



Universidade da Beira Interior

Covilhã | Portugal

Optimização da produção, extracção e quantificação
de resveratrol e sua aplicação na inibição da urease
de *Helicobacter pylori*

Bruno Tiago Gonçalves Ferreira

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior,
para obtenção do grau de mestre em Bioquímica

Orientadora: Professora Fernanda Domingues

Co-Orientadora: Professora Fani Sousa

Covilhã, 2010

*Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto,
é a coisa mais preciosa que temos.*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar às minhas orientadoras, Professora Fernanda Domingues e Professora Fani Sousa, pela orientação, disponibilidade, partilha de ideias e atenção dispendidas.

Agradeço também a todos os colegas e amigos sem exceção, com quem partilhei os laboratórios do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, pelo companheirismo e apoio demonstrado ao longo deste ano de trabalho.

Não posso deixar de agradecer à Sara, ao Luís e ao Williams pelo apoio, amizade incondicional, compreensão e muita paciência, quer no laboratório quer fora dele.

Pelos momentos partilhados, companhia, e por ter estado presente independentemente do que acontece-se agradeço à Joana.

Aos meus pais, irmã, cunhado e sobrinho, por tudo o que me ajudaram a ultrapassar, por terem acreditado em mim e me terem feito acreditar que era possível, o meu muito OBRIGADO.

Por fim, à Universidade da Beira Interior.

Declaro que todos os dados presentes nesta tese são da minha inteira responsabilidade

(Bruno Tiago Gonçalves Ferreira)

ÍNDICE

Agradecimentos.....	ii
Lista de abreviaturas.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	x
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I – Revisão bibliográfica.....	3
1.1 – Introdução.....	4
1.2 – Resveratrol	4
1.2.1 – Estrutura e propriedades físico-químicas do Resveratrol.....	6
1.2.2 - Efeitos Biológicos do Resveratrol	7
1.2.3 - Resveratrol como anti-bacteriano.....	10
1.3 – <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.3.1 Crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	13
1.3.2 – Factores de virulência.....	14
1.3.3 – Urease e inibidores da urease	15
1.3.5 – Quantificação da ureia e identificação “in gel” de urease	16
1.4 - Produção de Resveratrol	16
1.4.1 - Produção de Resveratrol em plantas	16
1.4.2 - Produção de trans-Resveratrol em células vegetais (culturas)	18
1.4.3 - Plantas transgênicas e o trans-Resveratrol.....	19
1.4.4 - Produção de Resveratrol em células animais.....	20
1.4.5 -Produção de biomoléculas em microrganismos.....	20

1.4.6 - Produção de Resveratrol em microrganismos recombinantes	23
1.6- Recuperação e Quantificação de Resveratrol	25
1.6.1 – Extracção líquido – líquido	26
1.6.2 – Extracção em fase sólida.....	26
1.6.3 – Purificação de resveratrol.....	26
1.6.4 - Quantificação de resveratrol.....	27
Capitulo II – Objectivos.....	28
2 - Objectivos	29
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	30
3.1 - Materiais.....	31
3.2 - Produção de Resveratrol	33
3.2.1 – Estirpe e vector.....	33
3.2.2 – Banco de células.....	33
3.2.3- Meios de Fermentações.....	33
3.2.4 – Condições de fermentação	34
3.3 - Recuperação do Resveratrol	34
3.3.1 – Extracção líquido-líquido	34
3.3.2 – Extracção em fase sólida.....	35
3.3.3 - Cromatografia Preparativa.....	36
3.3.4 – Quantificação.....	36
3.4 – Crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em meio líquido	38
3.5 – Extracção de Urease de <i>Helicobacter pylori</i>	38
3.6 – Determinação da actividade da urease de <i>Helicobacter pylori</i>	38
3.7 – Ensaio de inibição da urease de <i>Helicobacter pylori</i>	39
3.8 – Electroforese de proteínas e coloração de Fishbein.....	40
Capitulo IV – Resultados e Discussão	41

4.1- Produção de Resveratrol.....	42
4.2 - Extracção de Resveratrol a partir de meios de fermentação.....	45
4.2.1- Selecção do Solvente orgânico para a extracção liquido-liquido.....	45
4.2.2 – Optimização da extracção com acetato de etilo	48
4.3 - Quantificação de Resveratrol.....	49
4.3.1- HPLC.....	49
4.3.2- Espectrofotometria.....	49
4.4 – Cromatografia preparativa.....	51
4.5– Crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em meio líquido.....	55
4.6 – Identificação “in gel” de urease de <i>Helicobacter pylori</i>	56
4.7 - Inibição da Urease de <i>Helicobacter pylori</i>	57
4.7.1 – Visualização “in gel” da inibição de urease de <i>Helicobacter pylori</i>	59
Capitulo V – Conclusões gerais e perspectivas futuras	61
5.1 – Conclusões gerais.....	62
5.2- Perspectivas futuras	63
Capitulo VI - Referências.....	65
6.1 - Referências	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido acetohidroxâmico – AHA

Brain heart Infusion broth – BHI

Densidade óptica - DO

Estilbeno Sintetase – STS

Extracção em fase sólida – EFS

Extracção líquido-líquido - ELL

Fenilalanina amónia liase – PAL

Helicobacter pylori – HP

Hidroxilase-4 do ácido cinâmico – C4H

High-performance liquid chromatography - HPLC

Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido - IPTG

Ligase 4-coumarato:CoA - 4CL

Luria Bertani – LB

Metiljasmonato - MeJA

Mueller – Hinton broth – MHB

Photo-diode array – PDA

Resveratrol – Resv

Tirosina amónia liase – TAL

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Algumas plantas onde pode ser encontrado resveratrol.....	5
Figura. 2. Estrutura química do trans- e cis- resveratrol.....	6
Figura 3: Imagem de microscopia electrónica de <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 4. Mapa esquemático da prevalência da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	13
Figura 5. Reapresentação esquemática da via de síntese de resveratrol.....	17
Figura 6. Via biossintética do trans-resveratrol e piceid.....	24
Figura 7. curva de calibração de resveratrol em 66% água, 39,4% acetonitrilo, 0,1% ácido acético), curva obtida por HPLC-PDA.....	37
Figura 8. Curva de calibração de resveratrol em 66% água, 39,4% acetonitrilo, 0,1% ácido acético.....	37
Figura 9- Curva de calibração de cloreto de amónia.....	39
Figura 10. Electroforese de ácido nucleicos de lisado de lisado <i>E. coli</i> com o plasmídeo pAC-4CL-STS.....	42
Figura 11. Curvas de crescimento de <i>E. coli</i>	43
Figura 12. Cromatograma de HPLC obtido a 304 nm, de meio SOB, às 20 horas de fermentação.....	43
Figura 13. Espectro de absorção obtido com o detector PDA acoplado ao HPLC.....	44
Figura 15. Cromatograma de um padrão de 25µg/mL de Resv, e o seu espectro de absorção.....	46
Figura 16. Cromatogramas das extracções com diferentes solventes.....	47
Figura 17. Gráfico de superfície referente a optimização da extracção de Resv em soluções aquosas.....	48

Figura 18. Cromatograma do meio 2xYT, fortificado com 1mg/L extraído com acetato de etilo e injectado no HPLC.....	49
Figura 19. Cromatograma de meio 2x YT fortificado com 1 mg/L de resveratrol, extraído com acetato de etilo.....	50
Figura 20. Cromatograma da purificação com a coluna superose 12. Meio 2xYT com crescimento fortificado com 50 µg/mL de Resv, sem ácido p-coumárico e IPTG	51
Figura 21. Cromatograma da purificação com a coluna superose 12. Meio 2xYT com crescimento fortificado com 50 µg/mL de Resv e 5 mM de ác. p-coumarico.....	52
Figura 22. Cromatograma da purificação com a coluna superose 12. Meio 2xYT com crescimento fortificado com 15 µg/mL de Resv e 5 mM de ác. p-coumarico.....	53
Figura 23. Cromatogramas de HPLC dos picos referentes à cromatografia preparativa	54
Figura 24. Taxa de crescimento de HP em meio líquido.....	56
Figura 25. Gel de electroforese de acrilamida não desnaturante (4/8%) e Coloração de fishbein do lisado de <i>Helicobacter pylori</i>	57
Figura 26. Gráfico das curvas da percentagem de inibição, para o Resv e para o AHA	58
Figura 27. Gel de elctroforese de acrilamida não desnaturante (4/8%) corado com coloração de Fishbein	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Alvos moleculares do Resveratrol.....	9
Tabela 2: Mínimas concentrações inibitórias (MIC ₅₀) de Resveratrol para vários agentes patogênicos humanos.	11
Tabela 3. Composição percentual dos elementos químicos que constituem a bactéria <i>E. coli</i>	23
Tabela 4. Lista de reagentes com grau de pureza e fornecedor.	31
Tabela 5. Lista de aparelhos utilizados.....	32
Tabela 6: Composição dos meios de fermentação utilizados no trabalho experimental.....	33

RESUMO

Desde há muitos séculos que se tem utilizado o resveratrol em formulações químicas e dietas botânicas com fins terapêuticos. Este composto é um estilbeno, pertencente à família dos polifenóis, sendo que a sua estrutura química alterna entre duas conformações cis- e trans-. A configuração mais estudada é a trans- por apresentar efeitos anti-oxidantes, anti-carcinogénicos, cardioprotectores e também propriedades antibacterianas sendo um dos alvos a *Helicobacter pylori*. Esta bactéria infecta cerca de 50 % da população mundial e é considerada um das principais causas de úlceras gástricas. O tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* tem-se tornado menos eficiente nos últimos anos devido ao aumento da resistência a antibióticos. Torna-se assim necessário encontrar alternativas terapêuticas, podendo o resveratrol ser um auxiliar neste tratamento. O resveratrol já foi produzido com sucesso em plantas, células animais e microrganismos recombinantes, requerendo a produção nestes últimos ainda trabalho de optimização. Assim, neste trabalho, foi realizada a optimização da produção, extracção e quantificação de resveratrol a partir de diferentes meios de fermentação, e estudada a inibição de urease de *Helicobacter pylori* com resveratrol. Os meios 2xYT e 2xYT com 1% glicerol são os mais promissores para a produção de resveratrol. O melhor solvente orgânico numa estratégia de extracção líquido-líquido foi o acetato de etilo com uma percentagem de recuperação de cerca de 90%. A quantificação por HPLC e espectrofotométrica foi possível após um passo de clarificação das amostras com uma coluna superose 12 prep grade, obtendo-se valores similares para as duas técnicas. Foi possível efectuar o crescimento de *Helicobacter pylori* em meio líquido e proceder à extracção da urease. A urease extraída foi inibida com sucesso, com diferentes concentrações de resveratrol, a qual foi ainda avaliada com recurso à coloração de géis de electroforese de Fishbein.

Palavras – chave: Resveratrol, Produção, Extracção, *Helicobacter pylori*, Urease, coloração de Fishbein.

ABSTRACT

For many centuries resveratrol has been used in chemical formulations and in botanical dietary for therapeutic purposes. Resveratrol is a stilbene that belongs to the family of polyphenols, and its chemical structure alternates between two conformations cis- and trans-. The most studied configuration of resveratrol it's the trans- form because it has been demonstrated that has anti-oxidant, anti-carcinogenic, cardioprotective properties; it has also antibacterial properties, being one of the targets *Helicobacter pylori*. This bacterium infects about 50% of world population and is considered a major cause of stomach ulcers. In recent years the treatment of *Helicobacter pylori* infection has become less efficient due to increased antibiotic resistance. So, it becomes necessary to find alternative therapies, being resveratrol a valuable aid in this treatment. Resveratrol was successfully produced in plants, animal cells and recombinant microorganisms, and this last one requires optimization. Thus, this work was performed to optimize the production, extraction and quantification of resveratrol from different fermentation media, and to study the inhibition of urease of *Helicobacter pylori* by resveratrol. The most promising media for the production of resveratrol are 2xYT and 2xYT with 1% glycerol. The best solvent in liquid-liquid extraction was ethyl acetate with a recovery percentage of about 90%. The HPLC and spectrophotometric quantification was possible after clarifying the samples with a Superose 12 prep grade column, obtaining similar values for both techniques. The growth of *Helicobacter pylori* was possible in liquid media, and also urease extraction. Extracted urease was successfully inhibited with different concentrations of resveratrol, which was also assessed using the Fishbein staining for electrophoresis gel.

Key-words: Resveratrol, Production, Extraction, *Helicobacter pylori*, Urease, Fishbein stain.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 – INTRODUÇÃO

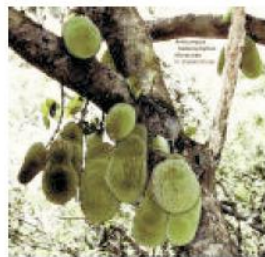
O interesse em compostos naturais com actividade farmacológica/ biológica é uma preocupação ancestral dos humanos, e tem crescido muito nas últimas décadas; a fácil obtenção através da dieta de alguns compostos naturais tem motivado variados estudos em diversas áreas de investigação. Sabe-se que 70% dos medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) provêm de compostos identificados primariamente em plantas, daí a insistência dos governos mundiais em promoverem o consumo de frutas e vegetais com o intuito de prevenir doenças comuns. A descoberta deste tipo de compostos, acessíveis através da dieta e de alto valor biológico, é essencial, na medida em que mais de 80% da população mundial está privada de medicamentos de formulação laboratorial. Nos últimos anos, muitos compostos naturais têm sido descritos como valiosos neste aspecto, embora um se destaque, o Resveratrol.

1.2 – RESVERATROL

Resveratrol (Resv) ou 3,5,4'-trans-hidroxiestilbeno é um estilbeno, que faz parte da grande família dos polifenóis (Signorelli e Ghidoni, 2005) . O Resv é utilizado desde há muitos séculos em formulações e dietas botânicas existentes na medicina tradicional chinesa e na medicina *Ayurveda* indiana (Paul et al., 1999). Como entidade química foi isolada pela primeira vez nos anos 40 do século passado de raízes de Helboro branco (*veratrum alb.*). O Resv pode ser encontrado em 72 espécies vegetais (distribuídas por 31 géneros e 12 famílias) (figura 1), em alimentos apenas são encontradas quantidades apreciáveis em nozes, amendoins, amoras, e na pele das uvas, podendo a sua concentração chegar a 400 µg/g em uvas infectadas por fungos, daí derivando a sua presença no vinho tinto, encontra-se também, mas em menores concentrações na videira (Pirola e Frojdo, 2008). De um ponto de vista botânico é uma fitoalexina, e a sua produção é regulada pelo stress sofrido de diversas formas, desde infecções fúngicas (mais comumente por *B. Cinerea*) ou até por estímulos abióticos como radiação U.V., contacto com iões alumínio, entre outros (Chong et al., 2009).



Amendoin
Arachis hypogea



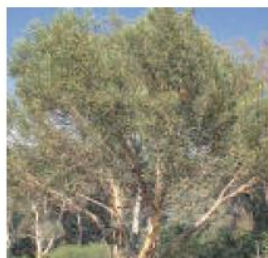
Jaqueira
Artocarpus sp.



Legumes
Cassia sp.



Orchid tree
Bauhinia sp.



Eucalypto
Eucalyptus globulus



Gneto
Gnetum montanum



Amora
Morus rubra



Picea - Abeto falso
Picea sp.



Pinheiro
Pinus sylvestris



Ko-Jo-Kon (planta japonesa)
Polygonum cuspidatum



Rheum
Rheum rhaponticum



Mirtilo
Vaccinium



Cereja
Vaccinium sp.



Helboro Branco
Veratrum grandiflorum



Helboro
Veratrum sp.

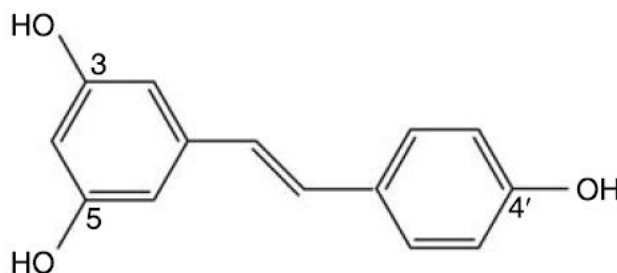


Uva
Vitis vinifera

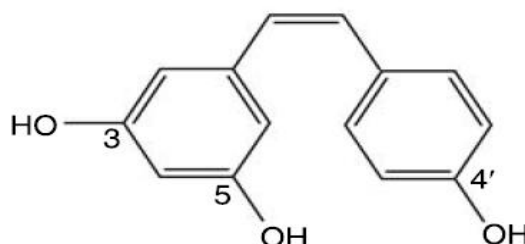
Figura 1. Algumas plantas onde pode ser encontrado resveratrol.

1.2.1 – ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO RESVERATROL

O Resveratrol é um composto de fórmula química $C_{14}H_{12}O_3$, e massa molecular de 228,243 g/mol. A sua estrutura compreende dois anéis aromáticos ligados por uma ligação dupla estireno, esta dupla ligação facilita a interconversão entre a forma trans- e cis- (figura 2) (Trela e Waterhouse, 1996).



Trans-Resv (trans-3,4',5-trihidroxiestilbeno)



Cis-Resv (cis-3,4',5-trihidroxiestilbeno)

Figura. 2. Estrutura química do trans- e cis- Resv (3,4',5-trihidroxiestilbeno).

Quanto às suas propriedades físico-químicas o Resv encontra-se na forma sólida (pó), de cor branca, o seu ponto de fusão ocorre para temperaturas entre os 253-255 °C, com um pKa de $9,14 \pm 0,20$ e com uma solubilidade em água inferior a 0,01 mol/L (Cucciolla et al., 2007).

A configuração mais estudada do Resv é a trans-, estando disponível comercialmente. A forma cis- tem sido descrita como muito instável e desta forma não está disponível para compra, podendo ser obtida a partir da forma trans- quer pela exposição à luz solar (Chen et al., 2007), quer pela exposição a radiação ultravioleta em comprimentos de onda de 254 ou 366nm (Blache et al., 1997; Trela e Waterhouse, 1996). Diversos estudos indicam que o trans-Resv, adquirido comercialmente, quando submetido a

diferentes condições se mantém estável durante meses, excepto, quando exposto a radiação UV, ou em tampões com pH elevado (Deak e Falk, 2003; Trela e Waterhouse, 1996).

O Resv é facilmente oxidado, este facto justifica que seja identificado nas plantas maioritariamente na forma de 3-O- β -glucosidases (piceid), o que o torna resistente a oxidações. Pode ainda ser conjugado, embora em menor escala, com outros grupos, como por exemplo grupos sulfato ou metil (Signorelli e Ghidoni, 2005).

