

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANOBIOSENSOR PARA
O MONITORAMENTO DA QUALIDADE AMBIENTAL NO
SETOR AGRÍCOLA**

Carolina de Castro Bueno

Sorocaba-SP

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANOBIOSENSOR PARA
O MONITORAMENTO DA QUALIDADE AMBIENTAL NO
SETOR AGRÍCOLA**

Carolina de Castro Bueno

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais
como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciência dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

Agência Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - CAPES

Sorocaba-SP

2013

B928e Bueno, Carolina de Castro
Desenvolvimento de um nanobiossensor para o monitoramento da
qualidade ambiental no setor agrícola / Carolina de Castro Bueno. –
– Sorocaba, 2013.
102 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos,
Campus Sorocaba, 2013
Orientador: Fábio de Lima Leite
Banca examinadora: Clarice Steffens, Augusto Etchegaray Junior
Bibliografia

1.Biossensores. 2.Nanotecnologia. 3. Microscopia de Força
Atômica. I. Título. II. Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

CDD 620.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do *Campus* de Sorocaba.

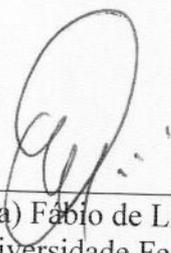
FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA DE CASTRO BUENO

**“DESENVOLVIMENTO DE UM NANOBIOSENSOR PARA O
MONITORAMENTO DA QUALIDADE AMBIENTAL NO SETOR AGRÍCOLA”**

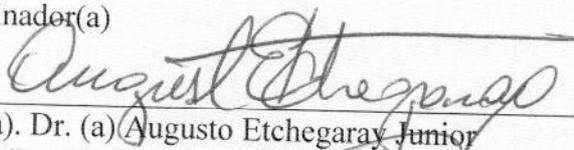
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 26 de fevereiro de 2013.

Orientador(a)



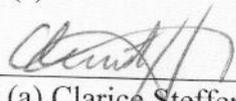
Prof (a). Dr.(a) Fábio de Lima Leite
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr. (a) Augusto Etchegaray Junior
PUC – Pontifícia Universidade Católica, campus Campinas

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Clarice Steffens
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, campus Erechim

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Francisco e Clarice, meus avós Cesário e Berenice, à minha grande amiga, segunda mãe e melhor irmã, Camila, ao meu cunhado Fabrício e ao meu amado noivo, Vinícius.

VITAE

Bacharel em Engenharia Ambiental pela Pontifícia Universidade Católica de
Campinas.

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
CAROLINA DE CASTRO BUENO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM PRIMEIRO
DE MARÇO DE DOIS MIL E TREZE.

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. FABIO DE LIMA LEITE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROF^a. DR^a. CLARICE STEFFENS
UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES *CAMPUS* DE ERECHIM

PROF. DR. AUGUSTO ETCHEGARAY JUNIOR
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus e a Maria por terem guiado meus passos e pensamentos e por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus pais, Francisco e Clarice, meus avós Cesário e Berenice, minha irmã Camila e meu cunhado Fabricio pelo apoio incondicional em meus estudos e decisões.

Agradeço meu noivo Vinícius pelo amor, compreensão e paciência em todos os momentos, por sempre estar ao meu lado, pela sua ajuda e apoio incondicional.

Agradeço a minha segunda família Francisco, Suzi, Leonardo, Luiz, Neide, Silvania, Solange, Beto, Isabella, Lucas e Cris por também estarem sempre ao meu lado e por todo carinho, ajuda e apoio que sempre me deram.

Agradeço aos meus amigos Cristiane, Tiago, Dani, Daiana, Pâmela, Ariana, Bárbara, Alessandra, Michelle e Natália por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço especialmente a Daiana por sua amizade, paciência, grande ajuda e suporte em todos os momentos.

Agradeço a Alessandra da Róz por sua amizade, troca de conhecimentos e grande ajuda em todos os momentos requisitados.

Agradeço ao Adriano e Gued por toda ajuda que me deram neste período e pela amizade.

Agradeço meus colegas de laboratório da UFSCar e aos professores Antônio Riul Junior e Marystela Ferreira que gentilmente cederam alguns de seus equipamentos. Agradeço também a Ana Lúcia Brandl por ter aberto as portas da

UFSCar para mim e por sua ajuda e compreensão e ao Prof. Dr. Amarildo pelas sugestões e correções.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio de Lima Leite por toda orientação, amizade, confiança, sabedoria, conhecimentos, conversas e suporte em todas as horas.

Agradeço também ao Prof. Dr. Omar Teschke por ter aberto as portas de seu laboratório, pela confiança, conhecimentos, ajuda e amizade.

Agradeço ao Luiz Bonugli pelas gentilezas, amizade, conhecimento, grande ajuda e suporte em todos os momentos.

Agradeço meu amigo Prof. Dr. Augusto Etchegaray Júnior por todos os ensinamentos, amizade, conhecimentos transmitidos e por sempre estar presente.

Agradeço a Profa. Dra. Katia Regina Evaristo de Jesus pela amizade, confiança, conhecimentos transmitidos e por também sempre estar presente.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço, enfim, a todos aqueles que sempre estiveram por perto e que me ajudaram a chegar aonde cheguei.

“The beauty of a living thing is not the atoms that go into it, but the way those atoms are put together.”
Carl Sagan

RESUMO

A elaboração de nanobiossensores altamente sensíveis e com seletividade funcional tem aplicações importantes para fins de resiliência e conservação dos recursos naturais que podem contribuir em projetos que visam a apontar áreas degradadas e contaminadas (solo e água), além de ser um indicador de qualidade. No presente trabalho, um nanobiossensor foi desenvolvido com base na biomimética do mecanismo de ação dos herbicidas nas plantas, juntamente com as ferramentas de Microscopia de Força Atômica (AFM). Para detectar a molécula do herbicida diclofop, a técnica da construção do biossensor se baseou na funcionalização química das superfícies de *cantilevers* de AFM e do substrato, onde a molécula alvo foi fixada. Através da funcionalização química dos *cantilevers* e substratos priorizam-se as ligações químicas, aumentando a especificidade do nanossensor. O design e arquitetura molecular do nanobiossensor foram baseados no arranjo molecular espacial, na eficiência e localização da ligação, na especificidade de interações enzima-substrato e suas energias de ligação, as quais foram analisadas por Docking Molecular e Dinâmica Molecular. Os resultados foram baseados na força de adesão (obtidos através de curvas de força) entre a ponta do AFM funcionalizada com a molécula sensora (enzima ACCase) e do substrato funcionalizado com herbicidas. Os resultados indicam que a molécula alvo do agroquímico que inibiu especificamente essa enzima foi eficiente, quando comparado com outros herbicidas não inibidores. A diferença entre os valores de reconhecimento específico (diclofop) e não específico (imazaquin, metsulfuron e glifosato) foi, em média, 90%. Esta evidência comprova a seletividade e especificidade do nanobiossensor. Este trabalho apresenta a primeira evidência da detecção ao nível molecular do diclofop por sensores de ponta de AFM.

Palavras-chave: nanobiossensor enzimático, detecção de agroquímicos, diclofop, Microscopia de Força Atômica, Agricultura, Nanotecnologia

THE DEVELOPMENT OF A NANOBIOSENSOR FOR MONITORING THE ENVIRONMENTAL QUALITY IN AGRICULTURE

ABSTRACT

The elaboration of highly-sensitive and selective functional nanobiosensors has significant applications for purposes of resilience and conservation of natural resources, to contribute on projects aimed to pointing out degraded and contaminated areas (soil and water), as well as being a quality indicator. In the present work, a nanobiosensor has been developed based on the biomimicry of the action mechanism of the herbicides in plants coupled with the Atomic Force Microscopy (AFM) tools. To sense the herbicide molecule at very low concentrations, the technique of the sensor construction was based on chemical functionalization of the surfaces of the AFM probes and substrate in order to prioritize covalent bonds and to improve the molecules flexibility, as well as to achieve reproducibility and accurate results. The architecture and molecular design of the nanobiosensor were based on the molecular spatial arrangement, binding efficiency and localization, host-guest specificity, and its binding energies which were analyzed by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation. The results were based on the adhesion force (carried out by force curves data) between the AFM probe functionalized with ACCase enzyme and the substrate functionalized with herbicides. The results indicate that the specific target molecule of agrochemical was efficient, when compared with others nonspecific agrochemicals. The difference between the values of specific recognition (diclofop) and nonspecific (imazaquin, metsulfuron and glyphosate) is, on average, 90%. This evidence validates the selectivity and specificity of the nanobiosensor. This work presents the first evidence of nanolevel detection of diclofop by AFM probes sensors.

Key-words: enzyme-based nanobiosensor, agrochemical detection, diclofop, Atomic Force Microscopy, Agriculture, Nanotechnology

PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA DISSERTAÇÃO

Artigo completo submetido em periódico

BUENO, C. C.; AMARANTE, A. M.; SOUZA, G.; NOGUEIRA, D. K. D.; TESCHKE, O.; LEITE, F.L. Detection of diclofop herbicide using na enzymatic nanobiosensor. *Biosensors and Bioelectronics*.X:XX, XXX-XXX, 2013.

Manuscrito completo em preparação para ser submetido em periódico

AMARANTE, A. M.; OLIVEIRA, G. S.; CUNHA, R. A.; BUENO, C. C.; FRANCA, E. F.; LEITE, F. L. Development of chemical force microscopy by means of molecular modeling technique. X:XX, XXX-XXX, 2013.

Resumo publicado em anais de congressos

SOUZA, B. B. ; DEDA, D. K. ; LEITE, F. L ; BUENO, C. C. ; SILVA, A. ; RIBEIRO, G. A. ; AMARANTE, A. ; CUNHA, R. ; OLIVEIRA, G. ; FREITAS, L. C. G. ; FRANCA, E. F. ; OLIVEIRA JR, O. N. .Modern Trends in Nanobiosensors using Atomic Force Microscopy. **In: The 5th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials NANOMAT**, 2012, São Carlos. The 5th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials NANOMAT, 2012.

SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA	VI
AGRADECIMENTO	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA DISSERTAÇÃO	XII
SUMÁRIO	XIV
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
LISTA DE SÍMBOLOS	XXIV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES	XXVI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
3.1 NANOTECNOLOGIA, AGRICULTURA E MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	5
3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	6
3.2.1 Microscopia de Força Química (CFM)	8
3.2.2 Espectroscopia de Força Atômica (AFS)	9
3.3 NANOBIOSSENSORES	13
3.3.1 Classificação dos Nanobiossensores	14
3.3.2 Nanobiossensores de Ponta de AFM	15
3.4 HERBICIDAS INIBIDORES DE ENZIMAS	16
3.4.1 Herbicida: Diclofop-Metílico / Diclofop	19
3.4.2 Acetil-coA Carboxilase (ACCase)	22
3.4.3 Acetil-coA Carboxilase (ACCase) e Diclofop – Mecanismo de Ação	25
3.4.4 Considerações Finais	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MODELAGEM MOLECULAR	29

4.1.1 Sistema Molecular	29
4.1.2 Docking Molecular (DM)	29
4.1.3 Dinâmica Molecular	30
4.2 REAGENTES	31
4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	32
4.4 PREPARAÇÃO DO NANOBIOSENSOR VIA FUNCIONALIZAÇÃO QUÍMICA DA PONTA DO AFM	33
4.4.1 Método de Fabricação na Nanoescala	33
4.4.2 Método de Imobilização de Enzimas	34
4.4.3 Construção do Nanobiossensor.....	35
4.5 IMOBILIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS ALVO VIA FUNCIONALIZAÇÃO QUÍMICA DO SUBSTRATO	38
4.6 MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA E ESPECTROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR.....	41
5.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE E MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE MONTAGEM DO NANOBIOSENSOR E PARA AS ETAPAS DE IMOBILIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS ALVO	44
5.2.1 Espectroscopia Raman para análise e monitoramento da funcionalização do nanobiossensor	44
5.2.2 Espectroscopia Raman para análise e monitoramento da funcionalização para imobilização das moléculas alvo.....	57
5.3 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA ANÁLISE DO NANOBIOSENSOR – ESTUDO DAS CURVAS DE FORÇA.....	63
5.3.1 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato modificado com APTES.....	63
5.3.2 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com imazaquin..	67
5.3.3 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com metsulfuron	69
5.3.4 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com glifosato.....	71
5.3.5 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com diclofop.....	73
5.3.6 Ponta funcionalizada com ACCase e bloqueada com anticorpo específico da ACCase e substrato funcionalizado com diclofop.....	75
5.3.7 Análise comparativa	76
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	85

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE A	1
A.1 Estruturas dos agroquímicos utilizados neste trabalho	1
A.1.1 Metsulfuron	1
A.1.2 Imazaquin	1
A.1.3 Glifosato	2
ANEXO A	1
A.1 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINADO DESTE TRABALHO Á REVISTA BIOSENSORS & BIOELECTRONICS: DETECTION OF DICLOFOP HERBICIDE USING AN ENZYMATIC NANOBIOSENSOR	1

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Componentes principais que dão origem aos nanossensores	14
Tabela 3.2 Culturas e plantas alvo para quais o diclofop é utilizado.	21
Tabela 4.1 Sistemas Simulados.	31
Tabela 5.1 Energias de interação entre a enzima ACCase e o inibidor diclofop para duas situações de arquitetura molecular do substrato.	43
Tabela 5.2 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão de APTES.....	46
Tabela 5.3 Atribuições de banda do espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície do Si ₃ N ₄ com APTES.	47
Tabela 5.4 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão de Glutaraldeído.	49
Tabela 5.5 Atribuições de banda do espectro Raman da segunda etapa da funcionalização da superfície do Si ₃ N ₄ com APTES + glutaraldeído.	50
Tabela 5.6 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão da enzima ACCase.	52
Tabela 5.7 Atribuições de banda do espectro Raman da última etapa da funcionalização da superfície do Si ₃ N ₄ com APTES + glutaraldeído + ACCase: Nanobiossensor.	54
Tabela 5.8 Comparação das bandas/comprimento de onda onde é possível verificar regiões semelhantes dos padrões nas etapas de funcionalização e, portanto, confirmar a presença das moléculas de ACCase na superfície reativa.	56
Tabela 5.9 Atribuições de banda do espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES.....	58
Tabela 5.10 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão do herbicida diclofop.	59
Tabela 5.11 Atribuições de banda do espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES + diclofop.....	60

Tabela 5.12 Comparação das bandas/comprimento de onda onde é possível verificar regiões semelhantes dos padrões nas etapas de funcionalização e, portanto, confirmar a presença das moléculas de diclofop na superfície reativa.	62
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Modos de operação do AFM: Contato, Não-Contato e Contato Intermitente (<i>tapping mode</i>)	7
Figura 3.2 (A) Curva de força típica e (B) Diagrama esquemático do movimento vertical da ponta do AFM durante a aproximação e retração de uma curva de força.	10
Figura 3.3 (A) Ligação específica, força de adesão (F_{ads}) de grande magnitude; (B) Ligação não específica, magnitude da força de adesão é pequena.	12
Figura 3.4 Formação do produto a partir do complexo enzima-substrato, seguida pela liberação do produto e regeneração enzima. Adaptado de Campbell.....	17
Figura 3.5 Processo de síntese de aminoácidos e ácidos graxos em plantas saudáveis e em plantas danificadas pela ação de herbicidas.....	18
Figura 3.6 (A) representação da Estrutura química do diclofop-metílico e (B) diclofop. * centro quiral.....	19
Figura 3.7 Representação da Estrutura tridimensional da enzima ACCase, fornecida através de Simulações Moleculares.....	23
Figura 3.8 Via da síntese dos lipídeos, catalisada pela enzima ACCase.....	24
Figura 3.9 Modelo esquemático das possíveis entradas do diclofop na célula vegetal através do fluxo de massa aposimplástica. Nesse modelo, o diclofop circula pela planta através do transporte do xilema para o floema, e vice-versa, atravessando os tecidos devido à estreita justaposição entre os sistemas.....	26
Figura 3.10 Modelo esquemático do mecanismo de ação de despolarização da membrana da célula vegetal pelo diclofop. (A) Contato do herbicida com a folha e (B) Rompimento da membrana plasmática e liberação dos íons.....	27

Figura 4.1 Modelo esquemático do <i>cantilever</i> de AFM para modo de contato, com ponta piramidal, utilizado neste trabalho.....	32
Figura 4.2 Modelo esquemático da funcionalização da ponta do AFM com APTES + Glutaraldeído + ACCase para a detecção do diclofop imobilizado na superfície da mica.	36
Figura 4.3 Modelo esquemático que descreve a interação não linear entre a ponta do AFM e amostra. A mola representa as diferentes trajetórias que a interação vetorial pode descrever.....	37
Figura 5.1 Docking e Dinâmica Molecular para estudos prévio de conformação geométricas das moléculas alvo e sensora. (A) Diclofop e os resíduos Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A e Phe1956B Ala1627A; (B) Posição cristalográfica; (C) Docking do diclofop e; (D) Docking do diclofop+APTES. Referência PDB: 1UYR.....	42
Figura 5.2 Espectro Raman do padrão de APTES.....	45
Figura 5.3 Espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície do Si ₃ N ₄ com APTES.....	47
Figura 5.4 Espectro Raman do padrão de Glutaraldeído.....	48
Figura 5.5 Espectro Raman da segunda etapa da funcionalização da superfície do Si ₃ N ₄ com APTES + glutaraldeído.....	50
Figura 5.6 Espectro Raman do padrão da enzima ACCase.....	51
Figura 5.7 Espectro Raman da última etapa da funcionalização da superfície do Si ₃ N ₄ com APTES + glutaraldeído + ACCase: Nanobiossensor.....	53
Figura 5.8 Comparação dos espectros Raman. (A) Padrão ACCase; (B) Funcionalização: Si ₃ N ₄ + APTES + Glutaraldeído+ ACCase: Nanobiossensor.....	55
Figura 5.9 Espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES.....	57
Figura 5.10 Espectro Raman do padrão do herbicida diclofop.....	58

- Figura 5.11 Espectro Raman da última etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES + diclofop. 59
- Figura 5.12 Comparação dos espectros Raman. (A) Padrão diclofop; (B) Funcionalização: mica + APTES + diclofop. 61
- Figura 5.13 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado sem herbicida. Nota-se que não há interação em nenhuma das curvas e, portanto, não há valor significativo de força de adesão. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0)..... 64
- Figura 5.14 Modelo esquemático para adesão de filmes estáveis em curvas de força em meio líquido, onde há a presença da força de hidratação repulsiva. 65
- Figura 5.15 Curva de força em formamida mostrando as forças repulsivas de vdW [46].. 66
- Figura 5.16 Modelo esquemático para adesão de filmes parcialmente estável ou metaestável em curvas de força em meio líquido. 68
- Figura 5.17 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com imazaquin, herbicida não inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0)..... 68
- Figura 5.18 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação não específica entre a enzima ACCase e o herbicida não inibidor imazaquin. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss. 69
- Figura 5.19 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com metsulfuron, herbicida não inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0)..... 70
- Figura 5.20 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação não específica entre a enzima ACCase e o herbicida não inibidor metsulfuron. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss. 71
- Figura 5.21 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com glifosato, herbicida não inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0)..... 72

- Figura 5.22 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação não específica entre a enzima ACCase e o herbicida não inibidor glifosato. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss..... 73
- Figura 5.23 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com diclofop, herbicida inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0). 74
- Figura 5.24 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação específica entre a enzima ACCase e o herbicida inibidor diclofop. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss..... 75
- Figura 5.25 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase bloqueada com seus anticorpos específicos e o substrato funcionalizado com diclofop, herbicida inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0). 76
- Figura 5.26 Comparação das curvas de força. A curva de força azul representa um evento de reconhecimento específico para um complexo de biomoléculas único formado pela interação específica entre ACCase-diclofop (que inibe a ação da enzima). Em contraste, as curvas em laranja, azul-claro e verde, representam eventos de reconhecimento não específicos com valores baixos, quase nulos, para forças de adesão. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0). 77
- Figura 5.27 Histogramas ($n = 19$) para as ocorrências (frequência relativa) dos valores para força de adesão dos sistemas de detecção em nanoescala: ACCase/diclofop; ACCase/imazaquin; ACCase/glifosato e; ACCase/metsulfuron. Os histogramas foram ajustados para funções gaussianas para identificar o valor da força de aderência mais provável, a fim de criar um valor padrão para eventos de reconhecimento específicos e sinais inespecíficos. 78
- Figura 5.28 As linhas verticais mostram a diferença entre os valores de força de adesão para os agroquímicos diversos, corroborando com a especificidade e seletividade do nanobiossensor. As linhas horizontais indicam cada amostra analisada por AFM. ▼ diclofop; ■ imazaquin; ● metsulfuron e; x glifosato..... 79

Figura 5.29 (A) Curva de força realizada no ar para a interação entre a enzima ALS e o herbicida metsulfuron [143] e (B) Curva de força realizada em meio líquido. A diferença da força de adesão entre as duas curvas é de 50 nN. 80

Figura A.1 Representação da estrutura química do Metsulfuron (metil-2-[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino] carbonil]-amino] sulfonil] benzoato). 1

Figura A.2 Representação da estrutura química do Imazaquin 2-[4,5-didro-4- metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-quinolina-ácido carboxílico). 1

Figura A.3 Representação da estrutura química do Glifosato ([N-(fosfonometil) glicina]). .. 2

LISTA DE SÍMBOLOS

F - Força

k – constante elástica do *cantilever*

Δx – Deflexão do *cantilever*

nm – nanômetro (10^{-9} m)

nN – nanoNewton

mV – milivolts

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ACCase– *Acetil-coA Carboxilase*

AFM – *Atomic Force Microscopy*

APTES – 3-aminopropiltrietoxissilano

AFS– *Atomic Force Spectroscopy*

EPA – *US Environmental Protection Agency*

MFA – Microscopia de Força Atômica

MFQ – Microscopia de Força Química

TEA – Trietilamina

vdW – van der Waals

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos foi aprimorada no século XIX devido a melhorias tecnológicas em técnicas agrícolas, tais como o uso de maquinários modernos, fertilizantes e moléculas mais eficientes de agroquímicos [1, 2]. Juntamente com a utilização de agroquímicos, emergiu também a contaminação do meio ambiente e problemas causados à saúde humana, como efeitos carcinogênicos [3, 4] e efeitos genotóxicos [5], causados pelo volume indiscriminado de agroquímicos em diversas culturas [6]. Conseqüentemente, a qualidade ambiental associada aos parâmetros físicos, químicos, biológicos, sociais e econômicos relacionados com tal contaminação é afetada, modificando o equilíbrio que existe entre o meio ambiente e saúde pública e animal.

Atualmente, a detecção de agroquímicos depende quase inteiramente de espectrometria de massa [7, 8], extração em fase sólida magnética [9], cromatografia gasosa por captura de elétrons [10, 11], cromatografia líquida de alta eficiência [12, 13] e via resposta bioluminescente em bactérias [14]. Com a utilização destes métodos citados é difícil alcançar um maior limite de detecção para baixas concentrações, assim como existe a possibilidade e tendência das amostras se degradarem termicamente antes do processo de detecção. Adicionalmente, muitos agroquímicos atualmente utilizados não são passíveis de detecção por meio de técnicas cromatográficas, ou pelo menos não nas concentrações suficientes para satisfazer os limites considerados seguros para a fauna, flora e a saúde humana, sendo que cada grupo possui seus limites característicos [15]. Dessa forma, é necessária a busca por outras metodologias de detecção de agroquímicos, onde a utilização de sensores/biossensores tem se mostrado promissora [16-20].

Recentemente, os sensores e biossensores baseados em *cantilevers*, que são sondas empregadas na Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*), vêm apresentando resultados promissores na detecção de substâncias na micro e nanoescala [21-23]. Quando o uso de *cantilevers* quimicamente modificados é combinado com métodos de detecção

específicos, obtém-se um sensor que pode detectar concentrações muito baixas de uma gama de substâncias variadas. Neste contexto, uma das ferramentas mais práticas e fundamentais para criar sistemas de nanossensores baseados em AFM é chamada de Espectroscopia de Força Atômica (AFS, do inglês *Atomic Force Spectroscopy*) [24, 25]. A ferramenta AFS é fundamentada em curvas de força *versus* distância, que fornecem dados importantes sobre as forças de interação em eventos de reconhecimento, sejam eles de ligações específicas ou inespecíficas. Igualmente essencial e útil em sistemas de bionanosensoriamento é a ferramenta chamada Funcionalização Química. Por meio desta técnica, as propriedades químicas de superfícies variadas podem ser modificadas, o que permite a criação de um modelo padrão de moléculas para imobilizar os analitos alvo e as moléculas que irão desempenhar o sensoriamento [26-28].

Neste sentido, este trabalho foi baseado no desenvolvimento de um nanobiossensor enzimático de em pontas de AFM para a detecção de moléculas de agroquímicos, especialmente moléculas de diclofop. O diclofop é um herbicida que pertence ao grupo dos aryloxyphenoxypropionatos (APPs) de herbicidas. O modo de ação deste grupo químico é a inibição da enzima ACCase (acetil-CoA carboxilase) [29, 30], enzima esta que está presente em quase todas espécies de plantas daninhas. Ao inibir a ação da enzima ACCase, a biossíntese dos ácidos graxos é interrompida, resultando na morte das plantas [31, 32]. O nanobiossensor enzimático desenvolvido para a detecção do herbicida diclofop e, possivelmente, outros herbicidas do grupo APPs, é considerado o primeiro relato de detecção de moléculas de diclofop na escala micro e nano utilizando um nanobiossensor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho de pesquisa foi construir um nanobiossensor baseado em pontas de AFM para a detecção ao nível molecular e em tempo real do herbicida diclofop, baseado na biomimetização do fenômeno biológico de inibição enzimática por herbicidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Funcionalizar quimicamente a superfície da ponta de AFM para imobilizar a molécula sensível (enzima ACCase) de forma que os sítios ativos não sejam inutilizados;
- Funcionalizar quimicamente a superfície do substrato (mica) para imobilizar a molécula alvo (diclofop);
- Caracterizar a eficiência das etapas da funcionalização química por meio da Espectroscopia Raman e;
- Caracterizar a eficiência do dispositivo através de curvas de força.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 NANOTECNOLOGIA, AGRICULTURA E MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A Nanotecnologia, dentro de inúmeros significados, tem sido definida como a tecnologia relacionada com materiais, sistemas e processos que operam e funcionam na escala de 1-100 nm [2]. Aplicação da Nanotecnologia na agricultura é considerada como o próximo passo natural na ciência, já que esta é uma área multidisciplinar, integrando a Engenharia com a Biologia, Química e Física. Neste sentido, a Nanotecnologia tem o potencial de aprimorar a indústria agrícola e de alimentos com novas ferramentas para o tratamento e detecção molecular de doenças e pragas e aumentando a eficiência de fertilizantes e agroquímicos, por exemplo.

Em termos de aplicação agrícola, a Nanotecnologia possui quatro áreas de tendências tecnológicas que podem ser apontadas: 1. Sensores, sistemas de distribuição inteligentes e dispositivos de diagnóstico para monitoramento das condições ambientais; 2. Controle da disponibilidade de água e de nutrientes em tempo real; 3. Engenharia Genética de plantas e animais para melhorar a produtividade e; 4. Produção de nanomateriais voltados para uso agrícola em geral (elaboração de moléculas, formulações e embalagem do produto final, por exemplo) [1, 33]. A área de sensores, sistemas de distribuição inteligentes e dispositivos de diagnóstico são promissoras para a Agroindústria no que tange o aprimoramento dos índices de qualidade ambiental por intermédio da mitigação e remediação áreas contaminadas e degradadas por agroquímicos [2].

Nas últimas décadas, tanto as terras voltadas para a produção agrícola como as áreas no entorno desta prática, têm sofrido com o crescimento de culturas resistentes a agroquímicos comprometendo a eficiência da produção de alimentos. A grande biodisponibilidade de moléculas de agroquímicos no ambiente é importante do ponto de vista fisiológico tanto de plantas quanto de seres humanos e animais, já que também existem relatos de intoxicação humana

por contato direto e indireto com agroquímicos [34]. Estudos e aplicações da Nanotecnologia na Agricultura visam criar novos métodos para reduzir a poluição/contaminação, aumentar a qualidade ambiental desses ambientes e, conseqüentemente, tornar a Agricultura mais sustentável.

3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Em 1981, a Microscopia de Tunelamento por Varredura (do inglês *Scanning Tunneling Microscope* - STM) tornou-se uma ferramenta útil na caracterização de superfícies de materiais condutores em escala atômica [35]. A maior limitação desta técnica foi justamente o seu princípio: a necessidade da amostra ser condutora (metais/semicondutores). Por causa desta limitação, em 1986, Binnig, Quate e Gerber, propuseram um novo tipo de microscópio para superar este obstáculo, pois ao invés de medir corrente elétrica, este novo equipamento de análise pode medir forças em escala atômica [36]. Esse microscópio era o Microscópio de Força Atômica (AFM – do inglês *Atomic Force Microscope*). Por meio desta nova técnica, uma vasta quantidade de materiais puderam ser analisados e caracterizados ao nível atômico. Como o AFM fornece o perfil da superfície da amostra medindo as forças entre sua ponta e uma superfície, pode-se afirmar que a quantidade de força medida durante as análises é dependente da constante de mola do *cantilever* e da distância entre este e a superfície da amostra.

Dessa forma, a força de interação entre os grupamentos químicos da ponta do AFM e do substrato pode ser calculada pela lei de Hooke [24]:

$$F = k \Delta x \quad (1)$$

onde F é a força de interação, Δx é deflexão do *cantilever* (nm) e k é a constante elástica do *cantilever* (N/m), que depende de sua geometria e do material de construção.

