

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS (PPGCM)

ADRIANO MORAES AMARANTE

**DESENVOLVIMENTO DA MICROSCOPIA DE FORÇA QUÍMICA USANDO
MODELAGEM MOLECULAR**

Sorocaba
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS (PPGCM)

ADRIANO MORAES AMARANTE

**DESENVOLVIMENTO DA MICROSCOPIA DE FORÇA QUÍMICA USANDO
MODELAGEM MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM), para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite

Co-Orientação: Prof. Dr. Eduardo Faria Franca

Sorocaba
2013

Amarante, Adriano Moraes

A485d Desenvolvimento da microscopia de força química usando modelagem molecular / Adriano Moraes Amarante. -- Sorocaba, 2013.

119 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, 2013

Orientador: Fábio de Lima Leite

Banca examinadora: Alberto Luís Dario Moreau, Sérgio Dias Campos, Tércio Guilherme de Souza Cruz

Bibliografia

1. Modelagem Molecular Computacional. 2. Microscopia de força química. 3. Biossensores. I. Título. II. Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

CDD 502.82

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

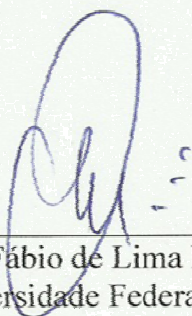
FOLHA DE APROVAÇÃO

ADRIANO MORAES AMARANTE

**"DESENVOLVIMENTO DE MICROSCOPIA DE FORÇA QUÍMICA USANDO
MODELAGEM MOLECULAR"**

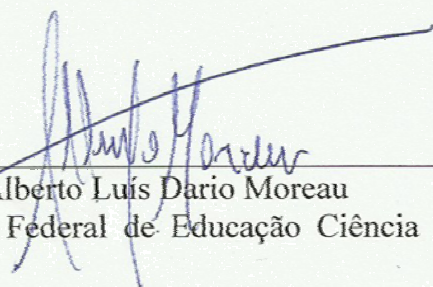
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 19 de março de 2013.

Orientador(a)



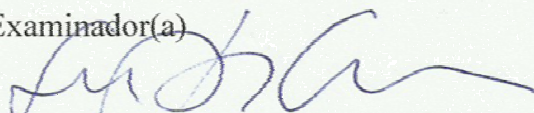
Prof (a). Dr.(a) Fábio de Lima Leite
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



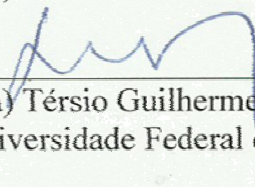
Prof (a). Dr. (a) Alberto Luís Dario Moreau
IFSP – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus Itapetininga

Examinador(a)

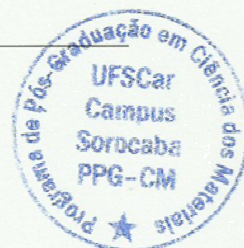


Prof (a). Dr. (a) Sérgio Dias Campos
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Tércio Guilherme de Souza Cruz
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba



Aos meus pais Herculano e Sonia.

“Do or do not. There is no try”

Yoda

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Herculano e Sonia, e aos meus irmãos Juliano e Natália pelo apoio incondicional e presença na minha vida a todo o momento.

Agradeço a minha querida avó Lourdes por todo apoio na vida estudantil e carinho que teve por mim em vida.

Agradeço aos meus mentores e amigos Fábio e Eduardo por toda confiança e ensinamentos de vida e profissionais.

Agradeço a meu tutor e amigo Guedmiller por tudo o que me ensinou e a cortesia mineira de toda sua família em Uberlândia.

Agradeço a minha amiga e companheira de pesquisa Carolina por todo trabalho e conhecimento compartilhado.

Agradeço a todo grupo de NanoNeuroBioFísica que faço parte na UFSCar-SO por todo apoio.

Agradeço aos meus professores da UFSCar-SO pelos conhecimentos transmitidos, apoio e confiança depositada.

Agradeço a todos os meus amigos e companheiros que estiveram comigo nesse período tão importante da minha vida.

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

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver o protótipo de um novo nanobiossensor de alta especificidade por intermédio do estudo e desenvolvimento de modelos teóricos específicos para a Microscopia de Força Química (MFQ). Para o sensoriamento foram utilizadas técnicas de Modelagem Molecular Computacional (MMC) e resultados experimentais de MFQ, do qual a ponta do Microscópio de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) foi funcionalizada com enzimas Acetil-coA Carboxilase (ACC). O nanobiossensor foi utilizado para detectar especificamente substratos de herbicidas específicos e não-específicos. O nanobiossensor explora as características de inibição enzimática específica da enzima ACC pelo herbicida Diclofop revertendo esse processo aplicando-se uma força numa determinada direção. Essa força foi calculada teoricamente por intermédio de cálculos de técnicas de Dinâmica Molecular e associada à força de adesão experimental. Os resultados experimentais validaram os modelos teóricos de forma inequívoca. Questões teóricas e experimentais envolvendo nanobiossensores de ponta de AFM não respondidas até o momento (número de enzimas úteis na ponta do AFM que podem interagir com o substrato, o número de sítios ativos disponíveis, consequências da imobilização das enzimas e do substrato, força de adesão teórica entre a ponta do AFM e o substrato de herbicidas, etc.) foram solucionadas neste trabalho.

Palavras Chave. Nanobiossensor. Modelagem Molecular Computacional (MMC). Microscópio de Força Atômica (AFM). Microscopia de Força Química (MFQ). Dinâmica Molecular. *Docking* Molecular. Acetil-coA Carboxilase. Diclofop. Funcionalização de Superfícies.

ABSTRACT

In this work was developed a prototype of a new nanobiosensor with molecular specificity through a study of theoretical models of Chemical Force Microscope. For the sensing were used molecular modeling techniques as well as experimental models of the functionalized Atomic Force Microscope tip with the Acetil co-A Carboxylase (ACC) attached. Specific and non-specific inhibitors were used to evaluate substrate-enzyme interactions. The nanobiosensor investigates specific enzymatic inhibition characteristics of the ACC enzyme through the herbicide Diclofop by reversing this process applying a force in a determined direction. The force is theoretically calculated by using molecular dynamic techniques associated to the adhesion force experimentally obtained. Theoretical and experimental questions involving nanobiosensors of AFM tips still obscure until now, such as, the number of functional enzymes attached on the AFM tip, the number of the active sites available to interact after immobilization process, the consequences of the enzyme immobilization as well as the substrate and theoretical adhesion between AFM tip and substrate were analyzed here.

Keywords: Nanobiosensor. Molecular Modeling. Atomic Force Microscopy. Chemical Force Microscopy. Molecular Dynamics. Molecular Docking. Acetil-coA Carboxilase. Diclofop. Surface Functionalization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da ligação peptídica	34
Figura 2 – Tipos de modelagem de estruturas básicas de proteínas.....	35
Figura 3 – Modelagem da enzima ALS	38
Figura 4 – Ângulo de torção entre i , j , k e l	41
Figura 5 – Diagrama esquemático do AFM.....	50
Figura 6 – Curva de força típica.....	53
Figura 7 – Via da síntese dos lipídeos, catalisada pela enzima ACC	57
Figura 8 – Estrutura química do Diclofop.....	58
Figura 9 – Estrutura da enzima ACC	68
Figura 10 – Funcionalização da ponta do AFM com enzima ACC.....	70
Figura 11 – Funcionalização do substrato com Diclofop.....	71
Figura 12 – <i>Docking</i> Molecular das células Dinâmica Molecular da ACC.....	73
Figura 13 – Desvio quadrático médio da enzima ACC relaxada.....	75
Figura 14 – Potencial Eletrostático da superfície da enzima ACC.....	76
Figura 15 – Modelo Rígido da enzima ACC desenvolvido	77
Figura 16 – Posição 1. Uma das três possíveis formas de funcionalização.....	79
Figura 17 – Posição 2. Uma das três possíveis formas de funcionalização.....	80
Figura 18 – Posição 3. Uma das três possíveis formas de funcionalização.....	81
Figura 19 – Simulação por Dinâmica Molecular da enzima ACC.....	82
Figura 20 – Uma possível forma de encaixe sem nova estrutura multimérica	84
Figura 21 – Áreas de ocupação na ponta do AFM pela enzima ACC.....	85
Figura 22 – Monocamada 2D de menor dimensão possível de enzimas ACC	86
Figura 23 – Curva do Parâmetro de distância d x Raio.....	87

Figura 24 – Curva número de enzimas úteis N x Raio	88
Figura 25 – Arranjo esperado de enzimas ACC	90
Figura 26 – Dinâmica Molecular Direcionada	91
Figura 27 – Curva de força experimental.....	93
Figura 28 – Histograma contendo a frequência relativa	94
Figura 29 – <i>Artwork</i> da modelagem do nanobiossensor.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC– Acetil-coA Carboxilase

AFM – *Atomic Force Microscopy*

ALS – Acetolactato Sintase

APTES – 3-aminopropiltrietoxissilano

MFQ – Microscopia de Força Química

MMC – Modelagem Molecular Computacional

PDB – *Protein Data Bank*

RMSD – Desvio Quadrático Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVOS GERAIS	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	31
3.1 MMC	31
3.1.1 MMC - Definição	31
3.1.2 Biomoléculas e Modelagem de Proteínas	32
3.1.2.1 Biomoléculas	32
3.1.2.2 Proteínas	32
3.1.2.3 Estrutura das Proteínas	34
3.1.2.4 Tipos de Representação de Biomoléculas e Proteínas	36
3.1.3 Métodos Clássicos de MMC aplicados a Biomoléculas	39
3.1.3.1 Dinâmica Molecular	39
3.1.3.1.1 <i>Dinâmica Molecular e Potenciais Relacionados</i>	39
3.1.3.1.2 <i>Métodos de Simulação de Dinâmica Molecular</i>	43
3.1.3.2 Docking Molecular	46
3.1.3.2.1 <i>Docking Molecular - Definição</i>	46
3.1.3.2.2 <i>Docking Molecular Receptor-Ligante</i>	47
3.1.3.2.3 <i>Algoritmos Genéticos</i>	47
3.2 AFM e a MFQ	48
3.2.1 O AFM	48
3.2.2 MFQ	51

3.3 NANOBIOSENSORES DE PONTA DE AFM	53
3.3.1 Definição de Nanossensores e Nanobiossensor de Ponta de AFM.....	53
3.3.2 Imobilização de enzimas em suportes.....	55
3.4 A ENZIMA ACC	55
3.4.1 Função da enzima ACC na síntese de ácidos graxos	55
3.4.2 Herbicida Diclofop e Diclofop-Metílico	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1 PARTE COMPUTACIONAL	61
4.1.1 Sistema Molecular	61
4.1.2 Simulação por <i>Docking</i> Molecular	61
4.1.3 Simulação por Dinâmica Molecular	62
4.1.4 Potencial eletrostático e representação da superfície da enzima ACC	63
4.1.5 Simulação por Dinâmica Molecular Direcionada	63
4.2 PARTE EXPERIMENTAL	64
4.2.1 Processo de Funcionalização da ponta do AFM.....	64
4.2.2 Imobilização dos Herbicidas Diclofop na Superfície de Mica.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 ESTRUTURA DA ENZIMA ACC.....	67
5.2 PROCESSOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES.....	69
5.2.1 Funcionalização da ponta do AFM (Elemento Sensorial)	69
5.2.2 Funcionalização da Placa de Mica (Substrato)	71
5.3 <i>DOCKING</i> MOLECULAR E DINÂMICA MOLECULAR.....	72
5.4 SUPERFÍCIES DE INTERAÇÃO.....	74
5.4.1 Estrutura da enzima ACC e o Modelo Rígido desenvolvido	74
5.4.2 Probabilidades envolvidas nas áreas de interação	77

5.4.3 Área média ocupada na superfície da ponta do AFM pela ACC	83
5.4.4 Número de enzimas úteis na ponta do AFM funcionalizada	85
5.5 DINÂMICA MOLECULAR DIRECIONADA	90
5.6 MONTAGEM EXPERIMENTAL DO NANOBIOSENSOR	92
5.7 O PROTÓTIPO DO NANOBIOSENSOR	95
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	101
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE A	111
APÊNDICE B	113
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

Nanobiossensores são sensores biológicos com a sensibilidade e a seletividade na nanoescala (compreendidos na escala de 1-100 nm) (Rumayor, Iglesias e Cabezas, 2005). A resolução em detecção de forças no AFM pode ser menor do que a magnitude da ligação química mais fraca (Smith, 1995), o que torna possível investigar interações moleculares específicas, que é o caso da MFQ, baseadas em pontas de AFM funcionalizadas. Entretanto, grupos químicos específicos, adsorvidos ou ligados covalentemente na ponta do AFM e interagindo com outras superfícies são ainda pouco explorados, e por essa razão foram modelados neste trabalho por intermédio da MMC da MFQ.

Os nanobiossensores estão sendo estudados e desenvolvidos por intermédio de modelos teóricos e protótipos experimentais, explorando a MFQ e a MMC, dando destaque aos trabalhos do grupo de pesquisa de NanoNeuroBioFísica da UFSCar-So (“Grupo de NanoNeuroBioFísica”, [s.d.]) (ANEXO A, ANEXO B). Neste contexto, estudos fenomenológicos são importantes, visando maior interação entre trabalhos experimentais e teóricos e, de fato, poucos modelos teóricos para nanobiossensores possuem comprovações experimentais. A ligação entre modelos teóricos e experimentais pode fazer com que, além de comprovações e validações, novos conhecimentos surjam, conhecimentos esses não oriundos somente de um, mas emergentes da fusão entre vários modelos, teóricos e experimentais. Sendo assim, o desenvolvimento da MFQ por intermédio da MMC apresentado neste trabalho foi o “elo” que uniu modelos teóricos e protótipos experimentais, resultando em novos conhecimentos que permitiram o desenvolvimento de um novo nanobiossensor.

Dentre as técnicas de MMC existentes atualmente, a Dinâmica Molecular é uma das mais promissoras e merece grande destaque. Poderosa e versátil ferramenta no estudo de macromoléculas biológicas, a Dinâmica Molecular fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico dos átomos individuais que compõem um determinado sistema, tendo como base a Mecânica Clássica (Berman *et al.*, 2000; Frenkel e Smit, 2001).

O modelo Chave-Fechadura usado para descrever o mecanismo de catálise de uma reação, por intermédio das enzimas, retrata o que se supunha sobre o grau

de conformação das proteínas, porém hoje se sabe que as proteínas ao catalisarem uma reação química possuem um determinado grau de conformação, principalmente nos resíduos que compõe seu sítio ativo (Bowen e Hilal, 2009). Assim, os modelos criados neste trabalho para a MFQ, permitem a conformação de toda ou parte da enzima ACC, ou a considera ainda uma estrutura rígida, dependendo das condições termodinâmicas e nanoescalas envolvidas.

Os modelos desenvolvidos neste trabalho, ilustrados em figuras autoexplicativas, respondem a questões fenomenológicas que até o momento não haviam sido solucionadas, e que são de suma importância para o desenvolvimento de novos protótipos de nanobiossensores, além de “abrir as portas” para novas ideias aplicadas no estudo de doenças autoimunes e neurodegenerativas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Objetivo geral deste trabalho é estudar e aperfeiçoar modelos teóricos capazes de fornecer subsídios para o desenvolvimento de nanobiossensores de alta especificidade utilizados na detecção de herbicidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Descrever por intermédio de modelo teórico a funcionalização da superfície da ponta do AFM para imobilizar a molécula sensorial;
- 2) Descrever por intermédio do modelo teórico a funcionalização da superfície do substrato de mica com as moléculas do herbicida Diclofop;
- 3) Propor um modelo teórico que explique as superfícies envolvidas no nanobiossensor do ponto de vista do sensoriamento.
- 4) A partir do modelo teórico proposto e cálculos de Dinâmica Molecular, fazer previsões que corroborem resultados experimentais existentes.
- 5) Relacionar os resultados obtidos pelo modelo teórico com resultados experimentais, obtendo mais uma ferramenta para validar e aperfeiçoar o protótipo experimental do nanobiossensor de alta especificidade.
- 6) A partir do modelo teórico proposto, fazer previsões que sugiram e auxiliem o surgimento de novos resultados experimentais.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 MMC

3.1.1 MMC - Definição

Objetivando entender e prever o comportamento de sistemas reais, a modelagem molecular compreende um número de ferramentas e métodos computacionais que são usados para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Sendo assim, a MMC é a modelagem que estuda as propriedades atômicas por intermédio do uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica. Esse é um ramo no qual se estuda sistemas químicos e biológicos mais complexos, com um número elevado de partículas, da ordem de 10^{23} , podendo realizar cálculos específicos e criar modelos que seriam impossíveis de serem realizados de outra maneira (Morgon e Coutinho, 2007; Sant'Anna, 2009).

Com o avanço dos recursos computacionais, tratando-se de softwares e hardwares, a MMC se desenvolveu de maneira surpreendente nas últimas décadas. No passado, a MMC era restrita ao grupo de pesquisadores e cientistas responsáveis pelo desenvolvimento dos *softwares* utilizados. Nos dias atuais, diversos recursos e softwares de modelagem estão disponíveis gratuitamente na rede web, sem ter a necessidade de ter uma pessoa em um grupo de pesquisa destinada exclusivamente para o desenvolvimento de tais *softwares*.

Cabe salientar que o campo da química computacional e de MMC foi de fato reconhecido em 1998, fato que acarretando um prêmio Nobel em Química a John Pople e Walter Kohn (Santos, 2001).

3.1.2 Biomoléculas e Modelagem de Proteínas

3.1.2.1 Biomoléculas

As biomoléculas são compostos químicos sintetizados por seres vivos. Dentre elas podem-se destacar as proteínas, que apresentam estruturas amplamente estudadas através de modelagem molecular. Seu alto grau de conformação exige modelos mais dinâmicos que retratem suas propriedades químicas e físicas, e neste contexto, a modelagem molecular conta com poderosas ferramentas computacionais específicas para esse tipo de estrutura complexa, como a Dinâmica Molecular, que é a simulação computacional do movimento molecular.

3.1.2.2 Proteínas

As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes em todas as partes das células. Elas são encontradas em uma enorme variedade de espécies e apresentam pesos moleculares muito diferentes, o que resulta em uma enorme diversidade de funções biológicas (Nelson e Cox, 2011).

Definimos proteína como uma sequência ou cadeia polimérica de aminoácidos, sendo que cada resíduo se une com seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente chamada de ligação peptídica. As proteínas são compostas em sua grande maioria por apenas quatro elementos químicos: C, H, O e N. Esta definição é importante, pois são as proteínas as biomoléculas mais representadas no presente trabalho, e por isso que suas estruturas e diferentes formas de modelagem serão apresentadas (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008).

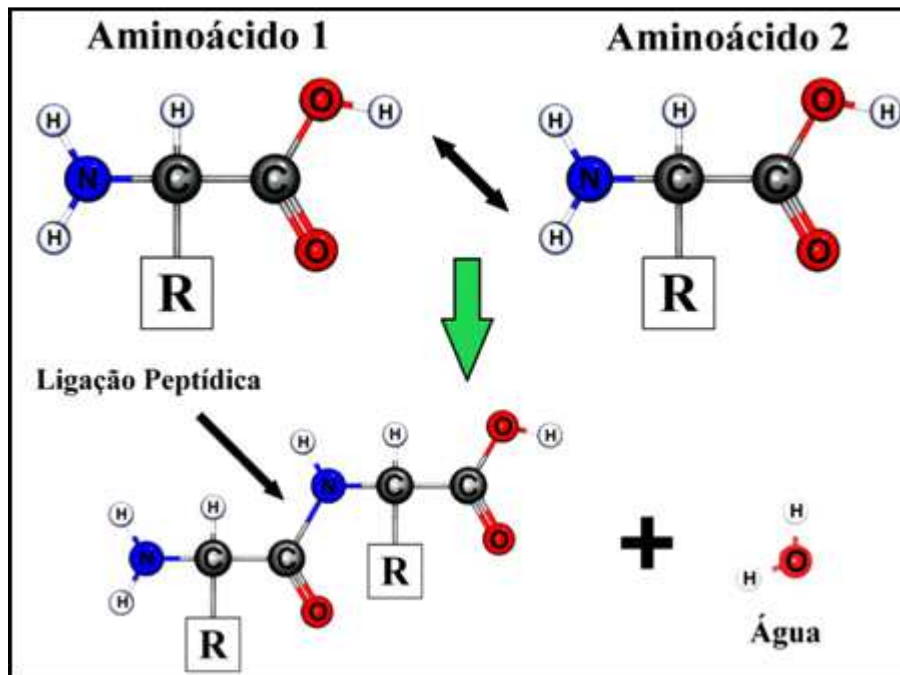
Os aminoácidos são subunidades monoméricas relativamente simples que fornecem a estrutura básica das proteínas. Todas as proteínas, sejam as das mais antigas cepas de bactérias ou das mais complexas formas de vidas, são construídas a partir de um mesmo conjunto ubíquo de 20 aminoácidos (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008). Um fato admirável é que as células podem produzir proteínas com propriedades e atividades das mais diferentes, simplesmente unindo os mesmos 20 aminoácidos em muitas combinações e sequências diferentes (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008). Com isto os organismos podem

fazer tal diversidade de produtos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras e elementos como penas, teias, chifres, entre outros. Entre estes produtos protéicos, as enzimas são as mais variadas e especializadas (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008). Praticamente, todas as reações celulares são catalisadas por enzimas (Brown, Lemay e Bursten, 2005; Nelson e Cox, 2011).

Todos os 20 aminoácidos comuns são α -aminoácidos, ou seja, eles possuem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono determinado carbono α (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008). Eles diferem uns dos outros nas suas cadeias laterais ou grupos R, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e que influenciam a solubilidade dos aminoácidos em água (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008). Modelos simples e de grande funcionalidade podem ser usados para representar os aminoácidos, e neste caso o modelo bolas e bastões é o mais indicado (Santos, 2001) (FIG. 1). Cabe ressaltar que nesta representação não há interesse na estrutura tridimensional da molécula e nem na escala do desenho (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008).

A ligação entre o grupo amino e o grupo carboxila entre dois aminoácidos é chamada de ligação peptídica (FIG 1) (Voet, Voet e Pratt, 2008). Esta ligação também resulta na perda de uma molécula de água sobrando apenas o que chamamos de resíduo dos dois aminoácidos iniciais (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008).

FIGURA 1 – Representação esquemática da união entre dois aminoácidos através da ligação peptídica.



Fonte: Modelagem com base em (Voet, Voet e Pratt, 2008).

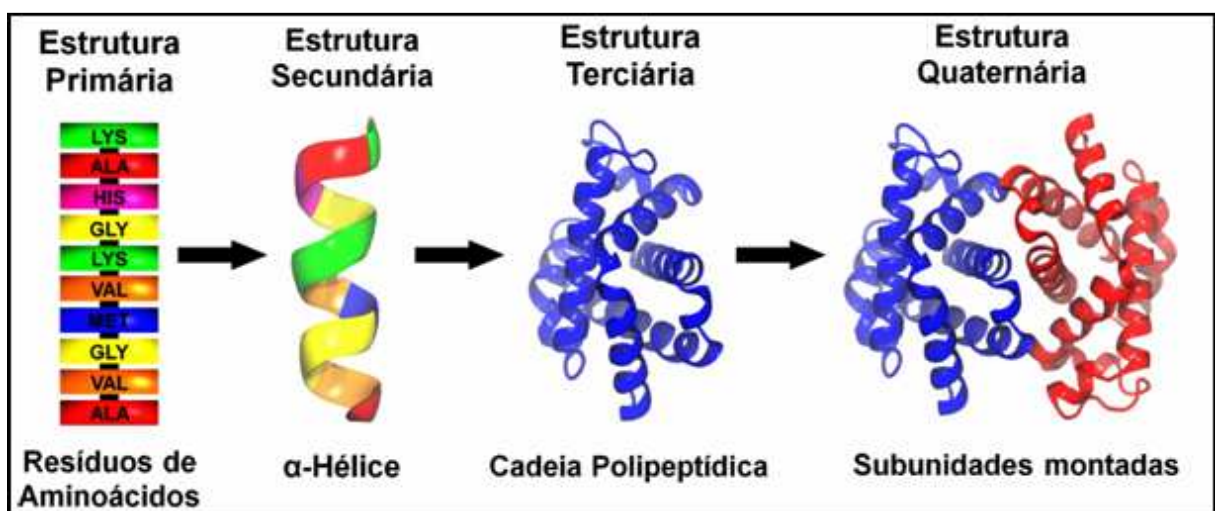
3.1.2.3 Estrutura das Proteínas

Existem vários níveis de estrutura proteica, e para descrever e entender essas estruturas são necessários temas que são abordados em diversos níveis de complexidade (Brown, Lemay e Bursten, 2005; Voet, Voet e Pratt, 2008). Comumente são definidos quatro níveis de estrutura básica para as proteínas (FIG. 2) (Brown, Lemay e Bursten, 2005; Voet, Voet e Pratt, 2008):

- *Estrutura primária*: consiste de uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e inclui quaisquer ligações dissulfeto (Nelson e Cox, 2011).
- *Estrutura secundária*: é o polipeptídeo resultante da estrutura primária e pode ser espiralado ou ter a estrutura de uma hélice (Nelson e Cox, 2011).

- *Estrutura terciária*: várias hélices ou espirais por sua vez descrevem todos os aspectos do enovelamento tridimensional da cadeia polipeptídica (Nelson e Cox, 2011).
- *Estrutura quaternária*: ocorre quando duas cadeias polipeptídicas ficam unidas entre si (Nelson e Cox, 2011).

FIGURA 2 – Tipos de modelagem de estruturas básicas formados pelas proteínas.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB (do inglês *Protein Data Bank*) referência 1V4U ("RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB", [s.d.]).

A proteína utilizada na FIG. 2 se trata da subunidade beta da hemoglobina, proteína transportadora de oxigênio no sistema circulatório (Yokoyama *et al.*, 2004).

As uniões das cadeias polipeptídicas nas proteínas ocorrem em sua maioria por ligações de dissulfeto e ligações de hidrogênio. Esta estrutura tridimensional junto com a sequência de aminoácidos confere a proteína sua função específica (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008). Algumas destas funções específicas muitas vezes consistem em catalisar reações químicas, desse modo a proteína passa a pertencer a uma classe denominada enzima (Nelson e Cox, 2011; Voet, Voet e Pratt, 2008).

3.1.2.4 Tipos de Representação de Biomoléculas e Proteínas

Como foi dito anteriormente, a modelagem molecular consiste em criar modelos teóricos que representem as estruturas e certas propriedades das moléculas. Sendo assim, diferentes propriedades de estudo podem ser destacadas em diferentes modelos de representação. Os modelos têm como objetivo destacar certas propriedades importantes das moléculas, podendo muitas vezes ser criados de maneira distante da realidade como um todo, mas que atendam muito especificamente o objeto de estudo em si. Para elucidar melhor estes conceitos, será utilizada como exemplo a MMC da enzima Acetolactato Sintase (ALS) na FIG. 4. A ALS é uma proteína que participa da síntese de aminoácidos nas plantas, fungos e bactérias (McCourt e Duggleby, 2006).

O modelo da FIG 3A é de grande valor quando se trata de estudar os elementos químicos, até mesmo alguns tipos de ligação, é o modelo de bolas e bastões (Santos, 2001), representando elementos diferentes por cores diferentes elucidando, assim, os elementos químicos que compõe a molécula.

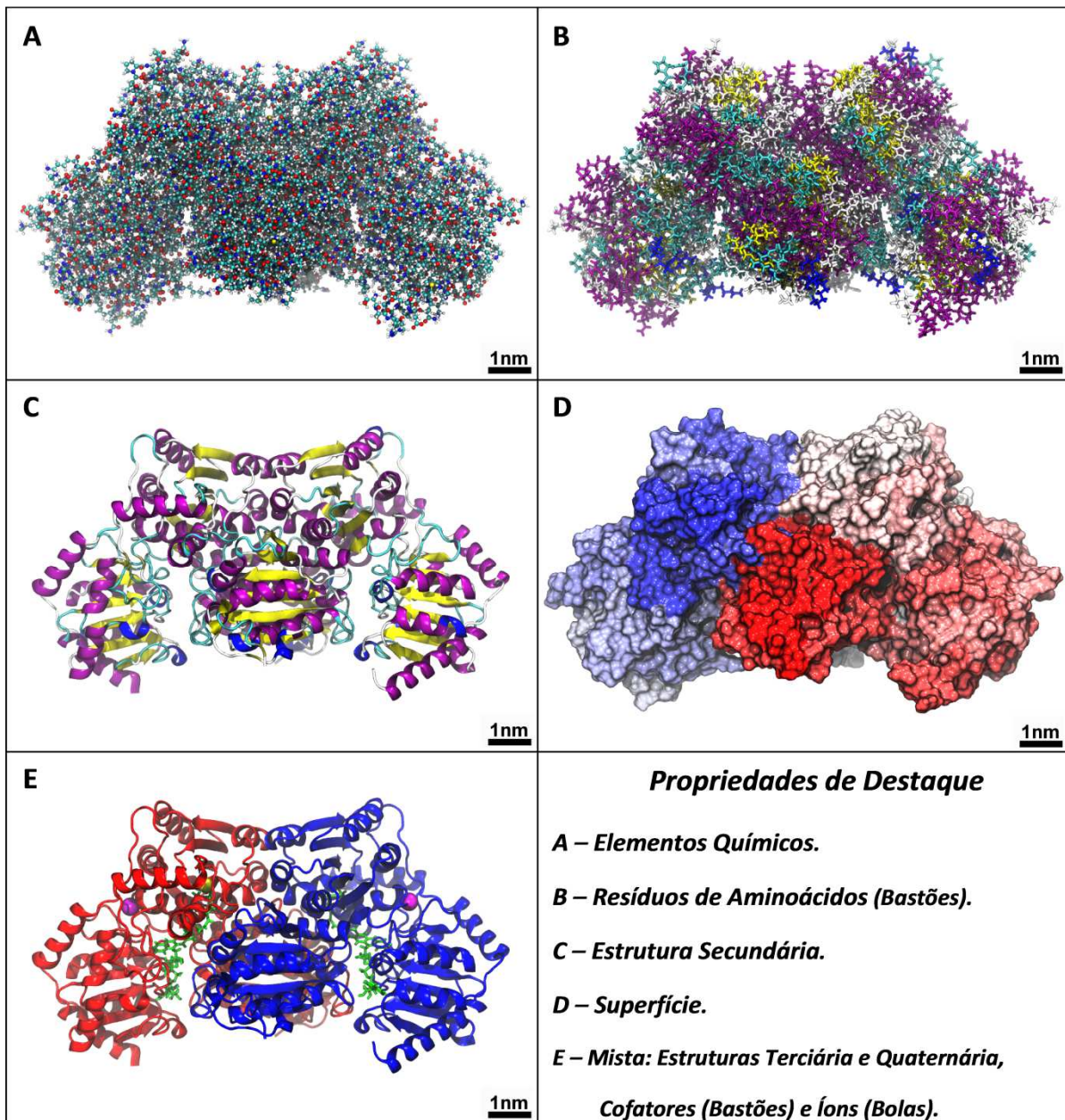
Diferentes tipos de representação podem criar um modelo bem diferente para uma mesma molécula. A mesma proteína da FIG 3A é agora representada na FIG. 3B em forma de bastões. Esse modelo agora permite o destaque de certos resíduos de aminoácidos específicos que compõe a proteína, podendo se escrever nome ou número, ou atribuir diferentes cores a cada um destes. A representação de bastões é muito utilizada, principalmente quando se trata de destacar aminoácidos que participam de uma determinada ligação ou reação química.

O modelo representado na FIG. 3C, para mesma proteína, destaca sua estrutura secundária. Este tipo de representação destaca as propriedades estruturais de uma proteína, arranjos e enovelamentos secundários representados principalmente pelos enovelamentos hélices α e folhas β de forma pictórica nas cores violeta e amarelo respectivamente (Silva, 1999). Cabe salientar que as hélices α também são comumente representadas na forma de tubos. O tipo de representação de estrutura secundária é um dos mais comuns quando se trata de representar proteínas, pois há uma grande importância em se estudar o seu arranjo tridimensional, para fornecer informações sobre o seu comportamento estrutural.

Quando se trata de estudar efeitos de superfície, as representações anteriormente descritas não destacam tão bem essa propriedade, sendo necessária assim uma representação que mostre características superficiais como formato, distribuição de cargas e massa, geometria espacial, eletrosfera (no caso de uma molécula pequena) e locais de possível reação. A FIG. 3D mostra uma dessas possíveis representações de superfície para enzima ALS, sendo que para cada propriedade mencionada, diferentes cores podem ser administradas com o intuito de destacar a distribuição das mesmas.

Muitas enzimas possuem partes não proteicas, ou seja, partes que não são aminoácidos, e a enzima ALS não é uma exceção. Essas partes podem ser de caráter inorgânico, denominados cofatores, de caráter orgânico, denominadas coenzimas ou podem ser íons. Dada a necessidade de representar em um mesmo modelo estruturas com propriedades distintas, é bem comum se utilizar a representação mista, sendo essa uma combinação das representações vistas anteriormente, uma para cada estrutura ou propriedade na qual se quer destacar. A FIG. 3E mostra um exemplo de tipos diferentes de representação em um mesmo modelo, também para a enzima ALS. Neste modelo, temos a representação de estrutura secundária para cada uma das duas estruturas terciárias da proteína; a representação de bastões para as coenzimas e a representação de bolas (sem escala) para os íons Mg^{2+} e K^+ em amarelo e cor-de-rosa, respectivamente.

FIGURA 3 – Diferentes tipos de representação de modelagem da enzima acetolactato sintase (ALS).



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1T9D (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

3.1.3 Métodos Clássicos de MMC aplicados a Biomoléculas

3.1.3.1 Dinâmica Molecular

Os métodos experimentais em geral são capazes de mensurar propriedades que são resultado da soma de todos os possíveis microestados entrópicos e energéticos que um conjunto de moléculas pode ocupar. Entretanto, mesmo com a constante evolução de metodologias experimentais há a necessidade da utilização de modelos teóricos para previsão de propriedades e compreensão, a nível molecular, dos experimentos. Desta forma, o comportamento estatístico dos dados experimentais pode ser utilizado na validação das médias obtidas pelas metodologias teóricas desenvolvidas para realizar predições relacionadas àquele sistema. Neste contexto, a Dinâmica Molecular é uma poderosa e versátil técnica para estudos de macromoléculas biológicas, tendo como base a Mecânica Clássica.

