

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)

ALINE CRISTINE NANUH DA SILVA

**ESTUDO DE “SUPERFÍCIES INTELIGENTES” PARA DESENVOLVIMENTO DE  
NANOBIOSENSORES**

Sorocaba  
2012



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)

ALINE CRISTINE NANUH DA SILVA

**ESTUDO DE “SUPERFÍCIES INTELIGENTES” PARA DESENVOLVIMENTO DE  
NANOBIOSENSORES**

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

Sorocaba  
2012

Silva, Aline Cristine Nanuh da  
S586f Estudo de “superfícies inteligentes” para desenvolvimento de  
nanobiossensores / Aline Cristine Nanuh da Silva. -- Sorocaba, 2012.  
106 f. : il. (color.) ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, *Campus*  
Sorocaba, 2012  
Orientador: Fábio de Lima Leite  
Banca examinadora: Francisco Trivinho Strixino, Ronald Tararam  
Bibliografia

1. Biossensor. 2. Nanotecnologia. 3. Herbicidas. I. Título. II. Sorocaba -  
Universidade Federal de São Carlos.

CDD 620.11

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS DE SOROCABA

Rodovia João Leme dos Santos, km 110  
Bairro Itinga  
Telefone: (15) 3229-5941  
CEP 18052-780 - Sorocaba - São Paulo – Brasil  
<http://www.ppgcm.ufscar.br/> : [ppgcm@ufscar.br](mailto:ppgcm@ufscar.br)



**ATA GERAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ALINE CRISTINE NANUH DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS, CURSO DE MESTRADO, DO CCTS - CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE – UFSCAR / CAMPUS SOROCABA.**

Aos dez dias do mês de abril de 2012, às 14:00h na Sala de Reuniões do Prédio da Administração, do Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade, UFSCar - campus Sorocaba, reuni-se a Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Fábio de Lima Leite, da Universidade Federal de São Carlos/campus Sorocaba, Prof. Dr. Francisco Trivinho Strixino, da Universidade Federal de São Carlos/campus Sorocaba, Prof. Dr. Ronald Tararam, da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” – UNESP/campus Araraquara, sob a presidência do primeiro, para a Defesa de Dissertação de **ALINE CRISTINE NANUH DA SILVA**, intitulada: **Estudo de “Superfícies Inteligentes” para Desenvolvimento de Nanobiossensores**, de acordo com o regulamento do Programa, tendo o(a) candidato(a) recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. FÁBIO DE LIMA LEITE

  
Prof. Dr. FRANCISCO TRIVINHO STRIXINO

  
Prof. Dr. RONALD TARARAM





## DEDICATÓRIA

*“ A Deus, em primeiro lugar,*

*Minha mãe Sonia,*

*minha avó Masalda e à*

*meu namorado Pedro.”*





*O mais importante de tudo é  
nunca deixar de se perguntar. A  
curiosidade tem sua própria razão de  
existir.*

*Albert Einstein*



## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio de Lima Leite, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e apoio para a realização deste trabalho.

À Dra. Alessandra da Róz e à Dra. Daiana Nogueira, pelas conversas, ideias e preocupação, que contribuíram muito para execução desse trabalho.

À doutoranda Tamires de Souza Nossa, pelo auxílio com as medidas de CAM, conversas e apoio nos momentos difíceis.

Ao Professor Dr. Antonio Riul Jr., coordenador do PPGCM / UFSCar, Campus Sorocaba/SP, pelo apoio nos momentos necessários.

À mestranda Carolina de Castro Bueno, pelo auxílio com o procedimento de funcionalização de pontas de AFM, e discussões.

Ao mestrando Adriano Amarante, pela companhia no laboratório, conversas e auxílio.

Ao Prof. Dr. Nilson Cristino Cruz, e à UNESP - Campus Sorocaba pela utilização do FTIR, e à doutoranda Rita de Cássia Rangel pelo auxílio com os espectros de FTIR.

Ao Prof. Dr. Vadim Viviani pela utilização do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Sistemas Bioluminescentes, UFSCAR - Campus Sorocaba, à aluna Camila de Carvalho e à Dra. Rogilene Prado, pela ajuda com a enzima ALS, pelas conversas e apoio.

Aos colegas do Mestrado e do laboratório de pesquisa, pela amizade e boa convivência.

À USP São Carlos, pela utilização do CAM.

À Embrapa, pelas imagens de MEV.

À Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Campus Sorocaba/SP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, pela oportunidade.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos do grupo de pesquisa Nanoneurociência.



## RESUMO

SILVA, Aline Cristine Nanuh da. *Estudo de “Superfícies Inteligentes” para Desenvolvimento de Nanobiossensores*. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2012.

A utilização de herbicidas vem aumentando consideravelmente nos últimos anos e, como consequência, tem-se também um aumento da exposição dos ecossistemas e da vida humana a esses compostos altamente tóxicos. O estudo e desenvolvimento de metodologias com maior sensibilidade, no que visa à detecção desses pesticidas, vêm se tornando extremamente relevante. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento de um nanobiossensor, aplicando pontas de AFM funcionalizadas e Espectroscopia de Força Atômica (AFS), para detecção dos herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil, inibidores da enzima ALS. Estudou-se a força e o trabalho de adesão entre pontas de AFM, não modificadas e modificadas quimicamente através da imobilização da ALS, e substratos contaminados com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil. Além disso, as pontas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados possibilitaram constatar diferenças entre as pontas funcionalizadas e não funcionalizadas, analisar as propriedades individuais de cada uma, bem como desenvolver um nanobiossensor para detecção de herbicidas.

Palavras-chave: Enzimas. Herbicidas. Nanobiossensores. Nanociência. Sensores.



## ABSTRACT

The use of herbicides has increased considerably in recent years and as a consequence, it has also been an increased exposure of ecosystems and human life to these highly toxic compounds. The study and development of methodologies with greater sensitivity, which aims at the detection of these pesticides, are becoming extremely relevant. Thus, this study aimed to study the development of a nanobiosensor applying functionalized AFM tips and Atomic Force Spectroscopy (AFS) for detection of herbicides imazaquin and metsulfuron-methyl, ALS inhibitors. We studied the force and work of adhesion between AFM tips, unmodified and chemically modified by immobilization of ALS, and substrates contaminated with imazaquin and metsulfuron-methyl. In addition, the tips were characterized by infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). It was possible to see differences between the tips functionalized and not functionalized, analyze the properties of each individual and develop a nanobiosensor for detection of herbicides.

Keywords: Enzymes. Herbicides. Nanobiosensores. Nanoscience. Sensors.





## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FUNCIONAMENTO DO STM. ....	35
FIGURA 2 - MODOS DE OPERAÇÃO STM (A) CORRENTE CONSTANTE. (B) ALTURA CONSTANTE .	36
FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DO CANTILÉVER (A) E DA PONTA DE PROVA (B). ....	37
FIGURA 4 - (A) AFM <i>MULTIMODE V</i> INSTALADO NO LABORATÓRIO DE NANOCIÊNCIA E NANOSCOPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - <i>CAMPUS</i> SOROCABA. (B) ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO GERAL DO AFM. ....	38
FIGURA 5 - FORÇAS DE INTERAÇÃO PONTA-AMOSTRA. ....	40
FIGURA 6 – CURVA DE FORÇA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. (A) ILUSTRANDO TODAS AS POSSÍVEIS REGIÕES E OS PONTOS ONDE OCORREM O DESPRENDIMENTO ( <i>PULL-OFF FORCE</i> ) E A ATRAÇÃO DA HASTE ( <i>PULL-ON FORCE</i> ), E (B) ILUSTRANDO O MOVIMENTO DA HASTE EM RELAÇÃO ÀS FORÇAS DE INTERAÇÃO NO SISTEMA PONTA–AMOSTRA. ....	41
FIGURA 7 - (A) FUNCIONALIZAÇÃO EM PONTAS DE OURO. (B) FUNCIONALIZAÇÃO EM PONTAS DE OURO COM ETILENOGLICOL CURTO (C) FUNCIONALIZAÇÃO EM PONTAS DE SILÍCIO COM PEG. ....	43
FIGURA 8 - (A) ESQUEMA DA LIGAÇÃO DO APTES À PONTA DO AFM. (B) ESTRUTURA MOLECULAR DO APTES E GLUTARALDEÍDO, RESPECTIVAMENTE. ....	44
FIGURA 9– REPRESENTAÇÃO DAS TENSÕES ATUANTES NO SISTEMA SÓLIDO-LÍQUIDO. ....	44
FIGURA 10 – MODELAGEM MOLECULAR DA LIGAÇÃO ESPECÍFICA ENTRE A ENZIMA ALS E O HERBICIDA METSULFURON-METIL.(A) REPRESENTAÇÃO TIPO-ENOVELAMENTO DE UM DÍMERO DA ENZIMA ALS, COM O RESPECTIVO HERBICIDA INTERAGINDO NO SÍTIO ATIVO (B) REPRESENTAÇÃO ( <i>SURFACE</i> ) QUE DESTACA A LIGAÇÃO ENZIMA-HERBICIDA. ....	51
FIGURA 11 - REAÇÕES CATALISADAS PELA ALS. ....	54
FIGURA 12 - ESQUEMA MODO DE INIBIÇÃO ALS. ....	55
FIGURA 13 - (A) ESTRUTURA MOLECULAR IMAZAQUIN. (B) ESTRUTURA MOLECULAR METSULFURON-METIL. ....	56
FIGURA 14 - ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA A ENZIMA ACETOLACTATOSINTASE. (A) SOLUÇÃO ENZIMA ALS LOGO APÓS SUA EXTRAÇÃO (B) SOLUÇÃO DA ENZIMA ALS LOGO APÓS 24 (VINTE E QUATRO)H DE SUA EXTRAÇÃO (C) SOLUÇÃO CONTROLE (D) SOLUÇÃO CONTENDO O EXTRATO BRUTO DE BACTÉRIA SEM O CDNA DA ALS. ....	59
FIGURA 15 - (A) PONTAS E SUBSTRATOS QUE FORAM SUBMETIDOS AO PROCESSO DE LIMPEZA. (B) UV/PLASMA PROCLEANER MODELO NÚMERO UV.PC.220 DA BIOFORCE. ....	61

FIGURA 16 - SISTEMA UTILIZADO, CONSTITUÍDO POR UM DESSECADOR, COM ENTRADA E SAÍDA PARA GÁS, LIGADO A UM CILINDRO DE NITROGÊNIO.....	62
FIGURA 17 - ESPECTRO FTIR (A) PLACA NITRETO DE SILÍCIO, (B) PLACA NITRETO DE SILÍCIO - GLUTARALDEÍDO E (C) PLACA NITRETO DE SILÍCIO - ALS.....	67
FIGURA 18 – (A) LIGAÇÃO DO APTES AO NITRETO DE SILÍCIO, (B) DO GLUTARALDEÍDO AO APTES. (C) ESQUEMA DE TODAS AS ETAPAS DE FUNCIONALIZAÇÃO DAS PONTAS DE NITRETO DE SILÍCIO.....	69
FIGURA 19 –(A) IMAGEM DE MEV PONTA NÃO FUNCIONALIZADA SEM USO E LIMPA (PROCEDIMENTO DE LIMPEZA). (B) IMAGEM DE MEV DA PONTA NÃO FUNCIONALIZADA APÓS AS MEDIDAS DE CURVAS DE FORÇA; (C) IMAGEM DA PONTA DE AFM FUNCIONALIZADA ANTES DAS MEDIDAS E (D) APÓS AS MEDIDAS DE CURVA DE FORÇA. ....	71
FIGURA 20 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS ENERGIAS DE SUPERFÍCIE POLARES ( $\gamma_p$ ), DISPERSIVAS ( $\gamma_D$ ) E TOTAIS ( $\gamma_s$ ) PARA A PONTA DE AFM NÃO FUNCIONALIZADA (SILÍCIO), FUNCIONALIZADA (ALS) E PARA OS SUBSTRATOS: IMAZAQUIN E METSULFURON-METIL. .	73
FIGURA 21 – (A) CURVAS DE FORÇA TÍPICA ENTRE UMA PONTA <i>IN NATURA</i> (SEM FUNCIONALIZAR) E O HERBICIDA METSULFURON-METIL. (B) PARA UMA PONTA FUNCIONALIZADA E O HERBICIDA METSULFURON-METIL (NANOBIOSSENSOR). ....	73
FIGURA 22– GRÁFICO COMPARATIVO DAS MEDIDAS DE FORÇA DE ADESÃO DETERMINADAS COM PONTA NÃO FUNCIONALIZADA (A) E PONTA FUNCIONALIZADA (B) EM TRÊS PONTOS DISTINTOS. ....	74
FIGURA 23 – GRÁFICO COMPARATIVO DAS MEDIDAS DE FORÇA DE ADESÃO DETERMINADAS COM PONTA NÃO FUNCIONALIZADA (A) E PONTA FUNCIONALIZADA (B) EM TRÊS SUBSTRATOS DISTINTOS. ....	77
FIGURA 24 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS MEDIDAS DE FORÇA DE ADESÃO DETERMINADAS COM PONTAS NÃO FUNCIONALIZADAS (A) E PONTAS FUNCIONALIZADAS (B), SENDO QUE TRÊS PONTAS FORAM UTILIZADAS EM CADA CASO. ....	79
FIGURA 25 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS MEDIDAS DE FORÇA DE ADESÃO DETERMINADAS COM PONTA NÃO FUNCIONALIZADA (A) E PONTA FUNCIONALIZADA (B) EM TRÊS PONTOS DISTINTOS. ....	81
FIGURA 26 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS MEDIDAS DE FORÇA DE ADESÃO DETERMINADAS COM PONTA NÃO FUNCIONALIZADA (A)E PONTA FUNCIONALIZADA (B) EM TRÊS SUBSTRATOS DISTINTOS CONTAMINADOS COM METSULFURON-METIL.....	84

FIGURA 27 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS MEDIDAS DE FORÇA DE ADESÃO, DETERMINADAS COM PONTA NÃO FUNCIONALIZADA (A) E PONTA FUNCIONALIZADA (B), EM SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM METSULFURON-METIL. FORAM UTILIZADAS TRÊS PONTAS DIFERENTES EM CADA CASO. ....	86
FIGURA 28 - REPRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE ADESÃO ENTRE A PONTA NÃO FUNCIONALIZADA (SI), PONTA FUNCIONALIZADA (ALS) E OS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM IMAZAQUIN E METSULFURON-METIL.....	89
FIGURA 29–FORÇA DE ADESÃO TEÓRICA OBTIDA ATRAVÉS DAS TEORIAS DMT E JKR. ....	90
FIGURA 30 – GRÁFICO CÁLCULO TEÓRICO DA FORÇA CAPILAR.....	92
FIGURA 31–MÓDULO DA FORÇA DE ADESÃO TOTAL UTILIZANDO AS TEORIAS DMT E JKR.....	93
FIGURA 32 – GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS DA FORÇA DE ADESÃO DETERMINADA PARA A PONTA FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS E PARA A PONTA NÃO FUNCIONALIZADA. COM AMBAS AS PONTAS FORAM REALIZADAS TESTES COM OS HERBICIDAS IMAZAQUIN E METSULFURON-METIL. ....	94
FIGURA 33 – (A) GRÁFICO COMPARATIVO DA FORÇA ESPECÍFICA SEMI-EMPÍRICA APLICANDO AS TEORIAS DMT E JKR. (B) GRÁFICO COMPARATIVO DA FORÇA DE ADESÃO MEDIDA COM UMA PONTA NÃO FUNCIONALIZADA, COM UMA PONTA FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS SOBRE SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM O HERBICIDA METSULFURON-METIL.....	96



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ALS CALCULADA ATRAVÉS DA EQ. 18. ....	60
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DAS ENERGIAS DOS LÍQUIDOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE ÂNGULO DE CONTATO. ....	66
TABELA 3- MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO E ENERGIAS DE SUPERFÍCIES CALCULADAS, TOTAL, $\gamma_s$ , POLAR, $\gamma_p$ , E DISPERSIVA, $\gamma_d$ , PARA AS PONTAS E OS SUBSTRATOS. ....	72
TABELA 4 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON DA FORÇA DE ADESÃO MEDIDA COM AS PONTAS DE AFM NÃO FUNCIONALIZADA E FUNCIONALIZADA COM ALS NOS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM IMAZAQUIN, EM TRÊS PONTOS DISTINTOS. ....	76
TABELA 5 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON DA FORÇA DE ADESÃO, MEDIDA COM AS PONTAS DE AFM NÃO FUNCIONALIZADA E FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS NOS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM IMAZAQUIN, EM TRÊS SUBSTRATOS DISTINTOS. ....	78
TABELA 6 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON DA FORÇA DE ADESÃO MEDIDA COM TRÊS PONTAS DE AFM DISTINTAS, NÃO FUNCIONALIZADAS E FUNCIONALIZADAS COM A ENZIMA ALS, NOS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM IMAZAQUIN. ....	80
TABELA 7 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON DA FORÇA DE ADESÃO, MEDIDA COM AS PONTAS DE AFM NÃO FUNCIONALIZADA E FUNCIONALIZADA COM ALS, NOS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM METSULFURON-METIL, EM TRÊS PONTOS DISTINTOS. ....	83
TABELA 8 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON DA FORÇA DE ADESÃO MEDIDA COM AS PONTAS DE AFM NÃO FUNCIONALIZADA E FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS, NOS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM METSULFURON-METIL, EM TRÊS SUBSTRATOS DISTINTOS. ....	85
TABELA 9 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DE PEARSON DA FORÇA DE ADESÃO MEDIDA COM TRÊS PONTAS DE AFM DISTINTAS, NÃO FUNCIONALIZADA E FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS, NOS SUBSTRATOS CONTAMINADOS COM METSULFURON-METIL. ....	87
TABELA 10 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS DA FORÇA DE ADESÃO DETERMINADA PARA A PONTA FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS E PARA A PONTA NÃO FUNCIONALIZADA. COM AMBAS AS PONTAS FORAM REALIZADAS TESTES COM OS HERBICIDAS IMAZAQUIN E METSULFURON-METIL. ....	90
TABELA 11 – CÁLCULO TEÓRICO DA FORÇA CAPILAR. ....	91
TABELA 12 – APRESENTAÇÃO DO CÁLCULO DA FORÇA DE ADESÃO TEÓRICA APLICANDO A TEORIA DMT. ....	92

TABELA 13 - APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS DA FORÇA DE ADESÃO DETERMINADA PARA A PONTA FUNCIONALIZADA COM A ENZIMA ALS E PARA A PONTA NÃO FUNCIONALIZADA. COM AMBAS AS PONTAS FORAM REALIZADAS TESTES COM OS HERBICIDAS IMAZAQUIN E METSULFURON-METIL.....	94
TABELA 14 – RESULTADOS SEMI-EMPÍRICOS DO CÁLCULO DA FORÇA ESPECÍFICA. ....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCase	Acetil Coenzima A Carboxilase
AFM	do inglês “ <i>Atomic Force Microscopy</i> ” (Microscopia de Força Atômica)
AFS	do inglês “ <i>Atomic Force Spectroscopy</i> ” (Espectroscopia de Força Atômica)
ALS	Acetolactato Sintase
APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
ATR	do inglês “ <i>Attenuated Total Reflectance</i> ” (Refletância Total Atenuada)
CAM	do inglês “ <i>Contact Angle Method</i> ” (Método do ângulo de contato)
CFM	do inglês “ <i>Chemical Force Microscopy</i> ” (Microscopia de Força Química)
DMT	Teoria Derjaguin – Muller - Toporov
DNA	do inglês “ <i>Desoxyribonucleic Acid</i> ” (Ácido Desoxiribonucleico)
EDTA	do inglês “ <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> ” (Ácido Etilenodiaminotetracético)
EPSP	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase
FTIR	do inglês “ <i>Fourier Transform Infrared</i> ” (Infravermelho por Transformada de Fourier)
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-galactosídeo
IMA	imazaquin
JKR	Teoria Johnson – Kendall – Roberts
LB	Luria Bertani
MET	metsulfuron-metil
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
RNA	do inglês “ <i>Ribonucleic Acid</i> ” (Ácido Ribonucleico)
OD	do inglês “ <i>Optical Density</i> ” (Densidade Óptica)
PEG	Polietilenoglicol
STM	do inglês “ <i>Scanning Tunneling Microscope</i> ” (Microscópio de Tunelamento)
TB	do inglês “ <i>Transformation Buffer</i> ” (Tampão de Transformação)
TPP	Tiamina Pirofosfato