A distância entre a ponta e a amostra é de fundamental importância para a caracterização de um material, para a resolução das imagens e qualidade dos resultados. Dessa forma, o modo de varredura em que o microscópio trabalha é importante para uma análise de qualidade de Microscopia de Força Atômica. Nesse aspecto, três modos de operação são definidos de acordo com a distância existente entre a ponta e amostra [37]: 1. Contato: Forças repulsivas de van der Waals (vdW) são predominantes; o escaneamento da amostra é rápido e, portanto, pode danificar amostras “moles”; 2. Não-contato: Forças atrativas de vdW são predominantes; geralmente fornece uma imagem de baixa resolução; não danifica a amostra; 3. Contato intermitente (*tapping mode*): permite boa resolução das imagens; velocidade de escaneamento é geralmente baixa. A Figura 3.1 ilustra os três modos de operação.

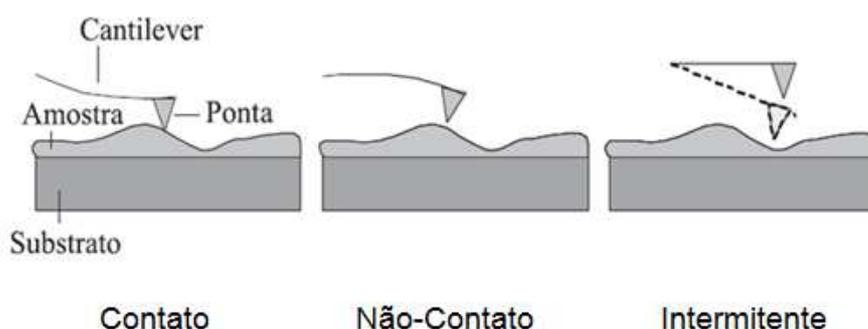


Figura 3.1 Modos de operação do AFM: Contato, Não-Contato e Contato Intermittente (*tapping mode*) [37].

O AFM pode operar também em meios diversos, como o ar, vácuo e líquido. No que tange a operação de nanossensores de ponta de AFM, a escolha do meio adequado é influenciada tanto pelas características das moléculas de sensoriamento, como pelas propriedades das moléculas alvo. Na maioria das vezes, nanobiossensores que utilizam enzimas e proteínas como elementos de sensoriamento são utilizados em meio líquido para preservar a estrutura terciária dessas biomoléculas, evitando assim, sua desnaturação e consequente perda de sua funcionalidade.

Quando os experimentos são realizados em meio líquido, deve-se prestar atenção a algumas variáveis relacionadas às forças intermoleculares atuantes no sistema que requerem identificação e quantificação, como por exemplo, as forças de vdW, hidratação, solvatação, dupla camada, elástica e hidrofóbica [25]. Já quando o sistema de sensoriamento é conduzido no ar ou vácuo, forças como vdW, elástica, adesão, química e eletrostática devem ser averiguadas [25].

3.2.1 Microscopia de Força Química (CFM)

O AFM é uma ferramenta muito importante para medir e mapear quimicamente superfícies, bem como a natureza das forças de interação de materiais e amostras biológicas através do controle das interações químicas entre a ponta do AFM e a amostra [38, 39]. Esta técnica é conhecida como Microscopia de Força Química (CFM, do inglês *Chemical Force Microscopy*) e baseia-se nas análises realizadas por pontas de AFM quimicamente modificadas com grupos funcionais expostos, propositalmente e arquitetados para realizar uma função exclusiva em um sistema [38-42]. A CFM pode ser empregada na realização de métodos de titulação por AFM para obter o valor de pK_a aparente na superfície de uma amostra [43], para definir as forças adesivas e a energia em uma superfície, localizar uma substância específica, aferir forças intermoleculares (interações do tipo chave-fechadura/encaixe induzido em um ambiente complexo), detectar grupos químicos dominantes, mapear, determinar e analisar a hetero/homogeneidade de superfícies em tempo real [44].

A CFM tem sua origem em procedimentos de funcionalização química (ou simplesmente funcionalização), que é justamente a modificação das características químicas de uma superfície por meio da inserção de novas espécies moleculares em um ambiente controlado. Por meio da funcionalização, a CFM pode ter aplicações muito úteis na criação e caracterização de superfícies químicas sintéticas, sensores inteligentes e dispositivos de micro/nanofluídica, onde não basta apenas ligar diversas espécies moleculares, sendo necessário também, buscar a funcionalidade do dispositivo e uma determinada finalidade prática.

3.2.2 Espectroscopia de Força Atômica (AFS)

A AFS é uma das ferramentas mais promissoras no que tange a obtenção de processos de reconhecimento com resolução molecular. Em análises biológicas, a AFS permite aferir a interação específica que rege as moléculas em suas condições fisiológicas, bem como tem a capacidade de fornecer informações sobre a cinética e a termodinâmica de um conjunto de moléculas que interagem entre si. A AFS também pode completar abordagens clássicas da bioquímica, oferecendo a possibilidade de esclarecer aspectos não convencionais relacionados com processos de reconhecimento específico, mudanças conformacionais e heterogeneidade da população molecular de uma amostra [45]. Em virtude desses atributos, a AFS é uma técnica particularmente favorável para pesquisar sistemas biológicos.

Quando o AFM realiza ensaios de AFS, a ponta do *cantilever* é movida na direção vertical, z, (perpendicular ao plano da amostra) para baixo, até ficar em contato com a superfície da amostra e, em seguida, experimentada a interação, a ponta é forçada a se soltar da amostra (movimento para cima) até voltar à sua posição inicial. Esse movimento induzido resulta nas curvas de força e é uma função do deslocamento piezoelétrico (*scanner*). A Figura 3.2 mostra uma curva de força típica, identificando suas regiões: A-B: A ponta do *cantilever* é induzida ao contato com a amostra; B-C: A ponta é pressionada contra a superfície da amostra até a região C e o *cantilever* se curva para cima; C-D: O *cantilever* começa a entrar em equilíbrio com as forças de superfície; D-E: o *cantilever* sofre uma deflexão devido às forças de atração (adesão); E-F: no ponto E tem-se a ruptura da ponta com o substrato. No ponto G, o *cantilever* volta à sua posição inicial. A distância vertical F-G corresponde ao valor da força de adesão (F_{ads}) entre a ponta e a amostra (pontual) e; G-H: A ponta e a amostra já não estão mais em contato [35, 46].

A partir dessas curvas de força é possível averiguar como as biomoléculas interagem, como complexos ligante-receptor se formam, como as moléculas estão orientadas tanto na ponta como no substrato e, portanto, se assumem uma

configuração geométrica favorável ao reconhecimento específico. Do mesmo modo, outras informações como a extensão das ligações (comprimento de desacoplamento) [27], a tendência e comportamento do processo de desacoplamento das moléculas e se o processo de ligação é ou não reversível, também podem ser obtidas. Essas averiguações podem mimetizar o que ocorre em sistemas biológicos, indicando horizontes para aplicações de novos medicamentos e sistemas de biorremediação ambiental, por exemplo.

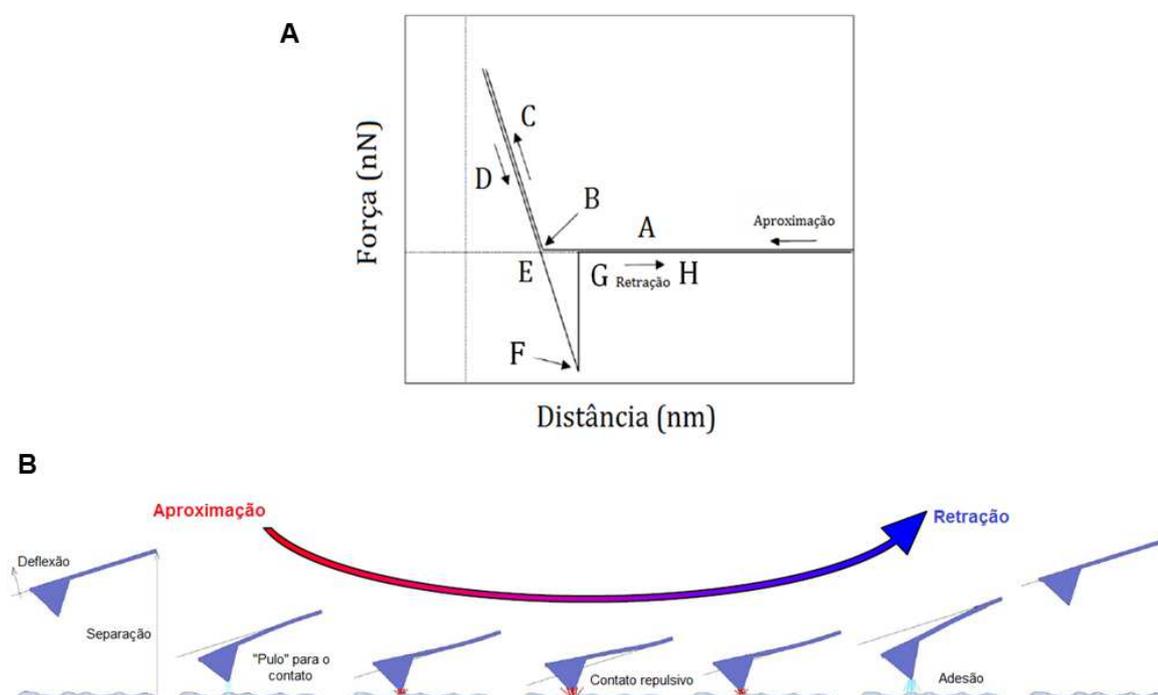


Figura 3.2 (A) Curva de força típica e (B) Diagrama esquemático do movimento vertical da ponta do AFM durante a aproximação e retração de uma curva de força [35].

Diversas estratégias estão sendo criadas para imobilizar as moléculas na ponta do AFM e em outros substratos de modo a favorecer uma interação correta entre eles (arquitetura/*design* de moléculas), para reduzir eventos múltiplos e diferenciar os eventos de reconhecimento específicos (Figura 3.3A) e inespecíficos (Figura 3.3B) dentro do sistema de estudo. No contexto dos nanossensores, sabe-se que os dispositivos utilizados na AFS (*cantilevers* e

pontas de AFM) são baseados na tecnologia do silício (SiO_2 , Si, Si_3N_4 [47]) e que estes não tem, por si só, atributos sensitivos. Para habilitar esses materiais a serem sensores seletivos e sensíveis, comumente suas superfícies são funcionalizadas com organosilanos que possuem grupos funcionais terminais ativos para fornecer uma interface adequada entre o transdutor de silício e as moléculas a serem arquitetadas em sua superfície. Para aumentar a capacidade de reconhecimento específico, uma das etapas adicionais da funcionalização é a adição de um elemento que seja flexível, que possa atuar como um espaçador (*linker*), como por exemplo, o glutaraldeído, alcanotóis e o polietileno glicol (PEG), sendo este último o mais utilizado [48]. As funções desses espaçadores em um sistema de sensoriamento na nanoescala são: fornecer mobilidade e liberdade de orientação estrutural para as moléculas, auxiliar a distinguir os reconhecimentos específicos dos não específicos, prevenir deformidades estruturais e desnaturação de moléculas biológicas e colaborar para a orientação uniforme das moléculas na superfície, além de atuarem como uma ponte entre as superfícies inorgânicas e as biomoléculas [45]. As imobilizações desses grupamentos químicos em superfícies, como as das pontas de AFM, são semelhantes a um jogo de peças de montar, onde o encaixe dos blocos (moléculas) pode ocorrer via reticulação ou adsorção física, onde o ambiente e a superfícies são controlados para imobilizar moléculas através das forças naturais presentes; ou então podem ocorrer através da formação de ligações covalentes, que é a metodologia mais utilizada, onde a modificação da superfície é alcançada através de reações químicas [27, 49-51].

Mais especificamente, para planejar a funcionalização química de superfícies para sistemas de sensores baseados em pontas de AFM, é imprescindível conhecer a geometria da ponta utilizada, bem como sua constante elástica e as moléculas que irão fazer parte do sistema de estudo. Por exemplo, se o sistema de sensoriamento requer a detecção de moléculas de antígeno, como uma toxina, a biomolécula que irá reconhecê-lo será seu anticorpo específico e não uma enzima desconhecida. Para prever os tipos de interação, energias de ligação, conformação estrutural, propriedades elétricas e coeficiente

de inibição (ligação) de um sistema de sensoriamento em nanoescala, a Modelagem Molecular pode ser uma ferramenta adequada [52].

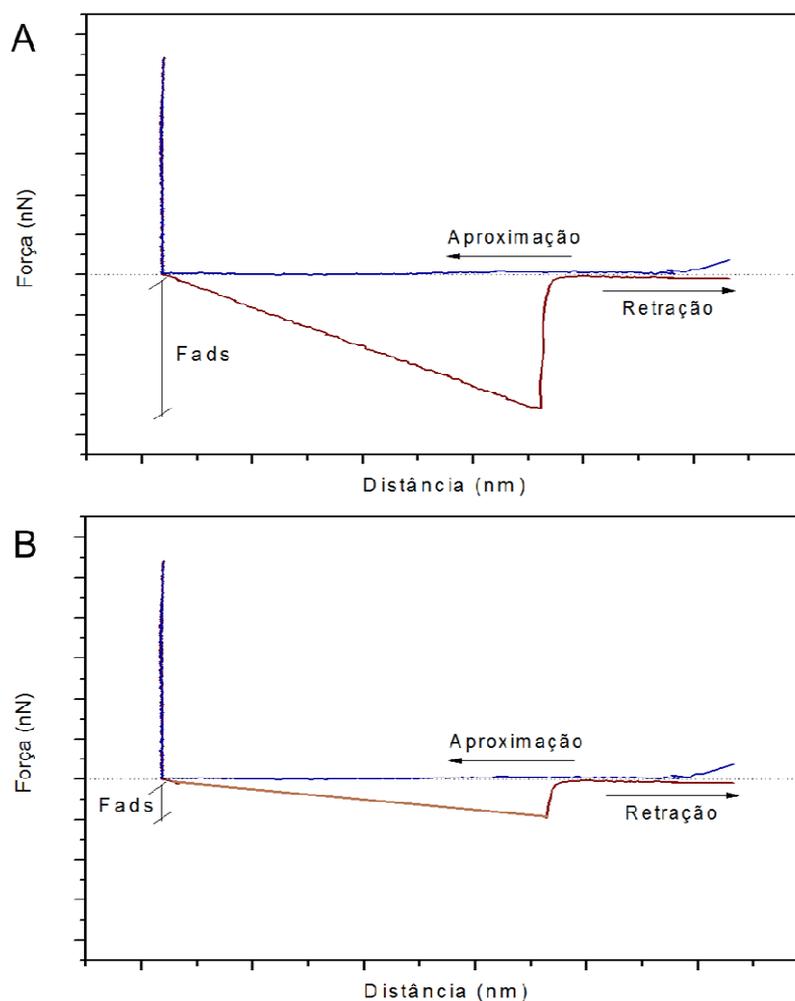


Figura 3.3 (A) Ligação específica, força de adesão (F_{ads}) de grande magnitude; (B) Ligação não específica, magnitude da força de adesão é pequena.

As curvas de força são estatisticamente significativas quando feitas em série e repetidas n vezes, a fim de produzir um universo que represente de forma fidedigna e confiável o que a amostra realmente representa como um todo. Para tanto é conveniente fazer linhas de varreduras pontuais das forças de adesão (F_{ads}) em diversos padrões geométricos, como em quadrados e linhas diagonais, por exemplo. Dependendo das características do sistema, as regiões mais

interessantes de se analisar podem ser especificadas pela imagem topográfica de AFM fornecida previamente na análise e/ou pelas funções fornecidas pelo software do equipamento.

Após obter uma amostra representativa de dados, um histograma de frequência relativa dos valores de força de adesão é obtido e através dele, pode-se obter uma faixa de valores padronizados de F_{ads} . Em outras palavras estes histogramas mostram a distribuição estatística das forças de adesão, que é dado pela distância vertical encontrada na curva de força. Este tipo de dado é de extrema utilidade quando o nanobiossensor visa aplicações analíticas, já que a partir dele, pode-se verificar se uma amostra real está dentro das condições estatísticas padronizadas previamente e, portanto, dizer se a amostra real contém a molécula procurada.

3.3 NANOBIOSSENSORES

Os biossensores são ferramentas analíticas que combinam biomoléculas (ácido nucleico, enzima, anticorpo, receptor, célula, tecido) imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta, possivelmente contínua, de um analito específico [53].

Dependendo da natureza do elemento de reconhecimento do sistema transdutor escolhido, o significado de biossensor pode ser estendido. Em determinados eventos pode ser de interesse priorizar a seletividade e/ou sensibilidade do sensor enquanto que em outro evento, o intervalo de resposta ou de habilidade de regeneração da superfície de interação seja a prioridade. Neste contexto, a miniaturização das partes sensitivas por intermédio da Nanotecnologia é, em vários episódios, atraente e viável. Deste modo, quando a sensibilidade e a seletividade do biossensor são investigadas na escala nano (compreendidos na escala de 1-100 nm), estes dispositivos recebem o nome de nanobiossensores [54].

Assim, podem-se definir os nanobiossensores como sendo materiais funcionais e sensitivos utilizados para transmitir informações químicas, físicas, quânticas ou biológicas sobre materiais e moléculas diversas. Os

nanobiossensores não são apenas *sensores pequenos*, mas sim sensores que utilizam e detectam fenômenos físicos, químicos, biológicos e quânticos na micro e na nanoescala.

3.3.1 Classificação dos Nanobiossensores

Os nanobiossensores podem ser classificados de acordo com quatro critérios fundamentais: i. Quanto ao método utilizado para detectar a interação desejada; ii. Quanto ao tipo de interação que se estabelece entre o elemento sensor e o analito; iii. Quanto ao sistema de transdução e; iv. Quanto à natureza do composto de reconhecimento (biológico ou não biológico) [54]. Através de diversas combinações entre esses critérios, podem surgir diferentes tipos de nanobiossensores que são definidos e categorizados por seus diferentes alvos de detecção, materiais que são feitos e pelos sinais que utilizam para transmitir informação, como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Componentes principais que dão origem aos nanossensores [55].

NANOSSENSORES		
Materiais	Sinais	Alvo
<i>Cantilevers</i> de AFM	Ópticos	Anticorpos
<i>Cantilevers</i> de AFM	Mecânicos	Peptídeos
Nanopartículas metálicas/magnéticas	Elétrico	Moléculas biológicas diversas
Nanotubos	Magnético	Analitos inorgânicos perigosos
Nanocanais	Eletroquímico	Aptâmero
<i>Cantilevers</i> de AFM	Piezoelétrico	Enzima

De acordo com a teoria que envolve os nanobiossensores, os componentes mostrados na Tabela 3.1 se ajustam a várias combinações. Contudo, na prática, a escolha da molécula biológica sensorial depende dos atributos da molécula alvo de interesse [54].

3.3.2 Nanobiossensores de Ponta de AFM

O AFM, além de ser útil em análises de imageamento de diversos tipos superfícies e fornecer dados das propriedades mecânicas das mesmas [56], também pode ser empregado como um instrumento de sensoriamento na nanoescala. O mesmo dispositivo utilizado para as análises de varredura de superfícies em AFM, o *cantilever* com uma ponta pode ser utilizado para medidas pontuais de interação e reconhecimento específico de diversos analitos. Sensores construídos com base neste dispositivo são chamados de nanossensores de pontas de AFM (ou de sonda, ou de *tip*) e, são baseados na resposta de interação entre a ponta do *cantilever* com um substrato específico ou ainda entre as moléculas imobilizadas no ápice de sua superfície, como uma função da distância de separação relativa entre eles. Dados desse reconhecimento são fornecidos por curvas de força *versus* distância, como já foi visto no item 3.2.2. Neste contexto, a AFS consegue fornecer dados relativos ao comportamento de moléculas nas superfícies através de forças de alongamento e torção, bem como a sua resposta de indentação [26, 57].

Os nanobiossensores de ponta de AFM podem detectar tanto analitos inorgânicos, como orgânicos, podendo ser construídos através da funcionalização química de sua superfície com elementos de sensoriamento biológicos (biomoléculas) [52] ou biomiméticos [54].

Geralmente as pontas de AFM são funcionalizadas quimicamente com o objetivo de promover uma ligação covalente para imobilizar ou adsorver fortemente uma molécula sensorial (enzima ou anticorpo na superfície da ponta) [21, 26, 58]. Na maioria das vezes, as interações específicas entre esse sistema e o substrato (amostra) são reversíveis, permitindo o monitoramento contínuo de amostras [59]. Estes sensores são instrumentos muito úteis para a análise de doenças e detecção de moléculas tóxicas no meio ambiente, já que são altamente seletivos e sensíveis [60, 61].

As principais vantagens dos nanobiossensores de ponta de AFM estão relacionadas, principalmente, com os limites de detecção baixos, ao nível molecular. Os nanobiossensores de ponta de AFM também apresentam vantagens de performance, como resposta instantânea/em tempo real e, em

alguns casos, portabilidade [62]. Por serem dispositivos que permitem a imobilização de moléculas específicas, os nanobiossensores oferecem também um reconhecimento específico e direcionado, evitando assim ligações cruzadas inespecíficas. Adicionalmente, esses sensores são considerados como sendo sensores inteligentes, já que podem ser empregados como sistemas independentes de detecção ou integrados às redes de dados [62]. Igualmente, apresentam o benefício de detectar analitos múltiplos e, dependendo do design do nanobiossensor, podem ser reutilizáveis e mimetizar ambientes orgânicos [63].

Inversamente, o ponto negativo dos nanossensores de ponta de AFM está ligado ao fato de que os sistemas de sensoriamento empregados para seu funcionamento precisam ser estudados extensiva e detalhadamente para que se possa escolher tanto a melhor geometria da ponta, como as moléculas apropriadas para desempenhar o papel de elemento sensitivo. Além disso, também é preciso indicar o método de funcionalização adequado de modo que os sítios ativos ou grupamentos químicos principais estejam disponíveis para promoverem as ligações. Ter dimensões na nanoescala, o grande benefício desses sensores, também pode ser uma grande desvantagem, já que os eventos na dimensão nano se tornam mais difíceis de serem controlados.

3.4 HERBICIDAS INIBIDORES DE ENZIMAS

Enzimas são estruturas orgânicas que catalisam reações em processos biológicos [64]. Todos os processos bioquímicos ao nível celular dependem de enzimas, que por isso são essenciais à manutenção da vida. Em uma reação catalisada por uma enzima, esta se liga ao seu substrato para formar o complexo enzima-substrato. A especificidade de uma enzima é determinada por sua composição e pela disposição espacial dos aminoácidos que constituem suas proteínas. O substrato é a substância inicial que é transformada em um produto específico na reação catalisada pela enzima e liga-se, na mesma, por meio de interações não covalentes a uma pequena porção da enzima conhecida como sítio ativo, frequentemente situado em uma fenda ou bolso da superfície da

proteína (que contém os aminoácidos essenciais para a atividade enzimática) [64]. Um exemplo dessa reação catalisada é ilustrado na Figura 3.4.

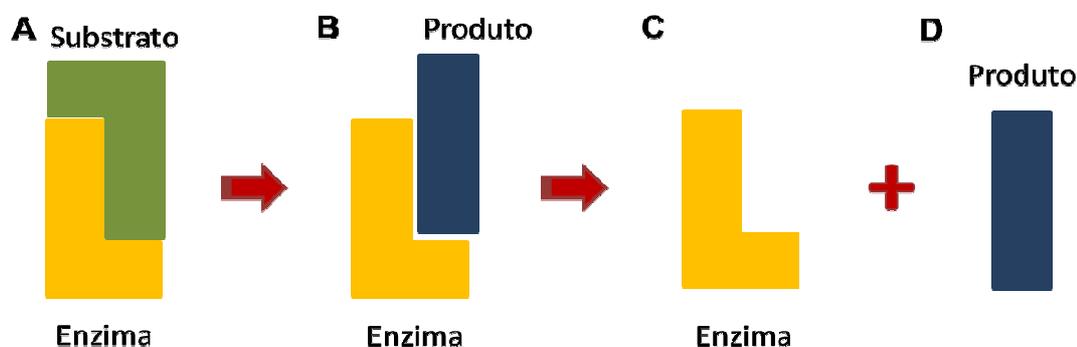


Figura 3.4 Formação do produto a partir do complexo enzima-substrato, seguida pela liberação do produto e regeneração enzima. Adaptado de Campbell [64].

Na Figura 3.4A, pode-se observar a formação do complexo enzima-substrato, a qual ocorre devido a interações altamente específicas entre o substrato e as cadeias laterais dos aminoácidos que constituem o sítio ativo. Na transição de A para B, ocorre o estado de transição, onde as ligações são rearranjadas. Neste ponto, dois modelos importantes foram descritos para descrever esse processo de ligação: Modelo Chave-Fechadura e o Modelo de Encaixe Induzido (*Host-Guest*), sendo este último mais aceito atualmente [65], já que leva em consideração a flexibilidade conformacional tridimensional das proteínas e não apenas o grau de similaridade geométrica entre a forma do substrato e do sítio de ligação na enzima. O modelo de encaixe induzido assume que o sítio de ligação da enzima tem uma forma tridimensional diferente antes da ligação ao substrato, tornando-se complementar somente após a ligação com o mesmo [64].

Alguns tipos de herbicidas atuam bloqueando a atividade de enzimas específicas e por isso tem sua eficiência ligada diretamente a essa inibição. Agindo diretamente, os herbicidas podem interferir em processos normais no

núcleo das células, competir com o substrato por sítios ativos e, assim, afetar sua associação ativa com a enzima. Os herbicidas também agem indiretamente na ação das enzimas, onde interferem na produção de ATP e no suprimento de materiais para a formação de coenzimas, afetando assim as condições das reações catalisadas [66].

O efeito de um herbicida sobre a atividade das enzimas é variável de planta a planta, de órgão a órgão e do estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra [67]. A inibição da enzima nada mais é que uma reação entre uma molécula e uma enzima, reação esta que forma um complexo que bloqueia a ação da enzima, temporária ou permanentemente. Existem vários tipos de inibição enzimática que envolve diferentes tipos de moléculas e processos. Dependendo do processo envolvido na inibição, como a síntese de aminoácidos e de ácidos graxos, o funcionamento do processo é descontinuado, levando a morte da célula e, conseqüentemente, da planta, como mostrado na Figura 3.5.

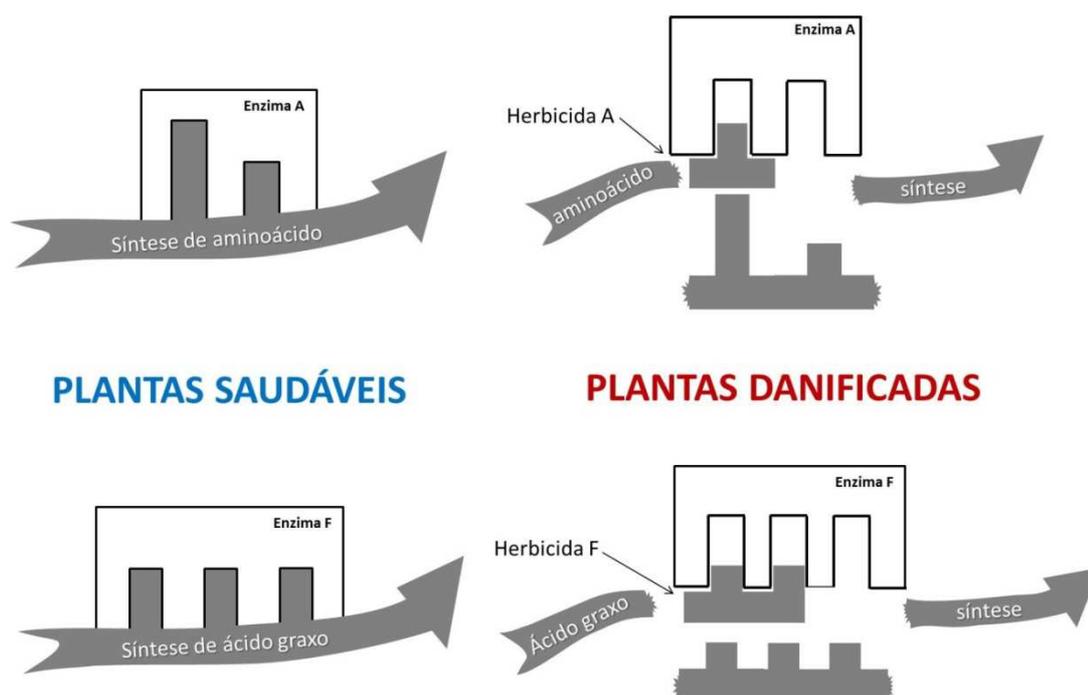


Figura 3.5 Processo de síntese de aminoácidos e ácidos graxos em plantas saudáveis e em plantas danificadas pela ação de herbicidas [66].

3.4.1 Herbicida: Diclofop-Metílico / Diclofop

O herbicida diclofop-metílico foi registado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1982 para o controle e supressão da aveia selvagem e gramíneas anuais em culturas de trigo e cevada [30]. Mais exemplos de culturas e plantas alvos em que o diclofop é utilizado são mostradas na Tabela 3.2.

O diclofop tem baixa solubilidade, forte absorção e baixa pressão de vapor, o que indica que seria imóvel nas condições de campo. Porém, estudos tem demonstrado que o diclofop-metílico (Figura 3.6A) sofre uma hidrólise rápida e se degrada para diclofop (Figura 3.6B) tanto na planta quanto no solo (essa hidrólise ocorre principalmente por decomposição biológica) [68]. Até 15% de diclofop-metílico é hidrolisado no momento da aplicação e incorporado no solo, e os outros 85% são hidrolisados em até 24 horas após sua aplicação. O diclofop é o ácido propanoico correspondente que possui uma menor ação herbicida, quando comparado com o composto original diclofop-metílico [68]. Assim, neste texto, o diclofop-metílico será denominado apenas de diclofop (hidrolisado), já que esta é a forma em que se encontra no meio ambiente e foi a forma empregada em testes experimentais deste trabalho [69, 70].