1.2.2 - EFEITOS BIOLÓGICOS DO RESVERATROL

O interesse no estudo dos compostos presentes em vinhos, começou no momento em que estudos epidemiológicos demonstravam uma correlação inversa entre a ingestão de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares (Gronbaek et al., 1995; Richard, 1987). A este fenómeno foi dado o nome de *Paradoxo Francês*, devido ao facto da população francesa sofrer menos de problemas cardiovasculares em comparação com outros países industrializados, apesar da sua dieta rica em gorduras saturadas (Richard, 1987). Em 1992 foi detectado pela primeira vez Resv em amostras de vinho tinto, e desde logo se pensou ser esta a molécula responsável pelo *Paradoxo Francês* (Siemann e Creasy, 1992). Mais recentemente a descoberta de que o trans-Resv activaria a apoptose de células cancerígenas em humanos aumentou significativamente o interesse nesta molécula (Pervaiz, 2001).

Em todas as áreas da ciência, nomeadamente nas áreas ligadas à saúde, têm sido encontradas evidências das potencialidades do Resv. Em 1997 surgiram as primeiras evidências de que o trans-Resv poderia ser um agente anti-carcinogénico, com a publicação de Jang e seus colaboradores. Nesta publicação Jang conseguiu obter informação de que o trans-Resv tinha capacidade para inibir múltiplas fases da carcinogénese (Jang et al., 1997). Esta tese para além de suportada por dados experimentais, apoiava-se em dados que iam sendo obtidos por todo o mundo, assim como, a capacidade demonstrada para inibir a angiogénese, e conseqüentemente impedir o crescimento de tumores sólidos (Brakenhielm et al., 2001). Outra forma pela qual o Resv poderia combater a progressão, e até a iniciação de tumores, seria o facto de gerar alterações no ciclo celular e na apoptose, resultados *in vitro* e *in vivo* documentam os

efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos do Resv. (Aggarwal et al., 2004; Baur et al., 2006).

Uma das características fundamentais do Resv no que diz respeito às suas potencialidades terapêuticas prende-se com sua capacidade intrínseca de ser antioxidante, é capaz de captar espécies reactivas de oxigénio (ROS), podendo retardar desta forma os efeitos negativos provocados pelas mesmas (Qian et al., 2009). O Resv é capaz de modular a oxidação das LDL (lipoproteínas de baixa densidade), prevenindo a sua oxidação através da quelação do cobre e captação das ROS (estudos *in vitro*) (Frankel et al., 1993). Este composto actua também como fitoestrogénio em diversos sistemas e esta sua propriedade tem sido sugerida como podendo mediar efeitos cardio e neuroprotectores (Athar et al., 2007).

Por outro lado a correlação entre o Resv e o *Paradoxo Francês*, levou à ligação imediata entre o composto, a sua estrutura e propriedades, e as doenças cardíacas. Alguns dos efeitos biológicos que o Resv demonstrou como molécula responsável pela cardioprotecção, seriam a capacidade de combater a agregação plaquetar *in vitro*. O mecanismo pelo qual, tal acontece pensa tratar-se de inibição selectiva das diferentes isoformas da COX1 e COX2 (ciclooxigenase), devido ao balanço de prostaglandinas ser essencial para a homeostase vascular. Por exemplo, o Tromboxano A2 é sintetizado pela COX1 nas plaquetas sendo um potente agente de agregação plaquetar e vasoconstritor; pelo contrário as prostaciclina produzidas pela isoforma 2 da COX têm efeitos opostos (Bertelli et al., 1995). Nesta medida o Resv apresenta-se também como vasodilatador, pela sua capacidade de estimular os canais Ca^{+} - K^{+} , e incrementar as vias de sinalização do óxido nítrico no endotélio (Li et al., 2000; Orallo et al., 2002).

Dentro dos efeitos biológicos do trans-Resv destacam-se nos últimos cinco anos um grande número de trabalhos que relacionam a toma de trans-Resv com o combate ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas. Howitz. *et al* em 2003 provaram que o Resv era um forte potenciador da actividade da SIRT1, esta proteína pertence à família das *Sirtuinas*, uma família conservada das desacetilases dependentes de NAD^{+} (desacetilases de histonas classe III). Homólogos desta proteína em leveduras, vermes e moscas (Sir 2) demonstram estar fortemente implicados no aumento do tempo de vida, destas espécies (Howitz et al., 2003). Em alguns destes organismos a restrição calórica leva ao aumento da expressão deste tipo de proteínas. Colocando-se como hipótese que estas desempenham um papel fundamental na protecção e sobrevivência dos organismos quando colocados em situações de stress biológico (Chen et al., 2005). Foi provado por

dados *in vitro* e *in vivo* que o Resv conseguia aumentar o tempo de vida de *S. cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. Em ratinhos comprovou-se que o Resv conseguia mimetizar os efeitos do uso de uma alimentação com restrição calórica. A restrição calórica consegue retardar alguns aspectos do envelhecimento em mamíferos como a mortalidade relacionada com o envelhecimento, a formação de tumores e o declínio fisiológico associado ao envelhecimento (Barger et al., 2008). A activação da Sirtuina 1 pelo Resv ganha contornos de essencial também na questão das doenças neurodegenerativas como são os casos da doença de Parkinson e a doença de Alzheimer, nestes casos o Resv tem sido equacionado como um auxiliar nas estratégias terapêuticas destas doenças (Sun et al., 2010).

O Resv tem ainda um grande número de alvos moleculares (tabela 1), com os quais interage, e regula, a nível genético e proteico.

Tabela 1. Alvos moleculares do Resv adaptado de (Aggarwal et al., 2004).

Citocinas	- Factor de transformador crescimento $\beta 2$ - FasL	"Upregulated"
	Factor transformador de crescimento GF)- α - Factor de crescimento epidérmico - Factor de necrose tumoral - Interleucina- 1β - Interleucina-6 - Factor de crescimento endotelial vascular - <i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>	"Downregulated"
Factores de transcrição	- <i>Early growth response 1</i>	"Upregulated"
	- Activador de proteina-1 - Factor nuclear -kappa B - Beta catenina - Receptor de androgénios	"Downregulated"
Proteínas do ciclo celular	- Cinase dependente de ciclina-2 - p21Cip1/WAF1 - p27kip1	"Upregulated"

Tabela 1. Continuação.

	- Ciclina D1 - Retinoblastoma - Ciclina A - Ciclina B1	"Downregulated"
Mediadores Inflamação	- NADPH:quinona oxidoreductase 1	"Upregulated"
	- Ciclooxygenase-2 - 5-Lipoxigenase - Sintetase do oxido nitrico indutivel - Moléculas de adesão celular vascular-1 - Molécula de adesão intracelular-1 - Factor tecidular	"Downregulated"
Apoptose	- p53 - Bax	"Upregulated"
	- Bcl-2 - Survivina	"Downregulated"
Cinases	- Protein Cinase C - Syk - Protein Cinase D - Casesin Cinase II - Extracellular signal-regulated Cinase 1/2	"Downregulated"
Outros	- <i>Nonsteroidal antiinflammatory drug-activated gene 1</i>	"Upregulated"
	- Ribonucleotido reductase - DNA polimerase - CYP1A1	"Downregulated"

1.2.3 - RESVERATROL COMO ANTI-BACTERIANO

Nas plantas um dos mecanismos de defesa adoptados aquando da infecção por um agente bacteriano ou fúngico é o aumento da produção de fitoalexinas, como o Resv. Este metabolito tem demonstrado actividade biológica contra uma vasta gama de agentes patogénicos de plantas e de humanos. Tabela 2.

Tabela 2: Mínimas concentrações inibitórias (MIC₅₀) de Resv para vários agentes patogénicos humanos.

Bactéria	Mínima concentração inibitória (MIC₅₀)(µg/mL)	Referência
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	12,5	(Schriever et al., 2003)
<i>Helicobacter pylori</i>	12,5	(Mahady and Pendland, 2000)
<i>Bacillus cereus</i>	50	(Chan, 2002)
<i>Neisseria Gonorrhoeae/ meningitidis</i>	25/100	(Docherty et al., 2001)
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	(Paulo et al., 2010)
<i>Enterococcus faecalis</i>	100	(Paulo et al., 2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥400	(Paulo et al., 2010)
<i>Salmonella typhimurium</i>	≥400	(Paulo et al., 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥400	(Paulo et al., 2010)

1.3 – *HELICOBACTER PYLORI*

Em 1982 Warrem e Marshall isolaram uma nova bactéria do estômago de doentes com úlceras gástricas, vindo esta a ser classificada num novo género *Helicobacter pylori* (HP) (Goodwin et al., 1989). A HP (figura 3.) pertence à classe Epsilonproteobacteria, pode classificar-se como gram negativa, é microaerófila apresenta motilidade e quanto à forma pode ser espiralada ou cocoide. É um patógeno gastrointestinal e cerca de 50% da população mundial encontra-se infectada com este microrganismo (Bartnik, 2008); classificado com um dos principais causadores de úlceras, é também descrito como mais consideráveis factores de risco em casos de carcinomas do estômago, responsáveis por

700.000 mortes/ano (Malfertheiner et al., 2010) . Esta associação é feita tendo em conta que esta bactéria tem a capacidade de colonizar a mucosa gástrica e lá sobreviver durante anos induzindo inflamação crónica (Matysiak-Budnik e Megraud, 2006). Os problemas clínicos associados à *H. pylori* advêm de uma complexa interacção entre factores externos, as condições do hospedeiro e os factores de virulência (Hocker e Hohenberger, 2003).

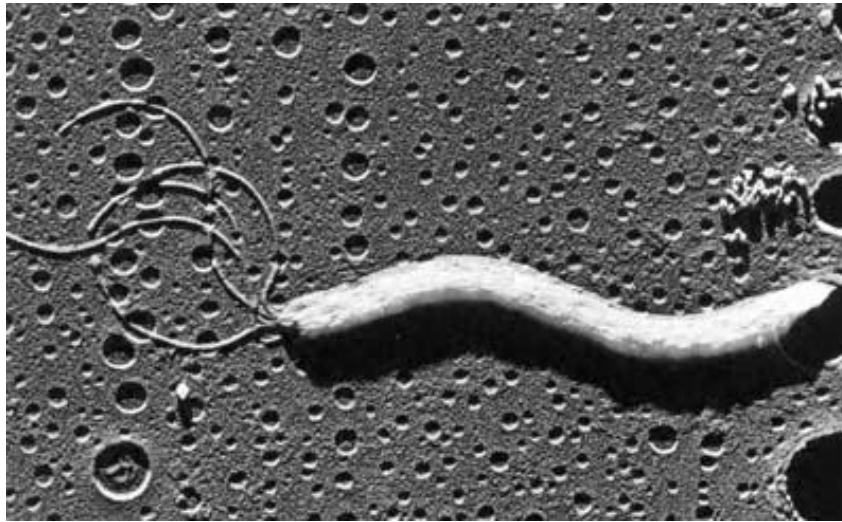


Figura 3: Imagem de microscopia electrónica de *Helicobacter pylori*.

A prevalência da infecção por HP é mais facilmente correlacionada com a situação socioeconómica do país do que com a raça. Embora ocorra por todo o mundo, existem diferenças substanciais na prevalência e incidência desta infecção. Os países industrializados têm uma percentagem de infecção entre os 20-50 % em adultos jovens, enquanto os países em desenvolvimento pode ultrapassar os 80% (figura 4). A infecção na sua generalidade ocorre na infância e prolonga-se na vida do indivíduo até ser convenientemente tratada. Este facto pode dever-se à melhoria das condições de higiene e sanitárias principalmente durante a infância, e aumento dos tratamentos com antibióticos, nos países industrializados (Gerrits et al., 2006).

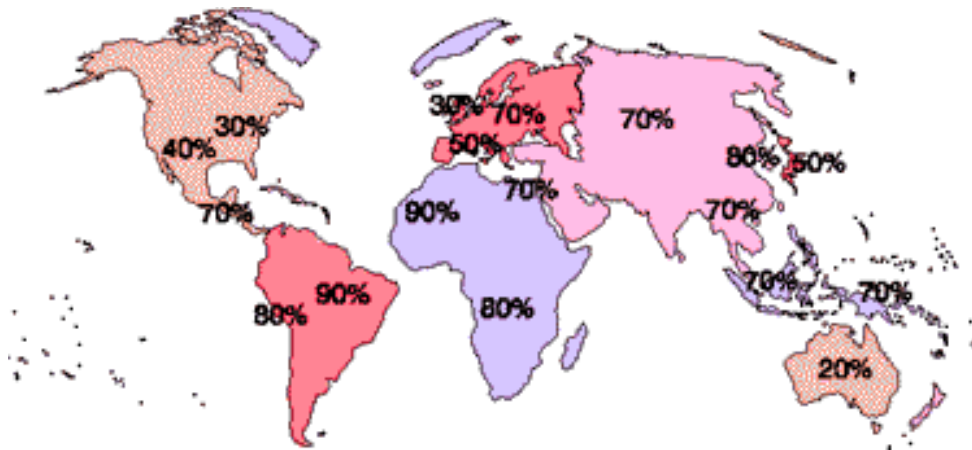


Figura 4. Mapa esquemático da prevalência da infecção por HP. (*Helicobacter pylori* foundation)

Quanto ao tratamento muitos antibióticos têm sido recomendados para a erradicação da infecção, mas a emergente resistência a antibióticos tornam os tratamentos mais complexos. Dois antibióticos muito usados no controlo e erradicação desta bactéria são o metronidazole® e a claritromicina®, ainda assim, muitas vezes a terapia tem de passar por associações medicamentosas entre 3 a 4 antibióticos e ainda inibidores das bombas de prótons, só dessa forma se revelando eficaz (Lin et al., 2005).

1.3.1 CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI*

Uma das características mais marcantes do *Helicobacter pylori*, é o seu crescimento requerer grande fornecimento de nutrientes, e as condições de crescimento terem de ser altamente controladas. A HP apenas cresce em ambiente microaerófilo, com 5 a 10 % de oxigénio, exibindo uma temperatura óptima de crescimento de cerca de 37 °C. Esta bactéria cresce muito lentamente, levando 3-4 dias para crescer em placa após o isolamento inicial (recorrentemente biópsias) (Stevenson et al., 2000). Para o crescimento em placa, a HP cresce em meios de base agár, normalmente meios complexos suplementados com sangue ou soro de cavalo inactivados, os mais comumente utilizados são o *Brain heart infusion broth* (BHI), *Mueller-Hinton broth* (MHB) e *Brucella broth* (BB) (Coudron e Stratton, 1995; Dent e McNulty, 1988; Ho e Vijayakumari, 1993).

O crescimento em meio líquido, apresenta todos os requerimentos necessários ao crescimento em placa, no entanto, o sangue de cavalo utilizado em placa, no caso dos meios líquidos, geralmente substituído por soro de cavalo inativado, no crescimento em meio líquido novos desafios se colocam, nomeadamente o recipiente em que a cultura deverá ser feita existindo muita controvérsia em relação a esse tema. No entanto o crescimento é possível, com algumas particularidades importantes como por exemplo o inóculo inicial ter de ser reduzido (Walsh e Moran, 1997) ou o crescimento ser mais favorável sem agitação (Deshpande et al., 1995).

Foram já estudados inúmeros suplementos para auxiliar ao crescimento de HP em meio líquido, assim como: eritrócitos lisados, extracto de levedura, peptona, amido, ciclodextrinas e piruvato de sódio; no entanto, ainda nenhum demonstrou ser um bom substituto para o soro de cavalo/ovelha ou mesmo o sangue (Vega et al., 2003).

1.3.2 – FACTORES DE VIRULÊNCIA

São vários os factores de virulência identificados até ao momento, entre os mais representativos encontram-se *Cag-pathogenicity island* (Cag-PAI), *vacuolating cytotoxin* (VacA) e moléculas de adesão. Esta bactéria é também caracterizada por uma grande variabilidade genética, podendo ao longo do tempo rearranjar o seu genoma, provocando mutações endógenas, o que parece ser importante na sua adaptação no estômago do hospedeiro.

A urease de HP, gera controvérsia na sua classificação como factor de virulência não o sendo considerado por muitos autores, no entanto o papel que esta proteína desempenha, em todo o processo de inflamação, leva a que tenha uma função fulcral.

1.3.3 – UREASE E INIBIDORES DA UREASE

A urease de HP tem uma massa molecular de aproximadamente 540 KDa, contendo duas subunidades (UreA -30KDa e UreB-62KDa), numa proporção molar de 1:1. Esta enzima possui ainda um centro activo com moléculas de níquel (Dunn et al., 1997).

A urease é responsável pela manutenção do pH circundante da bactéria. A urease catalisa a hidrólise da ureia com formação de amónia e dióxido de carbono, elevando o pH, o que protege a bactéria do ambiente ácido do estômago (Hocker e Hohenberger, 2003). A urease é uma proteína citoplasmática no entanto encontra-se em muitos casos na superfície bacteriana. Isto ocorre através de um fenómeno de auto-lise bacteriana libertando o conteúdo citoplasmático e fazendo com que a urease fique adsorvida na membrana externa das bactérias circundantes (Phadnis et al., 1996).

Ainda que o controlo da infecção por HP tenha sido comumente realizado com recurso a antibióticos, têm também surgido indicações de que uma inibição efectiva da urease permitiria um controlo do crescimento e colonização de HP na mucosa do estômago (Nagata et al., 1992). Tal ficou demonstrado quando se tentou a colonização da mucosa estomacal de ratos com estirpes mutantes urease-negativos, onde ficaram reveladas grandes dificuldades de colonização (Tsuda et al., 1994). Existem três grandes grupos de inibidores da urease: os ácidos hidroxâmicos e a maioria dos seus derivados, as fosforamidas e os tióis. Os ácidos hidroxâmicos e os seus derivados são eficientes tanto na inibição de urease de plantas como de bactérias. Este tipo de ácidos são quelantes de metais, partindo desse pressuposto o seu mecanismo de acção (alteram o centro activo metálico da enzima) (Clark e Wilcox, 1989). As fosforamidas, são também potentes inibidores da urease, sendo em alguns casos mais potentes que os ácidos hidroxâmicos. Têm um mecanismo de acção semelhante ao dos ácidos hidroxâmicos, tratando-se de um inibidor competitivo, no entanto em algumas fosforamidas assim como o fenilfosforodiamidato é hidrolisado em pequenas proporções pela enzima. O último dos três grandes grupos de inibidores são os tióis, estes são inibidores fracos das ureases, e apenas revelam a sua apetência para inibir esta enzima na presença de outros compostos carregados positivamente. Estes compostos têm sido muito úteis na caracterização das cinéticas enzimáticas de urease de diferentes proveniências (Mobley et al., 1995).

1.3.5 – QUANTIFICAÇÃO DA UREIA E IDENTIFICAÇÃO “IN GEL” DE UREASE

Para o cálculo da actividade da urease estão descritos vários métodos, todos eles sejam directos ou indirectos se baseiam na quantificação dos produtos formados na reacção de hidrólise da ureia pela urease, a amónia e o dióxido de carbono. Os métodos mais usados são o ensaio do indofenol que detecta a amónia formada; a quantificação de $^{14}\text{CO}_2$ pelo decaimento de ureia marcada radioactivamente, ensaios que utilizam a glutamato desidrogenase e medem a oxidação de NADPH. O método do indofenol tem várias vantagens como a sua sensibilidade (amónia pode ser quantificada em soluções com menos de $4\mu\text{M}$ de amónia). Tem uma resposta linear numa grande gama de concentrações, a cor formada é estável e facilmente quantificada espectrofotometricamente (Witte e Medina-Escobar, 2001).