## LISTA DE SÍMBOLOS

$C_{ind}$	Coefficiente de indução
$C_{orient}$	Coefficiente de orientação
$C_{disp}$	Coefficiente de dispersão
$F$	Força de interação
$F_c$	Força de capilaridade
$F_{ad}$	Força de adesão
$F_{cmax}$	Força de capilaridade máxima
$h$	Constante de Plank
$I_T$	Corrente de Tunelamento
$I$	Corrente
$K$	Constante elástica do cantiléver
$K$	Constante de Boltzman
$p/p_s$	Pressão de vapor relativa de Laplace
$r_1$	Raio de curvatura do menisco
$r_2$	Raio de curvatura do menisco
$r_K$	Raio de Kelvin
$R$	Constante dos gases
$R_{at}$	Raio da ponta de AFM
$r$	Distância entre os dipolos
$T$	Temperatura absoluta
$V$	Volume molar
$U_T$	Diferença de Potencial
$W_{vdW}$	Potencial de Van der Waals
$w_K$	Potencial de Keesom
$w_{SL}$	Trabalho de adesão sólido/líquido
$w_D$	Potencial de Debye
$\alpha_{01}$	Polarizabilidade eletrônica das moléculas
$\alpha_{02}$	Polarizabilidade eletrônica das moléculas
$\gamma_L$	Energia de superfície líquido/ar
$\gamma_S$	Energia de superfície sólido/ar

$\gamma_{SL}$	Energia de superfície sólido/líquido
$\gamma_L^d$	Energia de superfície dispersiva do líquido
$\gamma_L^p$	Energia de superfície polar do líquido
$\gamma_S^d$	Energia de superfície dispersiva do sólido
$\gamma_S^p$	Energia de superfície polar do sólido
$\Delta z$	Deflexão do cantiléver
$\epsilon$	Permissividade elétrica do meio
$\epsilon_0$	Permissividade elétrica do vácuo
$\theta$	Ângulo formado entre a gota e a superfície sólida
$u_1$	Momento de dipolo da molécula
$u_2$	Momento de dipolo da molécula
$v_1$	Primeiro potencial de ionização de uma molécula
$v_2$	Primeiro potencial de ionização de uma molécula

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTO .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XXI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>XXV</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>XXVII</b>
<b>ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>35</b>
3.1 MICROSCOPIA DE VARREDURA POR TUNELAMENTO (STM).....	35
3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	36
3.2.1 <i>Modo Contato</i> .....	39
3.2.2 <i>Modo de Contato Intermitente</i> .....	39
3.3 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFS).....	40
3.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTAS DE AFM.....	42
3.5 MOLHABILIDADE E ENERGIA DE SUPERFÍCIE .....	44
3.6 TRABALHO DE ADESÃO .....	46
3.7 FORÇAS DE SUPERFÍCIE .....	47
3.7.1 <i>Forças de van der Waals</i> .....	47
3.7.2 <i>Força Capilar</i> .....	48
3.7.3 <i>Força de Adesão</i> .....	49

3.7.4	<i>Força Específica</i> .....	50
3.7.5	<i>Força de adesão Total</i> .....	51
3.8	HERBICIDAS E ENZIMAS .....	52
3.8.1	<i>Enzimas</i> .....	52
3.8.2	<i>Herbicidas Inibidores da Enzima ALS</i> .....	54
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
4.1	MATERIAIS.....	57
4.2	MÉTODOS.....	57
4.2.1	<i>Preparação e extração da enzima ALS</i> .....	57
4.2.2	<i>Metodologia empregada para funcionalização das pontas e dos substratos</i> <i>61</i>	
4.2.3	<i>Medidas de Espectroscopia de Força Atômica (AFS)</i> .....	63
4.2.4	<i>Caracterização das pontas</i> .....	64
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
5.1	RESULTADOS EXPERIMENTAIS .....	67
5.1.1	<i>Medidas de Espectroscopia no Infravermelho</i> .....	67
5.1.2	<i>Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das Pontas de AFM</i>	69
5.1.3	<i>Medidas ângulo de contato e energia de superfície</i> .....	71
5.1.4	<i>Medidas de curvas de força</i> .....	73
5.2	RESULTADOS TEÓRICOS.....	88
5.2.1	<i>Cálculo do trabalho de adesão</i> .....	88
5.2.2	<i>Cálculos da Força de Adesão usando os modelos DMT e JKR</i> .....	89
5.2.3	<i>Cálculos da força capilar</i> .....	91
5.2.4	<i>Cálculo da Força de Adesão Teórica Total</i> .....	92
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>101</b>

## ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Essa dissertação está dividida em 6 (seis) tópicos, como segue abaixo:

No tópico 1 (um), referente à **Introdução**, apresenta-se ao leitor um resumo sobre a problemática do desenvolvimento de métodos de detecção de herbicidas, e a modificação química de pontas de AFM para aplicação em nanobiossensores.

No tópico 2 (dois) são apresentados os **Objetivos** do estudo desenvolvido.

No tópico 3 (três), referente à **Fundamentação Teórica**, apresenta-se uma pesquisa bibliográfica referente ao desenvolvimento e aplicação do Microscópio de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM), seus modos de operação, as forças envolvidas na superfície em análise, o trabalho de adesão na interface, assim como uma descrição sobre o método do ângulo de contato. Este tópico aborda também uma discussão sobre as técnicas de Espectroscopia de Força Atômica (*Atomic Force Spectroscopy* - AFS) e Funcionalização de pontas de AFM, assim como relata as características da enzima Acetolactato Sintase (*Acetolactate Synthase* - ALS) e dos herbicidas inibidores da mesma.

No tópico 4 (quatro), referente à **Metodologia (Materiais e Métodos)**, são descritos os processos de funcionalização química das pontas de AFM funcionalizadas e caracterização das pontas de AFM funcionalizadas e não funcionalizadas, além dos processos de preparação das enzimas e herbicidas.

No tópico 5 (cinco), referente aos **Resultados e Discussões**, apresenta-se os resultados mais importantes e relevantes, correlacionados com os modelos teóricos. Além disso, elucida os testes de sensoriamento e seu grau de confiabilidade.

No tópico 6 (seis), referente a **Considerações Finais**, apresenta-se as principais conclusões do presente estudo, além de uma perspectiva para futuros trabalhos a serem desenvolvidos nessa área de pesquisa.



# 1 INTRODUÇÃO

O consumo de herbicidas na produção agrícola tem aumentado significativamente nos últimos anos. Apesar de beneficiar o aumento no rendimento da produção agrícola, seu acúmulo nos alimentos pode causar sérios danos à saúde humana. Uma pesquisa mundial estima que aproximadamente cerca de 3 (três) milhões de pessoas sejam gravemente envenenadas e cerca de 220.000 (duzentos e vinte mil) morrem anualmente em decorrência da bioacumulação desses compostos na cadeia-alimentar<sup>1</sup>.

Herbicidas são compostos químicos que agem diretamente em processos metabólicos. Eles foram desenvolvidos com o objetivo de proteger as plantações das pragas, porém o desvio desses compostos para o solo, água e ar vem ocasionando reações adversas aos organismos vivos e ao ecossistema<sup>2</sup>. A exposição humana a esses compostos pode provocar dores de cabeça, distúrbios endócrinos e até mesmo câncer<sup>3</sup>. Mesmo que sejam expostos a pequenas quantidades, danos irreparáveis podem ser causados à saúde humana, principalmente se a mesma ocorrer no estágio fetal ou na infância<sup>4</sup>. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias capazes de detectar pequenas quantidades desses agentes químicos, de forma rápida e eficaz, se torna bastante relevante. Nesse aspecto, a utilização de nanobiossensores tem se mostrado uma alternativa promissora na análise de compostos mesmo em baixas concentrações, sendo uma excelente alternativa para a detecção desses agentes herbicidas<sup>5,6,7,8</sup>.

Os nanobiossensores são dispositivos formados por biomoléculas com atividade catalítica em contato com um transdutor físico (eletroquímico, óptico, piezométrico) que converte o sinal químico em sinal biológico<sup>9</sup>. No presente trabalho, utilizaram-se pontas de AFM modificadas quimicamente, aplicando a Espectroscopia de Força Atômica (AFS) para estudar métodos de detecção de herbicidas inibidores enzimáticos. A modificação química das pontas de AFM permite a imobilização de moléculas, através de ligações covalentes, o que torna possível a investigação de interações específicas<sup>10</sup>.

Florin *et al.*<sup>11</sup>, introduziram o termo Microscopia de Força Química (CFM) em 1997 (mil novecentos e noventa e sete), eles estudaram a interação específica entre moléculas de avidina e biotina, através utilização da curva de força (AFS); a partir daí as duas técnicas vem sendo amplamente difundidas<sup>12,13,14,15,16</sup>, porém o uso de CFM e AFS para detecção de herbicidas ainda é inédito.

Nesse estudo, a enzima ALS foi imobilizada, através de ligações covalentes, à ponta do AFM, a fim de estudar as interações específicas que ocorrem entre a enzima ALS e os

herbicidas inibidores enzimáticos metsulfuron-metil e imazaquin. Esse estudo tem como objetivo principal o desenvolvimento de superfícies inteligentes com alta sensibilidade, em uma pequena área, demonstrando o potencial da técnica da AFS na detecção de contaminantes.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de “superfícies inteligentes” usando metodologias específicas de funcionalização química para o estudo dos mecanismos de ação de herbicidas e sua *posteriori* aplicação na detecção de contaminantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Realizar medidas de curva de força, empregando pontas de AFM funcionalizadas, para análise de reconhecimento molecular;
2. Desenvolver “*superfícies inteligentes*” usando metodologias específicas de funcionalização química;
3. Estudar interações específicas entre herbicidas e enzimas, (medidas de curva de força – espectroscopia de força).

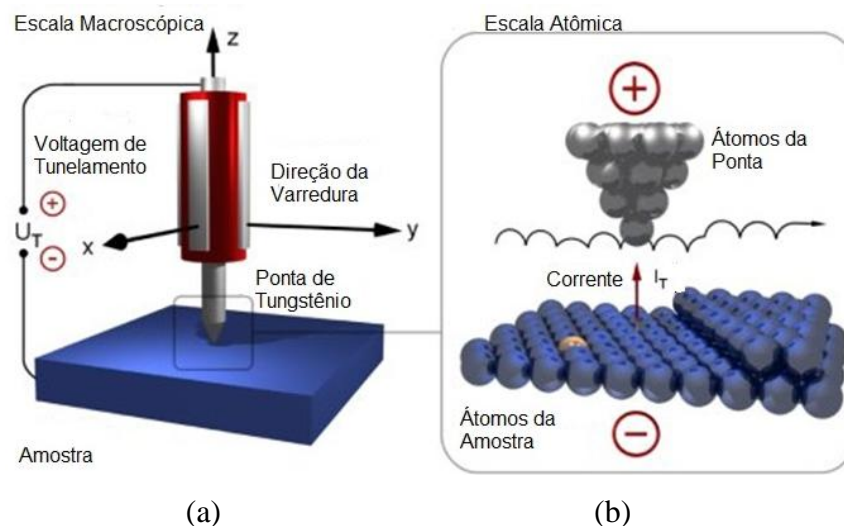


### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM)

O microscópio de varredura por tunelamento (*Scanning Tunneling Microscopy* – STM) foi inventado por Binnig *et. al.* Em 1982 (mil novecentos e oitenta e dois)<sup>17</sup>, no laboratório da IBM em Zurique; trata-se do primeiro microscópio capaz de realizar imagens topográficas em escala atômica. O funcionamento de um STM baseia-se em uma ponta de metal, normalmente de tungstênio, que é colocada a uma pequena distância da amostra, e que se desloca de acordo com a voltagem aplicada ao tubo piezelétrico (FIG. 1a). A resolução do STM depende da corrente de tunelamento ( $I_T$ ) e da distância entre a ponta e a amostra e o termo tunelamento está relacionado à transferência de elétrons da ponta para amostra (FIG 1b). Uma das limitações do STM é a necessidade de trabalhar somente com amostras condutoras, o que inviabiliza sua aplicação em amostras biológicas. A invenção do STM conferiu aos seus inventores o prêmio Nobel de Física em 1986 (mil novecentos e oitenta e seis).

FIGURA 1 – Funcionamento do STM.

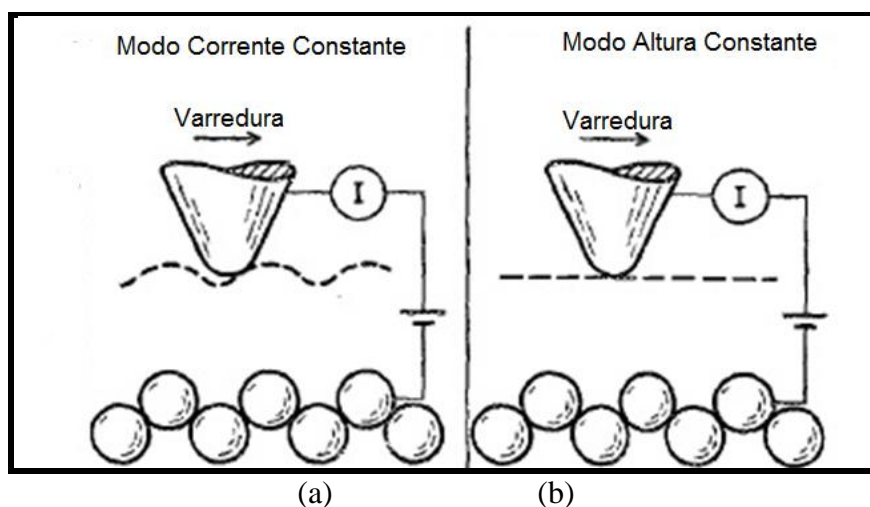


Fonte: WOEDTKE, S., Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física Experimental e Aplicada como pré-requisito à obtenção do título de doutor, Christian-Albrechts-Universitat, Kiel, 2002.

O STM possui dois modos básicos de operação: modo corrente constante e modo altura constante. No modo corrente constante, o sistema de realimentação desloca a ponta no eixo  $z$  para manter a corrente constante, e a distância entre a ponta e a amostra permanece a

mesma (FIG. 2a). No modo altura constante a ponta varre a amostra nos eixos  $x$  e  $y$ , e o sistema de realimentação reponde rapidamente a fim de manter o eixo  $z$  constante (FIG. 2b)<sup>18</sup>. Ressalta-se que além de obter imagem em escala atômica, utilizando o STM é possível também depositar ou retirar material de uma superfície. Essa técnica é chamada de litografia e foi introduzida em 1986 (mil novecentos e oitenta e seis) por Abraham<sup>19,20</sup>.

FIGURA - 2: Modos de operação STM (a) corrente constante. (b) altura constante



Fonte: HANSMA, P. K., TERSOFF, J., Scanning tunneling microscopy, *J. Appl. Phys.* v.61 n.2, janeiro 1987.

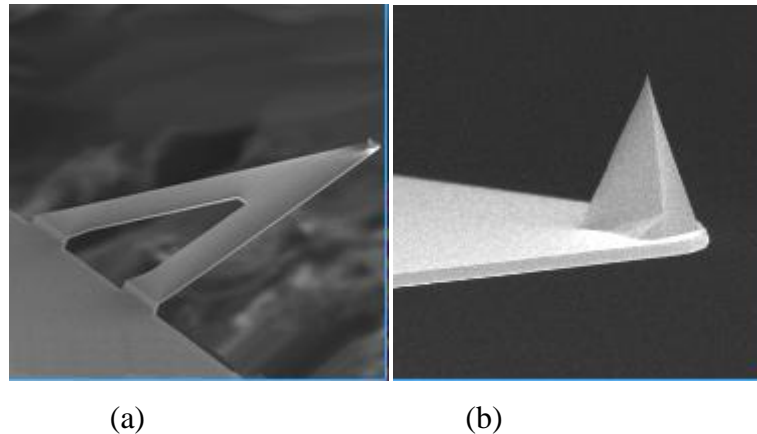
### 3.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Em 1986 (mil novecentos e oitenta e seis), Binnig, Quate e Gerber desenvolveram o AFM (FIG. 3a), eles combinaram os princípios do STM com um perfilômetro *Stylus* (instrumento utilizado para medir a rugosidade de superfícies)<sup>21</sup>. O princípio fundamental do AFM é a obtenção de imagens da superfície através da deflexão de um cantiléver, essas deflexões são causadas por forças repulsivas ou atrativas existentes entre a ponta de prova e a amostra. A escolha da ponta depende diretamente do material a ser analisado e do modo de operação escolhido. Para realizar medidas de curva de força normalmente são utilizadas pontas de silício (Si) ou nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ); o cantiléver fica preso a um substrato rígido (FIG. 3a), e na extremidade livre do cantiléver fica localizada a ponta de prova (FIG. 3b), o cantiléver funciona como uma mola nanométrica que permite que as interações ponta-amostra sejam medidas, de maneira geral a ponta tem formato piramidal.

O AFM, ao contrário do STM, permite a análise de amostras não condutoras, além disso, é capaz de obter imagens em meio líquido, possibilitando a análise de biomoléculas,

sem modificar as características de seu meio natural e conservando suas propriedades. A preparação das amostras em geral é bastante simples e a técnica é não destrutiva.

FIGURA 3 – Ilustração do cantiléver (a) e da ponta de prova (b).



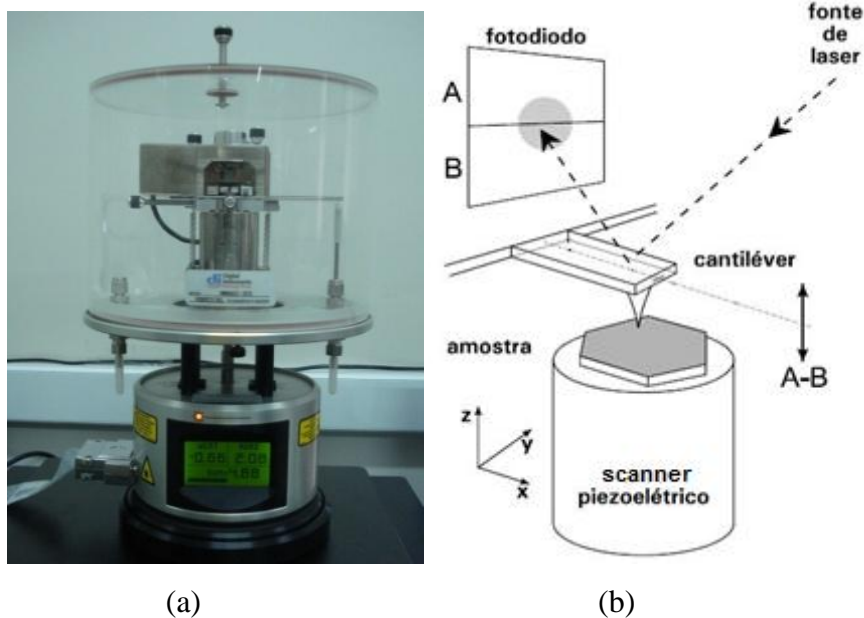
Fonte: (a)<http://www.brukerafmprobes.com/>, (b)<http://www.brukerafmprobes.com/>, acessado 15/01/2012 às 16:40h.

Um fator importante no funcionamento do AFM é o local onde o aparelho será alocado (FIG. 4a), devendo ficar sobre uma plataforma sem vibração, já que uma pequena perturbação pode afetar a interação ponta-amostra. O seu funcionamento se dá por meio de uma fonte de laser que incide sobre o cantiléver que normalmente tem uma pequena camada de ouro para uma boa reflexão. O laser refletido é detectado por um fotodiodo que indica a posição e assim é obtida a deflexão do cantiléver (FIG. 4b). Tal deflexão ocorre devido à interação ponta-amostra, e com o auxílio de um *software* específico, esses dados são transformados em imagem. A topografia é proporcional à variação do eixo Z, que é controlada por cerâmicas piezelétricas (obtidas a partir de soluções sólidas de  $\text{PbZrO}_3 - \text{PbTiO}_3$ <sup>22</sup>). Essas cerâmicas expandem-se ou contraem-se nanometricamente quando uma tensão é aplicada. A força de interação entre a ponta e a amostra é medida pela lei de Hooke<sup>12</sup>:

$$F = Kz \quad (1)$$

onde F é a força, K é a constante elástica e z é a deflexão do cantiléver que foi detectada pelo fotodiodo.

FIGURA 4 - (a) AFM *Multimode V* instalado no Laboratório de Nanociência e Nanoscopia da Universidade Federal de São Carlos - *campus* Sorocaba. (b) Esquema do funcionamento geral do AFM.



(a)

(b)

Fonte – (a) SILVA, A.C.N.

(b) LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. DRELICH, J.; MITTAL, K.L. Atomic Force Microscopy in Adhesion Studies. Boston. Leiden. 2005. p. 03-43.

Os modos de varredura variam de acordo com a distância entre a ponta e a amostra e o movimento da ponta em relação à superfície a ser investigada. A escolha do modo de operação adequado depende do tipo de amostra e do tipo de informação a ser extraída dessa imagem. Em geral, podemos citar dois modos de operação, que estão diretamente relacionados com as forças entre a ponta e a amostra: (i) modo contato (*contact mode*) e (ii) modo de contato intermitente (*tapping mode*). Quando o AFM opera na região onde a força entre a ponta e a amostra é repulsiva, temos o modo contato, quando a força varia entre atrativa e repulsiva, observa-se o modo de contato intermitente. Ambos os modos de operação serão discutidos a seguir.