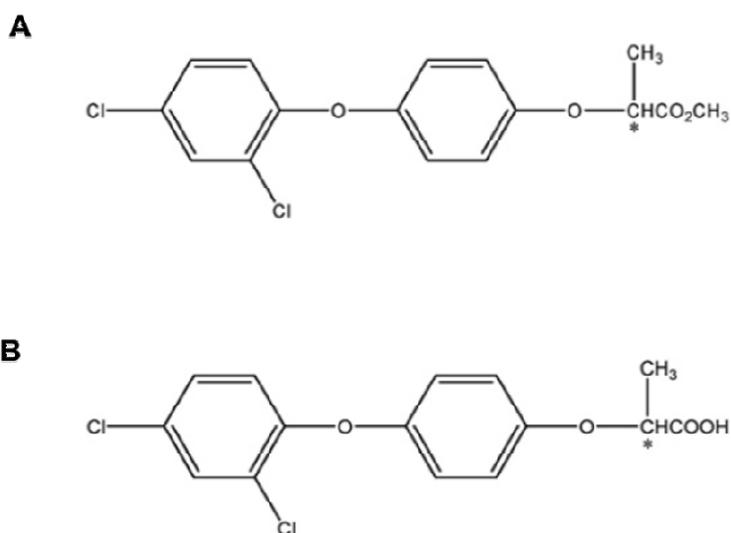


Figura 3.6 (A) representação da Estrutura química do diclofop-metílico e (B) diclofop. * centro quiral.

A persistência do diclofop no solo pode ser influenciada por processos como a degradação química e biológica. Além disso, esse herbicida apresenta uma característica de se adsorver fortemente às partículas do solo, o que resulta em muitas perdas dessa substância para o meio ambiente após o escoamento do material pós-aplicação [71]. Resíduos de diclofop não extraíveis são normalmente ligados à matéria orgânica do solo, especialmente o ácido fúlvico e frações de ácidos húmicos. Além de se adsorver no solo, também é possível que o diclofop se incorpore na biomassa microbiana pedológica [71]. Estudos de campo e laboratoriais indicaram que as doses letais e subletais de diclofop para taxas de aplicação e concentração na água, para mudas de plantas não alvo são, respectivamente, $0,036 \text{ kg ha}^{-1}$ e $0,34 \mu\text{g L}^{-1}$ [72].

Tabela 3.2 Culturas e plantas alvo para quais o diclofop é utilizado [73].

CULTURA	ERVA DANINHA
Trigo Cevada Triticale	Azevém (Wimmera) anual
Centeio cereal Canola (colza) Cártamo Linhaça	Farpa de grama comum
Tremoço Ervilha	Azevém anual
	Farpa de grama comum
Trigo Cevada Triticale Centeio cereal Canola (colza) Cártamo Linhaça	Aveia selvagem
Tremoço Ervilha	Aveia selvagem
Pasto Vagem Culturas de sementes	Azevém anual
	Aveia selvagem
Papoulas oleaginosas	Aveia selvagem
	Azevém anual

O diclofop é um inibidor da síntese de ácidos graxos, através da inibição da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCCase), atacando a membrana celular, prevenindo a translocação de assimilados fotossintéticos para as raízes, reduzindo o teor de clorofila e inibindo as atividades bioquímicas nos meristemas. O diclofop é um herbicida seletivo sistêmico também com ação de contato, sendo absorvido principalmente através das folhas e, em parte, pelas raízes em solo úmido [74].

3.4.2 Acetil-coA Carboxilase (ACCase)

Os lipídeos são formados por moléculas relativamente pequenas que podem se associar para constituir grandes moléculas que servem, principalmente, como componentes estruturais das membranas, como forma de armazenamento de energia e outras funções essenciais (formação de hormônios esteroides, vitaminas, proteção, material isolante). Os principais lipídeos encontrados em células vegetais incluem os glicolipídeos e outros derivados de ácidos graxos, como os isoprenóides e fenilpropanóides. Cerca de 5 a 10% da massa de matéria seca das células vegetais é formado por lipídeos [75].

Nas plantas, a síntese primária dos ácidos graxos, saturados e monoinsaturados, é realizada nos plastídios (cloroplastos - organelas responsáveis pela fotossíntese). Os ácidos graxos são sintetizados a partir de uma molécula de acetil-CoA e sete moléculas de malonil-CoA, que é produzida pela carboxilação (CO_2 que é encontrado na forma de bicarbonato) do acetil-CoA. A acetil-CoA (acetilcoenzima A) é um composto intermediário essencial no metabolismo celular, constituído de um grupo acetila, de dois carbonos, unidos de maneira covalente à coenzima A. Ela procede do metabolismo dos carboidratos e lipídeos e, em menor proporção, do metabolismo das proteínas e aminoácidos. É esta reação entre o acetil-CoA + CO_2 + malonil-CoA que é catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase – Figura 3.7) (Figura 3.8).

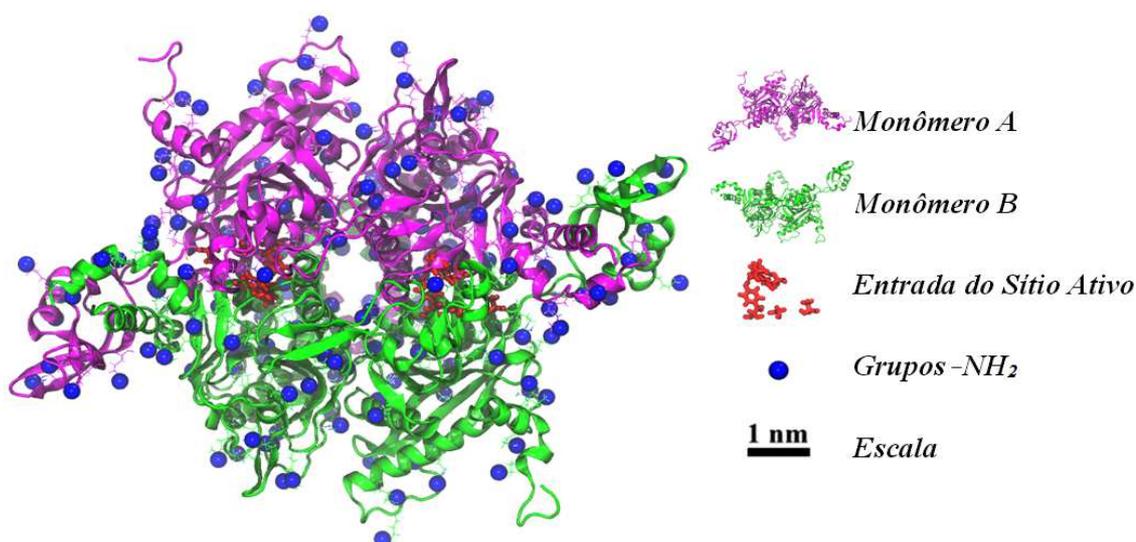


Figura 3.7 Representação da Estrutura tridimensional da enzima ACCase, fornecida através de Simulações Moleculares.

Neste contexto, pode-se definir a ACCase como uma enzima chave no metabolismo dos ácidos graxos, que regula a biossíntese e oxidação dos lipídeos, catalisando a carboxilação (dependente de ATP) da acetil-CoA para produzir malonil-CoA [76]. Essa reação catalisada pela ACCase é realizada em duas etapas, onde primeiramente ocorre a carboxilação dependente de ATP e de biotina, e a conseqüente transferência do grupo carboxila a partir de biotina da acetil-CoA catalisada pela carboxiltransferase (CT) [77] (Figura 3.8). A biotina é o cofator da enzima piruvato carboxilase e é uma molécula especializada no transporte de dióxido de carbono. Nas células vegetais, grandes quantidades de malonil-CoA são necessárias nos plastídeos para sustentar a síntese dos ácidos graxos, além o alongamento de ácidos graxos para a síntese de flavonóides (metabólito secundário com ação antioxidante) e fitoalexinas (proteína enzimática presente na parede celular vegetal que mantém a parede livre de microrganismos deletérios para a mesma) no citosol [78].

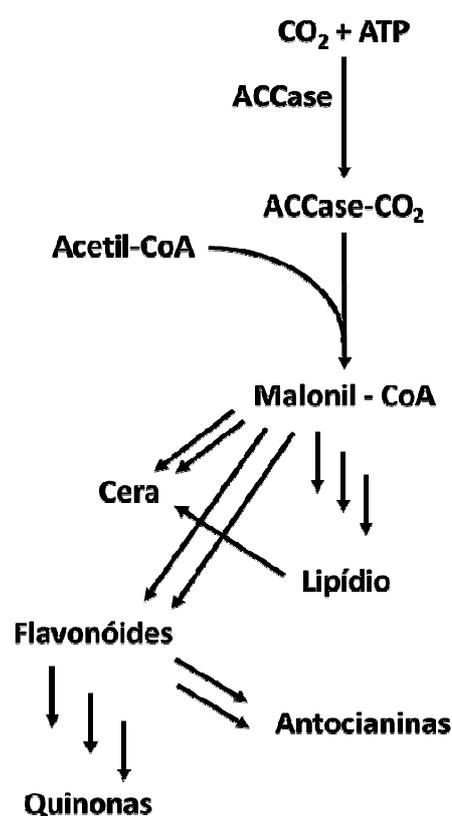


Figura 3.8 Via da síntese dos lipídeos, catalisada pela enzima ACCase [79].

Duas isoformas da ACCase são identificadas em células vegetais [80, 81]: ACCase heteromérica e homomérica, sendo que a ACCase heteromérica localiza-se no cloroplasto na maioria das plantas e é composta de quatro subunidades de proteína transportadora de biotina: carboxila (PTBC), biotina carboxilase (BC), carboxiltransferases α e β (CT-CT α e β -). Enquanto a ACCase homomérica localiza-se no citosol e é composta por um peptídeo de cadeia simples que inclui quatro domínios de função, BC, BCCP, CT e CT- α β -.

Na forma cloroplástica, vários domínios de ACCase foram identificados como sendo o destino de dois grupos de herbicidas: aryloxyphenoxypropionatos (APPs) e ciclohexanodionas (CC) [79, 82]. Ambos os tipos de herbicidas inibem seletivamente a atividade da carboxiltransferase da ACCase, inibindo assim a síntese do malonil-CoA, que impede, conseqüentemente, a síntese de lipídeos e a formação de constituintes essenciais das membranas plasmáticas das células e organelas. Essa deficiência provoca transtornos sobre a permeabilidade celular e,

posteriormente, o rompimento da estrutura das membranas, bem como outras deficiências, como a produção de hormônios e aminoácidos [76].

Nos animais, a ACCase também está relacionada com a síntese de ácidos graxos. Natter e Kohlwein [83] recentemente afirmaram que as células cancerígenas são caracterizadas por uma síntese elevada de ácidos graxos, que também é realizada através da conversão da acetil-CoA para malonil-CoA catalisada pela ACCase. A interferência da atividade da ACCase em animais, seja pela utilização de inibidores ou silenciamento da expressão genética, demonstrou ser deletéria para vários tipos de células cancerosas [84, 85]. O tratamento de células de câncer de próstata com o inibidor específico da ACCase (sorafenó A) levou ao impedimento do crescimento desses tipos de células e, em última análise, levou à morte celular [84]. Assim, os fluxos reduzidos de conversão da acetil-CoA para malonil-CoA pode ser um dos principais fatores determinantes para a reprogramação metabólica de uma célula cancerígena. Estudos recentes também sugerem que a inibição da ACCase em animais pode estar ligada às síndromes metabólicas como diabetes tipo 2 e obesidade, bem como uma maior probabilidade dos pacientes com esses transtornos desenvolverem episódios de câncer [83].

3.4.3 Acetil-coA Carboxilase (ACCase) e Diclofop – Mecanismo de Ação

Sabe-se que os herbicidas afetam as plantas bloqueando processos fisiológicos importantes que são necessários para o seu crescimento e desenvolvimento normais. Normalmente, o ingrediente ativo do herbicida inibe uma ou mais enzimas que catalisam algumas das reações importantes envolvidas na biossíntese de compostos orgânicos, como compostos estruturais das células e hormônios. Uma vez aplicado, cerca de 70% do volume de diclofop atinge as folhas das gramíneas e os outros 30% ficam ligados permanentemente nas paredes das células vegetais, sendo metabolizado em componentes polares [86]. Uma vez absorvidos, os herbicidas do grupo dos APPs são translocados de forma apoplasmática até as partes meristemáticas, onde exercem sua ação herbicida (como é definido na Figura 3.9), já que são nestas regiões que apresentam

melhor desempenho. Isso acontece em virtude dos pontos meristemáticos apresentarem crescimento ativo, como rápida divisão celular e cloroplastos ativos [75].

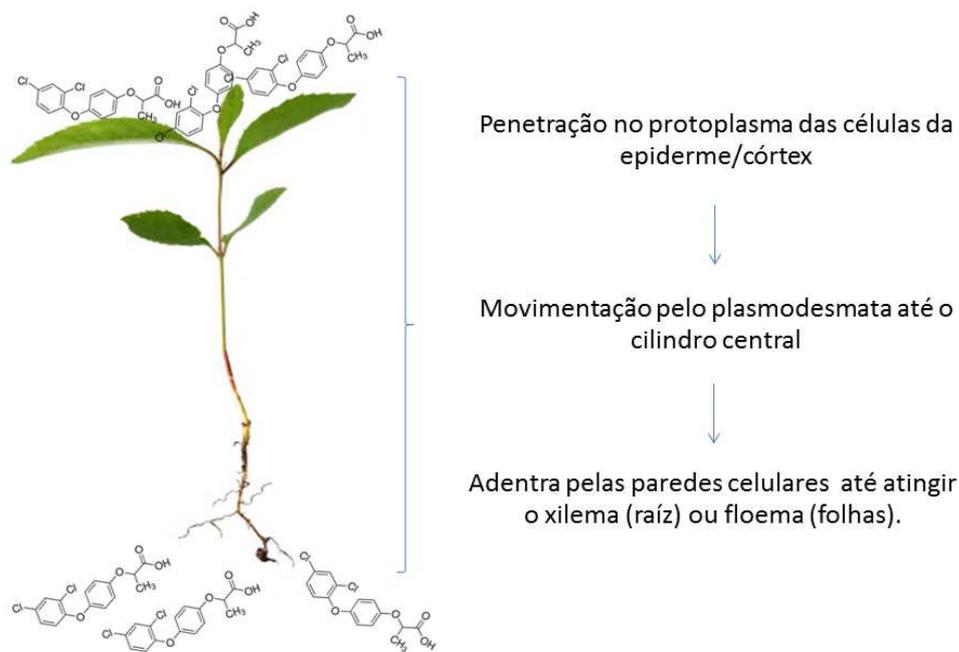


Figura 3.9 Modelo esquemático das possíveis entradas do diclofop na célula vegetal através do fluxo de massa aposimplástico. Nesse modelo, o diclofop circula pela planta através do transporte do xilema para o floema, e vice-versa, atravessando os tecidos devido à estreita justaposição entre os sistemas.

Essa dinâmica de atuação onde o diclofop age de forma reversível e não competitiva sobre a enzima ACCase reduzindo a capacidade das plantas em produzir malonil-CoA, é o mecanismo de ação proposto mais conhecido para a interação diclofop-ACCase. Outro mecanismo de ação recentemente proposto para este grupo de herbicidas é o biofísico, que envolve alterações no gradiente de prótons na membrana plasmática (despolarização), alterando sua permeabilidade e provocando a morte da célula (Figura 3.10) [87]. Esses dois mecanismos de ação podem coexistir [88, 89].

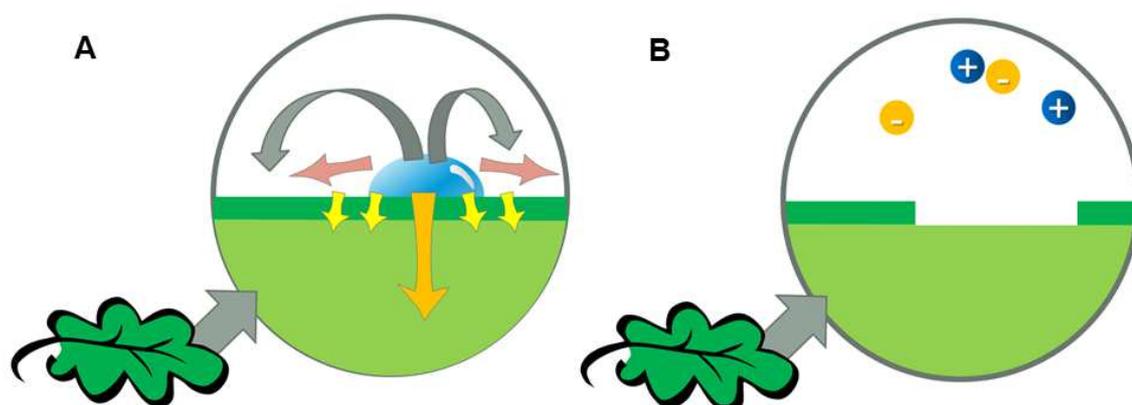


Figura 3.10 Modelo esquemático do mecanismo de ação de despolarização da membrana da célula vegetal pelo diclofop. (A) Contato do herbicida com a folha e (B) Rompimento da membrana plasmática e liberação dos íons.

As membranas plasmáticas e subcelulares são essenciais para a realização e suporte dos processos fisiológicos. A perda da estabilidade da membrana afeta negativamente as funções bioquímicas e, conseqüentemente, a viabilidade celular. Sendo assim, a integridade da membrana é indicada como um bom marcador para monitorar estresses bióticos e abióticos em plantas, incluindo tensões induzidas por herbicidas [90, 91]. O diclofop também é apontado como desestabilizador de membranas celulares, alterando seus potenciais eletrofisiológicos [87] através de processos independentes de luz, como a própria integridade da membrana, por exemplo [91]. A afinidade que o herbicida possui com certos alvos, pode gerar espécies reativas de oxigênio, ocasionando a peroxidação da membrana (mitocondrial), resultando na liberação descontrolada de eletrólitos da célula [91]. Hauler *et al.* [92] relataram que o diclofop, de fato, perturba a estabilidade da membrana, alterando o gradiente de prótons da transmembrana, reduzindo a polaridade da membrana de -100 mV para cerca de -30 a -50 mV. Isto pode ser monitorado através da medição da condutividade elétrica de um meio no qual as amostras de plantas são expostas a vários inibidores. Também foi observado que os aryloxyphenoxypropionatos e seus

análogos interferem da mesma forma, na manutenção de gradientes eletroquímicos das membranas encontradas em animais [93, 94].

Os primeiros e mais evidentes sintomas provocados pelos herbicidas inibidores da ACCase são observados nas regiões meristemáticas, geralmente entre cinco e quinze dias após a aplicação [75, 87]. Esses sintomas incluem a permeabilidade na membrana plasmática que evolui para poros que colapsam com o subsequente gradiente do potencial eletroquímico perturbado, alterando, assim, o pH citoplasmático [95]. Esses indícios culminam na paralisação do crescimento da planta, incluindo a clorose, necrose e morte dos pontos de crescimento e da planta devido à falta de ácidos graxos e morte celular [75, 95].

3.4.4 Considerações Finais

Nesta seção de revisão da literatura foram apresentados conceitos fundamentais para o entendimento do princípio e funcionamento do nanobiossensor proposto neste trabalho. Dessa forma, as próximas seções serão embasadas em conceitos, técnicas e ferramentas aqui apresentados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELAGEM MOLECULAR

A Modelagem Molecular é vastamente empregada para simular o comportamento e movimento de moléculas com o intuito de alcançar um entendimento mais profundo de processos tais como estabilidade de macromoléculas, enovelamento de proteínas, alterações conformacionais, reconhecimento molecular, *design* de substâncias (fármacos, principalmente), efeitos quânticos, entre outros [96]. Além da abordagem experimental, simulações computacionais baseadas na dinâmica molecular são amplamente utilizadas em Nanotecnologia visando prever as propriedades e o comportamento dos nanomateriais.

4.1.1 Sistema Molecular

A estrutura molecular da enzima ACCase utilizada para os modelos teóricos foi obtida a partir do *Protein Data Bank*, com a identificação (referência) de 1UYR. Em contraste, as estruturas moleculares do APTES e do herbicida diclofop foram previamente ajustadas utilizando o Programa ORCA 2.8.0 [97]. Os cálculos quânticos foram realizados a fim de verificar todos os parâmetros não explorados que foram utilizados para executar todas as simulações de Docking Molecular (DM) para o sistema de interação entre a ACCase e o herbicida diclofop neste trabalho.

4.1.2 Docking Molecular (DM)

O docking molecular pode ser definido como a predição da estrutura de complexos receptor-ligante. Em outras palavras, é o estudo do melhor ajuste entre duas estruturas tridimensionais [96]. É baseado em dados de Cristalografia, já que esta permite a determinação da posição dos átomos presentes na estrutura das macromoléculas. O processo do docking molecular pode ser dividido em quatro partes: planejamento do experimento *in silico* (realizado utilizando

programas e simulações computacionais); realização do experimento computacional com objetivo de formar complexos; validação do experimento (*redocking*) e; avaliação dos resultados obtidos no experimento [96, 98]. Dados dessa natureza são úteis para entender certos tipos de doenças, bem como seus mecanismos de possíveis curas [99], bem como prever o funcionamento de dispositivos nanométricos, como nanossensores, por exemplo [52].

Neste sentido, como ponto de partida para os cálculos de acoplamento (ligação específica), a estrutura molecular da ACCase, diclofop, e do conjugado APTES + diclofop foram inseridos no programa AutoDock4.0 [100]. Em uma estrutura molecular rígida da ACCase, o diclofop e o conjugado foram ancorados com cargas parciais calculadas pelo método de Gasteiger-Huckel [101], que é implementado no programa AutoDock Tools. Uma grade pré-definida em 3D foi criada em diversas regiões ao longo da enzima de modo a avaliar as posições com energias de ligação mais favoráveis para serem utilizadas em cálculos de Dinâmica Molecular. Além disso, os mapas de grade contendo os pontos X-Y-Z para as células unitárias do conjugado foram usados para restringir esses pontos, dentro dos sítios ativos. Somado a isso, o Algoritmo Genético Lamarckiano (do inglês *Lamarckian Genetic Algorithm*- LGA) foi aplicado para a classificação do espaço conformacional das células unitárias do conjugado e um conjunto contendo 10 estruturas acopladas (*dockadas*) no LGA foram obtidas.

4.1.3 Dinâmica Molecular

A partir das posições acopladas, simulações de DM foram realizadas para obter energias de interação baseadas nas energias de vdW e eletrostáticas entre o herbicida diclofop e a ponte de ligação com o herbicida. Cálculos de DM foram realizados utilizando o software NAMD 2.7 [102] e os resultados foram analisados utilizando *scripts* de *Tool Command Language* (TCL) implantados no programa VMD [103]. Através da aplicação do termostato de Langevin e do pistão Langevin [104], o sistema foi minimizado, equilibrou-se a 310K (temperatura ideal para a atividade enzimática da ACCase) e a pressão foi ajustado para 1 atm, respectivamente. Estas simulações foram realizadas no conjunto NVT (em

número constante de partículas (N), volume (V) e de temperatura (T)). Um atalho de 1,4 nm foi utilizado para as interações eletrostáticas de curto alcance e de vdW. As contribuições de longo alcance foram tratadas através do Entrosamento de Partículas de Ewald (do inglês *Particle Mesh Ewald* - PME) [105]. Os parâmetros de campo de força para simular os movimentos do diclofop, diclofop + conjugado com ACCase foram calculados e empregados no protocolo de CHARMM Force Field [106], como está indicado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Sistemas Simulados.

SISTEMA	NÚMERO DE ÁTOMOS DO SOLUTO	NÚMERO DE ÍONS	NÚMERO DE MOLÉCULAS DO SOLVENTE
ACCcase + diclofop	22121	31	119602
ACCcase + conjugado	22147	30	119602

As simulações computacionais foram realizadas pelos alunos de mestrado e doutorado da UFSCar-SP, Adriano Moraes Amarante e Guedmiller Souza de Oliveira da UFSCar, respectivamente, sob as orientações do Prof. Dr. Fábio de Lima Leite (UFSCar-SP) e Prof. Dr. Eduardo Faria Franca (UFU-MG).

4.2 REAGENTES

A enzima acetil-CoA carboxilase e seus anticorpos específicos foram obtidos por intermédio da CUSABIO® (Hubei Province, P.R.China), como partes do kit de ELISA "*Bovine Acetil-CoA carboxilase Sintetase*" (que é baseado em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas). A enzima utilizada foi a ACCase animal devido à disponibilidade comercial e também pela evidência cristalográfica de similaridade estrutural e de mecanismo de ação em animais e plantas [34]. Além disso, sabe-se que alguns herbicidas do grupo aryloxyphenoxypropionates e seus análogos interferem na manutenção dos gradientes eletroquímicos da transmembrana em animais; observações

semelhantes a esta foram relatadas em plantas, como citado anteriormente neste trabalho (item 3.4.2) [92]. A enzima deste kit foi fornecida purificada e foi reconstituída de acordo com as normas do fabricante em uma solução fornecida pelo fabricante também.

Materiais de pureza analítica foram usados no processo de funcionalização: 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), trietilamina (TEA) e glutaraldeído (solução aquosa a 25%), todos fornecidos pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). Os agroquímicos diclofop, imazaquin, o glifosato, e metsulfuron, também foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). Os *cantilevers* de AFM com ponta piramidal com e raio de curvatura < 20 nm fornecido pelo fabricante, (ponta de Si₃N₄) foram adquiridos da Microlevers Thermo Microscopes® (Sunnyvale, CA) e sua geometria pode ser vista na Figura 4.1.

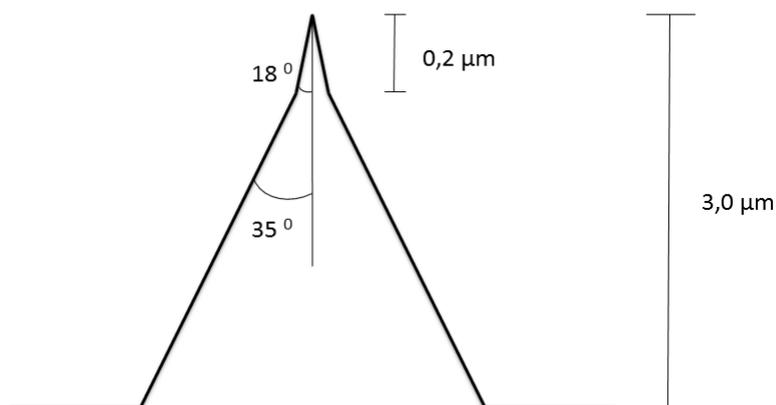


Figura 4.1 Modelo esquemático do *cantilever* de AFM para modo de contato, com ponta piramidal, utilizado neste trabalho.

4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os processos de funcionalização para a montagem molecular do nanobiossensor foram caracterizados por Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-RAMAN). O FT-RAMAN foi utilizado por ser uma técnica não destrutiva, que oferece ampla riqueza de detalhes derivadas da vibração das moléculas em diferentes níveis de energia. Desse modo, cada etapa

do processo de funcionalização pôde ser analisada química e fisicamente. O sistema foi magnificado para uma placa de nitreto de silício de 2 cm², visto que o feixe de laser do equipamento é maior do que o raio das pontas de AFM utilizadas neste trabalho, sem perdas de informações. As amostras não passaram por algum tipo de tratamento prévio.

Os espectros de Raman foram obtidos com um espectrômetro portátil (FirstGuardTM[®] / Raman Analyzer v2.2.0) e um laser 1064 nm foi utilizado como fonte de excitação para as medições de Raman. A energia de saída laser foi ajustada a 300 mW e o tempo de integração para 5000 ms. Para a construção e análise dos espectros foi utilizado o programa Origin Pro 8[®].

4.4 PREPARAÇÃO DO NANOBIOSENSOR VIA FUNCIONALIZAÇÃO QUÍMICA DA PONTA DO AFM

4.4.1 Método de Fabricação na Nanoescala

Os nanobiossensores foram construídos por meio do processo *bottom up* (adição de átomos ou moléculas, “de baixo para cima”), envolvendo modificações químicas e funcionalização das superfícies de nitreto de silício e mica por meio da automontagem molecular [51]. Em uma abordagem mais ampla, o processo de automontagem molecular sugeriu uma construção passiva de “blocos de moléculas”, onde elas apenas se *encaixaram* sem inserção de energia externa. O processo desta técnica foi influenciado por reações e interações químicas, interações eletrostáticas e fenômenos físicos e biológicos, onde as moléculas reagiram coletivamente com seu substrato específico por intermédio de ligações covalentes (adsorção química) ou de forças intermoleculares (adsorção física) [51]. Aqui, a funcionalização química envolveu adição e troca dos grupos químicos das superfícies das pontas de AFM e da mica. O principal objetivo da modificação química foi melhorar o comportamento químico das superfícies observando a biomimética, ou seja, dando suporte para essas reações e interações acontecerem em condições brandas de temperatura e pH, por exemplo, conforme ocorrem na natureza [51].

Em adição, os métodos de funcionalização utilizados aqui para fabricação das superfícies com terminações sensitivas na nanoescala, possuíram mais caráter termodinâmico do que cinético, já que o controle termodinâmico prioriza a formação de produtos e interações termodinamicamente estáveis (equilíbrio termodinâmico), enquanto que o controle cinético prioriza a velocidade do acontecimento das interações e produtos [51]. Dessa forma, os fatores termodinâmicos desempenharam um papel fundamental na seletividade, reconhecimento molecular e automontagem do nanobiossensor proposto [51].

4.4.2 Método de Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas é uma ferramenta muito útil para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade [107]. O termo imobilização é empregado para delinear a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. A imobilização de enzimas a suportes diversos oferece diversas vantagens como: a utilização de pequenos volumes de amostra, aumento do tempo de vida e da estabilidade da estrutura 3D da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação do pH sem perda considerável da atividade catalítica, operar de forma contínua para possibilitar maior controle das variáveis do processo e reaproveitamento da enzima [107-109]. Essas vantagens foram particularmente úteis neste estudo onde os produtos da reação enzimática com os inibidores são detectados diretamente e em tempo real por análises de AFS.