A identificação “in gel” da urease de *Helicobacter pylori*, apenas foi realizada utilizando Western-blot (Dunn et al., 1997), no entanto a coloração de Fishbein, foi realizada com sucesso para urease de plantas (Witte and Medina-Escobar, 2001). A coloração de Fishbein permite a localização da zona onde se encontra a banda da urease em géis de acrilamida não desnaturantes, devido á incubação com ureia e fenol-nitroprussido, levando a que na zona onde ocorre a reacção de hidrólise da ureia, ocorra uma alteração de pH o que resulta numa mudança de cor nessa zona do gel (Witte e Medina-Escobar, 2001).

1.4 - PRODUÇÃO DE RESVERATROL

Hoje em dia os maiores mercados de trans-Resv são os mercados dos nutracêuticos e cosméticos, e na sua maioria o Resv é extraído da uva, ou produzido via síntese química. Devido ao aumento de interesse nas suas propriedades biológicas, outras formas de produção terão de ser encontradas. Neste campo, a biotecnologia poderá ser uma arma efectiva no que diz respeito a aumentar a produção de Resv quer em plantas quer em microrganismos.

1.4.1 - PRODUÇÃO DE RESVERATROL EM PLANTAS

As fitoalexinas estilbenóides, como é o caso do Resv são formadas nas plantas segundo a via biosintética fenilpropanóica (Delaunois et al., 2009). Esta via é formada por 4 enzimas, a fenilalanina amónia liase (PAL; EC- 4.3.1.5), hidroxilase-4 do ácido cinâmico (C4H; EC-1.14.13.11), ligase 4-coumarato:CoA (4CL; EC-6.2.1.12), e pela estilbeno sintetase (STS; EC- 2.3.1.95) (figura 5).

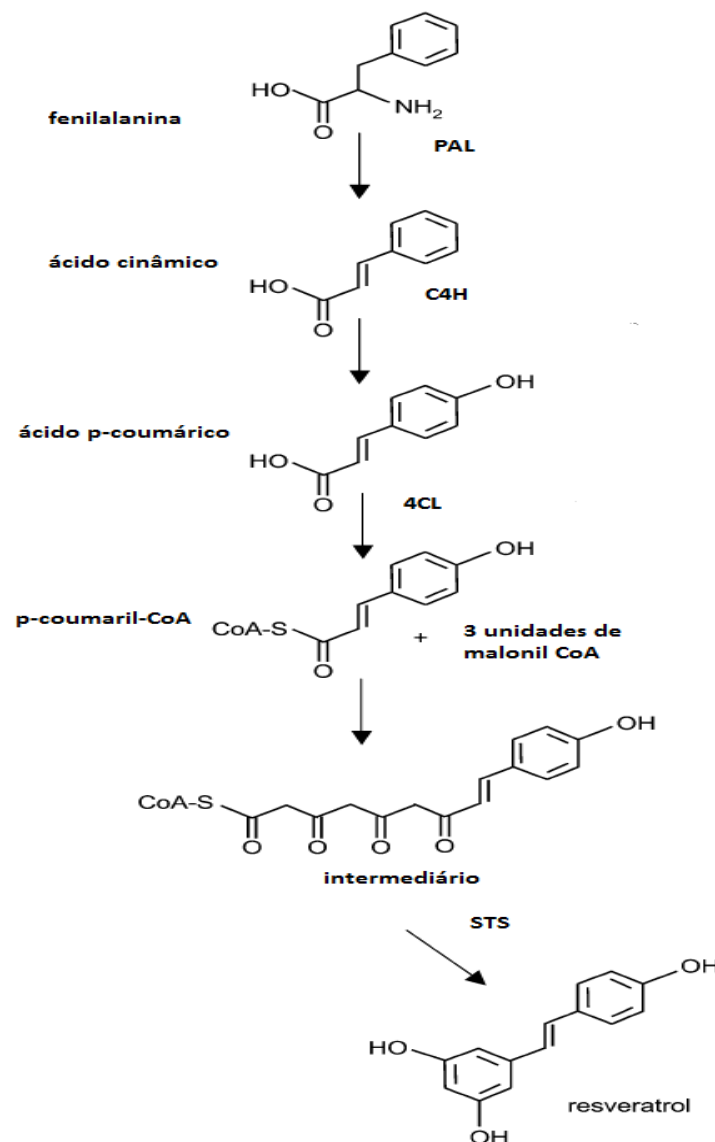


Figura 5. Reapresentação esquemática da via de síntese de resveratrol.

As duas primeiras enzimas, PAL e C4H, transformam o aminoácido fenilalanina em ácido p-coumárico. A terceira enzima (4CL) liga o ácido p-coumárico à coenzima A, produzindo o p-coumaril-CoA, estas três enzimas são comuns num grande número de

plantas e as responsáveis pela formação da maioria dos compostos fenólicos, assim como antocianinas, pigmentos, flavonóides, fitoalexinas e componentes da parede celular (Chong et al., 2009; Flores-Sanchez e Verpoorte, 2009). A estilbeno sintetase (STS) catalisa a condensação do Resv a partir de 1 molécula de p-coumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA, este último originário da síntese de ácidos gordos (Halls e Yu, 2008).

1.4.2 - PRODUÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM CÉLULAS VEGETAIS (CULTURAS)

A cultura de células de plantas tem sido intensivamente investigada para a produção de metabolitos secundários, assim como trepenóides, alcalóides, compostos fenólicos ou até heterósidos. Nestes casos têm sido desenvolvidos dois modelos principais de culturas, as culturas em suspensão celular e o cultivo de raízes e caules, ambos os sistemas são processados em sistemas com um meio de cultivo líquido ou sólido e em condições de assepsia (Donnez et al., 2009).

1.4.2.1 - Suspensões celulares vegetais

A maior vantagem de cultura com suspensões celulares é o facto das células em suspensão não necessitarem de modificação genética, estas produzem o Resv constitutivamente, ou mais comumente em resposta a stress introduzido na cultura, estes podem ser por exemplo, o quitosano ou ciclodextrinas (Ferri et al., 2009; Larronde et al., 1998), ou moléculas sinalizadoras como metiljasmonato (MeJA) (Krisa et al., 1999). A produção no entanto fica limitada pela capacidade da respectiva planta produzir o trans-Resv (Repka, 2001). Um dos inconvenientes neste tipo de produção é no entanto o excesso de moléculas de “picieds” encontrados em algumas plantas (Donnez et al., 2009). A utilização de MeJA como promotor da produção de Resv em *Vitis vinifera* mostrou-se eficaz e foram conseguidos valores de estilbenos a rondar os 280 mg/L (Aumont et al., 2004), no entanto o trans-Resv encontrava-se na sua maioria glicosilado, para evitar este facto e com vista a fazer o “scale-up” neste tipo de produção, testou-se a introdução de stress através de luz UV. No entanto, este método não foi possível ser aplicado, devido à fácil isomerização do Resv, e a excessiva produção de antocianinas (Aumont et al., 2004). Um trabalho recente, demonstra no entanto, que suspensões celulares de *Vitis Vinifera* cv.

Monastrell com a introdução de DIMED (β -ciclodextrina) em erlenmyer de 250 mL com 100 mL de meio conseguem um valor de 680 mg/L, demonstrando ainda sinergias entre MeJA e esta ciclodextrina específica conseguindo um valor de cerca de 4000 mg/L, de trans-Resv (Lijavetzky et al., 2008).

1.4.2.2 - Culturas de Raízes e Caules

Para que ocorra a produção de estilbenos em culturas de caules e raízes é necessário transformar geneticamente os tecidos da planta. Um dos métodos de transformação recorre à utilização do plasmídeo, Ri T-DNA de *Agrobacterium rhizogenes*. Este causa a modificação genética, levando ao desenvolvimento de raízes, que têm a capacidade de crescer em meio líquido e produzir metabolitos secundários.

Na produção de trans-Resv em culturas de raízes de amendoim (*Arachis hypogea*), estas foram expostas a soluções concentradas de acetato de sódio, de forma a criar stress biológico. Desta forma a produção de trans-Resv aumentou 60 vezes em apenas 24 horas, com cerca de 98 mg/mg de cultura seca (Medina-Bolivar et al., 2007). Neste tipo de cultura a selecção da planta e da estirpe de *Agrobacterium rhizogenes*, é crítica para a uma produção efectiva.

A produção em culturas de caules tem sido investigada nos últimos anos, e concluiu-se que se conseguem produzir compostos como, o trans-Resv, piceatanol, entre outros. As culturas de caules são feitas em meio sólido, e requerem grande disponibilidade de espaço, o que faz com que seja a maior limitação ao “scale-up” no que toca a esta técnica (Kiselev et al., 2007).

1.4.3 - PLANTAS TRANSGÉNICAS E O TRANS-RESVERATROL

A produção de Resv em plantas transgénicas já foi realizada com sucesso. Nas plantas apenas é necessário introduzir o gene correspondente a estilbeno sintetase (STS), visto que estas possuem parte da via fenilpropanóica. A STS já foi transfectada para várias plantas, como arroz, tomate, maçã, papaia, entre outros (Delaunoy et al., 2009; Pervaiz, 2003). A transfecção de plantas com os genes que codificam para STS, e a resistência a doenças (infecções por fitopatogéneos) conferida pela produção de Resv, pode apresentar-

se como alternativa a pesticidas e fungicidas, fica no entanto por conhecer o acréscimo de valor nutricional que traria a uma planta transgênica. Ainda assim uma aplicação comercial ficou demonstrada recentemente, visto que a introdução de STS de amendoim em *Humulus Lupulus* aumentou a resistência a infecções e ao mesmo tempo o valor nutricional da bebida final (Delaunoy et al., 2009; Halls e Yu, 2008).

1.4.4 - PRODUÇÃO DE RESVERATROL EM CÉLULAS ANIMAIS

A produção de Resv em células animais está ainda em fase de experimentação, podendo referir-se que já foi tentada e com sucesso em células de linha celular de rim (HEK293). Nestes tipos de células, para além dos genes que codificam para a via fenilpropanóica têm de ser adicionados os genes que codificam para a enzima TAL (tirosina amónia liase). Desta forma, a tirosina é convertida em ácido p-coumárico (muitas células humanas contêm reservas de tirosina livre, desta forma existe uma contínua alimentação de substrato), essencial ao início/progressão da via biossintética, não sendo desta forma necessário introduzir um substrato tóxico, como o ácido p-coumárico (Wippel et al., 2004). Este tipo de produção tem apenas em vista introduzir níveis de Resv na célula, levando a que esta beneficie das suas propriedades biológicas. (Donnez et al., 2009; Halls e Yu, 2008).

1.4.5 - PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM MICRORGANISMOS

Nos últimos anos, o número de biomoléculas recombinantes usadas para aplicações terapêuticas aumentou significativamente. O recurso a sistemas de expressão usando bactérias e leveduras são muito utilizados devido ao baixo custo e ao rápido crescimento das mesmas. O crescente conhecimento das bases genéticas e bioquímicas destes sistemas de expressão, em conjunto com o baixo custo, tem permitido a produção de biomoléculas vantajosas economicamente, assim como enzimas industriais como amilases, proteases, celulasas, proteínas terapêuticas, como insulina, hormonas de crescimento e solventes, como o etanol, butanol, entre outras biomoléculas de interesse biológico e comercial (Andersen e Krummen, 2002; Chemler e Koffas, 2008).

Os sistemas celulares hospedeiros para a expressão de genes exógenos podem ser procariotas (geralmente *E. coli*) ou eucariotas (*Saccaromyces cerevisiae*), cada um apresentando vantagens e desvantagens, com aplicações diversas. Assim, a selecção do sistema de expressão deve ser feita tendo em conta a produtividade, bioactividade, aplicação final e propriedades físico-químicas da biomolécula de interesse, assim como o custo, segurança e conveniência do próprio sistema (Yin et al., 2007). De entre os vários sistemas de expressão heteróloga disponíveis, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* tem sido o mais atractivo devido à sua capacidade de crescimento rápido e a alta densidade em substratos de baixo custo, para além destes factores, também o conhecimento acerca do seu genoma e a disponibilidade de inúmeros vectores para a clonagem, o posicionam como um excelente sistema de expressão (Baneyx, 1999).

A expressão é normalmente levada a cabo através da incorporação de plasmídeos com componentes genéticos compatíveis, entre os quais uma origem de replicação (*ori*), um marcador de resistência a antibiótico, promotores transcrpcionais, regiões de iniciação de tradução (TIRs) assim como terminadores transcrpcionais e traducionais. O sistema de plasmídeos pET baseado na T7 RNA polimerase, constituído por promotores híbridos, múltiplos locais de clonagem para incorporação de diferentes parceiros de fusão e locais de clivagem de protease, é o mais usado na produção de proteínas recombinantes (Sørensen e Mortensen, 2005). Por outro lado, também a escolha da estirpe bacteriana é importante na expressão recombinante, uma vez que devem carecer de proteases nativas, manter a estabilidade do plasmídeo e conferir elementos genéticos relevantes ao sistema de expressão (Sorensen e Mortensen, 2005). Especificamente, a tecnologia de proliferação controlada consiste em controlar o ciclo celular do hospedeiro produtor de maneira a reconduzir a sua energia metabólica na criação de biomassa para produção de proteínas (Shiloach e Fass, 2005; Weber e Fussenegger, 2007). O processo de produção desenvolve-se em duas fases sequenciais: uma fase de expansão a que corresponde a proliferação das células até atingir uma densidade celular específica, seguida de uma fase produtora onde as células suspendem o ciclo celular na fase G1 e iniciam a produção da proteína - alvo, após indução (Weber e Fussenegger, 2007).

O processo fermentativo decorre em bioreactores, estes podem funcionar de diferentes modos, dependendo do modo de alimentação a que estão sujeitos, podem então operar em modo descontínuo (batch), semi-contínuo (fed-batch), ou contínuo.

No primeiro processo, em reactores descontínuos, ao longo de todo o processo não há adição de substratos, nem o meio de cultura é retirado ao longo da fermentação, visto

isto, o volume permanece aproximadamente constante ao longo de todo o processo. Nos reactores que operam de forma semi-contínua, os substratos poderão ser adicionados de forma contínua ou intermitentemente, sem que nenhum meio de cultura seja retirado até ao final da fermentação, desta forma o volume final da fermentação aumenta. Nos reactores que operam de forma contínua o volume final permanece constante uma vez que ao mesmo tempo que se dá a entrada de substratos, dá-se também a saída contínua de meio de cultura (Versyck e Van Impe, 1999). Os modelos descontínuos e contínuos são os mais utilizados, para os estudos de parâmetros cinéticos, já os processos semi-contínuos são menos utilizados neste tipo de estudos, embora recentemente venham a ser mais utilizados (Gnoth et al., 2008).

Para além dos factores genéticos e do sistema de expressão acima discutidos existem outros factores determinantes a ter em conta, para alcançar a máxima produção das biomoléculas pretendidas, assim como, a percentagem de oxigénio envolvida nos processos, pH, o meio de cultivo onde se promove o crescimento das bactérias, entre outros. Em relação ao oxigénio ficou demonstrado por Herbert em 1965 que o oxigénio era um factor determinante para o crescimento de bactérias *E. coli*, conseguiu concluir que 1 grama de oxigénio dava origem a 1,06 gramas de biomassa (Herbert D, 1965). No que diz respeito ao meio de cultura este deve suprimir todas as necessidades nutricionais das bactérias (Parekh et al., 2000). Os meios de cultura podem classificar-se como sendo definidos, ou seja, a sua composição é conhecida pormenorizadamente, os meios mínimos pertence geralmente a esta classe, e são comumente constituídos pelos componentes essenciais ao crescimento dos microrganismos (Mendez et al., 2006). Os meios podem ser também complexos, este tipo de meios contem componentes como extracto de levedura, casa-aminoácidos ou peptonas, não se conhece com certeza a sua constituição (Mendez et al., 2006). Para promover o crescimento bacteriano é então essencial que o meio contenha, uma fonte de carbono, esta é a fonte de energia para as células e normalmente o factor limitante para a fermentação, a glucose e o glicerol são as escolhas mais convencionais. Deve conter ainda uma fonte de azoto esta fonte é normalmente introduzida através da adição de sais (NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ao meio de cultura, no entanto os meios complexos contêm este tipo de fontes. Sais e minerais são também fundamentais para um crescimento/produção sustentada, entre estes sais encontram-se, o magnésio, fósforo, potássio entre outros (tabela 3) (Carnes e Williams, 2007; Shiloach e Fass, 2005). Então a composição do meio de cultura deve traduzir a composição de célula bacteriana.

Tabela 3. Composição percentual dos elementos químicos que constituem a bactéria *E. coli*.

Elemento	Percentagem presente em células de <i>E.coli</i>
Carbono	50-53
Hidrogénio	7
Azoto	12-15
Fósforo	2.3
Sulfatos	0,2-1,0
Potássio	1,0-4,5
Sódio	0,5-1,0
Cálcio	0,001-1,10
Magnésio	0,1-0,5
Cloro	0,5
Ferro	0,02-0,20

1.4.6 - PRODUÇÃO DE RESVERATROL EM MICRORGANISMOS RECOMBINANTES

A produção de trans-Resv em microrganismos recombinantes tem sido estudada ao longo dos últimos anos. A transformação de bactérias ou leveduras para que estas produzam Resv, representa uma forte ferramenta para a sua produção em larga escala.

A transformação destes microrganismos é essencial, visto não possuírem a via de síntese de Resv. Duas estratégias têm sido utilizadas, se por um lado se introduzem a totalidade dos genes que codificam para toda a via biossintética, e se usam como

substratos a L-fenilalanina ou L-tirosina, ou por outro lado apenas se introduzem genes específicos para a 4CL e STS usando o ácido p-coumárico como substrato (figura 6).

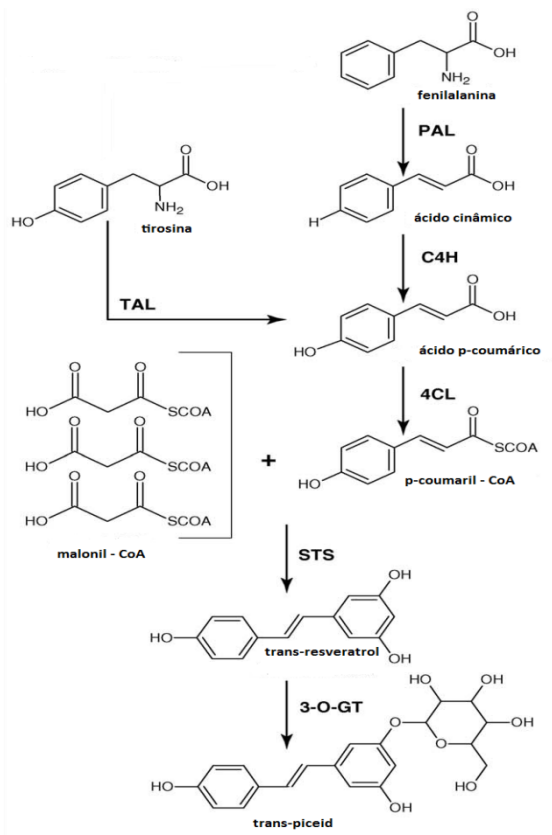


Figura 6. Via biossintética do trans-Resv e piceid.