Para sistemas moleculares compostos por centenas, milhares e até milhões de átomos, como proteínas, não há a possibilidade de caracterizá-los com precisão em nível de física quântica, porém, a física clássica oferece uma boa aproximação para a modelagem desses sistemas. Isto é feito devido ao fato dos orbitais moleculares de tais moléculas serem bem definidos, além de fenômenos de transferência de cargas serem imensuráveis na escala de tempo dos movimentos atômicos descritos pela Dinâmica Molecular.

3.1.3.1.1 Dinâmica Molecular e Potenciais Relacionados

A primeira aproximação da Mecânica Molecular é considerar os átomos como esferas rígidas dotadas de carga com posições definidas no espaço por um conjunto de potenciais harmônicos. Assim, a estrutura molecular é mantida por um campo de força descrito por potenciais lineares (V_d), angulares (V_θ) e torcionais (V_ϕ) que visam reproduzir as interações ligadas da molécula a ser simulada. As interações não ligadas, ou intermoleculares, são descritas pelos potenciais de Lennard-Jones (V_{LJ}), ou van der Waals, e de Coulomb (V_C), o que permite a construção de uma expressão completa da energia potencial (V_{total}) do sistema que depende somente das posições atômicas (Equação 1).

$$V_{\text{total}} = V_d + V_\theta + V_\phi + V_{LJ} + V_C \quad (1)$$

Em outras palavras, as moléculas são descritas a partir de um modelo de esferas indeformáveis dotadas de cargas ligadas por molas devidamente calibradas, de modo que estas possam descrever as vibrações de ligações químicas e as barreiras energéticas torcionais e angulares que reconstroem o comportamento da molécula a ser mimetizada. O somatório dos potenciais ligados e não ligados compõe o que é denominado campo de força do sistema.

Cada função de energia potencial visa descrever um comportamento estrutural característico da molécula.

Potencial Harmônico de Ligação (ou Linear): Em métodos de mecânica molecular as ligações covalentes são descritas como um oscilador harmônico clássico. O estiramento entre dois átomos é descrito pelo Potencial Harmônico Linear V_d , o qual descreve a energia associada ao desvio da distância de equilíbrio d_0 (Equação 2) (Cornell *et al.*, 1995).

$$V_d = \frac{1}{2}k_d(d - d_0)^2 \quad (2)$$

sendo d o comprimento da ligação entre dois átomos i e j (FIG. 4) e k_d é a constante elástica da força.

A distância d_0 e a constante de força são os parâmetros do campo de força. Tais parâmetros podem ser obtidos experimentalmente, por intermédio dos espectros de infravermelho, ou por intermédio da mecânica quântica. A constante k_d varia de acordo com a rigidez da ligação química. Como exemplo, a constante k_d de uma ligação simples entre carbonos C–C é 317 kcal/mol Å², enquanto que a ligação dupla C=C é 570 kcal/mol Å² (Cornell *et al.*, 1995).

Potencial Harmônico Angular: Este descreve a energia potencial relacionada aos desvios relativos ao ângulo de referência. Analogamente ao Potencial Harmônico Linear o Potencial Harmônico Angular pode ser definido pela Equação 3 (Cornell *et al.*, 1995).

$$V_{\theta} = \frac{1}{2}k_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

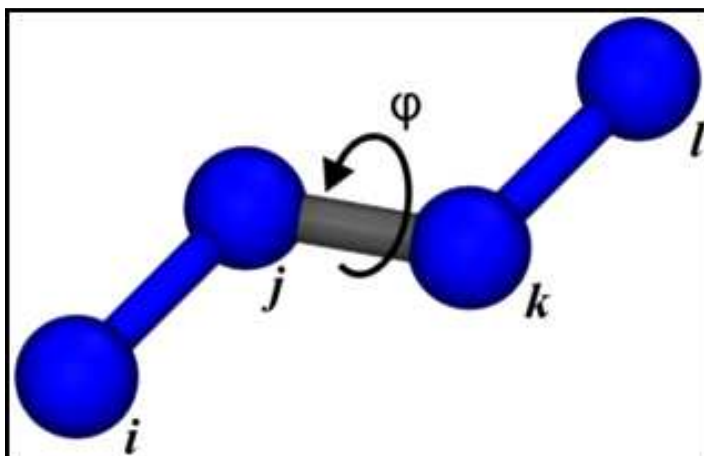
Potencial Torcional (ou Diedral): Considerando um conjunto de quatro átomos ligados, i , j , k e l , como mostrado na FIG. 4, o ângulo diedro φ é definido como o ângulo entre os planos formados pelos átomos ijk e jkl .

Pode-se entender o potencial torcional V_{φ} como a representação explícita da barreira energética atribuída à rotação dos átomos i e l ao redor da ligação $j-k$, sendo o mesmo definido pela Equação 4 (Cornell *et al.*, 1995).

$$V_{\varphi} = k_{\varphi}[1 + \cos(n\varphi + \delta)] \quad (4)$$

sendo k_{φ} a constante que define a altura da barreira energética para uma possível torção, n é o número de mínimos na curva de energia potencial pelo ângulo de torção, φ o ângulo diedral da ligação central e em relação a quatro átomos e δ a diferença de fase do ângulo diedral φ , que pode ser 0° e 180° , dependendo de este valor ser um ponto de máximo ou de mínimo.

FIGURA 4 – Representação geométrica do ângulo de torção entre i , j , k e l .



Fonte: (Cornell *et al.*, 1995).

A determinação de potenciais torcionais experimentalmente está longe de ser trivial. Na definição de tais parâmetros para moléculas novas, é comum se utilizar de potenciais diedrais semelhantes aos de uma molécula conhecida e previamente descrita. Outra estratégia para se determinar os parâmetros k_ϕ , n , e δ é otimizar os parâmetros para moléculas simples e extrapolar para moléculas complexas com grupamentos de átomos semelhantes. A curva de energia potencial pode ser obtida via mecânica quântica, o que é uma grande vantagem pela independência de valores experimentais (Cornell *et al.*, 1995).

Potencial de Lennard-Jones (ou van der Waals): O potencial de Lennard-Jones é utilizado para descrever interações intra e intermoleculares do tipo van der Waals. Este potencial é geralmente utilizado para descrever interações de átomos de uma mesma molécula se estes estiverem separados por três ou mais ligações covalentes. A expressão de energia potencial que descreve este tipo de interação entre dois átomos (i e j) é dada pela Equação 5 (Cornell *et al.*, 1995).

$$V_{LJ} = 4\varepsilon \left[\frac{\sigma^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma^6}{r_{ij}^6} \right] \quad (5)$$

sendo r_{ij} a distância entre os átomos i e j (FIG. 4), ε a profundidade do poço de energia potencial e σ o diâmetro de Lennard-Jones, o qual depende das espécies químicas ligadas. Existem outras formas de abordagem para a descrição deste tipo específico de interação, no entanto o formato de equação acima apresentado é o mais simples e geral (Cornell *et al.*, 1995).

Potencial de Coulomb: As interações de carga que são puramente eletrostáticas entre dois átomos i e j (FIG. 4) são descritas pela equação de energia potencial Coulombiana (Equação 6) (Cornell *et al.*, 1995).

$$V_C = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}} \quad (6)$$

sendo r_{ij} a distância entre os átomos i e j , q_i e q_j são as cargas dos átomos, ϵ_0 a permissividade no vácuo e ϵ a constante dielétrica do meio.

Existe a necessidade de determinar vários parâmetros para a aplicação das equações que descrevem as energias potenciais para as interações presentes em sistemas moleculares. Como citado anteriormente, os parâmetros podem ser obtidos via cálculos ou técnicas experimentais como cristalografia de raios-X, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear e muitas outras (Cornell *et al.*, 1995).

3.1.3.1.2 Métodos de Simulação de Dinâmica Molecular

As metodologias de Dinâmica Molecular são baseadas nas leis da mecânica clássica (Brooks, Karplus e Pettitt, 1990). As forças que atuam em cada átomo são baseadas no conjunto de parâmetros do campo de força, nas coordenadas e nas velocidades atômicas que são mapeadas durante todo o processo. Em uma simulação por Dinâmica Molecular, a força F atuante em determinado átomo é expressa em função do tempo, e é igual ao negativo do gradiente da energia potencial em relação à posição r_i de cada átomo, tal como expressa na Lei de Newton (Equação 7) (Brooks, Karplus e Pettitt, 1990).

$$-\frac{dV}{dr_i} = m \frac{d^2r_i}{dt^2} \quad (7)$$

Em linhas gerais, nos métodos de Dinâmica Molecular, as equações clássicas de movimento são iterativas e numericamente integradas para cada átomo do sistema a um determinado tempo, e a cada passo o processo de integração se repete considerando as posições atômicas e obedecendo a um determinado incremento no tempo (Δt) o qual é determinado pelo usuário e em geral é na escala de femtossegundos (10^{-15} s). Estas escalas de tempo tão pequenas são necessárias para que o erro relacionado à integração das equações de movimento seja suficientemente pequeno. Em outras palavras, se o valor de Δt for grande alguns eventos moleculares importantes, que ocorrem em escalas de tempo pequenas, não seriam simulados, criando artifícios computacionais que podem resultar na não

reprodução da realidade pelo modelo proposto. Tais artifícios recorrem a erros significativos no cálculo das forças, os quais refletem nos valores dos cálculos de energia livre e na busca dos estados conformacionais de menor energia em um determinado tratamento termodinâmico.

Outro princípio básico por trás da Dinâmica Molecular é o que a relação entre os dados teóricos obtidos e experimentais é feito a partir do uso da Hipótese Ergódica de Boltzmann. Esta hipótese fundamental demonstra que o valor médio de uma propriedade medida em um pequeno número de partículas por um longo tempo é equivalente às médias obtidas para um sistema de muitas partículas por um curto intervalo de tempo. Baseado nisto, as simulações de Dinâmica Molecular que possuem poucas partículas (comparado a qualquer sistema real) tem que ser suficientemente longas para que o sistema visite um número suficiente de conformações representativas para satisfazer este princípio. Esta justificativa teórica valida as médias obtidas de propriedades termodinâmicas de sistemas simulados por tempo suficiente num sentido ergódico.

Atualmente, existem vários algoritmos disponíveis que realizam a integração numérica das equações de movimento, sendo os mais comuns os do tipo *Verlet*. Os algoritmos de *Verlet*, *Velocity-Verlet* e *leap-frog* são os mais utilizados, pois tem um custo computacional menor em termos de consumo de memória RAM e tempo de processamento (Alder, 1977; Verlet, 1966). Em geral a escolha do algoritmo a ser usado se baseia em duas importantes variáveis: custo computacional e precisão na integração numérica. O algoritmo *Velocity-Verlet* utiliza a aceleração, velocidade e posição dos átomos em determinado tempo o que fornece mais precisão que o algoritmo de *Verlet*. Outros algoritmos conseguem ser bem mais precisos quanto à conservação da energia livre total do sistema, entretanto são bem mais custosos computacionalmente, como o algoritmo de Beeman (Beeman, 1976). A condição para que se escolha um algoritmo mais leve a um mais preciso é a de que com menos custo computacional as simulações podem atingir escalas de tempo maior, logo representam mais microestados entrópicos e energéticos do sistema permitindo obter ergodicamente médias de propriedade que podem seguramente ser confrontadas com valores experimentais.

Atualmente já é possível realizar simulações por Dinâmica Molecular de centenas de nanosegundos a alguns microsegundos, dependendo do número de átomos nos sistema. Entretanto, mesmo com a evolução temporal obtido pelos cálculos computacionais, as escalas de tempo *simuláveis* não são suficientes para obter informações completas de muitos fenômenos importantes, como *folding* de proteínas e envelhecimento de DNA. Algumas estratégias têm sido usadas visando aumentar o tempo de cada passo (Δt) obtendo assim simulações mais longas. Dentre os processos mais rápidos que ocorrem em sistemas moleculares estão as vibrações de ligação, em especial as ligações de hidrogênio. Estas vibrações têm pouca influência em várias propriedades moleculares, sendo assim alguns algoritmos mantêm estas ligações fixas, sendo alguns deles o SHAK (Ryckaert, Ciccotti e Berendsen, 1977), RATTLE (Vannucchi *et al.*, 2010) e o LINCS (Hess, 2008).

Em paralelo a estas estratégias há metodologias alternativas de MD que visam acelerar os processos moleculares. Nos casos em que as informações do comportamento atômico podem ser descartadas, pode se utilizar modelos *coarse-grained* que consideram grupos de átomos como partículas. Estes grupos são apontados via criteriosa análise do comportamento químico da molécula, respeitando suas características moleculares mais determinantes para determinada propriedade. Pode se agrupar em uma única partícula aminoácido ou até mesmo unidades monoméricas (Modesto Orozco, 2011). Isto pode ser feito a partir de uma melhor amostragem dos estados configuracionais do sistema em questão, direcionando-o a outros mínimos de energia potencial a partir de um conjunto de algumas variáveis cruciais e de um conjunto de regras. Algumas destas metodologias são *local elevation search*, *replica-exchange*, *parallel-tempering*, *simulated annealing*, *metadynamics* (Barducci, Bonomi e Parrinello, 2011; Medarde Agustín *et al.*, 1973; Trzesniak, Lins e Gunsteren, van, 2006).

Outra problemática envolvida nas simulações de Dinâmica Molecular é a utilização de solvente e o modelo a ser utilizado. O uso de solvente aumenta o custo computacional de qualquer simulação, no entanto permite a descrição precisa de várias propriedades que são diretamente dependes da interação com solventes. Os modelos de água mais utilizados são o SPC, TIP3P, TIP3P e TIP5P (Berendsen, Grigera e Straatsma, 1987; Jorgensen *et al.*, 1983; Mahoney e Jorgensen, 2000). O

aumento do número de partículas em uma simulação pode levar a vários problemas na estimativa das forças, devido a possíveis efeitos de superfície. Uma aproximação que contorna este problema é o uso de condições periódicas de contorno (Mahoney e Jorgensen, 2000). Um espaço de simulação se torna uma pequena parcela no centro de um número infinito de cópias idênticas do mesmo em todas as direções. O número de partículas na caixa de simulação é mantido constante considerando-se constante o número de moléculas que entram e saem pela caixa. Desta forma os efeitos de superfície são cancelados e a simulação se dá mimetizando o sistema em solução.

Em suma, simulações computacionais de sistemas com milhares de átomos podem ser realizadas com o uso de dinâmica molecular considerando fenômenos que ocorre em alguns nanosegundos sem a quebra ou formação de ligações químicas. Qualquer propriedade termodinâmica do sistema em questão pode ser obtida se a simulação considerar um número de estados energéticos suficientemente grandes para satisfazer a Hipótese Ergódica. A partir desta poderosa técnica podem-se analisar processos de adsorção, interação e o comportamento molecular conformacional de sistemas biológicos em geral.

3.1.3.2 *Docking* Molecular

3.1.3.2.1 *Docking* Molecular - Definição

Docking molecular é um método que prevê a orientação preferencial de uma molécula com relação à outra, quando ambas formam complexos estáveis. Costuma-se escolher uma molécula maior como receptora, por exemplo, uma enzima, e uma molécula menor como ligante. A molécula ligante pode ser um fármaco, um herbicida ou alguma molécula específica na qual se deseja estudar sua interação com a proteína (Morgon e Coutinho, 2007).

3.1.3.2.2 Docking Molecular Receptor-Ligante

O problema de *docking* receptor-ligante consiste basicamente na predição do modo de ligação de uma pequena molécula ligante (inibidor) na região de ligação (sítio de reação) de um alvo molecular, e na quantificação da afinidade de ligação entre receptor e o ligante. O processo de reconhecimento molecular proteína-ligante é regido por uma série de combinações e efeitos entrópicos e entálpicos (Brooijmans e Kuntz, 2003). Estes efeitos são previstos pela Equação 8 por intermédio da energia livre de ligação de Gibbs (ΔG_{lig}), que por sua vez está relacionada com a uma constante de inibição K_i que pode ser obtida experimentalmente (Morgon e Coutinho, 2007).

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = RT \ln k_i \quad (8)$$

sendo ΔH a variação de entalpia, T a temperatura absoluta, ΔS a variação de entropia e R a constante universal dos gases.

A metodologia de *Docking* molecular tem, então, grande aplicação no reconhecimento de fármacos e no estudo de doenças, desenvolvimento de novos pesticidas e no estudo de sensores de detecção.

A descrição do sistema receptor-ligante utilizando técnicas de modelagem molecular computacionais como o *Docking* molecular tem como principal motivação a redução de tempo e dos altos custos envolvidos no desenvolvimento de novos medicamentos, sensores, herbicidas e outros fármacos e tecnologias (Morgon e Coutinho, 2007).

3.1.3.2.3 Algoritmos Genéticos

O método de *Docking* molecular requer técnicas computacionais com potencial para investigar um grande número de soluções possíveis, com o intuito de encontrar a solução ótima, ou seja, aquela que melhor atende as necessidades do sistema. Os primeiros algoritmos de *Docking* começaram a ser desenvolvidos no início da década de 80, desde então, vários métodos têm sido implementados, constituindo uma área de pesquisa bastante ativa (Kitchen *et al.*, 2004).

Dentre os algoritmos utilizados para a construção de modelos utilizando *Docking* destacam-se os algoritmos genéticos. Algoritmos genéticos são algoritmos evolucionários pertencentes a uma classe de métodos estocásticos de otimização global, e são inspirados no processo biológico de evolução das espécies e na teoria da sobrevivência do mais apto de Darwin (Guizado, 2008; Morgon e Coutinho, 2007). São aplicados principalmente a *Docking* com ligantes flexíveis, ou seja, aqueles que são atribuídos graus de liberdade de rotação no próprio ligante. A cada geração, novos indivíduos são gerados através da troca de “genes” (no caso informações) entre dois indivíduos geradores, que proporcionam mudanças aleatórias no valor dos genes transmitidos (informação transmitida). O processo se repete de maneira que a população evolua para soluções melhores, até que um critério de parada seja previamente determinado (Morgon e Coutinho, 2007).

Atualmente, estes algoritmos são a ferramenta matemática mais utilizada pelos softwares de *Docking* molecular para executar cálculos de otimização de sistemas envolvendo receptor-ligante, de maneira a evoluir múltiplas subpopulações de ligantes (Morgon e Coutinho, 2007; Morris *et al.*, 1996). O programa AutoDock possui um algoritmo genético adicional chamado Lamarckiano, que é um híbrido com busca local (Morris *et al.*, 1996, 2009). A cada geração uma porção da população é escolhida ao acaso para a busca local, assim o indivíduo escolhido substitui o anterior, fazendo uma alusão à teoria da hereditariedade de características de Lamarck (Morgon e Coutinho, 2007; Morris *et al.*, 1996).

3.2 AFM e a MFQ

3.2.1 O AFM

Em 1981 a Microscopia de Tunelamento por Varredura tornou-se uma ferramenta útil na caracterização de superfícies de materiais condutores em escala atômica (Butt, Cappella e Kappl, 2005). No entanto, maior limitação desta técnica é 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, o AFM, para superar este obstáculo, pois ao invés de medir corrente elétrica, este novo equipamento de

análise podia medir forças em escala atômica (Binnig, 1987). A partir daí, uma vasta quantidade de materiais puderam ser analisados e caracterizados em nível atômico.

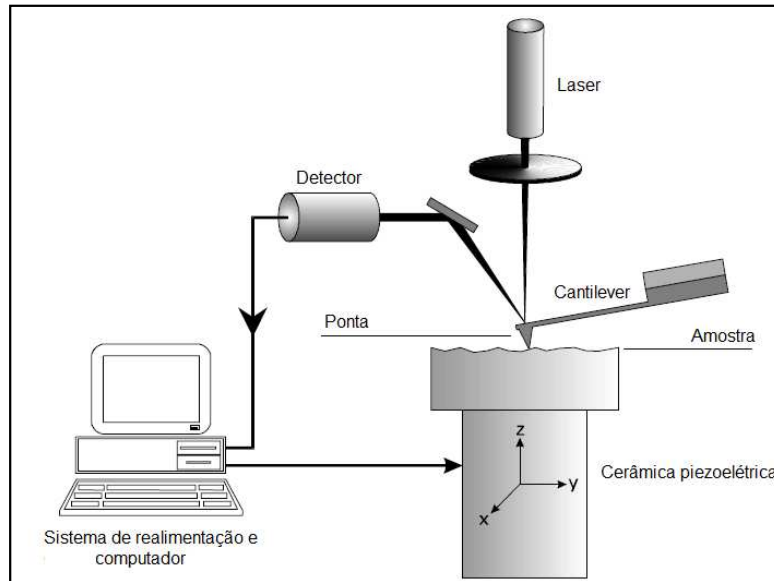
Como o AFM fornece o perfil da superfície da amostra medindo as forças entre sua ponta e uma superfície, pode-se afirmar que a quantidade de força medida durante as análises é dependente da constante de mola do *cantilever* (peça que sustenta a ponta) e da distância entre este e a superfície da amostra. Dessa forma, a força de interação entre os grupamentos químicos da ponta do AFM e do substrato pode ser calculada pela lei de Hooke (Equação 9):

$$F = k \Delta x \quad (9)$$

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

Os componentes essenciais de um AFM, e da maioria dos microscópios de varredura por sonda, são uma cerâmica piezoelétrica (*scanner*), um *cantilever* com a ponta, detector, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*, sistema de realimentação (*feedback*) e um computador, que armazena e processa as diferentes deflexões da sonda, transformando-as em imagens topográficas da superfície (2D ou 3D), como mostra a FIG. 5 (Santolin, 2009).

FIGURA 5 – Diagrama esquemático do sistema de Microscopia de Força Atômica.



Fonte: (Leite *et al.*, 2007).

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. Neste aspecto, três modos de operação são definidos de acordo com a distância existente entre a ponta e amostra:

- 1) Contato: Forças repulsivas de van der Waals são predominantes; o escaneamento da amostra é rápido e, portanto, pode danificar a amostra;
- 2) Não-contato: Forças atrativas de Van der Waals são predominantes; geralmente fornece uma imagem de baixa resolução; não danifica a amostra;
- 3) Contato intermitente: permite boa resolução das imagens; velocidade de escaneamento é geralmente baixa.

O AFM pode operar também em meios diversos, como o ar, vácuo e líquido. Quando os experimentos são realizados em meio líquido, deve-se prestar atenção

em algumas variáveis, relacionadas às forças intermoleculares atuantes no sistema, que requerem identificação e quantificação, como por exemplo, as forças de Van der Waals, hidratação, solvatação, e hidrofóbica (Leite *et al.*, 2012), forças consideradas nas simulações por Dinâmica Molecular.

3.2.2 MFQ

O AFM pode oferecer 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 da amostra (Alsteens *et al.*, 2009; Smith D.A. *et al.*, 2003). Esta técnica é conhecida como MFQ, baseia-se em pontas de AFM quimicamente modificadas com grupos funcionais específicos expostos e arquitetados para realizar uma função exclusiva em um sistema (Alsteens *et al.*, 2009; Azebara e Tokumoto, 2009; Dordi *et al.*, 2004; Smith D.A. *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998). A MFQ pode ser empregada na titulação por AFM para obter o valor de pK_a aparente na superfície de uma amostra (Brant, Johnson e Childress, 2006), para definir as forças adesivas e a energia em uma ou entre superfícies, 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 (Araki e Toma, 2002). Essas aplicações podem ser muito úteis na criação de superfícies químicas sintéticas, nanossensores e dispositivos de micro/nanofluídica.

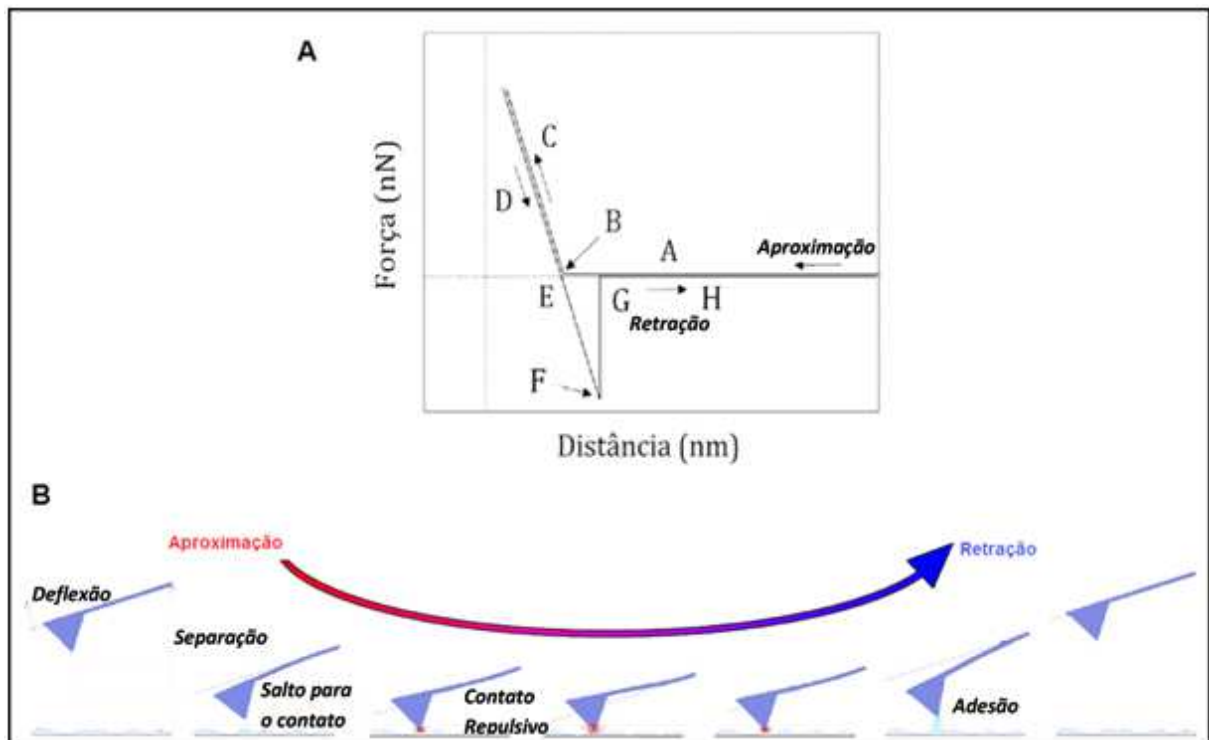
Espectroscopia de Força Atômica

A Espectroscopia de Força Atômica é uma técnica proveniente da MFQ utilizada para obtenção de processos de reconhecimento com resolução molecular. Em análises biológicas, a Espectroscopia de Força Atômica permite aferir a interação específica que rege as moléculas em suas condições fisiológicas, tem a capacidade de fornecer informações sobre a cinética e a termodinâmica de um

conjugado de moléculas que interagem entre si. A Espectroscopia de Força Atômica 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 (Bizzarri e Cannistraro, 2010). Em virtude desses atributos, a Espectroscopia de Força Atômica é uma técnica particularmente favorável para pesquisar sistemas biológicos.

Quando o AFM realiza ensaios de espectroscopia de força, a ponta do *cantilever* é movida unicamente 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 FIG. 6 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 entre a ponta e a amostra (pontual) e; G-H: a ponta e a amostra já não estão mais em contato (Butt, Cappella e Kappl, 2005; Cappella e Dietler, 1999).

FIGURA 6 – (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.



Fonte: (Butt, Cappella e Kappl, 2005; Cappella e Dietler, 1999).

3.3 NANOBIOSSENSORES DE PONTA DE AFM

3.3.1 Definição de Nanossensores e Nanobiossensor de Ponta de AFM

O AFM, além de ser útil em análises de imageamento de diversos tipos de superfícies e fornecer dados das propriedades mecânicas das mesmas (Etchegaray, Bueno e Teschke, 2010), 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 foi visto na FIG. 8A. Neste contexto, a Espectroscopia de Força Atômica consegue fornecer dados relativos ao comportamento de moléculas nas superfícies por intermédio de forças de alongamento e torção (García e Pérez, 2002; Silva, da *et al.*, 2013).

Os nanossensores de ponta de AFM podem detectar tanto analitos inorgânicos, como orgânicos, podendo ser construídos por intermédio da funcionalização química de sua superfície com elementos de sensoriamento biológicos (biomoléculas) (Franca *et al.*, 2011) ou biomiméticos (Rumayor, Iglesias e Cabezas, 2005). 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) (Etchegaray, Bueno e Teschke, 2010; Silva, da *et al.*, 2013; Sisqueira *et al.*, 2010). Na maioria das vezes, as interações específicas entre esse sistema e o substrato (amostra) são reversíveis, permitindo o monitoramento contínuo de amostras (Ferraz *et al.*, 2006). Estes nanossensores são instrumentos muito úteis para a análise de doenças e detecção de moléculas tóxicas no meio ambiente, já que são altamente seletivos e sensíveis (Cui *et al.*, 2012).

As principais vantagens dos nanossensores de ponta de AFM estão relacionadas, principalmente, com os limites de detecção baixos, em nível molecular. Os nanossensores de ponta de AFM também apresentam vantagens de desempenho, como resposta instantânea/em tempo real e, em alguns casos, portabilidade (Devreese, 2007). Por serem dispositivos que permitem a imobilização de moléculas específicas, os nanossensores oferecem também um reconhecimento específico e direcionado, evitando assim ligações cruzadas inespecíficas

Assim, podem-se definir os nanossensores como sendo materiais funcionais e sensoriais utilizados para transmitir informações químicas, físicas ou biológicas sobre materiais e moléculas diversas, a nível molecular. 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 (Rumayor, Iglesias e Cabezas, 2005). 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 (Rumayor, Iglesias e Cabezas, 2005).

3.3.2 Imobilização de enzimas em suportes

A imobilização de enzimas é uma ferramenta muito útil para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade (Cardoso, Moraes e Cass, 2009). 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 em suportes diversos oferece 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 (Aguiar *et al.*, 2009; Cardoso, Moraes e Cass, 2009). Essas vantagens foram utilizadas no processo de funcionalização química da ponta do AFM e, conseqüentemente, no desenvolvimento experimental do nanobiossensor.

Efeitos da imobilização da enzima ACC em uma superfície de nitreto de silício foram estudados no manuscrito do ANEXO A.

3.4 A ENZIMA ACC

3.4.1 Função da enzima ACC na síntese de ácidos graxos

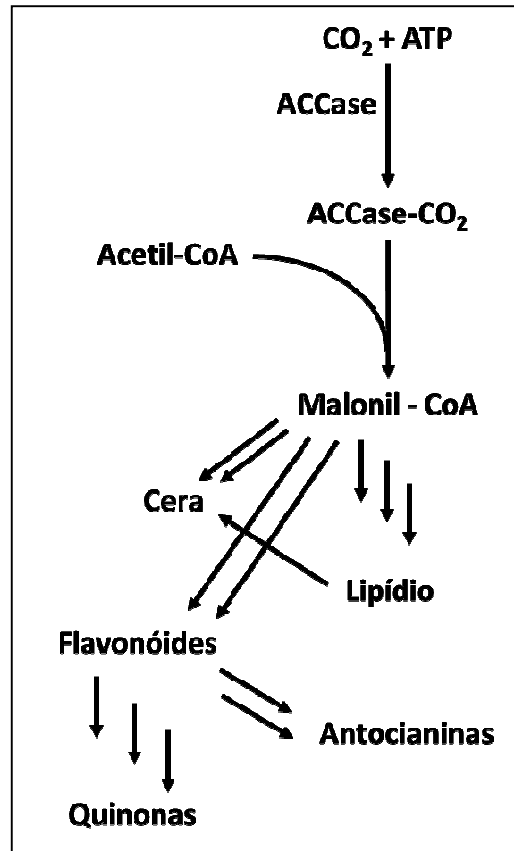
Os lipídeos são formados por moléculas relativamente pequenas que podem se associar para constituir grandes moléculas que servem, principalmente, como componentes estruturais das membranas, como forma de armazenamento de energia e outras funções essenciais (formação de hormônios esteroides, vitaminas,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

massa de matéria seca das células vegetais é formado por lipídeos (Christoffoleti *et al.*, 2008).

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, HCO_3^-) 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. Esta 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 ACC.

Neste contexto, pode-se definir a ACC 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 (Tao *et al.*, 2012). Essa reação catalisada pela ACC é realizada em duas etapas, nas quais primeiramente ocorre a carboxilação dependente de ATP e de biotina, e a consequente transferência do grupo carboxila a partir de biotina da acetil-CoA catalisada pela carboxiltransferase (Davis, Solbiati e Cronan, 2000) (FIG. 7). 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 do alongamento de ácidos graxos para a síntese de flavonóides e fitoalexinas no citosol (Joyard *et al.*, 2010).

FIGURA 7 – Via da síntese dos lipídeos, catalisada pela enzima ACC.



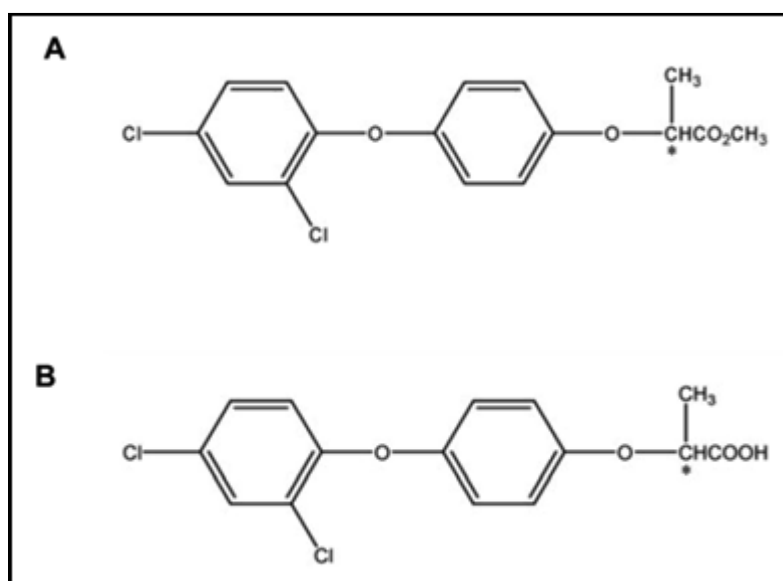
Fonte: (Sasaki e Nagano, 2004).

