas sobre substratos de mica e medidas no modo de contato intermitente AFM.

Estrutura quadrúplex-G no gene AR

A motivação de trabalhar com a estrutura G_4 é colaborar com um projeto do grupo do professor Hernandes Faustino de Carvalho do Instituto de Biologia da UNICAMP. O objetivo do projeto é analisar os efeitos epigenéticos em ratos de laboratório (Rattus Norvegicus), produzidos pela exposição a estrógenos sintéticos tais como 17- β estradiol no período pósnatal (1, 3 e 5 dias depois do nascimento)^{40 41}.

A região promotora do gene receptor de andrógeno AR nos ratos estrogenizados apresentou um maior grau de metilação, que é um dos processos pelos quais normalmente se produz o bloqueio da transcrição gênica. Este bloqueio causa problemas no desenvolvimento da próstata do animal, diminuindo seu crescimento em mais de 50% na sua vida adulta.

Através da análise de reação em cadeia de polimerase (PCR) semiquantitativo no DNA dos ratos não estrogenizados (ratos de controle) se observou um decaimento na amplificação de uma parte específica da região promotora do gene AR. Este decaimento poderia ser devido à metilação, mas nos ratos de controle a região promotora do gene AR não deveria apresentar metilação. Por esta razão a parte que apresentava o decaimento foi analisada; encontrou-se uma sequência típica para a formação de estrutura quadrúplex (abundante base nitrogenada de guanina), a qual também produz bloqueio gênico. Na figura 23 se pode ver o sequenciamento da seção que apresentou o decaimento na amplificação por PCR, onde se mostra a grande concentração de guaninas (enlaces vermelhos). Esta seção tem 60 pares de bases e cada uma mede ~0,33nm de comprimento; assim, o comprimento da seção completa é ~19,8nm.

Nossa colaboração no projeto tem o objetivo de explorar e visualizar, mediante medidas AFM, se a estrutura quadrúplex é formada ou não e no caso de se formar, indicar que tipo de quadrúplex é formado.



Figura 23: Sequenciamento da seção tomada do gene AR, rica em guanina.

4.1 Preparação das amostras

Inicialmente a preparação das amostras foi feita seguindo protocolos típicos na preparação de amostras de DNA da literatura^{37 38}, mas as primeiras amostras medidas apresentaram estruturas típicas de contaminação por impurezas.

Na preparação das amostras de DNA, comumente se encontram problemas de contaminação relacionada com impurezas no tampão. Dependendo do tamanho relativo destas estruturas com relação às cadeias de DNA de interesse, estas impurezas podem ou não ser importantes.

Na figura 24 se apresenta uma imagem topográfica AFM obtida em nosso grupo por A.L.D.Moreau, na qual pode se distinguir uma cadeia de DNA e um aglomerado de sais do tampão. Neste caso podemos ver que o tamanho da dsDNA (~2000 pares de bases) pode ser facilmente distinguido das impurezas.



Figura 24: Imagem AFM de DNA plasmídeo tomada por A.L.D.Moreau.

Em nosso caso a dsDNA (~19,8nm) é aproximadamente do mesmo tamanho que a impureza, assim, para poder ter certeza que o que víamos nas imagens é DNA, tivemos que eliminar qualquer tipo de contaminação na amostra. Por este motivo, fizemos uma análise

minuciosa com a finalidade de saber qual era o componente da solução que estava contribuindo para a contaminação. Depois de várias medidas descobrimos que o componente contaminado era o TRIS. Para evitar estes problemas foram comprados novos reagentes químicos com os quais obtivemos melhores resultados.

Depois de superar o problema das impurezas, uma etapa muito importante neste trabalho foi fazer variações no protocolo de preparação das amostras, com a finalidade de otimizar a aquisição de imagens de qualidade que possam trazer novas informações sobre o problema. Das várias tentativas realizadas, o protocolo que forneceu melhores resultados foi o seguinte:

• *Preparação da Solução:* A solução na qual é colocado o DNA consta de três componentes, os quais tem diferentes funções, que são explicadas a seguir:

Tampão: A função do Tampão é manter fixo o pH da solução. Neste caso o tampão utilizado foi trishidroximetilaminometano $(HOCH_2)_3CNH_2$ que é comumente abreviado como TRIS (O TRIS tem uma capacidade tamponante efetiva num intervalo de pH entre 7,0 e 9,2). A concentração usada foi de 20mM; depois se agregou ácido clorídrico HCl até conseguir um pH de 7,4 que é o pH natural do DNA (o pH do fluido intracelular esta entre 7,0 e 7,4).