Obter trans-Resv através dos precursores L-fenilalanina e L-tirosina, parece ser uma estratégia promissora em termos de custo. A transformação de leveduras oleaginosas *Yarrowia lipolytica* (ATCC 20362), com os genes que codificam para a via metabólica de síntese de Resv, foi realizada com sucesso. Os melhores resultados com este tipo de estratégia foram alcançados, com a introdução dos genes PAL e TAL obtidos da planta *Rhodotorula glutinis*, a 4CL foi obtido de *Streptomyces coelicolor* e a enzima STS era de *Vitis sp.* esta junção originou uma produção de 1,46 mg/L (Lixuan Lisa Huang, 2009). Foi também introduzida em outros microrganismos toda a via metabólica, assim como, *Saccharomyces cerevisiae* (CEN.PK113-5), *Lactococcus lactis* (FSAO-VST), *Aspergillus Níger* (FGSC A913) and *Aspergillus oryzae* (MG1363). Esta estratégia foi também testada em *E.Coli* (BL21), no entanto os níveis de expressão das enzimas TAL e PAL permanecia residual, logo tal facto reproduzia-se na baixa produção de Resv (Vannelli et al., 2007; Xue et al., 2007).

Os resultados da segunda estratégia citada (introdução de genes específicos 4CL e STS), têm sido melhores. A primeira estirpe a ser testada com este tipo de condições foi de *Saccharomyces cerevisiae* (FY23), com esta conseguiram-se obter concentrações baixas de Resv, 1,45 µg/L (Becker et al., 2003). Noutra estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* (WAT11), desta vez os genes foram introduzidos de forma a obter uma proteína de fusão, foram obtidos 1 mg/L de trans-Resv, ficando demonstrado que a utilização de proteínas de fusão para esta produção específica em leveduras é bastante favorável devido localização espacial das enzimas beneficiar as reacções envolvidas (Zhang et al., 2006). O aumento da produção de malonil-CoA, com o objectivo de aumentar a produção de trans-Resv também já foi testado e conseguiram-se a 3,6 mg/L, este trabalho deu origem a uma patente (Katz, 2006). A *Saccharomyces cerevisiae* (CEN.PK113-3b) e *E. coli* BL21 foram transformadas com 4CL de tabaco e STS de videira, conseguindo-se produções de 5,8 e 16 mg/L respectivamente (Beekwilder et al., 2006). Os melhores resultados obtidos com *E. coli* foram ambos obtidos com a estirpe JM109 transformados com 4CL de *Arabidopsis thaliana* e STS de *Arachis hypogea*, estes obtiveram resultados de 100mg/L com (Watts et al., 2006) e 171 mg/L quando transformados com 4CL de *Lithospermum erythrorhizon* e STS de *Arachis hypogea* (Katsuyama et al., 2007).

A produção em microrganismos requer muito trabalho de optimização; está dependente de factores como a estirpe e sistema de expressão utilizado, da origem primária dos genes utilizados para a transformação, o plasmídeo, entre outros parâmetros. Os resultados são ainda relativamente baixos, no entanto as possibilidades de optimização, posicionam o recurso aos microrganismos para a produção de trans-Resv, como uma alternativa a ter em conta para a produção em larga escala.

1.6– RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RESVERATROL

Com vista a identificar a presença de Resv e quantifica-lo em solução têm sido desenvolvidas e optimizadas várias técnicas. De forma a aumentar a sensibilidade, selectividade e a fiabilidade dos métodos de quantificação das amostras, assim como bebidas, alimentos, plasma sanguíneo e extractos vegetais (Dominguez et al., 2001; Juan et al., 2010; Zotou e Frangi, 2008) que contêm Resv, são utilizados processos de extracção ou clarificação das amostras.

1.6.1 – EXTRACÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO

Os processos extractivos têm como principal objectivo diminuir a quantidade de interferentes presentes nas amostras. A extracção liquido-liquido (ELL) baseia-se na utilização de solventes orgânicos e a separação de duas fases, uma orgânica e outra aquosa, procedendo-se à recolha da fase que contém os compostos pretendidos. Seguidamente é feita a evaporação do solvente e a reconstituição da amostra para quantificação. Os solventes orgânicos usados neste tipo de extracção, são usualmente o acetato de etilo, éter dietílico, n-hexano, acetona, entre outros (Dominguez et al., 2001).

1.6.2 – EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extracção em fase sólida (EFS) pode ser utilizada isoladamente, servindo como processo extractivo único, ou em paralelo com a extracção liquido-liquido, com o objectivo de diminuir os interferentes da amostra. Usualmente a EFS, utiliza mini-colunas e o procedimento baseia-se em cromatografia de troca catiónica, sendo necessários passos de activação das mini-colunas, tratamento da amostra, lavagem e eluição da amostra. A EFS utiliza à semelhança da ELL, solventes orgânicos, que depois de eluídos com a amostra, são evaporados e a amostra reconstituída em solvente adequado à quantificação.

A escolha do processo de extracção depende da sensibilidade requerida para cada tipo de análise, da complexidade biológica e química da matriz e ainda do processo a utilizar para a detecção (Vinas et al., 2008) O tipo de extracção mais utilizada actualmente é a extracção em fase sólida, a sua escolha deve-se a numerosas vantagens tais como, maior selectividade, em alguns casos maior rapidez de execução e principalmente a facilidade de automação do processo (Dominguez et al., 2001).

1.6.3 – PURIFICAÇÃO DE RESVERATROL

No que diz respeito à purificação do resveratrol, existem poucas referências, no entanto o trabalho de Gu e co-autores de 2006, consegue a separação do Resv a partir de extractos de plantas. Neste trabalho foi utilizada cromatografia baseada na adsorção do

Resv à matriz da coluna por pontes de hidrogénio, utilizando uma coluna Superose 12 HR 10/30 (GE healthcare®). Este processo permite o isolamento e purificação do Resv a partir de matrizes complexas, de forma simples e sem utilização de processos extractivos, permitindo assim a quantificação do Resv sem manipulações posteriores à purificação (Gu et al., 2006).

1.6.4 - QUANTIFICAÇÃO DE RESVERATROL

Na quantificação do resveratrol é frequentemente utilizada HPLC (High-performance liquid chromatography) recorrendo a colunas de fase reversa C18 com detector de UV acoplado, PDA (Photo-diode array). Esta técnica permite a distinção entre as duas isoformas, baseando-se nas suas absorvâncias máximas, a absorção máxima no espectro de UV ocorre para o trans- por volta dos 306 nm enquanto para a forma cis- ronda os 288 nm. No entanto técnicas como espectrometria de massa, fluorimetria, e a utilização de detectores electroquímicos acoplados ao HPLC, aumentam consideravelmente a sensibilidade, e diminuem a quantidade de amostra necessária (Pineiro et al., 2006). Para além do HPLC, a Cromatografia Gasosa (CG) e Electroforese Capilar, têm também sido utilizados na separação, identificação e quantificação do Resv (Ren et al., 2007). Recentemente Camont L. et al, 2009 propuseram um método de quantificação de Resv (cis- e trans-) em soluções aquosas, através de uma simples quantificação espectrofotométrica, mais rápida e menos dispendiosa. A técnica descrita recorre a células de quartzo com 0,2 cm de percurso óptico, este é menor do que o normalmente utilizado (1cm), devido ao facto de o Resv ter uma absortividade molar maior que os compostos geralmente quantificados espectrofotometricamente, cerca de $30335\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

CAPITULO II – OBJETIVOS

2 - OBJECTIVOS

O presente estudo teve como objectivo global a produção de Resv em microrganismos recombinantes, testando diferentes meios de fermentação e a sua utilização como possível inibidor da urease de *Helicobacter pylori*.

Desta forma os objectivos específicos deste trabalho foram:

- Transformação das células de *E. coli*, com o plasmídeo pAC-4CL-STS.
- Produzir Resv a partir da estirpe BL21 de *E. coli* com o plasmídeo pAC-4CL-STS.
- Testar e estabelecer uma técnica de extracção e purificação de Resv a partir de meios de fermentação.
- Quantificar o Resv produzido.
- Testar o crescimento de *Helicobacter pylori* em meio líquido em diferentes condições.
- Estabelecer e otimizar a coloração de Fishbein para urease de *Helicobacter pylori*.
- Estudar a inibição da urease de *Helicobacter pylori* crescida em meio líquido, com Resv comercial e obtido através de *E. coli* recombinante.

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

Ao longo do trabalho experimental foram usados diversos produtos químicos, que se apresentam na tabela 4, com os respectivos graus de pureza e fornecedores.

Tabela 4. Lista de reagentes com grau de pureza e fornecedor.

<u>Reagentes</u>	<u>Pureza %</u>	<u>Fornecedor</u>
Acetato de etilo	Analítico	<i>J.T.Baker</i>
Acetonitrilo	Analítico	<i>Merk</i>
Ácido Acético	Analítico	<i>BHD</i>
Ácido acetohidroxâmico	99	<i>Sigma</i>
Ácido p-coumárico	≥99	<i>Sigma</i>
Cloranfenicol	99	<i>Fluka</i>
Cloreto de amónia	≥99	<i>Sigma</i>
Cloreto de amónia (NH₄Cl)	-	<i>Sigma</i>
Cloreto de sódio (NaCl)	-	<i>Panreac</i>
Diclorometano	Analítico	<i>Merk</i>
Etanol	-	<i>Carlo Erba</i>
Éter dietílico	Analítico	<i>Merk</i>
Extracto de levedura	-	<i>Sigma</i>
Fenol	≥99	<i>Sigma</i>
Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄)	-	<i>Sigma</i>
Glicerol	86	<i>Riede-de-Hen</i>
Hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄)	-	<i>Panreac</i>

<u>Reagentes</u>	<u>Pureza %</u>	<u>Fornecedor</u>
IPTG	99	<i>Acros</i>
Luria Bertani (LB)	-	<i>Sigma</i>
NBT (Nitro Blue Tetrazolium)	98	<i>Sigma</i>
Nitroprussido de sódio	-	-
Resv	Analítico	<i>Extrasynthese</i>
Triptona	-	<i>Himedia</i>
Ureia	-	<i>Vaz Pereira</i>

Ao longo do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados os equipamentos, apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Lista de aparelhos utilizados.

<u>Designação</u>	<u>Marca</u>	<u>Modelo</u>
Autoclave	Uniclave	88
Balança analítica	Mettler	Toledo AG 204
Balança analítica	Sartorius	CP225P
Centrifuga refrigerada eppendorfs	Hermle	Z323K
Centrifuga refrigerada	Sartorius	Sigma 3-18K
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech	Ultrospec U/V 3000
Estufa	Selecta P	Incubig
Incubador orbital	Aralab	160E, série 8500
Incubador orbital	Aralab	Agitorb 200
HPLC	Waters	-

3.2 - PRODUÇÃO DE RESVERATROL

3.2.1 – ESTIRPE E VECTOR

Foi utilizado durante o trabalho experimental o microrganismo *Escherichia coli* BL21, com o plasmídeo pAC-4CL-STS, cedido por Jules Beekwilder, *Plant Research International*, Holanda. Este é um plasmídeo *low copy*, que codifica para a expressão de 4CL e STS.

3.2.2 – BANCO DE CÉLULAS

As células foram transformadas com o plasmídeo pAC-4CL-STS por electroporação, fazendo-se posteriormente o crescimento em meio líquido LB até uma densidade óptica (DO) de 0,6. Procedeu-se então à distribuição das células por tubos criogénicos estéreis com 30 % de glicerol, sendo estes armazenados a - 80 °C. Todas as fermentações foram iniciadas com recurso a este banco de células.

3.2.3– MEIOS DE FERMENTAÇÕES

Tabela 6: composição dos meios de fermentação utilizados no trabalho experimental.

		Composição								
Classificação	Nome	Extracto de levedura (g/L)	Triptona (g/L)	Glicerol (%)	NaCl (g/L)	MgCl ₂ (mM)	NH ₄ Cl (g/L)	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	CaCl ₂ (mM)
Complexo	2xYT	10	16	-	5	-	-	-	-	-
	2xYT 1 % glicerol	10	16	1	5	-	-	-	-	-
	SOB*	5	20	-	0,5	1	-	-	-	-
	TB	24	12	2			-	-		-
	LB**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Definido	M9			1	0,075	2	0,15	0,9		0,1
Semi-definido	M9 modificado	1,25		1	0,075	2	0,15	0,9		0,1

*O meio SOB é suplementado com sais de potássio. ** Luria bertani (LB) foi utilizado o meio comercial.

Todos os meios foram suplementados com 30µg/mL de cloranfenicol.

3.2.4 – CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Após o crescimento em placa durante 64h a 37 °C em meio LB suplementado com 30µg/mL de cloranfenicol, uma colónia isolada era retirada para iniciar a cultura em meio líquido. A pré-fermentação decorreu no mesmo meio da posterior fermentação, até uma DO de aproximadamente 2.6(era retirado o equivalente a perfazer uma diluição de 1:100 na fermentação). As fermentações decorreram com um volume de 50 mL em erlenmyer de 250 mL. A fermentação inicia-se a 37°C, 250 rpm, até uma D.O de 0,3-0,4; a fermentação é então suplementada com 0,1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG), e 5mM de ácido p-coumárico, a partir deste ponto os erlenmyers são transferidos para orbital refrigerado a uma temperatura de 28°C e 250 rpm. Ao longo do tempo de fermentação foram recolhidas alíquotas de 100µL para o acompanhamento do crescimento (DO) e de 2 mL para a quantificação de Resv produzido.

3.3 - RECUPERAÇÃO DO RESVERATROL

A recuperação foi feita primariamente pela centrifugação das amostras retiradas ao longo das fermentações, estas amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos, sendo finalmente recolhido o sobrenadante para a realização da posterior técnica de extracção.

3.3.1 – EXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

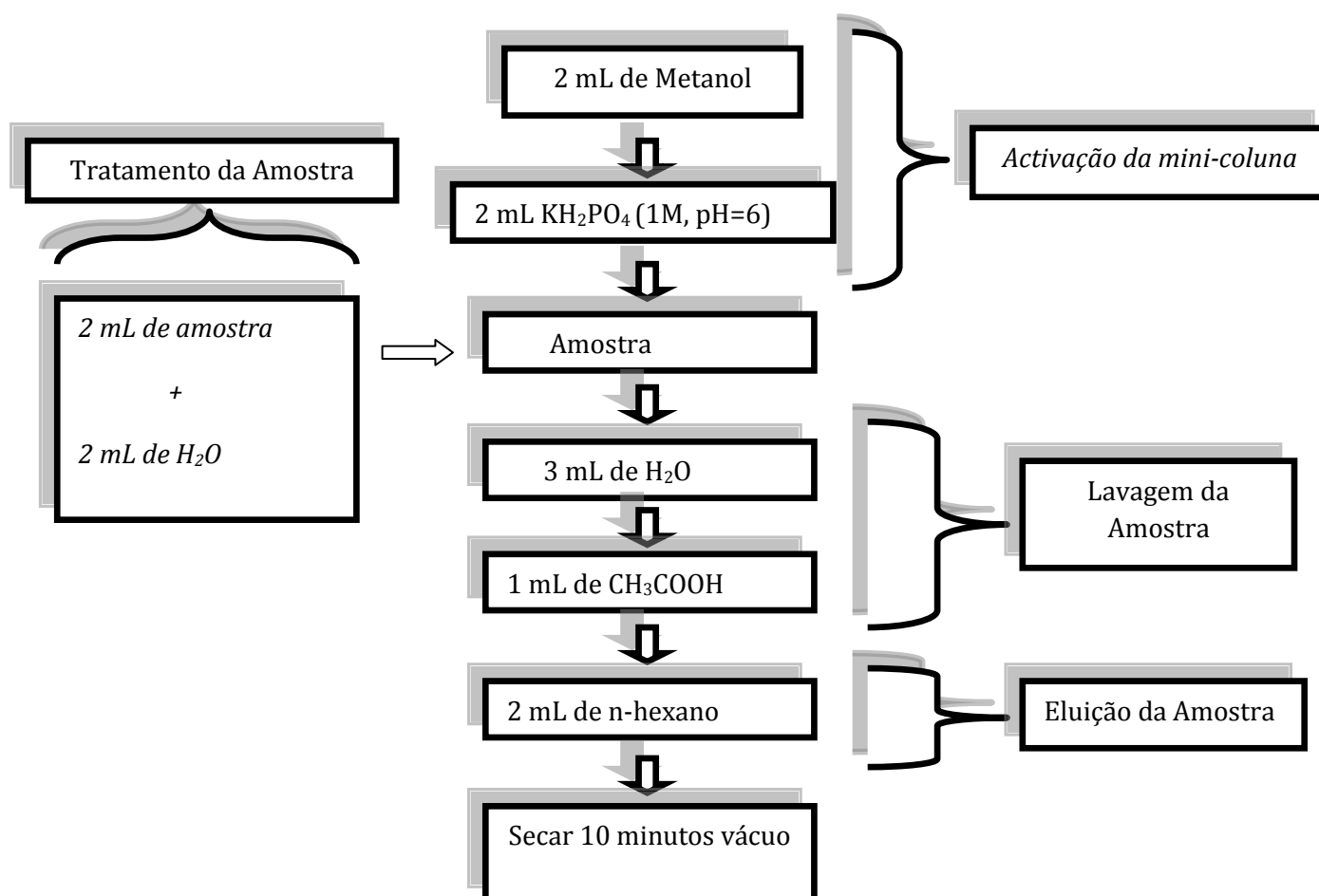
Com o objectivo de recuperar o Resv produzido pelas bactérias, foi testada a extracção liquido-liquido, com solventes orgânicos como o acetato de etilo, éter dietílico e diclorometano. Foram testados diferentes tempos de extracção e volume de solvente orgânico, respectivamente, 2,5; 5; 10 minutos e 0,5; 1; 2 mL. As ELLs foram feitas pela mistura da amostra com o solvente orgânico, seguida de um período de homogeneização

em rolo. Após a recolha da fracção orgânica da solução, esta foi evaporada com azoto. Depois de totalmente seca, a amostra foi reconstituída fase móvel (66% água, 39,4% acetonitrilo, 0,1% ácido acético) para posterior injeção no HPLC ou análise por espectrofotometria.

3.3.2 – EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extracção em fase sólida foi realizada em mini-colunas bondelut™, estas são colunas que se baseiam na separação de troca catiónica, este tipo de extracção, ocorre pela troca de iões da resina da matriz da mini-coluna por iões da solução que se pretende extrair.