Nos animais, a ACC também está relacionada com a síntese de ácidos graxos. A interferência da atividade da enzima ACC em animais, seja pela utilização de inibidores ou silenciamento da expressão genética, demonstrou ser deletéria para vários tipos de células cancerosas (Beckers *et al.*, 2007). 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 enzima ACC 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 (Natter e Kohlwein, 2013).

3.4.2 Herbicida Diclofop e Diclofop-Metílico

O herbicida Diclofop-metílico foi registrado 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 (Cai, Liu e Chen, 2005). Este herbicida 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 (FIG. 8A) sofre uma hidrólise rápida e se degrada para Diclofop (FIG. 8B) tanto na planta quanto no solo (essa hidrólise ocorre principalmente por decomposição biológica) (Smith *et al.*, 1986). 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 (Smith *et al.*, 1986). Assim, neste trabalho, o Diclofop (hidrolisado) é a estrutura a ser tratada e estudada, já que esta é a forma em que se encontra no meio ambiente e foi a forma empregada em testes experimentais deste trabalho (Cai, Liu e Chen, 2005; Lu *et al.*, 2011).

FIGURA 8 – Representação da Estrutura química do Diclofop-metílico (A) e Diclofop (B).



Fonte: (Smith *et al.*, 1986).

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 (Grover *et al.*, 1997). 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 (Grover *et al.*, 1997).

O diclofop é um inibidor da síntese de ácidos graxos por intermédio da inibição da enzima ACC, atacando a membrana celular, prevenindo a translocação de assimilados fotossintéticos para as raízes, reduzindo o teor de clorofila e inibindo as atividades bioquímicas. O diclofop é um herbicida seletivo sistêmico também com ação de contato, sendo absorvido principalmente pelas folhas e, em parte, pelas raízes em solo úmido (Gu *et al.*, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PARTE COMPUTACIONAL

4.1.1 Sistema Molecular

A estrutura inicial da enzima ACC foi obtida por intermédio do modelo experimental de cristalografia de raios-X, disponível na literatura no banco internacional de dados de estrutura de proteínas: *Protein Data Bank*, arquivo PDB: 1UYR. Os resíduos de aminoácidos não determinados por cristalografia de raios-X foram construídos (Franca *et al.*, 2011) e esta estrutura foi utilizada como ponto de partida para os cálculos de *Docking* e dinâmica molecular. Os parâmetros do ligante 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) reagiram com glutaraldeído e Diclofop (ANEXO A) e calculados usando o programa ORCA (Neese, 2012). Os parâmetros foram implementados no campo de força OPLS-AA. As cargas atômicas parciais dos ligantes foram determinadas usando o método de RESP (do inglês *Restrained electrostatic Potential*) (Dupradeau *et al.*, 2010) no programa NWChem (Valiev *et al.*, 2010). Ambos os ligantes foram acoplados à enzima ACC, a fim de se obter as posições de fragmentação para serem utilizadas nas simulações por dinâmica molecular.

Para a visualização e produção de imagens referentes a todos os sistemas foi utilizado o programa VMD 1.9.1 (Humphrey, Dalke e Schulten, 1996) e todas as medições realizadas em todos os modelos foram realizadas utilizando o programa Jmol 10.0.31 (Herraez, 2006).

4.1.2 Simulação por *Docking* Molecular

Como foi mencionado no item 4.1.1, os ligantes (APTES, Glutaraldeído e Diclofop) foram acoplados na estrutura molecular da enzima ACC, a fim de prever orientações conformacionais favoráveis a serem utilizadas em simulações de dinâmica molecular. O protocolo de *Docking* molecular empregado no presente trabalho pode ser descrito como: i) As cargas parciais do sistema molecular foram atribuídas por intermédio Gasteiger-Huckel método (Gasteiger e Marsili, 1980) implementado nas ferramentas do programa *Autodocking* (ADT) (Morris *et al.*, 1998),

ii) O programa *AutoGrid* foi utilizado para avaliar a propensão de ligação entre os ligantes estudados e a enzima ACC. Os mapas de grade contendo 34,28 e 50 divisões nos eixos X-Y-Z do sistema, respectivamente, foram usados para restringi-los, dentro dos locais ativos, iii) O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) foi aplicado para pesquisar o espaço conformacional das células unitárias. As posições de encaixe foram cuidadosamente avaliadas segundo um desvio quadrático médio (RMSD) de 2 Å , utilizando as energias mais baixas totais.

4.1.3 Simulação por Dinâmica Molecular

A partir das posições acopladas pelos cálculos de *Docking* molecular foram realizadas as simulações por dinâmica molecular, para obter as energias de interação com base nas interações de van der Waals e eletrostáticas entre o complexo ACC+Diclofop e o complexo ACC+APTES+Diclofop.

O protocolo para executar o cálculo de dinâmica molecular pode ser descrito como: i) Após ajuste da pressão a 1,0 atm por um pistão Langevin (Martyna, Tobias e Klein, 1994), os cálculos foram realizados em *ensemble* NVT em 298 K e durante 1 ns, a temperatura foi controlada utilizando um termostato de Langevin, ii) Um corte de 14,0 Å foi utilizado para as interações eletrostáticas e van der Waals, e contribuições de longo alcance para a energia foram incluídas por intermédio do uso do método de *particle mesh Ewald* (PME), (Essmann *et al.*, 1995) iii) Um passo de equilíbrio NPT com 1 ns foi executado depois de (i); iv) Valores de médias foram obtidos em conjunto por intermédio do *ensemble* NVT usando a parte equilibrada da trajectória simulada. A simulação por dinâmica molecular foi realizada utilizando o programa NAMD 2.7 (Kalé *et al.*, 1997) e os resultados foram analisados por meio de linguagens de comando implantadas no programa VMD 1.9.1 (Humphrey, Dalke e Schulten, 1996). O sistema simulado foi resumido na TABELA 1.

TABELA 1 – Sistema Simulado (Dinâmica Molecular).

Sistema	Número de Átomos do Solutivo	Número de Íons	Número de Moléculas do Solvente
ACC+Diclofop	23150	31	82118
ACC+APTES+Diclofop	23176	30	82118

Fonte: Simulação realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

4.1.4 Potencial eletrostático e representação da superfície da enzima ACC

A distribuição de cargas para a superfície da enzima ACC foi obtida por intermédio do cálculo do potencial eletrostático resolvendo numericamente a equação não-linear de Poisson-Boltzmann, aplicando o método de diferença-finita (Davis e McCammon, 1990; Nielsen *et al.*, 1999) pelo programa APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (Holst, Baker e Wang, 2000), em conjunto com os parâmetros do campo de força OPLS-AA (Kaminski *et al.*, 2001). A estrutura da enzima ACC foi obtida usando constante dielétrica de 78,54 para o solvente, o qual tem as especificações: tensão superficial 0,105 N/m, raio de corte de 1,4 nm, e força iônica de 100 mM. Os potenciais tridimensionais foram obtidos utilizando 129 pontos de rede nas direções de x, y e z.

Para o desenvolvimento do modelo rígido de superfície foram utilizadas técnicas de desenho técnico de projetos mecânicos (Provenza, 1991).

4.1.5 Simulação por Dinâmica Molecular Direcionada

O sistema inicial para a simulação por dinâmica molecular direcionada foi obtido a partir de um sistema equilibrado de uma dinâmica molecular padrão, realizada para o tempo de 10 ns com a enzima ACC e o herbicida Diclofop em um

solvente explícito. O procedimento aplicado foi realizado durante 4 ns para investigar o processo de ligação e para medir as forças envolvidas quando o ligante Diclofop é puxado para fora da enzima ACC a partir da entrada do sítio ativo em coordenadas predefinidas. O protocolo usado para simular o sistema com metodologia dinâmica molecular direcionada pode ser resumido da forma: i) Temperatura: 298 K (Bussi, Donadio e Parrinello, 2008); ii) Força constante: 367 pN / Å; iii) Taxa de Velocidade: 0,001 nm/ps; iv) passo de tempo de um femtosegundo.

O trabalho mecânico realizado durante o processo de desacoplamento foi obtido integrando a força exercida sobre o sistema ao longo da coordenada z utilizada para definir a via de extração da molécula Diclofop. As simulações foram realizadas utilizando o programa GROMACS 4.5.4 (David Van Der Spoel, 2006). O sistema simulado foi resumido na TABELA 2.

TABELA 2 – Sistema Simulado (Dinâmica Molecular Direcionada).

Sistema	Número de Átomos do Sóluto	Número de íons Na⁺	Número de íons Cl⁻	Número de Moléculas do Solvente
ACC+Diclofop	23249	692	662	362198

Fonte: Simulação realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

4.2 PARTE EXPERIMENTAL¹

4.2.1 Processo de Funcionalização da ponta do AFM

O desenvolvimento experimental do nanobiossensor se baseou no trabalho de Etchegaray *et al.* (Etchegaray, Bueno e Teschke, 2010) e Silva *et al.* (Silva, da *et al.*, 2013). A montagem começa com a funcionalização de *cantilevers* de AFM e sondas (*Microlevers Thermo* Microscópios - Sunnyvale, CA; ponta afiada - raio de curvatura: <20 nm), com um método que envolve primeiro, a silanização da

¹ Item 4.2 elaborado com base no ANEXO B

superfície com APTES (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO), seguida pela reação com glutaraldeído (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO). As pontas de AFM são colocadas numa placa de Petri esterilizada por esterilização sob luz UV durante 30 minutos. Após esta etapa, as pontas de AFM são expostas ao APTES e vapores trietilamina (50 mL e 40 mL, respectivamente). Após a incubação durante 40 minutos, a fim de que o vapor APTES ataque as superfícies, as pontas de AFM são imersas em 200 ml de uma solução aquosa de glutaraldeído a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e são incubadas durante 40 minutos. Após este tempo, as lavagens são feitas com água MilliQ. Depois destes passos, a enzima ACC (CUSABIO® - Hubei Province, República Popular da China) é induzida a ligar covalentemente ao terminal da molécula de glutaraldeído, por imersão dos *cantilevers* de AFM em 35 μL de solução de enzima ACC. Estas amostras são incubadas durante 35 minutos à temperatura ambiente 298K. Finalmente, as lavagens são feitas com água MilliQ mais uma vez.

4.2.2 Imobilização dos Herbicidas Diclofop na Superfície de Mica

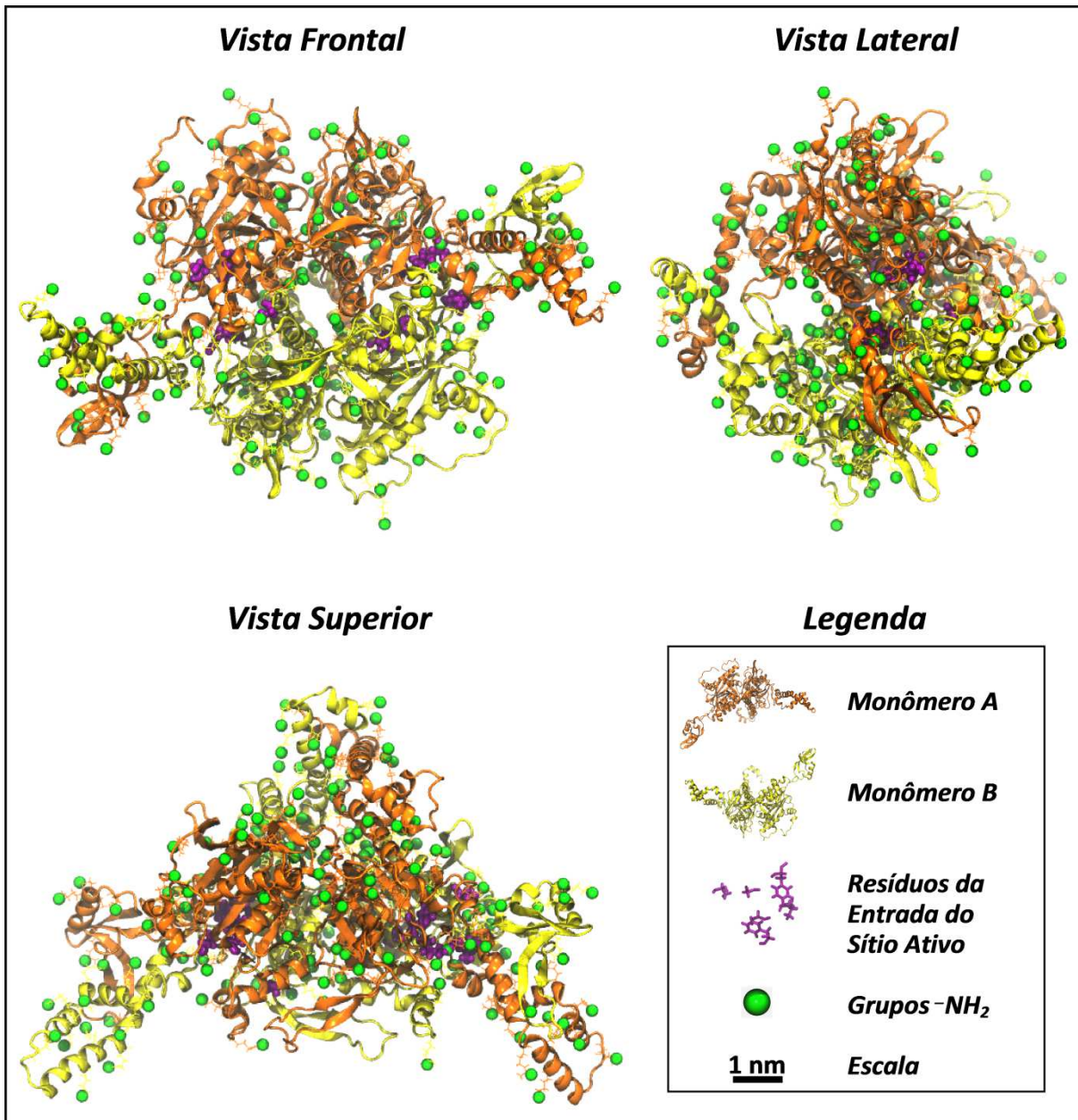
Para imobilizar as moléculas do herbicida Diclofop por ligações covalentes sobre o substrato (superfície de mica), foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 4.2.1, omitindo-se o passo em que os substratos são mergulhados numa solução de glutaraldeído. Nesta circunstância, a funcionalização se inicia com a formação de uma ligação covalente entre os grupos hidroxila presentes na superfície da mica e o grupo silanol das moléculas APTES. Depois disso, ocorre uma interação química entre o grupo amino presente nas moléculas de APTES com os grupos carboxila presentes na molécula do herbicida Diclofop (1 mM). O mesmo processo foi utilizado para a imobilização dos outros herbicidas Imazaquin e Glifosato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTRUTURA DA ENZIMA ACC

A estrutura da enzima ACC (FIG. 9) segundo Franca *et al.* (Franca *et al.*, 2011) tem simetria por intermédio dos dois monômeros (estrutura terciária) que formam a estrutura quaternária, estrutura essa mais estável na natureza em condições normais termodinâmicas (Franca *et al.*, 2011). Essas condições termodinâmicas são basicamente regidas por pressão $P = 1 \text{ atm}$, temperatura $T = 298\text{K}$ e pH neutro. Os resíduos da entrada do sítio ativo foram importantes nos cálculos e considerações aplicadas nos modelos subsequentes do presente trabalho. Na FIG. 9 podem ser observados de forma detalhada (na forma de esfera de van der Waals) os grupos $-\text{NH}_2$ provenientes dos aminoácidos lisina e arginina, nos quais há maior tendência de reagir com as moléculas de glutaraldeído (ANEXO 1) utilizadas no processo de funcionalização da ponta do AFM por enzimas ACC.

FIGURA 9 – Estrutura da enzima ACC e elementos importantes (monômeros, resíduos e grupos funcionais) para a compreensão dos processos de funcionalização e interação. Representação tipo pictórica.



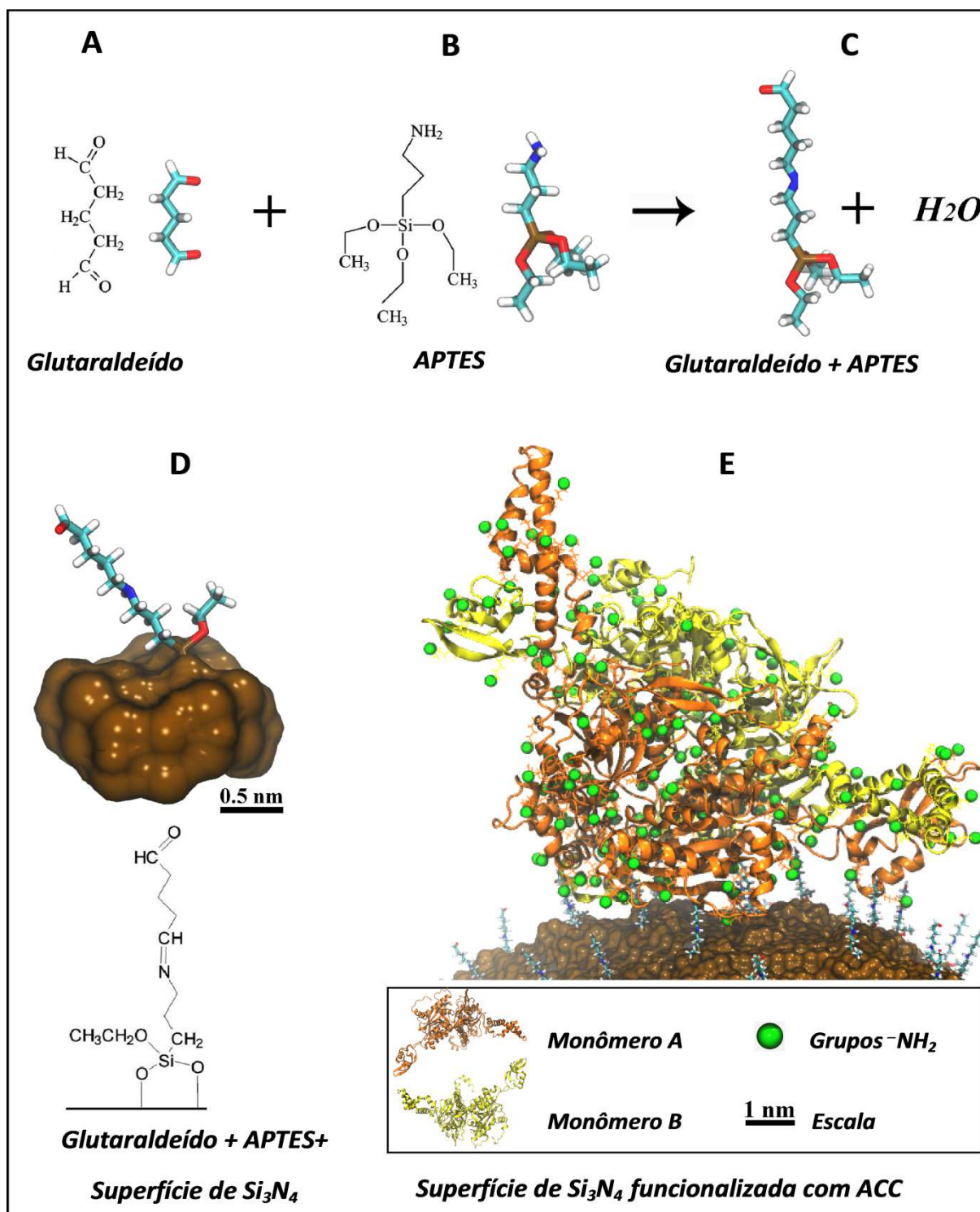
Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

5.2 PROCESSOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

5.2.1 Funcionalização da ponta do AFM (Elemento Sensorial)

A funcionalização da ponta do AFM foi obtida por intermédio da imobilização das enzimas ACC em sua respectiva superfície. Grupos $-NH_2$ presentes na molécula de APTES (FIG. 10B) e nos radicais dos aminoácidos arginina e lisina da enzima ACC permitem a ligação covalente dos mesmos na molécula de glutaraldeído (FIG. 10A) (ANEXO A). Estes grupos $-NH_2$ se ligam a molécula de glutaraldeído provavelmente pela formação da base de Schiff, na qual o azoto do amino nucleófilo desloca o oxigênio do grupo a partir do aldeído, o que provoca formação de uma molécula de água, formando assim a ligação $C=N$ (Wang *et al.*, 2002). Uma das extremidades da molécula de APTES+Glutaraldeído (FIG. 10C) liga-se no óxido de silício que se forma na superfície do nitreto de silício (FIG. 10D) (Etchegaray, Bueno e Teschke, 2010; Wang *et al.*, 2002), material que constitui a ponta do AFM usada experimentalmente. A outra extremidade restante da molécula de glutaraldeído se liga um dos grupos $-NH_2$ distribuídos de maneira uniforme ao longo da superfície da enzima ACC, formando a superfície da ponta do AFM funcionalizada (FIG. 10E).

FIGURA 10 – Descrição do processo de funcionalização da superfície de Si_3N_4 da ponta do AFM.

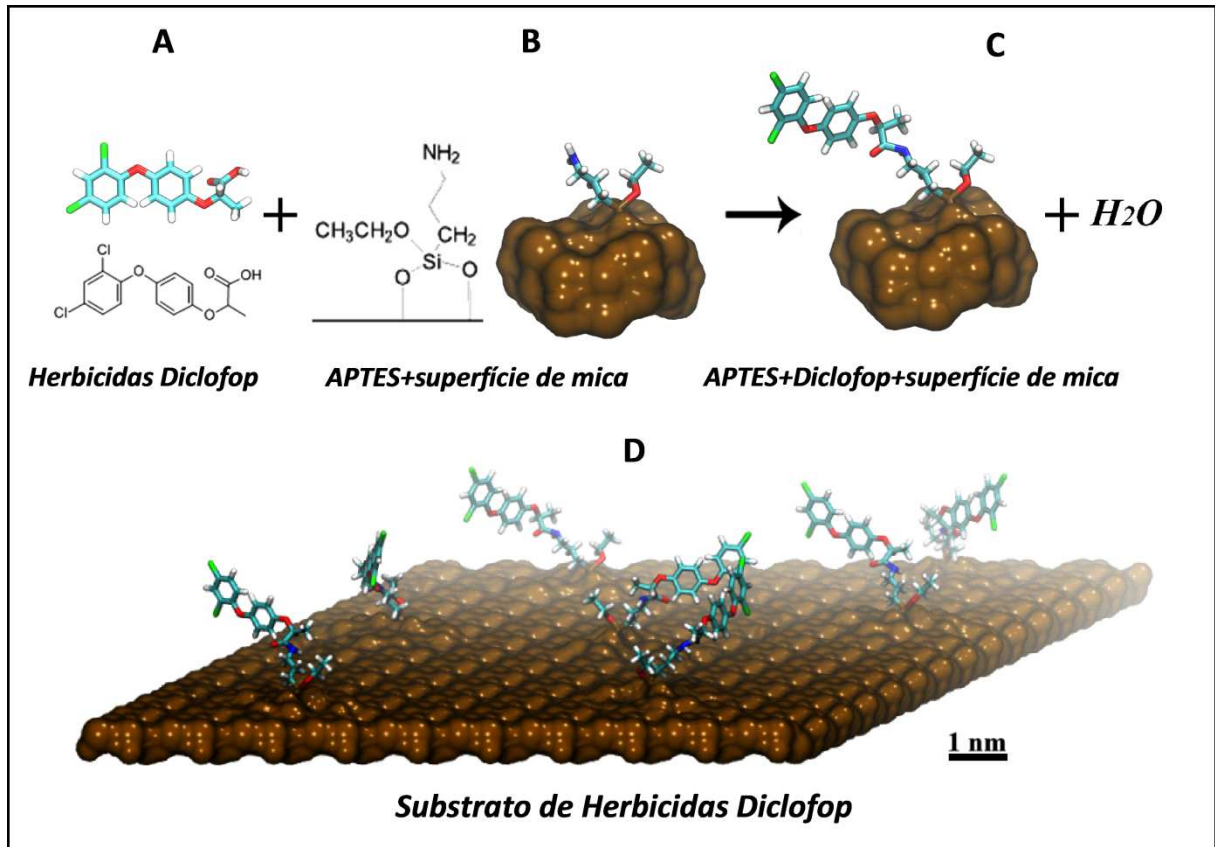


Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

5.2.2 Funcionalização da Placa de Mica (Substrato)

De maneira semelhante à funcionalização da ponta do AFM pelas enzimas ACC, a placa de mica na qual será imobilizado os herbicidas Diclofop (FIG. 11A), é funcionalizada também pela molécula de APTES. A mica apresenta estrutura predominante de silício (material filossilicato) (“mica - Infopédia”, [s.d.]), formando o óxido de silício e podendo ser funcionalizada pela molécula de APTES (FIG. 11B) e, portanto pode-se tratá-la como uma superfície com predominância de óxido de silício. O grupo $-NH_2$ da molécula de APTES forma ligação covalente com a carboxila do herbicida Diclofop (FIG. 11C), de maneira semelhante a uma ligação peptídica e muito provavelmente pela formação da base de Schiff (Wang *et al.*, 2002), tornando-se assim o substrato a ser detectado (herbicidas funcionalizados na superfície de mica da Fig. 11D) pela ponta do AFM funcionalizada.

FIGURA 11 – Descrição do processo de funcionalização da superfície do substrato na superfície da placa de mica. Como é MICA, então substitua Si_3N_4 por SiO_2 .



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

5.3 DOCKING MOLECULAR E DINÂMICA MOLECULAR

O Diclofop inibe a enzima ACC bloqueando uma de suas duas entradas ao sítio ativo. O bloqueio acontece de forma que o Diclofop se ligue através de forças eletrostáticas e de van der Waals aos resíduos Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A, Phe1956B e Ala1627A mostrados na FIG. 12A (Zhang, Tweel e Tong, 2004). Esse processo de inibição foi refeito a partir do método de *Docking* Molecular do Diclofop na região correspondente aos resíduos da (FIG. 12A), também representados na cor violeta nas FIG. 12B, 12C e 12D. A FIG. 12B mostra a melhor conformação e posição do Diclofop (verde) obtida a partir de dados cristalográficos (arquivo PDB referência 1UYR), enquanto as FIG. 12C e 12D mostram as melhores conformações e posições obtidas a partir dos cálculos de Docking molecular para o Diclofop e a célula APTES+Diclofop respectivamente.

Para completar os resultados de *Docking*, a dinâmica molecular permitiu a obtenção da energia de ligação média considerando a flutuação e mobilidade do sistema proteína-inibidor, no caso do complexo ACC-Diclofop e de maneira análoga, o *Docking* da Célula APTES+Diclofop na enzima ACC, ambos mostrados na TABELA 3.

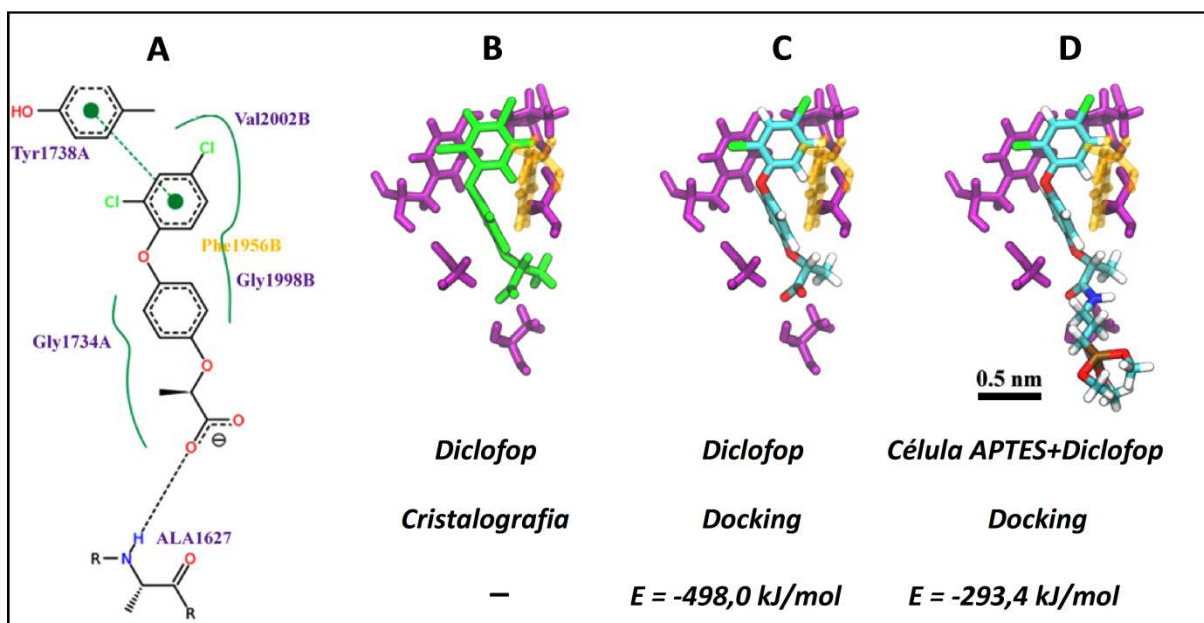
TABELA 3. Energias de interação entre ACC+Diclofop e energia de ligação entre ACC+Célula. A energia de ligação é a soma das energias de natureza eletrostática com as energias de natureza das interações de van der Waals.

Sistema	Eletrostática	Van der Waals	Total (kJ/mol)
ACC+Diclofop	-316,7	-181,3	-498,0
ACC+Célula	-22,4	-271,0	-293,4

Nota: Célula - Sistema constituído pelas moléculas APTES+Diclofop.

Fonte: Simulação realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR ("RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB", [s.d.]).

FIGURA 12 – *Docking* Molecular do herbicida Diclofop (*retro-docking*) e *Docking* Molecular da célula APTES+Diclofop.



Fonte: Simulação realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

Como pode ser observado na TABELA 3, quando a enzima ACC interage com o herbicida Diclofop a energia é maior em comparação com o sistema ACC+Célula. Essa diferença pode ser atribuída ao fato do herbicida Diclofop possuir maior quantidade de orientações energeticamente mais favoráveis do que quando está ligado à molécula de APTES. A diferença entre as energias eletrostáticas e de Van der Waals é mais acentuada quando se trata do sistema ACC+Célula, essa é da ordem de 12 vezes maior do que a energia eletrostática, e isto se deve principalmente ao volume molecular ocupado pelo conjunto diclofop+APTES

Ao final do processo de inibição, um dos oxigênios da carboxila do Diclofop fica acessível à solução, enquanto o restante é englobado por uma bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos envolvidos (Zhang, Tweel e Tong, 2004). A presença desse oxigênio livre contribuiu para que a célula APTES+Diclofop não perdesse a característica de inibição, como se pode notar fazendo a comparação entre as energias de ligação entre a célula APTES+Diclofop e o inibidor Diclofop descritos na

TABELA 3. Esse resultado valida a parte correspondente experimental, fornecendo uma comprovação teórica de que é possível fixar o herbicida Diclofop na superfície da placa de mica do AFM sem haver perdas em sua capacidade de inibição que invalidem a os resultados obtidos experimentalmente.

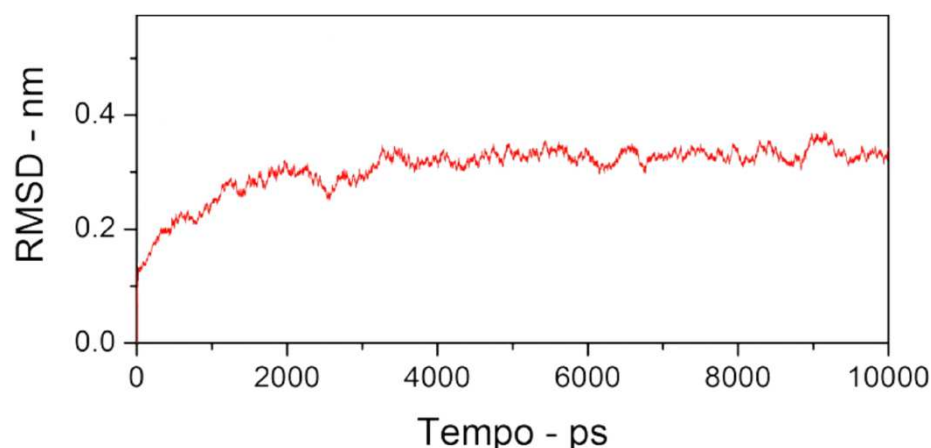
Torna-se importante observar que as magnitudes das energias de ligação observadas na TABELA 3 estão abaixo das magnitudes das energias de ligação covalentes (Askeland e Phulé, 2008), o que garante que uma enzima de uma monocamada funcionalizada não irá se soltar durante a interação específica com o substrato, resultado que também vale para a monocamada de herbicidas Diclofop funcionalizadas como substrato na superfície da mica.

5.4 SUPERFÍCIES DE INTERAÇÃO

5.4.1 Estrutura da enzima ACC e o Modelo Rígido desenvolvido

Sabe-se que um dos principais fatores que alteram a conformação das enzimas é a flutuação térmica do meio, segundo (Franca *et al.*, 2011) a determinação da estrutura da enzima ACC foi obtida por intermédio de cálculos de homologia (Guex e Peitsch, 1997) relaxada em água através de cálculo de Dinâmica Molecular. A simulação computacional da enzima ACC, relaxada em meio aquoso sob condições de $T = 298K$, $P = 1 \text{ atm}$ e pH neutro, foi realizada durante 10 ns. A simulação mostrou a flutuação conformacional da estrutura da enzima ACC segundo o desvio quadrático médio (RMSD) calculado para os átomos que a compõe. A flutuação conformacional se mostrou relativamente estável para o dímero da enzima ACC, em torno de 0,3 nm (FIG. 13) (Franca *et al.*, 2011) em relação a estrutura cristalográfica.

FIGURA 13 – Desvio Quadrático Médio da enzima ACC relaxada em água, relativo à estrutura cristalográfica.