Os métodos para imobilização de enzimas podem ser classificados em duas categorias básicas: imobilização em suportes e encapsulamento [109]. Neste trabalho, a imobilização das enzimas no suporte (ponta do AFM) foi realizada via ligação covalente. Neste tipo de imobilização, o estabelecimento da ligação suporte-enzima ocorre entre os grupos reativos existentes no suporte e os grupos dos resíduos de aminoácidos localizados na estrutura proteica em posições não estratégicas para a catálise.

4.4.3 Construção do Nanobiossensor

A construção dos nanobiossensores baseou-se no trabalho de Etchegaray *et al.* e da Silva *et al.* [21, 110] com modificações para se adequar ao sistema apresentado. A montagem molecular do nanobiossensor (Figura 4.2) se iniciou inserindo os *cantilevers* de AFM em uma placa de Petri esterilizada através de luz UV por 30 minutos em uma capela VECO Clean de fluxo laminar. Após este procedimento, os *cantilevers* e sondas de AFM foram funcionalizados inicialmente pela silanização com APTES. Esta reação constrói arranjos moleculares na superfície das pontas de AFM através das interações entre os seus grupos de óxido de silício e os grupos silanos presentes no APTES. As pontas de AFM foram expostas aos vapores de APTES (solução comercial) e de trietilamina (solução comercial) durante 30 minutos, a fim de promover as ligações das moléculas de APTES à superfície do *cantilever*. Os reagentes foram inseridos em poços próximos aos *cantilevers*. O passo seguinte da funcionalização foi realizado com o reagente bifuncional glutaraldeído que reagiu com APTES sobre a superfície da ponta de AFM, o qual introduziu uma terminação reativa (grupo aldeído), que reagiu com os grupos aminas (-NH₂) da enzima ACCase (elemento sensor). Nesta fase, o glutaraldeído ativou a superfície, agindo como um espaçador e proporcionando flexibilidade para a interação entre a enzima e o herbicida, o qual influenciou de forma positiva na sensibilidade do sensor (imobilização covalente da enzima no substrato). Nesta fase, as pontas de AFM foram imersas numa solução aquosa de glutaraldeído a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e foram incubadas durante 40 minutos em um dessecador. Após esse período, quatro lavagens foram realizadas com água MilliQ para remover o que não foi ligado de forma covalente à superfície das *cantilevers* de AFM. Em seguida, o elemento sensor foi induzido a se ligar covalentemente ao fragmento terminal da molécula de glutaraldeído através da imersão dos *cantilevers* de AFM na solução de enzima ACCase ($4 \mu\text{g L}^{-1}$). As pontas de AFM foram incubadas durante 35 minutos à temperatura ambiente em um dessecador. Após este período, quatro lavagens foram feitas com água MilliQ. Para concluir a funcionalização, depois da última lavagem, as pontas foram acondicionadas em um dessecador e, em seguida, foram utilizadas para análise de AFM/AFS.

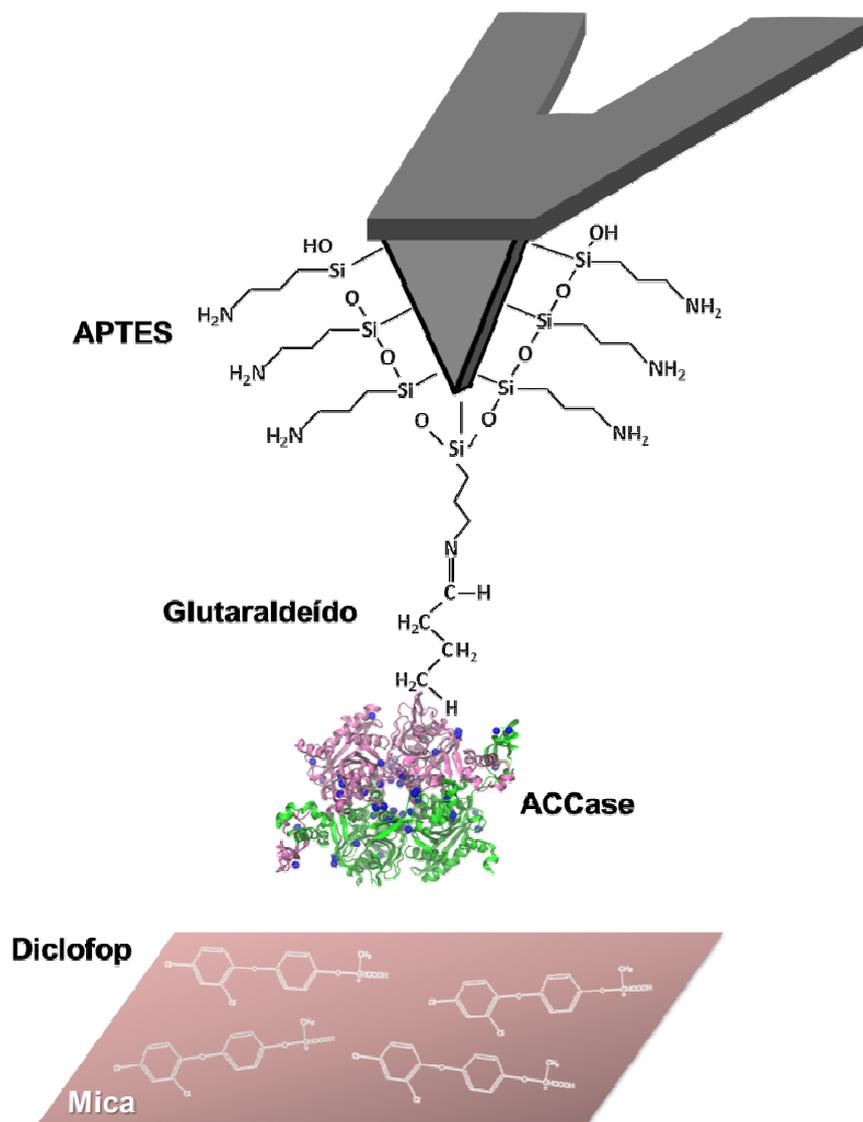


Figura 4.2 Modelo esquemático da funcionalização da ponta do AFM com APTES + Glutaraldeído + ACCase para a detecção do diclofop imobilizado na superfície da mica.

É válido apontar que nesse sistema, a interação de um ligante (ACCase) com seu receptor (diclofop) exibe duas características que são comumente empregadas para caracterizar o receptor: a especificidade molecular e a saturabilidade [111]. A especificidade molecular descreve o comportamento da interação do ligante com seu receptor em termos de afinidade e habilidade em

reconhecer molécula em particular, enquanto que a saturabilidade está relacionada à densidade do receptor [111]. A localização do receptor específico no sistema de sensoriamento proposto, precisa estar de acordo com critérios como saturabilidade, estereoespecificidade e alta afinidade entre as moléculas. Nesse contexto, a ACCase pode ser considerada como sendo um catalisador ativo e estereoespecífico, priorizando a especificidade geométrica. Em relação às propriedades vetoriais envolvidas na interação representada na Figura 4.2, elas são altamente dependentes da estrutura tridimensional das moléculas envolvidas, principalmente da ACCase. A distribuição das cargas na superfície da enzima é crucial para contribuição vetorial da força de interação, sendo que esta pode sofrer instabilidades atômicas descrevendo padrões não lineares de interação na maioria dos eventos (Figura 4.3).

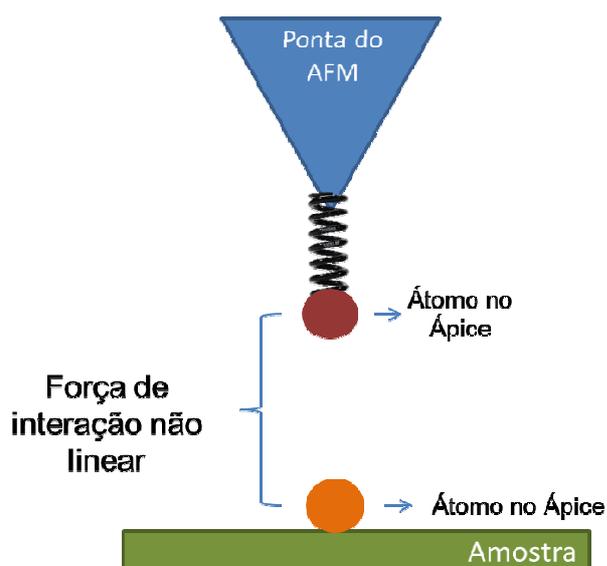


Figura 4.3 Modelo esquemático que descreve a interação não linear entre a ponta do AFM e amostra. A mola representa as diferentes trajetórias que a interação vetorial pode descrever.

4.5 IMOBILIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS ALVO VIA FUNCIONALIZAÇÃO QUÍMICA DO SUBSTRATO

Para imobilizar as moléculas-alvo no substrato (camada fresca de mica muscovita - New York Co. Nova York, EUA), em que os herbicidas (moléculas alvo) estão covalentemente imobilizados, foi utilizado um procedimento semelhante ao descrito no item 4.4, com uma modificação. Para a montagem do substrato, a funcionalização começa com a formação de uma ligação covalente com os grupos hidroxilas presentes na superfície da mica e o grupo silano das moléculas de APTES. Após esta etapa, ocorreu uma reação química entre o grupo amino presente nas moléculas de APTES, com os grupos carboxilas (-COOH) presentes nas moléculas do herbicida diclofop, imazaquin, metsulfuron e glifosato. Esta reação formou uma ligação peptídica entre os grupos funcionais, favorecendo, assim, a geometria das moléculas de herbicidas de modo que estas possam efetuar a inibição da enzima. Assim, após a exposição a vapores de APTES e trietilamina, os substratos foram imediatamente imersos nas soluções de agroquímicos (1mM) durante 35 minutos e, em seguida, são mantidos em um dessecador para eliminação do solvente presente nas soluções comerciais dos agroquímicos e posterior análise de AFM/AFS.

4.6 MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA E ESPECTROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O Microscópio de Força Atômica Microscópio Thermo Auto Probe CP[®] foi utilizado nos procedimentos de Espectroscopia de Força Atômica (AFS). A calibração dos *cantilevers* foi realizado de acordo com o método descrito por Sader *et al.* [112], apresentando o sistema de vibração e de medição da frequência de ressonância do ar. As medidas foram obtidas por força de aproximação e afastamento da ponta com uma taxa de $10 \mu\text{ms}^{-1}$. O modo contato foi utilizado para a determinação de todas as curvas de força, e estas foram realizadas em tampão fosfato de sódio a $20 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em pH 7,0, a temperatura e umidade ambiente de aproximadamente 25°C e 40%, respectivamente. O volume utilizado da solução tampão na célula líquida do AFM foi de 500 μL . Vinte

determinações foram realizadas para cada sonda, totalizando 19 medidas estatisticamente válidas. Este número precisou ser restrito devido ao tempo de atividade enzimática fornecida pelo fabricante após a reconstituição da enzima (4h). Todas as medições foram obtidas por dois ciclos com taxa de varredura de $10 \mu\text{ms}^{-1}$ com *cantilevers* de AFM de nitreto de silício adequados para o modo contato com constante de mola nominal (k) igual a 0,03 N/m e calculada (média de 10 pontas) igual a $0,037 \pm 0,003$ N/m. Para a análise e montagem das curvas, foi utilizado o programa TopoMetrix SPMLab 4.0[®] e Origem Pro 8[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR

As simulações de docking molecular e a dinâmica molecular tornaram-se parte integrante de muitos estudos para investigações de compostos biológicos [113]. Juntas, ambas as técnicas conseguem prever e otimizar o encaixe molecular ligando substratos diversos ao sítio ativo da proteína receptora, por exemplo, investigando os mecanismos de interações proteína-ligante ao nível atômico, fornecendo assim, informações dinâmicas e estruturais [113].

O herbicida diclofop inibe a ACCase por bloqueio de um dos dois sítios ativos disponíveis na estrutura da enzima. O bloqueio ocorre de uma maneira que o diclofop é ligado aos seguintes resíduos Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A e Phe1956B Ala1627A mostrados na Figura 5.1 (referência PDB: 1UYR) [114] por meio de forças eletrostáticas e interações de vdW. O resíduo Phe1956B foi removido das Figuras 5.1B, 5.1C e 5.1D para uma melhor visualização das estruturas. O processo de inibição da ACCase pelo herbicida mencionado foi reproduzido a partir do método de acoplamento do diclofop nas regiões correspondentes aos resíduos da Figura 5.1A, também apresentados em púrpura nas Figuras 5.1B, 5.1C e 5.1D. A Figura 5.1B mostra a melhor conformação e posição do diclofop (verde) obtida a partir de dados de cristalografia. As Figuras 5.1C e 5.1D mostram as melhores posições e conformações obtidas a partir de cálculos de Docking Molecular do diclofop e diclofop + APTES obtidos para o sistema do nanossensor proposto neste trabalho.

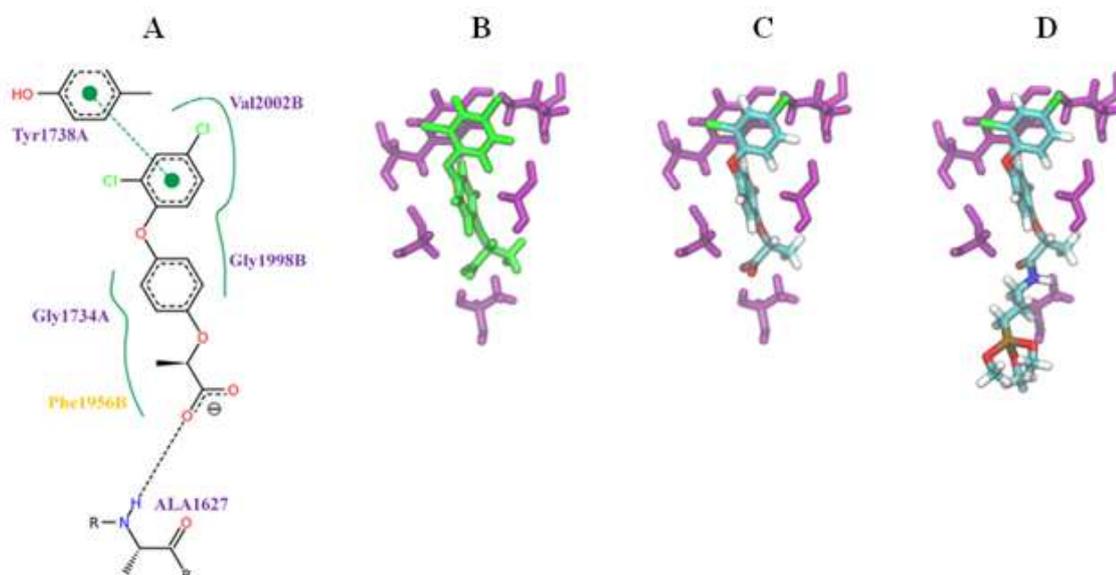


Figura 5.1 Docking e Dinâmica Molecular para estudos prévio de conformação geométrica das moléculas alvo e sensora. (A) Diclofop e os resíduos Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A e Phe1956B Ala1627A; (B) Posição cristalográfica; (C) Docking do diclofop e; (D) Docking do diclofop+APTES. Referência PDB: 1UYR.

Para complementar os resultados de acoplamento, a metodologia de Dinâmica Molecular permitiu obter a energia média de ligação considerando a flutuação e mobilidade do sistema enzima-inibidor (ACCCase+diclofop) para investigar duas situações de funcionalização do substrato: mica + APTES + glutaraldeído + diclofop e mica + APTES + diclofop, como são mostrados na Tabela 5.1. Por meio desses dados, concluiu-se que a melhor arquitetura molecular no substrato seria a segunda situação mencionada acima.

Tabela 5.1 Energias de interação entre a enzima ACCase e o inibidor diclofop para duas situações de arquitetura molecular do substrato.

SISTEMA	ELETROSTÁTICA (kcal / mol)	vdW (kcal / mol)	TOTAL(kcal / mol)
ACCcase + (diclofop+glutaraldeído+APTES)	-75,6933	-43,3299	-119,023
ACCcase + (diclofop+APTES)	-5,3546	-64,7615	-70,1161

A Tabela 5.1 apresenta as contribuições eletrostáticas e de vdW para as forças que mantêm as interações dos ligantes ligados à estrutura molecular da ACCase. Como pode ser visto, quando o inibidor diclofop está no sítio de ligação da enzima ACCase, a contribuição para a energia total vem das interações eletrostáticas, principalmente. Em contraste, quando este inibidor está ligado ao agente de reticulação (glutaraldeído), a contribuição vem principalmente das interações vdW.

No final do processo de inibição, um dos átomos de oxigênio do grupo carboxila da molécula de diclofop está disponível na solução, enquanto que o restante é incorporado por um saco hidrofóbico formado pelos resíduos envolvidos na reação [114]. A presença deste oxigênio livre contribui para o conjugado APTES + diclofop não perder a sua característica de inibição, como pode ser visto através de uma breve comparação entre os valores das energias de ligação entre as situações descritas na Tabela 5.1. Este resultado, em particular, corroborou com o experimental ao fornecer uma prova teórica que é possível montar e fixar o herbicida diclofop sobre a superfície do substrato de mica, bem como a enzima ACCase nas pontas de AFM, sem danos nas habilidades de inibição das moléculas do sistema de sensoriamento proposto.

5.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE E MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE MONTAGEM DO NANOBIOSSENSOR E PARA AS ETAPAS DE IMOBILIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS ALVO

5.2.1 Espectroscopia Raman para análise e monitoramento da funcionalização do nanobiossensor

A Figura 5.2 mostra o espectro RAMAN para o padrão líquido do APTES, seguida da Tabela 5.2, onde podem ser encontrados os principais números de onda dos picos e suas respectivas atribuições referentes aos sinais dos grupos funcionais. Já a Figura 5.3 mostra o espectro RAMAN para a primeira etapa da funcionalização da construção molecular do nanobiossensor: Si_3N_4 + APTES, seguida, também, da Tabela 5.3, onde estão dispostos os números de onda e suas atribuições. Em ambas as figuras (5.2 e 5.3), são encontrados os picos típicos do estiramento Si-O-Si ($850\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) [115, 116], que são atribuídas às moléculas hidroxiladas de APTES na solução aquosa. No padrão, em 1456 cm^{-1} , e o duplete em $1369/1413\text{ cm}^{-1}$ na primeira etapa da funcionalização, correspondem às deformações do CH_3 das cadeias alquilo do APTES [117]. Confrontando os dois espectros mencionados, percebe-se que houve a formação do filme de APTES na superfície do silício.

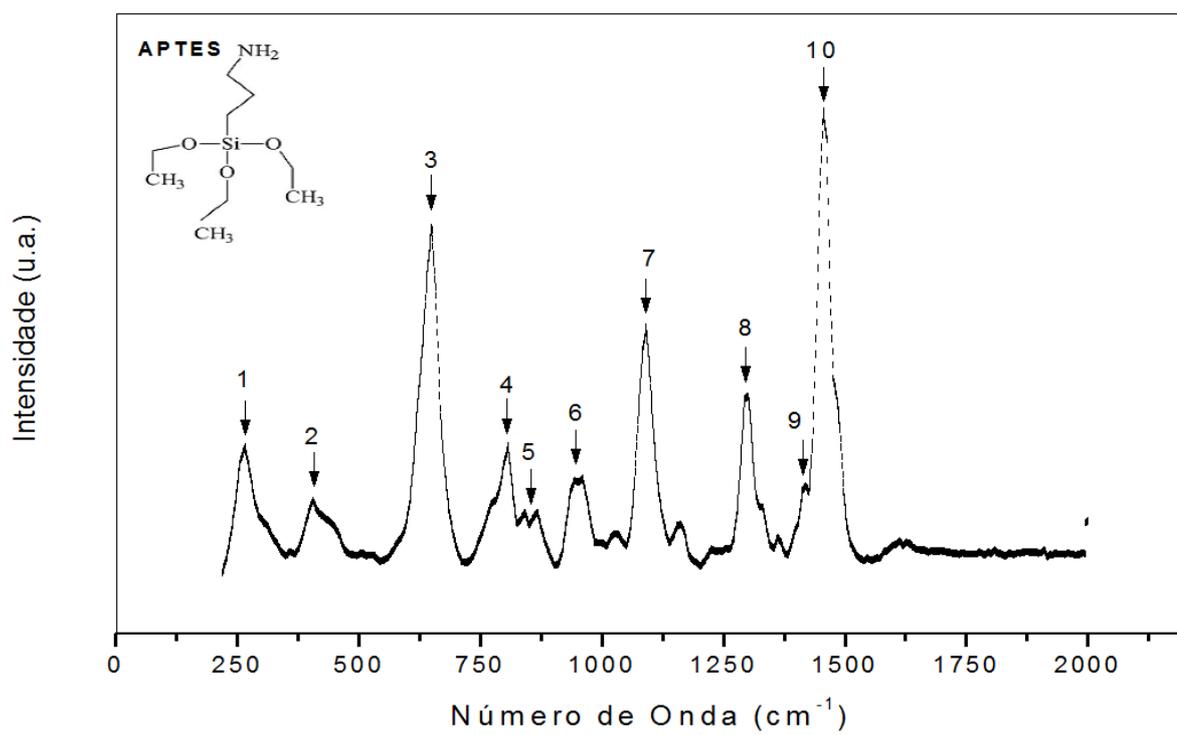


Figura 5.2 Espectro Raman do padrão de APTES.

Tabela 5.2 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão de APTES.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Torsão do CH ₃	265	Guirgis <i>et al.</i> 2004 [118]
2	Ombro de baixa frequência do ô(NH ₂)	404	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
3	Torsão do NH ₂	648	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
4	H ₂ O	807	Moreno <i>et al.</i> 1999 [119]
5	Estiramento simétrico das ligações Si-O	858	Huang <i>et al.</i> 2000[115]
6	Modo de estiramento do Si-O(Si-O-Si)	958	Trittschack <i>et al.</i> 2012 [116]
7	Estiramento antisimétrico do Si-O	1095	Trittschack <i>et al.</i> 2012 [116]
8	Estiramento do NH ₂	1294	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
9	Deformações do CH ₃	1413	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
10	Deformações do CH ₃	1456	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]

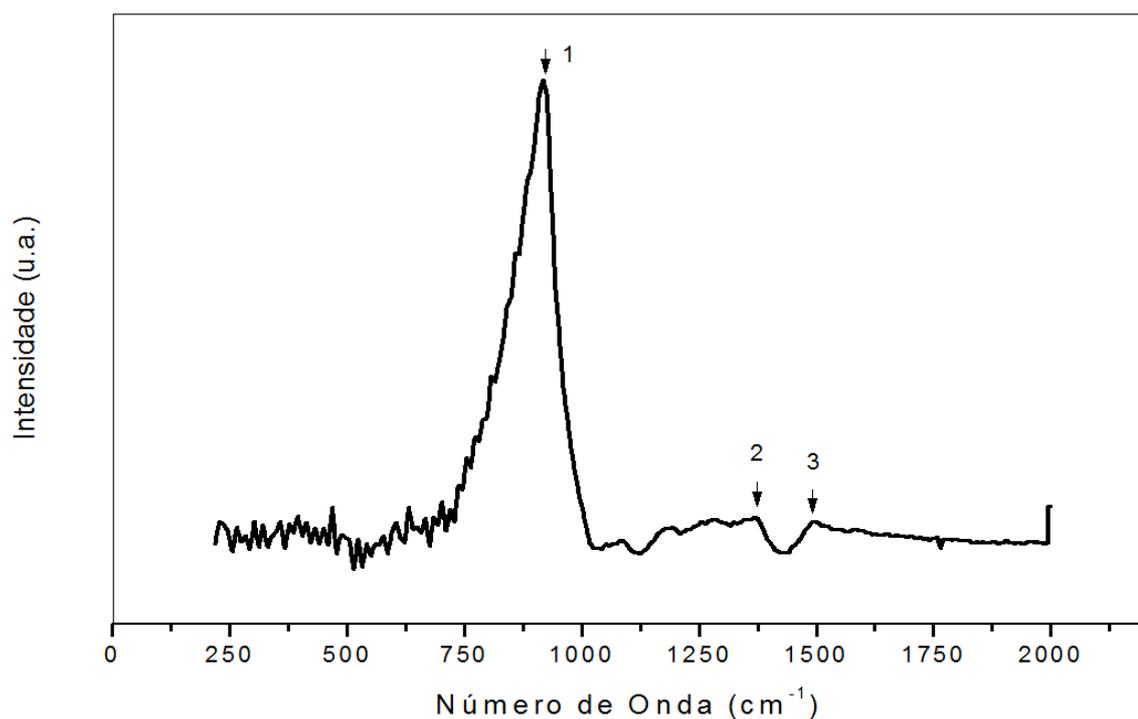


Figura 5.3 Espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície do Si_3N_4 com APTES.

Tabela 5.3 Atribuições de banda do espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície do Si_3N_4 com APTES.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm^{-1})	Referências
1	Modo de estiramento Si-O(Si-O-Si)	958	Trittschack <i>et al.</i> 2012 [116]
2	Deformação simétrica do CH_3	1369	Guirgis <i>et al.</i> 2004 [118]
3	Deformações do CH_3	1413	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [120]

Seguindo com as etapas de funcionalização, a Figura 5.4 mostra o espectro do padrão líquido do glutaraldeído (25% em solução aquosa). Na Tabela 5.4, pode-se conferir os principais picos desse espectro. Já na Figura 5.5 e na Tabela 5.5, são encontrados os mesmo dados, porém, para a segunda etapa da funcionalização: Si_3N_4 com APTES + glutaraldeído. Quando se confronta os dados dessas análises, pode-se perceber que os picos mais significativos estão compreendidos na região de $970\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$, onde são compreendidos sinais do estiramento das ligações C-C e da vibração dos grupamentos CH_2 [117, 118], e na região de $1360\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$, onde novamente são encontradas deformações pertinentes aos grupamentos CH_2 e também do CH [117]. Dados como esses, confirmam que as moléculas do glutaraldeído estão incorporadas na placa.

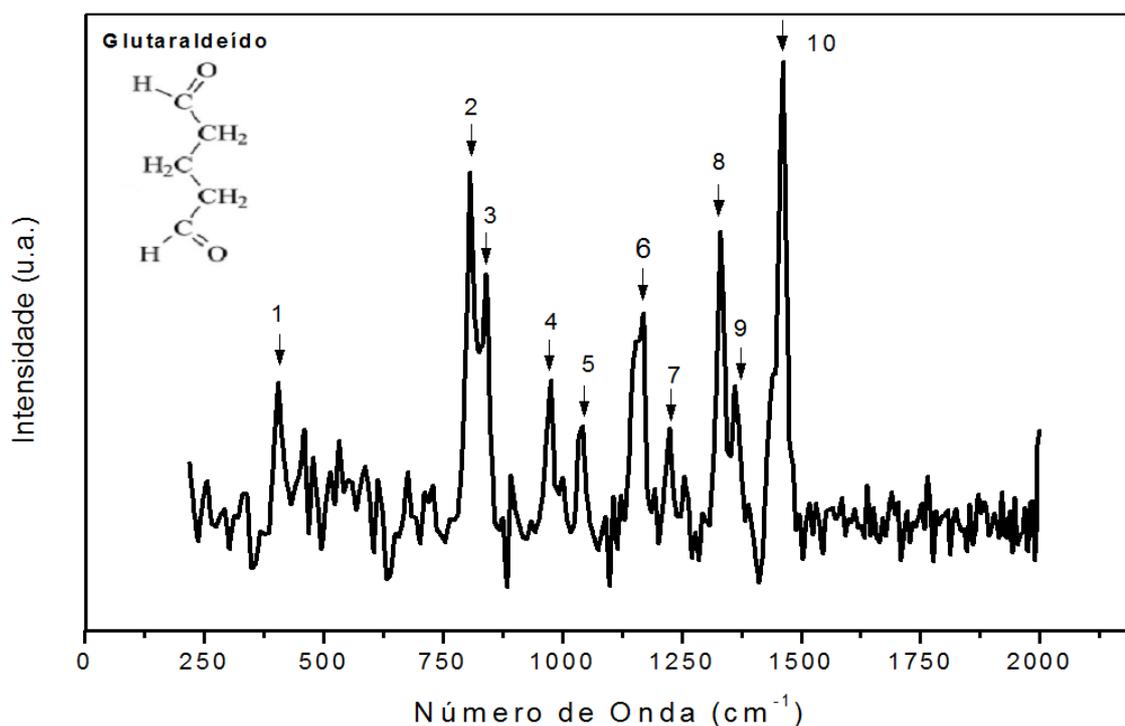


Figura 5.4 Espectro Raman do padrão de Glutaraldeído.