Cloreto de potássio (KCl): A importância do KCl reside na formação da estrutura quadrúplex, já que sua formação é facilitada com a presença de um íon metálico no meio da estrutura. Geralmente no DNA esse íon é potássio⁴². A concentração usada foi de 100mM.

Cloreto de Magnésio (MgCl₂): Tanto o DNA como a superfície da mica tem cargas negativas, assim o papel do MgCl₂ está diretamente relacionado com a fixação do DNA ao substrato (mica). O MgCl₂ fornece cátions divalentes que atuam como ponte "enlaçando" as moléculas. A concentração neste caso foi de 5mM.

 Aquecimento da solução: A solução é aquecida a uma temperatura de 60°C por aproximadamente uma hora para evitar aglomerados de KCl ou MgCl₂.

- Inclusão do DNA: O DNA é incluído depois do aquecimento da solução. A concentração usada variou entre 0,1 e 5,0 ng/μL.
- Deposição no substrato: Como a largura de uma cadeia de DNA está entre 2,2 até 2,6 nm, é preciso usar um substrato plano para poder distinguir com facilidade o DNA da superfície. Por isso o substrato usado foi mica. A deposição tem uma duração de ~1min. Depois a amostra é lavada com tampão (30 s.) e com água deionizada (30 s.) para remover as partículas que não foram fixadas.
- *Secagem:* o último passo é secar a amostra na estufa a 60°C por ~5min, para remover os resíduos de água e solução. Assim a amostra fica pronta para ser medida.

4.2 Resultados e Discussões

No processo de busca da estrutura G_4 fizemos amostras com diferentes concentrações de DNA, com e sem a presença de KCl ou MgCl₂, obtendo assim diferentes resultados.

Auto-montagem de DNA

Quando usamos uma concentração alta de DNA - $5ng/\mu L$ - observamos uma estrutura de DNA auto-montada (Figura 25) como a observada por Costa *et al.* 2004 ⁴³. Também se pode ver que as imagens de fase mostram uma área escura no redor da rede; esta área pode ser atribuída aos sais do tampão, como é reportado por Carl Leung *et al.* 2009 ⁴⁴ utilizando imagens de SP feitas por KPFM, em especial MgCl₂ (lembrando que nesta amostra não se usou KCl).



Figura 25: Imagens AFM, topografia (superior) e fase (inferior), com estruturas auto-montadas de DNA para uma concentração de 5ng/µL. As setas vermelhas mostram as áreas escuras correspondentes a sais tampão ao redor do DNA.

Partículas isoladas de DNA

Para poder visualizar a estrutura G_4 , necessitamos moléculas isoladas e relaxadas de DNA. Assim, o passo natural a seguir foi utilizar na preparação da amostra uma concentração 10 vezes menor, de 0,5ng/µL. Nesta ocasião as imagens mostraram moléculas individuais ou aglomerados de poucas moléculas (Figura 26), mas o DNA não ficou num estado relaxado, formando uma estrutura emaranhada ou de superenrolamento⁴⁵. Além disso, as imagens ainda continuaram apresentando a área escura ao redor do DNA (esta amostra também não tem KCl).



Figura 26: Imagens AFM, topografia (superior) e fase (inferior), de partículas de DNA emaranhadas apresentadas para uma concentração de 0,5ng/µL. A seta vermelha mostra a área escura correspondente a sais tampão ao redor do DNA.

Em busca do desenrolamento do DNA e da formação da estrutura quadrúplex, continuamos diminuindo a concentração de DNA até $0,1ng/\mu L$ e adicionamos KCl, obtendo imagens que, como na amostra anterior, também apresentaram moléculas individuais e aglomerados de moléculas emaranhadas de DNA (Figura 27). Nesta amostra não se utilizou MgCl₂, e também não se observou a zona escura ao redor do DNA na imagem de fase. Portanto



concluímos que o responsável pela mudança de fase é o MgCl₂.

Figura 27: Imagens AFM, topografia (superior) e fase (inferior), de partículas de DNA emaranhadas apresentadas para uma concentração de 0,1ng/µL. As setas amarelas mostram a estrutura interna das moléculas, que só se faz visível nas imagens de fase.