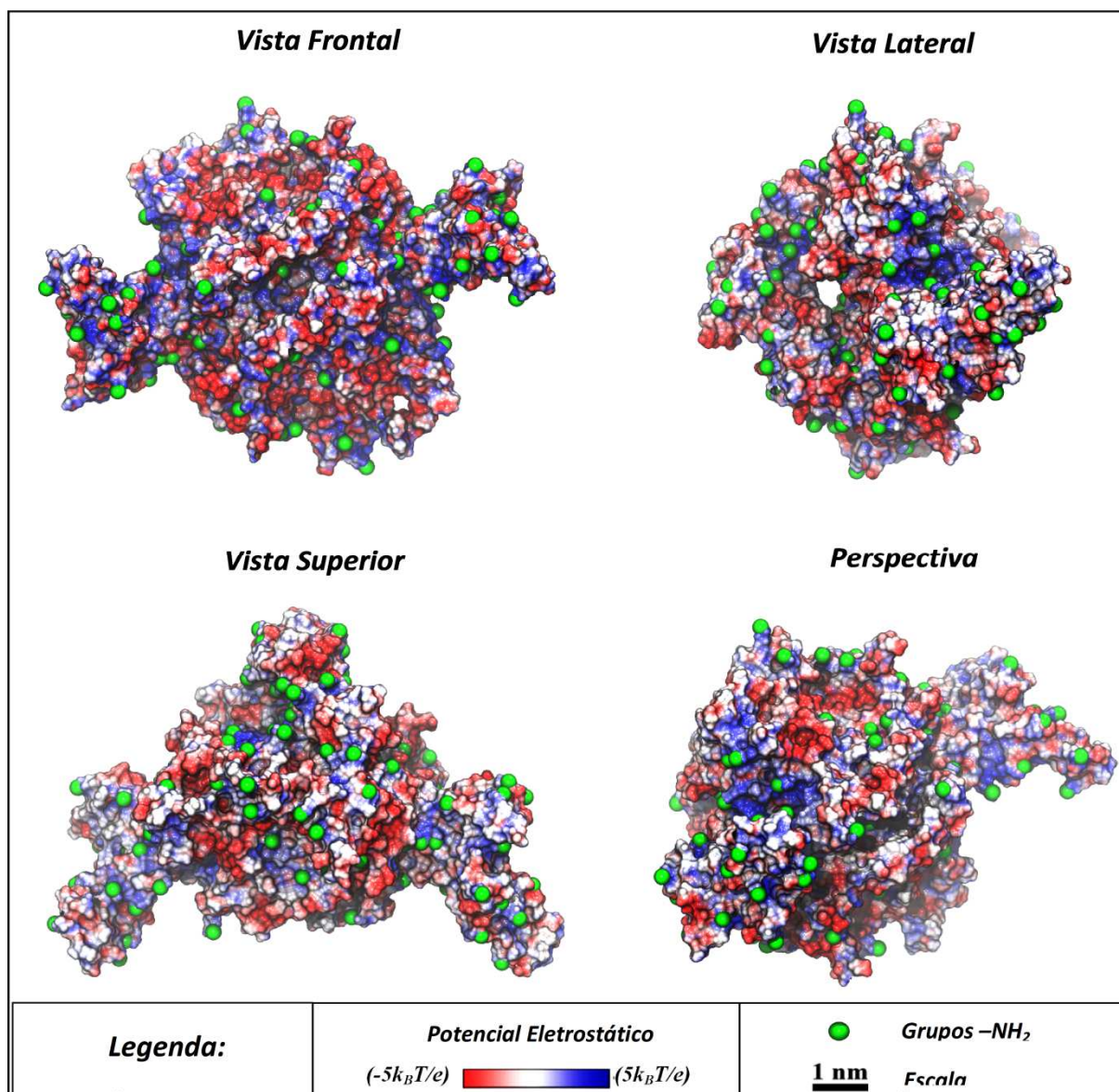
Fonte: (Franca *et al.*, 2011).

Dispondo do valor seguro de 0,3 nm de flutuação conformacional da enzima ACC em meio líquido, pôde-se criar um modelo rígido para a enzima ACC, informação que será útil no cálculo da interação com a ponta do AFM. O modelo rígido funciona quão bem quanto mais distantes forem as dimensões consideradas do valor mínimo de 0,3 nm, e é uma aproximação feita a partir das principais dimensões consideradas a partir de interações superficiais. A criação do modelo rígido teve a finalidade de facilitar o cálculo das áreas mais prováveis de interação entre superfícies e proporcionar números mais consistentes quanto à predição das probabilidades envolvidas nas possíveis posições e formas com que a enzima pode ser funcionalizada na ponta do AFM.

A FIG. 14 mostra a representação de superfície da enzima ACC, nesta representação está incluído o potencial eletrostático da enzima em pH neutro (Franca *et al.*, 2011) e os grupos $-NH_2$ (representação de van der Waals) disponíveis para a funcionalização após o interação entre superfícies, ambos exibem um caráter uniforme de distribuição ao longo da superfície da enzima. Por esse ponto de observação não há regiões preferenciais para a funcionalização. Outro ponto de observação são as regiões indicadas na FIG. 15, essa figura mostra a representação

técnica das principais dimensões da enzima ACC aproximadas. Neste modelo rígido as áreas A, B, C, D, E e F foram as superfícies de interação estudadas.

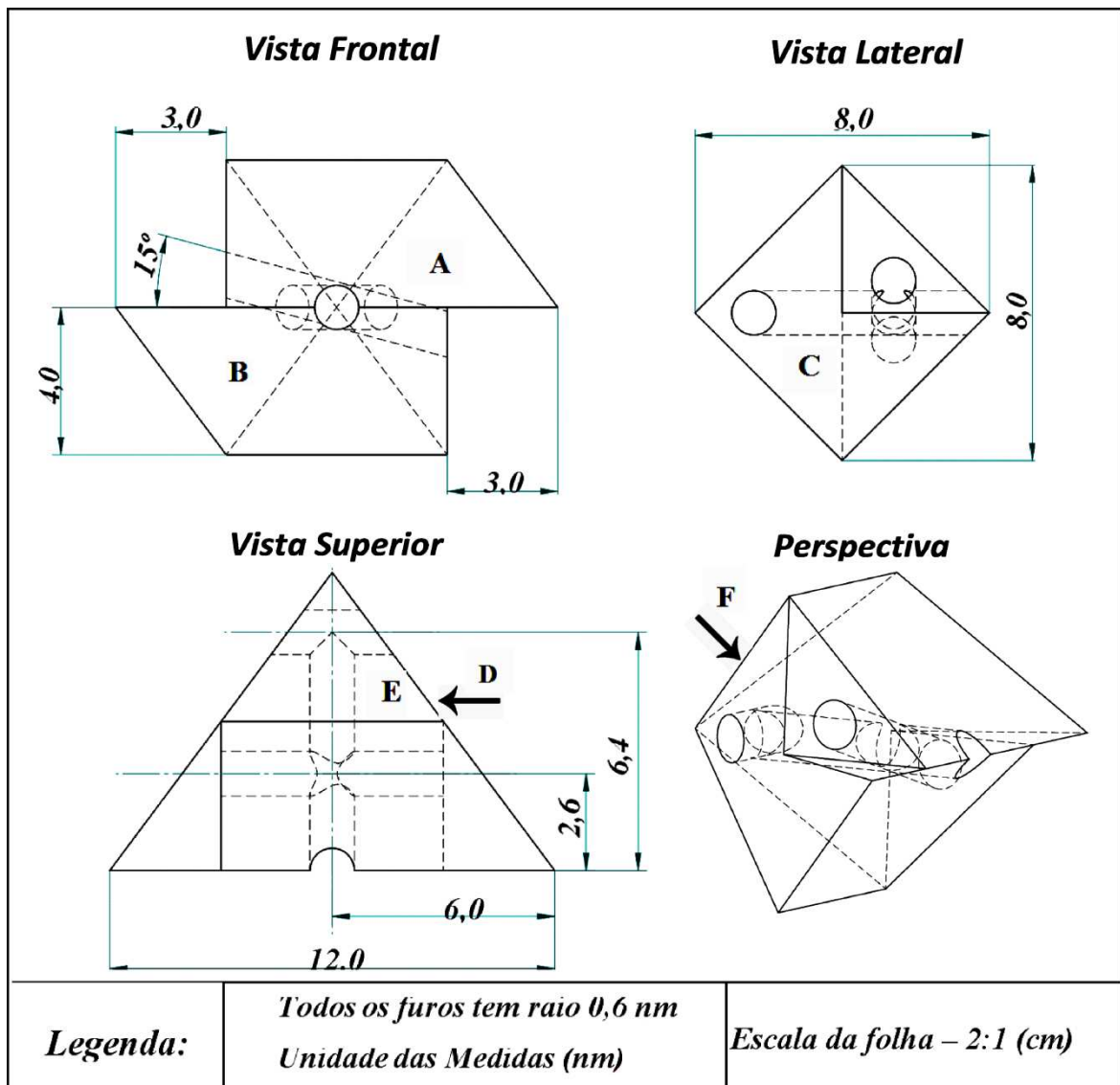
FIGURA 14 – Potencial Eletrostático da superfície da enzima ACC. As regiões representadas na cor azul são regiões de cargas positivas, as regiões representadas na cor vermelha são regiões de cargas negativas, enquanto as regiões representadas na cor branca são regiões neutras.



Nota: k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura e e a carga elementar.

Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

FIGURA 15 – Modelo Rígido da enzima ACC desenvolvido.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

5.4.2 Probabilidades envolvidas nas áreas de interação

As áreas A, B, C, D, E e F da FIG. 15 representam todas as possíveis áreas de interação entre a enzima ACC e a superfície da ponta do AFM, segundo o Modelo Rígido. Devido à simetria do modelo, nota-se que as posições correspondentes às áreas A, C, e E são as mesmas das áreas B, D e F respectivamente, o que limita a somente três posições possíveis para a

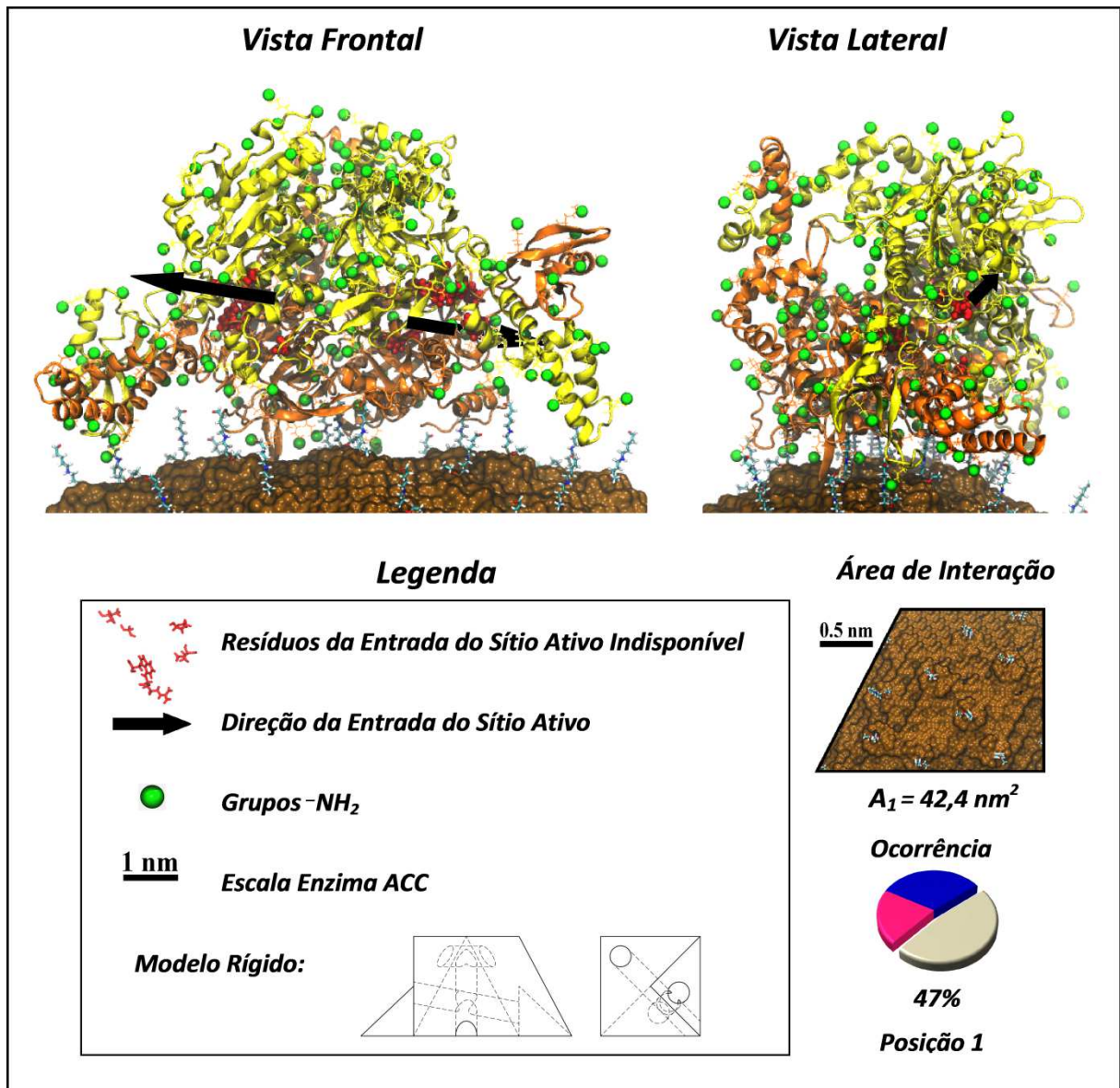
funcionalização da enzima ACC, segundo o modelo, representadas nas FIG. 16, 17 e 18. Essas três figuras mostram cada uma, uma posição da enzima ACC possível para a funcionalização com sua respectiva probabilidade de ocorrência correspondente a área de interação entre as superfícies $P(A_n)$ (Enzima e ponta do AFM), calculada como sendo (Equação 10):

$$P(A_n) = \frac{A_n}{A_1 + A_2 + A_3} \quad (10)$$

sendo A a área de interação e $n = \{1,2,3\}$ o índice correspondente.

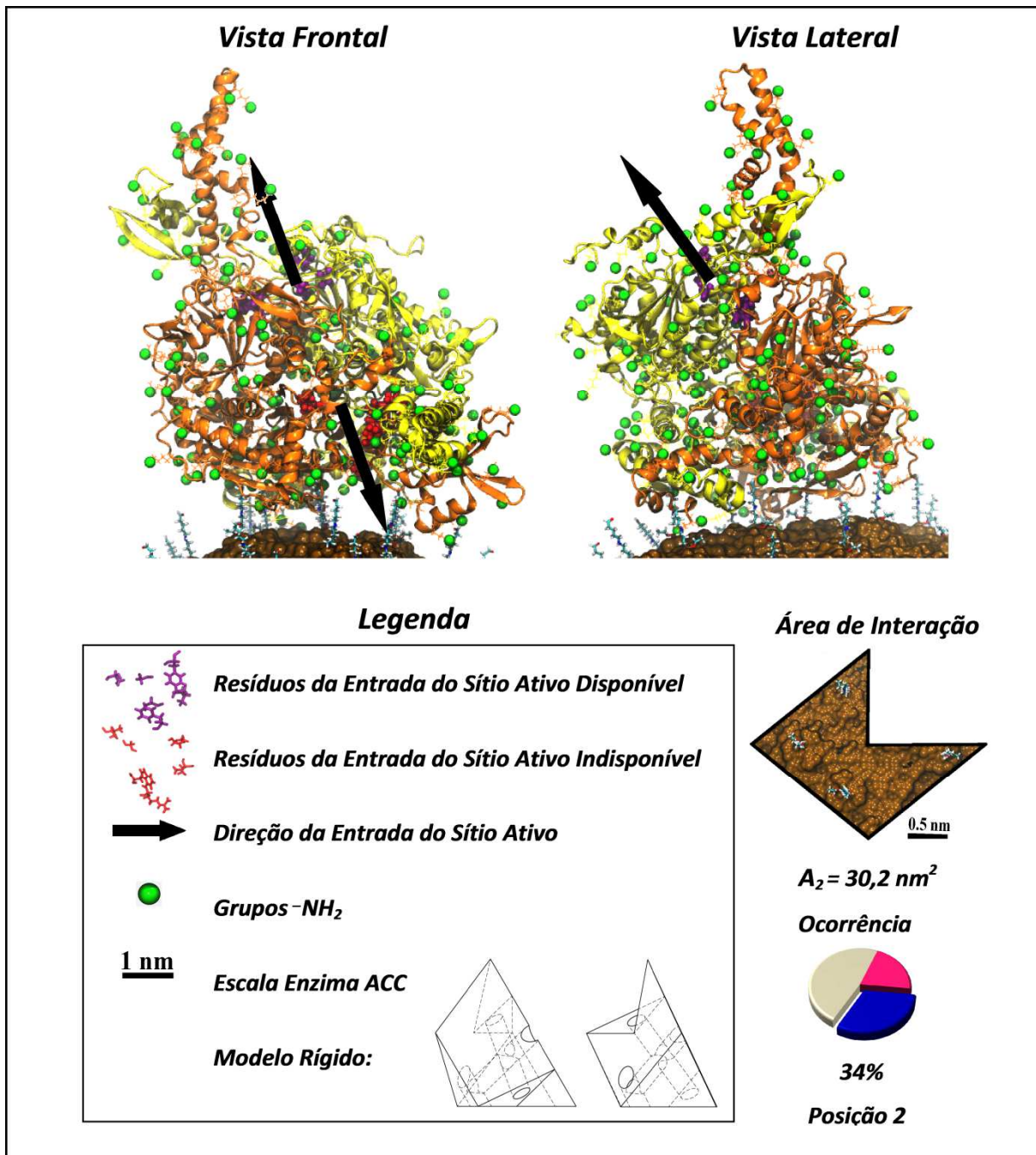
Nas FIG. 16, 17 e 18, para cada uma das três posições correspondentes, estão representadas por um vetor a direção da entrada do sítio ativo que pode ou não estar disponível para a detecção do substrato. Os vetores cujas componentes verticais estão apontadas na direção oposta ao substrato (sentido superfície da ponta) indicam uma entrada do sítio ativo indisponível para o mesmo, na qual os resíduos dos aminoácidos correspondentes estão representados na cor vermelha. Os vetores cujas componentes verticais estão apontadas na direção do substrato (sentido oposto à superfície da ponta do AFM) indicam uma entrada do sítio ativo disponível para o mesmo, na qual os resíduos dos aminoácidos correspondentes estão representados na cor violeta. Na FIG. 16, porém, não se observa entradas dos sítios ativos disponíveis que, segundo a direção da componente vetorial estaria disponível, devido a distância da mesma em relação a superfície da enzima ACC ser maior do que a altura da monocamada do substrato de herbicidas Diclofop funcionalizados na superfície de mica.

FIGURA 16 – Posição 1. Essa posição é uma das três possíveis formas da enzima ACC ser imobilizada na superfície de Si_3N_4 da ponta do AFM previstas pelo Modelo Rígido.



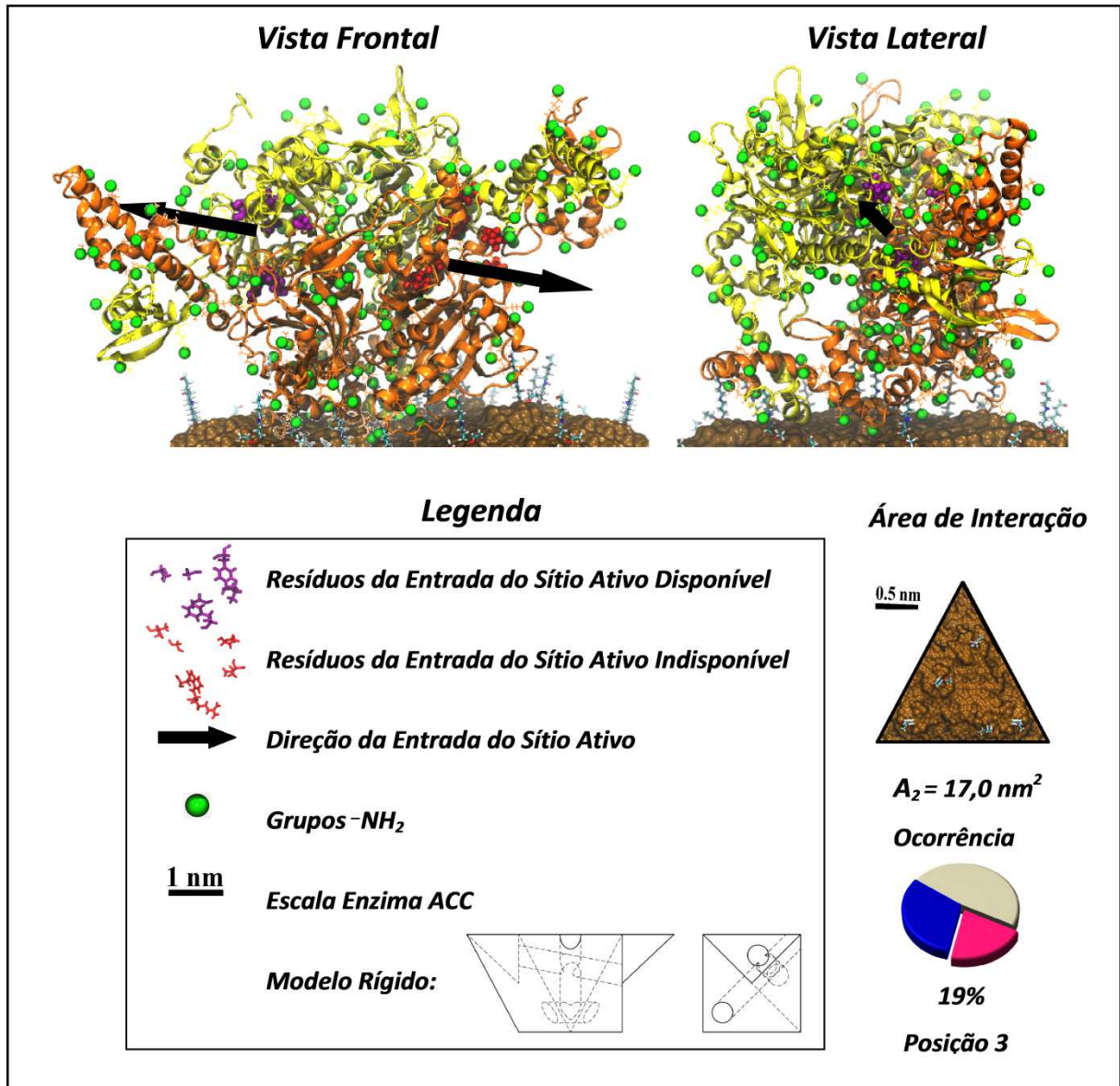
Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

FIGURA 17 – Posição 2. Essa posição é uma das três possíveis formas da enzima ACC ser immobilizada na superfície de Si_3N_4 da ponta do AFM previstas pelo Modelo Rígido.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

FIGURA 18 – Posição 3. Essa posição é uma das três possíveis formas da enzima ACC ser imobilizada na superfície de Si_3N_4 da ponta do AFM previstas pelo Modelo Rígido.



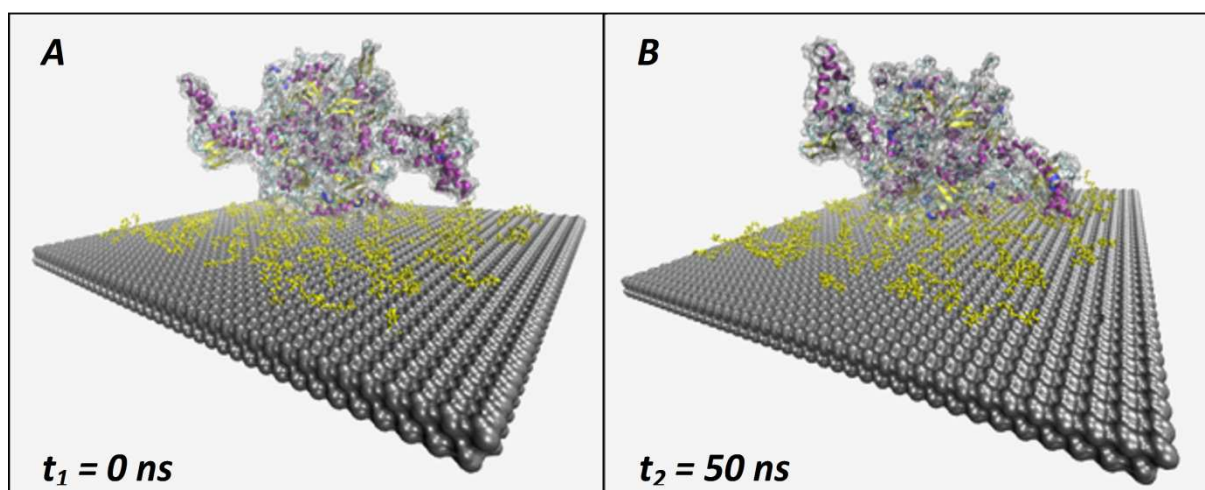
Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

Uma simulação realizada a partir de cálculos de Dinâmica Molecular (ANEXO A), feita nas mesmas condições termodinâmicas do modelo rígido, mostra que de fato a enzima tende a ajustar naturalmente sua posição na superfície da ponta do AFM para uma das três posições possíveis das FIG. 16, 17 e 18. Na simulação a

enzima foi posicionada de maneira aleatória no instante inicial $t = 0$ ns (FIG. 19A), e após um período de $t = 50$ ns (FIG. 19B) se observou que a enzima assumiu naturalmente a posição 2, representada na FIG. 17.

A simulação consistiu em estudar as superfícies de interação entre a enzima ACC e a superfície da ponta do AFM recoberta por uma monocamada de moléculas APTES+Glutaraldeído, fato que ocorre experimentalmente durante o processo de funcionalização. Ao final deste processo ocorre a ligação covalente entre os grupos $-NH_2$ disponíveis na superfície da enzima ACC com a extremidade das moléculas de Glutaraldeído, processo descrito no item 5.2.1.

FIGURA 19 – Simulação da interação da enzima ACC com a superfície de Si_3N_4 , realizada em solução aquosa para cálculos de Dinâmica Molecular.



Fonte: Manuscrito (ANEXO A).

Sendo assim, a probabilidade da entrada do sítio ativo de uma enzima ACC funcionalizada estar disponível, é dependente das três posições possíveis para funcionalização das FIG. 16, 17 e 18 e deverá ser $1 - 0,47 = 0,53$ segundo o Modelo Rígido.

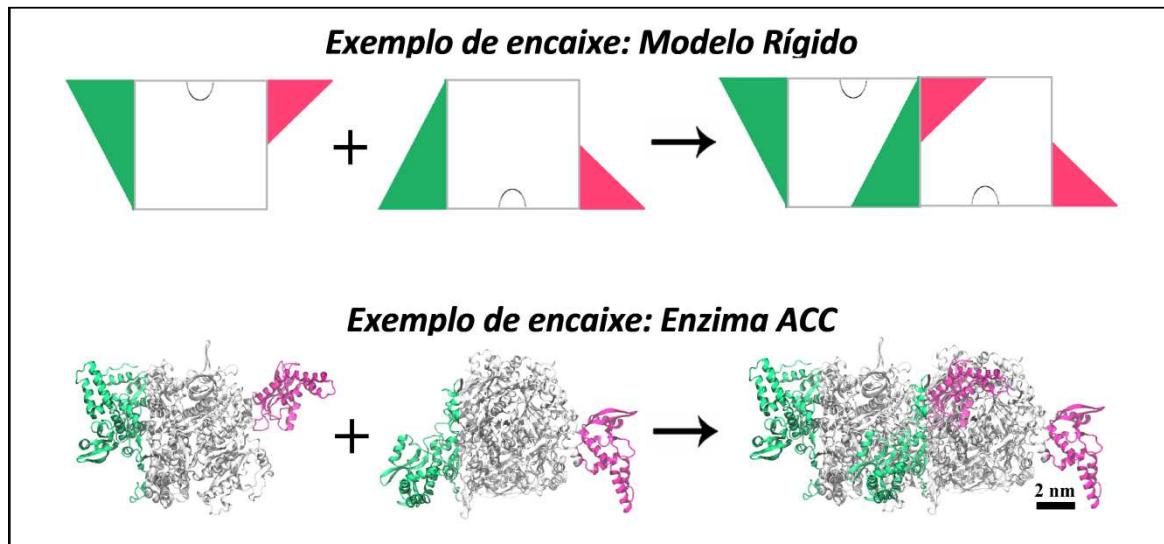
5.4.3 Área média ocupada na superfície da ponta do AFM pela ACC

Para calcular o número de enzimas úteis (enzimas que podem interagir especificamente com o substrato de herbicidas Diclofop) em função do raio da ponta do AFM é necessário saber antes qual é a área média ocupada por uma enzima ACC funcionalizada na superfície da ponta do AFM.

Estudos realizados mostram que o monômero da enzima ACC é estruturalmente pouco estável quando tratado isoladamente, o que corrobora a tendência da formação do dímero (estrutura mais estável na natureza) (Franca *et al.*, 2011) e esta seja a estrutura mais estável na natureza. A energia livre de solvatação $(-23,36 \cdot 10^3) \frac{kJ}{mol}$ descrita por Franca *et. al* (Franca *et al.*, 2011) mostra que a enzima ACC é solúvel em meio aquoso e dado seu respectivo ponto isoelétrico 6,23 (Cheng *et al.*, 2011), valor correspondente ao pH em que existe um equilíbrio entre o balanço de cargas negativas e positivas fazendo com que as forças de interação com o solvente sejam menores, as enzimas ACC tentem a formar aglomerados em pH neutro dependendo da concentração molar.

As enzimas ACC podem se ajustar umas nas outras por intermédio de acoplamentos que se mantêm estáveis por forças de natureza eletrostática como é o exemplo dos dois monômeros que compõe a enzima ACC, e formar aglomerados. Infelizmente não se tem dados cristalográficos na literatura sobre aglomerados de enzimas ACC, porém, da mesma maneira que só deve existir um acoplamento possível na natureza para os dois monômeros que compõe o dímero da enzima ACC (FIG. 9) (dentre todas as estruturas descritas na literatura), só deve haver uma maneira possível de duas enzimas ACC (dímero) se acoplarem. Este acoplamento forma dois dímeros, mas pode haver outras formas de estas mesmas proteínas se encaixarem sem que haja de fato a formação de novas estruturas multiméricas (FIG. 20), já que esse não é o comportamento encontrado na literatura da enzima ACC. Por intermédio do Modelo Rígido desenvolvido pôde-se identificar quais são as “peças” que podem se encaixar e descontá-las das áreas de ocupação na superfície da ponta do AFM.

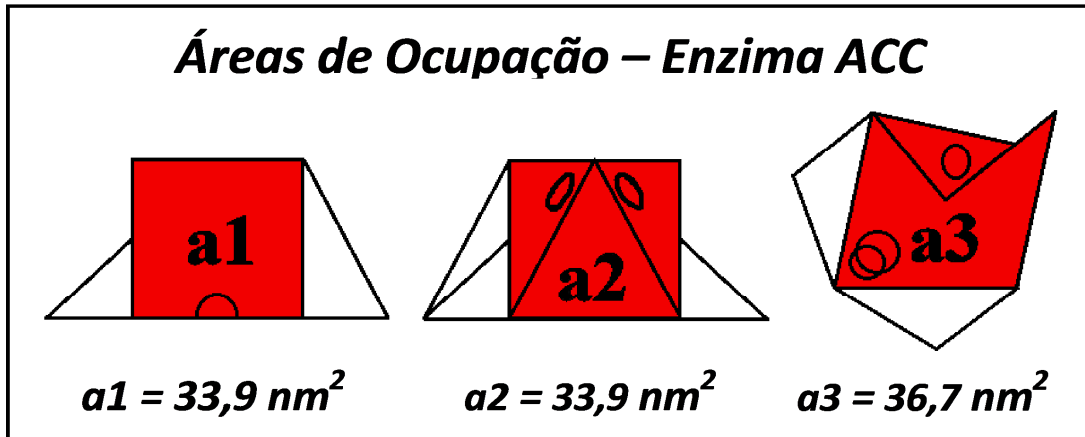
FIGURA 20 – Exemplo de um possível encaixe sem haver a formação de uma nova estrutura multimérica para a enzima ACC. Encaixe nas posições 1 e 3, correspondentes às FIG. 16 e 18 (Vista superior da enzima e representação pelo modelo rígido).