A EFS foi feita em mini-colunas bondelut™, segundo o protocolo:



3.3.3 - CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

A Cromatografia foi realizada em coluna Superose 12 prep grad (\pm 40 mL) (GE healthcare®). Com uma estratégia de três passos de eluição isocrática, com eluentes etanol e ácido acético em diferentes proporções (10/10; 20/20; 30/30 - %(v/v)), a um fluxo caudal de 1,0 mL/min. Foram recolhidas as fracções correspondentes a cada pico, para análise posterior. A coluna depois de utilizada, era lavada com dois volumes de coluna em NaOH 0,05 M, e acondicionada em etanol a 20 %.

As percentagens de recuperação foram calculadas com recurso á seguinte formula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração real (após extracção)}}{\text{Concentração teórica (antes da extracção)}} \times 100$$

3.3.4 – QUANTIFICAÇÃO

3.3.4.1- HPLC

A análise quantitativa do Resv produzido foi realizada por HPLC com fotodiodo acoplado, com loop de 20 μ L. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 (X-Terra columns®), a estratégia de eluição foi isocrática com fase móvel, 66% água, 39,4% acetonitrilo, 0,1% ácido acético, a um fluxo caudal de 0,5 mL/min. Foi realizada a quantificação, com método já validado pelo grupo de trabalho, a partir da área do pico.

Todas as quantificações realizadas por HPLC foram calculadas com recurso à curva de calibração da figura7.

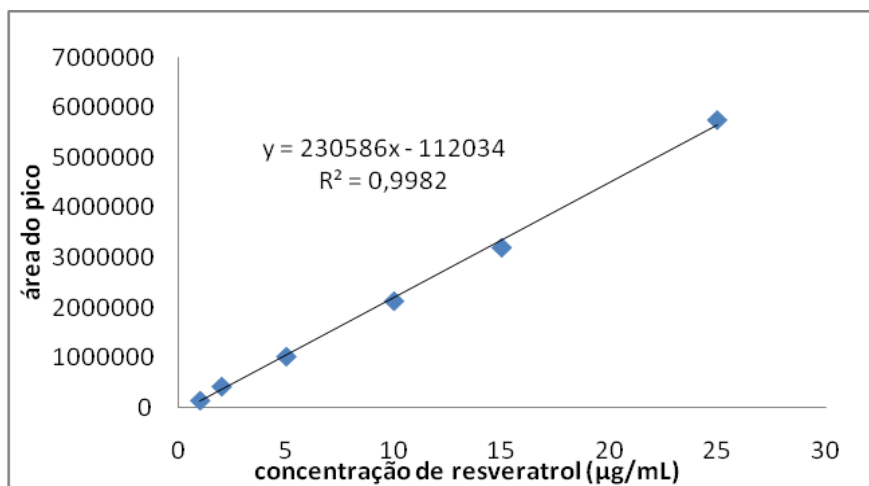


Figura 7. curva de calibração de resveratrol em fase móvel (66% água, 39,4% acetonitrilo, 0,1% ácido acético), curva obtida por HPLC-PDA.

3.3.4.2 - Espectrofotometria

As amostras depois de devidamente extraídas/clarificadas eram quantificadas a 304 nm com uma célula de quartzo 0,2 cm. Todas as quantificações realizadas por espectrofotometria foram realizadas com recurso à curva de calibração apresentada na figura 8.

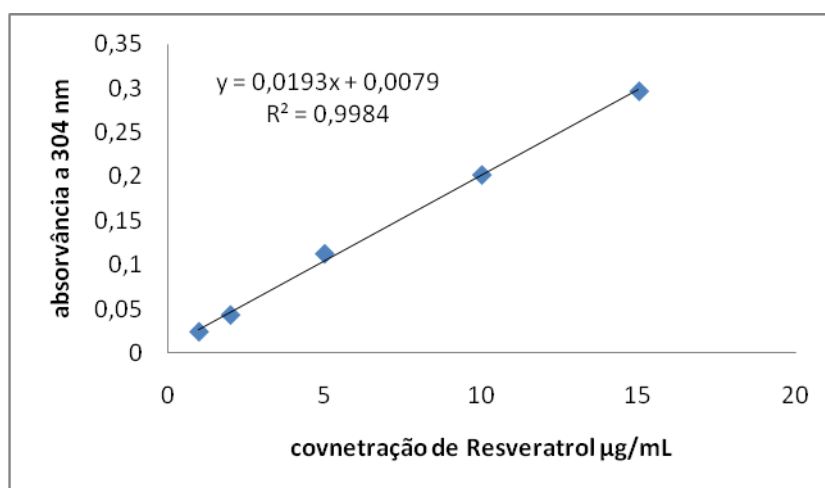


Figura 8. Curva de calibração de resveratrol dissolvido em 66% água, 39,4% acetonitrilo, 0,1% ácido acético.

3.4 – CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI* EM MEIO LÍQUIDO

Com o objectivo de estudar o crescimento de *Helicobacter pylori* (ATCC26695) em meio líquido, foram testados os seguintes meios: Mueller-Hinton broth (MHB), Brain heart Infusion broth (BHI), LB e DMEM. todos os meios foram suplementados com 10 % de soro de cavalo inactivado por calor. Como recipientes para a cultura usaram-se erlenmyer de 50 mL, frasco de culturas de células e caixas de petri de 9mm de diâmetro. O microrganismo foi cultivado em placas HP selectivas, durante 24 horas sendo passadas para placas de MHA com 10% de sangue de cavalo desfibrilhado, e deixadas crescer neste suporte durante 48 horas, após estas eram recolhidas de forma a todos os meios iniciarem com aproximadamente o mesmo inóculo. O crescimento quer em placa quer em meio líquido foi realizado a 37°C num ambiente microaerófilo.

3.5 – EXTRACÇÃO DE UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

A urease de *Helicobacter pylori* foi extraída segundo o protocolo descrito por S. Matsubara et al (2003). Esta extracção baseia-se na recolha das células de HP, a partir de meio líquido. Os microrganismos são lisados por sonicação (sonda), ciclo 1, amplitude 100%, durante 1 minuto, adicionando-se ao lisado um cocktail de inibidores de proteases. No final do protocolo é realizada uma centrifugação a 15000G, durante 20 minutos e recolhido o sobrenadante.

3.6 – DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

A actividade foi calculada através da quantificação do produto formado (amónia) com recurso ao teste do indofenol. Num eppendorf® com 10µL de tampão fosfato (PBS) e 15µL de água destilada, a estes são adicionados 25µL da solução de urease obtida no ponto anterior e é pré incubada a 37°C durante 10 minutos. A reacção inicia-se pela adição de 25 µL de uma solução de 25 mM de ureia incuba-se a 37°C e termina-se a reacção após 30 minutos por colocação dos tubos em gelo.

A 20 μL da solução obtida anteriormente foram adicionados 980 μL de água destilada, 100 μL de reagente de fenol-nitroprusside e 200 μL de reagente hipoclorito. Os tubos são imediatamente fechados, invertidos 2 a 3 vezes e colocados num banho a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. As medições foram feitas a 636 nm em células de plástico de 1 cm de percurso óptico. Os reagentes de fenol-nitroprusside e de hipoclorito foram preparados de acordo com Witte e Medina-Escobar, 2001. Para a quantificação da amónia utilizou-se a curva de calibração de cloreto de amónia (figura 9), permitindo quantificar a amónia produzida.

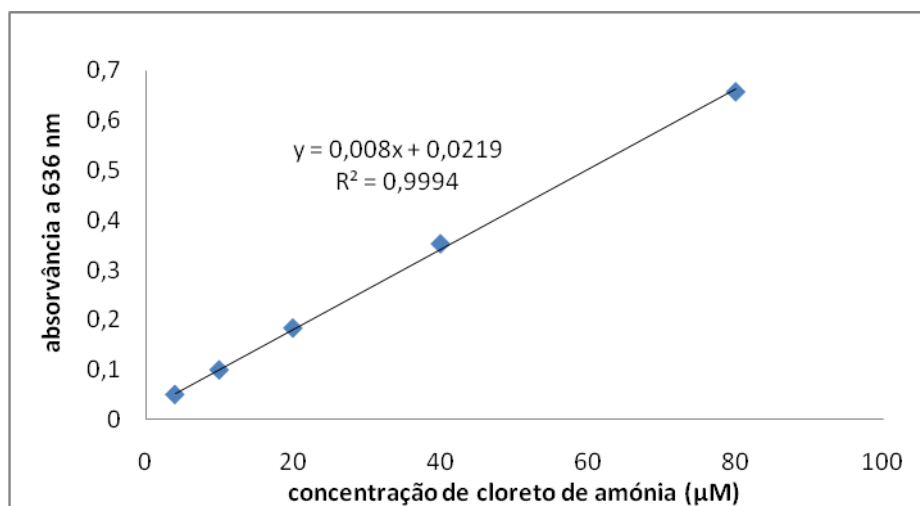


Figura 9- Curva de calibração de cloreto de amónia.

3.7 – ENSAIO DE INIBIÇÃO DA UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

O cálculo da inibição de urease de HP foi obtido através do protocolo enunciado acima, no entanto no ponto em que se adicionam 15 μL água destilada substitui-se por Resv em diferentes concentrações finas: 400; 200; 100; 50;25; 12,5; 6,25;1;0,1;0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A percentagem de inibição foi calculada com recurso à seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = (\text{absorvância do controlo} - \text{absorvância da amostra}) / \text{absorvância do controlo} \times 100$$

A absorvância do controlo corresponde à absorvância do ensaio em que foi utilizada água (solvente do Resv, nestes ensaios). Todas as concentrações de Resv foram comparadas com um inibidor específico da urease o ácido acetohidroxâmico (AHA).

3.8 – ELECTROFORESE DE PROTEÍNAS E COLORAÇÃO DE FISHBEIN

Com os extractos obtidos no ponto 4.4 foram realizadas electroforeses não desnaturantes de proteínas e usada a coloração específica de Fishbein, que permite identificar o local onde existe uma variação de pH, logo o local onde se dá a produção de amónia, o que permite detectar “in gel” a actividade da urease. A preparação dos géis e da coloração foi realizada segundo o protocolo de Witte and Medina-Escobar, 2001, com uma alteração, os géis apenas eram corados durante 15 minutos. Os géis foram também corados com recurso à coloração de Comassie, com o objectivo de identificar o padrão proteico presente nas amostras.

CAPITULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- PRODUÇÃO DE RESVERATROL

Aquando da construção do banco de células foi realizada uma electroforese com o objectivo de verificar se o plasmídeo pACYC-DUET1 (novagen) com genes da 4CL e STS tinha sido correctamente inserido. Este plasmídeo tem 6745pb. Na figura 10 está representada uma electroforese onde se pode verificar que o plasmídeo tem o peso descrito, e que foi correctamente inserido nas células de *E. coli*.

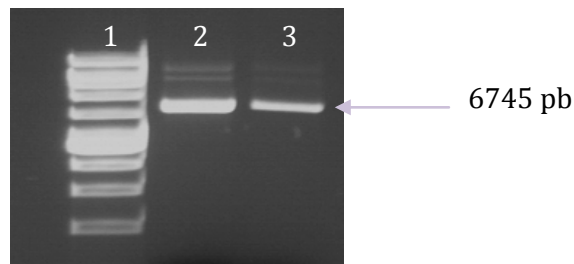


Figura 10. Electroforese de ácido nucleicos do lisado de *E.coli* transformadas com o plasmídeo pAC-4CL-STS. Poço 1- marcador de pesos moleculares; Poço 2- lisado de *E. coli* ; Poço 3- plasmídeo pAC-4CL-STS.

Pela análise da figura pode ver-se que o plasmídeo foi correctamente inserido aquando da construção do banco de células, isto porque a banda visualizada no poço 3 (correspondente ao plasmídeo pAC-4CL-STS), tem uma migração no gel, muito semelhante à banda mais representativa no perfil de ácidos nucleicos do lisado, sendo essa banda do plasmídeo inserido nas células (poço 2), apresentando ambas um peso molecular a rondar os 6745 pb.

Todas as fermentações realizadas foram iniciadas com recurso às células deste banco.

Foram então testados sete meios de fermentação descritos no ponto 3.2.3 da secção de materiais e métodos, com o objectivo de identificar o meio óptimo para a produção de resveratrol. Em todas a fermentações o crescimento foi iniciado a 37 °C, no entanto a temperatura da fermentação era alterada para 28 °C no momento da indução com IPTG e da introdução do substrato, o ácido p-coumárico. Os meios apresentaram diferentes cinéticas de crescimento visíveis na figura 11.

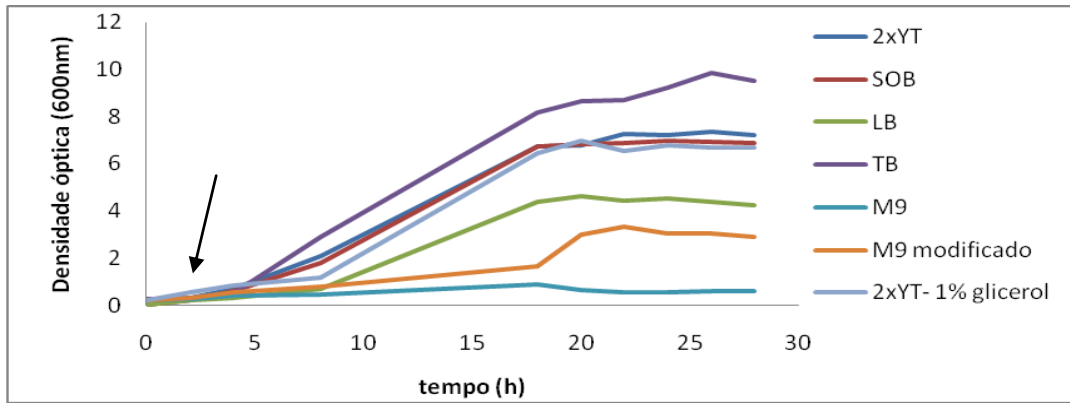


Figura 11. Curvas de crescimento de *E. coli* nos meios de fermentação testados para a produção de Resv. A seta indica o tempo de indução e de introdução de substrato, esta adição é acompanhada de mudança de temperatura de 37°C para 28°C.

Analisando a figura 11 é visível uma fase de adaptação de cerca de 5 horas para a maioria dos meios, no entanto no caso do meio M9 modificado esta parece acontecer mais tarde, quase as 20 horas de fermentação. A fase exponencial ocorre até cerca das 18-20 horas de fermentação para todos os meios, excepto o M9 modificado, a partir desse ponto entram em fase de latência.

Em relação à produção de Resv nos meios testados, está descrito na literatura que a produção de resveratrol ocorre durante a fase exponencial (Beekwilder et al., 2006), foram então recolhidas amostras em diferentes tempos de fermentação (preferencialmente durante a fase exponencial), nos diferentes meios. Estes foram extraídos com acetato de etilo e injectados no HPLC (figura 12), com o objectivo de quantificar o trans-Resv produzido.

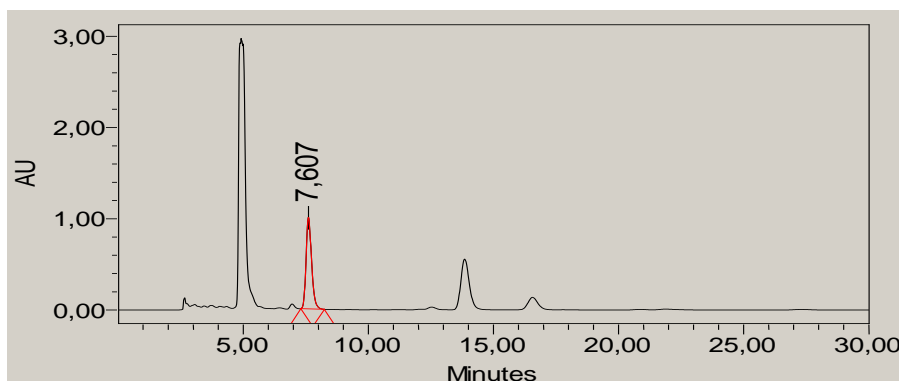


Figura 12. Cromatograma de HPLC obtido a 304 nm, de meio SOB, às 20 horas de fermentação.

Em todos os meios estudados o perfil de eluição dos compostos era idêntico, observando-se um pico por volta dos 7 minutos, que não existia nos brancos. Deste facto é exemplo o pico eluído aos 7,607 minutos na figura 12.

Este pico foi integrado, pretendendo visualizar o espectro do composto eluído aos 7,607 minutos (figura 13), com vista a confirmar a produção de resveratrol.

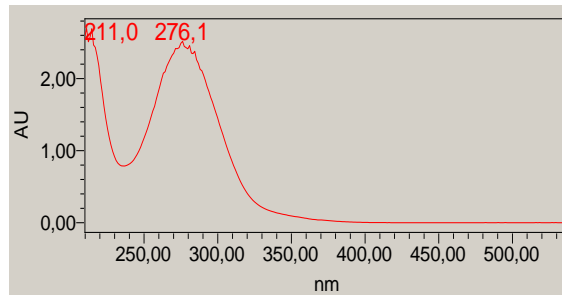


Figura 13. Espectro de absorção obtido com o detector PDA acoplado ao HPLC.

Pela análise da figura, pode concluir-se que o composto produzido tem um espectro de absorção muito semelhante ao do Resveratrol, diferindo na absorvância máxima, visto o resveratrol ter uma absorvância máxima a 304 nm.

Todos os meios de fermentação às 20 horas, apresentavam um composto a ser eluído no tempo de retenção característico do Resv, no entanto o espectro de absorção era distinto, tendo um máximo de absorção a 276 nm (figura 13). Poderá haver várias hipóteses para explicar este facto:

- O Resv estar a ser produzido na sua forma conjugada, tanto com grupos sulfato, metil, ou glicosilado, por vias não enzimáticas. Tal só seria possível ser elucidado contendo a amostra no seu estado puro, e fazendo depois um espectro de massas.
- Estando o Resv a ser produzido na sua forma activa - *trans*, uma possibilidade é este ter sido interiorizado pelas células, que o utilizariam com nutriente, este facto resultaria num curto período em solução o que dificultaria a quantificação.
- A expressão proteica pode não estar a ser feita da forma correcta, tendo como resultado, uma errada construção do produto final. A sequenciação do plasmídeo,

seria uma forma de saber se as regiões sequenciadoras de STS e 4-CL, estão correctamente inseridas.

Às 20 horas de fermentação nos meios 2xYT e 2xYT -1% glicerol extraídos com acetato de etilo e injectados no HPLC, registou-se produção em níveis residuais a rondar os 0,3 µg/mL, no entanto seriam necessários mais ensaios para confirmar este facto.

4.2 - EXTRACÇÃO DE RESVERATROL A PARTIR DE MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Tomando como ponto de partida a produção de resveratrol em meios de fermentação, seria necessário encontrar um método eficaz, simples e económico de extrair o resveratrol de meios de fermentação. Desta forma foi otimizada a extracção líquido-líquido.

4.2.1- SELECÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO PARA A EXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Com o objectivo de extrair Resveratrol de meios de fermentação, foram inicialmente testadas extracções em meio.