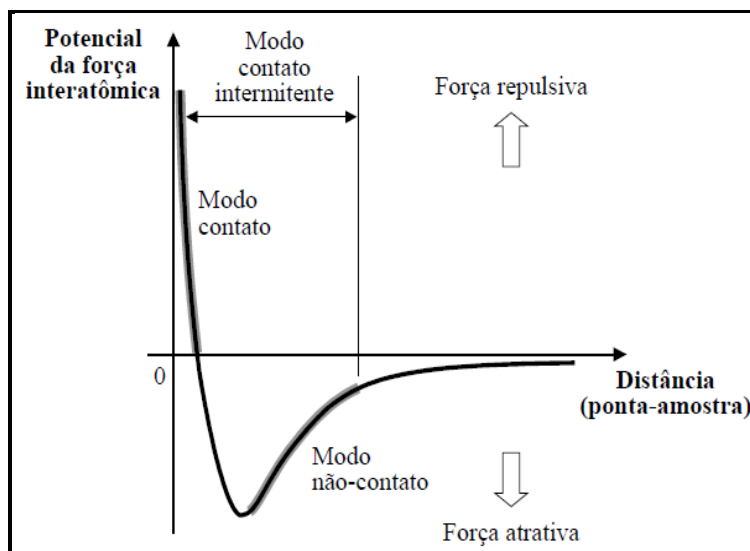
### **3.2.1 Modo Contato**

O modo contato é o mais utilizado para obtenção de imagens. Nesse modo de operação a ponta fica o tempo todo em contato com a amostra e a força de atração que mantém a ponta em contato com superfície é da ordem de 100 e 1 nN<sup>23</sup>. O sistema de realimentação mantém constante a força exercida pela ponta sobre a amostra, através da deflexão do cantiléver detectado pelo fotodiodo. A ponta é montada, preferencialmente, sobre um cantiléver de formato piramidal. A sua constante elástica deve ser baixa, em geral menor do que 1N/m, para assegurar que não ocorrerá deformação da amostra quando o cantiléver flexionar, além de garantir que o cantiléver será suficientemente flexível e não irá quebrar.

### **3.2.2 Modo de Contato Intermitente**

No modo de operação de contato intermitente a ponta fica oscilando em alta frequência e toca suavemente a superfície, de maneira que essa oscilação impede que a ponta fique presa à amostra. A força de atrito é quase desprezível o que permite a análise de amostras mais moles, tais como amostras biológicas, sem danificá-las. As forças são tanto atrativas quanto repulsivas: quando a ponta não está em contato com a superfície a natureza da força é atrativa, a ponta vai se aproximando da superfície até que se inicie o contato, a partir desse momento a natureza da força é repulsiva (FIG. 5). Em geral, as pontas utilizadas para esse modo de imagem são montadas em cantiléveres retangulares, mas pode ser utilizado o cantiléver em formato V. Com relação à constante elástica do cantiléver, quanto maior for a constante elástica, mais rígido será o cantiléver e maior sua frequência de oscilação.

FIGURA 5 - Forças de interação ponta-amostra.



Fonte: Adaptado de :LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. DRELICH, J.; MITTAL, K.L. Atomic Force Microscopy in Adhesion Studies. Boston. Leiden. 2005. p.03-43.

### 3.3 Espectroscopia de Força Atômica (AFS)

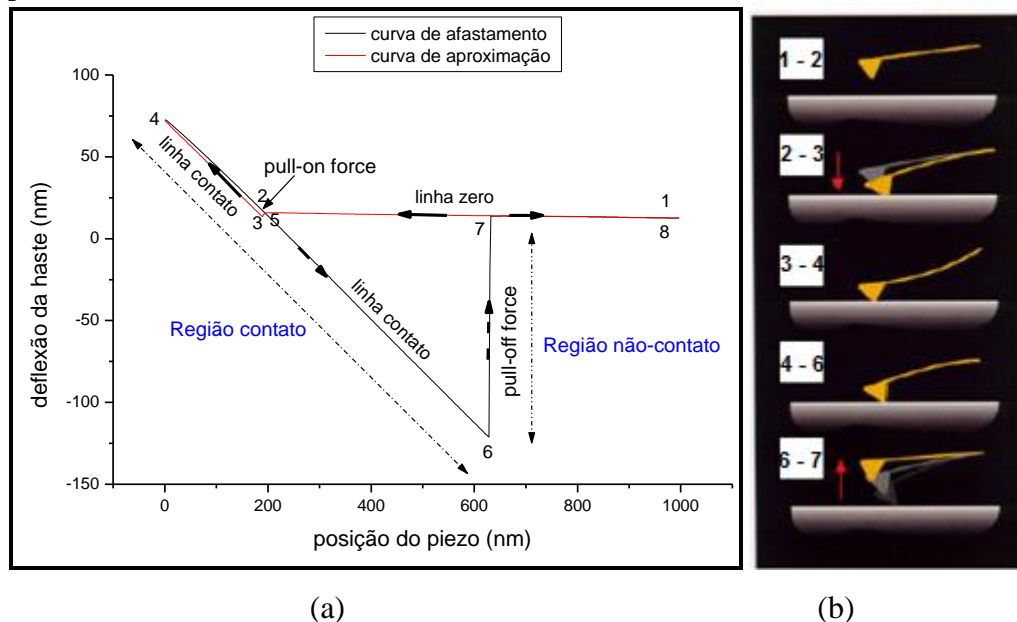
Desde a invenção do AFM em 1986 (mil novecentos e oitenta e seis) por Binning *et al.*<sup>21</sup>, ele vem sendo amplamente utilizado para obtenção de imagens topográficas. No entanto, também é possível medir as interações que ocorrem entre a ponta e a amostra no momento do desprendimento da ponta, essas medidas são conhecidas como curvas de força (FIG. 6a)<sup>24</sup>. Em uma curva de força a ponta aproxima-se da amostra até entrar em contato com a superfície (*pull-on force*) e afasta-se (*pull-off force*). Esse movimento é realizado de acordo com a voltagem aplicada ao piezelétrico e essas medições tornam possível a obtenção de informações sobre as forças de superfície presentes. Através da curva de força é possível determinar alguns parâmetros como: a força de adesão, que é a força requerida para que a ponta desprenda-se da amostra<sup>25</sup>; *i.e.*, a força atrativa máxima; além de outros dados tais como as propriedades mecânicas do material quando se observa a inclinação da curva e a dureza do material através da observação da histerese. As curvas de força podem ser empregadas na investigação de todas as forças superficiais conhecidas, e vêm sendo empregadas em diversas áreas de pesquisa tais como engenharia de materiais, bioquímica e biotecnologia<sup>46</sup>.

Analisando a FIG. 6b, podemos observar que do ponto 1 (um) até o ponto 2 (dois) não há contato entre a ponta e a superfície. Em seguida o scanner piezelétrico estende-se para



que a ponta possa fazer contato com a superfície e assim, do ponto 2 (dois) até o ponto 3 (três), a ponta entra em contato com a superfície devido a forças atrativas presentes. Do ponto 3 (três) ao ponto 4 (quatro) a ponta está pressionada contra a superfície e o cantiléver se desloca para cima. Caso a constante elástica da ponta seja alta, a mesma é capaz de fazer uma indentação na superfície, a qual pode fornecer informações sobre a elasticidade da superfície da amostra. Do ponto 4 (quatro) ao ponto 5 (cinco) o *scanner* piezelétrico começa a se retrainr, o cantiléver tende a equilibrar-se com as forças de superfície. Em seguida, do ponto 5 (cinco) ao 6 (seis), o scanner piezelétrico continua retraindo-se, o cantiléver se curva para baixo devido a força de atração que a superfície exerce sobre a ponta, de maneira que a ponta continua em contato com a superfície devido às forças de adesão e de ligação. Do ponto 6 (seis) até o ponto 7 (sete) ocorre a ruptura do contato entre a ponta e a superfície, o cantiléver retorna ao ponto inicial. Com a diferença entre esses dois pontos é possível medir a força de adesão entre a ponta e a superfície. Do ponto 7 (sete) ao 8 (oito) observa-se que já não há mais nenhum contato entre a ponta e a superfície<sup>26</sup>.

FIGURA 6 – Curva de força por Microscopia de Força Atômica. (a) ilustrando todas as possíveis regiões e os pontos onde ocorrem o desprendimento (*pull-off force*) e a atração da haste (*pull-on force*), e (b) ilustrando o movimento da haste em relação às forças de interação no sistema ponta–amostra



Fonte: LEITE, F. L., Fundamentos Teóricos. Estudos de Filmes de Polímeros Condutores por Microscopia de Força Atômica: Processos de Adsorção e Propriedades Eletrônicas Cap 1, p. 19-22. Tese. Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

### 3.4 Funcionalização de pontas de AFM

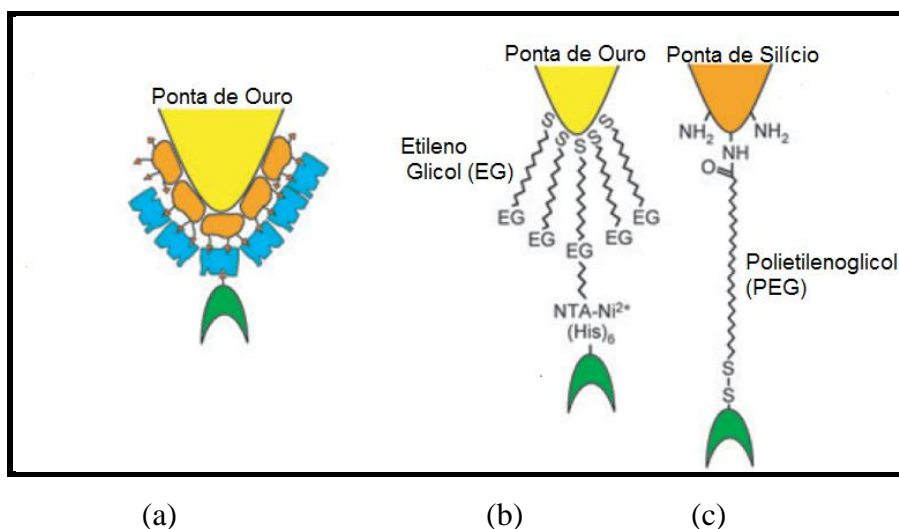
A modificação química de pontas de AFM permite a investigação de interações específicas entre a ponta e a amostra. A técnica vem sendo aplicada no estudo das forças existentes entre biomoléculas, devido, principalmente, resolução nanométrica<sup>27</sup>.

Durante a varredura, a ponta do AFM contendo os ligantes entra em contato com a superfície onde estão os respectivos receptores, formando um tipo de ligação que é denominado “chave-fechadura”. Em seguida, a ponta é retraída, a força aplicada pelo sistema de realimentação é aumentada até que a ponta desprende-se da superfície. Para que ocorra a ligação específica, *i.e.*, o reconhecimento, é necessário que os ligantes sejam ligados fortemente à ponta de AFM, seja por ligação covalente ou por forças eletrostáticas.

As interações específicas que ocorrem entre fitas complementares de DNA, enzima-substrato, lectina-carboidrato, antígeno-anticorpo são relevantes, pois participam dos processos biológicos mais importantes, dentre os quais podemos citar replicação e transcrição genômica, atividade enzimática, resposta imunológica, início de uma infecção dentre outras funções celulares. A especificidade e a seletividade dessas ligações vêm sendo empregadas na fabricação de biossensores. Dentre as metodologias existentes para modificação química de pontas de AFM, duas estão sendo mais explorada nos últimos anos, a primeira utiliza pontas de ouro (FIG. 7a), ou recobertas com ouro<sup>28</sup>, e grupos tióis ligados covalentemente para a funcionalização com biomoléculas. A segunda trabalha com pontas de silício ou nitreto de silício oxidado, ao serem expostas ao ar ou à água elas oxidam naturalmente, formando uma camada de óxido que contém uma grande quantidade de grupos reativos Si-OH, esses grupos reagem fortemente com silanos ou alcoóis<sup>29,30</sup> (FIG.7c). Ainda é possível a utilização do polímero polietilenoglicol (PEG)<sup>31</sup> (FIG. 7c), ou etilenoglicol mais curto (FIG. 7b), como espaçador flexível entre a biomolécula e a ponta. Esse espaçador proporciona uma maior flexibilidade ao ligante, permitindo assim que ele ligue-se livremente ao receptor<sup>32</sup>. Assim como o ligante, o receptor deve ser ligado fortemente à superfície, evitando assim que o mesmo desprenda-se durante a execução da curva de força<sup>33</sup>.

As pontas recobertas com ouro ligam-se a grupos tióis, porém a deposição desse filme acrescenta cerca de 20nm ao raio da ponta, o que ocasiona perda de resolução<sup>30</sup>. Portanto, para evitar esses inconvenientes, no presente trabalho, utilizou-se ponta de nitreto de silício oxidado modificada com grupos silanos.

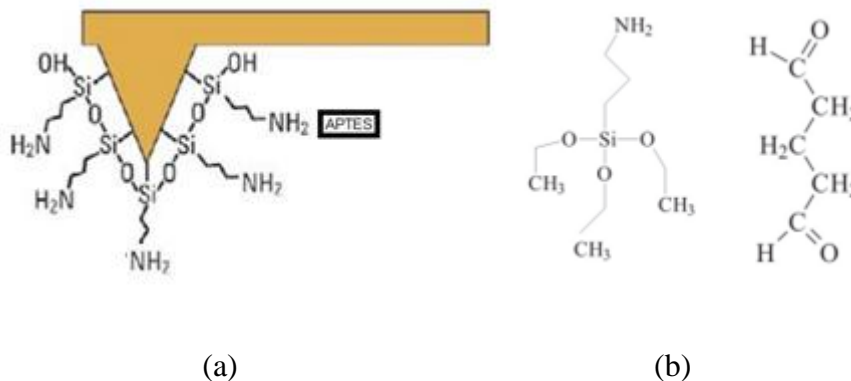
FIGURA 7 - (a) Funcionalização em pontas de ouro. (b) Funcionalização em pontas de ouro com etilenoglicol curto (c) Funcionalização em pontas de silício com PEG.



Fonte: HINTERDORFER, P., DUFRÊNE, Y., F., Detection and localization of single, molecular recognition events using atomic force microscopy, *Nat. Met.* v.3 n.5 p. 347-355 maio 2006.

A silanização das pontas de AFM pode ser feita através da reação de aminosilanos, que são compostos que possuem um grupo silano em uma das extremidades e um grupo amina na outra, visando a formação de um filme fino de grupos amina (FIG. 8a). A reação de aminosilanos em solventes como tolueno, etanol ou acetona, pode ser utilizada para a funcionalização, porém essa reação tende a polimerizar em solução o que resulta na adição de massa e rugosidade à ponta de AFM<sup>30</sup>. Esse problema pode ser solucionado facilmente, visto que as reações de silanização da superfície podem ser realizadas em fase de vapor, utilizando-se 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) (FIG. 8b) recém destilado<sup>30</sup>. Essa reação resulta em uma superfície recoberta com grupos amina que posteriormente podem reagir com outros grupos funcionais, como aldeídos. Como exemplo, pode-se citar o glutaraldeído, composto que possui grupo aldeído nas duas extremidades e que é empregado como cross-linking em reações envolvendo proteínas. O glutaraldeído reage com resíduos do aminoácido lisina e forma aductos estáveis,<sup>34, 35</sup> o que motivou a utilização desse método no presente trabalho para a imobilização da enzima ALS na ponta do AFM.

FIGURA 8 - (a) Esquema da ligação do APTES à ponta do AFM. (b) Estrutura molecular do APTES e glutaraldeído, respectivamente.



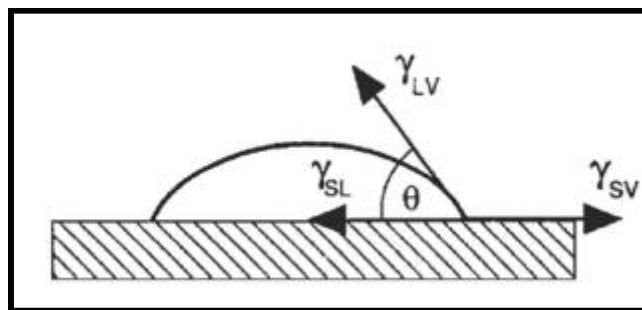
Fonte: SILVA, A.C.N.

### 3.5 Molhabilidade e Energia de Superfície

A molhabilidade depende diretamente do balanço das energias interfaciais sólido-líquido-vapor do sistema. Materiais que absorvem líquidos são conhecidos como hidrofílicos e apresentam um ângulo de contato de até  $90^\circ$ , já outros materiais que são capazes de resistir à entrada de líquido em sua estrutura são chamados hidrofóbicos, e apresentam ângulos superiores a  $90^\circ$ <sup>36</sup>.

O ângulo de contato formado por uma gota e uma superfície depende da relação entre as forças adesivas, responsáveis pelo espalhamento da gota na superfície, e as forças coesivas do líquido que contraem a gota na forma de esfera. O ângulo depende das tensões existentes entre as fases sólida, líquida e vapor, conforme esquematizado na (FIG.9)<sup>37</sup>.

FIGURA 9– Representação das tensões atuantes no sistema sólido-líquido.



Fonte: LUZ, A. P., RIBEIRO, S., PANDOLFELLI, V.C., Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cer.* v.54 p. 174-183 2008

Existem três interfaces descritas por uma gota de líquido em repouso sobre uma superfície sólida: a parte inferior do líquido, que está em contato com a superfície sólida e representa a interface sólido-líquido; o restante da superfície do sólido, que está em contato com um gás acima, tipicamente de vapor do líquido e/ou ar e representa a interface sólido-vapor; e a região superficial do líquido que está em contato com o gás acima e representa a interface líquido-vapor. A existência de três regiões interfaciais resulta em três energias de superfície interfacial. A forma de cúpula que a gota adquire pode ser descrita por um ângulo de contato, que se forma entre uma linha traçada ao longo da interface sólido-líquido e uma linha tangente à gota na interface sólido-líquido e líquido-vapor.

A energia interfacial de cada material está diretamente ligada à adesão entre os materiais. O arranjo dos átomos na superfície dos materiais apresenta forma diferenciada quanto à disposição atômica em relação ao volume interno. Este tipo de diferença acaba ocasionando a elevação do nível de energia livre na superfície, fazendo com que ocorra uma tendência maior na adsorção dos átomos e moléculas estranhas. Isto ocorre devido ao fato de que quanto maior a energia por unidade de superfície, maior será a possibilidade de surgirem reações entre a superfície do material e materiais estranhos. Além disso, podem ocorrer modificações na composição da superfície original. Uma das abordagens mais utilizadas para cálculo da energia de superfície dos materiais é a teoria de Owens-Wendt<sup>38</sup>. Nesse método são assumidos componentes polares (interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio) e apolares (forças dispersivas) para a energia de superfície, sendo combinados como uma média geométrica<sup>39</sup>:

$$W_{SL} = \gamma_L(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (2)$$

onde  $\gamma_S^p$  e  $\gamma_S^d$  são as energias de superfície polar e dispersiva do sólido, respectivamente, e  $\gamma_L^p$  e  $\gamma_L^d$ , as energias de superfície polar e dispersiva do líquido.

Dividindo a Equação (2) por  $2\sqrt{\gamma_L^d}$ , temos:

$$\frac{\gamma_L(1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^d} + \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} \sqrt{\gamma_S^p} \quad (3)$$

A Equação (3) fornece um gráfico,  $\gamma_L(1 + \cos\theta)/2\sqrt{\gamma_L^d}$  versus  $\sqrt{\gamma_L^p/\gamma_L^d}$ , onde o coeficiente linear da reta é,  $\sqrt{\gamma_s^d}$ , e o coeficiente angular,  $\sqrt{\gamma_s^p}$ . Assim, os valores de energia superficial do material sólido podem ser encontrados<sup>48,40</sup>.

### 3.6 Trabalho de Adesão

Para poder calcular a força de adesão entre a ponta de AFM e a amostra é necessário encontrar o valor do trabalho de adesão,  $W_{ikj}$ , onde a ponta é representada por (  $i$  ), o substrato por (  $j$  ), em um meio (  $k$  ). O trabalho de adesão, conceito primeiramente introduzido por Harkins<sup>41</sup>, pode ser calculado através de um sistema simples, onde um líquido adere a um sólido e está definido pela seguinte equação:

$$W_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (4)$$

onde  $\gamma_s, \gamma_L$  e  $\gamma_{SL}$  são, respectivamente, as tensões interfaciais entre sólido/vapor, líquido/vapor e sólido/líquido.

A análise se caracteriza pela deposição de uma gota de um determinado líquido polar, e outro apolar (com valores conhecidos e padronizados de energia superficial) no plano superficial de uma amostra sólida. Em seguida, faz-se a medição do ângulo que se forma entre a gota e a superfície da amostra<sup>48</sup>. Na sequência, com as medidas do ângulo de contato e com o auxílio do modelo físico-matemático Owens-Wendt<sup>38</sup> é possível determinar valores de energia de superfície.