Um aspecto interessante foi observado no interior dos aglomerados nas imagens de fase, já que na topografia não pode se distinguir mudanças notáveis de altura no interior das moléculas ou aglomerados de DNA. Na imagem de fase são observadas mudanças que indicam variações na dureza (ou elasticidade) da estrutura no interior das moléculas. Esta variação pode ser devida a uma mudança de material, mas se supõe que o material interno à estrutura também é DNA. Assim essa mudança de fase deve estar relacionada a mudanças na estrutura (ou sub-estrutura) do DNA dentro dos aglomerados.

4.3 Conclusões

Embora não tenhamos conseguido identificar com certeza se as estruturas observadas correspondem à formação da estrutura quadrúplex, conseguimos informações importantes neste estudo.

A maior parte do trabalho descrito neste capítulo consistiu no desenvolvimento do protocolo de preparação das amostras de DNA. Assim obtivemos condições otimizadas para este processo. Encontramos que a concentração adequada para evitar a formação de auto-montagens de DNA, que não permitem a observação da estrutura G_4 que estamos procurando, tem que ser inferior a 0,5ng/µL. Também conseguimos ver resíduos atribuídos ao MgCl₂ ao redor das moléculas de DNA através de imagens de fase. Estas observações haviam sido reportadas anteriormente em imagens de SP⁴³.

Adicionalmente, observamos diferenças na estrutura dentro das moléculas de DNA. Estas diferenças só foram visíveis nas imagens de fase (e não na topografia), mostrando assim a possível formação da estrutura G_4 dentro destas partículas de DNA. Estas observações na fase são um resultado original e mostram a importância da complementaridade dos modos de operação AFM.

4.4 Perspectivas

Para podermos identificar com certeza se as estruturas vistas são estruturas $G_{4,}$ o próximo passo neste trabalho será implementar um vetor ou plasmídeo no qual nossa cadeia com alta concentração de guanina será colocada. O objetivo do plasmídeo é alongar a cadeia e assim facilitar o relaxamento da mesma evitando superenrolamento.

Outra experiência que seria de interesse é tomar imagens de SP com a finalidade de ver se as mudanças de fase no interior das moléculas de DNA também reportam mudanças elétricas. Para isso, precisamos modificar o substrato visando uma maior condutividade para a polarização homogênea.

Capítulo 5 Conclusão geral

O objetivo principal neste trabalho foi mostrar como os diferentes modos de operação AFM são uma ferramenta poderosa na análise de sistemas biológicos. Assim, com nossos resultados, podemos observar que a importância da técnica KPFM não só reside nas informações elétricas do sistema, mas também permite complementar a análise por outros modos SPM auxiliando na compreensão de sistemas complexos tais como as amostras biológicas.

Outro aspecto que vale a pena destacar é a metodologia de preparação das amostras, totalmente desenvolvida em nosso grupo. Nem sempre um protocolo reportado na literatura garante bons resultados; é preciso explorar variáveis neste processo a fim de garantir um mínimo de reprodutibilidade e controle na análise, mesmo em se tratando de amostras biológicas. Esse cuidado e a metodologia de análise aqui proposta garantiram a observação de vários aspectos ainda não reportados na literatura em relação aos dois sistemas biológicos analisados (Xf e G₄). Um estudo mais aprofundado implicará numa maior colaboração com os grupos a que estes projetos se reportam, dentro das perspectivas mencionadas nos capítulos 3 e 4. As discussões expostas nesta dissertação, no entanto, foram propostas por nosso grupo dentro do estudo da literatura da área e das condições de preparação de cada amostra, e aprovadas pelos grupos de origem das amostras.

Referências Bibliográficas.

¹ A. K. Sinensky e A. M. Belcher, *Label-free and high-resolution protein/DNA nanoarray analysis using Kelvin probe force microscopy*, Nature Nanotechnology **2**, 653 (2007).

² P. Gao e Y. Cai, *Label-free detection of the aptamer binding on protein patterns using Kelvin probe force microscopy (KPFM)*, Anal. Bioanal. Chem. **394**, 207 (2009).

³ I. Sokolov, D. S. Smith, G. S. Henderson, Y. A. Gorby e F. G. Ferris, *Cell Surface Electrochemical Heterogeneity of the Fe(III)-Reducing Bacteria Shewanella putrefaciens*, Environ. Sci. Technol. **35**, 341 (2001).

⁴ Y. J. Oh, W. Jo, Y. Yang e S. Park, *Biofilm formation and local electrostatic force characteristics of Escherichia coli O157:H7 observed by electrostatic force microscopy*, Appl. Phys. Lett. **90**, 143901 (2007).