Testaram-se inicialmente diferentes solventes orgânicos, com o intuito de definir o solvente que apresentava a melhor percentagem de recuperação:

- Acetato de Etilo
- Éter dietílico
- Diclorometano: Acetato de Etilo (50:50)

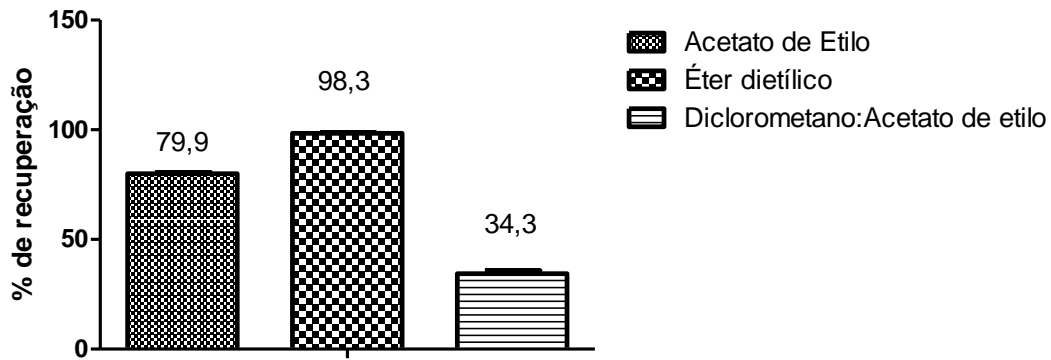


Figura 14. Gráfico representativo da percentagem de recuperação das ELL com diferentes solventes orgânicos. As extracções foram levadas a cabo durante 5 minutos com o dobro do volume da amostra. Foram extraídas soluções aquosas

Como se pode ver na figura 14 a melhor percentagem de recuperação das extracções liquido-liquido foi a do éter dietílico com 98,3%, seguida do acetato de etilo com 79,9%.

Na figura 15 pode ver-se o cromatograma de um padrão de 25µg/mL e o seu espectro de absorção, esta injeção foi realizada para se saber qual o tempo de retenção do resveratrol e o seu espectro de absorção.

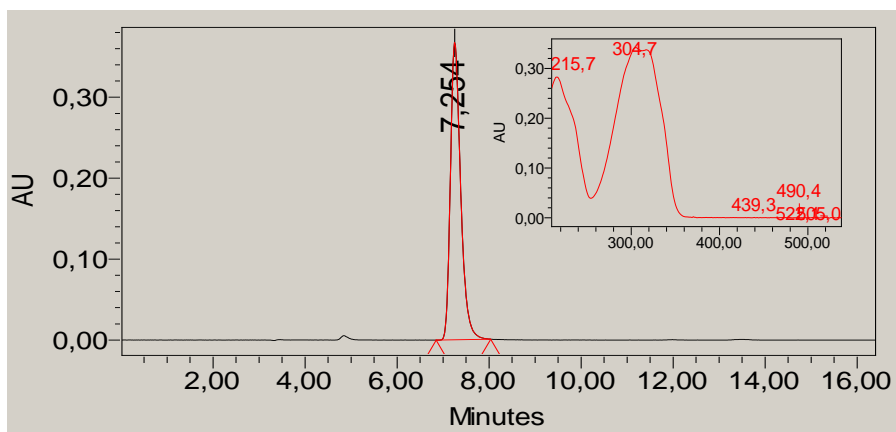
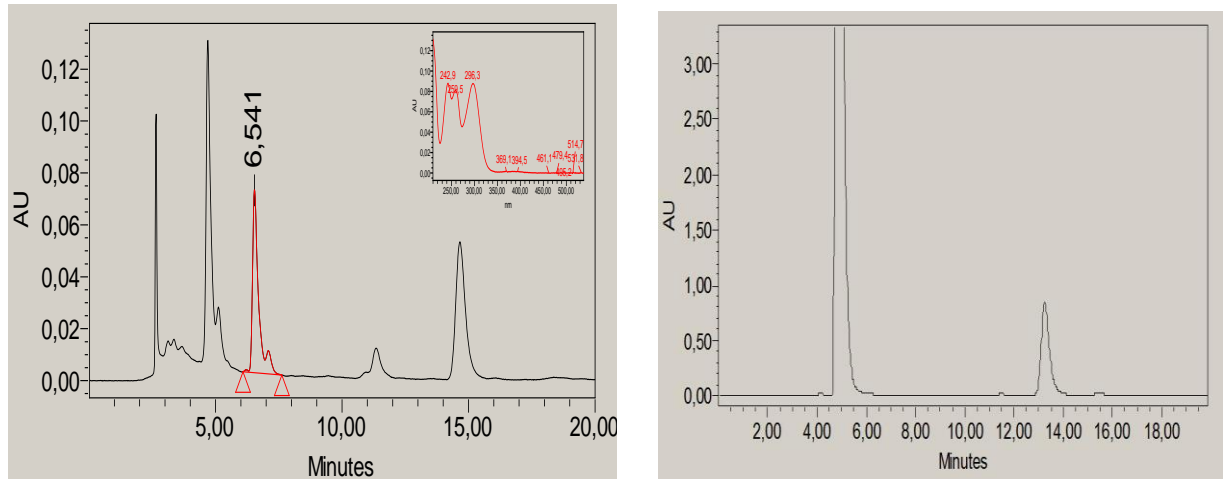


Figura 15. Cromatograma de um padrão de 25µg/mL de Resv, e o seu espectro de absorção.

Pode verificar-se que o resveratrol elui sensivelmente aos 7 minutos, podendo existir alguma variação. O resveratrol apresenta um espectro característico tendo uma absorção máxima aos 304 nm.

Com o objectivo de verificar se os componentes do meio de fermentação não iriam interferir com a quantificação do resveratrol, realizou-se uma fermentação nas mesmas condições de produção mas sem a indução da produção, após centrifugar e extrair o meio com os diferentes solventes, as amostras foram injectadas no HPLC (figura 16).



a)

b)

Figura 16. Cromatogramas das extracções com diferentes solventes. a) ELL com éter dietílico e espectro de absorção do composto eluído aos 6,541 minutos; b) ELL com acetato de etilo. Cromatogramas obtidos a 304 nm.

Pela análise da figura 9 pode verificar-se que no tempo de retenção característico do Resv (aproximadamente 7 minutos), no cromatograma a), correspondente ao éter dietílico é eluído um composto que poderá interferir com a quantificação, no entanto com o acetato de etilo, cromatograma b), nenhum composto é eluído aos 7 minutos. Desta forma, a extracção líquido-líquido apenas pode ser realizada com o acetato de etilo, tendo em conta os solventes testados. Não foi testada a mistura de diclorometano e acetato de etilo por não ser rentável em termos de recuperação.

Testou-se também a extracção em fase sólida, no entanto também não é possível a utilização deste método para a extracção de Resv a partir de meios de fermentação, visto serem extraídos compostos com um tempo de retenção semelhantes ao do Resv, quando injectados no HPLC.

Foi então estabelecido que o acetato de etilo é um solvente adequado à extracção, visto que no tempo de retenção característico do Resv quando analisados por HPLC-PDA, não são eluídos composto susceptíveis de interferir com a quantificação.

4.2.2 – OPTIMIZAÇÃO DA EXTRACÇÃO COM ACETATO DE ETILO

Após a selecção do solvente orgânico óptimo para a extracção líquido-líquido, procedeu-se à optimização da extracção com acetato de etilo, onde foram testados três tempos (2,5; 5; 10 minutos) e três volumes diferentes de solvente (0,5; 1; 2 mL) (figura 17).

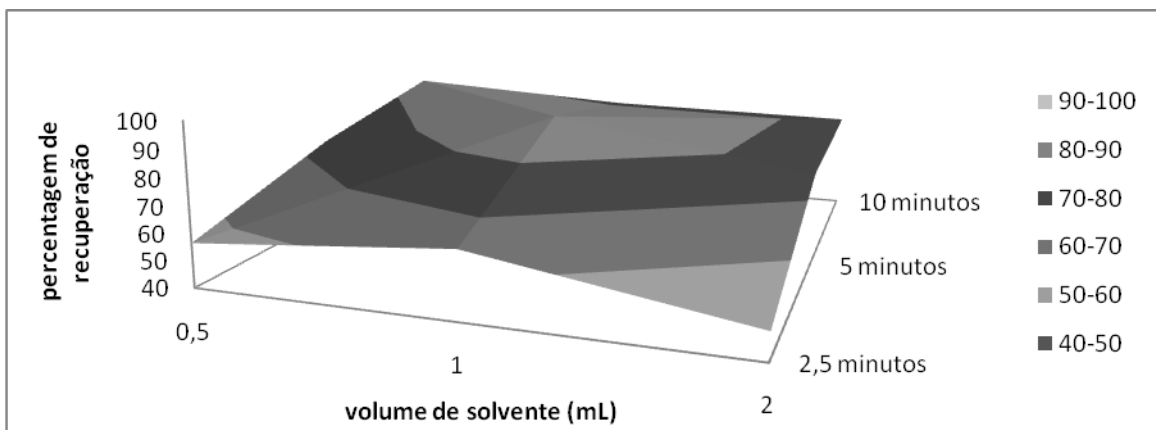


Figura 17. Gráfico de superfície referente a optimização da extracção de Resv em soluções aquosas. Todas as extracções foram realizadas com 1 mL de amostra.

Pela análise do gráfico, pode verificar-se, que as condições mais favoráveis para a extracção com acetato de etilo são: a extracção durante 5 minutos com um volume de solvente igual a 1 mL. Nestas condições consegue-se uma percentagem de recuperação de cerca de 90%. Estas condições foram utilizadas para a extracção de Resv de todos os meios de fermentação.

4.3 - QUANTIFICAÇÃO DE RESVERATROL

Com o objectivo de quantificar o resveratrol a partir de meios de fermentação de forma simples, eficaz e económica, foram testados dois métodos de quantificação, tanto a quantificação por HPLC quer por métodos espectrofotométricos. Para a quantificação, os meios testados foram fortificados com concentrações padrão de resveratrol, para garantir a presença de resveratrol, no momento da quantificação.

4.3.1- HPLC

O método de quantificação de Resv por HPLC-PDA com o método que estava optimizado para a análise de Resv em vinhos, pode ser também aplicado para meios de cultura bacteriana, conseguindo-se uma boa separação entre os interferentes e o Resv (figura 18).

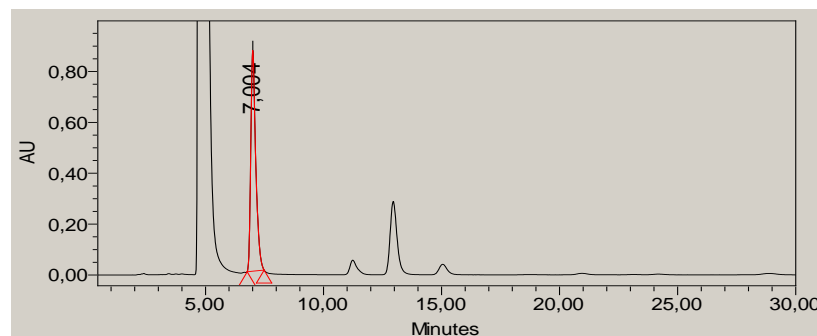


Figura 18. Cromatograma do meio 2xYT, fortificado com 1mg/L extraído com acetato de etilo e injectado no HPLC. Cromatograma obtido a 304 nm.

É visível na figura 18 a separação de todos os componentes presentes no meio de fermentação. Desta forma a quantificação de resveratrol por HPLC-PDA foi conseguida.

4.3.2- ESPECTROFOTOMETRIA

Com vista a conseguir-se uma quantificação eficaz, rápida e economicamente mais rentável do que a realizada no HPLC, foi testada a quantificação através do espectrofotómetro, com célula de 0,2 cm de percurso óptico (Camont et al., 2009). Para

isto era essencial não existirem contaminantes na amostra extraída do meio de fermentação que absorvessem ao comprimento de onda de 304 nm, de forma a não influenciarem positivamente a quantificação. No entanto tal não se veio a verificar, e executando a extracção com acetato de etilo, eram extraídos contaminantes, que interferiam com a quantificação espectrofotométrica a 304 nm (figura 19).

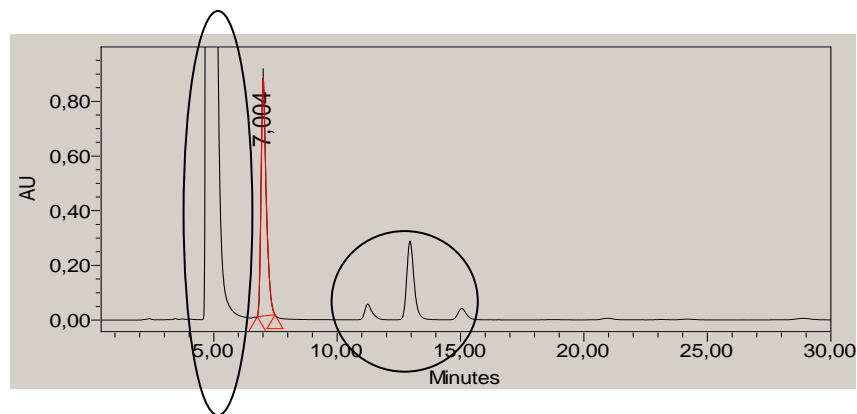


Figura 19. Cromatograma de meio 2x YT fortificado com 1 mg/L de resveratrol, extraído com acetato de etilo. Cromatograma obtido a 304 nm.

Como se pode verificar pela análise da figura 19, ao longo da corrida cromatográfica são eluídos para além do Resv, diversos composto que vão interferir na quantificação realizada no espectrofotómetro, a 304 nm. Nestas circunstâncias o que acontece é que a absorvância do padrão adicionado ao meio seja acrescida da absorvância dos interferentes, introduzindo um erro na quantificação do Resv presente na amostra.

Um dos possíveis interferentes, que poderia estar a ser extraído seria o ácido p-coumárico (substrato da reacção) que tem uma estrutura muito semelhante ao Resv, ou eventualmente estariam a ser extraídas proteínas provenientes do meio de cultura.

Tentou-se então elaborar um processo cromatográfico preparativo com o objectivo de fazer uma “clarificação” da amostra, de forma a eliminar a maioria dos interferentes, permitindo a quantificação através de espectrofotometria a 304 nm, já que esta quantificação não era possível após a extracção devido ao grande número de interferentes.

4.4 – CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Gu et al (2006) descreveram um processo cromatográfico com vista a purificar o trans-Resv de matrizes complexas, como plantas, recorrendo às propriedades adsorptivas das colunas Superose 12 HR 10/30 (GE healthcare®). Testou-se então a aplicação deste processo para a purificação do Resv a partir de meios de fermentação.

Foram desta forma fortificados, meios de fermentação com concentrações padrão de Resv, e passadas na coluna com uma estratégia de eluição por passos com concentrações crescentes de etanol e ácido acético, 10/10, 20/20, 30/30 % (V/V).

Este processo cromatográfico faz com que o resveratrol fique retardado na coluna, devido à adsorção por pontes de hidrogénio que este estabelece com a matriz cromatográfica, aquando da utilização da 1ª fase móvel (10/10), o Resv só é eluído quando se aumenta a proporção de ácido acético e etanol (20/20), como é visível na figura 20.

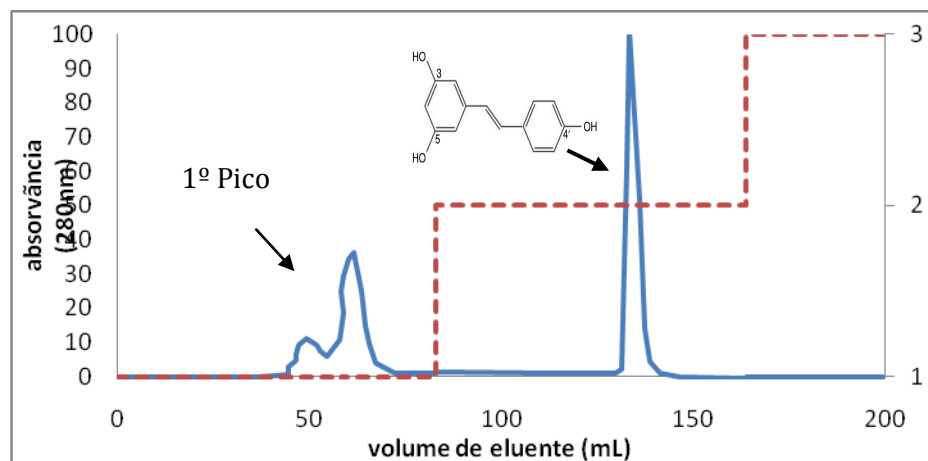


Figura 20. Cromatograma da purificação com a coluna superose 12. Meio 2xYT com crescimento fortificado com 50 µg/mL de Resv, sem ácido p-coumárico e IPTG . Os valores 1, 2 e 3 são relativos às proporções de etanol/ácido acético e correspondem a 10/10; 20/20; 30/30 % (V/V), respectivamente.

Pode verificar-se que o resveratrol só é eluído após a mudança de fase móvel, para 20/20% de etanol e ácido acético. Esta alteração, promove a desadsorção do resveratrol da coluna.

A adsorção é mediada por interações entre os electrões π presentes nos anéis aromáticos do resveratrol e a estrutura da matriz cromatográfica. Daí um aumento da concentração de ácido acético no eluente fazer com que a força destas interações diminua, permitindo assim a eluição do resveratrol.

Os resultados obtidos, visíveis na figura 20, são promissores, em relação à separação do resveratrol dos contaminantes presentes na cultura. Foi então suplementado um meio de fermentação com ácido p-coumárico na concentração final pretendida nas fermentações (5mM), por se suspeitar ser este o principal interferente extraído (aquando da realização das extracções com acetato de etilo), interferindo de forma determinante na quantificação espectrofotométrica.

Após a realização do ensaio (figura 21), verificaram-se diferenças significativas no perfil cromatográfico, do meio de fermentação, sendo visível o aumento considerável do 1º pico.

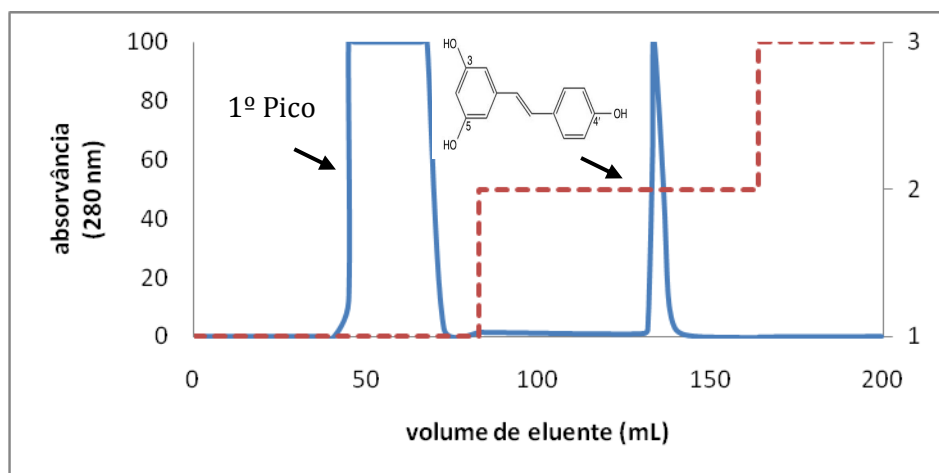


Figura 21. Cromatograma da purificação com a coluna superose 12. Meio 2xYT com crescimento fortificado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de Resv e 5 mM de ác. p-coumarico. Os valores 1;2 e 3 são relativos às proporções de etanol/ácido acético e correspondem a 10/10; 20/20; 30/30 % (V/V), respectivamente.