Ressalta-se que a Equação 4 é pouco utilizada isoladamente, pois das três tensões somente  $\gamma_L$  pode ser medida com precisão. Desta forma, nesse trabalho foi utilizada uma aproximação semi-empírica (Equação 5)<sup>42, 43, 48</sup> para calcular o trabalho de adesão entre a ponta funcionalizada, não funcionalizada e os substratos contaminados com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil.

$$W_{ij} = \frac{4\gamma_i^d \gamma_j^d}{\gamma_i^d + \gamma_j^d} + \frac{4\gamma_i^p \gamma_j^p}{\gamma_i^p + \gamma_j^p} \quad (5)$$

Onde o trabalho da adesão ( $W_{ij}$ ) é determinado pela relação entre as energias de superfície polares e dispersivas das superfícies em estudo, em que a ponta é representada por (  $i$  ) e o substrato por (  $j$  ).

Os valores das energias de superfícies podem ser encontrados usando métodos e equações específicas, conforme descrito no tópico 3.5.

### 3.7 Forças de Superfície

Nesse tópico foi realizada uma revisão teórica sobre as principais forças presentes no sistema ponta-amostra, em especial, no sistema estudado nessa dissertação. Essas forças podem influenciar diretamente a determinação de curvas de força, desta forma, a elucidação dessas forças servirá de referência para análise dos dados obtidos. Também serão apresentadas duas teorias que tratam a adesão esfera-plano, que são aproximações teóricas que podem explicar de forma satisfatória os resultados obtidos nessa pesquisa.

#### 3.7.1 Forças de van der Waals

Estas interações desempenham um papel importante para uma série de fenômenos como **adesão, tensão superficial, adsorção física, molhabilidade**, entre outros. As forças de van der Waals são consideradas atrativas de longo alcance e repulsivas de curto alcance e estão presentes entre todos os átomos e moléculas<sup>12</sup>, além de serem relevantes para o nosso sistema, pois descrevem as interações existentes entre a ponta de prova e a amostra.

Tais forças classificam-se em três componentes diferentes: Força de Orientação ou Força de Keesom, Força de Indução ou Força de Debye, Força de Dispersão ou Força de London<sup>12</sup>.

A Força de Keesom é responsável pela interação dipolo-dipolo entre átomos e moléculas (dipolos permanentes) e é uma das três interações que variam de acordo com a razão  $1/r^6$ :

$$w_K(r) = - \frac{u_1^2 u_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 K T r^6} \text{ for } K T > \frac{u_1 u_2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r^3} \quad (6)$$

onde  $u_1$  e  $u_2$  são os momentos de dipolo das moléculas,  $\epsilon$  é a permissividade elétrica do meio,  $\epsilon_0$  é a permissividade elétrica do vácuo,  $K$  é a constante de Boltzman e  $T$  é a temperatura,  $r$  é a distância entre os dipolos.

A Força de Debye é responsável pela interação dipolo-dipolo induzido entre dois átomos ou moléculas:

$$w_D(r) = - \frac{[u_1^2 \alpha_{02} + u_2^2 \alpha_{01}]}{(4\pi\epsilon_0 \epsilon)^2 r^6} \quad (7)$$

onde  $\alpha_{01}$  e  $\alpha_{02}$  são as polarizabilidade eletrônica das moléculas.

A Força de London, também chamadas de forças de dispersão (entre dipolos instantaneamente induzidos), compõem a terceira e possivelmente a mais importante contribuição para a força de van der Waals já que elas estão sempre presentes; as outras duas forças podem ou não estar presentes, dependendo das propriedades das moléculas:

$$W_L(r) = -\frac{C_L}{r^6} = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \frac{hv_1 hv_2}{v_1 + v_2} \quad (8)$$

onde  $v_1$  e  $v_2$  são o primeiro potencial de ionização de cada molécula,  $h$  e a constante de Plank.

Assim, com a somatória dessas três forças tem-se a força de van der Waals:

$$W_{vdw}(r) = -\frac{3K_b T}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \left( \frac{u_1^2}{3K_b T} + \alpha_{01} \right) \left( \frac{u_2^2}{3K_b T} + \alpha_{02} \right) - \frac{3}{2} \frac{\alpha_{01}\alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \frac{hv_1 hv_2}{v_1 + v_2} \quad (9)$$

Ou, de forma resumida:

$$W_{vdw}(r) = \frac{C_{ind} + C_{orient} + C_{disp}}{r^6} = -\frac{C_{vdW}}{r^6} \quad (10)$$

onde  $C_{ind}$ ,  $C_{orient}$ , e  $C_{disp}$  são os coeficientes devido à indução, orientação e dispersão, respectivamente. Essa equação em conjunto com a interação repulsiva, devido à sobreposição entre os elétrons da nuvem eletrônica dos átomos, descreve a interação entre moléculas isoladas no vácuo.

### 3.7.2 Força Capilar

Em condições ambientes, a medição de força de adesão através de curvas de força é difícil, pois forma-se um filme de água sobre a superfície em análise, de maneira que essa fina camada de água dá origem a força de capilaridade que normalmente é maior do que uma interação química específica. Foi estudado um sistema esfera-plano, pois é o sistema que mais se aproxima da ponta de AFM sobre a superfície em análise. Israelachvili<sup>44</sup> considerou um sistema esfera-plano e calculou através da equação de Kelvin e da pressão de Laplace a força de capilaridade que mantém a esfera no plano. Líquidos que possuem pequeno ângulo de contato se condensam espontaneamente na superfície. Em equilíbrio, o raio de curvatura do menisco ( $1/r_1 + 1/r_2$ ) está relacionado com a pressão relativa de vapor ( $P/p_s$ ), que está representado pela equação de Kelvin (foi considerado um menisco simétrico ( $r_1 = r_2 = r$ ) em que  $R_{ponta} \gg r_{menisco}$ ):

$$\left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) = r_K = \frac{\gamma_{LV}}{RT \log\left(\frac{P}{p_s}\right)} \quad (11)$$



onde  $r_K$  é o raio de Kelvin,  $V$  é o volume molar,  $p/ps$  é a pressão relativa de Laplace,  $R$  é a constante dos gases e  $\gamma_L$  é a energia da superfície do líquido. O efeito desse líquido condensado na superfície sobre a força de adesão entre uma esfera e um plano é dado considerando-se a pressão de Laplace no líquido. Desta forma, a força atrativa devido à força capilar ( $F_c$ ) é<sup>44</sup>:

$$F_c = \frac{2\pi R \gamma_L (\cos \theta_1 + \cos \theta_2)}{(1+D/d)} \quad (12)$$

onde  $D$  é distância entre a esfera e o plano,  $\theta_1$  e  $\theta_2$  são os ângulos de contato entre a água e o plano e a água e a esfera, respectivamente.

A máxima atração ocorre quando  $D=0$ , onde:

$$F_c = F_{c \max} = 2\pi R \gamma_L (\cos \theta_1 + \cos \theta_2) \quad (13)$$

Para duas superfícies idênticas  $\theta_1 = \theta_2$ , então:

$$F_c = F_{c \max} = 4\pi R \gamma_L \cos \theta \quad (14)$$

Note que,  $\theta$  é o ângulo de contato do menisco em relação à ponta de AFM e em relação à superfície.

### 3.7.3 Força de Adesão

Serão apresentadas duas teorias que auxiliarão na elucidação dos mecanismos de adesão esfera-plano e que consideram o efeito da energia de superfície na deformação do contato. Foram analisadas as duas teorias com objetivo de compará-las. Na teoria de Derjaguin – Muller – Toporov<sup>45</sup>, a esfera elástica é deformada de acordo com a teoria de Hertz, mas em adição a carga externa, as forças agindo entre os dois corpos fora da região de contato também são levados em consideração. Essas forças produzem uma área finita de contato e, se uma carga externa é aplicada, a área de contato é aumentada. Se uma carga negativa é aplicada, a área de contato diminui até que ela alcance o valor zero, de maneira que quando isso ocorre, a força de desprendimento alcança seu máximo valor. A expressão correspondente é:<sup>45,46</sup>

$$F_{ad} = 2\pi R_t W_{ikj} \quad (15)$$

onde  $R_t$  é o raio da ponta, e  $W_{ikj}$  é o trabalho de adesão entre duas superfícies  $i$  e  $j$  num meio  $k$  (vide Equação 5). A teoria de DMT pode ser aplicada em sistemas adesivos com baixa adesão e esferas de pequeno raio.

A teoria Johnson – Kendall – Roberts<sup>47</sup> negligencia forças de longo alcance fora da área de contato e considera somente forças de curto alcance dentro da região de contato. A expressão correspondente é<sup>47</sup>:

$$F_{ad} = \frac{3}{2} \pi R_t W_{ikj} \quad (16)$$

A teoria JKR deve ser utilizada em sistemas altamente adesivos, com baixa rigidez e grande raio da ponta de prova. Uma dificuldade encontrada nessa teoria é que ela prevê uma tensão infinita no canto da área de contato. Essa situação, que não se encaixa na física, se torna ainda mais complicada, pois a teoria JKR considera somente forças dentro da área de contato e implicitamente assume que a força atrativa atua sob uma área muito pequena<sup>46,48</sup>.

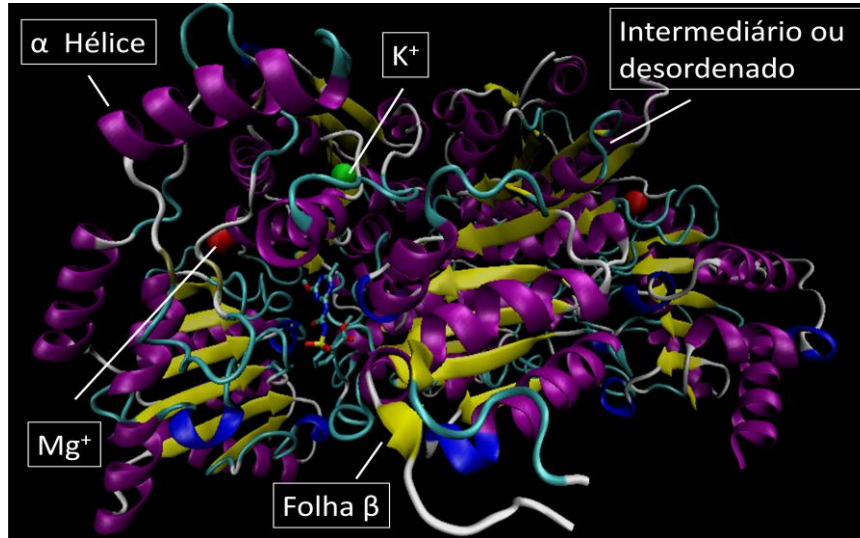
Ambas as teorias não devem ser aplicadas quando ocorrer uma deformação plástica ou elasto-plástica na superfície, nesse caso a teoria de *Maugis-Pollock* deve ser aplicada<sup>49</sup>.

### 3.7.4 Força Específica

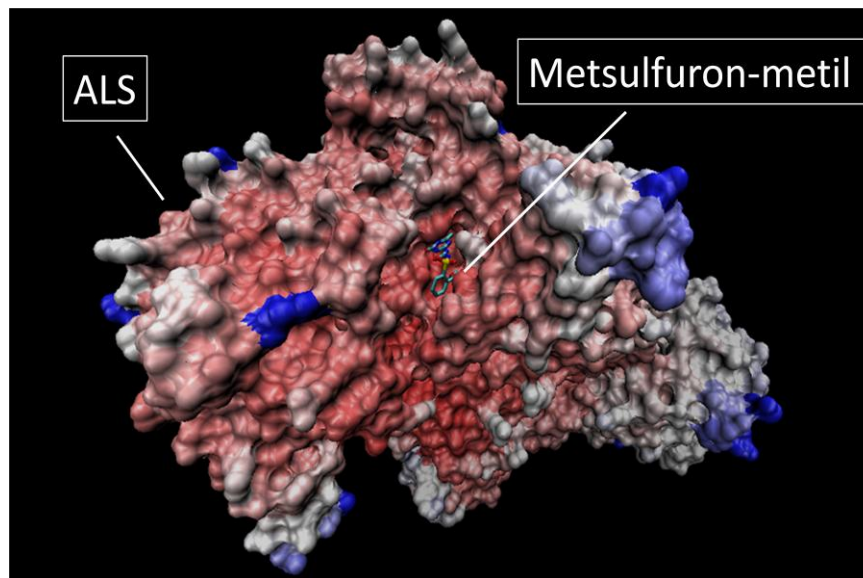
Forças específicas são forças não-covalentes que geram uma adesão muito forte entre grupos moleculares. O termo “força específica” refere-se a todas as forças que estão presentes entre duas moléculas especificamente<sup>50,46</sup>. A grande maioria das interações que ocorrem entre biomoléculas são devido à força específica, sendo que, na maioria das vezes, essas forças são favorecidas pela geometria de interação entre essas moléculas. Quando duas biomoléculas se encaixam perfeitamente, esse tipo de ligação pode ser chamado “chave-fechadura”, “complementar” ou “ligante-receptor”<sup>46</sup>. É importante lembrar que ligações específicas podem ser tão fortes quanto às ligações químicas como as do tipo covalente<sup>50</sup>.

É possível medir essas forças específicas utilizando o AFM, para isso é necessário funcionalizar quimicamente as pontas de AFM (verificar os itens 3.3 e 3.4) com uma molécula que se ligue especificamente à outra<sup>51</sup>. A FIG. 10 ilustra a ligação específica entre a enzima ALS e o herbicida metsulfuron-metil em dois tipos diferentes de representação. Na FIG 10a estão representados dois tipos de enovelamento secundário, a cor roxa representa a estrutura secundária helicoidal alfa-hélice, a cor amarela representa a estrutura secundária planar folha-beta, as esferas vermelhas representam o íon  $Mg^+$ , a esfera verde o íon  $K^+$ . Na FIG 10b a cor azul indica a estrutura secundária alfa-hélice e a cor vermelha indica a estrutura secundária beta-hélice, esse tipo de representação destaca a superfície da macromolécula e permite observar de maneira mais clara a ligação enzima-herbicida.

FIGURA 10 – Modelagem molecular da ligação específica entre a enzima ALS e o herbicida metsulfuron-metil. (a) representação tipo-enovelamento de um dímero da enzima ALS, com o respectivo herbicida interagindo no sítio ativo (b) representação (*surface*) que destaca a ligação enzima-herbicida.



(a)



(b)

Fonte: AMARANTE, A. M.

### 3.7.5 Força de adesão Total

A força de adesão teórica total entre a ponta do AFM e a amostra pode ser dada por<sup>51</sup>:

$$F_{total}^{ar} = F_{cap} + F_{DMT/JKR} \quad (17)$$

onde  $F_{cap}$  refere-se à força capilar (Equação 13),  $F_{DMT/JKR}$  refere-se às duas teorias que podem ser aplicadas para o cálculo teórico da adesão (Equação 15 ou 16, respectivamente)<sup>1</sup>. A força de adesão total experimental entre a ponta e a amostra possui uma nova componente referente a interação específica, que não está incluso na Eq. (17). Para essa interação ainda não existe uma equação ou relação matemática que possa explicá-la. Entretanto, no tópico 5.2.4 quantificamos de forma semi-empírica o valor da força específica, utilizando os modelos matemáticos e os resultados experimentais.

### **3.8 Herbicidas e Enzimas**

#### **3.8.1 Enzimas**

As enzimas representam uma classe especial de proteínas altamente especializadas que catalisam reações químicas nos sistemas biológicos. Basicamente as enzimas convertem uma substância, genericamente chamada de substrato em outra, denominada produto. Esta conversão ocorre no sítio ativo, interior da enzima onde resíduos específicos de aminoácidos se ligam ao substrato e catalisam sua transformação. Sem a catálise enzimática as reações químicas que são imprescindíveis para a vida humana podem levar anos para ocorrerem, enfatizando a importância das enzimas em todos os processos biológicos. Quase todas as enzimas são proteínas com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas. Algumas enzimas necessitam de um componente químico adicional para exercer sua atividade catalítica: esse grupo é chamado de cofator, e pode ser constituído por um ou mais íons inorgânicos, uma molécula orgânica complexa ou uma molécula metalorgânica chamada de coenzima, que funciona como um transportador transitório de grupos funcionais específicos. A catálise enzimática pode diminuir ou cessar completamente, isso ocorre quando agentes moleculares denominados inibidores se ligam à enzima. Eles subdividem-se em duas classes: competitivos e não-competitivos. Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima, assim se a concentração de substrato foi maior, a inibição não ocorre; já os inibidores não competitivos não se ligam ao sítio ativo, assim não competem pelo sítio ativo, a inibição ocorre de qualquer maneira<sup>52</sup>. Alguns herbicidas denominados inibidores enzimáticos agem inibindo a atividade de enzimas específicas. Essa inibição desencadeia outros eventos que provocam a morte ou inibem o desenvolvimento do organismo<sup>53</sup>.

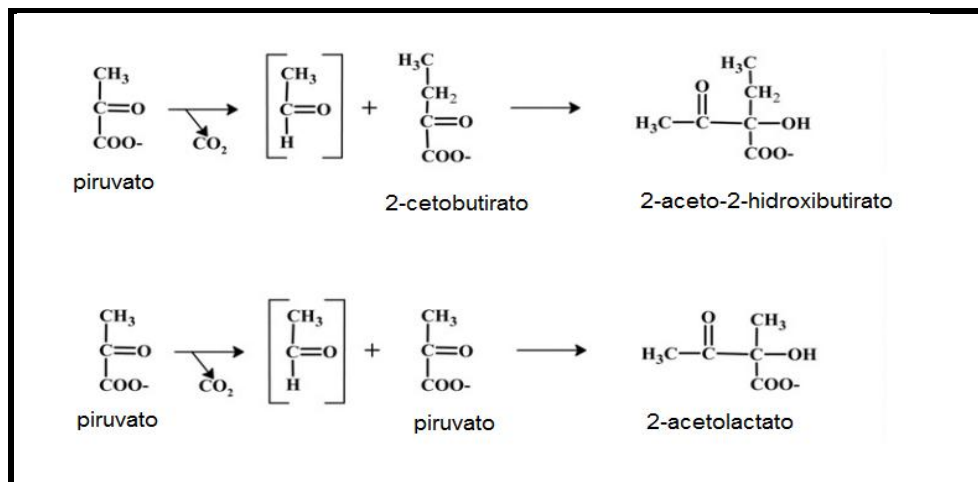
---

<sup>1</sup> As forças de van der Waals estão inclusas nas teorias DMT e JKR.

No presente trabalho foram utilizados os herbicidas do **grupo B** (vide anexo I), inibidores da Acetolactato Sintase (ALS). Tais procedimentos aqui desenvolvidos poderão auxiliar em estudos de interação de outros herbicidas inibidores enzimáticos, tais como, **grupo A** (enzima ACCase) e **grupo G** (enzima EPSP), além do ácido 2,4 diclorofenóxiacético (2,4-D) (**grupo O**), que são reguladores do crescimento. A enzima Acetolactato Sintase (ALS; EC 4.1.3.18), também chamada de acetohydroxyacidsynthase (AHAS), atua na fase inicial da biossíntese dos aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina, os quais são necessários para formação de novas células<sup>54,55,56</sup>. A ALS está presente em plantas superiores e microorganismos, porém não é encontrada em mamíferos. A rota biossintética se dá a partir de duas moléculas de piruvato para o aminoácido valina, uma molécula de piruvato mais uma molécula de acetil-CoA para o aminoácido leucina e uma molécula de piruvato mais uma molécula de 2-cetobutirato para o aminoácido isoleucina. A ALS catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato formando 2-acetolactato. Essa é a via para formação da valina e da leucina, porém para formação da leucina será necessário a reação com uma molécula de acetil-Coa. A ALS também catalisa a reação de condensação de uma molécula de piruvato e uma de 2-cetobutirato para a formação de 2-aceto-2-hidroxi-butirato, sendo essa a via para a formação da isoleucina (FIG. 11). A ALS é uma enzima dependente de flavina adenina dinucleotídeo (FAD)<sup>57,58</sup> e tiamina difosfato, cofatores essenciais a catalise.

A ALS apresenta duas subunidades. Uma subunidade maior, com massa molecular de 59 a 66 KDa, que contém o sítio de catalítico, e apresenta um peptídeo sinal N-terminal necessário para encaminhar a enzima para seu local de ação, no caso dos fungos para a mitocôndria e no caso das plantas para os cloroplastos. A segunda subunidade apresenta variações entre espécies: 10-20 KDa em bactérias, 34 KDa em eucariontes e maior do que 50KDa em plantas<sup>59</sup>. Esta subunidade não apresenta atividade catalítica, porém, nos organismos é essencial, pois regula a atividade da subunidade maior.

FIGURA 11 - Reações catalisadas pela ALS.