Tabela 5.4 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão de Glutaraldeído.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Modo <i>guarda-chuva</i> sobre o átomo C terciário	402	Ibrahim <i>et al.</i> 2012 [121]
2	H ₂ O	807	Moreno <i>et al.</i> 1999 [119]
3	Balanço duplete do CH ₂	844	De Gelder <i>et al.</i> 2007 [122]
4	Estiramento da ligação C-C	976	Guirgis <i>et al.</i> 2004 [118]
5	Modo de balanço do CH ₂	1045	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
6	Agitação do CH ₂	1172	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
7	Agitação do CH ₂	1227	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
8	Vibrações do CH ₂	1330	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
9	Deformação do CH	1363	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
10	Deformação da vibração do CH ₂	1462	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]

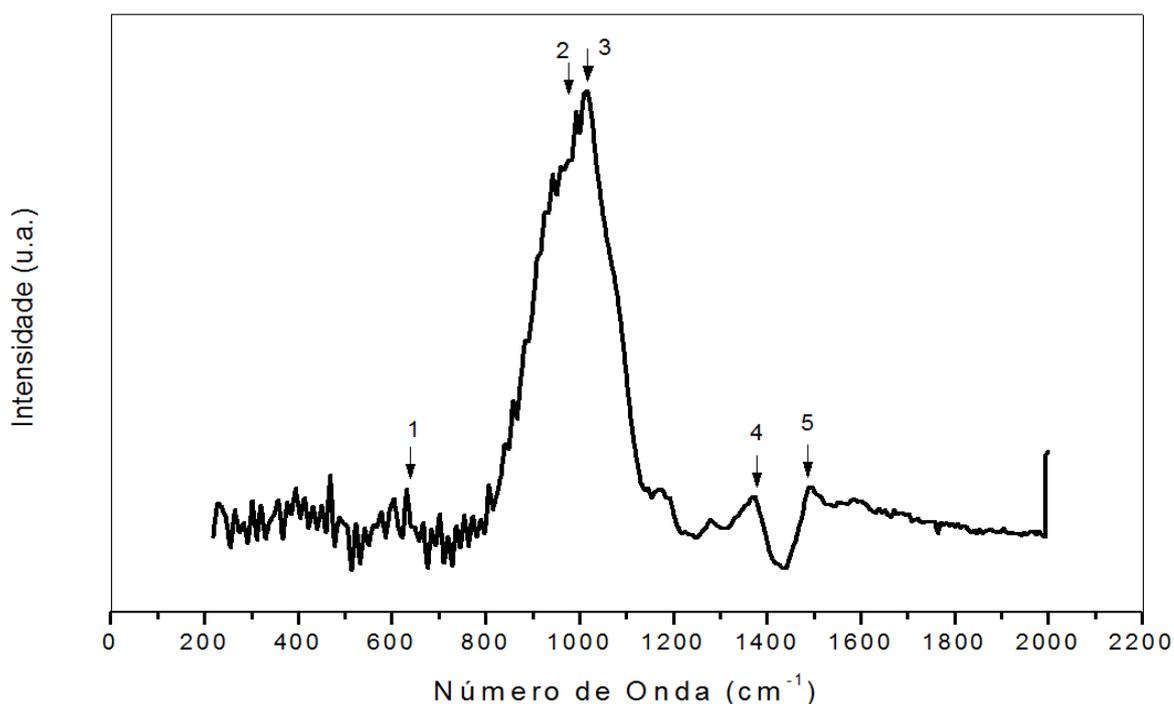


Figura 5.5 Espectro Raman da segunda etapa da funcionalização da superfície do Si_3N_4 com APTES + glutaraldeído.

Tabela 5.5 Atribuições de banda do espectro Raman da segunda etapa da funcionalização da superfície do Si_3N_4 com APTES + glutaraldeído.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm^{-1})	Referências
1	COOH	630	Podstawka <i>et al.</i> 2005 [123]
2	C-C	998	Podstawka <i>et al.</i> 2005 [123]
3	Estiramento da ligação CNH_2 ou C-Modos de estiramento das ligações O-C C-OH	1030	Pereira <i>et al.</i> 2003; Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120, 124]
4	Deformação do CH	1363	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]
5	Vibração de deformação do CH_2	1462	Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117]

A Figura 5.6 mostra o espectro RAMAN para o padrão sólido da ACCase e a Tabela 5.6 explica os principais picos que foram encontrados. Assim, as características fundamentais do espectro RAMAN para o padrão da ACCase são cinco picos, que podem ser associados com o espectro RAMAN da última etapa da funcionalização, que já é o nanobiossensor propriamente dito (Figura 5.7 e Tabela 5.7). São eles: $460/450\text{ cm}^{-1}$, $993/999\text{ cm}^{-1}$, $1047/1045\text{ cm}^{-1}$, $1367/1367\text{ cm}^{-1}$ e $1462/1462\text{ cm}^{-1}$, que correspondem, respectivamente, às vibrações das pontes de ligações de carbono não planas, vibrações do C-N, vibrações do NH_2 , vibrações do estiramento do COO^- ou CNH_2 e vibrações do CH_3 ou CH_2 .

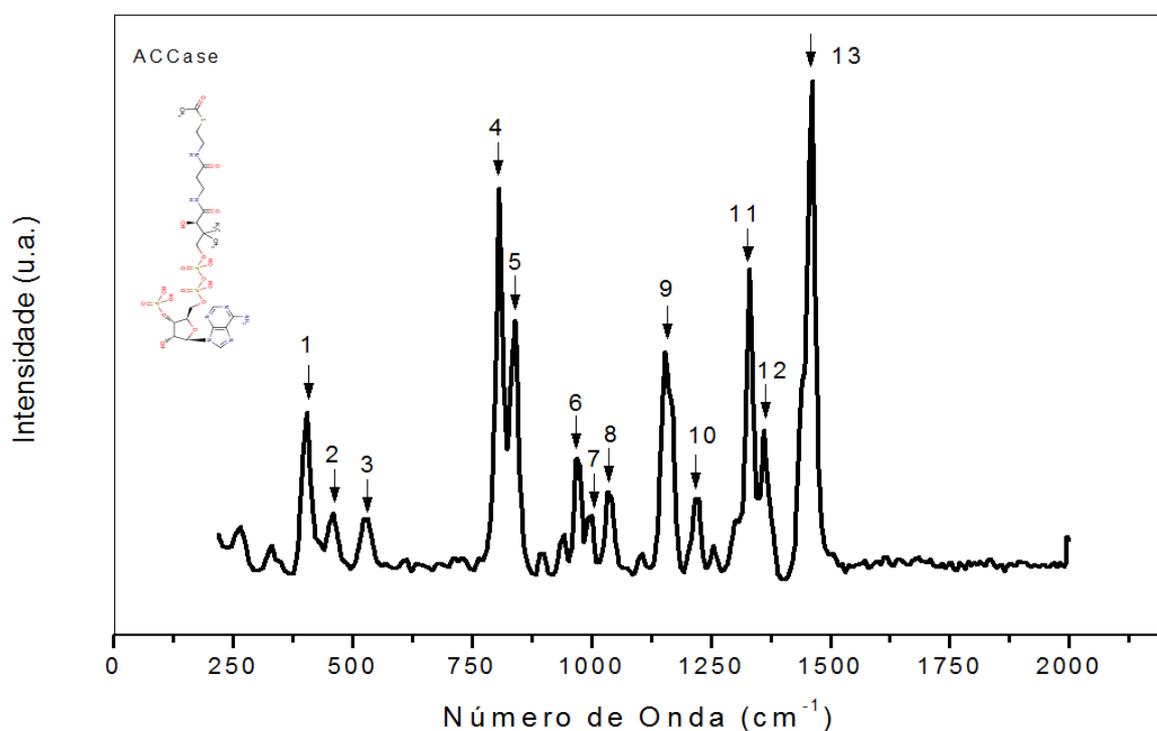


Figura 5.6 Espectro Raman do padrão da enzima ACCase.

Tabela 5.6 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão da enzima ACCase.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Vibrações das pontes de ligações de carbono não planas	405	Puviarasane <i>et al.</i> 2004 [125]
2		460	
3	Deformação da ligação C-C ou vibrações da Amina VI	550	De Gelder <i>et al.</i> 2007 [122]
4	Deformações dos grupos laterais COH, CCH e OCH	806	De Gelder <i>et al.</i> 2007 [122]
5	Estiramento simétrico do amino grupo CNC e estiramentos da ligação C-N da amina ou vibrações de C-S-C	850	De Gelder <i>et al.</i> 2007; Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120, 122]
6	Modo de agitação do CH ₃	957	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
7	Vibração C-N	993	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
8	Vibração do NH ₂	1047	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
9	Vibração do CCN	1154	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
10	Vibrações da amina III	1221	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
11	Estiramento C-NH ₂	1325	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
12	Vibrações do estiramento COO ⁻ /deformações do estiramento do C-NH ₂	1367	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
13	Vibrações das deformações do CH ₃ e/ou CH ₂	1462	Podstawka <i>et al.</i> 2004a; Podstawka <i>et al.</i> 2004b [117, 120]

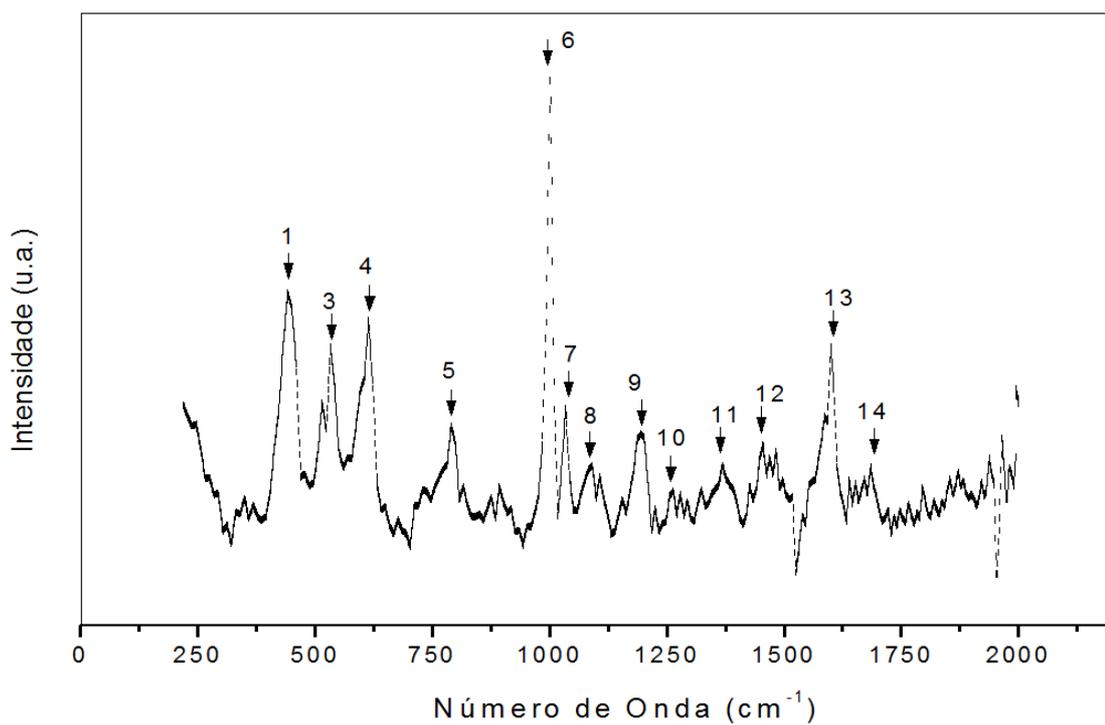


Figura 5.7 Espectro Raman da última etapa da funcionalização da superfície do Si_3N_4 com APTES + glutaraldeído + ACCase: Nanobiossensor.

Tabela 5.7 Atribuições de banda do espectro Raman da última etapa da funcionalização da superfície do Si₃N₄ com APTES + glutaraldeído + ACCase: Nanobiossensor.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Vibrações das pontes de ligações de carbono não planas	450	Puviarasan <i>et al.</i> 2004 [125]
2	Modo de agitação do CH ₂	515	Ibrahim <i>et al.</i> 2012 [121]
3	Modo de agitação do CH ₂	534	Ibrahim <i>et al.</i> 2012 [121]
4	Vibração do CONH ₂	611	Moreno <i>et al.</i> 1999 [119]
5	H ₂ O	785	Ibrahim <i>et al.</i> 2012 [121]
6	Vibração do C-N	999	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
7	Vibração do NH ₂	1045	Podstawka <i>et al.</i> 2004b [120]
8	Vibração do C-N	1081	Moreno <i>et al.</i> 1999 [119]
9	Modo de agitação do CH ₂	1179	De Gelder <i>et al.</i> 2007 [117]
10	Estiramento do NH ₂	1270	De Gelder <i>et al.</i> 2007 [117]
11	Vibrações de estiramento do COO ⁻ /deformações do estiramento do C-NH ₂	1367	De Gelder <i>et al.</i> 2007; Podstawka <i>et al.</i> 2004b [117, 120]
12	CH ₃ e/ou vibrações de deformação do CH ₂	1462	De Gelder <i>et al.</i> 2007; Podstawka <i>et al.</i> 2004b [117, 120]
13	H ₂ O	1596	Moreno <i>et al.</i> 1999 [119]
14	C=N	1687	De Gelder <i>et al.</i> 2007; Podstawka <i>et al.</i> 2004a [117, 122]

Após a funcionalização com a enzima ACCase (Figura 5.7) surgem picos semelhantes nas regiões 450-460 cm⁻¹. Essas designações podem ser atribuídas às vibrações das pontes de ligações de carbono não planas [125]. Na região 990-

1050 cm^{-1} , as atribuições correspondem às vibrações do C-N/NH₂ [120] onde, no espectro do nanobiossensor, há um aumento do sinal na região, devido ao grande número de ligações C-N presentes na estrutura da enzima. Nas últimas regiões (1367 e 1462 cm^{-1}), os sinais podem ser atribuídos às vibrações de alongamento COO⁻, deformações C-H, estiramento do C-NH₂ e deformações do CH₂ e/ou CH₃ [117, 120]. Estas semelhanças nos valores demonstram que a enzima foi, de fato, covalentemente ligada à superfície de nitreto de silício e, portanto, está disponível na superfície do nanobiossensor para promover os eventos de reconhecimento específico. Na Figura 5.8 pode-se conferir a comparação entre o padrão da ACCase e a última etapa da funcionalização do nanobiossensor, mostrando que realmente a ACCase se encontra imobilizada na superfície.

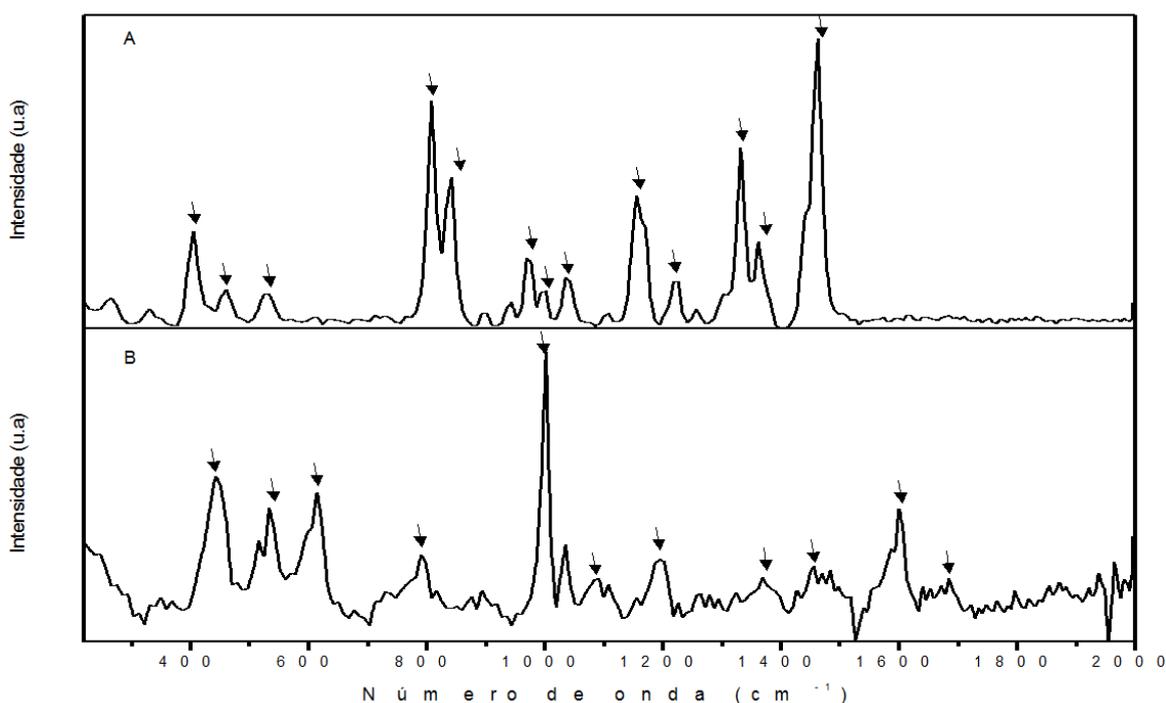


Figura 5.8 Comparação dos espectros Raman. (A) Padrão ACCase; (B) Funcionalização: Si₃N₄ + APTES + Glutaraldeído+ ACCase: Nanobiossensor.

Por fim, os valores numéricos dos principais picos encontrados tanto nos padrões, como nas etapas de funcionalização, podem ser acompanhados na

Tabela 5.8. Nela é possível verificar que certos picos de identidades encontrados nos padrões das moléculas utilizadas, também são encontrados, em sua maioria, nas etapas de funcionalização.

Tabela 5.8 Comparação das bandas/comprimento de onda onde é possível verificar regiões semelhantes dos padrões nas etapas de funcionalização e, portanto, confirmar a presença das moléculas de ACCase na superfície reativa.

ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE E MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE MONTAGEM DO NANOBIOSENSOR					
APTES Padrão	Funcionalização 1	Glutaraldeído Padrão	Funcionalização 2	ACCase Padrão	Nanobiossensor
265					
404		402		405	
				460	450
					515
					534
				550	
					611
			630		
648					
					785
807		807		806	
858		844		850	
958	958			957	
		976			
			998	993	999
			1030		
		1045		1047	1045
					1081
1095					
				1154	
		1172			1179
		1227		1221	
					1270
1294					
		1330		1325	
		1363	1363	1367	1367
	1369				
1413	1413				
1456		1462	1462	1462	1462
					1596
					1687

5.2.2 Espectroscopia Raman para análise e monitoramento da funcionalização para imobilização das moléculas alvo

Os processos de funcionalização para a montagem molecular do substrato que contém as moléculas alvo também foram caracterizados por FT-Raman. Cada etapa do processo de funcionalização pôde ser analisada química e fisicamente. O sistema foi mantido da mesma forma que foi utilizado nos experimentos de AFS, utilizando uma placa de mica com área de $1,7 \text{ cm}^2$.

A Figura 5.9 mostra o espectro RAMAN para a primeira etapa da funcionalização da construção molecular substrato onde as moléculas alvo (diclofop): mica+ APTES, seguida, também, da Tabela 5.9, onde estão mostrados os números de onda e suas respectivas atribuições. Esse espectro apresentou dois picos característicos do estiramento Si-O-Si ($950/1105 \text{ cm}^{-1}$) [115, 116], que são atribuídas às moléculas hidroxiladas de APTES na solução aquosa. De maneira semelhante ao observado para o nanobiossensor, na mica também houve a formação do filme de APTES em sua superfície.

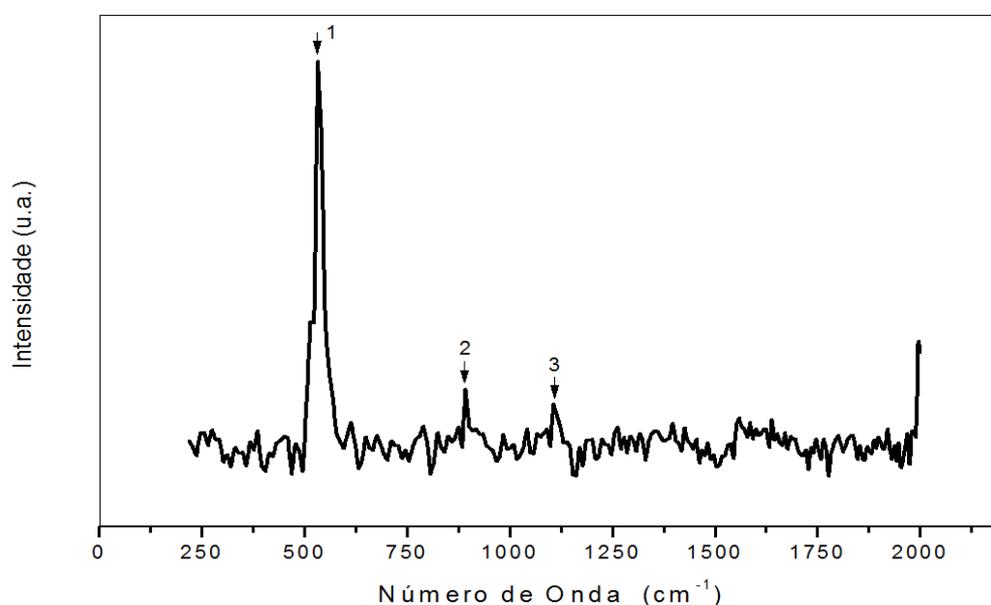


Figura 5.9 Espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES.

Tabela 5.9 Atribuições de banda do espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Vibrações no esqueleto da estrutura do CH ₂	539	Ibrahim <i>et al.</i> 2012 [121]
2	Modo de estiramento do Si-O-Si	950	Trittschack <i>et al.</i> 2012 [116]
3	Estiramento antisimétrico do Si-O-Si	1105	Trittschack <i>et al.</i> 2012 [116]

O espectro RAMAN para o padrão líquido do herbicida diclofop pode ser visto na Figura 5.10 e os modos vibracionais relacionados com seus picos estão inseridos na Tabela 5.10. As principais características do espectro RAMAN para o padrão do diclofop estão compreendidas nos picos 842 e 1150 cm⁻¹, que são referentes ao estiramento da ligação C-Cl e do estiramento do anel aromático da estrutura do herbicida [126]. Igualmente, na Figura 5.11 e Tabela 5.11, também ocorre à presença do estiramento do anel aromático da molécula de diclofop, deslocado para 1145 cm⁻¹.

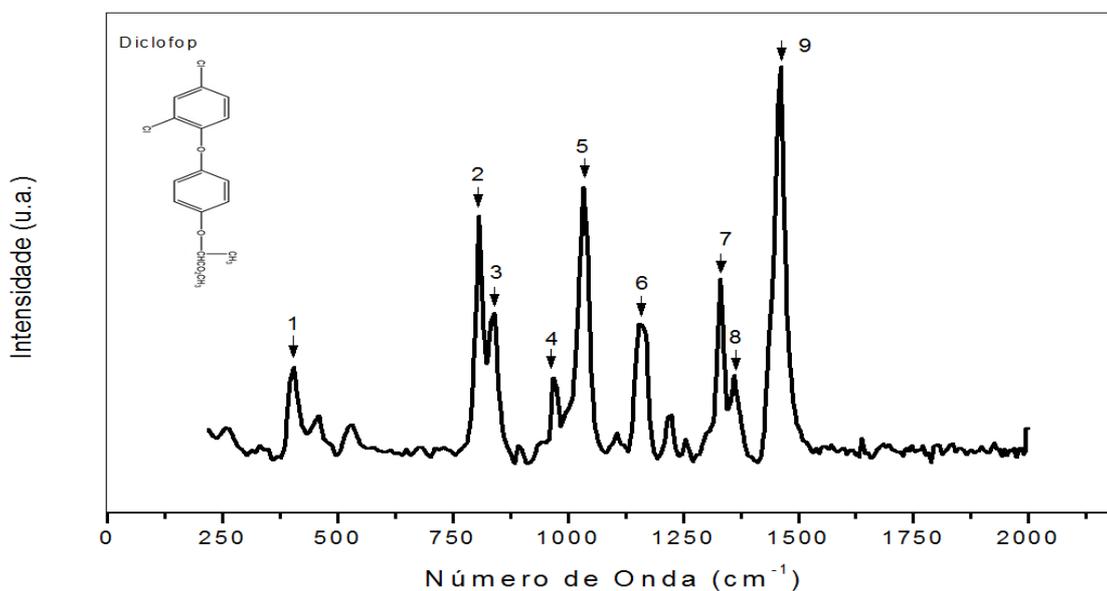


Figura 5.10 Espectro Raman do padrão do herbicida diclofop.

Tabela 5.10 Atribuições de banda do espectro Raman do padrão do herbicida diclofop.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Número de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Vibrações das pontes de ligações do carbono fora não planas	404	Puviarasan <i>et al.</i> 2004 [125]
2	H ₂ O	807	Moreno <i>et al.</i> 1999 [119]
3	Estiramento do C-Cl	842	Kumar <i>et al.</i> 2010 [126]
4	Dobras não planas C-CH	970	Kumar <i>et al.</i> 2010; Puviarasan <i>et al.</i> 2004 [125, 126]
5	Modo de vibração CH ₃	1040	Kumar <i>et al.</i> 2010 [126]
6	Estiramento do anel aromático	1150	Kumar <i>et al.</i> 2010 [126]
7	Deformação do C-H / Estiramento C-O	1328	De Gelder <i>et al.</i> 2007 [122]
8	Deformação simétrica CH ₃	1360	Kumar <i>et al.</i> 2010 [126]
9	Vibração do estiramento C-C no anel aromático	1445	Kumar <i>et al.</i> 2010 [126]

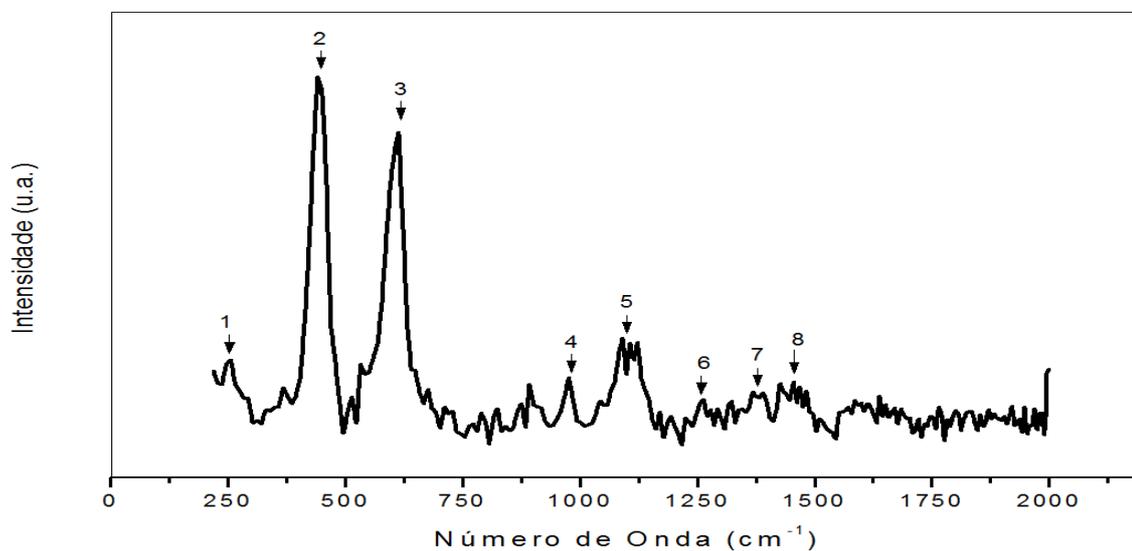


Figura 5.11 Espectro Raman da última etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES + diclofop.

Tabela 5.11 Atribuições de banda do espectro Raman da primeira etapa da funcionalização da superfície da mica com APTES + diclofop.

Nº de Identificação	Modo Vibracional Atribuído	Números de Onda (cm ⁻¹)	Referências
1	Estiramento assimétrico do grupamento O-H-O	250	Tlili <i>et al.</i> 1989 [127]
2	Vibrações das ligações do carbono fora do plano no carbono simétrico	459	Puviarasan <i>et al.</i> 2004 [125]
3	Estiramento do Si-O	612	Boo 2011 [128]
4	Deformações fora do plano C-CH	970	Kumar <i>et al.</i> 2010; Puviarasan <i>et al.</i> 2004 [125, 126]
5	Estiramento do anel aromático	1145	Kumar <i>et al.</i> 2010 [126]
6	Estiramento do C- CH ₃	1240	Puviarasan <i>et al.</i> 2004[125]
7	Deformação simétrica CH ₃	1361	Kumar <i>et al.</i> 2010[126]
8	Vibração do estiramento C-C no anel aromático	1445	Kumar <i>et al.</i> 2010[126]

A Figura 5.12 mostra a comparação entre o padrão de diclofop e a última etapa da funcionalização do substrato, mostrando que houve mudanças de informações físicas e químicas na superfície da mica. Os picos característicos do diclofop foram verificados e, portanto, observou-se a presença das moléculas diclofop, as quais são fundamentais no processo de reconhecimento.

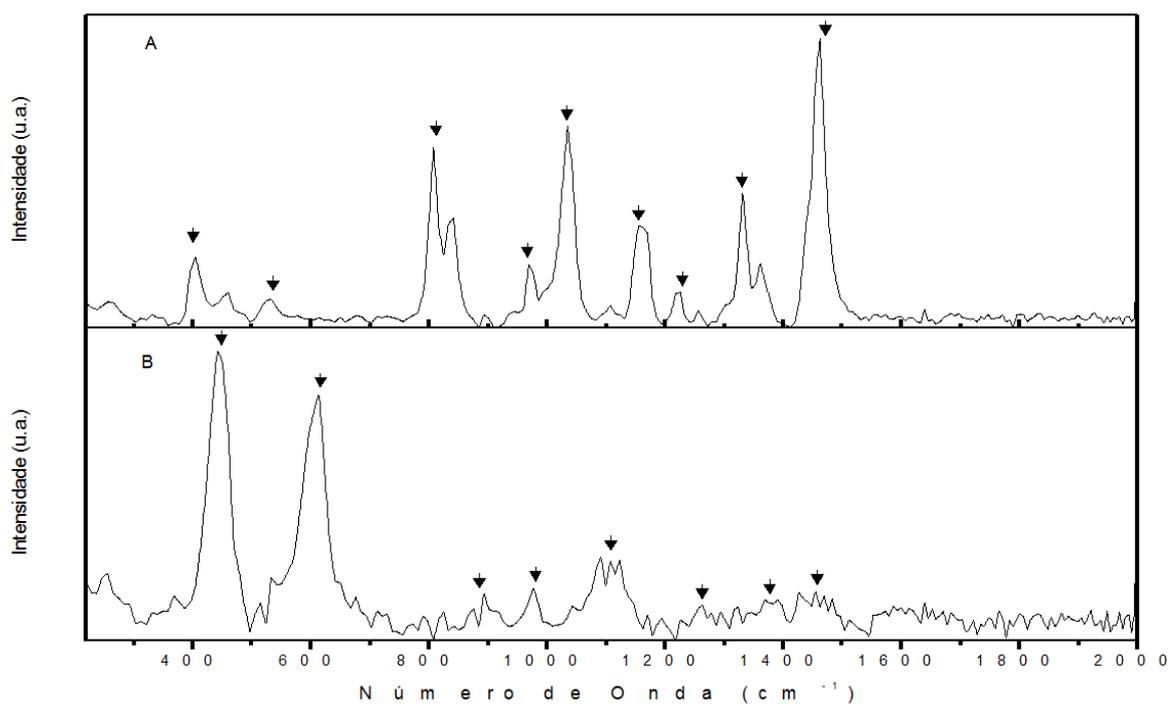


Figura 5.12 Comparação dos espectros Raman. (A) Padrão diclofop; (B) Funcionalização: mica + APTES + diclofop.