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

Sendo assim, a área efetiva ocupada por uma enzima ACC, segundo o Modelo Rígido, deve ser a média das projeções das vistas superiores correspondentes cada posição possível ocupada descontado das projeções correspondentes aos encaixes. Considerando que não há espaços vazios entre as projeções das enzimas ACC aglomeradas, a área média $A_m = 34,8 \text{ nm}^2$ (com desvio padrão $2,6 \text{ nm}^2$ para um grau de confiabilidade de 95%.) ocupada por uma enzima ACC foi calculada como sendo a média das três áreas possíveis de ocupação (Fig. 21) ponderada pela probabilidade de ocorrência de cada uma, correspondente às três posições das FIG. 16, 17 e 18,

FIGURA 21 – Áreas de ocupação possíveis na superfície da ponta do AFM para a enzima ACC (representadas na cor vermelho) segundo o Modelo Rígido.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

5.4.4 Número de enzimas úteis na ponta do AFM funcionalizada

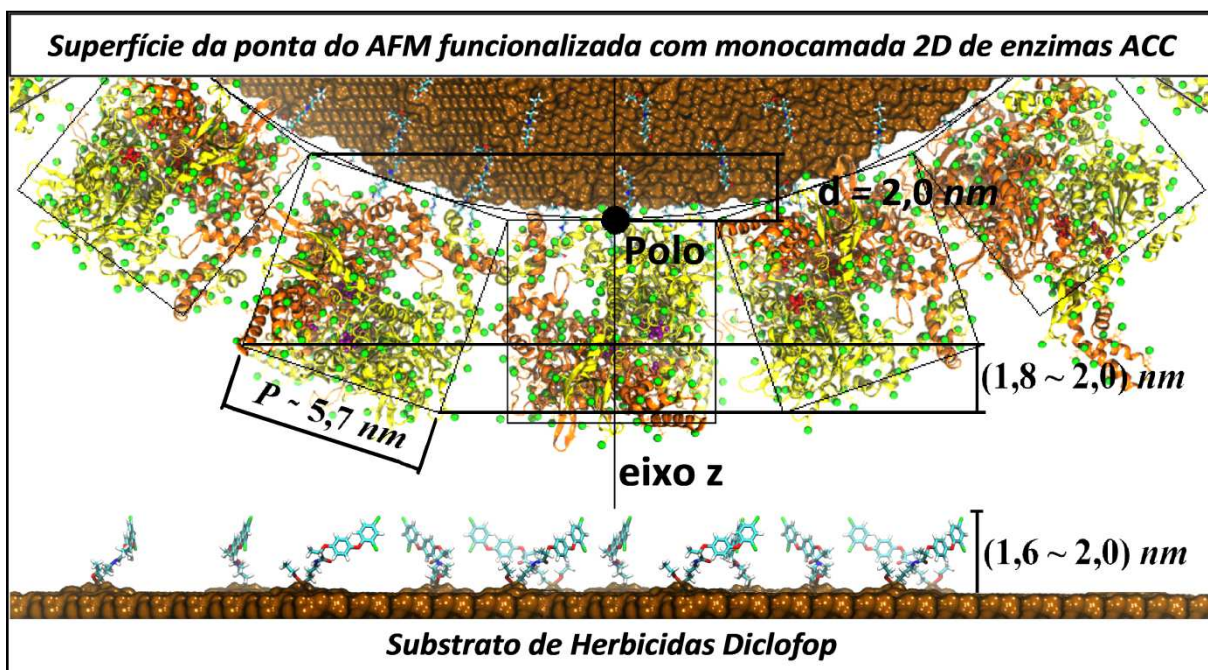
O passo seguinte foi a determinação da área da ponta do AFM disponível para agrupar as enzimas úteis, para isso foi estipulado um valor máximo $d = 2,0 \text{ nm}$ de distância na qual as enzimas ACC de uma monocamada podem se ligar ao plano esférico da superfície da ponta do AFM em relação ao polo deste (FIG. 22). Esta distância foi estipulada com base na altura da monocamada do substrato de herbicidas Diclofop (FIG. 22), tornando a área A da superfície esférica uma função do raio R da ponta do AFM, com o parâmetro d fixado em $2,0 \text{ nm}$ (Equação 11).

$$A = 2\pi dR \quad (11)$$

Cada célula APTES+Diclofop funcionalizada na ponta pode se estender até um comprimento de 3 nm depois de complexada a entrada do sítio ativo da enzima ACC, porém o comprimento mínimo de 2 nm deve ser alcançado pela entrada do sítio ativo das enzimas ACC funcionalizadas na ponta do AFM. Na FIG. 22 uma monocamada de enzimas está representada em um plano 2D de acordo com sua menor dimensão, um quadrado de lado P segundo o Modelo Rígido, que corresponde à aresta dos quadrados que as envolvem. O cálculo para as demais

dimensões (revolução em torno do eixo central z) é exatamente o mesmo, pois é a localização da entrada do sítio ativo que é levada em consideração. A vista lateral das enzimas corresponde também às vistas laterais que são apresentadas nas FIG. 16, 17 e 18.

FIGURA 22 – Monocamada 2D de menor dimensão possível de enzimas ACC funcionalizadas na ponta do AFM e distâncias mínimas para que haja interação entre as enzimas e o substrato de herbicidas Diclofop.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

De acordo com o modelo sugerido, para pontas de AFM com raio $< 15 \text{ nm}$ o valor do parâmetro d não fixado fica acima de $2,0 \text{ nm}$, o que leva a conclusão de que apenas a enzima que foi funcionalizada em cima do polo da ponta do AFM deve ser útil e apta a interagir especificamente com o substrato de herbicidas Diclofop. O valor do raio da ponta do AFM não pode ser inferior à metade do parâmetro P (aproximadamente $5,7 \text{ nm}$ para a enzima ACC), pois nesta condição a enzima não tem condições físicas de se aderir ao polo da ponta do AFM, impossibilitando

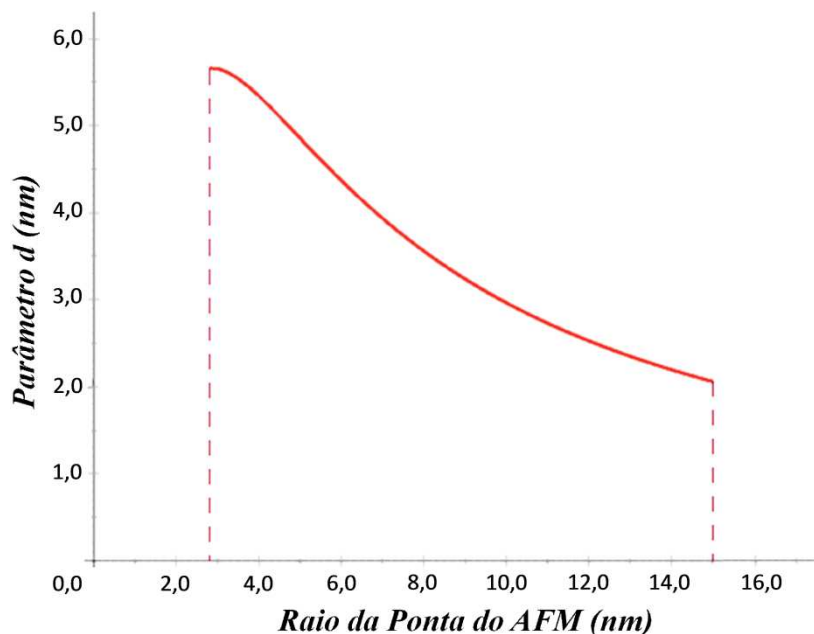
interações específicas com o substrato. Isso fica mais visível na equação do parâmetro d (12), que mostra d em função de R para a caixa cúbica de lado P adjacente à enzima polar da ponta do AFM (enzima funcionalizada no polo da superfície esférica) de raio R (Esquemático da superfície da circunferência, representando a ponta do AFM, que levou a Equação 12 (APÊNDICE A)).

$$d = R - \sqrt{R^2 - x^2} + \frac{P}{2} |\sin(\arctan\theta)| \quad (12)$$

sendo $x^2 = \frac{R^2 \tan^2 \theta}{1 + \tan^2 \theta}$ e $\tan \theta = -\frac{PR}{R^2 - (\frac{P}{2})^2}$ a curva do parâmetro d

variável em função de R , para o intervalo $R =]\frac{P}{2}, 15]$ nm que é apresentada na FIG. 23.

FIGURA 23 – Variação do parâmetro d de distância em função do intervalo do raio da ponta] $(P/2), 15]$.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

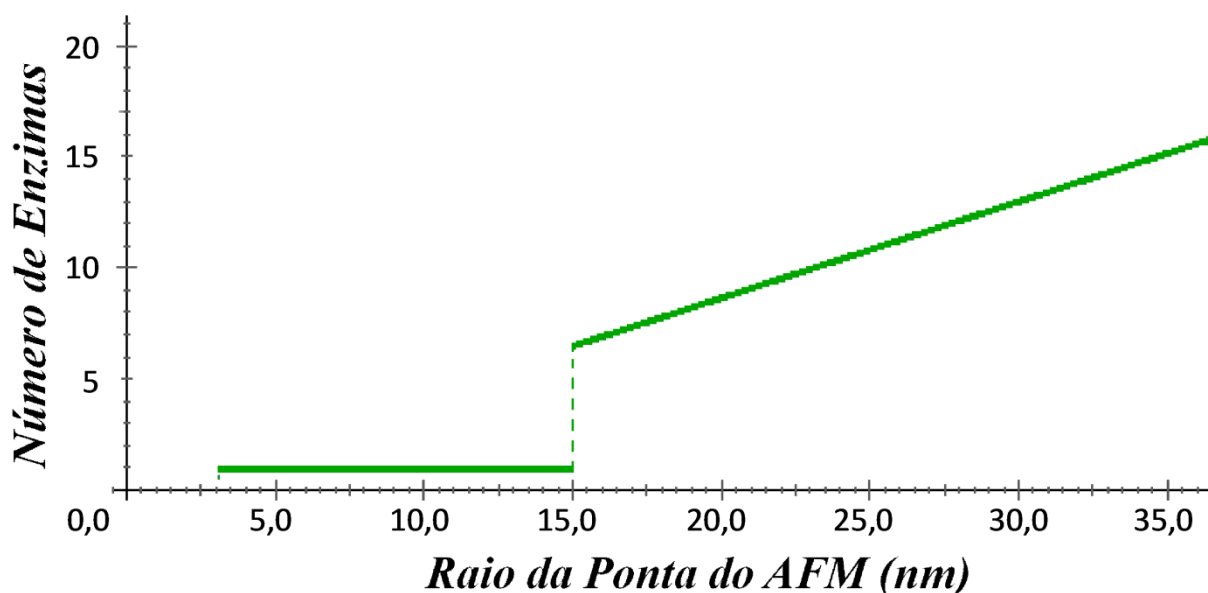
Assim, para raios de ponta do AFM com valores superiores a 15 nm não há necessidade do parâmetro d ser variável e função de R , o que torna a área A (disponível para agrupar as enzimas úteis) da superfície da ponta do AFM uma função apenas de R (11). Para valores de R entre $P/2$ (aproximadamente 3) e 15 nm, somente a enzima localizada no polo da superfície esférica da ponta do AFM irá interagir especificamente com o substrato.

O número de enzimas úteis N para pontas de AFM com raio >15 nm deve ser a razão entre a área A da ponta do AFM disponível para agrupar as enzimas úteis pela área A_m correspondente a área média da superfície de interação do modelo rígido para a enzima ACC (Equação 13).

$$N = \frac{2\pi dR}{A_m} \quad (13)$$

para qualquer R , N pode ser representado pela curva $R \times N$ da FIG. 24.

FIGURA 24 – Número de enzimas úteis que podem ser funcionalizadas em função do Raio da ponta do AFM.



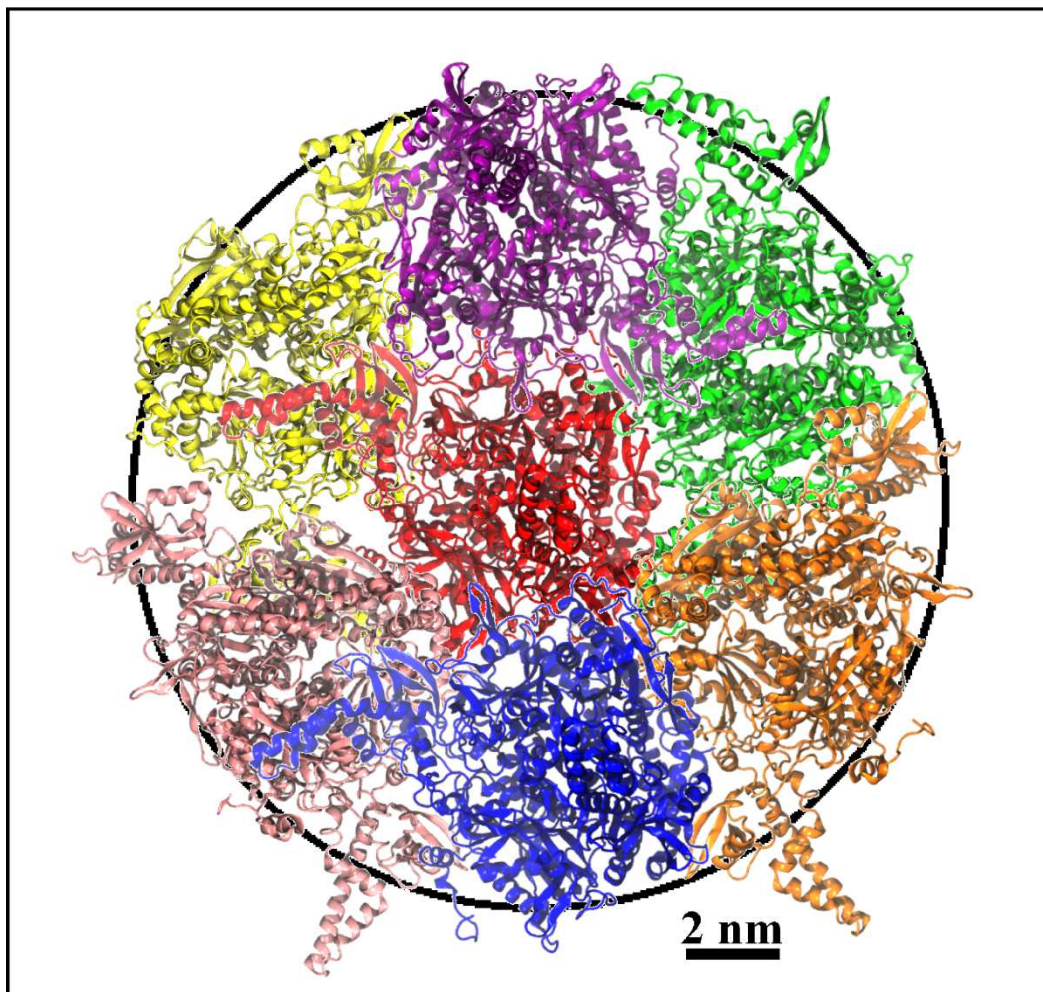
Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

O valor do raio da ponta do AFM (utilizada no experimento do nanobiossensor) especificado pelo fabricante é $R < 20$ nm, enquanto o valor mínimo para que ocorra a interações específicas com o substrato, envolvendo mais de uma enzima ACC funcionalizada, calculado teoricamente é 15 nm. Essas especificações definem o valor do raio da ponta utilizada experimentalmente como sendo um valor entre 16 (valor maior que 15 nm) e 20 nm, ou $(18,0 \pm 2,0)$ nm. Desta forma, o número de enzimas úteis na superfície da ponta do AFM é descrito de acordo com o cálculo da Equação 14, com grau de confiabilidade de 95%.

$$N = \frac{2\pi \cdot 2 \cdot (18,0 \pm 2,0)}{34,8 \pm 2,6} = (6,5 \pm 1,2) \text{ Enzimas} \quad (14)$$

Para o valor do raio da ponta do AFM de 18,0 nm, o parâmetro de profundidade $d = 2,0$ nm define uma superfície de semiesfera de raio maior 8,2 nm formando uma circunferência. A FIG. 25 indica a vista superior (ponto de vista do substrato) do polo da ponta do AFM funcionalizada com sete enzimas ACC úteis sendo limitada pela semiesfera de área $(2\pi \cdot 2 \cdot 18)$. O arranjo das 7 enzimas dentro das limitações da área da circunferência da FIG. 25 é um arranjo esperado, de acordo com as probabilidades das FIG. 16, 17 e 18. A forma como as enzimas se acoplam é uma previsão feita pelo modelo rígido, ainda não comprovada experimentalmente.

FIGURA 25 – Arranjo esperado de enzimas ACC numa semiesfera de raio maior que 8,2.

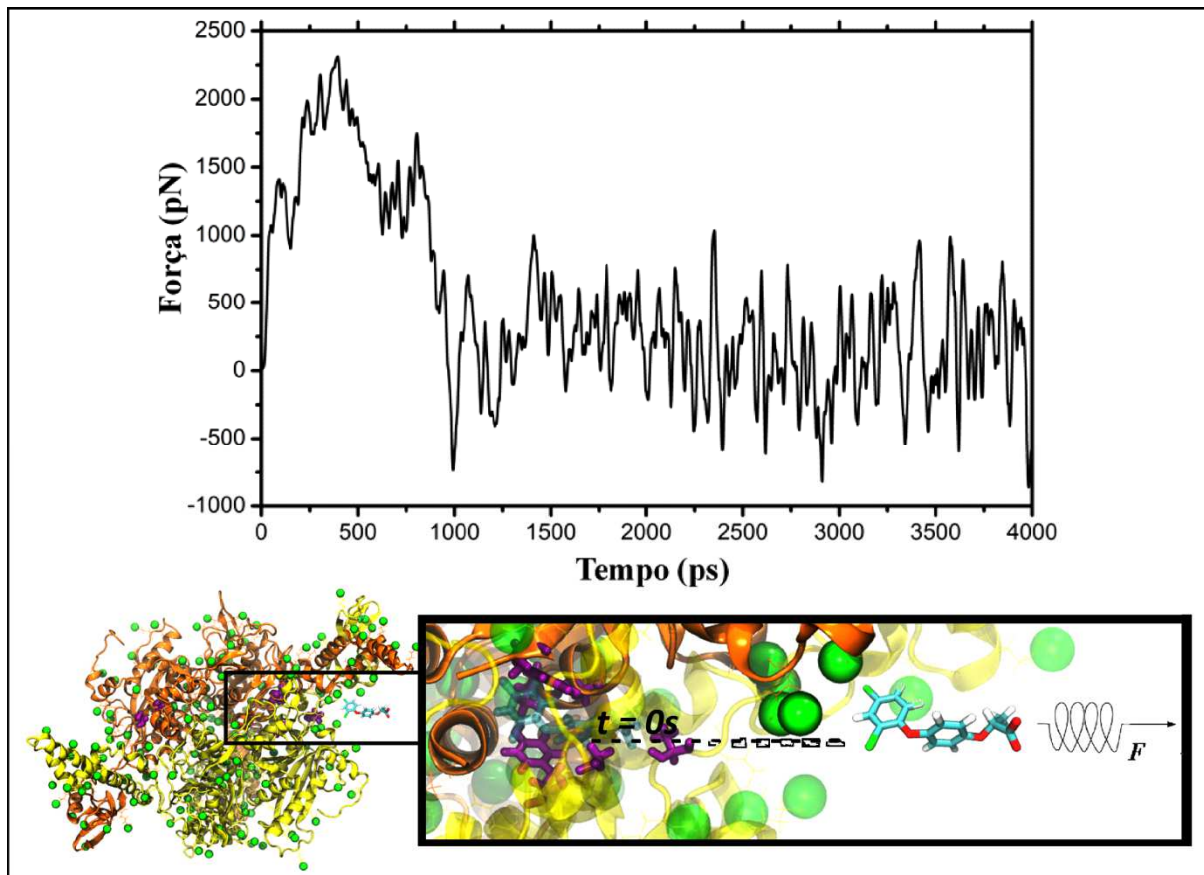


Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

5.5 DINÂMICA MOLECULAR DIRECIONADA

Os cálculos de Dinâmica Molecular Direcionada consistiram em simular a força média necessária para o desacoplamento do herbicida Diclofop dos resíduos da entrada do sítio ativo da enzima ACC. A FIG. 26 mostra a força aplicada com na direção e sentido do desacoplamento, resultando em uma média de $(1,6 \pm 0,5)$ nN para o processo. Essa força foi associada a força de adesão entre o herbicida Diclofop e a enzima ACC.

FIGURA 26 – Dinâmica Molecular Direcionada simulando um processo de desinibição da enzima ACC pelo herbicida Diclofop, obtenção da força teórica de adesão.



Fonte: Simulação realizada a partir do Arquivo PDB 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

Analisado a curva de força da FIG. 26, nota-se que a força necessária para a reversão do processo de inibição da enzima ACC pelo herbicida Diclofop, pode ser compreendida como a força de adesão entre 1 herbicida Diclofop funcionalizado num determinado substrato com 1 entrada do sítio ativo da enzima ACC, funcionalizada na superfície da ponta do AFM.

Dispondo deste valor de força de adesão pôde-se fazer uma previsão teórica, por intermédio dos cálculos de modelagem molecular e o modelo rígido proposto para a enzima ACC, do valor da força de adesão que deverá ser detectada pelo

protótipo experimental do nanobiossensor ao interagir especificamente com um substrato funcionalizado com herbicidas Diclofop, mostrada na Equação 15.

$$F = N \cdot (1,6 \pm 0,5) \cdot 0,53 \quad (15)$$

sendo N o número de enzimas úteis que interagem com o substrato de herbicidas, 1,6 nN a força de adesão calculada por intermédio da dinâmica molecular direcionada e 0,53 a probabilidade da entrada do sítio ativo estar disponível, para cada enzima ACC útil funcionalizada na superfície da ponta do AFM, calculada por intermédio do modelo rígido. Substituindo o valor de N calculado para um raio da ponta do AFM ($18,0 \pm 2,0$), a força de adesão prevista pela modelagem molecular da MFQ para o nanobiossensor será ($5,5 \pm 2,7$) nN para um grau de confiabilidade de 95%.

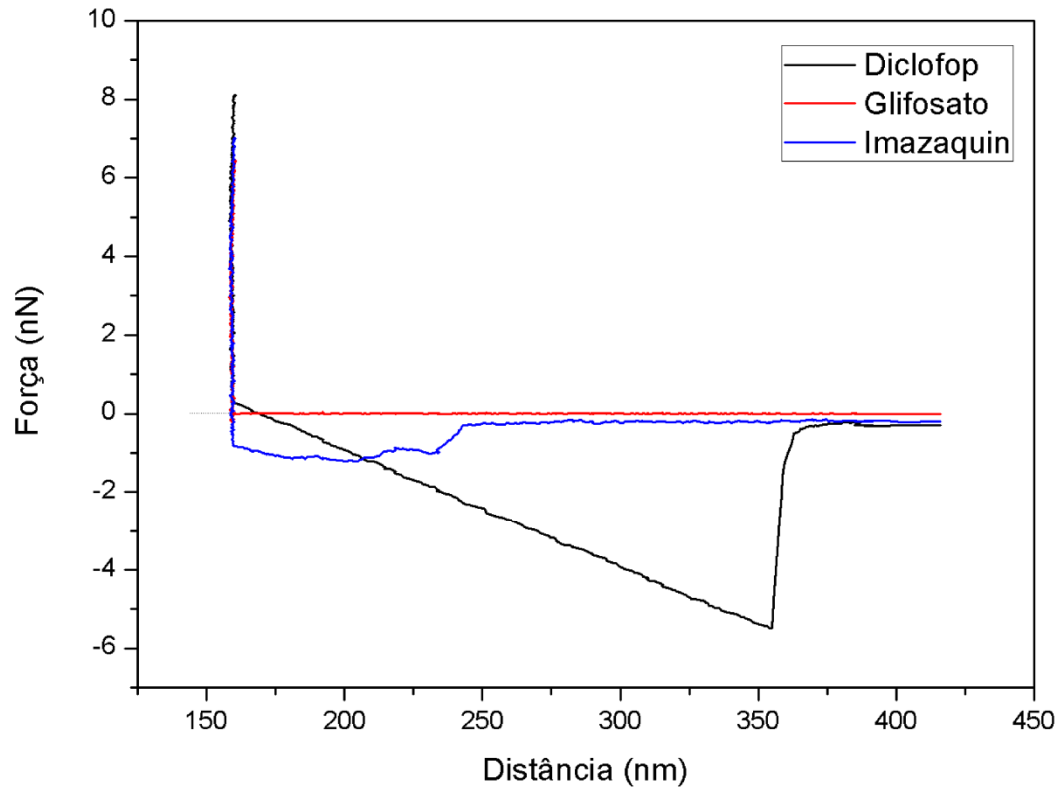
5.6 MONTAGEM EXPERIMENTAL DO NANOBIOSENSOR²

A montagem experimental do nanobiossensor deu-se de acordo com as funcionalizações do modelo teórico desenvolvido para a MFQ e realizada nas mesmas condições termodinâmicas em meio soluto, numa solução tampão com pH 7.0. A superfície da ponta do AFM foi funcionalizada com enzimas ACC para interação e detecção específica dos herbicidas Diclofop, funcionalizados como substrato na superfície da mica. De maneira análoga a funcionalização da mica pelo Diclofop, os herbicidas não inibidores da enzima ACC Imazaquin e Glifosato (APÊNDICE B) foram funcionalizados em substratos fornecendo diferentes amostras para detecção. A funcionalização com os herbicidas não inibidores teve o objetivo, além de testar a especificidade do nanobiossensor, fornecer uma amostra controle, ou “branco” para comparação com o sinal detectado para o inibidor Diclofop.

As curvas de força de adesão obtidas na FIG. 27 são o resultado da medida mais frequente do experimento de detecção, pela ponta do AFM funcionalizada (protótipo do nanobiossensor), realizado de acordo com o modelo teórico descrito, para três diferentes substratos contendo o inibidor (Diclofop) e dois não-inibidores (Imazaquin e Glifosato) cada um.

² Item 5.6 elaborado com base no ANEXO B

FIGURA 27 – Curvas de força obtidas experimentalmente oriundas do protótipo do nanobiossensor, para os herbicidas Diclofop (inibidor específico), Glifosato e Imazaquin, com 95% de confiabilidade para dos desvios padrões.



<i>Inibidor</i>	<i>Força de Adesão (nN)</i>
<i>Diclofop</i>	6,0 ± 2,0
<i>Glifosato</i>	0,6 ± 0,2
<i>Imazaquin</i>	0,8 ± 0,2

Fonte: Manuscrito (ANEXO B).

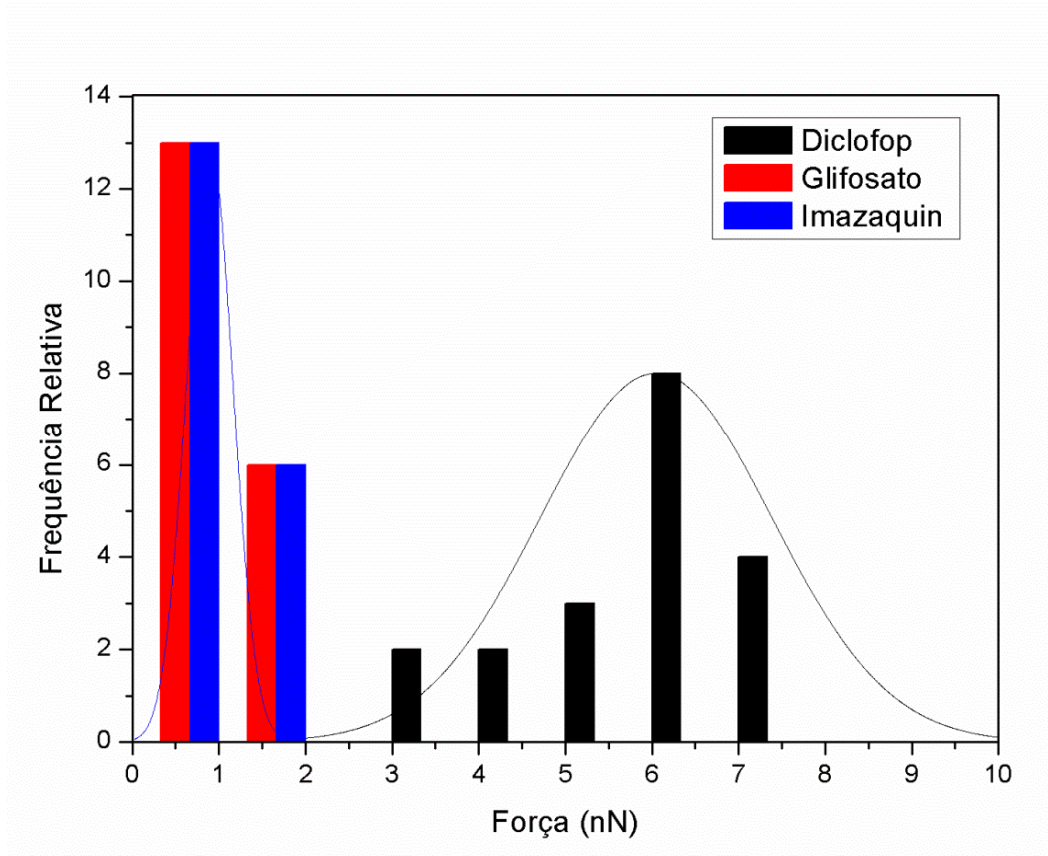
Ao analisar as curvas de força da FIG. 27 é possível observar que a força de adesão para o herbicida Diclofop é 7,5 vezes mais elevada ($6,0 \pm 2,0$ nN) quando comparados com o herbicida Imazaquin ($0,8 \pm 0,2$ nN), e cerca de 10 vezes mais elevada quando comparada com o herbicida glifosato ($0,6 \pm 0,2$ nN). Esta variação em valores de força de adesão é previsível, uma vez que o herbicida Imazaquin inibe a ação da enzima ALS (Acetolactato Sintase) (Ahonsi *et al.*, 2004; Kogan *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2012) e, como resultado, interage de maneira não específica

para a enzima ACC, provocando ruído não característico a uma curva típica de adesão.

O herbicida Glifosato é um inibidor da enzima EPSP (5-enolpiruvil sintase chiquimato-3-fosfato) (Alibhai e Stallings, 2001; Sammons *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2009) e, por consequência, também interage não especificamente com a enzima ACC. Esta prova corrobora a seletividade e especificidade das interações entre a enzima funcionalizada na ponta do AFM e seus inibidores específicos.

De acordo com os histogramas da FIG. 28, torna-se possível perceber a probabilidade de se encontrar valores de intervalo de eventos de adesão para os herbicidas Diclofop, Glifosato e Imazaquin. Os histogramas mostram um perfil típico com picos em vários valores da força de adesão, correspondentes a 19 medições.

FIGURA 28 – Histograma contendo a frequência relativa de ocorrência das medidas para os substratos funcionalizados com os herbicidas Diclofop, Glifosato e Imazaquin. Para cada substrato, foi realizado um total de 19 medidas.



Fonte: Manuscrito (ANEXO B).

As forças médias de adesão do histograma da FIG. 28, que representam as interações entre o nanobiossensor e os substratos estão dispostas na TABELA 4. Esta Tabela apresenta as forças de adesão de caráter específico e não específico, mostrando o protótipo do nanobiossensor detectando especificamente os herbicidas Diclofop na concentração de 1mM funcionalizados como sbustrato na superfície de mica.

TABELA 4. Forças de interação detectadas pelo nanobiossensor para os herbicidas Diclofop, Glifosato e Imazaquin, para um nível de confiabilidade de 95%.

Substrato	Força de Adesão (nN)	Natureza da Força
Diclofop	$5,7 \pm 2,5$	Específica
Glifosato	$0,8 \pm 0,8$	Não específica
Imazaquin	$1,2 \pm 1,0$	Não específica

Fonte: Manuscrito (ANEXO B).

5.7 O PROTÓTIPO DO NANOBIOSSENSOR

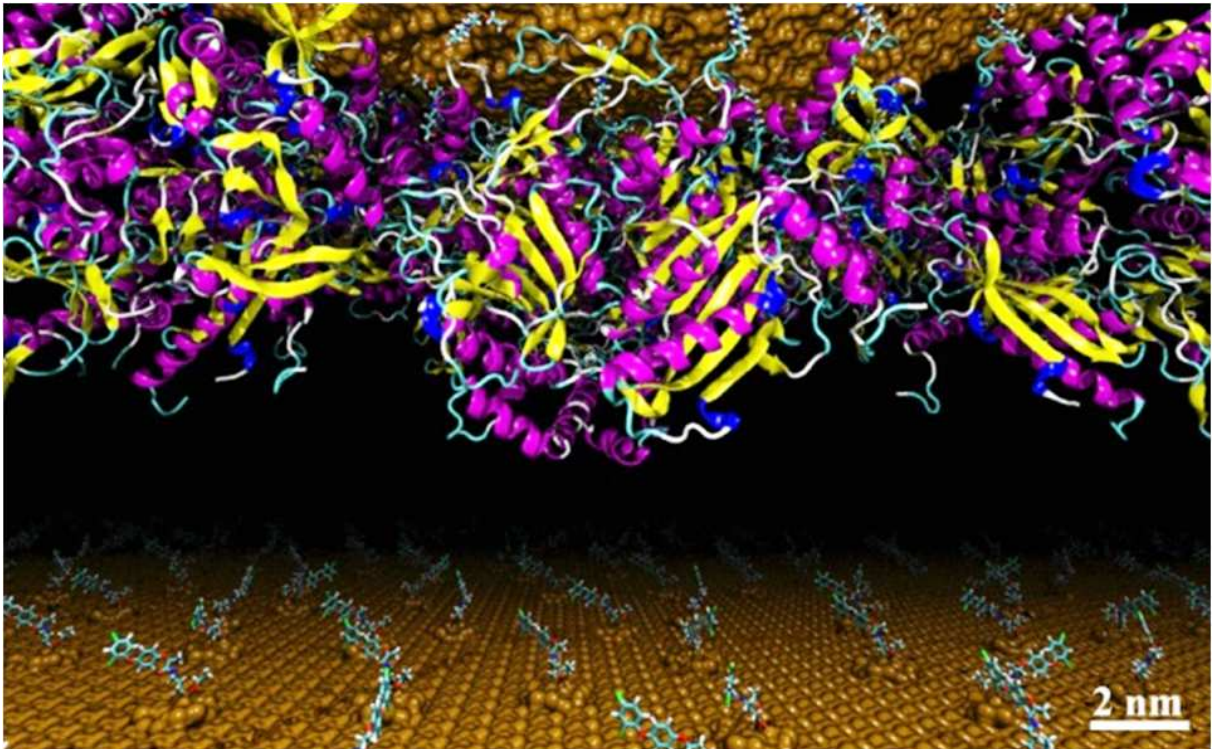
A força de adesão prevista pela modelagem molecular da MFQ ($5,5 \pm 2,7$) nN pôde ser comprovada pela força de adesão ($5,7 \pm 2,5$) nN medida experimentalmente pelo protótipo do nanobiossensor (FIG. 29), desenvolvido com base no modelo teórico apresentado. A magnitude da força de adesão necessária para quebrar as ligações formadas entre os diferentes substratos de herbicidas e as enzimas ACC funcionalizadas na superfície da ponta do AFM (Butt, Cappella e Kappl, 2005) contém não apenas a força de adesão calcula pela dinâmica molecular direcionada, mas também ruídos causados por outras interações não específicas detectadas por forças de natureza eletrostática e de Van der Waals.

Os pontos isoelétricos da superfície da mica (3,0 a 3,5) (Truong, Michael e Mark, 1998) e da enzima ACC (6,23) (Cheng *et al.*, 2011) são dois fatores em potencial que podem causar os ruídos nas curvas de adesão do nanobiossensor, já que estas superfícies estão potencialmente próximas. A mica é carregada positivamente em pH neutro e pode interferir no balanço de cargas da enzima ACC, fracamente carregada em pH neutro. É comprovado (ANEXO A) que estas superfícies podem interagir, causando atração ou repulsão entre as mesmas dependendo das condições de interação.

Considerando todas essas afirmações, é valoroso para o funcionamento do nanobiossensor que a força de adesão calculada pela dinâmica molecular direcionada seja superior a 1 nN para força de adesão entre uma enzima e um inibidor, para que haja especificidade suficiente para uma detecção confiável, já que não se pode eliminar todos os ruídos presentes na medida experimental.

O valor da força de adesão experimental para quaisquer inibidores específicos deve ser, segundo o modelo teórico, um múltiplo da força de adesão para cada processo de reversão de inibição enzimática calculado teoricamente e, variando os parâmetros estudados. O modelo sugerido pode servir para modelar outros nanobiossensores para detecção em escala molecular e em tempo real de diferentes substratos.