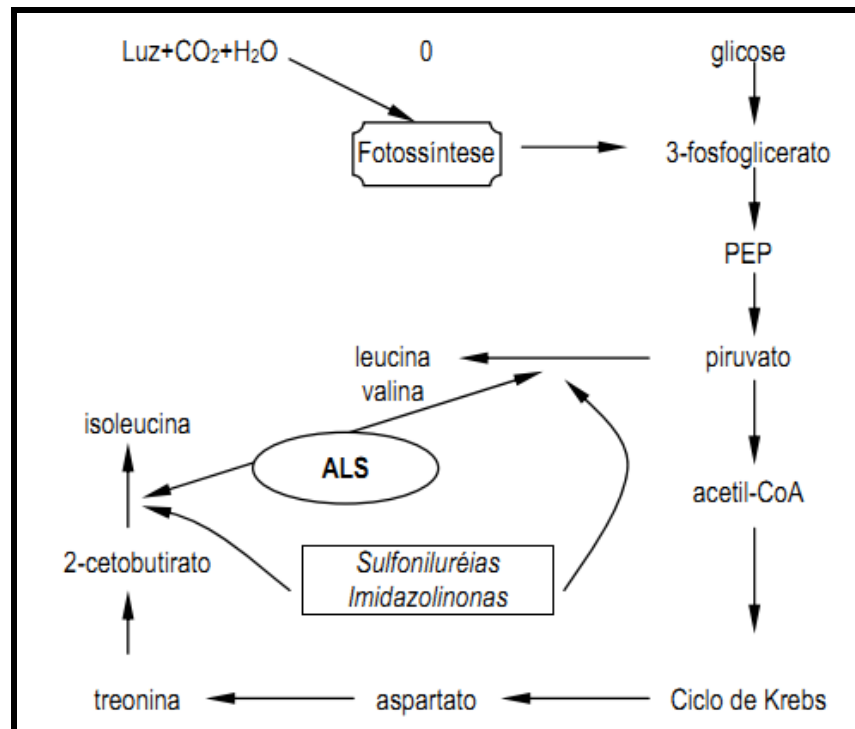


FONTE: DUGGLEBY, R. G., MCCOURT, J. A., GUDDAT, L. W., Structure and mechanism of inhibition of plant aceto-hydroxyacid synthase. *Pl. Phy. And Bio.* v. 46 p. 309-324 2008

### 3.8.2 Herbicidas Inibidores da Enzima ALS

Os herbicidas Imazaquin e Metsulfuron-metil atuam inibindo a enzima ALS de forma não-competitiva, na rota de síntese de aminoácidos ramificados valina, leucina e isoleucina (FIG. 12)<sup>56</sup>. Os Imidazolinonas, Sulfoniluréias e os Sulfoanilidas são os grupos de herbicidas comercializados atualmente, utilizados no controle de culturas de soja, trigo, cevada e arroz, e que agem sobre a ALS (anexo I). Esses herbicidas são amplamente utilizados devido à sua baixa toxicidade para humanos, já que atuam sobre uma enzima ausente em mamíferos, baixas dosagens recomendadas e alta seletividade<sup>60</sup>.

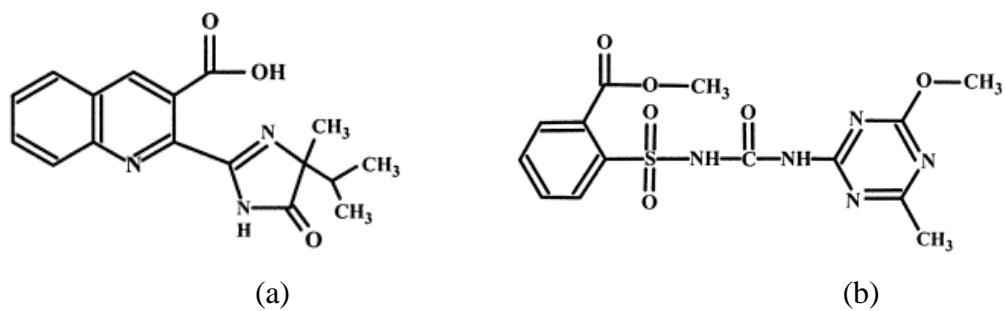
FIGURA 12 - Esquema modo de inibição ALS.



FONTE: Adaptado de DUGGLEBY, R. G., MCCOURT, J. A., GUDDAT, L. W., Structure and mechanism of inhibition of plant aceto-hydroxyacid synthase. *Pla. Phy. And Bio.* v.46 p.309-324 2008

Os herbicidas inibidores da ALS são rapidamente absorvidos pelas raízes e folhas e são levados ao local de ação, os pontos de crescimento. As moléculas pertencentes a estes grupos controlam principalmente dicotiledôneas, além de gramíneas e ciperáceas. Após algumas horas de sua adição ocorre o bloqueio da divisão celular e da síntese de DNA. No presente trabalho serão usados nos experimentos os seguintes herbicidas: (i) Imazaquin (FIG. 13a), (ii) Metsulfuron-metil (FIG. 13b).

FIGURA 13 - (a) Estrutura molecular Imazaquin. (b) Estrutura molecular Metsulfuron-metil.



FONTE: DUGGLEBY, R. G., MCCOURT, J. A., GUDDAT, L. W., Structure and mechanism of inhibition of plant acetoxyacid synthase. *Pla. Phy. And Bio.* v. 46 p. 309-324 2008



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados os seguintes reagentes: mica muscovita; 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) (98% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); solução aquosa 25% de glutaraldeído (Casa da Química Ind. e Com. Ltda.); imazaquin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); metsulfuron-metil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), pontas de nitreto de silício da Veeco, modelo SNL-10, K=0,58 (N/m; trietilamina 99% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); e a enzima ALS.

O extrato de bactéria enriquecido com a enzima ALS foi preparado em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Sistemas Bioluminescentes, UFSCAR - Campus Sorocaba, com o auxílio da aluna Camila de Carvalho de Carvalho, dentro do projeto CNPQ: Subclonagem, Expressão e Caracterização do ensaio das Enzimas ALS e EPSP para Futuro Desenvolvimento de nanobiosensores, sob supervisão da Dra. Rogilene Prado e do Prof. Dr. Vadim Viviani. O plasmídeo recombinante, contendo o cDNA da subunidade catalítica da enzima ALS de *Oryza sativa*, foi fornecido pelo Prof. Tsutomu Shimizu Kumiai da Chemical Industry Co, LTD.

As imagens de modelagem computacional foram obtidas através do *software* Chimera 1.5.3, gratuito.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparação e extração da enzima ALS

##### 4.2.1.1 Transformação de Bactérias

Uma solução contendo 50µL de células competentes BL21/DE3 (Agilent) e 5µL da biblioteca plasmidial foram misturadas em tubo de microcentrífuga gelado incubados por 30 minutos no gelo e submetida a um choque térmico de 45 segundos a 42°C. Novamente a solução foi incubada no gelo por mais 2 minutos e subsequentemente 200µL de meio de cultura LB líquido foi adicionado. Esta solução foi então mantida a 37°C em agitação de 225rpm por 1 hora e posteriormente plaqueada em meio LB Ágar/Ampicilina (100 µg/mL).

##### 4.2.1.2 Indução de Expressão Heteróloga de Proteína

Células competentes BL21/DE3 foram transformadas com DNA recombinante e cultivadas em 500 ml de meio LB líquido/Ampicilina (1 mM) a 37°C até a absorbância de 0,4 (OD600), e então induzidas com IPTG (0,4 mM) a 28° C sob agitação de 225 rpm por 3 horas. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2.500 rpm, por 15 minutos a 4 °C.

#### 4.2.1.3 Extração da Proteína

O *pellet*, contendo o material celular, foi ressuspensado em 1 -10 mL de tampão de extração gelado acrescido com 20-100 µL de coquetel anti-protease livre de EDTA e 2-10 µL DTT 1M. A lise celular foi feita por congelamento e descongelamento em gelo seco por três vezes. O lisado foi então centrifugado em 15.000 rpm por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante contendo a enzima solúvel foi utilizado nos ensaios posteriores.

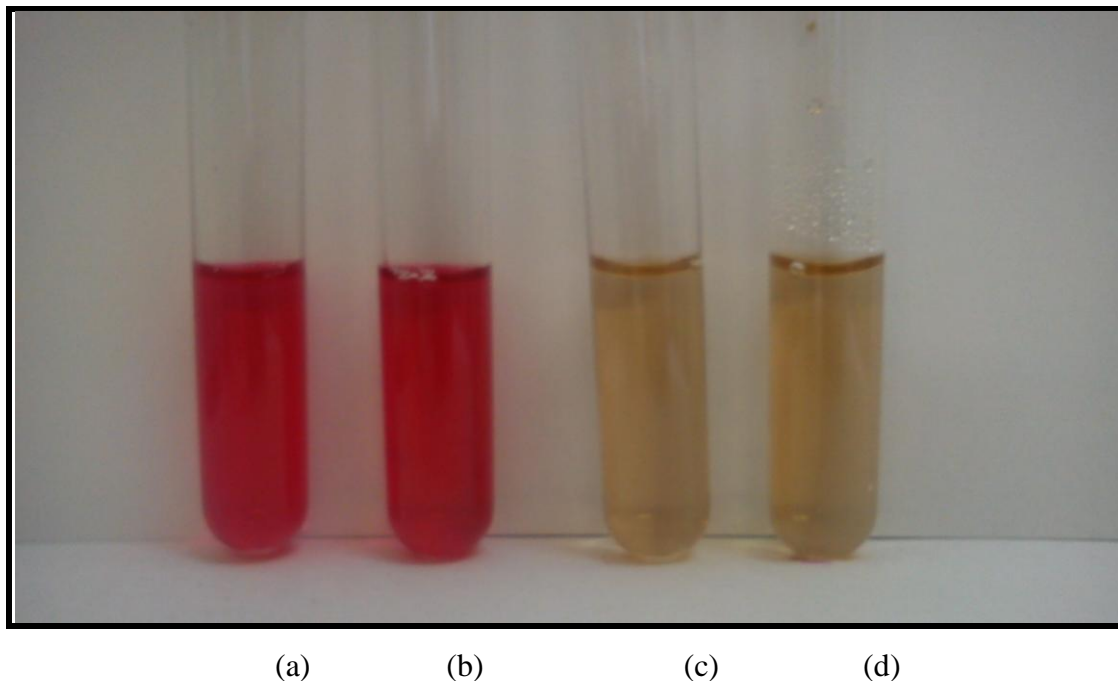
#### 4.2.1.4 Medição da Atividade Enzimática da ALS

O extrato bruto foi empregado para análise enzimática conforme Taniguchi<sup>61</sup>, utilizando-se uma mistura com cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 1mM, TPP 0,1 mM, FAD 0,1mM e tampão fosfato 0,1M (pH 7,6). Em seguida, 80µl da mistura, 50µl de piruvato e 870µl do extrato bruto foram misturados e incubados por 30 minutos a 37° C. A reação foi parada adicionando-se 5µl de ácido sulfúrico e novamente incubada a 60° C por 15 minutos para promover a cor. Uma mistura sem o piruvato foi utilizada como controle.

A quantificação do acetolactato acumulado é feita com o método Westerfeld<sup>62</sup>, que tem como princípio a formação de um complexo colorido na reação entre acetoina, creatina e naftol, cuja densidade óptica a 525nm é proporcional à concentração. Subsequentemente foram adicionados 100µl de 0,5% (m/v) creatina e 100µl de naftol 5% (m/v) a mistura e novamente colocado a uma temperatura de 60°C por 15 minutos para revelação da cor. A absorbância foi medida utilizando-se o espectrofotômetro UV.

Foram analisadas quatro soluções diferentes, a primeira trata-se de uma solução enzima ALS logo após sua extração (FIG. 14a) a segunda amostra, é uma solução da enzima ALS logo após 24h de sua extração (FIG. 14b), a terceira amostra trata-se de uma solução controle (FIG 14c) a qual não foi adicionado substrato, a última amostra é uma solução contendo o extrato bruto de bactéria sem o cDNA da ALS (FIG 14d).

FIGURA 14 - Ensaio colorimétrico para a enzima Acetolactato Sintase. (a) solução enzima ALS logo após sua extração (b) solução da enzima ALS logo após 24 (vinte e quatro)h de sua extração (c) solução controle (d) solução contendo o extrato bruto de bactéria sem o cDNA da ALS.



Fonte: PRADO, R.

A FIG. 14 (c) e (d) representam os testes utilizados como controle, eles não apresentaram atividade enzimática devido à ausência do substrato piruvato e do cDNA da ALS respectivamente. A FIG. 14 (a) e (b) mostram claramente a presença da enzima ALS no tubo, cujo teste colorimétrico revela o acúmulo significativo de acetolactato evidenciado pelo rosa mais intenso. Não foi verificada uma queda significativa na coloração rosa, o que indica a estabilidade da ALS após o tempo decorrido. A manutenção da atividade enzimática após 24h é muito relevante para o trabalho, pois a partir desse teste é possível assegurar que no momento da funcionalização química das pontas de AFM, a enzima ALS tem a atividade catalítica preservada.

#### 4.2.1.5 Quantificação de Proteínas Totais

Para a concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford<sup>63</sup>, considerada uma das metodologias mais simples, rápidas e com mínimo de interferência. A técnica se baseia na ligação da proteína com o corante Comassie Blue que tem uma

absorbância máxima em 595nm. Inicialmente foi montada uma curva-padrão (para o Fator de Correção) de concentração de proteína utilizando-se BSA (soroalbumina bovina). A concentração de proteínas totais foi determinada pela expressão:

$$[Proteína] = F \times Abs. \quad (18)$$

onde F é igual a  $\Delta x/\Delta y$ , obtido por pontos da curva-padrão. A TAB. 1 apresenta a concentração da enzima ALS calculada através do método de Bradford aplicando a Equação 18. Foram analisadas quatro soluções diferentes, a primeira trata-se de um extrato de bactéria enriquecido com a enzima ALS logo após sua extração, a segunda amostra, é uma solução de extrato de bactéria enriquecido com a enzima ALS após 24h de sua extração, a terceira amostra trata-se de uma solução controle a qual não foi adicionado substrato, a última amostra é uma solução contendo o extrato bruto de bactéria sem o cDNA da ALS.

TABELA 1 – Concentração da enzima ALS calculada através da Equação 18.

<b>Tratamento</b>	<b>[Proteína]</b>
Extrato de bactéria enriquecido com ALS	1,24
Extrato de bactéria enriquecido com ALS após 24h	1,12
Controle	0,06
Extrato de bactéria sem o cDNA da ALS	0,07

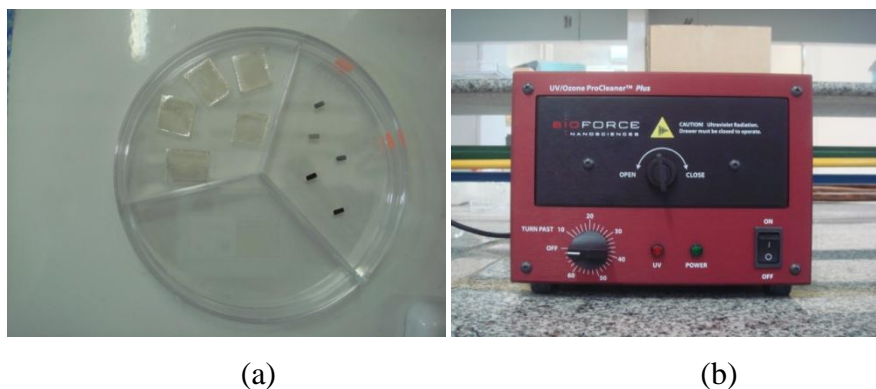
Fonte: Silva, A.C.N.

#### 4.2.2 Metodologia empregada para funcionalização das pontas e dos substratos

Um parâmetro importante a ser analisado foi a escolha da ponta do AFM. O raio da ponta é um parâmetro relevante já que afeta diretamente na área de contato entre a ponta e a amostra e influencia na precisão das medidas<sup>64</sup>, além da constante elástica da mola, optou-se pela utilização de uma ponta de raio de curvatura médio e com constante elástica baixa (raio de curvatura nominal  $r = 20\text{nm}$ , constante elástica nominal  $k = 0,12\text{ N/m}$ ), que são mais indicadas para determinação de curvas de força. Após ter sido escolhida a ponta mais adequada para a realização das medidas, passou-se para o processo de funcionalização das pontas e dos substratos, que envolveu duas etapas que serão discutidas detalhadamente na sequência.

A **primeira etapa** tratou-se do processo de limpeza. As pontas e os substratos foram submetidos a um agressivo procedimento de limpeza para garantir a eliminação de qualquer resíduo orgânico adsorvido na superfície da ponta. O primeiro passo foi inserir as pontas inseridas em uma placa *petri*, com três divisórias. Em uma das divisórias alocou-se as pontas, e na segunda e terceira divisórias foram inseridos os substratos, as micas recém-clivadas, respectivamente (FIG. 15a). Em seguida, colocou-se a placa *petri* em uma câmara de raios UV de ondas curtas, 240nm, por 15 minutos<sup>65</sup>. A câmara utilizada foi Procleaner modelo número UV.PC.220 da Bioforce, (FIG. 15b)

FIGURA 15 - (a) Pontas e substratos que foram submetidos ao processo de limpeza. (b) UV/Plasma Procleaner modelo número UV.PC.220 da Bioforce.



Fonte: SILVA, A.C.N.

Na sequência, foi realizada a **segunda etapa**, que é a funcionalização das pontas e dos substratos, adaptado do método descrito por WANG *et al.*,<sup>34</sup>. Para essa etapa foi necessário a construção de um sistema dedicado, constituído de um dessecador com entrada e saída para gás, ligado a um cilindro de Nitrogênio (FIG. 16), e sílica gel (para manter o ambiente mais seco possível).

FIGURA 16 - Sistema utilizado, constituído por um dessecador, com entrada e saída para gás, ligado a um cilindro de nitrogênio.



Fonte: SILVA, A.C.N.

Segue abaixo os passos para a realização da funcionalização das pontas e dos substratos:

1. Manter o fluxo de nitrogênio aberto durante 10 minutos para garantir uma atmosfera inerte dentro do dessecador;
2. Realizar o processo de silanização das superfícies da ponta e do substrato com APTES, por evaporação gasosa<sup>2</sup>;
3. Adicionar 200 µL de uma solução de glutaraldeído  $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , sobre as pontas e os substratos,

---

<sup>2</sup> Na terceira divisória da placa *petri* foram adicionados, em pequenos recipientes, 40 (quarenta) µL de APTES e 30 (trinta) µL de Trietilamina que foi utilizada para controlar o p.H dentro do dessecador. O fluxo de Nitrogênio foi interrompido, e o sistema foi mantido fechado por 30 (trinta) minutos para que o vapor do APTES adsorve-se sob as superfícies das pontas e dos substratos.

4. Manter as pontas e os substratos sob fluxo de Nitrogênio durante 10 minutos;
5. Interromper o fluxo e realizar 4 (quatro) lavagens com pequenas alíquotas de água Milli-Q.
6. Adicionar 20 $\mu$ L da enzima ALS (Concentração da enzima: 0,200 mg/mL) sobre cada ponta;
7. Adicionar 30 $\mu$ L dos herbicidas, Imazaquin e Metsulfuron-metil, aos respectivos substratos (concentração dos herbicidas:  $1 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>).
8. Manter todo o sistema fechado por 25 minutos, com fluxo de Nitrogênio aberto;
9. Realizar 3 (três) lavagens com água Milli-Q;
10. Manter as pontas e os substratos dentro de um dessecador, a 25°C, 30% umidade relativa do ar, até que seja possível a obtenção das curvas de força, normalmente esse processo demora em média uma hora, em seguida devem-se realizar as medidas de AFM,

#### 4.2.3 Medidas de Espectroscopia de Força Atômica (AFS)

Os experimentos de espectroscopia de força foram realizados com um Microscópio de Força Atômica sistema *Mulimode-V Nanoscope* com módulo *PicoForce*<sup>®</sup> (dedicado a espectroscopia de força), fabricado pela Bruker. O *PicoForce*<sup>®</sup> possui um software específico para tratamento de curvas de força, *scanner* com intervalo vertical de 20 $\mu$ m, é capaz de medir forças da ordem de  $10^{-12}$ N. Permite aplicar o método do ruído térmico ao cantilever para fácil determinação de constante de mola.

Dois métodos comparativos de detecção foram utilizados para esta técnica: (i) pontas funcionalizadas com enzimas (nanobiossensor) e (ii) pontas não funcionalizadas (nanossensor). As duas técnicas foram usadas para detectar herbicidas inibidores enzimáticos.

O primeiro experimento compara curvas de força, determinadas em três pontos diferentes de um mesmo substrato. Em seguida foram realizadas curvas de força com três substratos diferentes e, por último, foram determinadas curvas de força com três pontas de AFM distintas.

A ponta de AFM utilizada na determinação das curvas de força foi de nitreto de silício (de formato em V), modelo NP-10 da Veeco, com constante elástica nominal de (k) 0,12 N/m, porém, variações consideráveis podem ocorrer entre o valor nominal e valor real da constante de mola. Assim sendo, cada ponta de AFM passou por um procedimento de calibração antes de sua utilização, utilizando o método do ruído térmico<sup>66</sup>, que considera a

ponta de AFM como um oscilador harmônico. Em princípio, obtém-se uma curva de força sobre uma superfície rígida o suficiente para a ponta não realizar indentação com deformação elástica. É então feito o ajuste linear da parte da curva de força que determina o contato e assim é possível determinar a sensibilidade da ponta. Em seguida obtém-se um espectro do ruído da reflexão, o qual exibe um pico na frequência de ressonância do cantiléver. Ajusta-se então uma função Loretziana e integra-se o pico, sendo que todos esses cálculos são realizados automaticamente pelo software. As condições ambientais da sala onde foi realizada a análise variaram de 30% a 40% de umidade relativa do ar, e a temperatura de 21 a 26 °C.