⁵ D. S. H. Charrier, M. Kemerink, B. E. Smalbrugge, T. de Vries e R. A. J. Janssen, *Real versus Measured Surface Potentials in Scanning Kelvin Probe Microscopy*, ACS Nano 2, 622 (2008).

⁶ K. O. Vicaro, M. A. Cotta, H. R. Gutierrez e J. R. R. Bortoleto, *On the electrical properties of InAs/InP nanostructures*. Nanotechnology **14**, 509 (2003).

⁷ K. Smaali, M. Troyon, A. El Hdiy, M. Molinari, G. Saint-Girons e G. Patriarche, *Imaging* the electric properties of InAs/InP(001) quantum dots capped with a thin InP layer by conductive atomic force microscopy: Evidence of memory effect, Appl. Phys. Lett. **89**, 112115 (2006).

⁸ K. Sauer, *The genomics and proteomics of biofilm formation*, Genome Biology **4**, 219-223 (2003).

⁹ J.-L. Mergny, Anh-Tuan Phan e L. Lacroixa, *Following G-quartet formation by UV-spectroscopy*, FEBS Letters **435**, 74-78 (1998).

¹⁰ S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd e S. Neidle, *Quadruplex DNA:*

sequence, topology and structure. Nucleic Acids Research 34, 5402-5415 (2006).

¹¹ Ji Wook Shim, Qiulin Tan e Li-Qun Gu, *Single-molecule detection of folding and unfolding of the G-quadruplex aptamer in a nanopore nanocavity*, Nucleic Acids Research **37**, 972-982 (2009).

¹² Y. Qin e L. H. Hurley, *Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions, Biochimie* **90**, 1149-1171 (2008).

¹³ H. Li, E. H. Cao e T. Gisler, *Force-induced unfolding of human telomeric G-quadruplex:* A steered molecular dynamics simulation study, Biochemical and Biophysical Research Communications **379**, 70-75 (2009).

¹⁴ Veeco Instruments Inc. A practical guide to SPM scanning probe microscopy.

¹⁵ www.cds.caltech.edu/~murray/amwiki/index.php/Atomic_force_microscope

¹⁶ K. Boussu, B. Van, A. der Bruggen, J. Volodin, C. Snauwaert, C. Van Haesendock e C. Vandecasteele, *Roughness and hydrophobicity studies of nanofiltration membranes using different modes of AFM*, J. Colloid Interface Sci. **286**, 632-638 (2005).

¹⁷ U. Zerweck, C. Loppacher, T. Otto, S. Grafström e L. M. Eng, *Accuracy and resolution limits of Kelvin probe force microscopy*, Phys. Rev B **71**, 125424 (2005).

¹⁸ Moores, F. Hane e L. Eng, *Kelvin probe force microscopy in application to biomolecular films: Frequency modulation, amplitude modulation, and lift mode.* Ultramicroscopy **110**, 708 (2010).

¹⁹ R.M. Donlan e J.W.Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin. Microbiol. Rev. **15**, 167 (2002).

²⁰ R.M. Dolan, *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*, Emerging Infectious Diseases 8, 881-890 (2002).

²¹ E. Denkhaus, S. Meisen, U. Telgheder e J. Wingender, *Chemical and physical methods* for characterisation of biofilms, Microchimica Acta **158**, 1-27 (2007).

²² R.D. Monds e G.A. O'Toole, *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*, Trends in Microbiology **17**, 73-87 (2009).

²³ K.C. Marshall, R. Stout e R. Mitchell, *Mechanism of the initial events in the sortion of marine bacteria to surfaces*, J. General Microbiol. **68**, 337-348 (1971).

²⁴ M. Katsikogianni e 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**, 37-57 (2004).

²⁵ H. H. M. Rijnaarts, W. Norbe, E.J. Bouwer, J. Lyklema e A.J.B. Zehnder, *Reversibility and mechanism of bacterial adhesion*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **4**, 5-22 (1995).

²⁶ S.L. Kuchma e G.A. O'Toole, *Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression*. Curr. Opin. Biotechnol. **11**, 429 (2000).

²⁷ E.L. Barnard, E.C. Ash, D.L. Hopkins e R.J. McGovern, *Distribution of Xylella fastidiosa in oaks in Florida and its association with growth decline in Quercus laevis*, Plant Dis. **82**, 569-572 (1998).