FIGURA 29 – *Artwork* da modelagem do nanobiossensor.



Fonte: Modelagem realizada a partir do Arquivo PDB referência 1UYR (“RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB”, [s.d.]).

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi apresentado um modelo teórico para a MFQ, fornecendo subsídios para a criação do protótipo experimental de um nanobiossensor de alta especificidade. O nanodispositivo é usado para detecção do herbicida Diclofop, baseado no fenômeno de inibição enzimática por herbicidas. Para isto foram apresentados como fundamento teórico os mais atuais métodos de MMC que são de utilidade na modelagem de sistemas envolvendo o AFM e a MFQ.

Atendendo aos objetivos propostos, a modelagem molecular da MFQ descreveu a funcionalização química da ponta do AFM, usado como elemento detector, e a funcionalização da placa de mica como substrato. Isso resultou na modelagem do nanobiossensor por intermédio de vários submodelos ousados e inovadores, cada um deles adequados as condições termodinâmicas e nanoescalas envolvidas, ilustrados em figuras autoexplicativas e de acordo com os requisitos experimentais exigidos.

O modelo teórico desenvolvido para MFQ proporcionou a realização de previsões que seriam difíceis, caras ou mesmo impossíveis de serem realizadas. Entre estas previsões se destacam:

- 1) O número de enzimas úteis na ponta do AFM que podem interagir com o substrato;
- 2) O número de sítios ativos disponíveis nas enzimas funcionalizadas;
- 3) A força de adesão teórica entre a ponta do AFM e o substrato de herbicidas;
- 4) A influência de diferentes medidas de raio de pontas de AFM no número de enzimas úteis funcionalizadas e;
- 5) Um possível experimento envolvendo uma única enzima útil funcionalizada, sem a necessidade métodos de funcionalização mais complexos.

Por intermédio da descrição química de funcionalizações de superfícies e a criação de diferentes submodelos foi possível fazer previsões teóricas que foram comprovadas experimentalmente, como a força de adesão teórica ($5,5 \pm 2,7$) nN e a

força de adesão obtida experimentalmente ($5,7 \pm 2,5$) nN, fornecendo mais subsídios para validar e aperfeiçoar o protótipo do nanobiossensor de alta especificidade.

Por fim, os modelos desenvolvidos neste trabalho vão contribuir plenamente no desenvolvimento de outros protótipos de nanobiossensor para detecção específica de substratos a nível molecular e em tempo real, além de auxiliar no estudo de doenças autoimunes e neurodegenerativas.

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Segue abaixo os possíveis trabalhos futuros:

- 1) Aperfeiçoamento do modelo teórico, que pode ser realizado por intermédio da criação de outros submodelos, e.g., a dinâmica molecular direcionada;
- 2) Levantamento de curvas teóricas, que sejam função da concentração molar de herbicidas funcionalizados em substratos, com o intuito de auxiliar novos experimentos para testes e aperfeiçoamento do nanobiossensor;
- 3) Estudo de outras moléculas em conjunto com o APTES para a funcionalização da placa de mica como substrato, com o intuito do mesmo ter maior alcance dos sítios ativos disponíveis nas moléculas detectoras provenientes do nanobiossensor, eliminando parte dos valores probabilísticos envolvidos nas curvas de adesão, tanto teóricos como experimentais.
- 4) Para a parte experimental, o modelo teórico detectou a necessidade de um aumento na precisão do raio da ponta, que pode ser conseguido através de Microscopia Eletrônica de Varredura, conseqüentemente aumentando a precisão do nanobiossensor. Será de grande importância para o aperfeiçoamento do modelo teórico desenvolvido o levantamento experimental de curvas previstas teoricamente por este.
- 5) Com o maior número de testes e medições teóricas e experimentais sendo realizado, o modelo desenvolvido tem como perspectiva a médio/longo prazo ser estendido para o estudo de outras enzimas, ligadas a doenças autoimunes e neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. O. de 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**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 15-19, November 2009. Disponível em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/7546/7546>>.

Acesso em: 10 janeiro 2013.

AHONSI, M. O. et al. Effects of ALS-inhibitor herbicides, crop sequence, and fertilization on natural soil suppressiveness to *Striga hermonthica*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Ibadan, v. 104, n. 3, p. 453-463, December 2004.

ALDER, B. **Methods in Computational Physics**. [S.I.]: Academic Press, 1977.

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 of the United States of America**, Chesterfield, v. 98, n. 6, p. 2944-2946, March 2001.

ALSTEENS, D. et al. Nanoscale imaging of microbial pathogens using atomic force microscopy. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**, Louvain-la-Neuve, v. 1, n. 2, p. 168-180, April 2009.

ARAKI, K.; TOMA, H. E. Chemistry of supramolecular systems containing porphyrins and metal complexes. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6A, p. 962-975, November 2002.

ASKELAND, D. R.; PHULÉ, P. P. **Ciência e Engenharia dos Materiais**. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

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**, Sapporo, v. 256, n. 4, p. 987-990, November 2009.

BARDUCCI, A.; BONOMI, M.; PARRINELLO, M. Metadynamics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, Lugano, v. 1, n. 5, p. 826-843, 2011.

BECKERS, A. et al. Chemical Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Induces Growth Arrest and Cytotoxicity Selectively in Cancer Cells. **Cancer Research**, Leuven, v. 67, n. 17, p. 8180-8187, September 2007.

BEEEMAN, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. **Journal of Computational Physics**, California, v. 20, n. 2, p. 130-139, February 1976.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, Groningen, v. 91, n. 24, p. 6269-6271, November 1987.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, Piscataway, v. 28, n. 1, p. 235-242, January 2000.

BINNIG, G. K. Atomic-Force Microscopy. **Physica Scripta**, Munich, v. 1987, n. T19A, p. 53, January 1987.

BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. The application of atomic force spectroscopy to the study of biological complexes undergoing a biorecognition process. **Chemical Society Reviews**, Viterbo, v. 39, n. 2, p. 734-749, January 2010.

BOWEN, W. R.; HILAL, N. **Atomic Force Microscopy in Process Engineering: Introduction to AFM for improved processes and products**. Burlington: Butterworth-Heinemann, 2009.

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**, Houston, v. 280, n. 1-3, p. 45-57, June 2006.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, San Francisco, v. 32, p. 335-373, 2003.

BROOKS, C. L.; KARPLUS, M.; PETTITT, B. M. **Advances in Chemical Physics, Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1990.

BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E. **Química: a Ciência Central**. 9. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BUSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. **Canonical sampling through velocity-rescaling**. March 2008. Disponível em: < <http://arxiv.org/abs/0803.4060>>. Acesso em: 01 maio 2013.

BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**, Berlin, v. 59, n. 1-6, p. 1-152, October 2005.

CAI, X.; LIU, W.; CHEN, S. Environmental effects of inclusion complexation between methylated beta-cyclodextrin and diclofop-methyl. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S.l.], v. 53, n. 17, p. 6744-6749, August 2005.

CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. **Surface Science Reports**, Lausanne, v. 34, n. 1-3, p. 1-104, 1999.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. DE; CASS, Q. B. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 175-187, January 2009.

CHENG, H. et al. Molecular characterization and tissue-specific expression of the acetyl-CoA carboxylase α gene from Grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. **Gene**, Lianyungang, v. 487, n. 1, p. 46-51, November 2011.

CHRISTOFFOLETI, P. J. et al. Alternative herbicides to manage Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) resistant to glyphosate at different phenological stages. **J. Environ. Sci. Health**, Piracicaba, v. B40, p. 59-67, 2005.

CORNELL, W. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **J. Am. Chem. Soc.**, San Francisco, v. 117, n. 3, p. 5179-5197, January 1995.

CUI, Y. et al. Biomimetic Peptide Nanosensors. **Accounts of Chemical Research**, New Jersey, v. 45, n. 5, p. 696-704, May 2012.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, Uppsala, v. 26, n. 16, p. 1701-18, 2006.

DAVIS, M. E.; MCCAMMON, J. A. Electrostatics in biomolecular structure and dynamics. **Chemical Reviews**, Houston, v. 90, n. 3, p. 509-521, May 1990.

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**, Houston, v. 275, n. 37, p. 28593-28598, September 2000.

DEVREESE, J. T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. **MRS Bulletin**, Antwerpen, v. 32, n. 09, p. 718-725, 2007.

DORDI, B. et al. Probing chemical reactions on the nanometer scale: Inverted chemical force microscopy of reactive self-assembled monolayers. **Surface Science**, Enschede, v. 570, n. 1-2, p. 57-66, October 2004.

DUPRADEAU, F.-Y. et al. The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, [S.I.], v. 12, n. 28, p. 7821-7839, July 2010.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, Chapel Hill, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, November 1995.

ETCHEGARAY, A.; BUENO, C. DE C.; TESCHKE, O. Identification of microcystin LR at the molecular level using atomic force microscopy. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1843-1848, January 2010.

FERRAZ, R. M. et al. High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor. **Molecular Immunology**, Barcelona, v. 43, n. 13, p. 2119-2123, May 2006.

FRANCA, E. F. et al. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Uberlândia, v. 13, n. 19, p. 8894-8899, April 2011.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation**: from algorithms to applications. 2nd. ed. Florida: Academic Press, 2001. v. 1

GARCÍA, R.; PÉREZ, R. Dynamic atomic force microscopy methods. **Surface Science Reports**, Madrid, v. 47, n. 6-8, p. 197-301, September 2002.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, Garching, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GROVER, R. et al. Magnitude and persistence of herbicide residues in farm dugouts and ponds in the Canadian prairies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Saskatchewan, v. 16, n. 4, p. 638-643, 1997.

GRUPO de NanoNeuroBioFísica. Disponível em:
<<http://www.nanoneurobiophysics.net/>>. Acesso em: 4 maio 2013.

GU, X. et al. Enantioselective degradation of diclofop-methyl in cole (*Brassica chinensis* L.). **Food Chemistry**, Beijing, v. 121, n. 1, p. 264-267, July 2010.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, Geneva, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, December 1997.

GUIZADO, T. R. C. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana**. 138 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

HERRAEZ, A. Biomolecules in the Computer: Jmol to the Rescue. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Alcalá de Henares, v. 34, n. 4, p. 255-261, July 2006.

HESS, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Mainz, v. 4, n. 1, p. 116-122, January 2008.

HOLST, M.; BAKER, N.; WANG, F. Adaptive multilevel finite element solution of the Poisson-Boltzmann equation I. Algorithms and examples. **Journal of Computational Chemistry**, California, v. 21, n. 15, p. 1319-1342, 2000.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, Urbana, v. 14, n. 1, p. 33-38, February 1996.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, Indiana, v. 79, n. 2, p. 926-935, July 1983.

JOYARD, J. et al. Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, Grenoble, v. 49, n. 2, p. 128-158, April 2010.

KALÉ, L. V. et al. NAMD: A Case Study in Multilingual Parallel Programming. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON LANGUAGES AND COMPILERS FOR PARALLEL COMPUTING, 10., 1997, **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 1997. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.47.6852>>. Acesso em: 10 janeiro 2013.

KAMINSKI, G. A. et al. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides†. **The Journal of Physical Chemistry B**, New York, v. 105, n. 28, p. 6474-6487, July 2001.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews. Drug discovery**, New York, v. 3, n. 11, p. 935-949, November 2004.

KOGAN, M. et al. Using penoxsulam ALS inhibitor as a broad-spectrum herbicide in Chilean rice. **Ciencia e Investigación Agraria**, Viña del Mar, v. 38, p. 83-93, 2011.

LEITE, F. L. et al. The Atomic Force Spectroscopy as a Tool to Investigate Surface Forces: Basic Principles and Applications. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. (Ed.). **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**. [S.l.]: FORMATEX, 2007. p. 747-757.

LEITE, F. L. et al. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, Sorocaba, v. 13, n. 12, p. 12773-12856, October, 2012.

LU, Y. et al. Stereoselective behaviour of diclofop-methyl and diclofop during cabbage pickling. **Food Chemistry**, Beijing, v. 129, n. 4, p. 1690-1694, December 2011.

MAHONEY, M. W.; JORGENSEN, W. L. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. **The Journal of Chemical Physics**, New Haven, v. 112, n. 20, p. 8910-8922, May 2000.

MARTYNA, G.; TOBIAS, D.; KLEIN, M. Constant-Pressure Molecular-Dynamics Algorithms. **Journal of Chemical Physics**, Bloomington, v. 101, p. 4177-4189, October 1994.

MCCOURT, J. A.; DUGGLEBY, R. G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. **Amino acids**, Brisbane, v. 31, n. 2, p. 173-210, September 2006.

MEDARDE AGUSTÍN, A. et al. Value of the detection of Australia antigen in blood donors. **Revista de sanidad e higiene pública**, v. 47, n. 6, p. 529-536, June 1973.

MICA. In: **Infopédia**: enciclopédias e dicionários Porto Editora. Disponível em: <[http://www.infopedia.pt/\\$mica](http://www.infopedia.pt/$mica)>. Acesso em: 1 mar. 2013.

MODESTO OROZCO, L. O. Coarse-grained representation of protein flexibility. Foundations, successes, and shortcomings. **Advances in protein chemistry and structural biology**, Barcelona, v. 85, p. 183-215, 2011.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

MORRIS, G. M. et al. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. **Journal of computer-aided molecular design**, La Jolla, v. 10, n. 4, p. 293-304, August 1996.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, La Jolla, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of computational chemistry**, La Jolla, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, December 2009.

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**, Graz, v. 1831, n. 2, p. 314-326, February 2013.

NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, Bonn, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2011.

NIELSEN, J. E. et al. Improving macromolecular electrostatics calculations. **Protein Engineering**, Heidelberg, v. 12, n. 8, p. 657-662, August 1999.

PROVENZA, F. **PRO-TEC-Desenhista de Máquinas**. 46. ed. São Paulo: F. Provenza, 1991.

RCSB Protein Data Bank: RCSB PDB. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 2 maio 2013.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, O. R.; CABEZAS, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madri: CEIM, 2005.

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-

alkanes. **Journal of Computational Physics**, Orsay, v. 23, n. 3, p. 327-341, March 1977.

SAMMONS, R. D. et al. Reevaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase: identification of an EPSP synthase.glyphosate ternary complex. **Biochemistry**, St. Louis, v. 34, n. 19, p. 6433-6440, May 1995.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, Seropédica, v. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOLIN, M. A. **Nanolitografia do silício utilizando o Microscópio de Força Atômica**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

SANTOS, H. F. dos. Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, Juiz de Fora, p. 01-05, Maio. 2001.

SASAKI, Y.; NAGANO, Y. Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure, Biosynthesis, Regulation, and Gene Manipulation for Plant Breeding. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Nagoya, v. 68, n. 6, p. 1175-1184, 2004.

SILVA, A. DA et al. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Metsulfuron-Methyl Detection. **Sensors**, Sorocaba, v. 13, n. 2, p. 1477-1489, January 2013.

SILVA, S. G. O. **Previsão da estrutura secundária de Proteínas Utilizando Redes Neurais**. 1999. 69 f. Dissertação (Mestrado em Informática) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 1999.

SISQUELLA, X. et al. A single-molecule force spectroscopy nanosensor for the identification of new antibiotics and antimalarials. **The FASEB Journal**, Barcelona, v. 24, n. 11, p. 4203-4217, November 2010.

SMITH, A. E. et al. Fate of Diclofop-methyl After Application to a Wheat Field. **Journal of Environmental Quality**, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 234-238, 1986.

SMITH, D. P. E. Limits of force microscopy. **Review of Scientific Instruments**, Munich, v. 66, n. 5, p. 3191-3195, May 1995.

SMITH, D. A. et al. Chemical force microscopy: applications in surface characterisation of natural hydroxyapatite. **Analytica Chimica Acta**, Leeds, v. 479, n. 1, p. 39-57, 2003.

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**, Changchun, v. 18, n. 8, p. 3783-3792, August 2012.

TRUONG, C. T.; MICHAEL, T. S.; MARK, T. M. Real-Time Observation of Plasma Protein Film Formation on Well-Defined Surfaces with Scanning Force Microscopy. **Langmuir**, California, v. 14, p. 2435-2443, 1998.

TRZESNIAK, D.; LINS, R. D.; GUNSTEREN, W. F. VAN. Protein under pressure: Molecular dynamics simulation of the arc repressor. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, Zürich, v. 65, n. 1, p. 136-144, 2006.

VALIEV, M. et al. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. **Computer Physics Communications**, Richland, v. 181, n. 9, p. 1477-1489, September 2010.

VANNUCCHI, G. et al. Rituximab treatment in patients with active Graves' orbitopathy: effects on proinflammatory and humoral immune reactions. **Clinical & Experimental Immunology**, Milan, v. 161, n. 3, p. 436-443, 2010.

VERLET, L. **Computer "experiments" on Lennard-jones Molecules. I. Thermodynamical Properties.** [S.l.]: Defense Technical Information Center, 1966.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular.** 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008.

WALSH, D. T. et al. Camelina mutants resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Molecular Breeding**, Pullman, v. 30, n. 2, p. 1053-1063, 1 August 2012.

WANG, H. et al. Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin. **Biophysical Journal**, Tempe, v. 83, n. 6, p. 3619-3625, December 2002.

YOKOYAMA, T. et al. Novel mechanisms of pH sensitivity in tuna hemoglobin: a structural explanation of the root effect. **The Journal of biological chemistry**, Yokohama, v. 279, n. 27, p. 28632-28640, July 2004.

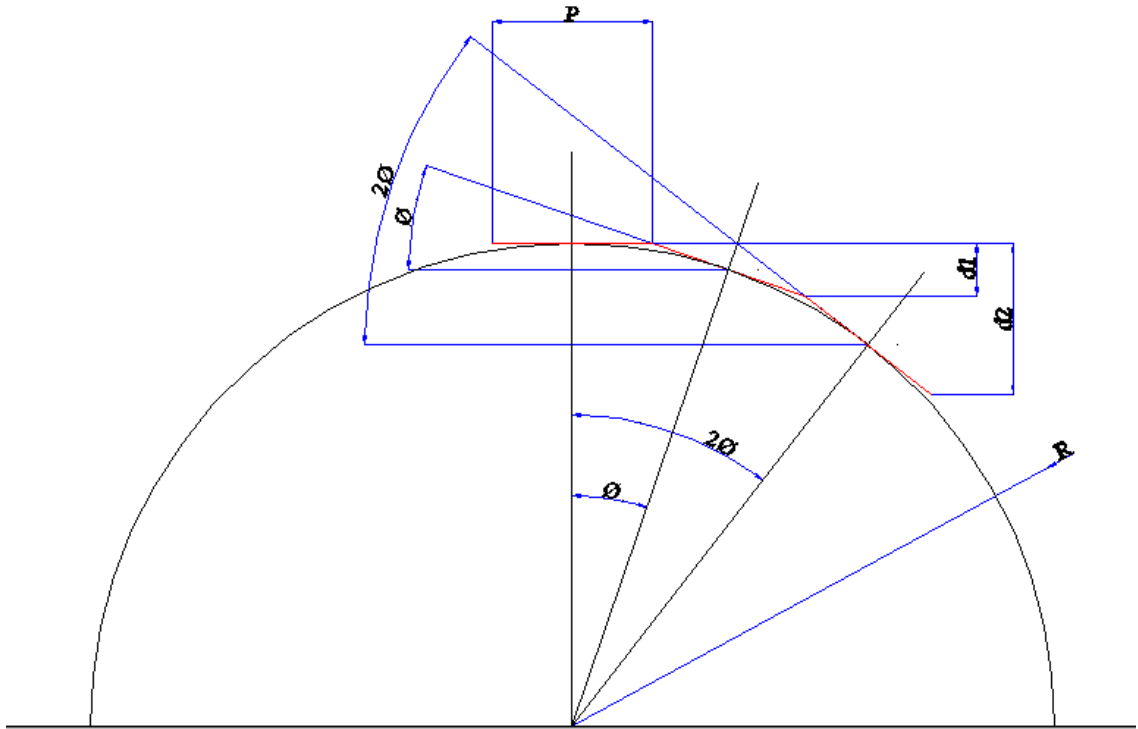
YU, Q. et al. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. **Planta**, Crawley, v. 230, n. 4, p. 713-723, September 2009.

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**, Beijing, v. 327-329, p. 778-780, August 1998.

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 of the United States of America**, New York, v. 101, n. 16, p. 5910-5915, April 2004.

APÊNDICE A

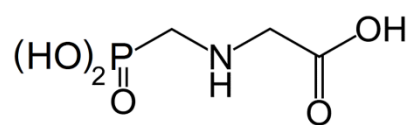
Esquemático da superfície da circunferência representando a ponta do AFM.



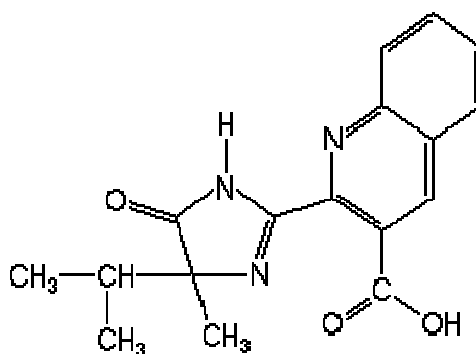
APÊNDICE B

Estrutura química dos herbicidas:

Glifosato



Imazaquin



ANEXOS

ANEXO A

Molecular Modeling of Enzyme Attachment on a Functionalized Atomic Force Microscope (AFM) Probe

Guedmiller S. Oliveira,^{*} Fabio L. Leite,[†] Adriano M. Amarante,[†] Eduardo de F. Franca,[¶] Richard A. Cunha,[¶] James M. Briggs,[‡] and Luiz C. G. Freitas^{*}

^{*}Chemistry Department, Federal University of São Carlos, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil, *E-mail: guedmiller@yahoo.com.br*; *Tel: +55 16 3351 8063*; [†] Multidisciplinary Laboratory of Nanoneurobiophysics, Nanoneurobiophysics Research Group, Department of Physics, Chemistry and Mathematics, Federal University of São Carlos, Sorocaba-SP, 18052-780, Brazil. *E-mail: fabioleite@ufscar.br*; *Tel: +55 15 3229 6014*; [¶]Chemistry Institute, Federal University of Uberlândia, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil.; [‡]Department of Biology and Biochemistry, University of Houston, Houston, 77204-5001, USA.

ABSTRACT

An atomistic model was proposed to model the attachment of the ACC enzyme on a functionalized Atomic Force Microscopy tip (AFM tip) surface. The force field parameters needed were obtained by combining available OPLSAA data with others obtained from quantum chemistry calculations. Starting from electrostatic considerations about the enzyme structure described by Franca et al(1), three suitable geometrical orientations for enzymatic adsorption were proposed. The geometrical orientation with the most favorable enzyme-surface interactions but still keeping the active sites of ACC enzyme available for interactions with molecules from the bulk was chosen. Following suitable protocols, a molecular dynamics simulation in aqueous solution was performed and a 50 ns trajectory was obtained. The analysis of hydrogen bonds shows the importance of arginine and lysine side groups in the enzyme attachment process. The analysis surface contact area and energy of interaction as well as dihedrals angles mobility using Ramachadran plotting shows the energetic and structural stability of ACC over the AFM tips. Therefore, the model obtained is suitable to study enzyme substrate interaction under AFM detection conditions. With minor changes the model can be straightforwardly used to study enzyme immobilization on silica for chromatography applications.

Received for publication "Staff will complete" and in final form "Staff will complete"

Address reprint requests and inquiries to

1. Introduction

The design of functionalized Atomic Force Microscope tips (AFM tips) to build biosensors with high definition and accuracy requires the quantification of the interaction energetics between organic and inorganic compounds, such as, protein-surface and protein-ligand complexes. The complexity of the adsorption process of enzymes onto inorganic surfaces can be better understood by a combination of theoretical and experimental studies and the achievements useful to build biosensors capable to detect inhibitors (e.g. herbicides) by using enzymes as a probe.

In a previous paper of our research group(2) we have been developing prototypes of nanobiosensors to detect herbicides used in agriculture. In addition, our obtained results from combination of theoretical and experimental data to investigate the interaction of two pesticides (diclofop and atrazine) with the active site of acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) were in a good agreement.(1, 3, 4) In the present paper, the earlier studies are reassumed and the aim is the development of a computational protocol to investigate how to immobilize enzymes as to build AFM tips biosensor. These investigations are part of a general research project aimed to discover new natural products which are capable to occupy the active site of important enzymes of plants and animals to be efficiently used in insect plague control.(5)

Atomic force microscopy (AFM) experiments have been successfully employed to measure intra-molecular unfolding forces of individual proteins(5,6) and intermolecular forces between various ligands and receptor pairs.(7–13) Compared with other biophysical approaches for direct measurements of intermolecular forces such as optical tweezers, magnetic torsion devices, and bio-membrane force probes (BFP), AFM has the unique advantage of possessing the high spatial resolution needed to detect molecular interaction. Additionally, recent progress in AFM studies has made it possible to directly quantify the range and magnitude of the interactions forces between proteins and other molecules.(14) Nevertheless, the AFM technique is very useful for quantifying single molecule interaction, but it does not reveal the molecular mechanisms behind the binding of ligands and nor conformational changes in biomolecules in atomic time scale.(1) The goal of quantifying intermolecular forces, binding energies as well as complex stabilization of protein–protein, protein–ligand and protein-surface systems can be obtained by combining AFM results with theoretical studies. Generally, the specificity of an AFM tip is obtained by using enzymes as molecular probe. Therefore, the combination of computational methods such quantum

mechanics and molecular dynamics calculations with experimental analysis it will be possible to make optimal estimative of immobilization of enzymes to propose AFM tips with enhanced sensibility to more specific targets. In this paper we report the use of computer simulation methodologies including (Molecular Dynamics (MD) and Quantum Mechanics (QM) to investigate proper conditions to immobilize an enzyme as to build functionalized AFM tips. The target enzyme used in this investigation was the acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) which has crucial roles in fatty acid metabolism of humans and most other living organisms. ACC is also an attractive target for drug discovery against a variety of human diseases, including diabetes, obesity, cancer, and microbial infections. In addition, ACC from plants is the preferential target of herbicides that have been used in commercially for more than 20 years commercial herbicides such as haloxyfop, diclofop (FOPs) and sethoxydim (DIMs) which are able to occupy the carboxytransferase (CT) domain of ACC and hamper its enzymatic function.(15)

AFM tips are made of silicon (Si) or silicon nitride (Si_3N_4) and this surface must be modified in order to bind the enzymatic sensor. Among the existing methodologies to chemical modification on the surface of AFM tips, two have been used mostly in the last few years. The first uses tips covered with gold(16) and thiol entities which are properly bonded to biomolecules. The second employs silicon or silicon nitride oxidized surface due to its exposure to air or water. This oxidized layer contains a large amount of reactive Si-OH groups which are capable of reacting strongly with silanes, alcohols and also polymers such as polyethyleneglycol (PEG).(17, 18) In the present study, a spacer agent obtained by combining 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde(19, 20) was used to cover the AFM tip surface. For biosensor purposes, the glutaraldehyde reacts with APTES establishing a bridge attachment of biomolecules. The glutaraldehyde is a common cross-linking agent due to its reaction with residues such as lysine to form stable adducts.(20, 21) The forces between tips and the associated enzyme must be greater than those between inhibitors and proteins; otherwise, the enzyme might be pulled off from the AFM tip. This linker provides stable adsorption conditions for the biomolecule but its flexibility and receptor-ligand interactions capabilities are preserved. In Figure 1 we present a schematic picture of the system under study: i) a silicon nitride surface covered by a spacer agent layer forming a functionalized AFM surface; ii) an enzyme adsorbed into the spacer agent surface. The geometric dimensions of the system were chosen as to provide the necessary simulations conditions to be discussed bellow.

2. Methodology

In this work molecular dynamics methodology was used to describe enzyme-surface interaction. Therefore, the atomistic model and the force field (FF) parameters of the system to be studied must be defined. In the next sections the atomistic model and the procedures used to determine the FF parameter are presented.

2.1 System Definition

According to the experimental data reported by Etchegaray et al(19) and Bhushan et al(20), AFM tip probes were modified using APTES as a linker. When AFM tips are exposure to environment conditions an oxidation occurs naturally; as a result, the AFM surface is hydroxylated forming -SiOH groups at the top of the surface, allowing the interaction with APTES molecules as depicted in Figure 1-a. Further, this surface is treated with glutaraldehyde forming a APTES-glutaraldehyde (Figure 1 and 1-b) complex which is capable of reacting with enzyme amino acids groups such as lysine and arginine. In order to reduce the number of atoms in the $\{\text{Si}_3\text{N}_4\}$ solid only the surfacial silicon atoms directly attached to an -OSi- group are considered and constrained to a fix position. Therefore, an atomistic model, similar to the proposed by Patrick, et al(22), of a $\{\text{Si}_3\text{N}_4\}$ surface covered with complex APTES-glutaraldehyde ligands was proposed. This model is called Surface-Spacer Agent, (SSA) and is presented in Figure 2-b. The interaction of this surface model with biomolecules can be straightforwardly obtained using FF allowing a computational insight in the physical-chemical process occurring on AFM tips. In the next section the FF parameterization of this atomistic model is discussed.

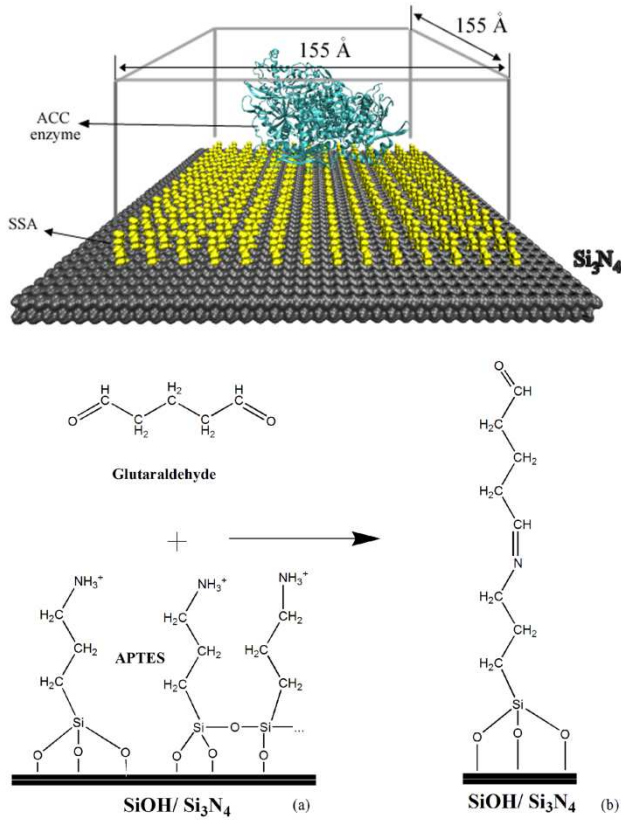


Fig. 1 A model structure of AFM tip surface covered by the spacer agent distributed along the Si₃N₄ surface. The above represented system was rendered using VMD with surf representation for APG and Si₃N₄ and new cartoon-secondary structure for the enzyme. Dimensions of the cross-linker surface are 155 Å x 155 Å. The related reaction to SSA formation is represented as the following (a) APTES bounded to the SiOH surface according to Bhusan et al^[20]. (b) Final molecular structure of the SSA.

2.1 Surface-Spacer Agent (SSA) Parameterization

To perform molecular dynamics simulations using a classical FF approach, the total energy is divided into two terms, the E^{intra} and the E^{inter} . The E^{intra} interaction energy is defined as:

$$E^{intra} = E^{stretch} + E^{bend} + E^{Rtors} + E^{Ftors} + E^{nb} \quad (1)$$

The first three terms have a harmonic expression

$$\begin{aligned}
 E^{stretch} &= \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{N_s} k_{\mu}^s (r_{\mu} - r_{\mu}^0)^2 \\
 E^{bend} &= \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{N_b} k_{\mu}^b (\theta_{\mu} - \theta_{\mu}^0)^2 \\
 E^{Rtors} &= \frac{1}{2} \sum_{\mu}^{N_{Rt}} k_{\mu}^t (\phi_{\mu} - \phi_{\mu}^0)^2
 \end{aligned} \quad (2)$$

where k_{μ}^s , k_{μ}^b , k_{μ}^t and r_{μ}^0 , θ_{μ}^0 , ϕ_{μ}^0 are the force constants and equilibrium values for bond stretching, angle bending and rigid torsional dihedral angle, respectively. The E^{Ftors} is the potential term contribution from a flexible proper dihedral angle Ψ and can be represented using a five terms Ryckaert-Bellemans (RB) function(23)

$$E^{Tors} = \sum_{n=0}^5 C_n (\cos(\Psi))^n \quad (3)$$

And the C_n terms are generally obtained fitting an appropriated energy curve. For the system under study most of the potential parameters defined above are available in the OPLS-AA FF. The parameters not available were obtained using geometries and energy results calculated with the ORCA program at the HF/6-31g* level and are presented in Table 1 and 2.

In Equation 1 E^{nb} represents the non-bonded interactions defined as a sum of standard 12-6 Lennard-Jones potential (E^{LJ}) and a charge–charge interaction (E^{Coul}). Using appropriated FF parameters the contribution of intermolecular interactions, E^{inter} , to the total energy is also defined as a sum of E^{nb} energy terms.

All the Lennard-Jones parameters were taken from the OPLSAA force-field. The charges needed to calculate the coulombic interactions were obtained using the RESP method(24) implemented in the NWChem program(25). Results obtained at the HF/6-31g* level are presented in Table 4. The same procedure used for creation of the potential energy curves, according to Kirschner et al^[25], constrained optimizations were performed by specifying an internal coordinate to be frozen while all other degrees of freedom were allowed to relax fully.

2.3 Molecular Dynamics Simulations

To obtain the initial conditions to perform molecular dynamics simulation a squared SSA model with dimensions 155 Å x 155 Å and containing 6,076 atoms was proposed and the ACC enzyme structure model defined by Franca et al(1) was used. This enzyme has 1655 residues (23185 atoms) and was initially placed 5 Å above the SSA. The SSA-ACC enzyme set was immersed in a box containing 143198 tip3p water molecules(26) and 30 Na⁺ cations were added. The final system obtained is summarized in Table 4.