Finalmente, os valores numéricos dos principais picos encontrados tanto no padrão do diclofop, como na etapa final de funcionalização, podem ser acompanhados na Tabela 5.12. Nela é possível constatar que existem picos de identidades semelhantes.

Tabela 5.12 Comparação das bandas/comprimento de onda onde é possível verificar regiões semelhantes dos padrões nas etapas de funcionalização e, portanto, confirmar a presença das moléculas de diclofop na superfície reativa.

ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE E MONITORAMENTO DAS ETAPAS DE IMOBILIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS ALVO		
Funcionalização 1	Diclofop Padrão	Funcionalização 2
		250
	404	
		459
539		
		612
	807	
	842	
950		
	970	970
	1040	
1105		
	1150	1145
		1240
	1328	
	1360	1361
	1445	1445

5.3 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA ANÁLISE DO NANOBIOSENSOR – ESTUDO DAS CURVAS DE FORÇA

O estudo das interações entre proteínas e superfícies é de alta importância biológica para a melhoria de biomateriais, em particular para conseguir uma concepção bem sucedida de sistemas de entrega para remediação de ambientes contaminados, doenças e biossensores, bem como para minimizar efeitos indesejáveis, tais como a incrustação biológica em materiais [129]. Ao mesmo tempo, o fato de que a imobilização de proteínas em superfícies é um processo complexo e controlado por um grande número de parâmetros, restringe a capacidade para prever com precisão o comportamento das proteínas mesmo quando eles interagem com as superfícies/moléculas em condições específicas [130]. Para superar essa limitação e compreender os conceitos das interações entre proteínas e outros materiais, sejam eles biológicos ou não, estas investigações devem ser focados ao nível molecular, através das curvas de força. As curvas de força podem determinar a força de ligação entre o ligante-receptor, já que transforma essa interação em um sinal elétrico.

5.3.1 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato modificado com APTES

Tendo em vista a demonstração dos tipos de sinais elétricos gerados pelas curvas de força típicas quando há um reconhecimento específico, foi realizado um experimento de controle, onde a ponta foi funcionalizada com a enzima e realizaram-se medidas de força em um substrato modificado somente com o APTES (controle).

Na Figura 5.13 nota-se claramente que as forças atrativas foram sobrepostas pelas forças repulsivas que se tem em meio líquido, como a de vdW, justificando assim a ausência desse tipo de força na curva mencionada. As curvas de força representadas na Figura 5.13 são indicadas como curvas de controle, onde não há nenhum sinal elétrico significativo entre a ponta de AFM e o substrato. Dessa forma, partimos do princípio de qualquer modificação nas características dessa curva, em outras situações de aproximação entre a ponta e

moléculas alvos, pode conter informações importantes de interação específica e/ou não específica entre a enzima e os herbicidas utilizados neste trabalho.

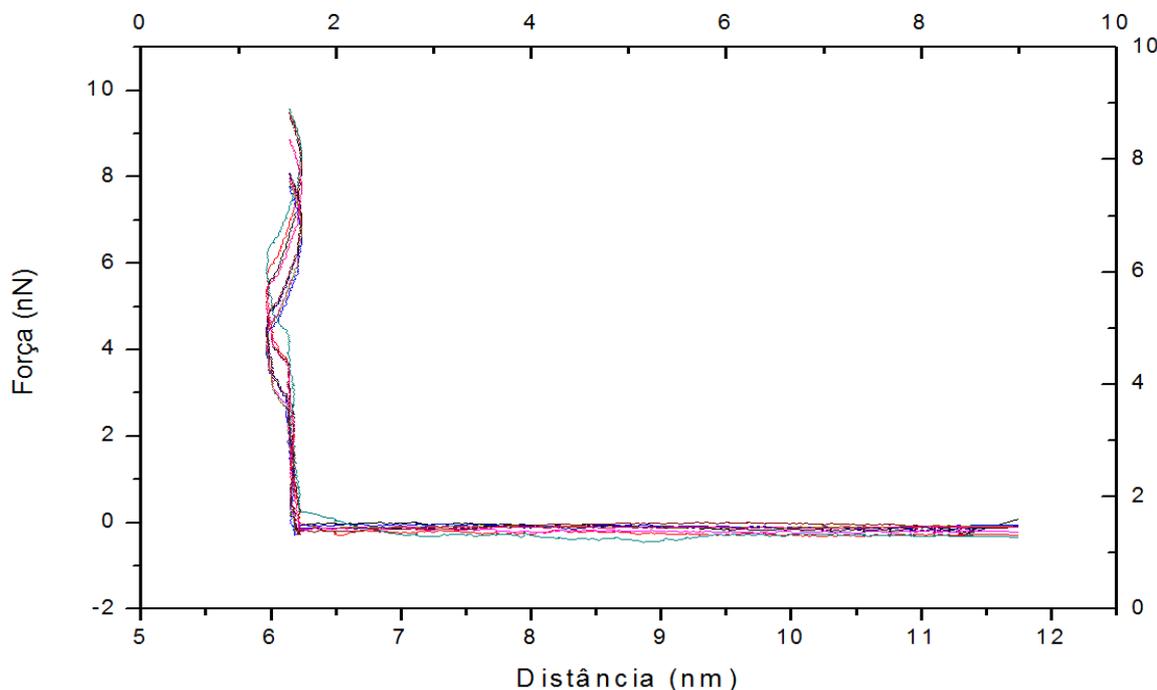


Figura 5.13 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado sem herbicida. Nota-se que não há interação em nenhuma das curvas e, portanto, não há valor significativo de força de adesão. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

Quando análises dessa natureza são realizadas em meio aquoso, diferentes forças (atrativas e repulsivas) agem entre a ponta do AFM e a superfície do substrato. Longe do substrato, entre 10 e 100 nm, forças quase sempre repulsivas, supostamente eletrostáticas, agem entre a ponta do AFM e a amostra. Próximo à interface observa-se uma interação geralmente atrativa, atribuída a forças de vdW. Resultados descritos na literatura revelam que, em meio aquoso, a força repulsiva atribuída à interação eletrostática é significativa e deveria ser levada em consideração [25], já que, quando imersas em água, as

superfícies da maioria dos materiais apresentam-se carregadas eletricamente [131, 132].

Devido à importância das interações eletrostáticas, muitas investigações têm sido conduzidas com o intuito de quantificá-las, incluindo os trabalhos pioneiros de Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948), conhecidos como 'teoria DLVO' [25]. A teoria DLVO é fundamentada na ideia de que as interações de curto e longo alcance entre partículas dispersas em solventes polares (especialmente água) são governadas por duas forças independentes: a força de vdW (atrativa) e a força eletrostática (repulsiva ou atrativa). De acordo com essa teoria, a força de interação total entre duas superfícies pode ser tratada como a soma do componente atrativo de vdW e o componente eletrostático, geralmente repulsivo. Enquanto as forças de vdW estão sempre presentes, a força eletrostática depende da existência de componentes superficiais carregados [131]. Segundo a teoria DLVO, a contribuição repulsiva seria devido à aproximação entre duas superfícies com cargas de mesmo sinal, enquanto a interação atrativa seria atribuída às forças de vdW.

Para filmes estáveis separados por pequenas distâncias (abaixo de 1nm) (Figura 5.14), é previsto que as interações atrativas de vdW superem as forças de repulsão eletrostática e do colapso das superfícies para um contato induzido. Porém, as forças envolvidas nas curvas de força das Figuras 5.18 e 5.20 possuem um caráter adicional de hidratação repulsiva que impede que a superfície da ponta do AFM interaja com a mica, impedindo assim, a adesão entre elas [133].

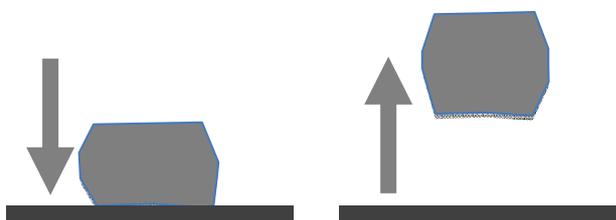


Figura 5.14 Modelo esquemático para adesão de filmes estáveis em curvas de força em meio líquido, onde há a presença da força de hidratação repulsiva [133].

As forças de hidratação são de curto alcance e operam a distâncias de separação da ordem de alguns nanômetros. Um modelo proposto por Basu e Sharma [134] atribui esse comportamento a um aumento na energia livre dos cátions solvatados causada pelo alinhamento das moléculas de água (diminuição da constante dielétrica) na vizinhança das interfaces sólido-líquido. Estes efeitos estruturais são causados por campos elétricos gerados por pontos carregados nas superfícies perto das interfaces sólido-líquido [135].

Dessa forma, para pontas de AFM de nitreto de silício com superfície eletricamente neutra ou ligeiramente negativa [131] — e mica (superfície carregada negativamente), imersos em água pura e soluções salinas, são observadas contribuições repulsiva e atrativa. Através da teoria DLVO, é possível supor que a contribuição repulsiva seja devido à aproximação entre duas superfícies com cargas de mesmo sinal (ponta do AFM ligeiramente negativa e a mica também negativa) e que a intensidade da interação diminui em função do aumento de concentração de íons, responsáveis pela blindagem das cargas superficiais [131]. Sendo assim, a *falta* de aderência observada na Figura 5.13 ocorre muito provavelmente devido às forças de repulsão de vdW e de hidratação repulsiva.

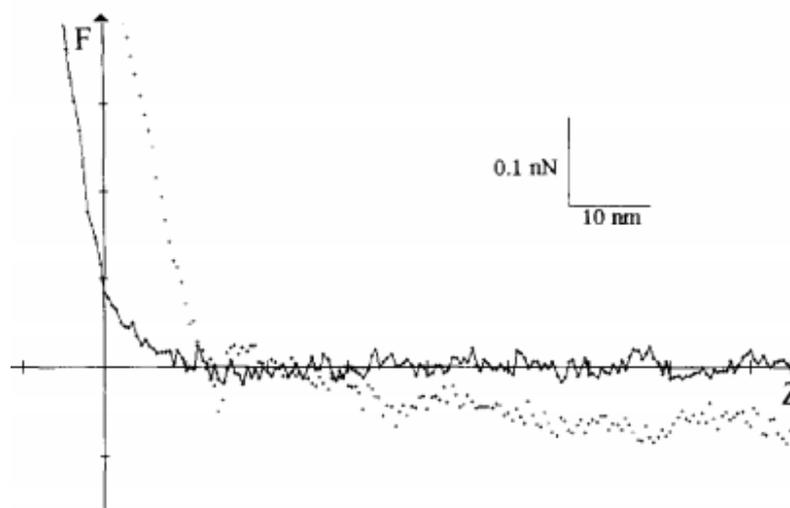


Figura 5.15 Curva de força em formamida mostrando as forças repulsivas de vdW [46].

Adicionalmente, a Figura 5.15 mostra a histerese (a separação das duas linhas de aproximação e retração) devido à viscosidade do meio aquoso, que é uma característica intrínseca das curvas feitas em meio líquido [46].

5.3.2 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com imazaquin

No sistema de investigação das forças que existem entre a enzima ACCase e o herbicida imazaquin, espera-se que não ocorra interações de afinidade específicas, visto que o herbicida imazaquin não possui afinidade por nenhum dos resíduos Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A, Phe1956B e Ala1627A. Isso é esperado, pois o imazaquin inibe a enzima ALS (acetolactato sintase, responsável por catalisar a primeira reação na produção dos aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina. Estrutura química vide Apêndice A).

Na Figura 5.17, dez curvas foram plotadas juntas com a finalidade de visualizar o comportamento de um universo de amostras estatisticamente válidas. Notam-se, nessas curvas, que os valores de força de adesão estão em torno de $0,90 \pm 0,18$ nN. Esses valores evidenciados nas curvas de interação não específica entre o imazaquin e a ACCase mostram que não houve uma grande adesão entre suas moléculas. Padrões de curvas de força com baixas forças de adesão também podem ser decorrentes do comportamento do sistema em meio aquoso, mostrando forças de cargas baixas, como a de vdW e histerese, por exemplo [136, 137]. Em adição, diferentemente do comportamento observado nas curvas de controle onde há *falta* de aderência (Figura 5.13), aqui as curvas de força apresentam uma pequena força de adesão, mesmo não havendo interação específica. Este fato pode ser decorrente que o filme formado no substrato é parcialmente estável ou metaestável (Figura 5.16), resultando em uma interação decorrente do contato induzido e da indentação entre os filmes.

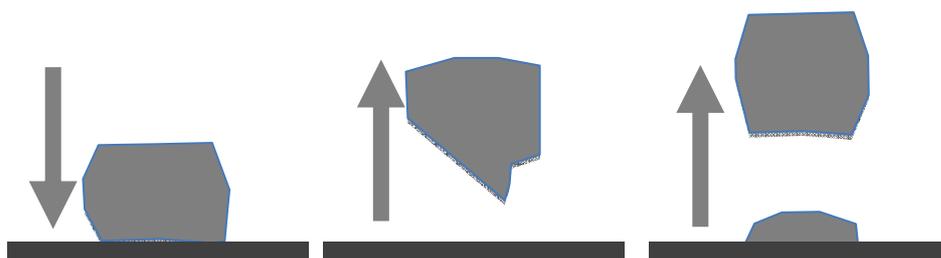


Figura 5.16 Modelo esquemático para adesão de filmes parcialmente estável ou metaestável em curvas de força em meio líquido [133].

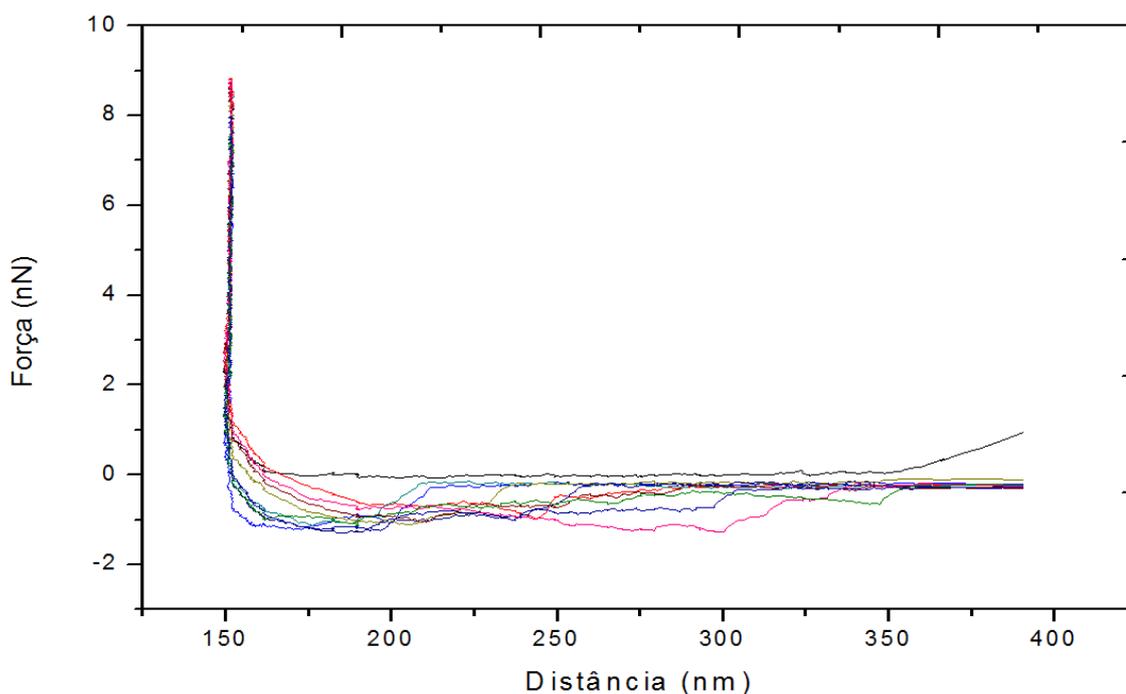


Figura 5.17 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com imazaquin, herbicida não inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

Em seguida, o histograma representativo da frequência relativa dos valores de força encontrados para a interação ACCase-imazaquin (Figura 5.18), mostra

que os valores mais recorrentes de força de adesão se encontram na faixa de 0,8-1,0nN.

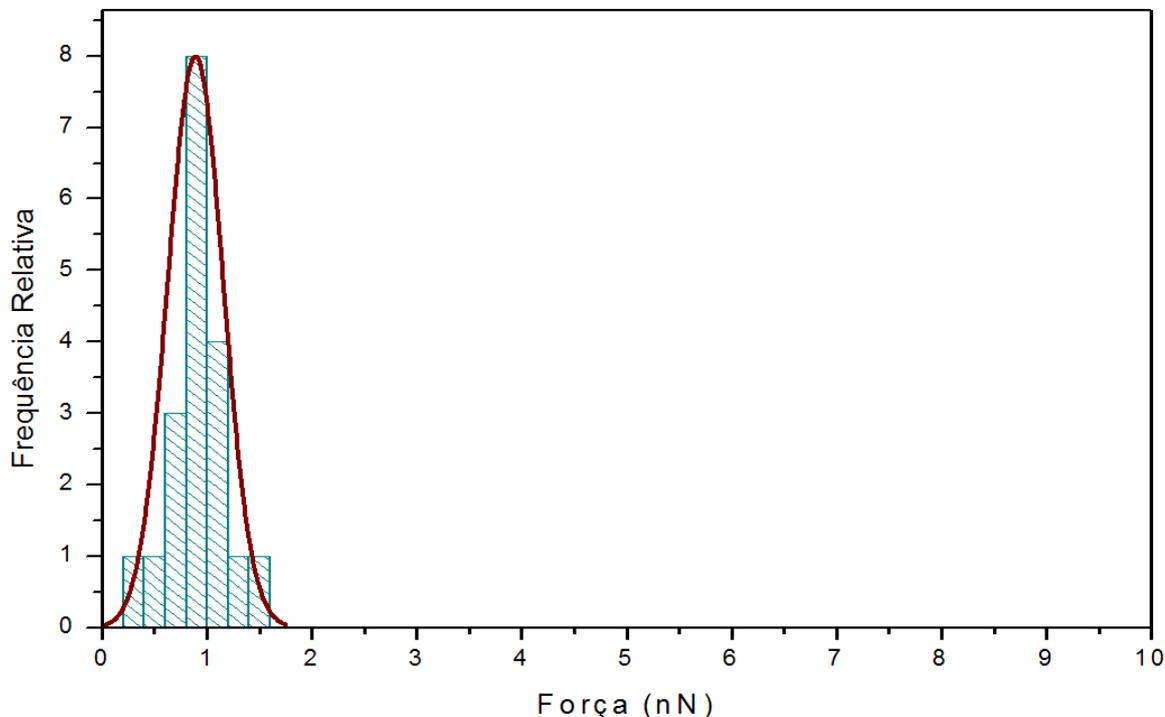


Figura 5.18 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação não específica entre a enzima ACCase e o herbicida não inibidor imazaquin. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss.

5.3.3 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com metsulfuron

O metsulfuron (estrutura química vide Apêndice A) é um dos herbicidas mais utilizados para o controle de plantas daninhas em pós-emergência na cultura do trigo, pertencendo ao grupo das sulfoniluréias, inibindo também a enzima chave ALS na produção de aminoácidos de cadeia ramificada em plantas. Assim, igualmente ao sistema de sensoriamento ACCase-imazaquin (Figura 5.19), nota-se que houve uma interação muito fraca entre o sensor e o substrato, sendo o valor da força de adesão média, aproximadamente $0,40 \pm 0,10$ nN. Esses valores

evidenciados nas curvas de interação não específica entre o metsulfuron e a ACCase também mostram que não houve uma grande adesão entre suas moléculas. Algumas curvas de força nesta amostragem se comportam diferentemente, pois seus dados numéricos apresentam diferenças de informações descritivas nos eixo x-y, o que levou a esse padrão de inclinação após o ajuste matemático das curvas.

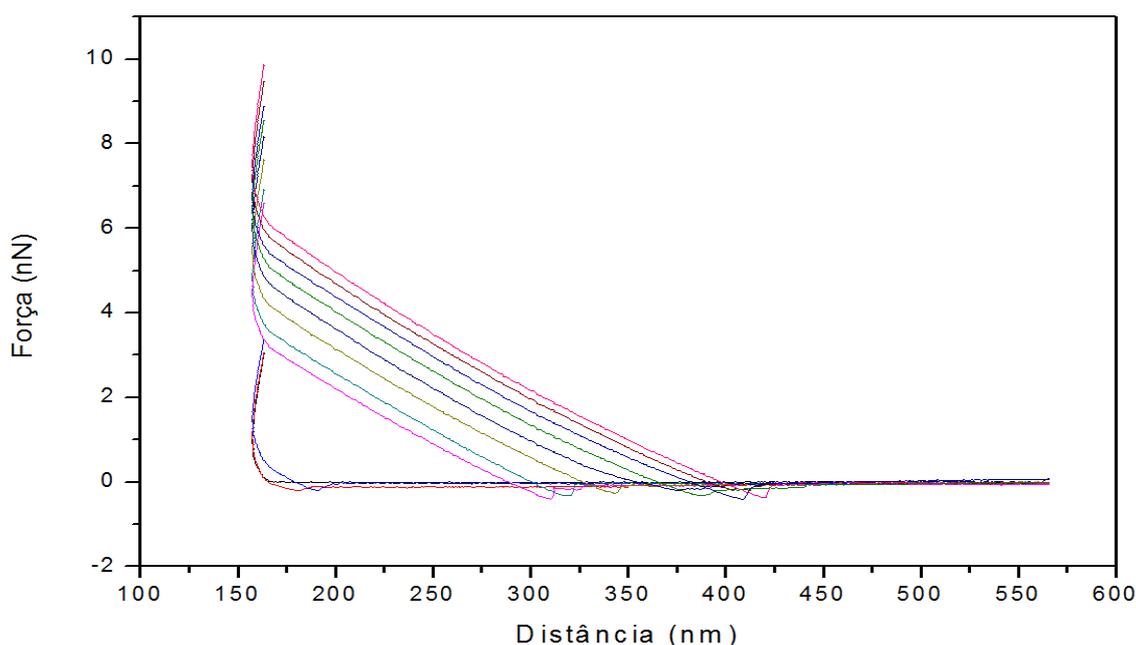


Figura 5.19 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com metsulfuron, herbicida não inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

O histograma representativo da frequência relativa dos valores de força de adesão encontrados para a interação ACCase-metsulfuron (Figura 5.20), mostra que os valores mais recorrentes de força adesão se encontram na faixa de 0,3 – 0,4 nN.

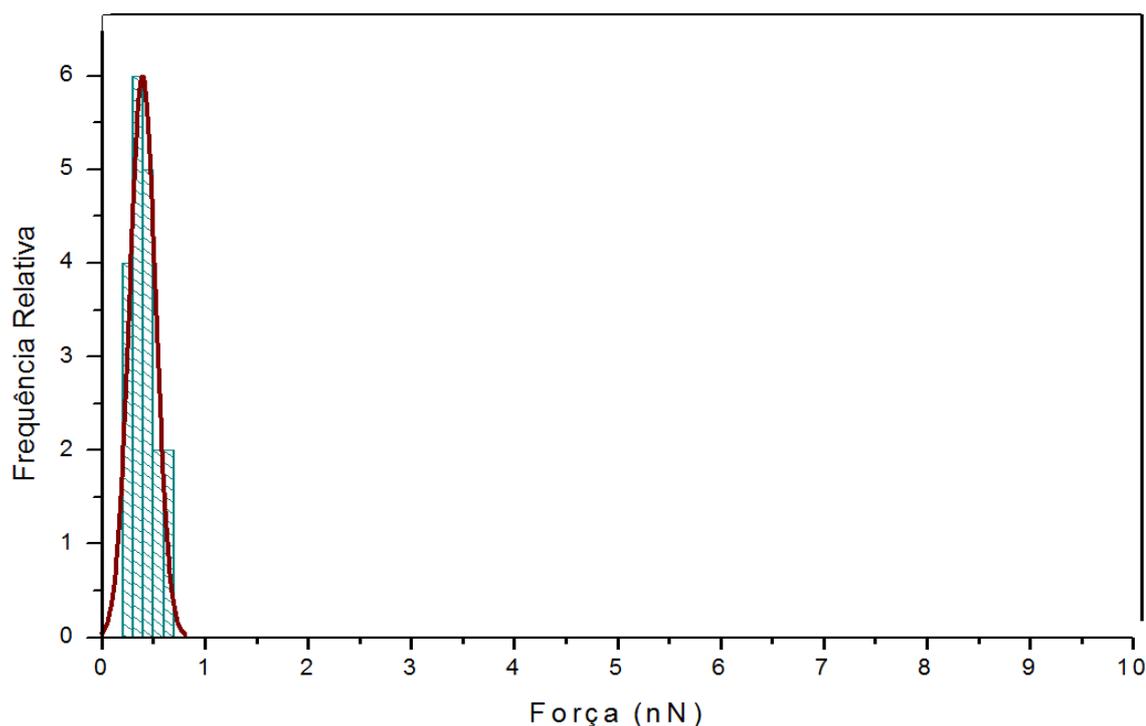


Figura 5.20 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação não específica entre a enzima ACCase e o herbicida não inibidor metsulfuron. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss.

5.3.4 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com glifosato

Em outro controle, foi testado outro herbicida não específico da enzima ACCase e com outro mecanismo de ação. Neste caso, o herbicida glifosato, que é um inibidor da enzima EPSPS (enolpiruvil-shikimato-fosfato, enzima indispensável na síntese dos aminoácidos aromáticos em plantas. Estrutura química vide Apêndice A), foi imobilizado na mica+APTES para a compreensão dos efeitos que decorrem quando este agroquímico e a ACCase são induzidos ao contato através medida pontual da força de adesão. Nesta análise das curvas mostradas na Figura 5.21 também é possível verificar que ocorre uma interação muito fraca nas curvas de força, com força de adesão girando em torno de $0,64 \pm 0,10$ nN. Este cenário também era esperado pelo fato do glifosato não ser física, biológica e

quimicamente compatível com os resíduos presentes nos sítios ativos da enzima ACCase.

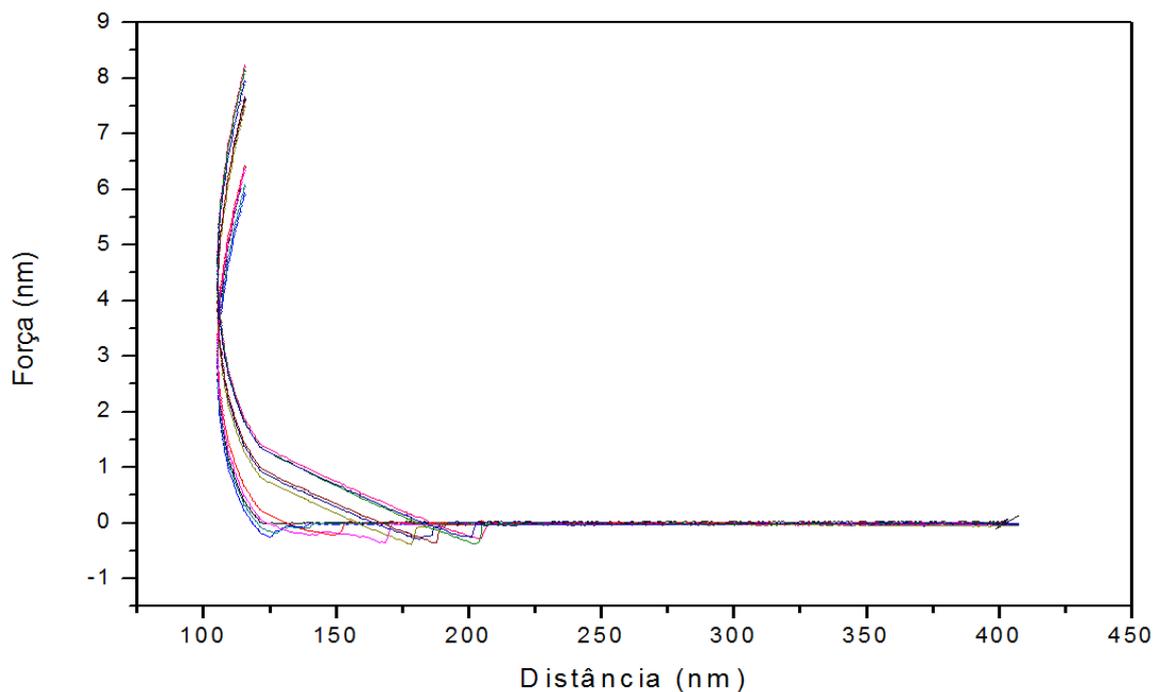


Figura 5.21 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com glifosato, herbicida não inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

Da mesma maneira, um histograma de frequência relativa *versus* força, evidenciou que os valores mais recorrentes de força adesão entre a ACCase e o glifosato (Figura 5.22) se encontram na faixa de 0,7 – 0,8 nN.