²⁸ J.E.O. Lima, V.S. Miranda, J.S. Hartung, R.H. Brlansky, A. Coutinho e S.R. Roberto, *Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with Xylella fastidiosa of citrus*, Plant Dis. **82**, 94-97 (1998).

²⁹ A.J.G.Simpson, F.C. Reinach e P. Arruda, *The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa*, Nature **406**, 151-157 (2000).

³⁰ A.H. Purcell e D.L. Hopkins, *Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens*, Annu. Rev. Phytopathol. **34**, 131-151 (1996).

³¹ 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*).

³² G. S. Lorite, *Investigação de Processos Físico-Químicos na Adesão e Desenvolvimento de Biofilmes de Xylella fastidiosa* (tese de doutorado apresentada no *IFGW*, *Universidade Estadual de Campinas*, *Campinas*, 2011).

³³ G.S. Lorite, C. M. Rodrigues, A.A. de Souza, C. Kranz, B. Mizaikoff e M. A. Cotta, *The Role of conditioning film formation and surface chemical changes on Xylella fastidiosa adhesion and biofilm evolution*, Journal of Colloid & Interface Science **359**, 289-295 (2011).

³⁴ A. C. Narváez, *Nanofios semicondutores: análise de propriedades elétricas e estruturais por microscopia no modo Kelvin Probe* (tese de doutorado apresentada no *Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008*).

³⁵ E. J. Stewart, R. Madden, G. Paul1 e F. Taddei, *Aging and Death in an Organism That Reproduces by Morphologically Symmetric Division*, Plos Biology **3**, 295-300 (2005).

³⁶ H.J. Wells, B.C. Raju, H.Y. Hung, W.G. Weisburg, L. Mandelco-Paul e D.J. Brenner, *Xylella fastidiosa gen. nov., sp. nov: Gram-Negative, Xylem-Limited, fastidious plant bacteria related to Xanthomonas ssp*, Int. J. Syst. Bacteriol **37**, 136-143.

³⁷ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg

³⁸ K. J. Neaves, J. L. Huppert, R. M. Henderson e J. M. Edwardson, *Direct visualization of G-quadruplexes in DNA using atomic force microscopy*, Nucleic Acids Research **37**, 6269–6275 (2009).

³⁹ D. González, P. G. A. Janssen, R. Martín, I. De Cat, S. De Feyter, A. P. H. J. Schenning, e E. W. Meijer, *Persistent, Well-Defined, Monodisperse,* π -*Conjugated Organic Nanoparticles via G-Quadruplex Self-Assembly,* J. Am. Chem. Soc. **132**, 4710-4719 (2010).

⁴⁰ T. M. Augusto, A. Bruni-Cardoso, D. M. Damas-Souza, W. F. Zambuzzi, F. Kuhne, L.
B. Lourenço, C. V. Ferreira e H. F. Carvalho, *Oestrogen imprinting causes nuclear*

changes in epithelial cells and overall inhibition of gene transcription and protein synthesis in rat ventral prostate, International Journal of Andrology **33**, 675–685 (2009).

⁴¹ S. A. F. Fernandes, G. R. O. Gomes, E. R. Siu, D. M. Damas-Souza, A. Bruni-Cardoso, T. M. Augusto, M. F. M. Lazari, H. F. Carvalho e C. S. Porto, *The anti-oestrogen fulvestrant (ICI 182,780) reduces the androgen receptor expression, ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in the rat ventral prostate,* International Journal of Andrology **34**, 486–500 (2011).

⁴² D. Renciuk, I. Kejnovská, P. Skoláková, K. Bednárová, J. Motlová e M. Vorlícková, Arrangements of human telomere DNA quadrúplex in physiologically relevant K^+ solutions, Nucleic Acids Research **37**, 6625–6634 (2009).

⁴³ L. T. Costa, L. Kerkmann, G. Harkmann, S. Endres, P. M. Bisch, W. M. Heckl e S. Thalhammer. *Structural studies of oligonucleotides containing G-quadruplex motifs using AFM*, Biochemical and Biophysical Research Communications **313**, 1065–1072 (2004).

⁴⁴ C. Leung, H. Kinns, B. W. Hoogenboom, S. Howorka e P. Mesquida, *Imaging Surface Charges of Individual Biomolecules*, Nano Letters **9**, 2769-2773 (2009).

⁴⁵ C. J. Benham e S. P. Mielke, *DNA Mechanics*, Annu. Rev. Biomed. Eng. 7, 21–53 (2005).