The molecular dynamics simulations were performed using NAMD 2.7 program(27) with the following protocol: *i*) After volume adjustment at 1.0 atm by a Langevin piston(28) the calculations were performed in the NVT ensemble at 310K and 1.0 atm during 1 ns, and temperature was controlled using a Langevin thermostat; *ii*) a cut-off 16.0 Å was used for electrostatics and van der Waals interactions and long-range contributions to the energy were included using particle mesh Ewald (PME) method(29); *iii*) After (*i*) a NPT equilibration step with 20 ns was run; *iv*) Averages values were obtained in NVT ensemble using a new 30 ns simulation trajectory. The results were analyzed using VMD(30) and XMGRACE(31) programs.

The quantum chemical calculations were performed in Theoretical Chemistry Laboratory at Federal University of São Carlos and the molecular dynamics calculations were carried out using the Texas Learning&Computation Center (TLC2) super computer cluster facilities at the University of Houston.

3. Results

Some of the force field parameters needed to run molecular dynamics were calculated as follows:

3.1 SSA Force Field Parameters

The molecular dynamics calculations were performed using the OPLS-AA parameters. Some SSA model parameters such as bond distances, bond angles, dihedrals and the corresponding force constants needed in Equation 2 were calculated and are presented in Tables 1 and 2. As discussed before these calculations were performed using the ORCA quantum chemistry software at the HF/6-31g*level. The standard deviation between calculated energy curves and the ones obtained using the parameters bellow is 0.05 kcal.mol⁻¹.

Table 1 Bond Distances and bond angles ($r_{\mu}^0 \text{Å}$, θ_{μ}^0) and force constants (k_{μ}^r , k_{μ}^{θ}) for the SSA Model reported in the Fig. 2.

Bond(r)	$k_{\mu}^r \text{kcal. mol}^{-1} \text{Å}^2$	$r_{\mu}^0 \text{Å}$
C8-SI	306.432	1.5080
SI-O	363.214	1.4180
Angle (θ)	$k_{\mu}^{\theta} \text{kcal. mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$	$\theta_{\mu}^0 / ^{\circ}$
C8-SI-O	418.400	108.000
C7-C8-SI	488.273	112.700
SI-C8-H8	313.800	110.700

Table 2 Dihedral angles ϕ_{μ}^0 and force constants k_{μ}^{ϵ} for the SSA Model* reported in the Fig.

2.

Dihedral (ϕ)	k_{μ}^{ϵ} kcal. mol ⁻¹	N	ϕ_{μ}^0
O1-SI-O2-H	0.7440	1	0.0000
	-1.700	2	180.00
	-0.1600	3	0.0000
C7-C8-SI-O	-0.344	1	0.0000
	0.878	2	180.00
	0.238	3	0.0000
H8-C8-SI-O	-0.327	1	0.0000
	0.536	2	180.00
	0.140	3	0.0000
C8-SI-O-H	0.135	1	180.00
	0.118	2	0.0000
C6-C7-C8-SI	0.051	1	0.0000
	0.341	2	180.00
	0.166	3	0.0000
C3-C4-C5-N	0.200	2	180.00
	0.150	3	0.0000
H7-C7-C6-N	0.200	2	180.00
	0.150	3	0.0000
C5-N-C6-H6	0.102	1	0.0000
	-0.168	2	180.00
	-0.176	3	0.0000
H5-C5-N-C6	0.344	1	0.0000
	8.076	2	180.00
	0.447	3	0.0000

* Note that the equilibrium values of dihedral angle formed by Si atoms are 180° independent their surface positions.

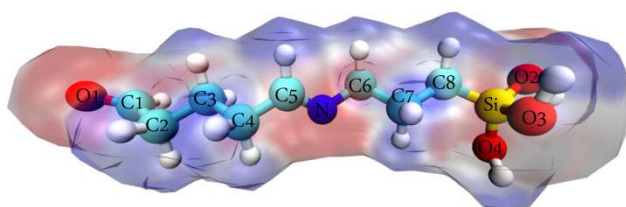


Fig. 2 Numbered atoms of the SSA for molecular geometry scanning and electrostatic potential of the SSA. In this representation the interaction with the surface was replaced by hydrogen atoms bounded to the -SiO group. Atoms are colored as follows: oxygen: red, silicon: yellow, carbon: blue, nitrogen: dark blue, hydrogen: white.

Table 3 Number of particles (N) of each system component.

Component	N
SSA Model	106,076
Enzyme	23,150
Tip3p Water	143,198
Na ⁺ contra-ions	30
Total	272454

3.2 Enzyme orientation and simulation on the surface

To a further understanding of the ACC enzyme orientation on the SSA modeled surface a combination of experimental and theoretical analysis is needed. The final structure achieved by the enzyme in the adsorption process depends basically on its initial orientation thorough the SSA as well as on some environmental conditions. Experimentally, it is possible to increase the probability of final enzymatic structure by controlling environment conditions, such as temperature, pH and reaction time.(2, 3, 32) From electrostatic considerations the protonated $-NH_3$ groups of an enzyme interacts strongly with aldehyde $-COH$ groups. Therefore, the availability of the positively charged sites on enzyme surface can be used to control its interaction with the SSA through aldehyde groups.(19) In a previous study, upon solving the nonlinear Poisson–Boltzmann equation using a finite-difference procedure, Franca et al(1) reported the electrostatic charge distribution over ACC surface. Therefore, using this previous electrostatic potential mapping, some initial orientations of the enzyme upon the SSA can be chosen to set initial geometric conditions for molecular dynamics simulation. As already discussed by those authors the enzyme orientation should be chosen keeping the active site exposed to interact with substrates from the bulk.

In Figure 3, three favorable adsorption positions of ACC enzyme on SSA are presented. The optimal enzyme orientation requires a large surface contact area to ensure strong adsorption on the SSA but living the active site unblocked to allow interactions with the substrate. From VMD analysis the surface contact area are $A(P1) \cong 2623,47 \text{ \AA}^2$, $A(P2) \cong 5000,25 \text{ \AA}^2$ and $A(P3) \cong 9825,23 \text{ \AA}^2$, therefore increasing from P1 to P3 showing that P3 is expect to have an optimal adsorption energy. Nevertheless in the P3 conditions the ACC active sites are not exposed to the bulk and the interaction with a given substrate is blocked. As the surface contact area of P2 is greater than P1 its adsorption conditions are more

favorable and therefore this structure was chosen to proceed with molecular dynamics analysis.

Using position 2 the set up of initial coordinate was performed placing the ACC enzyme 5 Å above the SSA. The MD simulation was performed following the protocol presented above. In the equilibration process the ACC enzyme was enforced towards to the surface using facilities implemented on the NAMD configuration file(27). In this procedure, a constant acceleration of $0.001 \text{ \AA} \cdot \text{ps}^{-2}$ (0.13896 pN) was used until the first amino acid reached 5 Å of the surface. Then, a 20 ns NPT simulation was carried out to equilibrate the system. After this equilibration procedure a 30 ns of simulation trajectory was performed for further analysis. The energy behavior during the simulation process is shown on Figure 7. One observes that after 20 ns the total energy is almost constant in agreement with an NVT ensemble calculation.

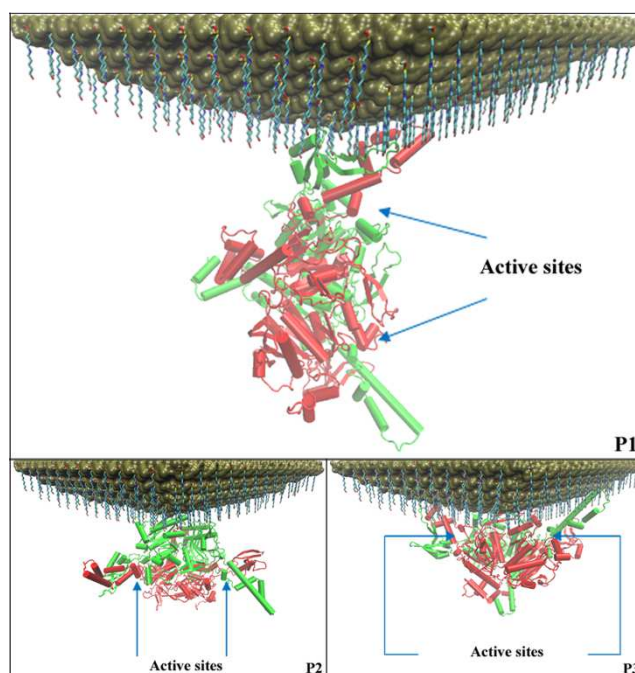


Fig. 3 Schematic representation of ACC Enzyme attachment on the SSA surface with different orientations. ACC enzyme is represented in Cartoon model using VMD program^[29]. The active sites are located between the red and green chains and indicates by the blues arrows.

Using the 30 ns last simulation trajectory some parameters were analyzed to obtain insight in the dynamical behavior of the system. Hydrogen bonding analysis between SSA and the ACC enzyme was obtained monitoring the interactions of ARG-NH₃⁺ and LYS-NH₃⁺ enzymatic groups with the SSA aldehyde O=C-H as function of time and the results obtained are shown in Figure 5. The hydrogen bonding populations were calculated using geometric rules

implemented in the VMD program(30) but using structural considerations proposed by Torshin et al(33).

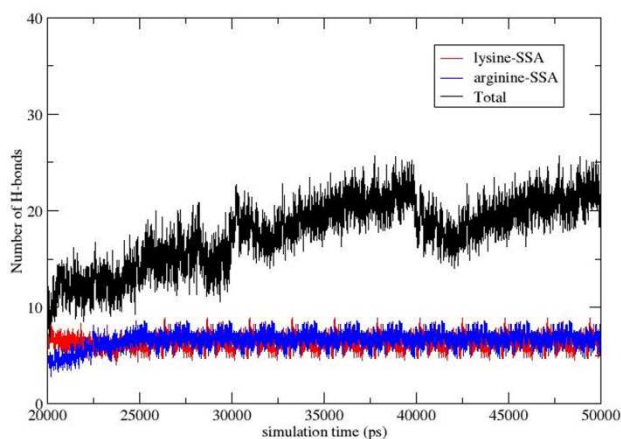


Fig. 4 Hydrogen bonds analysis on the last 30 ns simulation trajectory. An average of 18 h-bonds were scored, and the main side chains contributions are ~6.5 from arginine and ~7 from lysine.

In Figure 4 the h-bonds analysis shows an average of 18 h-bonds between ACC enzyme and SSA in the last 30 ns of trajectory and, as expected, the main contributions are from arginine and lysine side groups.

The ACC enzyme–SSA interaction as a function of time is further analyzed in Figure 5. One observes better adsorption conditions as a function of time in agreement with the increasing of the surface contact area. The evolution of enzyme-SSA interaction as a function of time is shown in Figure 5. An average energy/contact area of $-88.9546 \text{ kcal/mol/A}^2$ (region 1) and $-102.802 \text{ kcal/mol/A}^2$ (region 2) is obtained, to be compared with $-52.4201 \text{ kcal/mol/A}^2$ and $-89.2358 \text{ kcal/mol/A}^2$ respectively, in the beginning of the simulation. The increase of surface contact area is clear but the ACC enzyme active sites are still available to interact with molecules from the bulk.

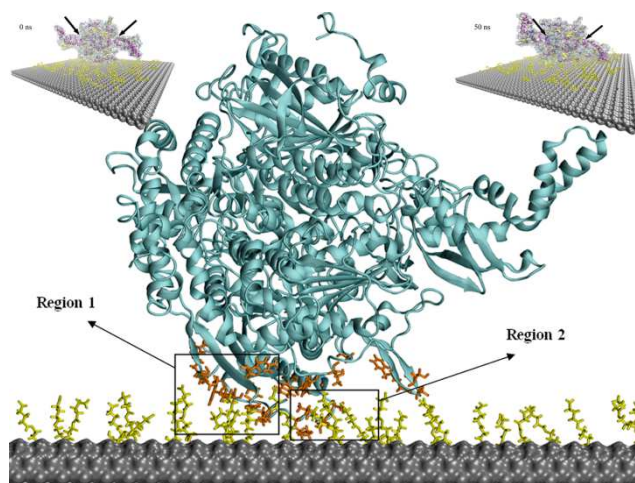


Fig. 5 Regions 1 and 2 of ACC enzyme shown in cartoon representation (VMD program) interacting with SSA surface. SiOH and cross-linker are represented in Surf and Licorice representations respectively. The structural mobility of the ACC enzyme after 50 ns of MD simulation. Water molecules were not presented in this representation. The black arrows indicate shown in the figures up left and up right indicate the active sites location.

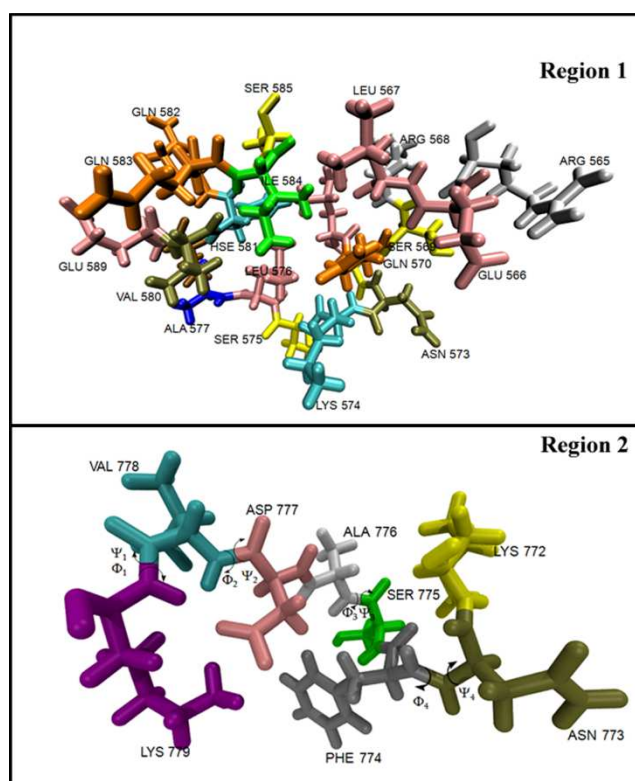


Fig. 6 Regions 1 and 2 monitored as a function of the dihedral angles ψ and Φ .

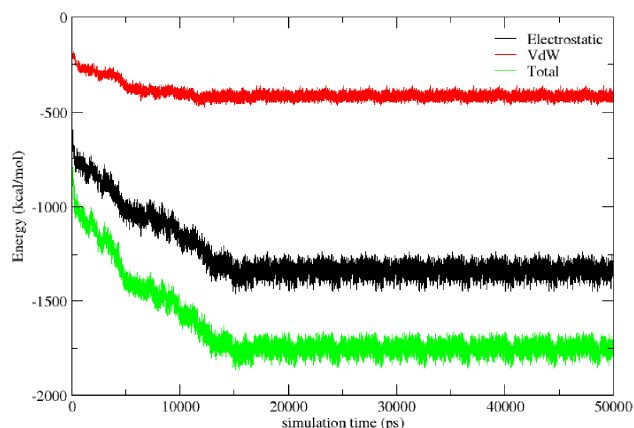


Fig. 7 Electrostatic, van der Waals and Total energies involved during 50ns of MD simulation between enzyme and surface. After 15 ns the system energies stabilized with average of Electrostatic energy = $-1306.46 \text{ kcal.mol}^{-1}$ van der Waals = $-417.682 \text{ kcal.mol}^{-1}$ and Total energy = $-1724.15 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

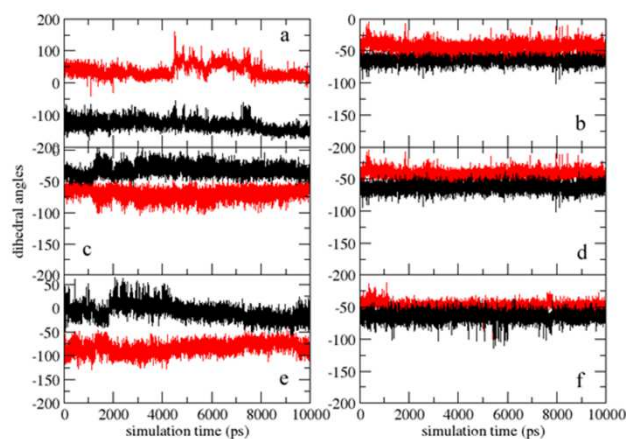


Fig. 8 ϕ (in red) and Ψ (in black) of the selected dihedral angles from the region 2. (*a, c* and *e* represents 10 ns of the trajectory after equilibration, and *b, d* and *f* the last 10 ns of the trajectory).

Another important issue to be monitored is the enzyme structure as a function of time to prevent enzyme denaturation. To perform this analysis some selected amino acids were divided into two regions according to their interactivity with the SSA (Figure 6). Region 1 is defined as the one with initial interaction with de SSA and Region 2 is the one achieving relevant interaction after 20 ns. Therefore, the internal flexibility of the regions 1 and 2 were monitored following the dihedral angles values ϕ and Ψ as a function of time. One should expect different structural behavior in these regions as a consequence of enzyme–SSA interaction. Nevertheless the dihedral angles distributions as a function of time are almost the same for both regions. Figure 8 represents time progression of the selected dihedral angles from the region 2 in the last 20 ns of the trajectory. In the first part (Figure 8 - *a, c* and *e*)

dihedral undergo some changes due the few h-bonds exhibited. In contrast, the last part, the number of h-bonds was increased (Figure 8 - *b*, *d* and *f*), as a consequence, almost stable values are observed. The initial and final enzyme structures are compared using the Ramachandran plotting presented in Figure 9. Results obtained from Ramachandran plotting shown no eligible differences between the ϕ and Ψ dihedral angles from the initial and final structure after 50 ns of MD trajectory. Therefore, the ACC enzyme was not denatured by the interaction with SSA. In the next studies, according to Gunsteren W.F. V. et al (34), using a large time step, the stability and unfolding of the ACC will be investigated.

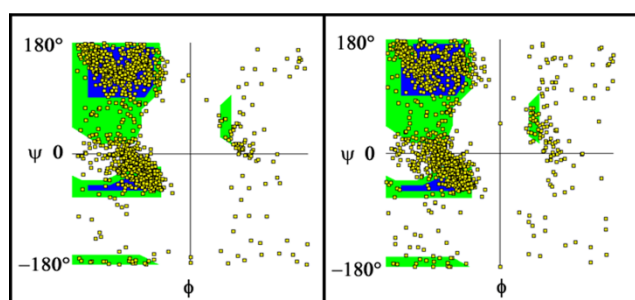


Fig. 9 Ramachandran plotting of the ACC enzyme after 50 ns. Most of the amino acids present in ACC molecular structure are not affected by the presence of the SSA surface.

4. Conclusions

This paper reports an atomistic model for the (Si_3N_4) surface of a AFM tip covered by a cross linker molecules suitable to attach enzyme for nanobiosensor purposes. The atomistic model was called SSA which stands for Surface-Space Agent. The OPLS-AA Force Field was used but some parameters needed in the atomistic model were calculate at HF/6-31g level. Molecular dynamic simulations were employed to simulate the functionalized AFM tip interacting with an previous ACC enzyme model Franca et al(1) in aqueous solution. According to electrostatic potential analysis three possible enzymatic orientation of ACC on the AFM tip we proposed. The final molecular dynamics calculations were performed using the attachment geometry with enhanced adsorption energy but still keeping the active sites of ACC free to interact with molecules from the bulk.

From electrostatic potential analysis the ACC enzyme-AFM tip interactions were assumed to be of major importance in two peptide regions. Hydrogen bonds were monitored as a function of time and an average of 18 h-bonds was found. Most of the h-bonds were formed between Arginine and Lysine sides groups and the aldehyde group of SSA. It was observed an enhancement of surface contact area between ACC enzyme-SSA but the actives sides availability to bulk molecules was preserved. The possibility of enzyme denaturation

due to interactions with SSA was investigated monitoring some dihedral angles from contact area. Ramachandran plotting showed that after 50 ns of MD simulation no significant enzyme structure modifications were detected.

The results obtained suggest that the atomistic model proposed in this paper is helpful to a further understanding of the enzyme-surface interactions process from an atomistic point of view. It is also worth to note that with minor modifications the SSA model can be straightforwardly used to study enzyme immobilization on silica for chromatography applications.(35, 36) Therefore, the interactions of a given substrate with an enzyme active site can studied considering all the important features needed for the atomistic modeling in different detection process, which is helpful in the development of new ligands screening methodologies.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq - National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - INCT, 573742/2008-1), FAPESP – São Paulo Research Foundation (FAPESP - INCT, 08/57859-5, 07/05089-9), and CAPES – Higher Education Improvement Coordination Agency. One of us (Oliveira, G. S.) also acknowledges CAPES for the award of a scholarship during his six months visit to University of Houston, TX, USA.

References

1. Franca, E.F., F.L. Leite, R.A. Cunha, O.N. Oliveira Jr., and L.C.G. Freitas. 2011. Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13:8894-8899.
2. Da Silva, A., D. Deda, A. da Róz, R. Prado, C. Carvalho, et al. 2013. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Metsulfuron-Methyl Detection. *Sensors.* 13: 1477–1489.
3. Steffens, C., F.L. Leite, C.C. Bueno, A. Manzoli, and P.S.D.P. Herrmann. 2012. Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors. *Sensors (Basel).* 12: 8278–8300.
4. Leite, F.L., C.C. Bueno, A.L. Da Róz, E.C. Ziemath, and O.N. Oliveira. 2012. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 12773–12856.
5. Fisher, T., A. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, P. Marszalek, and J. Fernandez. 1999. The study of protein mechanics with the atomic force microscope. *Trends Biochem.Sci.* 24: 379–384.

6. Desmeules, P., M. Grandbois, V.A. Bondarenko, A. Yamazaki, and C. Salesse. 2002. Measurement of membrane binding between recoverin, a calcium-myristoyl switch protein, and lipid bilayers by AFM-based force spectroscopy. *Biophys J.* 82: 3343–3350.
7. Chen, A., and V.T. Moy. 2000. Cross-linking of cell surface receptors enhances cooperativity of molecular adhesion. *Biophys J.* 78: 2814–2820.
8. Lee, I., and R.E. Marchant. 2001. Force measurements on the molecular interactions between ligand (RGD) and human platelet α IIb β 3 receptor system. *Surface Science.* 491: 433–443.
9. Li, H., W.A. Linke, A.F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, J.G. Kerkvliet, et al. 2002. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature.* 418: 998–1002.
10. Bartels, F.W., B. Baumgarth, D. Anselmetti, R. Ros, and A. Becker. 2003. Specific binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti*--a combined molecular biology and force spectroscopy investigation. *J. Struct. Biol.* 143: 145–152.
11. Meadows, P.Y., J.E. Bemis, and G.C. Walker. 2003. Single-Molecule Force Spectroscopy of Isolated and Aggregated Fibronectin Proteins on Negatively Charged Surfaces in Aqueous Liquids. *Langmuir.* 19: 9566–9572.
12. Kaur, J., K.V. Singh, A.H. Schmid, G.C. Varshney, C.R. Suri, et al. 2004. Atomic force spectroscopy-based study of antibody pesticide interactions for characterization of immunosensor surface. *Biosens Bioelectron.* 20: 284–293.
13. Kienberger, F., G. Kada, H. Mueller, and P. Hinterdorfer. 2005. Single molecule studies of antibody-antigen interaction strength versus intra-molecular antigen stability. *J. Mol. Biol.* 347: 597–606.
14. Lee, C.-K., Y.-M. Wang, L.-S. Huang, and S. Lin. 2007. Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction. *Micron.* 38: 446–461.
15. Tong, L., and H.J. Harwood Jr. 2006. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J. Cell. Biochem.* 99: 1476–1488.
16. Taninaka, A., O. Takeuchi, and H. Shigekawa. 2010. Reconsideration of Dynamic Force Spectroscopy Analysis of Streptavidin-Biotin Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2134–2151.
17. Johnson, W.T. 2008. Immobilizing Biological Molecules on AFM Probes for MRFM and TREC Studies, Agilent technologies, . .
18. Schroeder, T., T. Geisler, V. Walhorn, B. Schnatwinkel, D. Anselmetti, et al. 2010. Single-molecule force spectroscopy of supramolecular heterodimeric capsules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12: 10981–10987.
19. Etchegaray, A., C. de C. Bueno, and O. Teschke. 2010. Identification of Microcistin LR at the Molecular Level using Atomic Force Microscopy. *Quim. Nova.* 33: 1843–1848.
20. Bhushan, B., D.R. Tokachichu, M.T. Keener, and S.C. Lee. 2005. Morphology and adhesion of biomolecules on silicon based surfaces. *Acta Biomaterialia.* 1: 327–341.
21. Richards, F., and J. Knowles. 1968. Glutaraldehyde as a Protein Cross-Linking Reagent. *J. Mol. Biol.* 37: 231–&.
22. Patrick, D.L., J.F. Flanagan 4th, P. Kohl, and R.M. Lynden-Bell. 2003. Atomistic molecular dynamics simulations of chemical force microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 6762–6773.

23. Ryckaert, J., and A. Bellemans. 1975. Molecular-Dynamics of Liquid Normal-Butane Near Its Boiling-Point. *Chem. Phys. Lett.* 30: 123–125.
24. Dupradeau, F.-Y., A. Pigache, T. Zaffran, C. Savineau, R. Lelong, et al. 2010. The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12: 7821–7839.
25. Valiev, M., E.J. Bylaska, N. Govind, K. Kowalski, T.P. Straatsma, et al. 2010. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. *Comput. Phys. Commun.* 181: 1477–1489.
26. Wu, Y., H.L. Tepper, and G.A. Voth. 2006. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. *J. Chem. Phys.* 124: 24503–24512.
27. Kalé, L.V., M. Bhandarkar, M. Bh, R. Brunner, N. Krawetz, et al. 1997. NAMD: A Case Study in Multilingual Parallel Programming. In: *In Proc. 10th International Workshop on Languages and Compilers for Parallel Computing.* . pp. 367–381.
28. Martyna, G., D. Tobias, and M. Klein. 1994. Constant-Pressure Molecular-Dynamics Algorithms. *J. Chem. Phys.* 101: 4177–4189.
29. Essmann, U., L. Perera, M. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, et al. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103: 8577–8593.
30. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14: 33–38.
31. Grace: Developer's Corner.
32. Souza, A.L., L.A. Marques, M.N. Eberlin, P.A.P. Nascente, P.S.P. Herrmann Junior, et al. 2012. Self-assembled hybrid films of phosphotungstic acid and aminoalkoxysilanes on SiO₂/Si surfaces. *Thin Solid Films.* 520: 3574–3580.
33. Torshin, I.Y., I.T. Weber, and R.W. Harrison. 2002. Geometric criteria of hydrogen bonds in proteins and identification of 'bifurcated' hydrogen bonds. *Protein Eng.* 15: 359–363.
34. Van Gunsteren, W.F., P.H. Hünenberger, H. Kovacs, A.E. Mark, and C.A. Schiffer. 1995. Investigation of protein unfolding and stability by computer simulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 348: 49–59.
35. De Moraes, M.C., R.G. Ducati, A.J. Donato, L.A. Basso, D.S. Santos, et al. 2012. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: A new approach for ligands identification and characterization. *J. Chromatogr. A* 1232: 110–115.
36. Guido, R.V.C., C.L. Cardoso, M.C. de Moraes, A.D. Andricopulo, Q.B. Cass, et al. 2010. Structural insights into the molecular basis responsible for the effects of immobilization on the kinetic parameters of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and human. *J. Braz. Chem. Soc.* 21: 1845–1853.

ANEXO B

DETECTION OF DICLOFOP HERBICIDE USING AN ENZYMATIC NANOBIOSENSOR

Carolina de Castro Bueno^{a*}, Adriano Moraes Amarante^a, Guedmiller Souza de Oliveira^b, Daiana Kotra Deda^a, Omar Teschke^c, Eduardo Faria Franca^d, Fábio de Lima Leite^{a*}

^aMultidisciplinary Laboratory of Nanoneurobiophysics, Federal University of São Carlos, CP 3031, Sorocaba-SP, 18052-780, Brazil; E-mails: amarante_adriano2@hotmail.com (A.M.A.); daianakdn@gmail.com (D.K.D.);

^bDepartment of Chemistry, Federal University of São Carlos (UFSCar), 13565-905, São Carlos, SP, Brazil; Email: guedmuller@gmail.com

^cInstitute of Physics Gleb Wataghin, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6165, 13083-970 Campinas, SP, Brasil; E-mail: oteschke@ifi.unicamp.br

^d Department of Chemistry, Federal University of Uberlândia (UFU), 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil; Email: eduardoffranca@yahoo.com.br

* Corresponding authors: carolcastrob@gmail.com (CCB) and fabioleite@ufscar.br (F.L.L); Tel.: +55-15-32296014

Abstract

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. The sensor development was based on chemical functionalization of the surfaces of the AFM probes and 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.

Keywords: enzyme-based nanobiosensor, agrochemical detection, diclofop, Atomic Force Microscopy, molecular docking, molecular dynamics simulation

1. Introduction

Food production was greatly improved in the nineteenth century due to technological improvements in agricultural techniques such as the use of modern machinery, fertilizers, and agrochemical molecules (Jha et al. 2011; Mousavi and Rezaei 2011). Along with the usage of agrochemicals, also emerged the environmental contamination, as well as the poisoning problem to the human health caused by the usage of indiscriminate agrochemicals volumes on crops (Chien et al. 2012), such as carcinogen and (EPA 2000; Goldman 1998) genotoxic (Ünal et al. 2011).

Currently, the agrochemical detection relies almost entirely on mass spectroscopy (MS) (Gosciny et al. 2012; Maloschik et al. 2010), magnetic solid phase extraction (MSPE) (He et al. 2012), gas chromatography-electron capture (ECD) (Kumazawa et al. 1995; Senseman et al. 1997), via effects on bioluminescent answer on bacteria (Jia et al. 2012), and high performance liquid chromatography (HPLC) (Fenoll et al. 2012; Laganà et al. 2000). Applying these methods is quite difficult to achieve a higher detection limit (sensitivity range) and is frequently reported that the samples have a tendency to thermally degrade before the detection procedure.

Recently, Atomic Force Microscopy (AFM) based sensors and biosensors (called nanobiosensors) have been fairly promising and showing outstanding results to detect molecules at the micro/nanolevel (Etchegaray et al. 2010; Steffens et al. 2012) In the overall perspective of AFM based nanosensors, one of the resourceful tools that are fundamental to these systems is the called Atomic Force Spectroscopy (AFS) (Leite et al. 2012; Leite and Herrmann 2005). The AFS tool is centered on the force *versus* distance curves (force curves), which provides important data on the measurement of recognition events, whether they are specific or nonspecific bonds, which are fundamental to create and analyze nanobiosensors (da Silva et al. 2013; Wang et al. 2007; Willemsen et al. 2000). Equally essential and useful in these biosensing systems, is a tool called functionalization. By this technique, the chemical properties at the surface can be exchanged, allowing the creation of a standard design of molecules to immobilize the target analytes and sensing molecules (Deda et al. 2012; Hinterdorfer et al. 1998; Wielert-Badt et al. 2002).

On the basis of AFM nanosensors, the aim of this work was the development of an AFM-enzyme based nanosensor to detect agrochemical molecules, in special diclofop molecules. Diclofop is an herbicide that belongs to the aryloxyphenoxypropionates (APPs) class of herbicides. The mode of action of this chemical group is the inhibition of the homomeric plastidic ACCase (Acetyl-CoA carboxylase) enzyme (Ahmad-Hamdani et al. 2012; Cai et al. 2005). This enzyme is presented in just about all weed species and therefore, the diclofop herbicide is applied in post-emergence situations on crops. By inhibiting the action of the ACCase enzyme, the fatty acid biosynthesis is interrupted, resulting into plant death in grass species (Chandi et al. 2011; Cruz-Hipolito et al. 2012). This work presents the development of an enzyme-based nanobiosensor and the first report evidence of its application on nanolevel detection of diclofop by AFM probes sensors.

2. Methodology

2.1. Computational simulation

2.1.1 Molecular system

The ACCase enzyme molecular structure used for the early theoretical models was obtained from the Protein Data Bank, PDB ID: 1UYR. The missing residues were rebuilt according to Franca et al, 2011. The FF parameters to simulate diclofop and APTES-diclofop were previously adjusted using quantum mechanical calculations with ORCA 2.8.0 program (Neese 2012) at the HF/6-31g*level. The parameters were implemented in CHARMM(Brooks *et al.*, 1983) FF protocol.

2.1.2 Molecular docking

The molecular structure of the system (APTES-diclofop + ACCase) were used in the Autodock 4.0 program (Morris et al. 1998). On a rigid ACCase molecular structure, the ligands (diclofop and APTES-diclofop), were docked with partial charges calculated by Gasteiger–Huckel method (Brooks et al. 2007) implemented in the AutoDock Tools program. A pre-defined 3D grid was created in several regions along the enzyme in order to evaluate clustered positions with favorable binding energies to be used in molecular dynamic calculations. Furthermore, grid maps containing X -Y -Z points for the unit system were used to constrain them within the active sites and Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) was applied to survey the conformational space of the unit system and a set containing 10 LGA docked structure was obtained. The criteria used to obtain clusters of the docked structures were the same used in a previous study of our research group (Franca et al, 2011) : *i*) lowest E_{Total} values ; and *ii*) clusters within a root mean square deviation (RMSD) limit of 2.0 Å.

2.1.3 Molecular dynamics simulation

From the clustered docked positions, MD simulations were carried out to obtain interaction energies based on van der Walls and electrostatic energies. The calculated energies involving the herbicide diclofop bounded to the linker APTES and ACC enzyme.

The protocol used to obtain the energies related to this interaction can be summarized as follow: *i*) the system was minimized and equilibrated at 310 K and the pressure was adjusted to 1 atm by applying Langevin thermostat and Langevin piston (Martyna et al. 1994) respectively; *ii*) The simulation was carried out in the NVT ensemble (at constant number of particles (N), volume (V) and temperature (T)); *iii*) A 1.4 nm cutoff was employed for short range electrostatics and van der Walls interactions; *iv*) Long-range contributions were treated through Particle Mesh Ewald (PME) method (Essmann et al. 1995).

All MD calculations were performed using the NAMD 2.7 software (Kalé et al. 1998) and the results were analyzed by using Tool Command Language (TCL) scripts implanted on the VMD program (Humphrey et al. 1996). The force field parameters to simulate diclofop were calculated using quantum mechanics calculations described by Oliveira, G. S. et al 2013 at HF/6-31G level and were implemented in CHARMM Force Field (Brooks et al. 2009) protocol, whereas ACCase enzyme parameters were described in the FF employed.