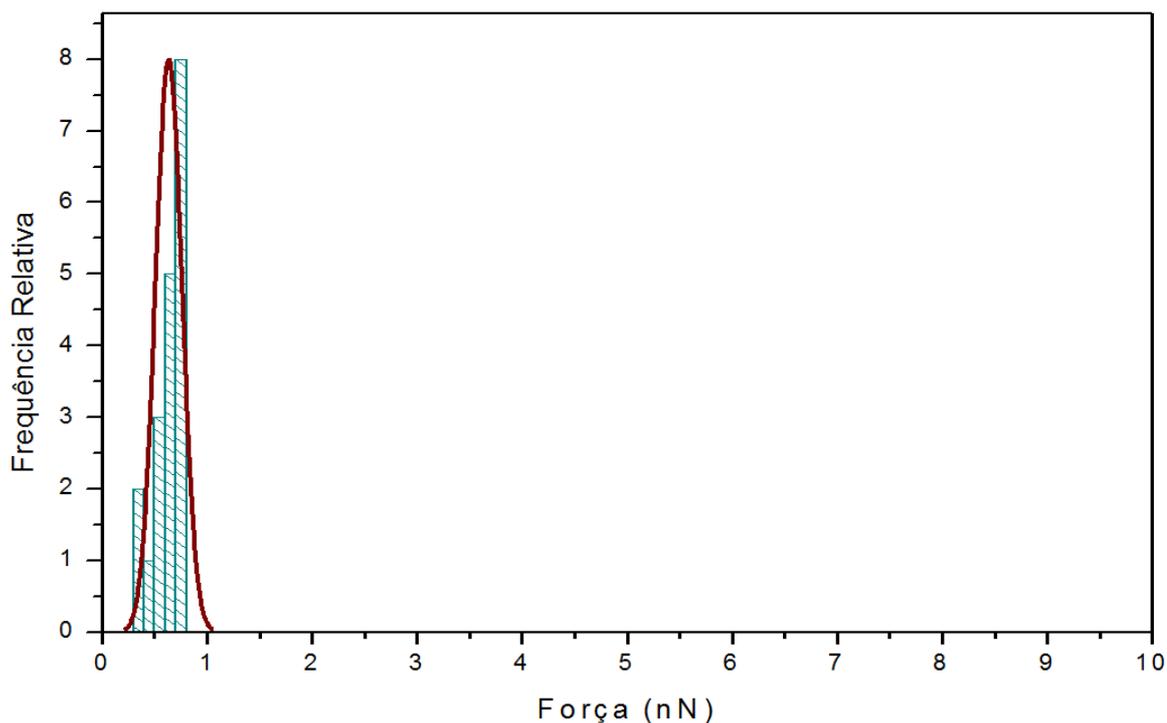


Figura 5.22 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação não específica entre a enzima ACCase e o herbicida não inibidor glifosato. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss.

5.3.5 Ponta funcionalizada com ACCase e substrato funcionalizado com diclofop

Para verificar a efetividade e possibilidade de emprego do nanobiossensor para herbicidas dos grupos do ariloxifenoxipropionatos e ciclohexanodionas, que são inibidores da ACCase, medidas de força de adesão foram realizadas em um substrato contendo moléculas de diclofop imobilizadas covalentemente.

Nas curvas resultantes dessas análises (Figura 5.23), nota-se que há uma alta interação específica nas curvas, verificando-se valores de força adesão em torno de $6,0 \pm 1,0$ nN.

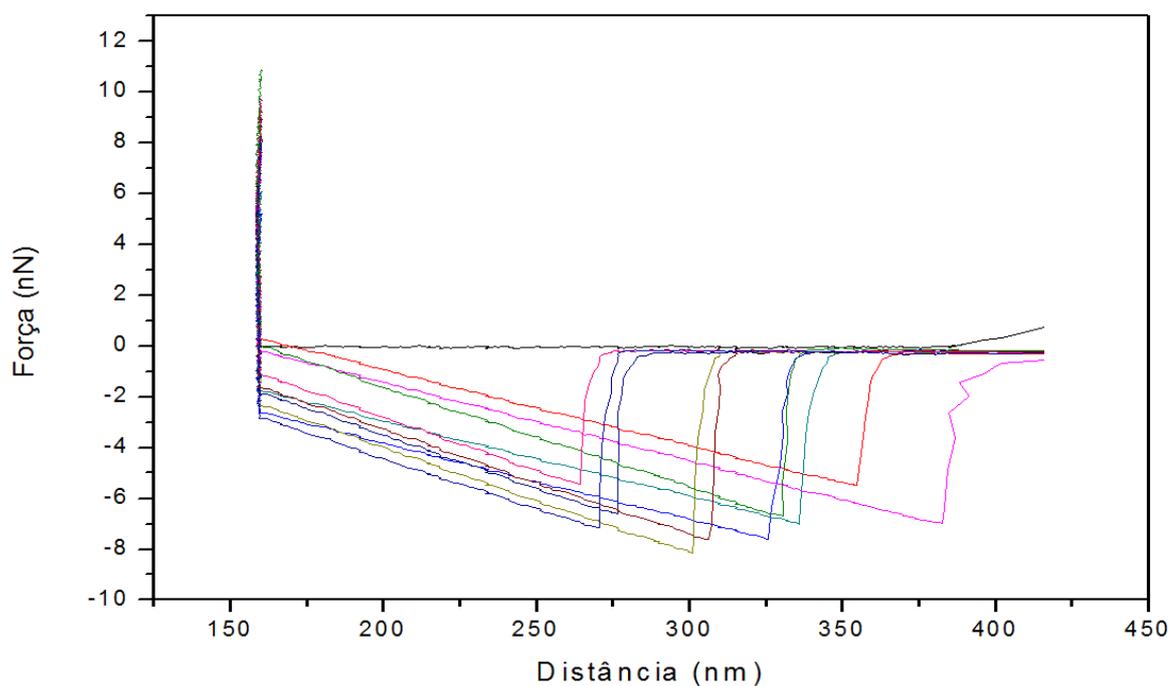


Figura 5.23 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase e o substrato funcionalizado com diclofop, herbicida inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

Para esse sistema, em um histograma mostrando a frequência relativa para os valores de força de adesão quantificados mais prováveis (Figura 5.24), verifica-se que os valores mais recorrentes de força de adesão entre a ACCase e o diclofop se encontram na faixa de 6,0 – 7,0 nN.

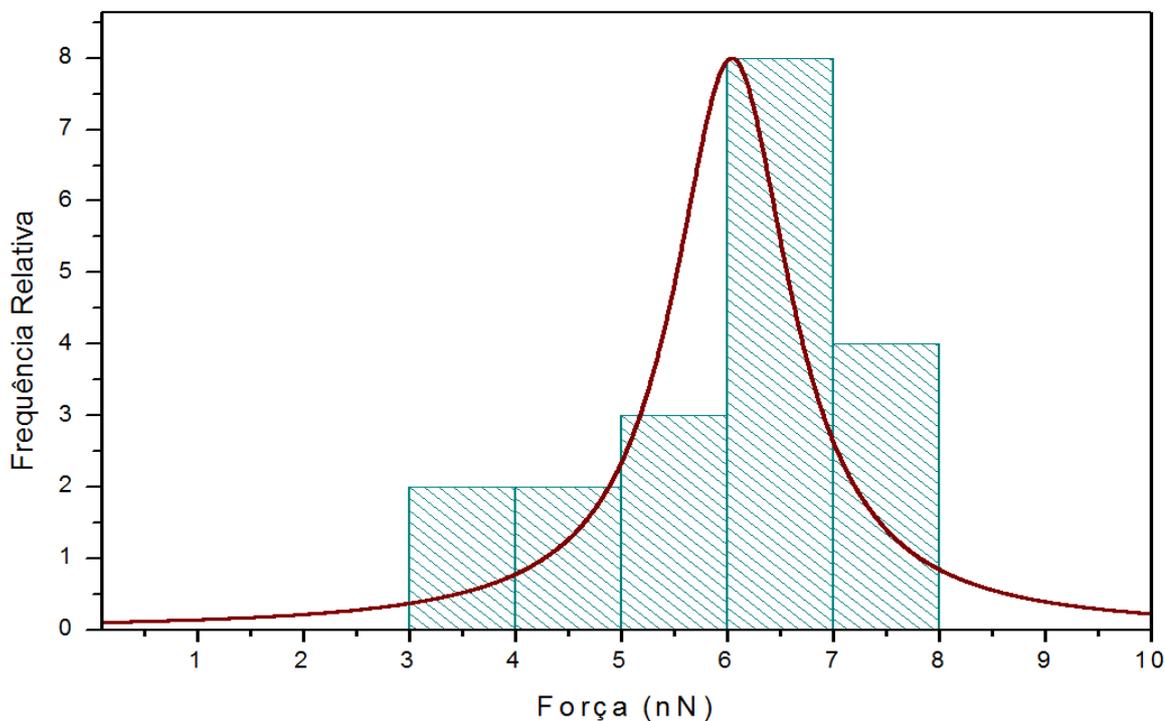


Figura 5.24 Histograma representativo da frequência de eventos ($n = 19$) e dos valores de força de adesão para a interação específica entre a enzima ACCase e o herbicida inibidor diclofop. A curva foi ajustada com uma distribuição de Gauss.

5.3.6 Ponta funcionalizada com ACCase e bloqueada com anticorpo específico da ACCase e substrato funcionalizado com diclofop

Outro tipo de controle efetivado neste trabalho foi realizar as medidas de força com as enzimas imobilizadas na ponta do AFM bloqueadas com anticorpos específicos da ACCase (fornecidos por intermédio kit de ELISA “*Bovine Acetyl-CoA carboxilase Sintetase*”). As curvas de força mostradas na Figura 5.25 comprovam que as enzimas imobilizadas na ponta estavam ativas nos controles anteriores, comprovando que o nanobiossensor proposto é ativo e funcional para a detecção de moléculas do herbicida diclofop.

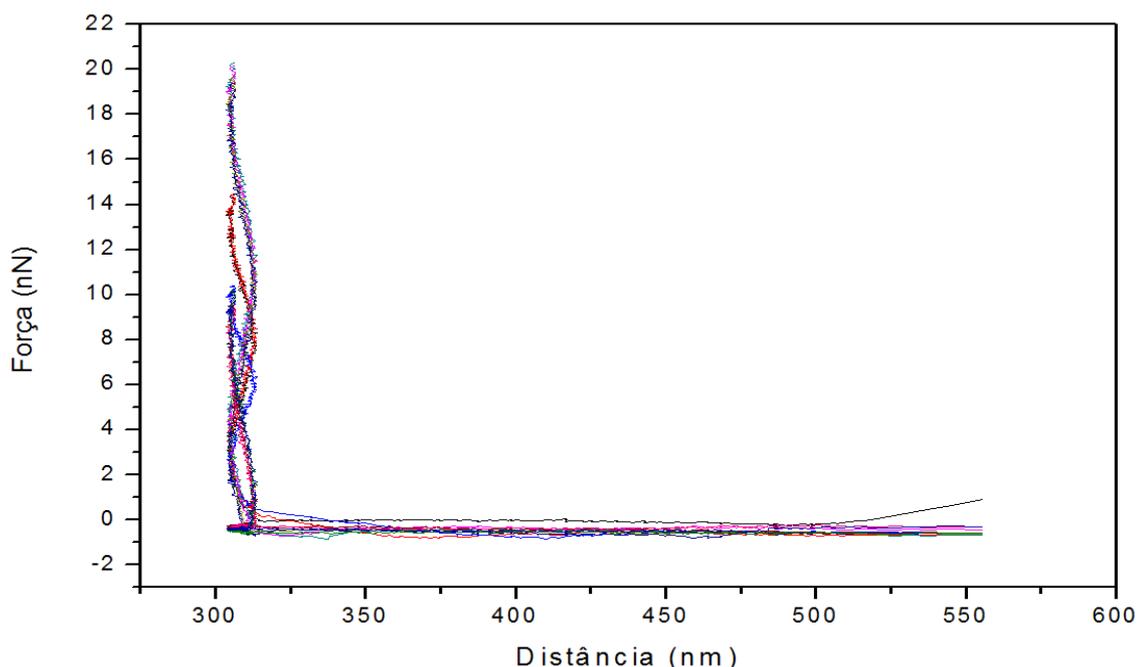


Figura 5.25 Curvas de força referente às análises do nanobiossensor com a ponta funcionalizada com ACCase bloqueada com seus anticorpos específicos e o substrato funcionalizado com diclofop, herbicida inibidor. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

5.3.7 Análise comparativa

A Figura 5.26 indica que os valores das forças de adesão do diclofop são 85% maiores em magnitude quando comparada com o herbicida imazaquin, e 93% maior em magnitude quando comparada com o herbicida metsulfuron. Esta diferença na adesão de valores de força é esperada, uma vez que estes herbicidas inibem a ação da enzima ALS [138-140] e, portanto, não é um ligante específico da enzima ACCase. Da mesma forma, os valores das forças de aderência de diclofop são 90% maiores em magnitude quando comparada com o herbicida glifosato. Esta diferença de valores de aderência força também é esperada, uma vez que o herbicida glifosato é um inibidor da enzima EPSP [141, 142] e, portanto, também é um ligante não específico da enzima ACCase. A

diferença entre os valores de reconhecimento específico (diclofop) e não específica (imazaquin, metsulfuron e glifosato) é de aproximadamente 90%. Esta evidência comprova a seletividade e especificidade do nanobiossensor proposto neste trabalho.

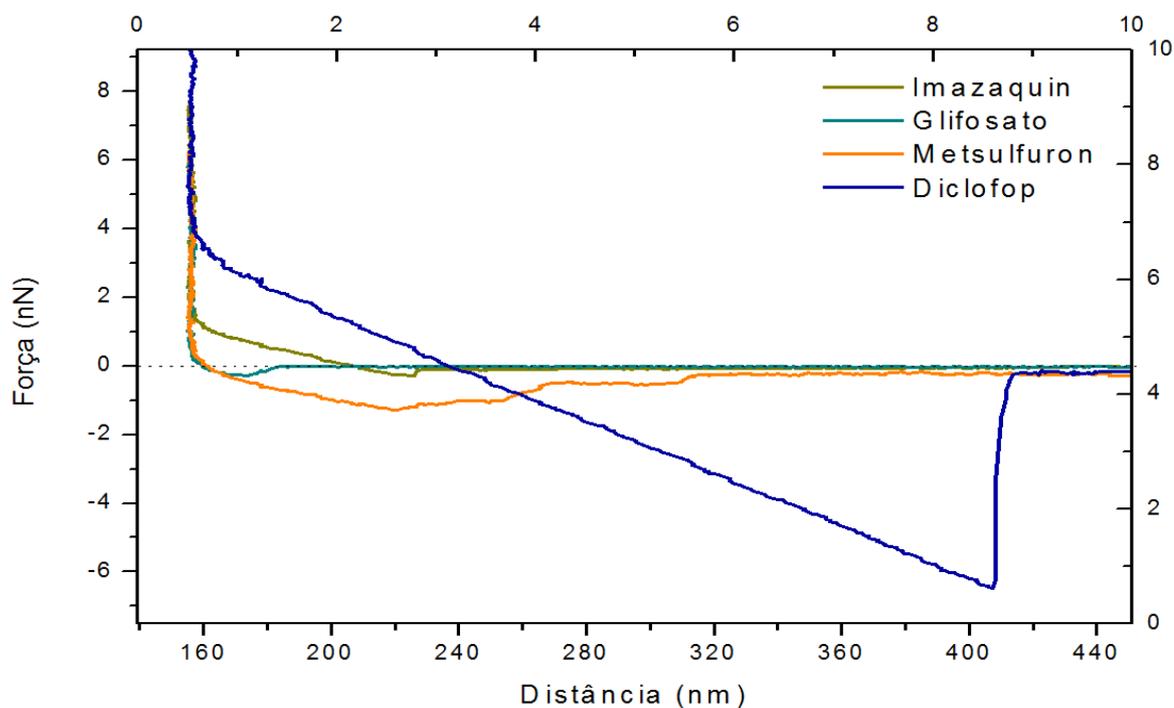


Figura 5.26 Comparação das curvas de força. A curva de força azul representa um evento de reconhecimento específico para um complexo de biomoléculas único formado pela interação específica entre ACCase-diclofop (que inibe a ação da enzima). Em contraste, as curvas em laranja, azul-claro e verde, representam eventos de reconhecimento não específicos com valores baixos, quase nulos, para forças de adesão. Curvas de força realizadas em meio líquido (solução tampão PBS a pH 7,0).

Nos histogramas mostrados na Figura 5.27 é possível comparar os valores de forças de adesão específicas e não específicas. Através desses histogramas também a seguinte conclusão pode ser extraída: em um determinado intervalo, a força de adesão mais provável pode ser observada e, conseqüentemente, esses

valores podem ser utilizados para padronizar o funcionamento do sensor em uma produção em maior escala e analiticamente. A diferença entre os valores da adesão para cada grupo de herbicidas (específico e não específico) (Figura 5.29) e a probabilidade dos valores que aparecem nas medidas experimentais também são dados importantes fornecidos pelos histogramas. No que tange as distribuições vista nos histogramas, todos os picos foram ajustados a uma função gaussiana (Figura 5.27).

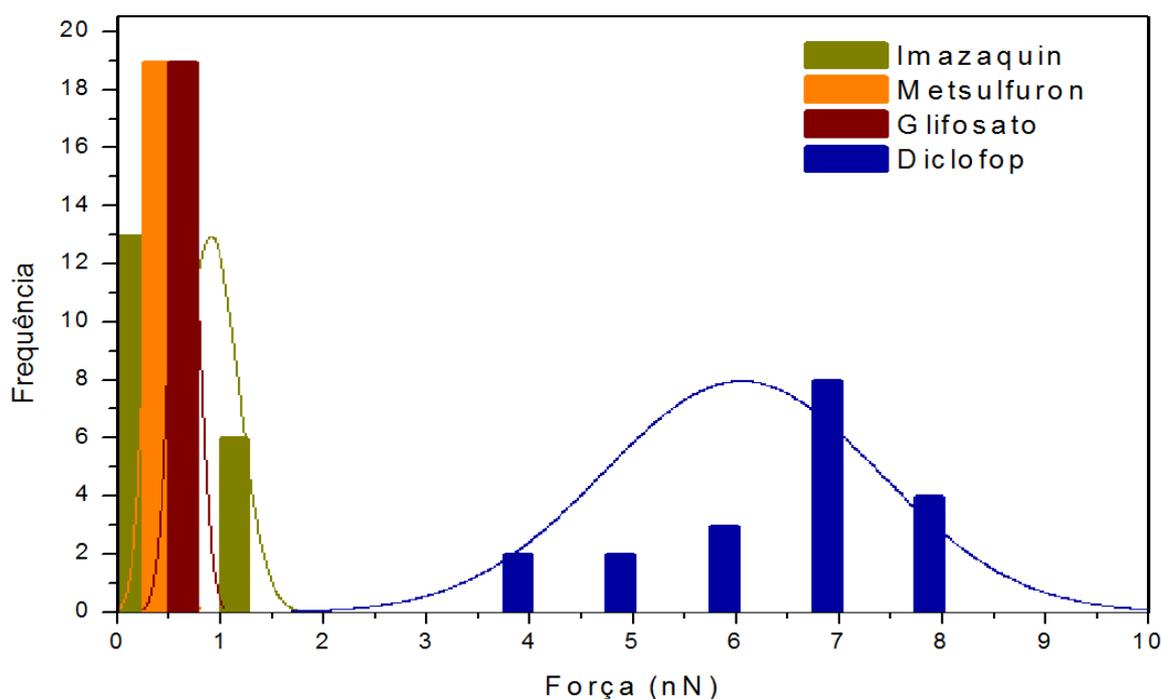


Figura 5.27 Histogramas ($n = 19$) para as ocorrências (frequência relativa) dos valores para força de adesão dos sistemas de detecção em nanoescala: ACCase/diclofop; ACCase/imazaquin; ACCase/glifosato e; ACCase/metsulfuron. Os histogramas foram ajustados para funções gaussianas para identificar o valor da força de aderência mais provável, a fim de criar um valor padrão para eventos de reconhecimento específicos e sinais inespecíficos.

Por meio da Figura 5.28, a diferença das forças de adesão para cada grupo de herbicidas fica bastante evidente.

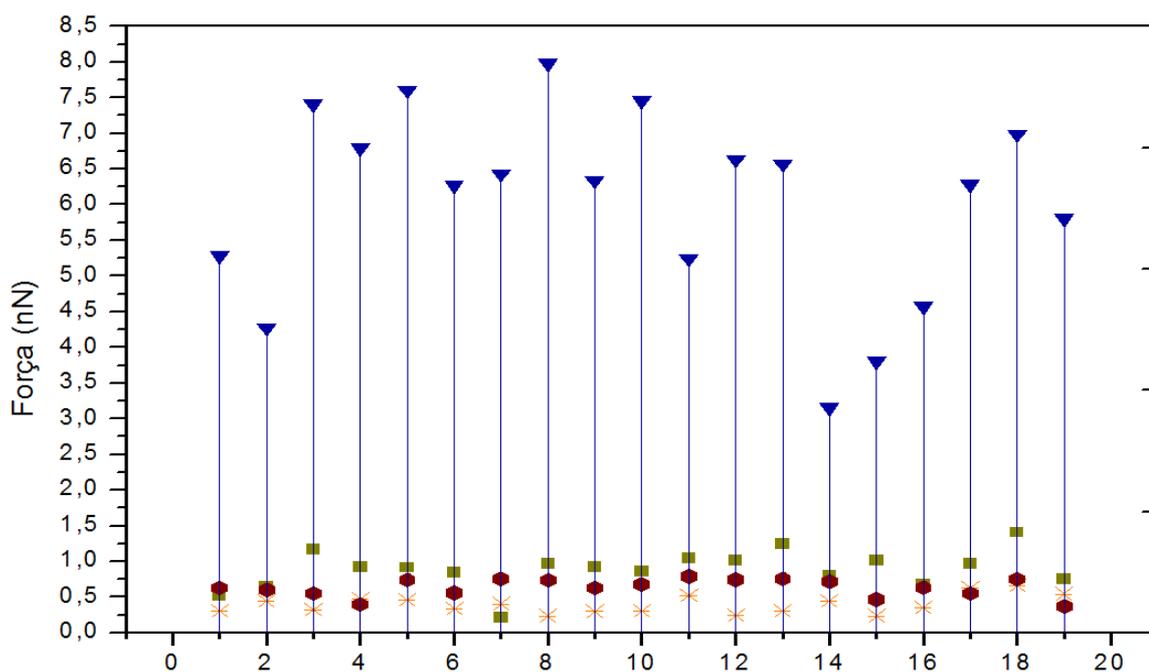


Figura 5.28 As linhas verticais mostram a diferença entre os valores de força de adesão para os agroquímicos diversos, corroborando com a especificidade e seletividade do nanobiossensor. As linhas horizontais indicam cada amostra analisada por AFM. ▼ diclofop; ■ imazaquin; ● metsulfuron e; x glifosato.

É interessante mencionar aqui que para medições em ar geralmente existe uma adesão resultante da força capilar entre a ponta do AFM e a amostra. A maioria das superfícies hidrofílicas é coberta com uma camada fina de água (espessura de poucos nanômetros) em condições ambientes e, muitas vezes, a ponta do AFM e a amostra são hidrofílicas. Nestes casos, as camadas de água podem se juntar quando a ponta e amostra são próximas umas das outras, formando um gargalo capilar entre eles. Assim, quando o *cantilever* é retraído da amostra, esta “união” das camadas de água faz com que exista uma forte adesão entre essa ponta e amostra. A certa distância, a força do *cantilever* será suficiente para superar essa aderência e a ponta vai se soltar, voltando ao seu posicionamento inicial. Diferentemente, em análises em meio líquido (caso deste trabalho), não existe essa aderência entre as camadas de água circundante e,

consequentemente, a adesão entre a ponta do AFM e a amostra é efetivamente reduzida (Figura 5.29).

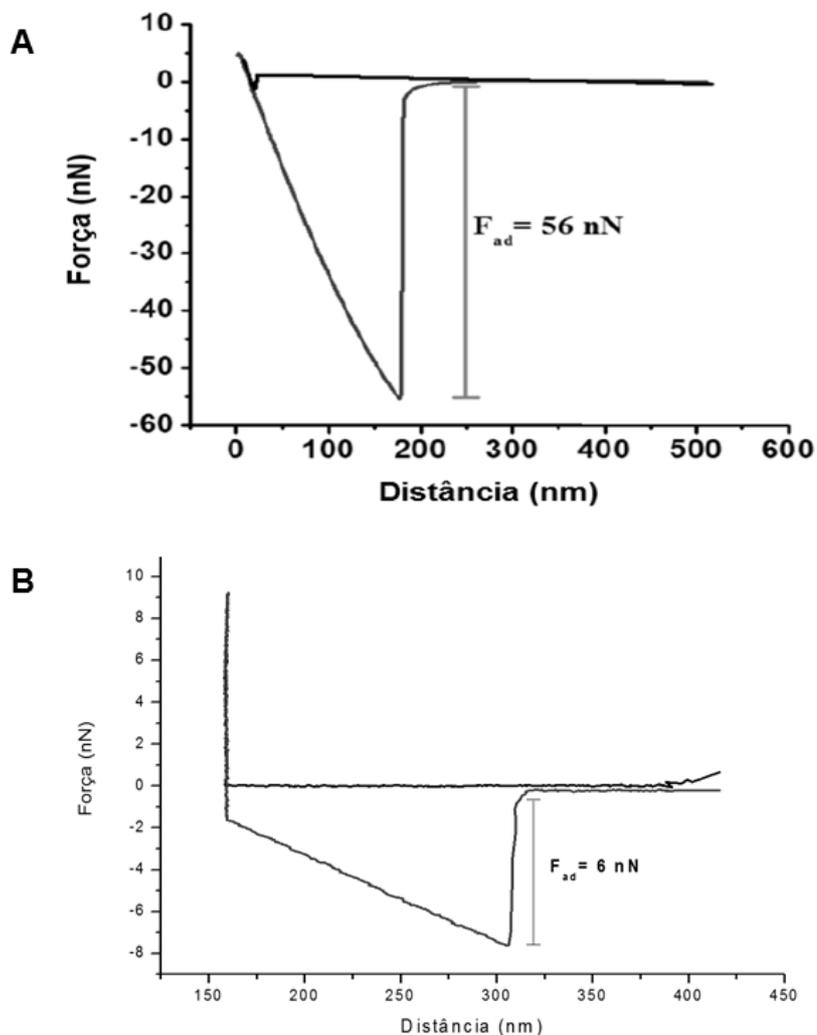


Figura 5.29 (A) Curva de força realizada no ar para a interação entre a enzima ALS e o herbicida metsulfuron [143] e (B) Curva de força realizada em meio líquido. A diferença da força de adesão entre as duas curvas é de 50 nN.

Neste sentido, os resultados deste trabalho fornecem uma abordagem nova aos nanobiossensores de pontas de AFM, uma vez que este dispositivo foi baseado na biomimética do mecanismo de ação de herbicidas seletivos em plantas daninhas. Imitando o modo como as interações ocorrem na natureza, o

estado de energia mínima do sistema de sensoriamento é preservado e as vias de reconhecimento específicos são realizadas fácil e naturalmente, uma vez que estas são privilegiadas.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo deste trabalho, foi apresentado o uso do Microscópio de Força Atômica e Espectroscopia de Força Atômica aplicados à biomimetização do fenômeno biológico de inibição enzimática por herbicidas visando o desenvolvimento de um nanobiossensor para detecção de moléculas de agroquímicos específicos.

Por intermédio da Espectroscopia RAMAN foi possível acompanhar as mudanças nas características químicas da superfície até a obtenção da confirmação que as moléculas sensitivas e alvos estavam presentes na camada superficial funcional por meio das características intrínsecas das vibrações moléculas de ACCase e de diclofop.

Com base nas curvas de força medidas por AFM e no modelo teórico-experimental proposto, foi possível determinar, de forma inédita, a detecção específica do herbicida diclofop na interface líquida por meio de uma força de adesão 90% maior para o diclofop, quando este é comparado com herbicidas não específicos da ACCase, como o imazaquin, metsulfuron e glifosato. O sistema de sensoriamento molecular foi baseado, com sucesso, nas funcionalizações químicas dos substratos utilizados sem que houvesse inativação dos sítios ativos da enzima, desnaturação ou impedimento estérico.

O nanobiossensor proposto neste trabalho se mostra como uma tecnologia útil e flexível, já que pode ser adaptado a várias circunstâncias, ou seja, para vários tipos de moléculas alvo. Pode ser utilizado para fins de resiliência e conservação dos recursos naturais, tomada de decisões sobre projetos que visam apontar áreas degradadas e contaminadas (solo e água), além de ser um indicador de qualidade ambiental para a melhoria e evolução das questões agrícolas, alimentícias e de pesquisa farmacêutica. Finalmente, uma das características mais importantes deste nanobiossensor é que este pode proporcionar a detecção de moléculas alvo em tempo real, em uma concentração baixa (1mM), em condições fisiológicas e sem marcação com fluoróforos.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros, pretende-se investigar diferentes tempos de contato entre a enzima e o herbicida, através da manipulação do software do AFM, em uma escala de tempo de crescimento da ordem de milésimos de segundo a segundos. Baseando-se no trabalho de Banerjee *et al.* [144], aumentando o tempo de contato é esperado que os valores de adesão também aumentem significativamente. Esta investigação também irá fornecer dados importantes para a melhor compreensão do tempo ótimo de contato para promover a inibição, bem como mapear a cinética da inibição da enzima pelo herbicida.

Igualmente pretende-se verificar a possibilidade de reutilização dos nanobiossensores com a finalidade de investigar sua durabilidade, bem como se existem mudanças na sensibilidade do dispositivo durante seu tempo de vida útil. Se a vida útil do nanobiossensor for confirmada, pretende-se realizar entre 150 – 200 medidas de força para validar o sensor analítica e estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA).

Também se pretende investigar o comportamento de resposta do sensor para amostras em que grupos de agroquímicos diversos estão presentes e interagindo em uma solução. Complementarmente, a técnica AFS será também utilizada para investigar a interação de dois ou mais herbicidas e seus compostos, com a finalidade de construir um isoblograma através de dados de curvas de força.