O valor nominal do raio da ponta é de 20 nm<sup>67</sup>. Entretanto, o valor aproximado do raio de curvatura das pontas foi medido através das imagens de MEV, conforme a referência<sup>68</sup>, as pontas não funcionalizadas apresentaram raio de curvatura de (20 ± 5) nm, já as pontas funcionalizadas apresentaram raio de curvatura de (30 ± 5) nm.

#### **4.2.4 Caracterização das pontas**

##### **4.2.4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho**

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) pode ser utilizada na caracterização de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos. Através dessa técnica é possível identificar os principais grupos funcionais dos compostos. Tal identificação é feita através interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com esses grupos. O espectro obtido é resultado da intensidade da energia radiante transmitida pela amostra em relação à energia incidente.

Quando se trata de amostras densas nas quais a energia não pode ser transmitida através da amostra utiliza-se a espectroscopia de refletância total atenuada (ATR). Nesse tipo de espectroscopia o feixe de radiação passa do cristal do ATR, um meio mais denso, para a amostra, meio menos denso, assim ocasionando a reflexão.

Em nosso trabalho o FTIR foi utilizado com o objetivo verificar a funcionalização e investigar as ligações que ocorrem entre os compostos durante as etapas de funcionalização. Como não foi possível realizar as medidas na ponta funcionalizada devido ao seu tamanho, o sistema da ponta funcionalizada foi reproduzido em escala macroscópica utilizando-se uma placa de nitreto de silício funcionalizada. Para a caracterização das placas foi utilizado um equipamento Jasco FTIR – 410. Os espectros das placas funcionalizadas foram obtidos empregando a técnica de ATR.



#### 4.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é amplamente utilizado na caracterização de materiais. Isso se deve ao fato de ser capaz de produzir imagens com alta resolução, fornecendo informações topográficas da superfície analisada e gerando imagens tridimensionais. O MEV foi utilizado com o objetivo de medir o raio da ponta e a constante elástica do cantiléver, investigar a efetividade da funcionalização das pontas de AFM, além da sua integridade. O microscópio utilizado foi o Jeol modelo JSM-6510, instalado no laboratório de microscopia da Embrapa (Empresa brasileira de pesquisa agropecuária), sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso e com o auxílio da analista Viviane Faria Soares. As pontas foram coladas com fita adesiva de carbono sobre o porta-amostra. Ressalta-se, que não foi necessário recobri-las com ouro devido ao caráter condutor do material.

#### 4.2.4.3 Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas com o objetivo de calcular as energias de superfície das pontas não funcionalizadas, das modificadas quimicamente com a enzima ALS, e dos substratos contaminados com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil, esses valores foram utilizados posteriormente para o cálculo do trabalho de adesão.

O equipamento utilizado foi o CAM200 da KSV, instalado no Laboratório de Polímeros da USP– São Carlos, sob coordenação do Prof. Dr. Antonio José Félix de Carvalho e com o auxílio da Doutoranda Tamires de Souza Nossa. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente. Como não foi possível realizar as medidas na ponta funcionalizada devido ao seu tamanho, o sistema da ponta funcionalizada foi reproduzido em escala macroscópica utilizando-se uma placa de silício funcionalizada, além disso, foram realizadas medidas nos substratos de mica contaminada com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil. O método foi repetido utilizando-se três tipos de líquidos: água, formamida e di-iodometano. Os valores das energias superficiais dos líquidos utilizados estão representados na TAB. 2.

As energias de superfície dos substratos foram calculadas através da teoria de Owens-Wendt descrita no tópico 3.5. Utilizam-se três tipos de líquidos para que seja possível a plotagem do gráfico conforme Equação (16), obtendo-se assim três pontos no gráfico e a

equação da reta para cada material analisado. Através da equação da reta, temos o coeficiente angular e linear como sendo  $\sqrt{\gamma_s^p}$  e  $\sqrt{\gamma_s^d}$ , respectivamente.

TABELA 2 - Identificação das energias dos líquidos utilizados nas análises de ângulo de contato.

Líquidos	Energia Superficial (mN/m)		
	$\gamma^p$	$\gamma^d$	$\gamma^l$
Água	51	21,8	72,8
Formamida	19	39	58
Di-iodometano	0	50,8	50,8

Fonte: CANTIN, S., BOUTEAU, M., BENHABIB, F., PERROT, F., Surface Free Energy Evaluation of Well-Ordered Langmuir-Blodgett Surfaces Comparison of Different Approaches, *Col. and Sur.* v. 276, p. 107-115, 2006.

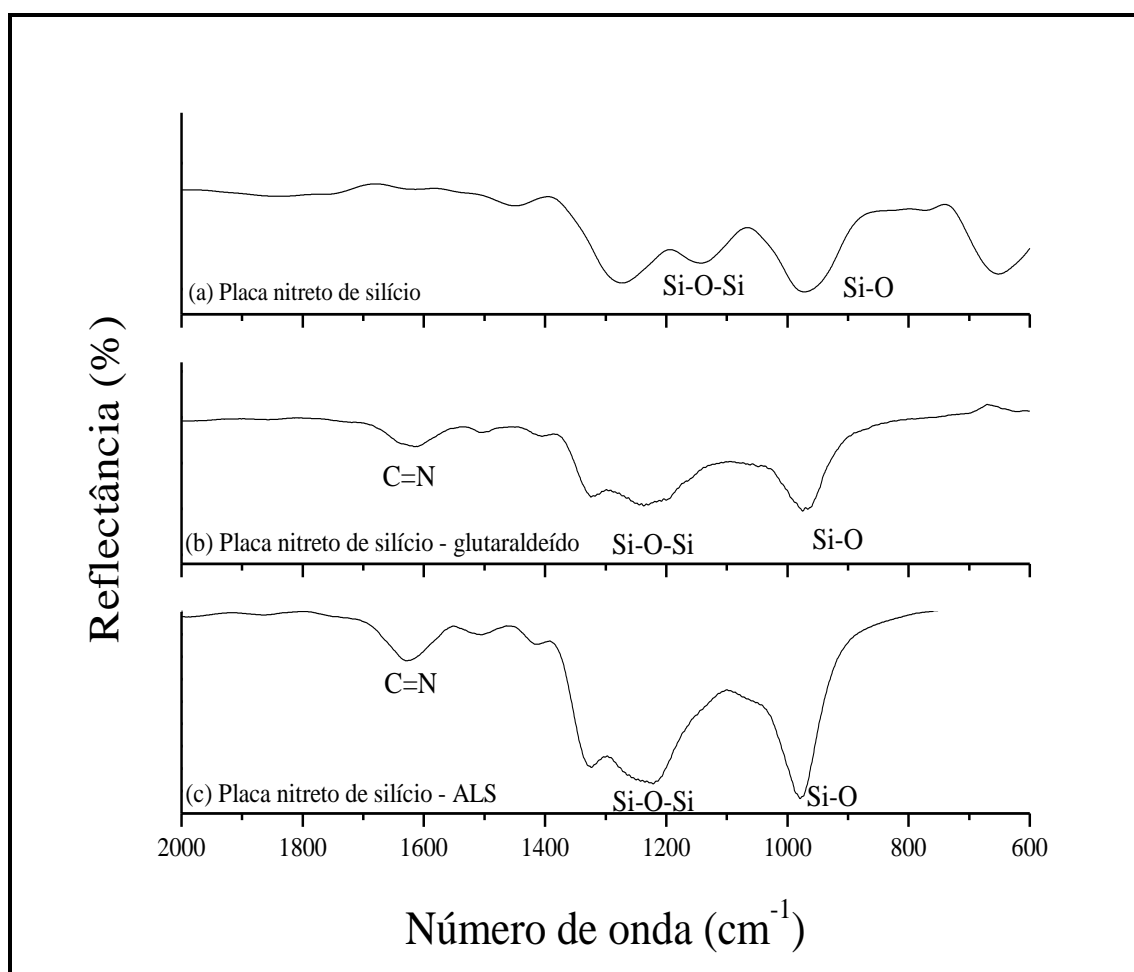
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados Experimentais

#### 5.1.1 Medidas de Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi empregada com o objetivo de caracterizar e comprovar a efetiva funcionalização da placa de nitreto de silício com a enzima ALS, além de verificar a incorporação de APTES e de glutaraldeído sob a placa após tratamento. Vale ressaltar, que a placa de nitreto de silício não funcionalizada também foi caracterizada. O espectro referente a placa de nitreto de silício (FIG. 17a) representa a placa que passou apenas pela etapa de limpeza, onde pode-se observar as bandas características intrínsecas do nitreto de silício: na região de  $976\text{ cm}^{-1}$  apresenta-se o pico referente à ligação Si-O, a banda próxima de  $1200\text{ cm}^{-1}$  indica a ligação Si-O-Si. Tal caracterização indica que a placa de nitreto de silício apresenta-se sem quaisquer contaminações que pudessem comprometer a etapa de funcionalização<sup>69, 70</sup>.

FIGURA 17 - Espectro FTIR (a) Placa nitreto de silício, (b) Placa nitreto de silício - glutaraldeído e (c) Placa nitreto de silício - ALS.

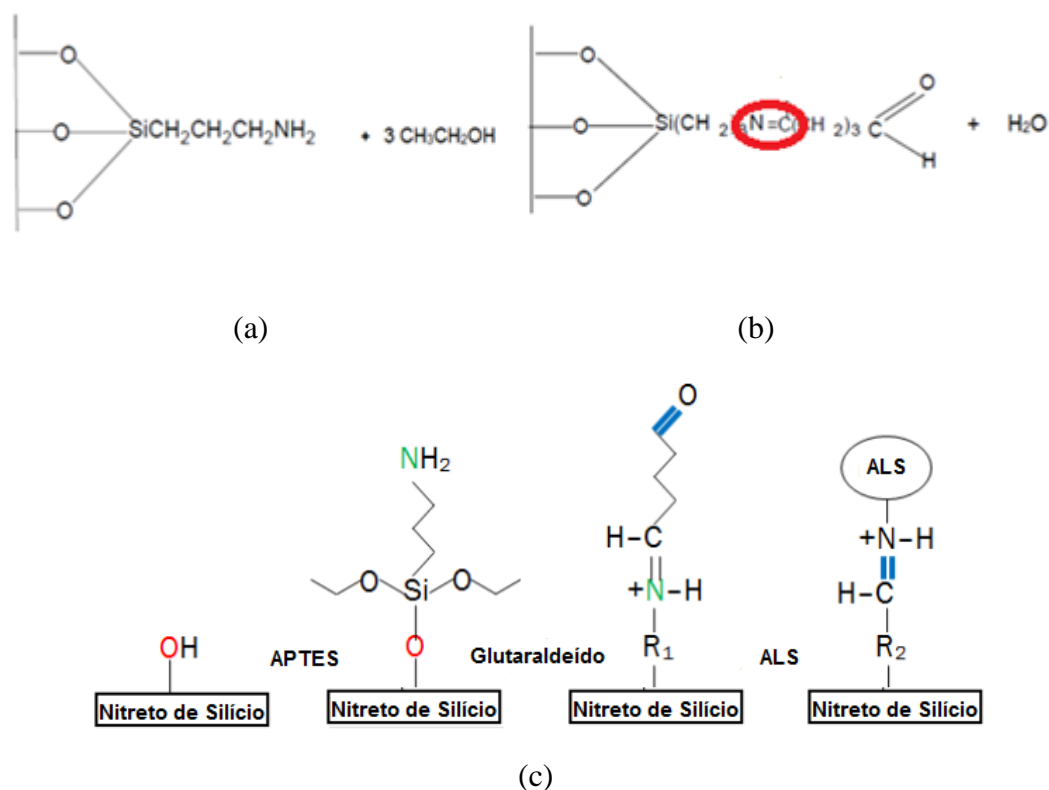


Fonte: SILVA, A.C.N.

A FIG. 17b apresenta o espectro da placa nitreto de silício funcionalizada com APTES e glutaraldeído. Analisando-se o espectro pode-se observar um pico próximo de  $1623\text{ cm}^{-1}$  que indica a presença da ligação C=N<sup>70</sup>. O surgimento dessa banda é um forte indicativo que a ligação do APTES ao glutaraldeído ocorreu<sup>34</sup>(FIG 18). Já o espectro da figura 17c representa a placa que passou por todas as etapas da funcionalização (exposição ao APTES, adição de glutaraldeído e ALS). É possível observar a presença dos picos que representam a placa de nitreto de silício, e novamente o pico em  $1623\text{ cm}^{-1}$ , referente à ligação C=N, resultante da ligação entre a enzima e o glutaraldeído<sup>35</sup>. O grupo aldeído da molécula de glutaraldeído reage com o grupo  $-\text{NH}_2$  do aminoácido da ALS. Nessa reação o nitrogênio nucleofílico do grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) desloca o oxigênio do aldeído, o que provoca a perda de uma molécula de água formando, assim, a ligação C=N.

A baixa intensidade dos sinais nos espectros apresentados se deve principalmente a pequena espessura do filme formado na superfície do nitreto de silício. Além disso, outros fatores como a baixa refletividade do nitreto de silício dificultaram a obtenção de espectros com melhor resolução. Nesse caso, para uma melhor caracterização do material, uma técnica adicional como espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) poderia ser mais eficiente e será posteriormente utilizada.

FIGURA 18 – (a) Ligação do APTES ao Nitreto de silício, (b) do glutaraldeído ao APTES. (c) Esquema de todas as etapas de funcionalização das pontas de nitreto de silício.



Fonte: (a) Adaptado de OLIVEIRA, V., V., “NOVOS ADSORVENTES DERIVADOS DE SÍLICA GEL MODIFICADA COM AMINAS E GLUTARALDEÍDO”. Dissertação. Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. (b) Adaptado de MENEZES, T., A., V., VERCIK, A., BAPTISTA, L., VERCIK, L., C., O., Porosificação Anódica de Si e Imobilização de HRP em Si Silanizado, Lab. de Nanotecnologia Biossensores e Dispositivos – ZAB – FZEA – USP.

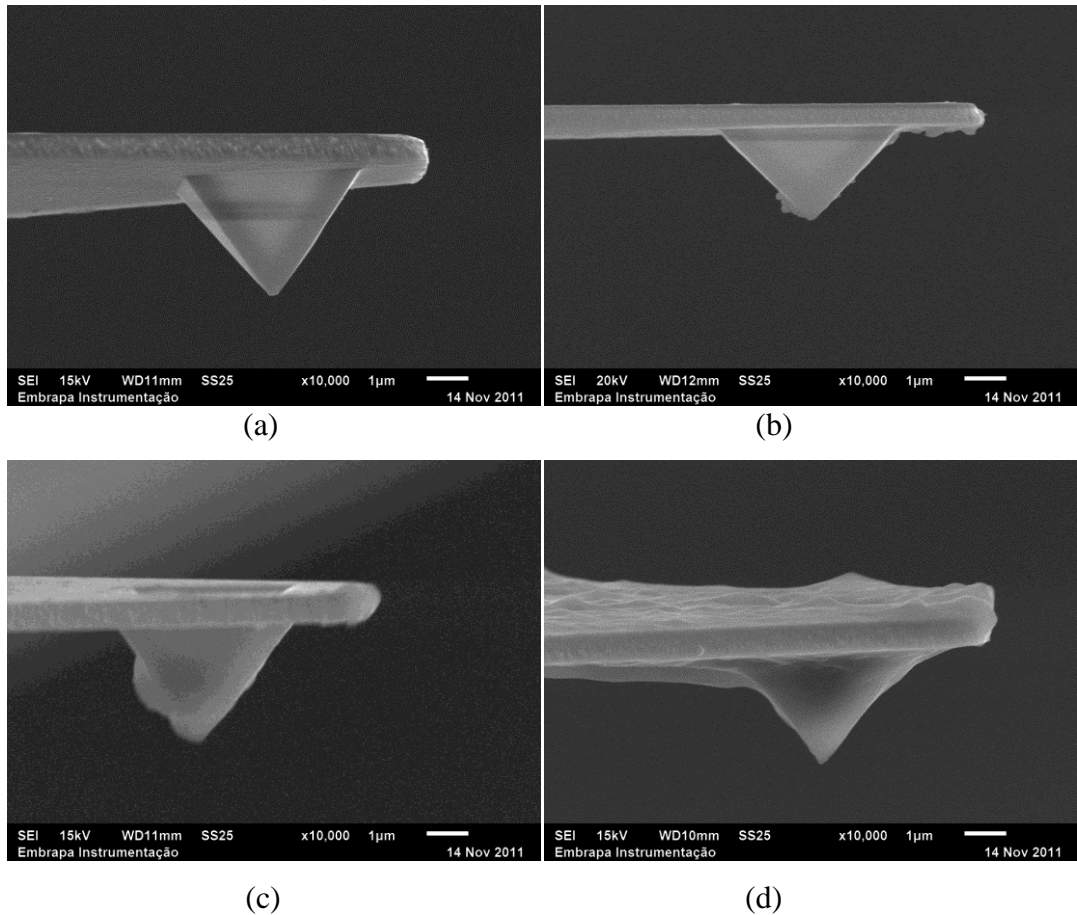
### 5.1.2 Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das Pontas de AFM

As imagens de MEV das pontas de AFM foram realizadas com o objetivo de verificar a integridade das pontas não funcionalizadas. A FIG. 19a representa a ponta não-funcionalizada antes da realização de quaisquer medidas, após o tratamento de limpeza, e a FIG. 19b representa a ponta não-funcionalizada após a realização de curvas de força. Nota-se que não há qualquer vestígio de impurezas nas pontas de AFM tratadas (procedimentos de limpeza), o qual poderia interferir nas medidas de força de adesão, resultado que pode ser corroborado com as medidas de FTIR (FIG. 17). Thundat<sup>71</sup> e seus colaboradores fizeram testes de curvas de força com pontas contaminadas e pontas limpas por dois procedimentos diferentes. No primeiro, as pontas foram imersas em soluções de acetona, metanol e cloreto de

metileno por aproximadamente 5 min. Já no segundo, as pontas foram inseridas numa câmara de raios UV por 5min.. Em ambos os casos houve uma diminuição na força de adesão determinada. No caso das pontas que foram submetidas ao primeiro procedimento de limpeza houve uma diminuição de 10% na força de adesão medida, já as que foram submetidas ao segundo procedimento demonstraram uma diminuição drástica na força de adesão medida, o que comprova a maior eficácia do procedimento de limpeza aplicado.

Já para as pontas funcionalizadas, o objetivo da utilização do MEV foi verificar a funcionalização das pontas de AFM em escala nanoscópica. As imagens obtidas são apresentadas na FIG. 19c e 19d. A FIG. 19c mostra a imagem da ponta de AFM funcionalizada e sem uso. Analisando-se a imagem é possível detectar a funcionalização. A FIG. 19d mostra a imagem da ponta funcionalizada após as medidas de curva de força, nota-se que após a realização das medidas de curva de força pequenas partes da enzima podem se desprender, esse fato pode ser atribuído à interação que ocorre entre a ponta funcionalizada e a amostra.

FIGURA 19 –(a) Imagem de MEV ponta não funcionalizada sem uso e limpa (procedimento de limpeza). (b) imagem de MEV da ponta não funcionalizada após as medidas de curvas de força; (c) imagem da ponta de AFM funcionalizada antes das medidas e (d) após as medidas de curva de força.



Fonte: SOARES, V.F.

### 5.1.3 Medidas ângulo de contato e energia de superfície

A análise de ângulo de contato foi realizada com o objetivo de determinar as energias de superfície, importante para o cálculo de trabalho de adesão e força de adesão entre a ponta de AFM e os substratos contaminados com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil. A TAB. 3 mostra os resultados das médias dos ângulos obtidos para cada amostra e suas respectivas energias de superfície polar ( $\gamma_p$ ), dispersiva ( $\gamma_d$ ) e total do sólido ( $\gamma_s$ ) que foram calculadas conforme especificado no tópico 3.5.

TABELA 3- Medidas de ângulo de contato e energias de superfícies calculadas, total,  $\gamma_s$ , polar,  $\gamma_p$ , e dispersiva,  $\gamma_d$ , para as pontas e os substratos.