O ácido p-coumárico promove o aumento do 1º pico, dando a entender que elui com 10/10 % de etanol/ácido acético. O pico correspondente ao Resv manteve-se sem alterações consideráveis.

A injeção de uma mistura de Resv e ácido p-coumárico, revelou a separação destes dois compostos. Se por um lado o ácido p-coumárico é eluído no primeiro passo de eluição (10/10), ou seja não é retardado por qualquer tipo de interacções, que sejam promovidas pela matriz cromatográfica, por sua vez o Resv, só é eluído quando se aumenta a proporção de etanol/ácido acético, ficando mais retido que os demais compostos.

Seguidamente após a passagem da amostra pela coluna, foram realizados ensaios com o objectivo de comparar a quantificação por HPLC e espectrofotométrica, para averiguar se eram de facto eliminados os interferentes, que não permitiam até aqui a quantificação espectrofotométrica após a extracção líquido-líquido.

Por fim, foi aplicado na coluna cromatográfica meio 2xYT fortificado com 15 $\mu\text{g/mL}$ de trans-Resv, com crescimento e com todos os componentes necessários à produção, excepto o indutor (IPTG) (figura 22).

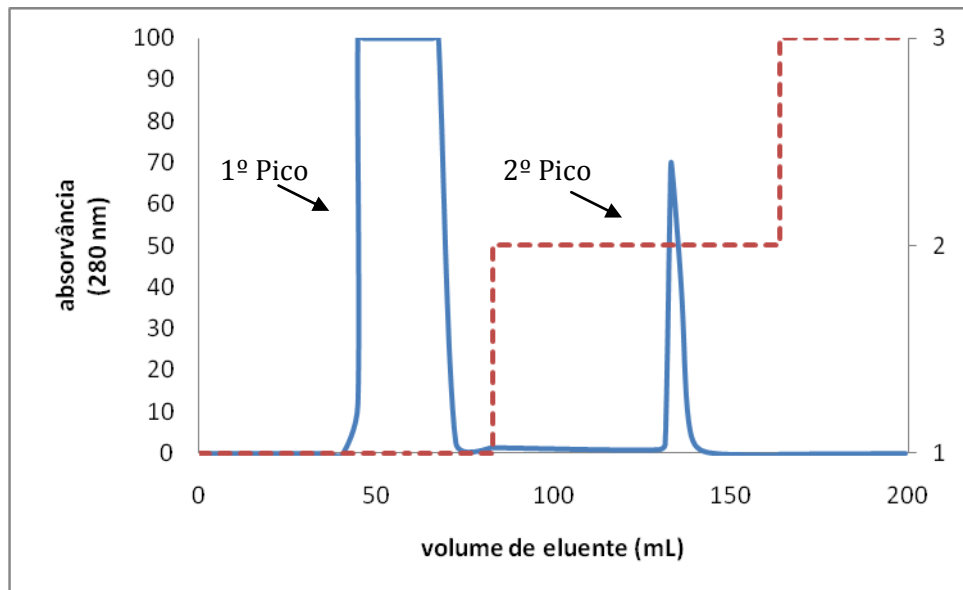


Figura 22. Cromatograma da purificação com a coluna superose 12. Meio 2xYT com crescimento fortificado com 15 $\mu\text{g/mL}$ de Resv e 5 mM de ác. p-coumarico. Os valores 1;2 e 3 são relativos às proporções de etanol/ácido acético e correspondem a 10/10; 20/20; 30/30 % (V/V), respectivamente.

No cromatograma presente na figura 22, verifica-se a separação entre os contaminantes (1º pico) e o resveratrol (2º pico). De forma a avaliar o conteúdo, em termos de componentes de cada pico, foram recolhidas as fracções correspondentes a cada pico. Estas fracções foram depois analisadas quer por HPLC quer por espectrofotometria, com vista a perceber o grau de pureza do composto, calcular a percentagem de recuperação após a passagem na coluna e notar as diferenças entre a quantificação no HPLC e no espectrofotómetro. Na figura 23 estão representados os cromatogramas das fracções obtidas após a passagem na coluna terem sido evaporadas e reconstituídas em 100 µL volume de fase móvel.

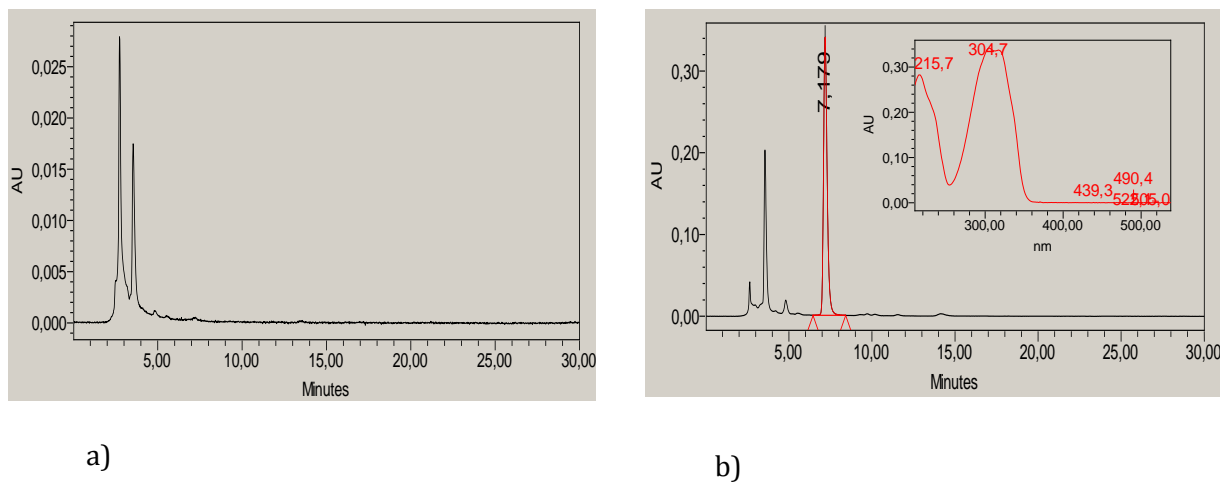


Figura 23. Cromatogramas de HPLC a 304 nm, a) 1ºpico eluído na cromatografia preparativa b) 2ºpico (pico do resveratrol) eluído na cromatografia preparativa. Injecção com 50µL da solução reconstituída.

Como se pode verificar no cromatograma a), o 1º pico apresenta contaminantes, no entanto a dificuldade de recolher e evaporar cerca 40 mL (volume da coluna), durante os quais são eluídos interferentes e reconstituir em 100µL, pode ter influenciado a representatividade desta amostra. O cromatograma b) do 2º pico (pico do resveratrol) eluído na coluna superose 12 prep grade, apresenta o Resv, com o seu espectro característico e com um tempo de eluição de cerca de 7,2 minutos.

Desta forma pode dizer-se que após a passagem na coluna de exclusão molecular, a amostra fica consideravelmente mais limpa, quando comparada com a extracção líquido-líquido.

A percentagem de recuperação após a passagem da amostra na coluna é de 76,42 % (quantificado por HPLC). A quantificação foi realizada com recurso à curva de calibração presentes no ponto 3.3.4.1 dos materiais e métodos.

Da quantificação por HPLC resultou o valor de 11, 463 µg/mL, enquanto no espectrofotómetro foi de 12,438 µg/mL. Esta ligeira diferença, é resultado dos interferentes visíveis na figura 23, eluídos entre os 2 e os 6 minutos. Desta forma pode considerar-se que o método espectrofotométrico é uma opção para acompanhar a produção do Resv em meios de fermentação, não podendo no entanto ser utilizada como método de quantificação, sem prévia purificação. Mediante algumas optimizações este pode ser um processo viável para a quantificação de Resv produzido em meios de fermentação.

Foram passados pela coluna superose 12 prep grade todos os meios de fermentação testados para a produção de Resv, exibindo todos, um perfil cromatográfico semelhante ao da figura 22, o que indica que esta estratégia pode ser aplicada como tratamento prévio de amostras resultantes de diferentes fermentações à quantificação rápida do resveratrol.

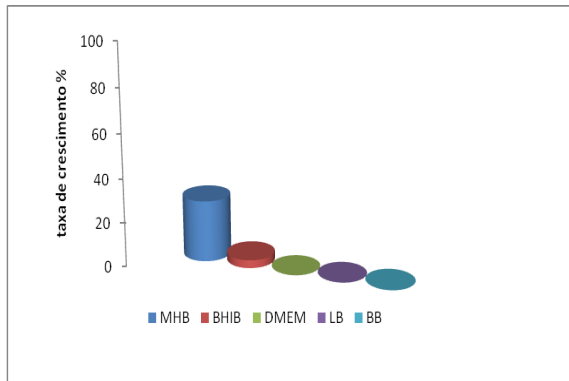
4.5– CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI* EM MEIO LÍQUIDO

Foi estudado o crescimento em meio líquido de HP em dois recipientes distintos, em frasco de cultura de células (50 cm²) e em caixa de petri de 9 mm de diâmetro. Em cada um dos recipientes foram testados vários meios de cultura, para o crescimento em meio líquido.

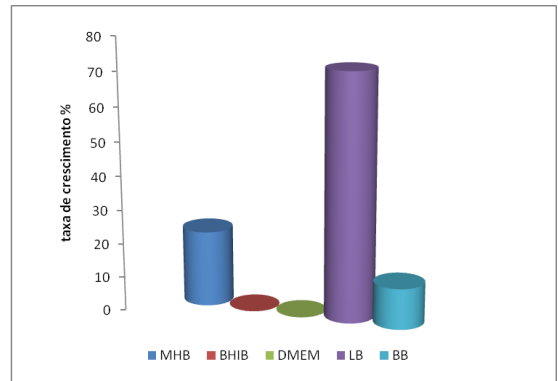
O inóculo inicial revelou-se de grande importância visto que ao iniciar a o crescimento com um inóculo de cerca de 0,5-0,8 DO, o crescimento é muito reduzido, independentemente do meio utilizado. Foram então iniciados os crescimento com inóculos de 0,2 para frascos, e 0,01 (recomendado) para placa (com 3 mL de meio), todos os meios foram suplementados com 10 % de soro de cavalo inactivado; foi testado soro fetal bovino, não se observando diferenças entre estes dois suplementos, no entanto optou-se pelo soro de cavalo por estar melhor documentado na literatura.

O recipiente que permite a obtenção de melhores taxas de crescimento é a caixa de petri com 72,2 % para o meio LB. No entanto nestas condições apenas se consegue, uma

DO_{final} de 0,732. Nos frascos de cultura, embora a taxa de crescimento seja de 27,8% a DO final é de cerca de 1,6 (figura 24). Assim o recipiente escolhido, para prosseguir com os ensaios de inibição foi o frasco de cultura de células, de forma a conseguir a maior densidade celular possível para prosseguir com os ensaios.



a)



b)

Figura 24. Taxa de crescimento de HP em meio líquido. a) Crescimento em frasco de cultura de células; b) Crescimento em caixa de petri de 9 mm. Os resultados foram obtidos após 48h do início do crescimento.

4.6 – IDENTIFICAÇÃO “IN GEL” DE UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

Com o objectivo de identificar a urease num gel de electroforese não desnaturante sem recorrer a processos de Western-blot, foi realizado o método de coloração de gel de Fishbein. Esta coloração de Fishbein permite a identificação da zona onde se situa a banda da urease (figura 25) de forma rápida e económica.

Pode verificar-se pela análise da imagem 19 que a urease é uma das proteínas mais representativas no perfil proteico do lisado de HP, e que a coloração de Fishbein é eficaz na identificação “in gel” da banda da urease de HP. Tal só havia sido feito para urease de plantas.

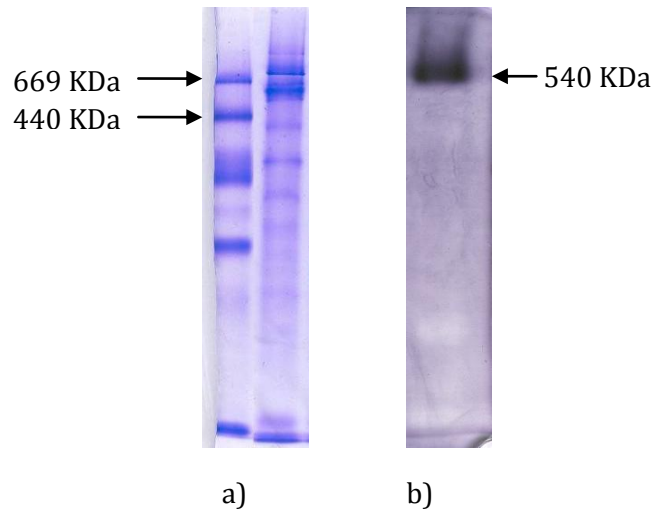


Figura 25. Gel de electroforese de acrilamida (4/8%). a) coloração de Comassie, poço 1 : maçador de pesos moleculares; poço 2: lisado de HP. b) Coloração de fishbein do lisado de *Helicobacter pylori*.

Pode verificar-se na figura 25 a presença de urease no gel que foi sujeito à coloração de Comassie, no poço 2, apresentando um peso molecular a rondar os 540 KDa. É também visível que banda identificada na coloração de Fishbein, b), se encontra na mesma zona do gel, daí se poder dizer que a coloração de Fishbein está a ser específica apenas para a zona onde ocorre mudança de pH, no gel, ou seja a zona onde se encontra a urease.

Como esta coloração apenas foi realizada para urease de plantas tornou-se necessário otimizar o tempo de coloração para urease de HP. Verificou-se que contrariamente ao descrito para plantas, para urease HP, era suficiente um tempo de incubação de 15 minutos.

4.7 - INIBIÇÃO DA UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

A inibição da urease de HP foi testada apenas com Resv comercial, visto não ter possível nas condições estudadas produzir quantidade suficiente de Resv em microrganismos recombinantes.

A actividade foi calculada em função da formação de produto da reacção promovida pela urease, resultando na produção de amónia. Para a quantificação da amónia utilizou-se a curva de calibração presente no ponto 3.6 da secção de materiais e métodos.

Todos os ensaios foram iniciados com a mesma actividade de enzima com vista a notar diferenças na percentagem de inibição. Para todas as concentrações de Resv testadas foram também realizados ensaios para o ácido acetohidroxâmico (AHA), este é um inibidor específico da urease de HP

Os controlos foram realizados com solvente da solução de inibidor, no caso água destilada.

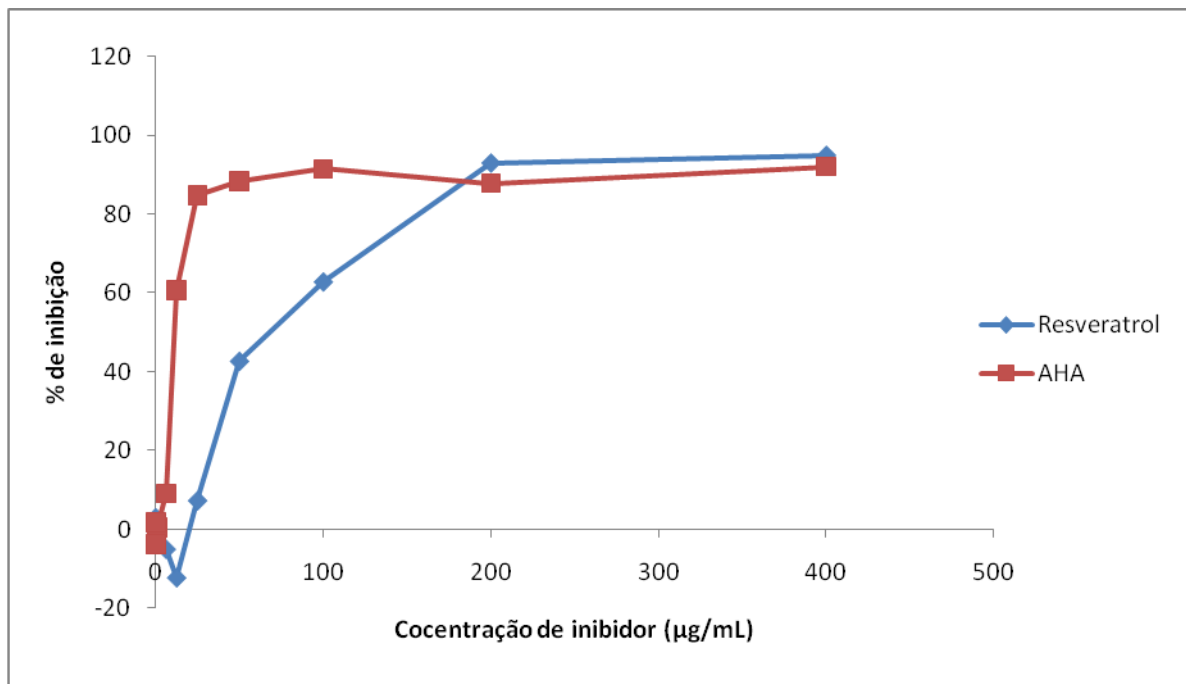


Figura 26. Gráfico das curvas da percentagem de inibição, para o Resv e para o AHA (inibidor específico).

Pela análise da figura 26 pode verificar-se que o Resv comercial apresenta uma percentagem de inibição máxima de 95% ligeiramente superior à do inibidor específico AHA (92,4%). O AHA atinge o seu máximo de inibição por volta dos 25µg/mL, enquanto o Resv necessita de estar mais concentrado para exercer o mesmo efeito, só atingindo esse patamar

aos 200µg/mL. O Resv para além de demonstrar este poder de inibição, parece também exercer um efeito potenciador na actividade desta enzima, isto até à concentração de 12,5µg/mL, no entanto mais estudos seriam necessários para verificar tal facto.

4.7.1 – VISUALIZAÇÃO “IN GEL” DA INIBIÇÃO DE UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*

Tentou-se também visualizar os efeitos desta inibição com recurso à coloração “in gel”, os extractos aplicados no gel foram sujeitos ao protocolo de inibição de urease de HP descrito no ponto 3.7 da secção de materiais e métodos. Foram realizadas electroforeses de proteínas com os extractos proteicos incubados com diferentes concentrações de Resv (12,5; 50; 100 µg/mL) e com 100µg/mL de AHA (figura 27).