8 REFERÊNCIAS

- [1] JHA, Z. et al. Nanotechnology: prospects of agricultural advancement. *Nano Vision*, India, v. 1, p. 88-100, 2011.
- [2] MOUSAVI, S. R.; REZAEI, M. Nanotechnology in agriculture and food production. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, Egypt, v. 1, p. 414-419, 2011.
- [3] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. R.E.D. Facts - Diclofop-Methyl. In: *Prevention, pesticides and toxic substances*, 2000. 6 p.
- [4] GOLDMAN, L. R. Chemicals and children's environment: what we don't know about risks. *Environmental Health Perspectives*, United States, v. 106, p. 875-880, 1998.
- [5] UNAL, F. et al. Genotoxic effects of chlorophenoxy herbicide diclofop-methyl in mice in vivo and in human lymphocytes in vitro. *Drug and Chemical Toxicology*, London, v. 34, p. 390-395, Oct. 2011.
- [6] CHIEN, W. C. et al. Risk and prognostic factors of inpatient mortality associated with unintentional insecticide and herbicide poisonings: a retrospective cohort study. *Plos One*, San Francisco, v. 7, p. 8, Sep. 2012.
- [7] GOSCINNY, S. et al. Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, Sunnysvale, v. 5, p. 1177-1185, Oct. 2012.
- [8] MALOSCHIK, E.; MÖRTL, M.; SZÉKÁCS, A. Novel derivatisation technique for the determination of chlorophenoxy acid type herbicides by gas chromatography – mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Germany, v. 397, p. 537-548, 2010.
- [9] HE, Z. Y. et al. Magnetic solid-phase extraction of sulfonylurea herbicides in environmental water samples by Fe₃O₄@dioctadecyl dimethyl ammonium chloride@silica magnetic particles. *Analytica Chimica Acta*, Netherlands, v. 747, p. 29-35, Oct. 2012.
- [10] KUMAZAWA, T. et al. Capillary gas chromatography with four different detectors for dinitroaniline herbicides in human body fluids. *Journal of Analytical Toxicology*, Oxford, v. 19, p. 95-98, 1995.
- [11] SENSEMAN, S. A. et al. Trace level pesticide detections in Arkansas surface waters. *Environmental Science & Technology*, Iowa City, v. 31, p. 395-401, Feb. 1997.
- [12] FENOLL, J. et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying phenylurea herbicides and their main

- metabolites in amended and unamended soils. *Journal of Chromatography A*, Philadelphia, v. 1257, p. 81-88, Sep. 2012.
- [13] LAGANÀ, A. et al. Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, Netherlands, v. 414, p. 79-94, 2000.
- [14] JIA, K. et al. A lower limit of detection for atrazine was obtained using bioluminescent reporter bacteria via a lower incubation temperature. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, United States, v. 84, p. 221-226, Oct. 2012.
- [15] LEE, J.-M. et al. Comparative study of pesticide multi-residue extraction in tobacco for gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Philadelphia, v. 1187, p. 25-33, Apr. 2008.
- [16] MASOJIDEK, J. et al. Detection of photosynthetic herbicides: Algal growth inhibition test vs. electrochemical photosystem II biosensor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, United States, v. 74, p. 117-122, Jan. 2011.
- [17] LIU, R. et al. Core-shell nanostructured molecular imprinting fluorescent chemosensor for selective detection of atrazine herbicide. *Analyst*, United Kingdom, v. 136, p. 184-190, 2011.
- [18] BORO, R. C. et al. Gold nanoparticles catalyzed chemiluminescence immunoassay for detection of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Analyst*, United Kingdom, v. 136, p. 2125-2130, 2011.
- [19] SHARMA, P. et al. Fluoroimmunoassay based on suppression of fluorescence self-quenching for ultra-sensitive detection of herbicide diuron. *Analytica Chimica Acta*, Netherlands, v. 676, p. 87-92, Aug. 2010.
- [20] VLADKOVA, R. et al. Assessment of chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen evolution parameters in development of biosensors for detection of q(b) binding herbicides. *Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences*, Bulgaria, v. 62, p. 355-360, 2009.
- [21] ETCHEGARAY, A.; BUENO, C. C.; TESCHKE, O. Identificação de microcistina-LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. *Química Nova*, Brasil, v. 33, p. 1843-1848, 2010.
- [22] STEFFENS, C. et al. Atomic Force Microscopy as a tool applied to nano/biosensors. *Sensors*, Switzerland, v. 12, Jun. 2012.
- [23] STEFFENS, C. et al. Gas sensors development using supercritical fluid technology to detect the ripeness of bananas. *Journal of Food Engineering*, Australia, v. 101, Dec. 2010.
- [24] LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. *Journal of Adhesion Science and Technology*, United Kingdom, v. 19, p. 365-405, 2005.

- [25] LEITE, F. L. et al. theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using Atomic Force Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, Switzerland, v. 13, p. 12773-12856, 2012.
- [26] DEDA, D. K. et al. Atomic Force Microscopy-Based molecular recognition: a promising alternative to environmental contaminants detection. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Badajoz: Formatex Research Center, 2012. p. 1337-1348. (v. 5).
- [27] HINTERDORFER, P. et al. A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy. *Nanobiology*, Oxfordshire, v. 4, p. 177-188, 1998.
- [28] WIELERT-BADT, S. et al. Single molecule recognition of protein binding epitopes in brush border membranes by force microscopy. *Biophysical Journal*, Rockville, v. 82, p. 2767-2774, May 2002.
- [29] AHMAD-HAMDANI, M. S. et al. ACCase-Inhibiting Herbicide-Resistant Avena spp. Populations from the Western Australian Grain Belt. *Weed Technology*, Washington/DC, v. 26, p. 130-136, Jan./Mar. 2012.
- [30] CAI, X. Y.; LIU, W. P.; CHEN, S. W. Environmental effects of inclusion complexation between methylated beta-cyclodextrin and diclofop-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington/DC, v. 53, p. 6744-6749, Aug. 2005.
- [31] CHANDI, A. et al. Resistance to Acetolactate Synthase and Acetyl Co-A Carboxylase Inhibitors in North Carolina Italian Ryegrass (*Lolium perenne*). *Weed Technology*, Washington/DC, v. 25, p. 659-666, Oct./Dec. 2011.
- [32] CRUZ-HIPOLITO, H. et al. Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. *Plant and Soil*, New York, v. 355, p. 121-130, Jun. 2012.
- [33] FREIBAUER, A. et al. *Sustainable food consumption and production in a resource-constrained world*. Brussels: European Commission, Standing Committee on Agricultural Research, 2011. (The 3rd SCAR Foresight Exercise)
- [34] CESSNA, A. J.; GROVER, R. Determination of the herbicide diclofop in human urine. *Journal of Chromatography*, Oxford, v. 600, p. 327-332, May 1992.
- [35] BUTT, H. J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, Philadelphia, v. 59, p. 1-152, Oct. 2005.
- [36] BINNIG, G. K. Atomic-Force Microscopy. *Physica Scripta*, United Kingdom, v. T19A, p. 53-54, 1987.
- [37] FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de Força Atômica Aplicada em Imunoensaios. *Química Nova*, Brasil, v. 29, p. 137-142, 2006.

- [38] SMITH, D. A. et al. Chemical force microscopy: applications in surface characterisation of natural hydroxyapatite. *Analytica Chimica Acta*, Netherlands, v. 479, p. 39-57, Mar. 2003.
- [39] ALSTEENS, D. et al. Nanoscale imaging of microbial pathogens using atomic force microscopy. *Wiley Interdisciplinary Reviews - Nanomedicine and Nanobiotechnology*, United States, v. 1, p. 168-180, Mar./Apr. 2009.
- [40] AZEHARA, H.; TOKUMOTO, H. Analysis of the number of hydrogen bond groups of a multiwalled carbon nanotube probe tip for chemical force microscopy. *Applied Surface Science*, Philadelphia, v. 256, p. 987-990, Nov. 2009.
- [41] DORDI, B. et al. Probing chemical reactions on the nanometer scale: Inverted chemical force microscopy of reactive self-assembled monolayers. *Surface Science*, Philadelphia, v. 570, p. 57-66, Oct. 2004.
- [42] ZHANG, H. et al. Force titration of amino group-terminated self-assembled monolayers of 4-aminothiophenol on gold using chemical force microscopy. *Thin Solid Films*, Philadelphia, v. 327, p. 778-780, Aug. 1998.
- [43] BRANT, J. A.; JOHNSON, K. M.; CHILDRESS, A. E. Characterizing NF and RO membrane surface heterogeneity using chemical force microscopy. *Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects*, Philadelphia, v. 280, p. 45-57, Jun. 2006.
- [44] ARAKI, K.; TOMA, H. E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfinas e complexos metálicos. *Química Nova*, Brasil, v. 25, p. 962-975, 2002.
- [45] BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. The application of atomic force spectroscopy to the study of biological complexes undergoing a biorecognition process. *Chemical Society Reviews*, London, v. 39, p. 734-749, 2010.
- [46] CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*, Philadelphia, v. 34, p. 1-3, 5-104, 1999.
- [47] SEO, Y.; JHE, W. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports on Progress in Physics*, United Kingdom, v. 71, Jan. 2008.
- [48] WANG, H. D. et al. Glutaraldehyde modified mica: A new surface for atomic force microscopy of chromatin. *Biophysical Journal*, Rockville, v. 83, p. 3619-3625, Dec. 2002.
- [49] BILLINGSLEY, K. et al. Fluorescent Nano-Optodes for glucose detection. *Analytical Chemistry*, Washington/DC, v. 82, p. 3707-3713, May 2010.
- [50] AWSIUK, K. et al. Spectroscopic and microscopic characterization of biosensor surfaces with protein/amino-organosilane/silicon structure. *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces*, Philadelphia, v. 90, p. 159-168, 2012.
- [51] HORNYAK G. L. et al. *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. California: CRC Press, 2008.

- [52] FRANCA, E. F. et al. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. *Physical Chemistry Chemical Physics*, London, v. 13, p. 8894-8899, 2011.
- [53] MELO, A. F. *Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis*. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- [54] RUMAYOR, V. G. et al. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Madri: Fundación para el conocimiento, 2005.
- [55] SWIERCZEWSKA, M. et al. High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. *Chemical Society Reviews*, London, v. 41, p. 2641-2655, 2012.
- [56] BURNHAM, N. A.; COLTON, R. J.; POLLOCK, H. M. Interpretation of force curves in force microscopy. *Nanotechnology*, London, v. 4, p. 64-80, 1993.
- [57] GARCIA R.; PEREZ R. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, Philadelphia, v. 47, p. 197–301, 2002.
- [58] SISQUELLA, X. et al. A single-molecule force spectroscopy nanosensor for the identification of new antibiotics and antimalarials. *Faseb Journal*, Bethesda, v. 24, p. 4203-4217, Nov. 2010.
- [59] FERRAZ, R. M. et al. High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor. *Molecular Immunology*, Philadelphia, v. 43, p. 2119–2123, May 2006.
- [60] CUI, Y. et al. Biomimetic peptide nanosensors. *Accounts of Chemical Research*, Washington/DC, v. 45, p. 696-704, May 2012.
- [61] VO-DINH T. Nanosensors and nanoprobos for environmental health sensing and biomedical screening. In: LEOS SUMMER TOPICAL MEETINGS, 2008. *Digest...* [S.l.:s.n.], 2008. p. 59-60
- [62] DEVREESE, J. T. Importance of nanosensors: Feynman's vision and the birth of nanotechnology. *Mrs Bulletin*, Warrendale, v. 32, p. 718-724, Sep. 2007.
- [63] BOGUE, R. Nanosensors: a review of recent research. *Sensor Review*, United Kingdom, v. 29, p. 310–315, 2009.
- [64] CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- [65] BOWEN, W. R.; HILAL, N. Atomic Force Microscopy in process engineering: Introduction to AFM for improved processes and products. Britain: Butterworth-Heinemann, 2009. 283 p.
- [66] GUNSOLUS, J. L.; CURRAN, W. S. Herbicide mode of action and injury symptoms. Minnesota: North Central Regional Extension Publications; University of Minnesota Extension, 1999. 22 p.

- [67] MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. *Herbicidas: mecanismos de ação e uso*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 36 p. (Embrapa Cerrados, v. 227).
- [68] SMITH, A. E. et al. Fate of diclofop-methyl after application to a wheat field. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v. 15, p. 234-238, Jul./Sep. 1986.
- [69] LU, Y. L. et al. Stereoselective behaviour of diclofop-methyl and diclofop during cabbage pickling. *Food Chemistry*, Philidelphia, v. 129, p. 1690-1694, Dec. 2011.
- [70] CAI, X. Y. et al. Effects of methyl-CD and humic acid on hydrolytic degradation of the herbicide diclofop-methyl. *Journal of Environmental Sciences - China*, Beijing, v. 17, p. 67-71, 2005.
- [71] CANADIAN ENVIRONMENTAL QUALITY GUIDELINES. Diclofop-methyl. In: *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Agricultural Water Uses*. Canadian: Council of Ministers of the Environment, 1999. 4 p.
- [72] SHIMABUKURO, R. H.; HOFFER, B. L. Enantiomers of diclofop-methyl and their role in herbicide mechanism of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Philidelphia, v. 51, p. 68-82, Jan. 1995.
- [73] GENFARM. *Diclofop-Methyl 375 Selective herbicide*. New South Wales, Australia: Genfarm Crop Protection Pty Ltd, 2005. 8 p.
- [74] GU, X. Enantioselective degradation of diclofop-methyl in cole (*Brassica chinensis* L.). *Food Chemistry*, Philidelphia, v. 121, p. 264-267, Jul. 2010.
- [75] CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*. 3. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008.
- [76] TAO, J. et al. Study on the enantioselectivity inhibition mechanism of acetyl-coenzyme A carboxylase toward haloxyfop by homology modeling and MM-PBSA analysis. *Journal of Molecular Modeling*, Bournemouth, v. 18, p. 3783-3792, Aug. 2012.
- [77] DAVIS M. S.; SOLBIATI, J.; CRONAN, J. E. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 275, p. 28593-28598, Sep. 2000.
- [78] JOYARD, J. et al. Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, Philidelphia, v. 49, p. 128-158, Apr. 2010.
- [79] SASAKI, Y.; NAGANO, Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Japan, v. 68, p. 1175-1184, Jun. 2004.
- [80] SASAKI, Y.; KONISHI, T.; NAGANO, Y. The compartmentation of acetyl-coenzyme-a carboxylase in plants. *Plant Physiology*, Waterbury, v. 108, p. 445-449, Jun. 1995.

- [81] POST-BEITTENMILLER, D. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 47, p. 405-430, 1996 1996.
- [82] H. L. Zhang, Z. R. Yang, Y. Shen, and L. Tong, Crystal structure of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme a carboxylase, *Science*, Washington/DC, v. 299, p. 2064-2067, Mar. 2003.
- [83] NATTER, K.; KOHLWEIN, S. D. Yeast and cancer cells: common principles in lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular and Cell Biology of Lipids*, Philadelphia, v. 1831, p. 314-326, 2013.
- [84] BECKERS, A. et al. Chemical inhibition of Acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cell. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 67, p. 8180-8187, Sep. 2007.
- [85] BRUSSELMANS, K. et al. RNA interference-mediated silencing of the Acetyl-CoA-Carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 65, p. 6719-6725, Aug. 2005.
- [86] BRAVIN, F.; ZANIN, G.; PRESTON, C. Resistance to diclofop-methyl in two Lolium spp. populations from Italy: studies on the mechanism of resistance. *Weed Research*, Washington/DC, v. 41, p. 461-473, Oct. 2001.
- [87] SHIMABUKURO, R. H.; HOFFER, B. L. Effect of diclofop on the membrane-potentials of herbicide-resistant and herbicide-susceptible annual ryegrass root-tips. *Plant Physiology*, Waterbury, v. 98, p. 1415-1422, Apr. 1992.
- [88] SHIMABUKURO, R. H.; HOFFER, B. L. Effects on transmembrane proton gradient and lipid biosynthesis in the mode of action of diclofop-methyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Philadelphia, v. 48, p. 85-97, Feb. 1994.
- [89] DE PRADO, J. L.; DE PRADO R. A.; SHIMABUKURO, R. H. The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction, and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Philadelphia, v. 63, p. 1-14, Jan. 1999.
- [90] FALK, J. S.; AL-KHATIB, K.; PETERSON, D. E. Rapid assay evaluation of plant response to protoporphyrinogen oxidase (protox)-inhibiting herbicides. *Weed Technology*, Washington/DC, v. 20, p. 104-112, Jan./Mar. 2006.
- [91] DAYAN, F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Philadelphia, v. 101, p. 182-190, Nov. 2011.
- [92] HAUSLER, R. E.; HOLTUM, J. A. M., POWLES, S. B. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*lolium-rigidum*) .4. correlation between membrane effects and resistance to graminicides. *Plant Physiology*, Waterbury, v. 97, p. 1180-1186, Nov. 1991.

- [93] CONTECAMERINO, D. et al. Enantiomers of clofibrac acid analogs have opposite actions on rat skeletal-muscle chloride channels. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, Germany, v. 413, p. 105-107, Nov. 1988.
- [94] BETTONI, G. et al. Stereospecificity of the chloride-ion channel: the action of chiral clofibrac acid analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington/DC, v. 30, p. 1267-1270, Aug. 1987.
- [95] LUCAS, W. J.; WILSON, C., WRIGHT, J. P. Perturbation of chara plasmalemma transport function by 2,4-(2',4'-dichlorophenoxy)phenoxy propionic acid. *Plant Physiology*, Waterbury, v. 74, p. 61-66, 1984.
- [96] BAPTISTINI, N. et al. Estudos de docking molecular aplicados ao estudo da formação de complexos entre derivados de compostos calcogênicos e enzimas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. *Resumo...* São José do Rio Preto: UNESP, 2009. p. 07213-07216.
- [97] NEESE, F. The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews - Computational Molecular Science*, Washington/DC, v. 2, p. 73-78, Jan./Feb. 2012.
- [98] SANSCHAGRIN, P. An introduction to molecular docking. Boston University, 2010.
- [99] ZUO, Z. L. et al. Molecular docking and 3D-QSAR studies on the binding mechanism of statine-based peptidomimetics with beta-secretase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Philadelphia, v. 13, p. 2121-2131, Mar. 2005.
- [100] MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, Malden, v. 19, p. 1639-1662, Nov. 1998.
- [101] BROOKS, C. L.; KARPLUS, R. T. I. N.; PETTITT, B. M. Dynamical Simulation Methods. In: *Advances in Chemical Physics*. New York: John Wiley & Sons, 2007. p. 33-58.
- [102] KALÉ, L. V. et al. NAMD: a case study in multilingual parallel programming. *Languages and Compilers for Parallel Computing: Lecture Notes in Computer Science*, New York, v. 1366, p. 367-381, 1998.
- [103] HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, Philadelphia, v. 14, p. 33-38, Feb. 1996.
- [104] MARTYNA, G. J.; TOBIAS, D. J.; KLEIN, M. L. Constant-pressure molecular-dynamics algorithms. *Journal of Chemical Physics*, Melville, v. 101, p. 4177-4189, Sep. 1994.
- [105] ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh ewald method. *Journal of Chemical Physics*, Melville, v. 103, p. 8577-8593, Nov. 1995.
- [106] BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry*, Malden, v. 30, p. 1545-1614, Jul. 2009.

- [107] CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, Brasil, v. 32, p. 175-187, 2009.
- [108] AGUIAR, R. O. et al. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. *Acta Scientiarum Technology*, Brasil, v. 32, p. 15-19, 2010.
- [109] VOLPATO, G. *Produção, purificação e imobilização de Staphylococcus warneri EX17 produzidas em glicerol*. 2009. 144 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- [110] SILVA, A. C. N. da et al. Nanobiosensors based on chemically modified AFM Probes: a useful tool for metsulfuron-methyl detection. *Sensors*, Switzerland, v. 13, p. 1477-1489, 2012.
- [111] GRALLERT, S. R. M.; TAVARES, L. C.; ARAÚJO, E. B. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Brasil, v. 39, p. 243-257, 2003.
- [112] SADER, J. E.; CHON, J. W. M.; MULVANEY, P. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, Melville, v. 70, p. 3967-3969, Oct. 1999.
- [113] LI, X. L. et al. Molecular docking, molecular dynamics simulation, and structure-based 3D-QSAR studies on estrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyls. *Science of the Total Environment*, Philadelphia, v. 441, p. 230-238, Dec. 2012.
- [114] ZHANG, H.; TWEEL, B.; TONG, L. Molecular basis for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme-A carboxylase by haloxyfop and diclofop. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington/DC, v. 101, p. 5910-5915, 2004.
- [115] HUANG, E. et al. Raman spectroscopic characteristics of Mg-Fe-Ca pyroxenes. *American Mineralogist*, Chantilly, v. 85, p. 473-479, Mar./Apr. 2000.
- [116] TRITTSCHACK, R.; GROBETY, B.; KOCH-MULLER, M. In situ high-temperature Raman and FTIR spectroscopy of the phase transformation of lizardite. *American Mineralogist*, Chantilly, v. 97, p. 1965-1976, Nov./Dec. 2012.
- [117] PODSTAWKA, E.; OZAKI, Y.; PRONIEWICZ, L. M. Part I: Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Applied Spectroscopy*, New York, v. 58, p. 570-580, May 2004.
- [118] GUIRGIS, G. A. et al. Infrared, Raman and far infrared spectra, ab initio calculations, and internal rotation of 3-fluoro-3-methyl-1-butyne. *Physical Chemistry Chemical Physics*, London, v. 6, p. 3919-3927, 2004.
- [119] MORENO, A. J. D. et al. Raman scattering studies of monohydrated L-asparagine. *Brazilian Journal of Physics*, Brasil, v. 29, p. 380-387, Jun. 1999.

- [120] PODSTAWKA, E.; OZAKI, Y.; PRONIEWICZ, L. M. Part II: Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of methionine containing fletrodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Applied Spectroscopy*, New York, v. 58, p. 581-590, May 2004.
- [121] IBRAHIM, E. E. et al. Raman Spectroscopy of Isotactic Polypropylene-Halloysite Nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, New York, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- [122] DE GELDER, J. et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, Malden, v. 38, p. 1133-1147, Sep. 2007.
- [123] PODSTAWKA, E.; OZAKI, Y.; PRONIEWICZ, L. M. Part III: Surface-enhanced Raman scattering of amino acids and their homodipeptide monolayers deposited onto colloidal gold surface. *Applied Spectroscopy*, New York, v. 59, p. 1516-1526, Dec. 2005.
- [124] PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and $(^{13}\text{C})\text{NMR}$ spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, Philadelphia, v. 20, p. 223-228, Jul. 2003.
- [125] PUVIARASAN, N.; ARJUNAN, V.; MOHAN, S. FTIR and FT-Raman spectral investigations on 4-aminoquinoline and 5-aminoquinoline. *Turkish Journal of Chemistry*, Turkey, v. 28, p. 53-65, 2004.
- [126] KUMAR, V. et al. Ab-initio calculations, FT-IR and FT-Raman spectra of 2-chloro-6-methyl benzonitrile. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, New Delhi, v. 48, p. 85-94, Feb. 2010.
- [127] TLILI, A. et al. A Raman microprobe study of natural micas. *Mineralogical Magazine*, United Kingdom, v. 53, p. 165-179, Apr. 1989.
- [128] BOO, B. H. Infrared and Raman Spectroscopic Studies Tris(trimethylsilyl)silane Derivatives of $(\text{CF}_3)_3\text{Si}(\text{Si}-\text{X})_3$ X = H, Cl, OH, CH₃, OCH₃, Si(CH₃)₃ : Vibrational Assignments by Hartree-Fock and Density-functional Theory Calculations. *Journal of the Korean Physical Society*, Korea, v. 59, p. 3192-3200, Nov. 2011.
- [129] TSAPIKOUNI, T. S.; MISSIRLIS, Y. F. Measuring the force of single protein molecule detachment from surfaces with AFM. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, Philadelphia, v. 75, p. 252-259, Jan. 2010.
- [130] HAYNES, C. A.; NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, Philadelphia, v. 2, p. 517-566, 1994.
- [131] CEOTTO FILHO, G. *Medidas do perfil da permissividade elétrica em interfaces sólido-líquido, usando microscopia de força atômica*. 2001. 90 f. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

- [132] CLAESSION, P.; HORN, R. G.; PASHLEY, R. M. Measurement of surface forces between mica sheets immersed in aqueous quaternary ammonium ion solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, Philadelphia, v. 100, p. 250-263, 1984.
- [133] BASU, S.; SHARMA, M. M. Measurement of critical disjoining pressure for dewetting of solid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, Philadelphia, v. 181, p. 443-455, Aug. 1996.
- [134] BASU, S.; SHARMA, M. M. Effect of dielectric saturation on disjoining pressure in thin-films of aqueous-electrolytes. *Journal of Colloid and Interface Science*, Philadelphia, v. 165, p. 355-366, Jul. 1994.
- [135] DAS, S. K.; SCHECHTER, R. S.; SHARMA, M. M. The role of surface-roughness and contact deformation on the hydrodynamic detachment of particles from surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, Philadelphia, v. 164, p. 63-77, Apr. 1994.
- [136] NOY, A. Chemical force microscopy - exploiting chemically-modified tips to quantify adhesion, friction, and functional-group distributions in molecular assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, Washington/DC, v. 117, p. 7943-7951, Aug. 1995.
- [137] VEZENOV, D. V. et al. Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, Washington/DC, v. 119, p. 2006-2015, Feb. 1997.
- [138] AHONSI, M. O. et al. Effects of ALS-inhibitor herbicides, crop sequence, and fertilization on natural soil suppressiveness to *Striga hermonthica*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Philadelphia, v. 104, p. 453-463, 2004.
- [139] KOGAN, M. et al. Using penoxsulam ALS inhibitor as a broad-spectrum herbicide in Chilean rice. *Ciencia e Investigación Agraria*, Chile, v. 38, p. 83-93, 2011.
- [140] WALSH, D. T. et al. Camelina mutants resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. *Molecular Breeding*, Malden, v. 30, p. 1053-1063, Aug. 2012.
- [141] ALIBHAI, M. F.; STALLINGS, W. C. Closing down on glyphosate inhibition-with a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington/DC, v. 98, p. 2944-2946, 2001.
- [142] YU, Q. et al. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, Malden, v. 230, p. 713-723, Sep. 2009.
- [143] SILVA, A. C. N. da et al. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Metsulfuron-methyl Detection. *Sensors*, Switzerland, v. 13, p. 1477-1489, 2013.
- [144] BANERJEE, S. et al. Effect of surface roughness and softness on water capillary adhesion in apolar media. *Journal of Physical Chemistry A*, Washington/DC, v. 116, p. 6481-6488, Jun. 2012.

APÊNDICE A

A.1 Estruturas dos agroquímicos utilizados neste trabalho

A.1.1 Metsulfuron

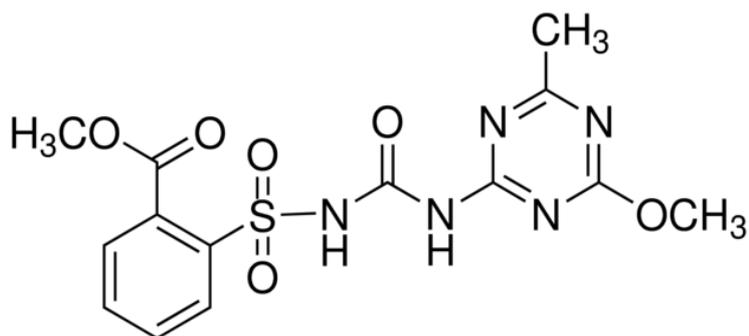


Figura A.1 Representação da estrutura química do Metsulfuron (metil-2-[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino] carbonil]-amino] sulfonil] benzoato).

A.1.2 Imazaquin

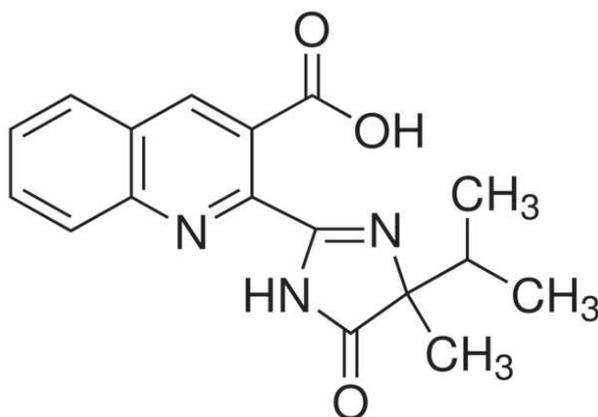


Figura A.2 Representação da estrutura química do Imazaquin 2-[4,5-didro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il]-3-quinolina-ácido carboxílico).

A.1.3 Glifosato

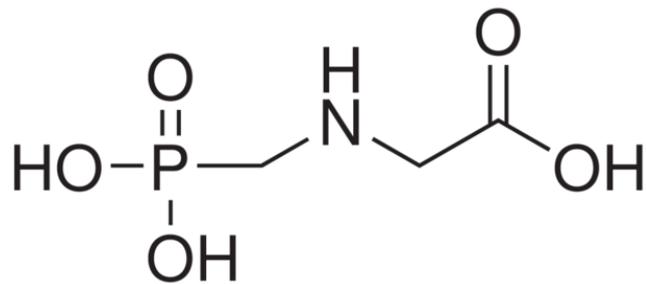


Figura A.3 Representação da estrutura química do Glifosato ([N-(fosfometil) glicina]).

ANEXO A

A.1 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINADO DESTE TRABALHO À REVISTA BIOSENSORS & BIOELECTRONICS: DETECTION OF DICLOFOP HERBICIDE USING AN ENZYMATIC NANOBIOSENSOR

A manuscript number has been assigned: BIOS-D-13-00256

Ms. Ref. No.: BIOS-D-13-00256

Title: DETECTION OF DICLOFOP HERBICIDE USING AN ENZYMATIC NANOBIOSENSOR

Biosensors and Bioelectronics

Dear Dr. Fabio Lima Leite,

Your submission entitled "DETECTION OF DICLOFOP HERBICIDE USING AN ENZYMATIC NANOBIOSENSOR" has been assigned the following manuscript number: BIOS-D-13-00256.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bios/>.

Your username is: fabioleite@ufscar.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/bios/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for

solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Professor Anthony P F Turner / Dr Alice X J Tang

Receiving Editors

Biosensors and Bioelectronics