Table 1. Simulated system and evaluation of the interaction energies between ACCase enzyme and related system using MD simulations. Energies were scored in kcal/mol.

System	N of solute atoms	N of ions	N of solvent molecules	Electrostatic	vdW	Total
ACCcase+ diclofop	22121	31	119602	-75.6933	-43.33	-119.02
ACCcase+ APTES+ diclofop	22147	30	1196020	-5.3546	-64.76	-70.12

2.2. Experimental procedure

2.2.1 Materials

The Acetyl-CoA carboxylase enzyme was purchased from CUSABIO[®] (Hubei Province, P.R.China) as a part of the Bovine Acetyl-CoA carboxylase Synthetase ELISA Kit. The enzyme of this kit was purified and reconstituted according to the manufacturer's standards. Super pure-grade materials were used in the functionalization procedure: 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), triethylamine (TEA) and glutaraldehyde (aqueous solution 25%), all purchased from Sigma-Aldrich. The herbicides diclofop, imazaquin, glyphosate, and metsulfuron were also purchased from Sigma-Aldrich. The AFM cantilevers with sharpened pyramidal tip (Si₃N₄ tip) were purchased from Thermo Microscopes Microlevers.

2.2.2 Nanobiosensor Assembly

The development of the nanobiosensors was based on the work of Etchegaray *et al.* (Etchegaray *et al.* 2010) and Silva *et al.* (da Silva *et al.* 2013). Initially, AFM cantilevers are placed in a sterile Petri dish for sterilization under UV light for 30 minutes. After this procedure, the functionalization of AFM cantilevers and probes begins with a method which involves first the silanization of the surface with APTES (Fig. 1A). The AFM tips are exposed to APTES and triethylamine vapors for over 30 minutes in order to promote the APTES binding to the surface of the cantilever. The next treatment step was done with the bifunctional reagent glutaraldehyde (Fig.1B). The AFM cantilevers are immersed in an aqueous solution of glutaraldehyde $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ for 40 minutes. Afterwards, four washes are performed with MilliQ water to remove the reagent that was not covalently attached to the surface of the AFM cantilevers. After the washing process, the sensing element (ACCcase enzyme – Fig.1D) is induced to covalently bind to the terminal fragment of the glutaraldehyde molecule by immersing the AFM cantilevers in the ACCcase enzyme solution ($4 \mu\text{gL}^{-1}$). These samples are incubated for 35 minutes at room temperature. After this period, four washes are performed with MilliQ water, and finally, the cantilevers were used for measurements of AFM/AFS.

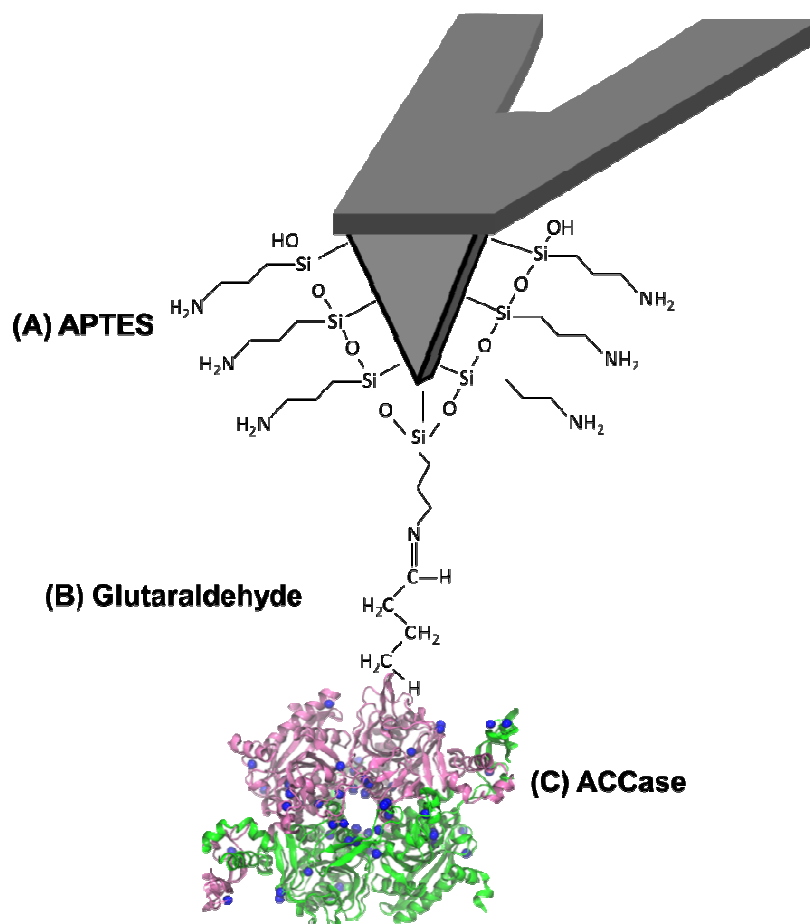


Fig.1. (A) and (B) show the structures for APTES and glutaraldehyde bounded to the substrate of Si₃N₄; (C) Acetyl-CoA carboxylase 3D structure (Molecular Formula: C₂₃H₃₈N₇O₁₇P₃S). Color caption of the enzyme: Pink - Monomer A; Green - Monomer B and; Blue dots - NH₂ groups.

2.2.3 Target Molecules Immobilization

To assemble the target molecules in the substrate system (fresh muscovite mica layer), where the herbicides (target molecules) are covalently immobilized, it was used a similar procedure described in Section 2.5. In this case, the functionalization begins with a formation of a covalent bond with the hydroxyl groups present on the surface of the mica muscovite and the silanol group of the APTES molecules. After that, occurs a chemical interaction between the amino group present in the APTES molecules with the carboxyl groups (-COOH) presented in the molecule of the diclofop herbicide (1mM). The same procedure was employed for immobilization of the others herbicides imazaquin, metsulfuron and glyphosate.

2.2.4 AFM and AFS

The Atomic Force Microscope ThermoMicroscope AutoProbe CP was used in the procedures of Atomic Force Spectroscopy (AFS). The calibration of the cantilevers was performed according to the method described by Sader *et al.* (Sader *et al.* 1999) by submitting the system to vibration and measuring the resonant frequency in air. The force measures were obtained by approximation and retraction of the tip with a rate of 10 μm.s⁻¹. Twenty

determinations were made for each probe, totaling about 19 statistically valid measures. All measurements were obtained by two cycles with scan rate of $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, and Si_3N_4 tips suitable for contact mode with spring constant (k) equal $(0.038\pm 0.003) \text{ N/m}$ (average of 10 tips). For statistics analysis, the programs TopoMetrix SPMLab 4.0[®] and OriginPro 8[®] were used.

2.2.5 Raman Spectroscopy

RAMAN spectra were obtained with a hand-held spectrometer (FirstGuardTM/Raman Analyzer V2.2.0) and a 1064 nm laser was used as the excitation source for the RAMAN measurements. The output of the laser power was set at 300 mW and the integration time at 5000 ms. For statistics analysis, the program OriginPro 8[®] was used.

3. Results and Discussion

3.1. Molecular Docking and Molecular Dynamic

The diclofop herbicide inhibits the ACCase enzyme by blocking one of the two active site inputs available (Zhang et al. 2004). The blockade takes place in a way that the diclofop is attached to the following residues Tyr1738A, Gly1998B, Val2002B, Gly1734A, and Phe1956B Ala1627A shown in Figure 2 via electrostatic forces and van der Waals interactions. The residue Phe1956B was removed of Figures 2B, 2C and 2D for a better visualization. The process of ACCase inhibition by the herbicide mentioned was reproduced from the method of docking diclofop regions corresponding to residues of Figure 2A, also shown in purple in Figures 2B, 2C and 2D. Figure 2B shows the best conformation and position of diclofop (green) obtained from crystallographic data (PDB file reference 1UYR), while Figures 2C and 2D show the best positions and conformations obtained from the calculations of molecular docking to diclofop and APTES+diclofop system respectively in the sensor system proposed.

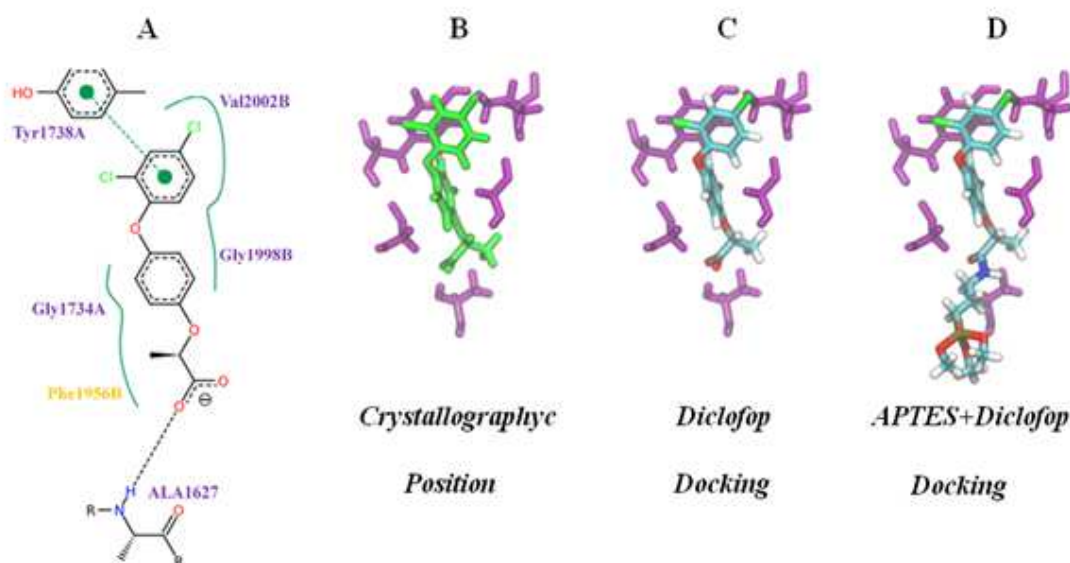


Fig.2. (A and B) Schematic drawing and crystallography representation of the interactions between diclofop and ACCase binding site (Zhang et al. 2004) diclofop (in green) and

binding mode (in magenta); (C) Diclofop docked in a binding site mode; (D) APTES+diclofop system docked in ACCase binding site mode.

MD simulations were employed to evaluate binding energies of the clustered docking positions (Table 1). These calculations were performed considering the fluctuation and mobility of the ACCase-diclofop and ACCase-system in aqueous solution. Each system was energy minimized and energy equilibrated during 1 ns previously.

Table 1 also reports electrostatic and van der Waals contributions to the interaction forces at which maintain the ligands attached to the ACCase molecular structure. As it shows, when the inhibitor diclofop is in the binding site of the ACCase enzyme, the contribution to the total energy comes from the electrostatic interactions mainly. In contrast, when this inhibitor is bonded to the cross-linker, the mainly contribution comes from the vdW interactions.

At the end of the inhibition process, one of the oxygen of the carboxyl group in the diclofop molecule is accessible in the solution, while the remainder is incorporated by a *hydrophobic bag* formed by the residues involved in this reaction (Zhang et al. 2004). The presence of this free oxygen contributed to the system APTES+diclofop in not losing their characteristics of inhibition, as it is observed by a comparison between the values of binding energies among the system APTES+diclofop and diclofop inhibitor, as described in Table 1. This particular result corroborates to the practical experiment, by providing a theoretical proof that it is possible to assemble and attach the diclofop herbicide on the surface of mica substrate and the ACCase enzyme on AFM probe without damaging in the molecule's abilities to inhibit and be inhibited.

3.2. Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring the Nanobiosensor Assembly

The probe functionalization process was characterized by Raman Spectroscopy. Figure 3 shows the Raman spectra for the ACCase standard (Figure 3A) and for the final functionalization step with the ACCase enzyme (Figure 3B). After the functionalization with the ACCase enzyme (Figure 3B) arise similar peaks in the regions $450\text{-}460\text{ cm}^{-1}$. These assignments can be attributed to carbon out of plane bending vibrations (Puviarasan et al. 2004); in the region $990\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ the assignments correspond to the C-N vibration/ NH_2 vibration (Podstawka et al. 2004), where in the nanobiosensor spectrum, there is an increase of the signal in this region due to the large number of binding C-N present in the structure of the enzyme. At the last regions (1367 and 1462 cm^{-1}), the signals can be attributed to COO^- stretching vibrations/ CH deformation/ C- NH_2 stretching and CH_3 or/and CH_2 deformations vibrations (Podstawka et al. 2004). These similarities in the values demonstrate that the enzyme was covalently attached on the surface of silicon nitride.

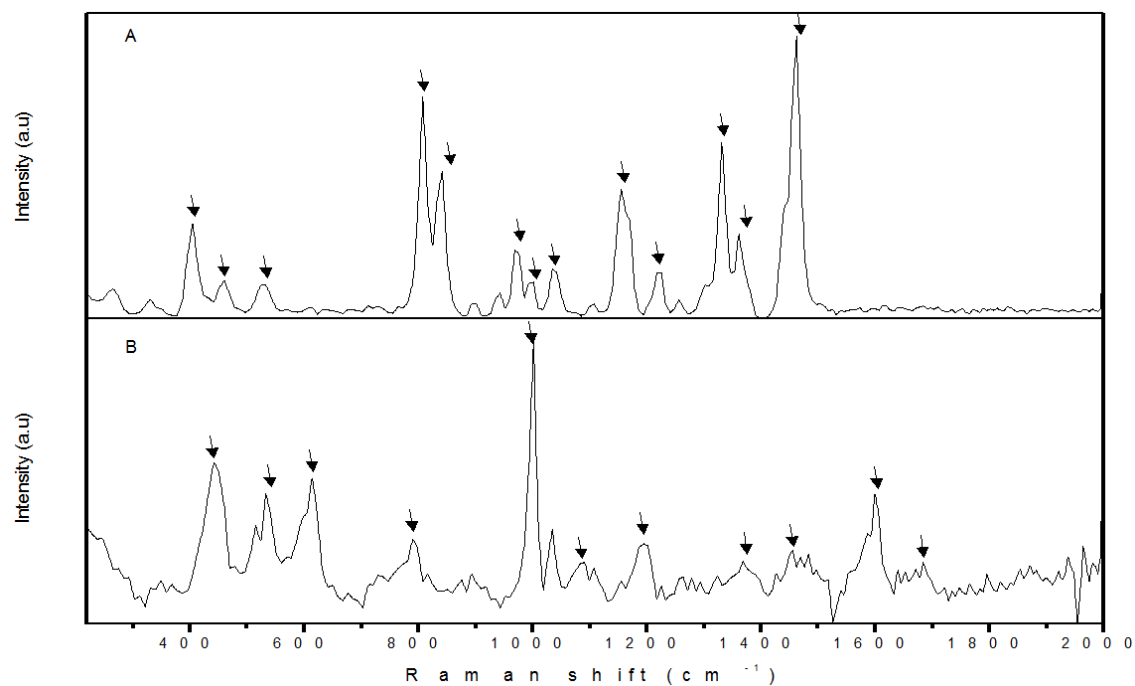
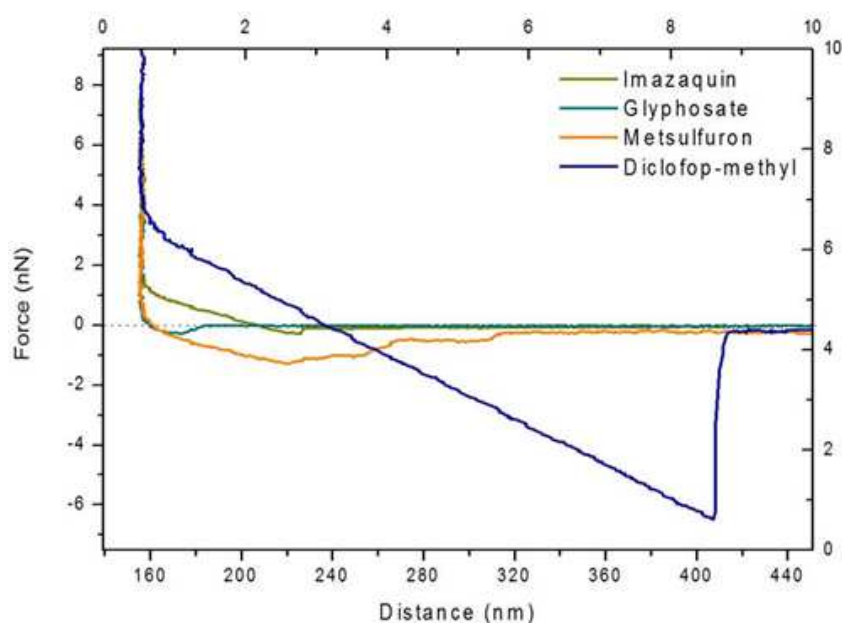


Fig.3. Raman spectra comparison. (A) ACCase standard; (B) Final Functionalization: Si₃N₄ + APTES + Glutaraldehyde + ACCase (Nanobiosensor).

3.3. Nanobiosensor for detection of agrochemicals

AFM force curves are used to quantify interactions between the AFM tip modified with the enzyme and the sample containing the herbicides, and confirmed the architecture of the system and the specific or non-specific recognition between the enzyme/herbicide. Since the force curves were performed in aqueous medium, when the interaction is weak, the behavior of them are in agreement with Vezenov *et al.* (Vezenov *et al.* 1997) and Noy *et al.* (Noy *et al.* 1995). Figure 4 presents the force curves obtained with the functionalized AFM tip and substrates modified with four different herbicides (3 non-specific: imazaquin, metsulfuron, and glyphosate; 1 specific: diclofop). On the basis of previous described data, a simple interpretation of the force curves shown in Fig.4, would be that due to the geometry of the adhesion curve (withdrawal), the nanobiosensor proved to be selective and specific for the herbicide initially proposed (diclofop).



Agrochemical	Average Adhesion Value (nN)
Diclofop	6.0 ± 1.0
Imazaquin	0.8 ± 0.1
Metsulfuron	0.3 ± 0.1
Glyphosate	0.6 ± 0.1

Fig.4. AFS force curves recorded in PBS solution buffer at pH 7.0 for the proposed agrochemical nanobiosensor. The blue curve represents a specific recognition event for a single biomolecular complex formed by the interaction between ACCase and diclofop (the specific chemical that inhibits the enzyme action). In contrast, the other curves represent nonspecific recognition events with low, almost null values for adhesion force.

Figure 4 points out that the values of the adhesion forces of diclofop are 85% higher (6.0 ± 1.0 nN) in magnitude when compared to the herbicide imazaquin (0.8 ± 0.1 nN), and 93% higher in magnitude when compared to the herbicide metsulfuron (0.3 ± 0.1 nN). This difference in force values adhesion is expected since these herbicides (imazaquin and metsulfuron) inhibits the action of acetolactate synthase enzyme (ALS) (Ahonsi et al. 2004; Kogan et al. 2011; Walsh et al. 2012), and consequently is a non-specific ligand (does not inhibit) of ACCase enzyme. Likewise, the adhesion force values of diclofop are 90% higher in magnitude when compared to the herbicide glyphosate (0.6 ± 0.1 nN). This difference in force value adhesion is also expected since the glyphosate herbicide is an inhibitor of the enzyme EPSP (5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) (Alibhai and Stallings 2001; Sammons et al. 1995; Yu et al. 2009) and consequently, is also a non-specific ligand (does not inhibit) of ACCase enzyme. The whole difference between the values of specific recognition (inhibitor - diclofop) and nonspecific (non-inhibitors: imazaquin, metsulfuron and glyphosate) is approximately 90%. This evidence validates the selectivity and specificity of the nanobiosensor.

Control experiments, in which the biorecognition process was inhibited, were used to confirm the specificity of the detected specific recognition events on statistical grounds. This

control was achieved by saturating the tip with the complementary blocking agent (*i.e.* anti-ACCase antibody). A significant decrease of 97% of the adhesion probability in the force curves was observed for the complex ACCase+antibody+diclofop (data not shown).

In the histogram obtained from Fig.5A, it is possible to collect several specific adhesion force values. The most important is that at a given loading rate, the most probable adhesion force can be observed, and consequently, such values can standardize the sensor operation on a large scale, the difference between the values of adhesion for each group of herbicides (specific and nonspecific), and the statistical probability of the values appear in the experimental measures. For the different statistical herbicides distributions, such as quantity, all peaks were fit with a Gaussian function, which means that it is the value that should be found in practical experiments for the ACCase-diclofop sensor system. Through Fig.5B, the visual difference of the adhesion is evident.

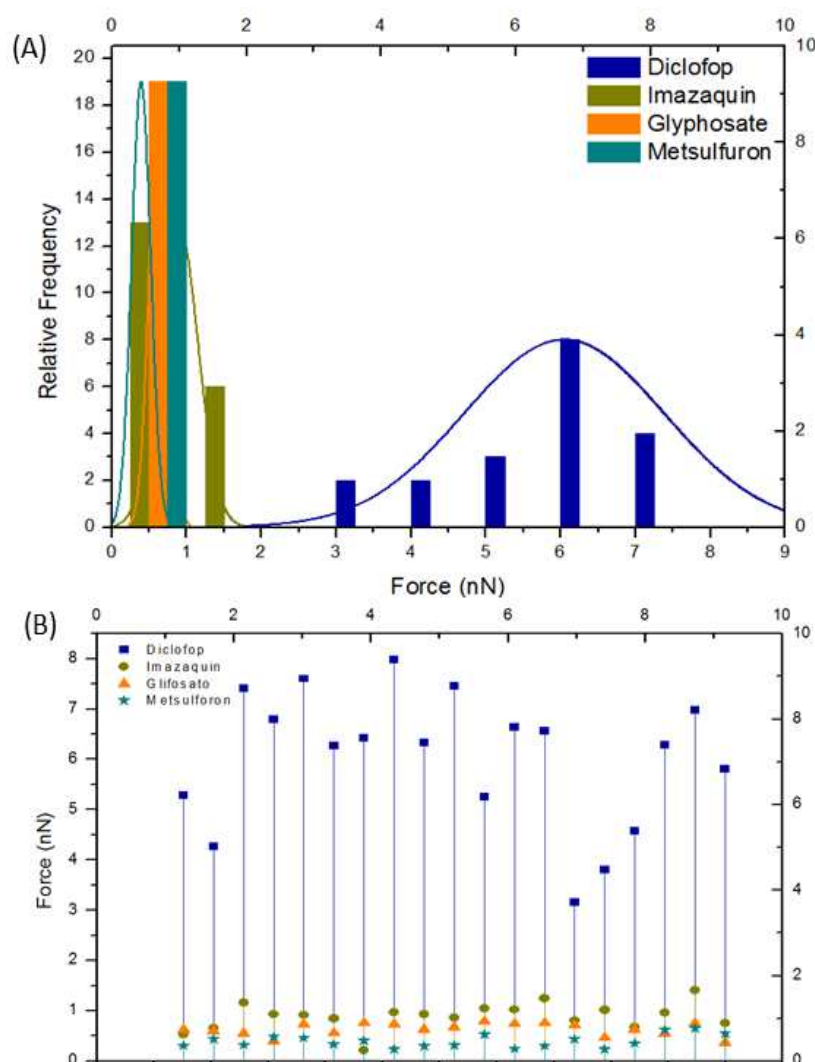


Fig. 5.(A) Adhesion force histograms ($n=19$) for the occurrences (relative frequency) of the adhesion force values for the sensing systems at the nanoscale: ACCase/diclofop; ACCase/imazaquin; ACCase/glyphosate and; ACCase/metsulfuron. The histograms were fitted to Gaussian functions. (B) Vertical drop lines showing the difference between the adhesion force values for the diverse herbicides.

The assessment of this system with other biosensors defined in literature is challenging due to the features, such as molecule physical and chemical nature, surface topography and characteristics, charge involved in the recognition event, different transduction modes, and the functionalization method of the nanobiosensor active area. Along with this, this is the first detection report of an APP herbicide by an AFM tip based nanobiosensor.

4. Conclusions

The results from this work provide a great approach to highly-sensitive and selective AFM enzyme based nanosensors, since this device was based on the biomimicry of the action mechanism of the herbicides in plants. The nanobiosensor proposed in this paper is a useful and flexible technology since it may be adapted to several circumstances: it can be adjusted to several types of target molecules, it can be used for purposes of resilience and conservation of natural resources, decision-making on projects aimed to pointing out degraded and contaminated areas (soil and water), as well as being a quality indicator for the improvement and evolvement of the Agricultural, Environmental, Food, Pharmaceutical Research, and Security issues. One of the most prominent qualities of this sensor is that it can provide the detection of the target molecules in real time in a really small quantity at the nanoscale in near-physiological conditions and without labelling. Future work, which has already been started, put forward the response behavior of the sensor for samples in which are several agrochemical groups interacting in a solution. Complementary, the AFS technique will also be used to investigate the competition of among two, or even more ligands for the same binding site of the enzyme.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Federal University of Sao Carlos (UFSCar), CAPES, CNPq and FAPESP for the infrastructure and financial support for research. The authors also would like to thank the significant contribution of Mr. Luiz Bonugli for the AFM measurements and Mr. José Roberto Castro for technical assistance, as well as the Institute of Physics Gleb Wataghin for the support. Finally, the authors would like to thank to Prof. Amarildo Otavio Matins for the noteworthy scientific review of the text and Juliette Gaasenbeek for the final review.

References

- Ahmad-Hamdani, M.S., Owen, M.J., Yu, Q., Powles, S.B., 2012. ACCase-Inhibiting Herbicide-Resistant *Avena* spp. Populations from the Western Australian Grain Belt. *Weed Technology* 26(1), 130-136.
- Ahonsi, M.O., Berner, D.K., Emechebe, A.M., Lagoke, S.T., 2004. Effects of ALS-inhibitor herbicides, crop sequence, and fertilization on natural soil suppressiveness to *Striga hermonthica*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 104(3), 453–463.
- Alibhai, M.F., Stallings, W.C., 2001. Closing down on glyphosate inhibition—with a new structure for drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(6), 2944–2946.

Brooks, B.R., Brooks, C.L., III, Mackerell, A.D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A.R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R.W., Post, C.B., Pu, J.Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R.M., Woodcock, H.L., Wu, X., Yang, W., York, D.M., Karplus, M., 2009. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry* 30(10).

Brooks, C.L., Karplus, R.T.I.N., Pettitt, B.M., 2007. *Dynamical Simulation Methods. Advances in Chemical Physics*, pp. 33-58. John Wiley & Sons.

Cai, X.Y., Liu, W.P., Chen, S.W., 2005. Environmental effects of inclusion complexation between methylated beta-cyclodextrin and diclofop-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(17), 6744-6749.

Chandi, A., York, A.C., Jordan, D.L., Beam, J.B., 2011. Resistance to Acetolactate Synthase and Acetyl Co-A Carboxylase Inhibitors in North Carolina Italian Ryegrass (*Lolium perenne*). *Weed Technology* 25(4), 659-666.

Chien, W.C., Chung, C.H., Jaakkola, J.J.K., Chu, C.M., Kao, S., Su, S.L., Lai, C.H., 2012. Risk and Prognostic Factors of Inpatient Mortality Associated with Unintentional Insecticide and Herbicide Poisonings: A Retrospective Cohort Study. *Plos One* 7(9), 8.

Cruz-Hipolito, H., Dominguez-Valenzuela, J.A., Osuna, M.D., De Prado, R., 2012. Resistance mechanism to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides in *Phalaris paradoxa* collected in Mexican wheat fields. *Plant and Soil* 355(1-2), 121-130.

da Silva, A.C.N., Deda, D.K., Da Róz, A.L., Prado, R.A., Carvalho, C.C., Viviani, V., Leite, F.L., 2013. Nanobiosensors Based on Chemically Modified AFM Probes: A Useful Tool for Metsulfuron-methyl Detection. *Sensors* 13, 1477-1489.

Deda, D.K., Bueno, C.C., Ribeiro, G.A., Moraes, A.S., Garcia, P.S., Souza, B.B., Leite, F.L., 2012. 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.

EPA, 2000. R.E.D. Facts - Diclofop-Methyl. Prevention, Pesticides And Toxic Substances, p. 6. United States Environmental Protection Agency.

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G., 1995. A smooth particle mesh ewald method. *Journal of Chemical Physics* 103(19).

Etchegaray, A., Bueno, C.C., Teschke, O., 2010. Identificação de microcistina-LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. *Química Nova* 33(9), 1843-1848.

Fenoll, J., Hellin, P., Maria Martinez, C., Flores, P., Navarro, S., 2012. 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* 1257.

Goldman, L.R., 1998. Chemicals and Children's Environment: What We Don't Know about Risks. *Environmental Health Perspectives* 106(3), 875-880.

Gosciny, S., Unterluggauer, H., Aldrian, J., Hanot, V., Masselter, S., 2012. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". *Food Analytical Methods* 5(5), 1177-1185.

He, Z.Y., Liu, D.H., Li, R.H., Zhou, Z.Q., Wang, P., 2012. Magnetic solid-phase extraction of sulfonylurea herbicides in environmental water samples by Fe₃O₄@dioctadecyl dimethyl ammonium chloride@silica magnetic particles. *Analytica Chimica Acta* 747, 29-35.

Hinterdorfer, P., Schicher, K., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schindler, H., 1998. A Mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy. *Nanobiology* 4, 177-188.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 14(1).

Jha, Z., Behar, N., Sharma, S.N., Chander, G., Sharma, D.K., Pandey, M.P., 2011. Nanotechnology: Prospects of Agricultural Advancement. *Nano Vision* 1(2), 88-100.

Jia, K., Eltzov, E., Toury, T., Marks, R.S., Ionescu, R.E., 2012. A lower limit of detection for atrazine was obtained using bioluminescent reporter bacteria via a lower incubation temperature. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84.

Kalé, L.V., Bhandarkar, M., Brunner, R., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., 1998. NAMD: A case study in multilingual parallel programming. *Languages and Compilers for Parallel Computing - Lecture Notes in Computer Science* 1366, 367-381.

Kogan, M., Gómez, P., Fischer, A., Alister, C., 2011. Using penoxsulam ALS inhibitor as a broad-spectrum herbicide in Chilean rice. *Ciencia e Investigación Agraria* 38(1), 83-93.

Kumazawa, T., Sato, K., H., S., Ishii, A., Suzuki, O., 1995. Capillary gas chromatography with four different detectors for dinitroaniline herbicides in human body fluids. *Journal of Analytical Toxicology* 19(2), 95-98.

Laganà, A., Fago, G., Fasciani, L., Marino, A., Mosso, M., 2000. 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* 414, 79-94.

Leite, F.L., Bueno, C.C., Da Róz, A.L., Ziemath, E.C., Oliveira Jr, O.N., 2012. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 13(10), 12773-12856.

Leite, F.L., Herrmann, P.S.P., 2005. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. *Journal of Adhesion Science and Technology* 19(3-5), 365-405.

Maloschik, E., Mörtl, M., Székács, A., 2010. Novel derivatisation technique for the determination of chlorophenoxy acid type herbicides by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(2), 537-548.

Martyna, G.J., Tobias, D.J., Klein, M.L., 1994. Constant-pressure molecular-dynamics algorithms. *Journal of Chemical Physics* 101(5).

Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19(14).

Mousavi, S.R., Rezaei, M., 2011. Nanotechnology in Agriculture and Food Production. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 1(10), 414-419.

Neese, F., 2012. The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science* 2(1).

Noy, A., Frisbie, C.D., Rozsnyai, L.F., Wrighton, M.S., Lieber, C.M., 1995. Chemical force microscopy - exploiting chemically-modified tips to quantify adhesion, friction, and functional-group distributions in molecular assemblies. *Journal of the American Chemical Society* 117(30), 7943-7951.

Podstawka, E., Ozaki, Y., Proniewicz, L.M., 2004. Part II: Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of methionine containing fletrodipeptides adsorbed on colloidal silver. *Applied Spectroscopy* 58(5).

Puviarasan, N., Arjunan, V., Mohan, S., 2004. FTIR and FT-Raman spectral investigations on 4-aminoquinoline and 5-aminoquinoline. *Turkish Journal of Chemistry* 28(1).

Sader, J.E., Chon, J.W.M., Mulvaney, P., 1999. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* 70(10).

Sammons, R.D., Gruys, K.J., Anderson, K.S., Johnson, K.A., Sikorski, J.A., 1995. Reevaluating Glyphosate as a Transition-State Inhibitor of EPSP Synthase: Identification of an EPSP Synthase.cntdot.EPSP.cntdot.Glyphosate Ternary Complex. *Biochemistry* 34(19), 6433–6440.

Senseman, S.A., Lavy, T.L., Mattice, J.D., Gbur, E.E., Skulman, B.W., 1997. Trace level pesticide detections in Arkansas surface waters. *Environmental Science & Technology* 31(2), 395-401.

Steffens, C., Leite, F.L., Bueno, C.C., Manzoli, A., De Paula Herrmann, P.S., 2012. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. *Sensors* 12(6).

Vezenov, D.V., Noy, A., Rozsnyai, L.F., Lieber, C.M., 1997. Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy. *Journal of the American Chemical Society* 119(8), 2006-2015.

Walsh, D.T., Babiker, E.M., Burke, I.C., Hulbert, S.H., 2012. Camelina mutants resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. *Molecular Breeding* 30(2), 1053-1063.

Wang, C., Wang, D., Mao, Y., Hu, X., 2007. Ultrasensitive biochemical sensors based on microcantilevers of atomic force microscope. *Analytical Biochemistry* 363(1).

Wielert-Badt, S., Hinterdorfer, P., Gruber, H.J., Lin, J.T., Badt, D., Wimmer, B., Schindler, H., Kinne, R.K.H., 2002. Single molecule recognition of protein binding epitopes in brush border membranes by force microscopy. *Biophysical Journal* 82(5), 2767-2774.

Willemsen, O.H., Snel, M.M.E., Cambi, A., Greve, J., De Grooth, B.G., Figdor, C.G., 2000. Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 79(6), 3267-3281.

Yu, Q., Abdallah, I., Han, H.P., Owen, M., Powles, S., 2009. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta* 230(4), 713-723.

Zhang, H., Tweel, B., Tong, L., 2004. 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* 101(16), 5910-5915.

Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S., Akıncı, N., Aksoy, H., 2011. Genotoxic effects of chlorophenoxy herbicide diclofop-methyl in mice in vivo and in human lymphocytes in vitro. *Drug and Chemical Toxicology* 34(4), 390-395.