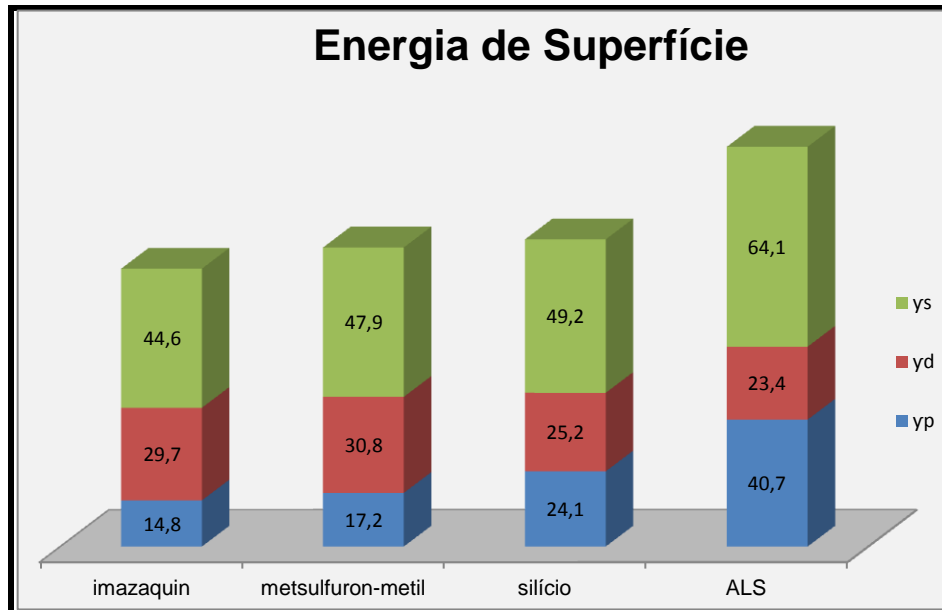
Sólido	Ângulo de contato $\theta(^{\circ})$			Energia de superfície (mN/m)		
	Água	Form.	Di-iod.	$\gamma_p$	$\gamma_d$	$\gamma_s$
Imazaquin	64,15	30,43	47,37	14,80	29,70	44,60
Metsulfuron-metil	58,55	30,78	39,14	17,20	30,80	47,90
Silício	51,11	39,84	41,31	24,10	25,20	49,20
ALS	25,26	22,73	35,18	40,70	23,40	64,10

Fonte: SILVA, A.C.N.

Observa-se, mais claramente, na FIG. 20 que o silício apresenta menor energia de superfície do que a superfície com a enzima ALS. Tal fato sugere que as pontas não funcionalizadas (aqui representadas pelo silício) possuem uma menor molhabilidade quando comparadas com as pontas funcionalizadas com a enzima ALS. Conseqüentemente, as superfícies das pontas não funcionalizadas podem fornecer uma interação pouco significativa, quando comparado com as forças capilares. Ressalta-se que quanto maior a energia de superfície de uma amostra maior será sua afinidade por água. Desta forma, espera-se uma interação capilar maior para a ponta funcionalizada. Além disso, a superfície contaminada com o herbicida imazaquin possui menor energia de superfície do que a superfície contaminada com o herbicida metsulfuron-metil, o que pode fornecer uma menor tendência a interagir com outras superfícies de alto valor de energia de superfície<sup>72</sup>.



FIGURA 20 - Gráfico comparativo das energias de superfície polares ( $\gamma_p$ ), dispersivas ( $\gamma_d$ ) e totais ( $\gamma_s$ ) para a ponta de AFM não funcionalizada (silício), funcionalizada (ALS) e para os substratos: imazaquin e metsulfuron-metil.

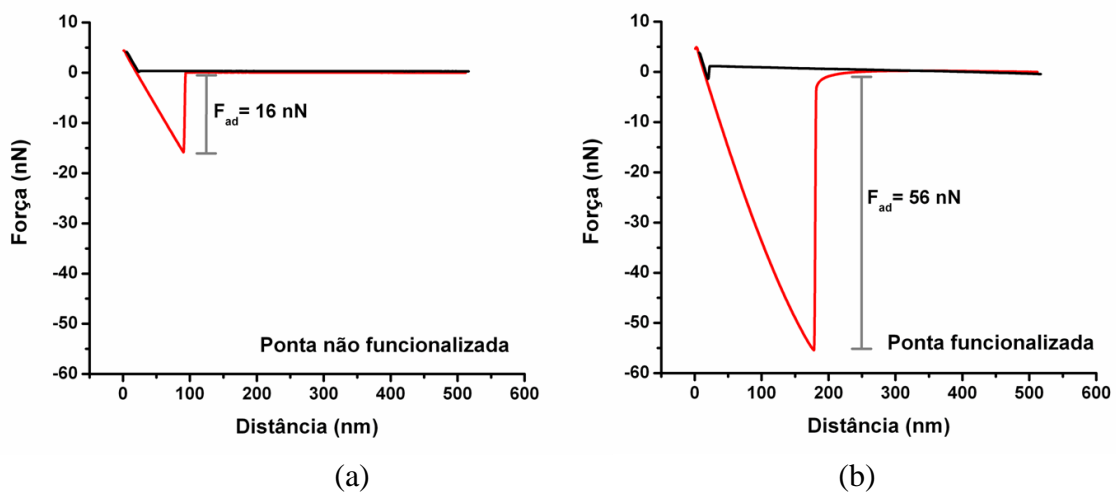


Fonte: SILVA, A.C.N.

#### 5.1.4 Medidas de curvas de força

A figura 21 mostra as curvas de força típicas para medidas de adesão entre uma ponta *in natura* (sem funcionalizar) e o herbicida (Fig. 21a) e a adesão entre uma ponta funcionalizada e o herbicida (nanobiossensor) (Fig. 21b).

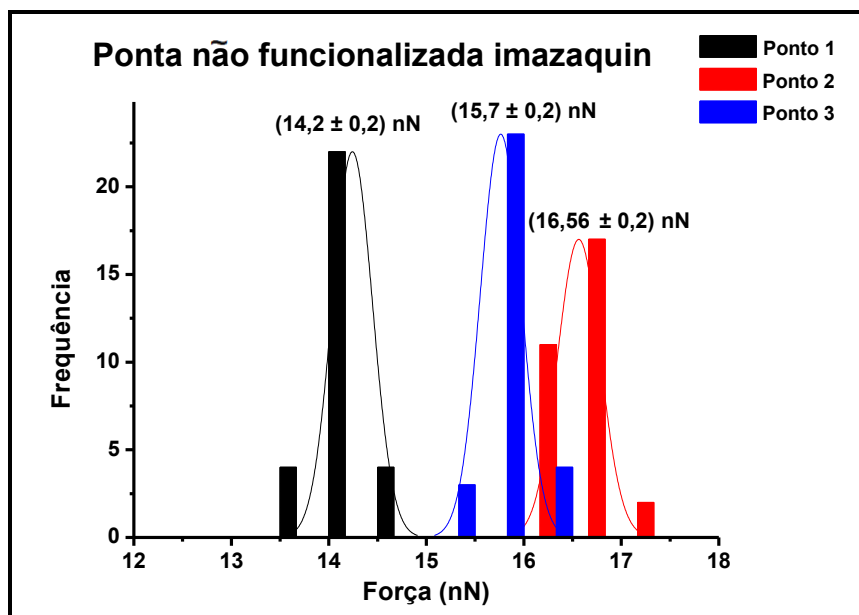
FIGURA 21 – (a) Curvas de força típica entre uma ponta *in natura* (sem funcionalizar) e o herbicida metsulfuron-metil. (b) Para uma ponta funcionalizada e o herbicida metsulfuron-metil (nanobiossensor).



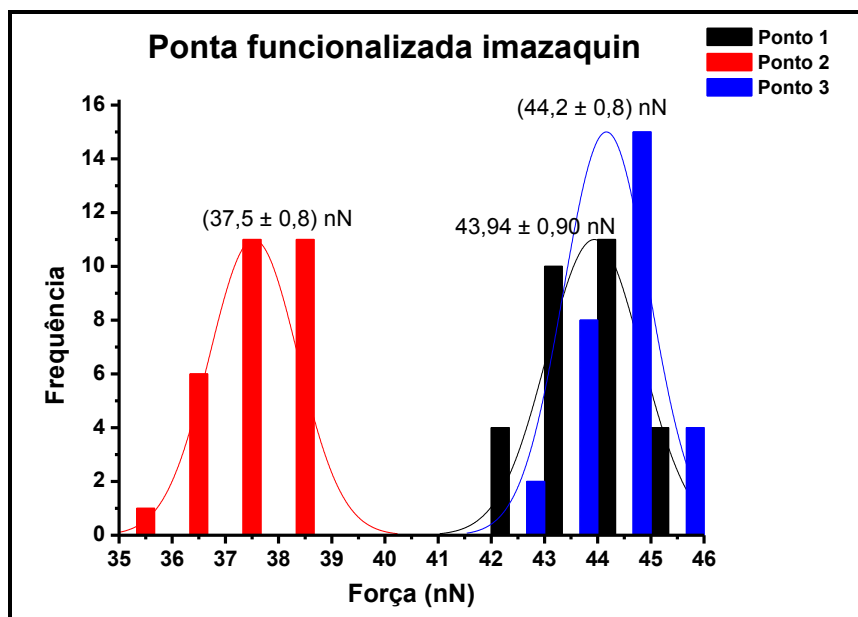
Fonte: SILVA, A.C.N.

A força de adesão foi determinada por intermédio de medidas de curva de força, analisando o ponto de deflexão máxima do cantiléver até o desprendimento total da superfície. A primeira parte do trabalho foi investigar a variação regional em cada amostra, *i.e.*, realizando 30 (trinta) curvas de força, em três pontos diferentes do substrato contaminado com o herbicida imazaquin. A FIG. 22a mostra a variação regional do substrato contaminado com imazaquin para a ponta não funcionalizada. Já a FIG. 22b mostra a variação regional do substrato contaminado com imazaquin para a ponta funcionalizada com ALS.

FIGURA 22– Gráfico comparativo das medidas de força de adesão determinadas com ponta não funcionalizada (a) e ponta funcionalizada (b) em três pontos distintos.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.

O valor médio da força de adesão para os três pontos distintos medidos com a ponta de AFM não funcionalizada foi de  $F_{ad} = (16 \pm 1)$  nN, enquanto que o valor médio da força de adesão para os três pontos distintos medidos com a ponta de AFM funcionalizada com ALS foi de  $F_{ad} = (42 \pm 4)$  nN. Nota-se que houve um aumento de 169% na força de adesão medida com a ponta funcionalizada em comparação com a ponta não funcionalizada. A hipótese mais provável é que esse aumento deve-se à interação específica entre o herbicida imazaquin e a enzima ALS, além de uma pequena influência do aumento do raio da ponta devido à adsorção de enzima na ponta.

Em relação à dispersão dos resultados em cada ponto, considerando que o desvio padrão é uma medida de dispersão relativa à média aritmética e os pontos medidos possuem valores distintos de média aritmética, não é cabível a comparação entre eles. Então será utilizado o coeficiente de variação expresso em porcentagem<sup>73,74</sup>:

$$\text{Coeficiente de Variação} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média Aritmética}} \times 100 \quad (19)$$

O coeficiente de variação para as medidas de força de adesão, calculado para os três pontos medidos será mostrado na TAB. 4:

TABELA 4 - Coeficiente de variação força de adesão medida com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada com ALS nos substratos contaminados com imazaquin, em três pontos distintos.

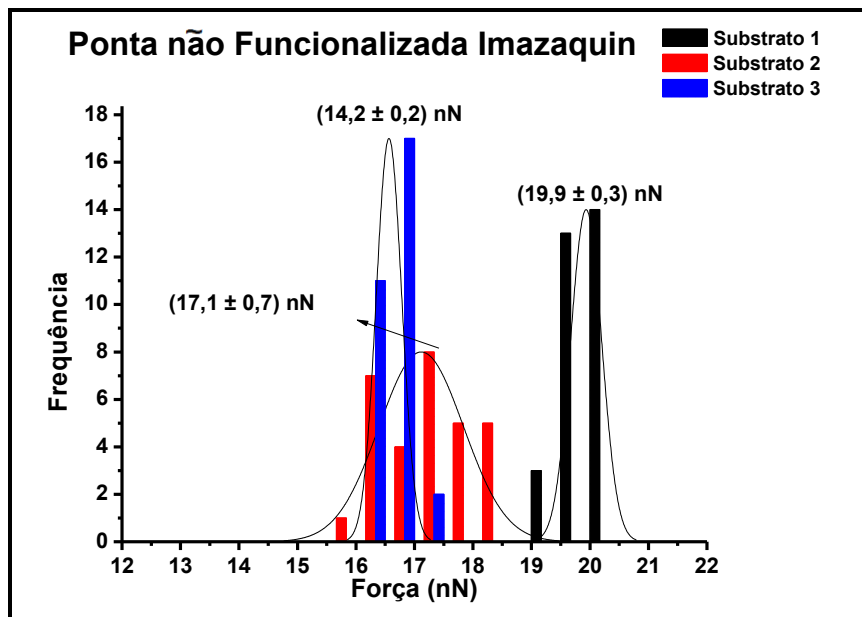
Coeficiente de variação	Ponto	Ponta não funcionalizada (%)	Ponta Funcionalizada (%)
	1	1,4	2,0
2	1,3	2,2	
3	1,3	1,8	
Média dos Pontos	7,6	9,0	

Fonte: SILVA, A.C.N.

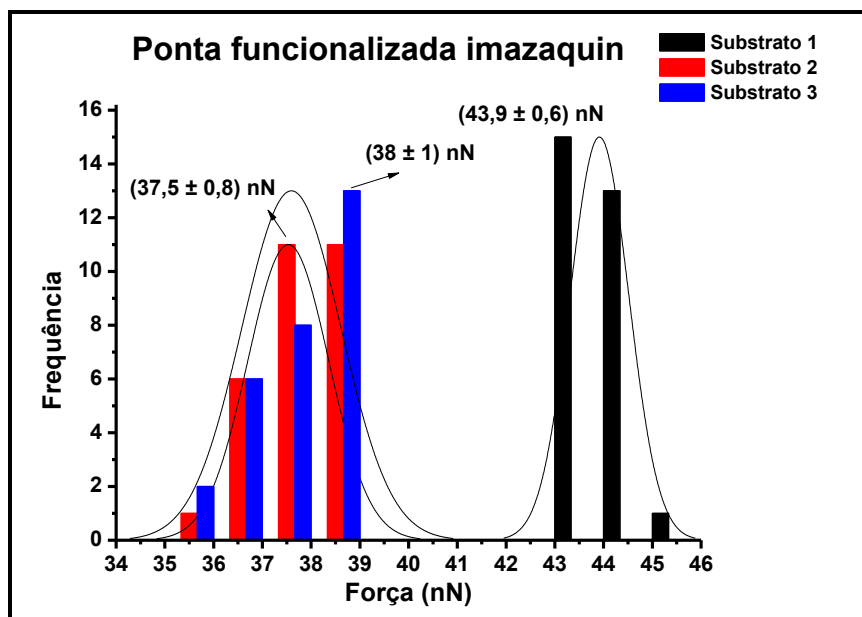
Ao observar a TAB. 4, é possível notar que a variação da força de adesão no mesmo ponto para a ponta não funcionalizada foi  $\leq 1,4\%$ , já para a ponta funcionalizada com a enzima ALS foi  $\leq 2,2\%$ , e se for analisada toda a amostra a variação foi  $\leq 9,0\%$ .

A pequena variação regional também foi observada utilizando diferentes amostras, realizando 30 (trinta) medidas de curva de força em três substratos diferentes (triplicata) contaminados com imazaquin. A FIG. 23a mostra a variação da força de adesão medida sobre os substratos contaminados com imazaquin para a ponta não funcionalizada, e a FIG. 23b mostra a variação da força de adesão medida sobre os substratos contaminados com imazaquin para a ponta funcionalizada com a enzima ALS.

FIGURA 23 – Gráfico comparativo das medidas de força de adesão determinadas com ponta não funcionalizada (a) e ponta funcionalizada (b) em três substratos distintos.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.

O valor médio da força de adesão para os três substratos distintos medidos com a ponta de AFM não funcionalizada foi de  $F_{ad} = (18 \pm 2)$  nN. Já o valor médio da força de adesão para os três substratos distintos medidos com a ponta de AFM funcionalizada com a

enzima ALS foi de  $F_{ad} = (40 \pm 4)$  nN. Observa-se que houve um aumento de 132% na força de adesão medida com a ponta funcionalizada em comparação com a ponta não funcionalizada, o que caracteriza novamente a interação específica entre a enzima e o herbicida.

O coeficiente de variação calculado para os três substratos medidos com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada com a enzima ALS são apresentados na TAB. 5.

TABELA 5 - Coeficiente de variação da força de adesão, medida com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada com a enzima ALS nos substratos contaminados com imazaquin, em três substratos distintos.

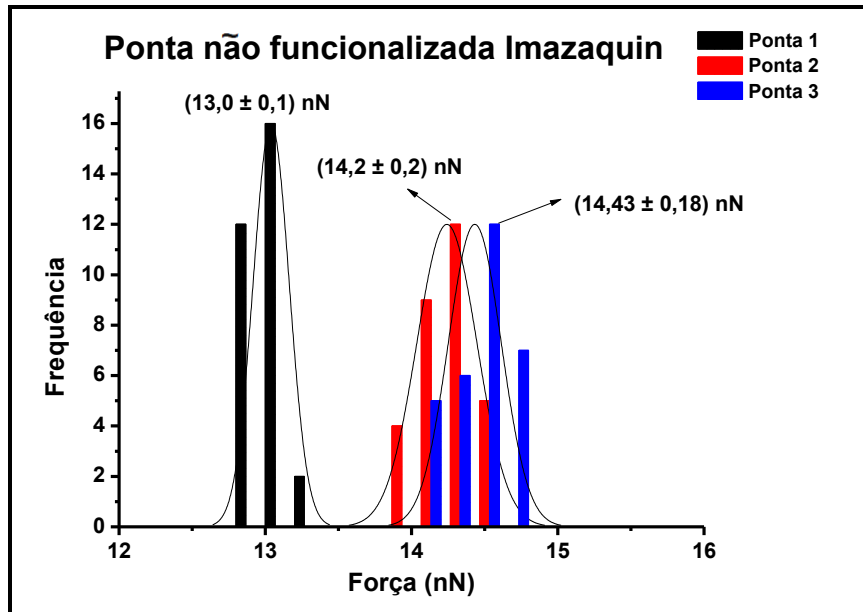
	Substrato	Ponta não funcionalizada	Ponta Funcionalizada
		(%)	(%)
Coeficiente de variação	1	1,3	1,3
	2	4,2	2,2
	3	1,4	2,7
	Média dos Substratos	16,6	9,2

Fonte: SILVA, A.C.N.

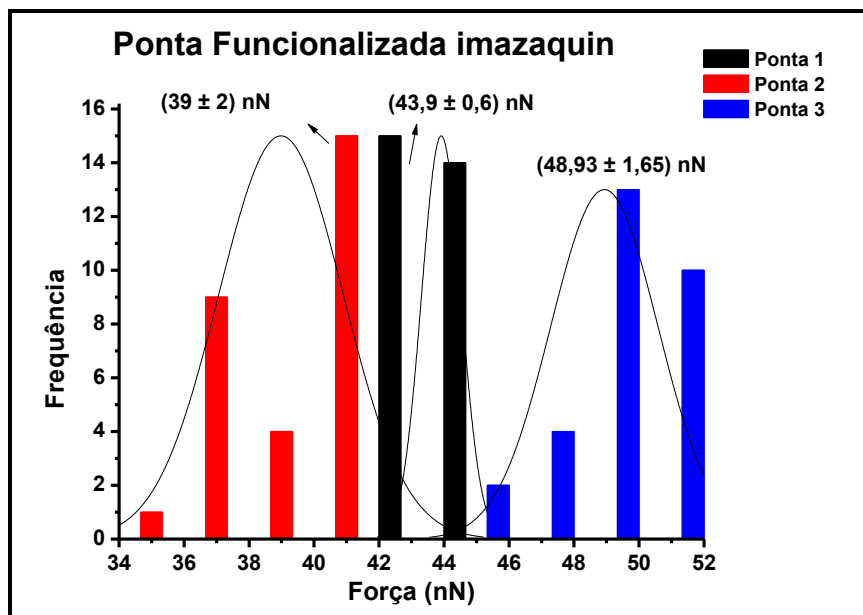
Ao observar a TAB. 5, é possível notar que a variação da força de adesão para a ponta não funcionalizada foi  $\leq 4,2\%$ , já para a ponta funcionalizada com a enzima ALS foi  $\leq 2,7\%$ , e se todos os substratos forem analisados essa variação foi  $\leq 16,6\%$ .

Para todas as medidas realizadas até esse momento foram utilizadas as mesmas pontas, apenas variando os pontos e os substratos. O próximo experimento foi realizar medidas com diferentes pontas de AFM, testando 3 (três) pontas diferentes (realizando 30(trinta) curvas de força para cada ponta). A FIG. 24a mostra a variação entre três pontas distintas não funcionalizadas, e a FIG. 24b mostra a variação entre três pontas distintas funcionalizada com a enzima ALS. As medidas foram determinadas em substratos contaminados com imazaquin.

FIGURA 24 - Gráfico comparativo das medidas de força de adesão determinadas com pontas não funcionalizadas (a) e pontas funcionalizadas (b), sendo que três pontas foram utilizadas em cada caso.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.