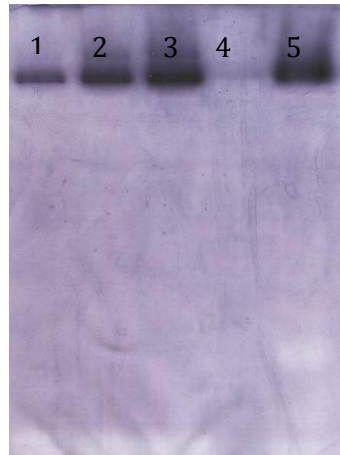


Figura 27. Gel de electroforese de acrilamida (4/8%) corado com coloração de Fishbein. Poço 1: 100 µg/mL de Resv; poço 2: 50 µg/mL de Resv; poço 3: 25 µg/mL de Resv; poço 4: 100 µg/mL de AHA; poço 5: extracto água (controlo).

Pela análise da figura 27 pode ver-se que no poço 4 os 100 µg/mL de AHA são necessários para a quase total inibição da enzima, o mesmo se verifica com as concentrações crescentes de Resv, diminuindo claramente a intensidade da banda. A intensidade das bandas corrobora os resultados obtidos para a percentagem de inibição do Resv (figura 26). Concentrações de Resv na gama dos 400 µg/mL promovem a degradação proteica (resultados não mostrados).

Este método abre novas opções quanto à capacidade de semi-quantificar a actividade da urease com recurso á quantificação da intensidade das bandas, podendo ser uma ferramenta útil, em trabalhos de screening de inibidores, estudando-se simultaneamente alterações no perfil proteico recorrendo à coloração de Comassie.

CAPITULO V – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 – CONCLUSÕES GERAIS

A possibilidade de utilização do trans-Resv como auxiliar terapêutico em diversas patologias tem sido proposto como alternativa credível, pelo que a produção deste composto em microrganismos recombinantes pode ser vantajosa em termos de custos, e a busca do meio de fermentação óptimo para a produção, com vista a aumentar a produtividade do processo é essencial, assim como encontrar um método de quantificação/identificação do composto em meios de fermentação. A utilização do trans-Resv como inibidor da urease de HP, abriria também novos caminhos no que diz respeito às terapêuticas utilizadas actualmente no combate à progressão da infecção por HP.

O objectivo global do presente trabalho era estabelecer o meio de fermentação óptimo para a produção de trans-Resv em *E. coli* BL21, extrair e quantificar o Resv produzido e testar o produto das fermentações na inibição da urease da HP.

Assim obtiveram-se as seguintes conclusões gerais:

- Os meios 2xYT e 2xYT-1% glicerol, são meios mais promissores para a produção de Resv em microrganismos recombinantes, nas condições utilizadas, nos quais são identificados níveis residuais de Resv. Em todos outros meios é produzido um composto, com um espectro de absorção semelhante ao do Resv.
- O melhor solvente orgânico para a extracção liquido-liquido de Resv a partir de meios de fermentação foi o acetato de etilo, conseguindo-se uma percentagem de recuperação de cerca de 90 %.
- A quantificação de Resv por espectrofotometria após a extracção liquido-liquido, não foi eficaz, visto serem extraídos do meio de fermentação grande número de interferentes, que absorvem a 304 nm.
- A utilização de processos de clarificação com uma coluna superose 12 prep grade, mostrou ser eficaz na limpeza da amostra, tornando possível a quantificação de Resv espectrofotometricamente, com uma percentagem de recuperação de 76,42%. Este processo pode ser utilizado para diferentes meios de fermentação.

- Foi possível crescer *Helicobacter pylori* em meio líquido em caixa de petri e frasco de cultura de células. No entanto, o crescimento em frasco permite a obtenção de uma densidade celular maior, o que permite a realização dos estudos de inibição da urease.
- A inibição da urease de HP, é possível com trans-Resv comercial, apresentando uma percentagem de inibição máxima de 95%, ligeiramente superior à do inibidor específico AHA (92,4%). No entanto o trans-Resv necessita de 200µg/mL para exercer a inibição máxima enquanto o AHA apenas necessita de 25µg/mL. O trans-Resv pode ainda exercer um efeito potenciador da actividade com concentrações até 12,5µg/mL.
- Foi possível a detecção “in gel” da banda e da actividade da urease de HP, com recurso à coloração de Fishbein. Com esta coloração consegue-se, para além de localizar a banda da urease sem recurso a Western-blot, observar-se diferenças na actividade da enzima.

Assim, neste trabalho, para além da produção de Resv em microrganismos recombinantes, foi possível otimizar o processo de extracção e clarificar as amostras de forma a quantificar o Resv a partir de meios de fermentação.

A utilização de Resv na inibição da urease de HP ficou demonstrada, assim como a possibilidade de detectar a banda da urease e semi-quantificar a actividade da enzima, após uma electroforese de proteínas e recorrendo à coloração de Fishbein.

5.2- PERSPECTIVAS FUTURAS

- Aumentar a produtividade do processo de produção de Resv recorrendo a desenho experimental.
- Recorrer a diferentes estratégias de purificação como cromatografia de interacção hidrofóbica e cromatografia de afinidade, com o objectivo de promover a total purificação do composto.

- Estudar o crescimento de HP em orbital ou bioreactor com ambiente controlado, tendo em vista o aumento da DO e estudo da cinética de crescimento.
- Estudar o papel do resíduo de cisteína-592 (fortemente implicado na actividade enzimática) na inibição de urease pelo trans-Resv. Este estudo pode ser realizado, introduzindo no protocolo de inibição um passo de adição de uma gama de concentrações de DTT ou cisteína, com vista a observar se a percentagem de inibição diminui.

CAPITULO VI - REFERÊNCIAS

6.1 - REFERÊNCIAS

- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., and Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24, 2783-2840.
- Andersen, D.C., and Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotech* 13, 117-123.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., and Kim, A.L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharm* 224, 274-283.
- Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Krisa, S., and Merillon, J.M. (2004). Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J Biotechnol* 109, 287-294.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech* 10, 411-421.
- Barger, J.L., Kayo, T., Vann, J.M., Arias, E.B., Wang, J., Hacker, T.A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J.D., Leeuwenburgh, C., *et al.* (2008). A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 3, e2264.
- Bartnik, W. (2008). Clinical aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Pol Arch Med Wewn* 118, 426-430.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., *et al.* (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.
- Becker, J.V.W., Armstrong, G.O., Van der Merwe, M.J., Lambrechts, M.G., Vivier, M.A., and Pretorius, I.S. (2003). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *Fems Yeast Res* 4, 79-85.
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C.H.R., and Bovy, A. (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl Environ Microb* 72, 5670-5672.
- Bertelli, A.A., Giovannini, L., Giannessi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M., and Bertelli, A. (1995). Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* 17, 1-3.
- Blache, D., Rustan, I., Durand, P., Lesgards, G., and Loreau, N. (1997). Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 702, 103-110.
- Brakenhielm, E., Cao, R., and Cao, Y. (2001). Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J* 15, 1798-1800.
- Camont, L., Cottart, C.H., Rhayem, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, R., Collin, F., Beaudeau, J.L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta* 634, 121-128.
- Carnes, A.E., and Williams, J.A. (2007). Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Pat Biotechnol* 1, 151-166.

- Chan, M.M.Y. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol* 63, 99-104.
- Chemler, J.A., and Koffas, M.A.G. (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr Opin Biotech* 19, 597-605.
- Chen, G., Shan, W., Wu, Y.L., Ren, L.X., Dong, I.H., and Ji, Z.Z. (2005). Synthesis and anti-inflammatory activity of resveratrol analogs. *Chem Pharm Bull* 53, 1587-1590.
- Chen, X.J., He, H., Wang, G.J., Yang, B., Ren, W.C., Ma, L., and Yu, Q.L. (2007). Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr* 21, 257-265.
- Chong, J.L., Poutaraud, A., and Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci* 177, 143-155.
- Clark, P.A., and Wilcox, D.E. (1989). Magnetic-Properties of the Nickel Enzymes Urease, Nickel-Substituted Carboxypeptidase-a, and Nickel-Substituted Carbonic-Anhydrase. *Inorg Chem* 28, 1326-1333.
- Coudron, P.E., and Stratton, C.W. (1995). Factors Affecting Growth and Susceptibility Testing of *Helicobacter-Pylori* in Liquid-Media. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1028-1030.
- Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., Galletti, P., Zappia, V., and Della Ragione, F. (2007). Resveratrol - From basic science to the clinic. *Cell Cycle* 6, 2495-2510.
- Deak, M., and Falk, H. (2003). On the chemistry of the resveratrol diastereomers. *Monatsh Chem* 134, 883-888.
- Delaunois, B., Cordelier, S., Conreux, A., Clement, C., and Jeandet, P. (2009). Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol J* 7, 2-12.
- Dent, J.C., and McNulty, C.A.M. (1988). Evaluation of a New Selective Medium for *Campylobacter-Pylori*. *Eur J Clin Microbiol* 7, 555-558.
- Deshpande, M., Calenoff, E., and Daniels, L. (1995). Rapid Large-Scale Growth of *Helicobacter-Pylori* in Flasks and Fermenters. *Appl Environ Microb* 61, 2431-2435.
- Docherty, J.J., Fu, M.M., and Tsai, M. (2001). Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemoth* 47, 243-244.
- Dominguez, C., Guillen, D.A., and Barroso, C.G. (2001). Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J Chromatogr A* 918, 303-310.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clement, C., and Courot, E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol* 27, 706-713.
- Dunn, B.E., Cohen, H., and Blaser, M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10, 720-&.
- Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M.J., and Bagni, N. (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics* 9, 610-624.
- Flores-Sanchez, I.J., and Verpoorte, R. (2009). Plant Polyketide Synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiol Bioch* 47, 167-174.

- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of Human Ldl Oxidation by Resveratrol. *Lancet* 341, 1103-1104.
- Gerrits, M.M., van Vilet, A.H.M., Kuipers, E.J., and Kusters, J.G. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 6, 699-709.
- Gnoth, S., Jenzsch, M., Simutis, R., and Lubbert, A. (2008). Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. *Bioproc Biosyst Eng* 31, 21-39.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W., and Harper, W.E.S. (1989). Transfer of *Campylobacter-Pylori* and *Campylobacter-Mustelae* to *Helicobacter Gen-Nov* as *Helicobacter-Pylori Comb-Nov* and *Helicobacter Mustelae Comb-Nov*, Respectively. *Int J Syst Bacteriol* 39, 397-405.
- Gronbaek, M., Deis, A., Sorensen, T.I.A., Becker, U., Schnohr, P., and Jensen, G. (1995). Mortality Associated with Moderate Intakes of Wine, Beer, or Spirits. *Brit Med J* 310, 1165-1169.
- Gu, M., Su, Z.G., and Janson, J.C. (2006). One-step purification of resveratrol and polydatin from *Polygonum cuspidatum* (Sieb. & Zucc.) by isocratic hydrogen bond adsorption chromatography on cross-linked 12% agarose. *Chromatographia* 64, 701-704.
- Halls, C., and Yu, O. (2008). Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends Biotechnol* 26, 77-81.
- Herbert D, P.P., Tempest DW. (1965). The chemostat: design and instrumentation. *Lab Pract* 14:1150- 61.
- Ho, B., and Vijayakumari, S. (1993). A Simple and Efficient Continuous-Culture System for *Helicobacter-Pylori*. *Microbios* 76, 59-66.
- Hocker, M., and Hohenberger, P. (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors - one part of a big picture. *Lancet* 362, 1231-1233.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., *et al.* (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220.
- Juan, M.E., Maijo, M., and Planas, J.M. (2010). Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharmaceut Biomed* 51, 391-398.
- Katsuyama, Y., Funa, N., Miyahisa, I., and Horinouchi, S. (2007). Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem Biol* 14, 613-621.
- Katz, M.S., Hans Peter; Forster, Jonsen; Nielsen, Jens Bredal (2006). Method for the production of resveratrol in a recombinant bacterial host cell (USA).
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A., and Zhuravlev, Y.N. (2007). The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J Biotechnol* 128, 681-692.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., and Merillon, J.M. (1999). Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and C-13 biolabeling. *J Nat Prod* 62, 1688-1690.

- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C., and Merillon, J.M. (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep* 17, 946-950.
- Li, H.F., Chen, S.A., and Wu, S.N. (2000). Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 45, 1035-1045.
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martinez-Zapater, J.M., Bru, R., and Pedreno, M.A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res Notes* 1, 132.
- Lin, Y.T., Kwon, Y.I., Labbe, R.G., and Shetty, K. (2005). Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appl Environ Microb* 71, 8558-8564.
- Lixuan Lisa Huang, Z.X., Quinn Qun Zhu (2009). Method for the production of resveratrol in arecombinant oleaginous microorganism (USA).
- Mahady, G.B., and Pendland, S.L. (2000). Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol* 95, 1849-1849.
- Malfetheriner, P., Bornschein, J., and Selgrad, M. (2010). Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: A chance for prevention. *J Digest Dis* 11, 2-11.
- Matysiak-Budnik, T., and Megraud, F. (2006). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Eur J Cancer* 42, 708-716.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A.M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S.F., Bennett, S., and Dolan, M.C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68, 1992-2003.
- Mendez, C.A., Cerda, J., Grossmann, I.E., Harjunkoski, I., and Fahl, M. (2006). State-of-the-art review of optimization methods for short-term scheduling of batch processes. *Comput Chem Eng* 30, 913-946.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., and Hausinger, R.P. (1995). Molecular-Biology of Microbial Ureases. *Microbiol Rev* 59, 451-480.
- Nagata, K., Mizuta, T., Tonokatu, Y., Fukuda, Y., Okamura, H., Hayashi, T., Shimoyama, T., and Tamura, T. (1992). Monoclonal-Antibodies against the Native Urease of *Helicobacter-Pylori* - Synergistic Inhibition of Urease Activity by Monoclonal-Antibody Combinations. *Infect Immun* 60, 4826-4831.
- Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., and Fernandez, P. (2002). The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 61, 294-302.
- Parekh, S., Vinci, V.A., and Strobel, R.J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biot* 54, 287-301.
- Paul, B., Masih, I., Deopujari, J., and Charpentier, C. (1999). Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasa, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol* 68, 71-76.
- Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J.A., and Domingues, F. (2010). Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World J Microb Biot* 26, 1533-1538.
- Pervaiz, S. (2001). Resveratrol--from the bottle to the bedside? *Leuk Lymphoma* 40, 491-498.

- Pervaiz, S. (2003). Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *Faseb Journal* 17, 1975-1985.
- Phadnis, S.H., Parlow, M.H., Levy, M., Ilver, D., Caulkins, C.M., Connors, J.B., and Dunn, B.E. (1996). Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun* 64, 905-912.
- Pineiro, Z., Palma, M., and Barroso, C.G. (2006). Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1110, 61-65.
- Pirola, L., and Frojdo, S. (2008). Resveratrol: One molecule, many targets. *Iubmb Life* 60, 323-332.
- Qian, Y.P., Cai, Y.J., Fan, G.J., Wei, Q.Y., Yang, J., Zheng, L.F., Li, X.Z., Fang, J.G., and Zhou, B. (2009). Antioxidant-Based Lead Discovery for Cancer Chemoprevention: The Case of Resveratrol. *J Med Chem* 52, 1963-1974.
- Ren, J.J., Liu, H.Y., Hao, Y.H., He, P.G., and Fang, Y.Z. (2007). Determination of resveratrol in red wine by solid phase extraction-flow injection chemiluminescence method. *Chinese Chem Lett* 18, 985-988.
- Repka, V. (2001). Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biol Plantarum* 44, 555-565.
- Richard, J.L. (1987). Coronary Risk-Factors - the French Paradox. *Arch Mal Coeur Vaiss* 80, 17-21.
- Schriever, C., Pendland, S.L., and Mahady, G.B. (2003). Red wine, resveratrol, Chlamydia pneumoniae and the French connection. *Atherosclerosis* 171, 379-380.
- Shiloach, J., and Fass, R. (2005). Growing E-coli to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* 23, 345-357.
- Siemann, E.H., and Creasy, L.L. (1992). Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *Am J Enol Viticult* 43, 49-52.
- Signorelli, P., and Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16, 449-466.
- Sorensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *J Biotechnol* 115, 113-128.
- Stevenson, T.H., Castillo, A., Lucia, L.M., and Acuff, G.R. (2000). Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol* 30, 192-196.
- Sun, A.Y., Wang, Q., Simonyi, A., and Sun, G.Y. (2010). Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*.
- Trela, B.C., and Waterhouse, A.L. (1996). Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J Agr Food Chem* 44, 1253-1257.
- Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., and Nakazawa, T. (1994). A Urease-Negative Mutant of Helicobacter-Pylori Constructed by Allelic Exchange Mutagenesis Lacks the Ability to Colonize the Nude-Mouse Stomach. *Infect Immun* 62, 3586-3589.
- Vannelli, T., Xue, Z.X., Breinig, S., Qi, W.W., and Sariaslani, F.S. (2007). Functional expression in Escherichia coli of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast Trichosporon cutaneum for production of p-hydroxycinnamic acid. *Enzyme Microb Tech* 41, 413-422.

- Vega, A.E., Cortinas, T.I., Mattana, C.M., Silva, H.J., and de Centorbi, O.P. (2003). Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with cyanobacterial extract. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5384-5388.
- Versyck, K.J., and Van Impe, J.F. (1999). Feed rate optimization for fed-batch bioreactors: From optimal process performance to optimal parameter estimation. *Chem Eng Commun* 172, 107-124.
- Vinas, P., Campillo, N., Hernandez-Perez, M., and Hernandez-Cordoba, M. (2008). A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. *Anal Chim Acta* 611, 119-125.
- Walsh, E.J., and Moran, A.P. (1997). Influence of medium composition on the growth and antigen expression of *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol* 83, 67-75.
- Watts, K.T., Lee, P.C., and Schmidt-Dannert, C. (2006). Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bmc Biotechnol* 6, -.
- Weber, W., and Fussenegger, M.T. (2007). Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering. *Curr Opin Biotech* 18, 399-410.
- Wippel, R., Rehn, M., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., and Mayer, B. (2004). Interference of the polyphenol epicatechin with the biological chemistry of nitric oxide- and peroxynitrite-mediated reactions. *Biochem Pharmacol* 67, 1285-1295.
- Witte, C.P., and Medina-Escobar, N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Anal Biochem* 290, 102-107.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Ben-Bassat, A., Sariaslani, R.S., and Huang, L. (2007). Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme Microb Tech* 42, 58-64.
- Yin, J.C., Li, G.X., Ren, X.F., and Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 127, 335-347.
- Zhang, Y.S., Li, S.Z., Li, J., Pan, X.Q., Cahoon, R.E., Jaworski, J.G., Wang, X.M., Jez, J.M., Chen, F., and Yu, O. (2006). Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *J Am Chem Soc* 128, 13030-13031.
- Zotou, A., and Frangi, E. (2008). Development and validation of an SPE-LC method for the simultaneous determination of trans-resveratrol and selected flavonoids in wine. *Chromatographia* 67, 789-793.