O valor médio da força de adesão para as três pontas de AFM não funcionalizadas foi de  $F_{ad} = (13,9 \pm 0,8)$  nN, enquanto que o valor médio da força de adesão para as três pontas de

AFM funcionalizadas foi de  $F_{ad} = (44 \pm 5)$  nN. O coeficiente de variação calculado para as três pontas de AFM não funcionalizadas e funcionalizadas são apresentados na TAB. 6. Neste caso, houve um aumento de 216% na força de adesão medida com a ponta funcionalizada em comparação com a ponta não funcionalizada.

TABELA 6 - Coeficiente de variação da força de adesão medida com três pontas de AFM distintas, não funcionalizadas e funcionalizadas com a enzima ALS, nos substratos contaminados com imazaquin.

	<b>Ponta</b>	<b>Ponta não funcionalizada (%)</b>	<b>Ponta Funcionalizada (%)</b>
<b>Coefficiente de variação</b>	1	0,9	1,3
	2	1,4	4,8
	3	1,2	3,3
	<b>Média das Pontas</b>	5,4	11,3

Fonte: SILVA, A.C.N.

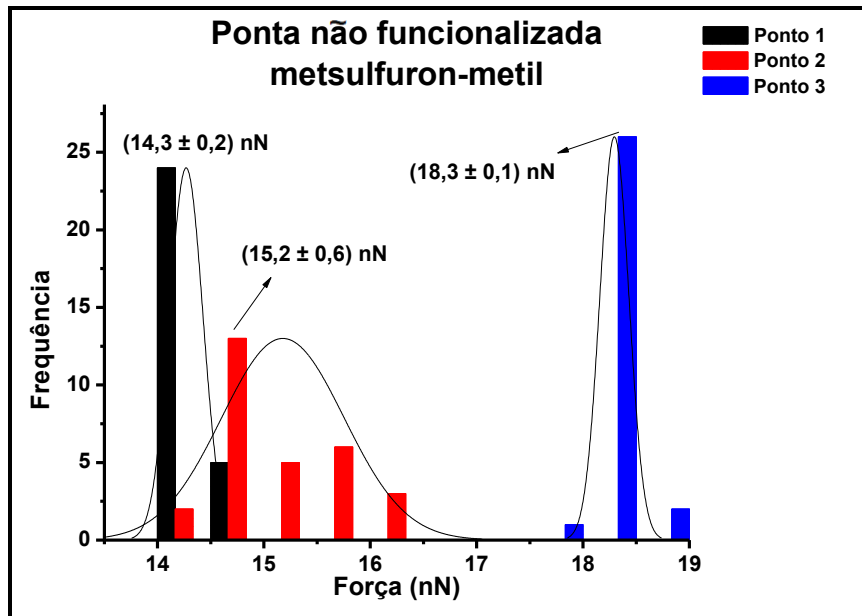
Ao observar a TAB. 6, é possível notar que a variação da força de adesão para a ponta não funcionalizada foi  $\leq 1,4\%$ , já para a ponta funcionalizada com a enzima ALS foi  $\leq 4,8\%$ , e se forem analisadas todas as pontas essa variação foi  $\leq 11,3\%$ .

O estudo de proteínas imobilizadas na ponta do AFM vem despertando o interesse dos pesquisadores, a fim de investigar, por exemplo, a força de interação específica entre as proteínas (lectinas) e seus carboidratos complementares, que mediam diversas reações biológicas complexas. Zhang *et.al.*<sup>75</sup> realizaram um estudo da força necessária para o rompimento da ligação entre Concanavalina A e mannose aplicando a microscopia de força química. A funcionalização da superfície com mannose minimiza as interações não específicas, o que possibilita uma detecção mais rápida e confiável. A funcionalização da ponta de AFM com Concanavalina A resultou em múltiplos eventos de força. Os autores estimam que um único evento possa gerar uma força de adesão de  $(95 \pm 10)$  pN, além disso permite a determinação de vínculo com moléculas individuais com alta especificidade, e pode ser usada para investigar as interações lectina de carboidratos na forma de matrizes de carboidratos, bem como matrizes lectina.

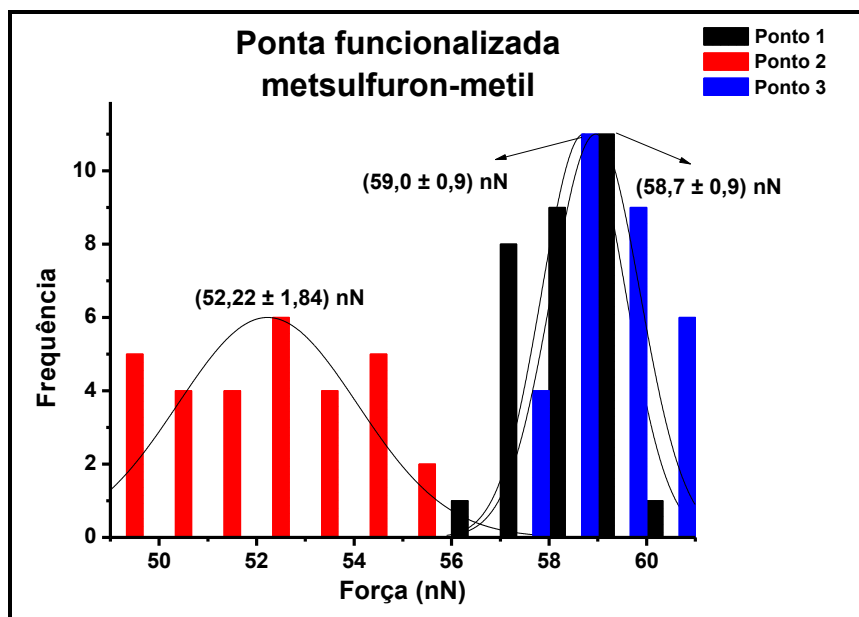


Além da investigação da força de adesão entre pontas não funcionalizadas e funcionalizadas em substratos contaminados com o herbicida imazaquin, foram realizados estudos da força de adesão entre pontas não funcionalizadas e funcionalizadas em substratos contaminados com o herbicida metsulfuron-metil. Para isso foram realizadas (trinta) curvas de força, em três pontos diferentes de cada substrato contaminado com o herbicida metsulfuron-metil. A FIG. 25a mostra a variação regional do substrato contaminado com metsulfuron-metil para a ponta não funcionalizada e a FIG. 25b mostra a variação regional do substrato contaminado com metsulfuron-metil para a ponta funcionalizada com ALS.

FIGURA 25 - Gráfico comparativo das medidas de força de adesão determinadas com ponta não funcionalizada (a) e ponta funcionalizada (b) em três pontos distintos.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.

O valor médio da força de adesão para os três pontos distintos medidos com a ponta de AFM não funcionalizada foi de  $F_{ad} = (16 \pm 2)$  nN, enquanto que o valor médio da força de adesão para os três pontos distintos medidos com a ponta de AFM funcionalizada foi de  $F_{ad} = (57 \pm 4)$  nN. Houve um aumento de 255% na força de adesão medida com a ponta funcionalizada em comparação com a ponta não funcionalizada. Como já citado anteriormente, acredita-se que esse aumento deve-se à interação específica entre o herbicida e a enzima ALS. Além disso, é possível observar também um drástico aumento, cerca de 50%, na força de adesão medida nos substratos contaminados com metsulfuron-metil quando comparado com o substrato contaminado com imazaquin. Isso se deve ao fato de que os herbicidas pertencentes ao grupo sulfoniluréias são melhores inibidores da ALS quando comparados aos herbicidas pertencentes ao grupo da imidazolinas (verificar ANEXO I)<sup>56</sup>.

O coeficiente de variação calculado para os três pontos medidos com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada são apresentados na TAB. 7. Ao observar a TAB. 7, é possível notar que a variação da força de adesão para a ponta não funcionalizada foi  $\leq 3,7\%$ , já para a ponta funcionalizada com a enzima ALS foi  $\leq 3,5\%$ , e se for analisada toda a região  $\leq 13,2\%$ .

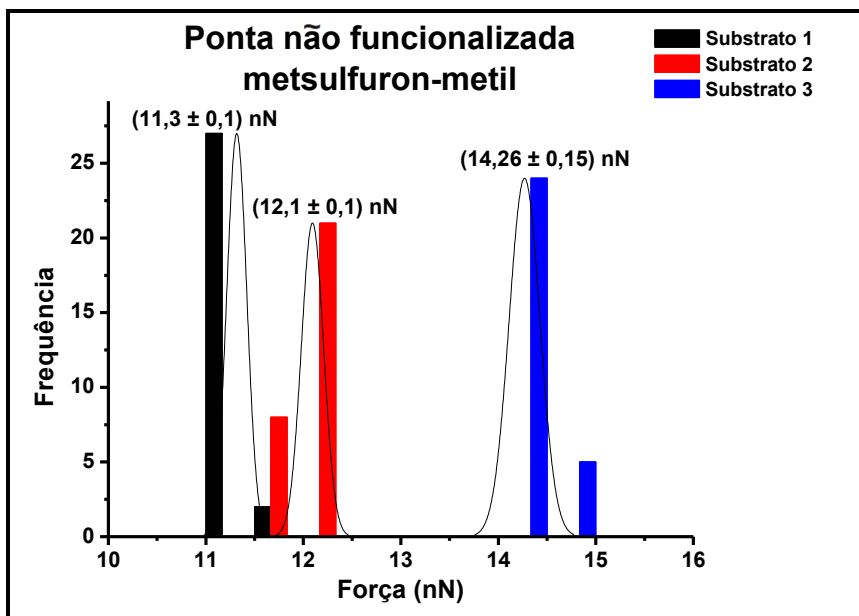
TABELA 7 - Coeficiente de variação da força de adesão, medida com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada com ALS, nos substratos contaminados com metsulfuron-metil, em três pontos distintos.

	<b>Ponto</b>	<b>Ponta não funcionalizada (%)</b>	<b>Ponta Funcionalizada (%)</b>
<b>Coeficiente de variação</b>	1	1,1	1,4
	2	3,7	3,5
	3	0,7	1,5
	<b>Média dos Pontos</b>	13,2	6,7

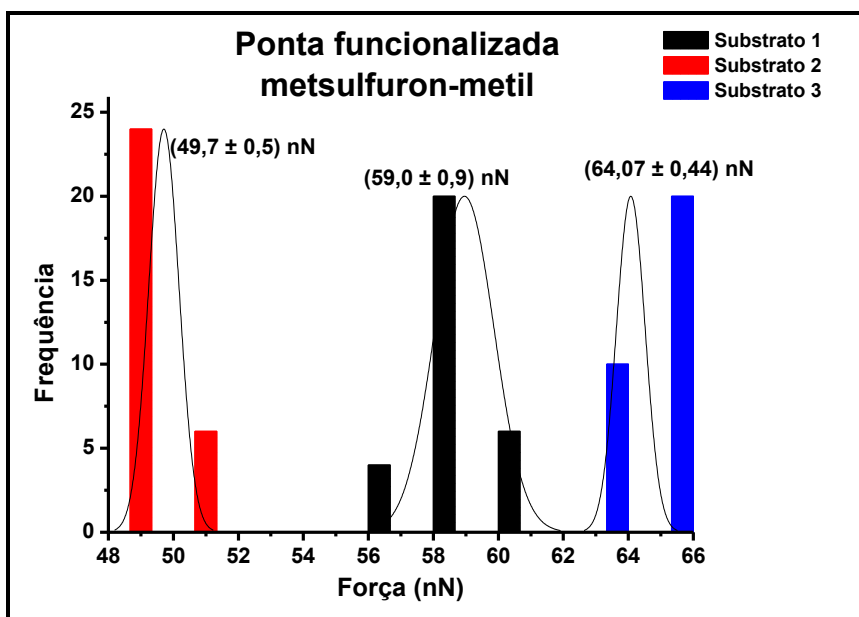
Fonte: SILVA, A.C.N.

Com o objetivo de investigar o comportamento das curvas de força utilizando pontas funcionalizadas e não funcionalizadas em amostras diferentes, foram realizadas 30 (trinta) medidas de curva de força em três substratos diferentes contaminados com o herbicida metsulfuron-metil. A FIG. 26a mostra a variação entre três substratos distintos, contaminados com metsulfuron-metil para a ponta não funcionalizada, e a FIG. 26b mostra a variação entre três substratos distintos, contaminados com metsulfuron-metil para a ponta funcionalizada com a enzima ALS.

FIGURA 26 - Gráfico comparativo das medidas de força de adesão determinadas com ponta não funcionalizada (a) e ponta funcionalizada (b) em três substratos distintos contaminados com metsulfuron-metil.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.

O valor médio da força de adesão para os três substratos distintos medidos com a ponta de AFM não funcionalizada foi de  $F_{ad} = (13 \pm 2)$  nN, enquanto que o valor médio da

força de adesão para os três substratos distintos medidos com a ponta de AFM funcionalizada foi de  $F_{ad} = (58 \pm 7)$  nN. Houve um aumento de 358% na força de adesão medida com a ponta funcionalizada em comparação com a ponta não funcionalizada.

O coeficiente de variação, calculado para os três substratos medidos com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada, são apresentados na TAB. 8. Ao observar a TAB. 8, é possível notar que a variação da força de adesão para a ponta não funcionalizada foi  $\leq 1,0\%$ , já para a ponta funcionalizada com a enzima ALS foi  $\leq 1,5\%$ , e se forem analisados os três substratos  $\leq 12,6\%$ . Para todas as medidas realizadas até esse momento, foram utilizadas as mesmas pontas apenas variando os pontos e os substratos.

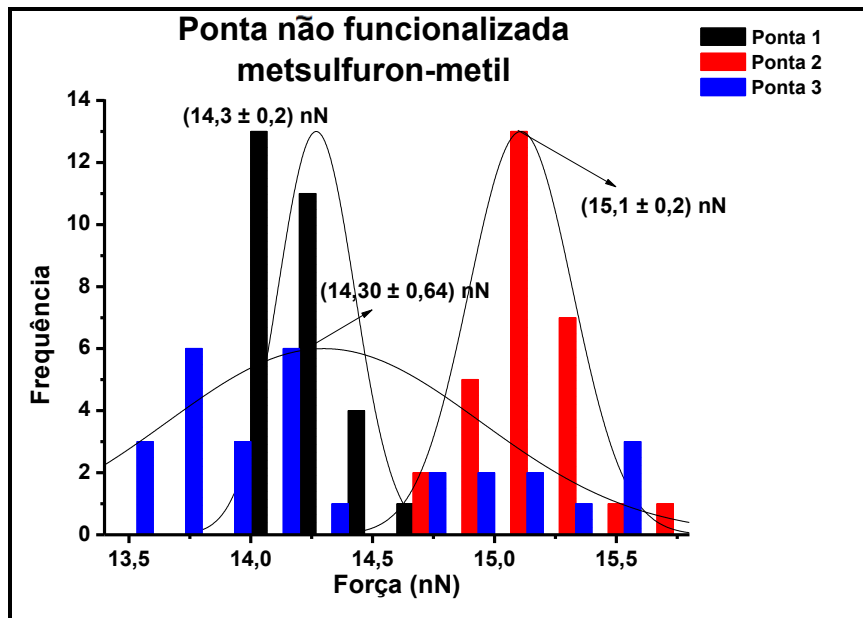
TABELA 8 - Coeficiente de variação da força de adesão medida com as pontas de AFM não funcionalizada e funcionalizada com a enzima ALS, nos substratos contaminados com metsulfuron-metil, em três substratos distintos.

	<b>Substrato</b>	<b>Ponta não funcionalizada (%)</b>	<b>Ponta Funcionalizada (%)</b>
<b>Coeficiente de variação</b>	1	0,8	1,5
	2	0,9	0,9
	3	1,0	0,7
	<b>Média dos Substratos</b>	12,1	12,6

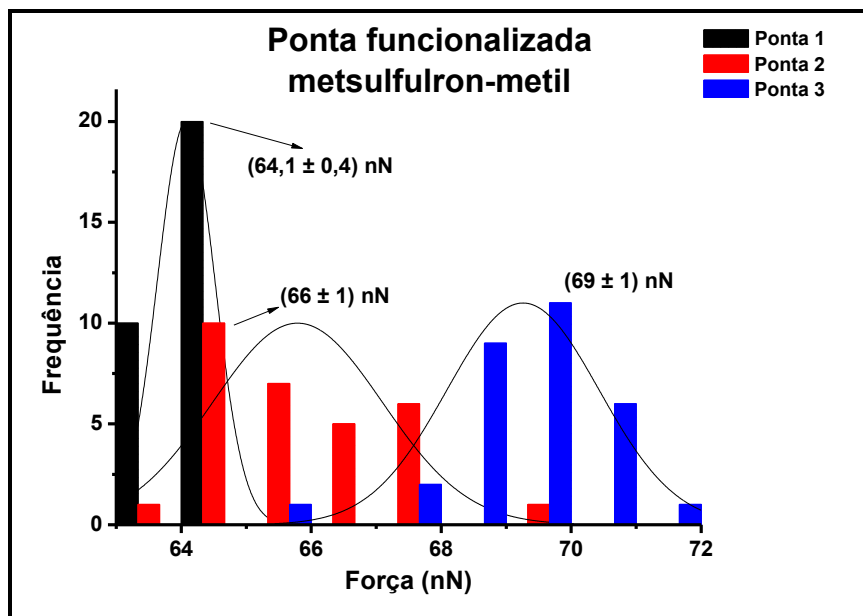
Fonte: SILVA, A.C.N.

Como próxima etapa, investigou-se a variação da ponta de AFM, sendo que foram testadas três pontas diferentes e cada ponta realizou trinta curvas de força. A FIG. 27a mostra a variação entre três pontas distintas não funcionalizadas, e a FIG. 27b mostra a variação entre três pontas distintas funcionalizada com a enzima ALS. As medidas foram determinadas em substratos contaminados com metsulfuron-metil.

FIGURA 27 - Gráfico comparativo das medidas de força de adesão, determinadas com ponta não funcionalizada (a) e ponta funcionalizada (b), em substratos contaminados com metsulfuron-metil. Foram utilizadas três pontas diferentes em cada caso.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.

O valor médio da força de adesão para as três pontas de AFM não funcionalizadas foi de  $F_{ad} = (14,6 \pm 0,5)$  nN, enquanto que o valor médio da força de adesão para as três pontas de AFM funcionalizadas foi de  $F_{ad} = (66 \pm 3)$  nN. Houve um aumento de 356% na força de adesão medida com a ponta funcionalizada em comparação com a ponta não funcionalizada.

O coeficiente de variação calculado para as três pontas de AFM não funcionalizadas e funcionalizadas serão mostrado na TAB. 9. Ao observar a TAB. 9, é possível notar que a variação da força de adesão para a ponta não funcionalizada foi  $\leq 4,5\%$ , já para a ponta funcionalizada com a enzima ALS foi  $\leq 1,9\%$ , e se forem analisadas as três pontas  $\leq 4,0\%$ .

TABELA 9 - Coeficiente de variação da força de adesão medida com três pontas de AFM distintas, não funcionalizada e funcionalizada com a enzima ALS, nos substratos contaminados com metsulfuron-metil.

	<b>Ponta</b>	<b>Ponta não funcionalizada (%)</b>	<b>Ponta Funcionalizada (%)</b>
<b>Coeficiente de variação</b>	1	1,1	0,7
	2	1,4	1,9
	3	4,5	1,7
	<b>Média das Pontas</b>	3,2	4,0

Fonte: SILVA, A.C.N.

O aumento percentual médio da força de adesão medida com a ponta funcionalizada com a enzima ALS, sobre os substratos contaminados com imazaquin foi de 172%, e sobre os substratos contaminados com metsulfuron-metil 323%. É possível observar que em ambos os casos o aumento percentual foi drástico; a análise desses dados é promissora, pois sugere que é possível utilizar pontas de AFM funcionalizadas para aplicação em sensoriamento de herbicidas.

Nos últimos anos, a funcionalização química de pontas de AFM tem despertado o interesse de alguns grupos de pesquisa, Kaur e seus colaboradores<sup>76</sup> investigaram o desenvolvimento de um imunobiossensor para detecção dos herbicidas ácido 2,4-diclorofenoxiacético e atrazina, eles imobilizaram anticorpos numa superfície e aplicaram pontas de AFM funcionalizadas com hapteno-proteínas. O estudo indicou um grande potencial do AFM para ser aplicado em um imunobiossensor que determinaria a presença e

também avaliaria as interações anticorpo-hapteno. Porém, a funcionalização de pontas de AFM com enzima, para o desenvolvimento de um nanobiossensor é inédita<sup>3</sup>, já que o único trabalho publicado na literatura sobre esse tema é de nosso grupo de pesquisa<sup>77</sup>. Além disso, a partir dos resultados apresentados em nosso trabalho, pode-se desenvolver nanossensores para detecção de outros contaminantes, tais como toxinas, metais pesados e outros pesticidas.

## **5.2 Resultados Teóricos**

### **5.2.1 Cálculo do trabalho de adesão**

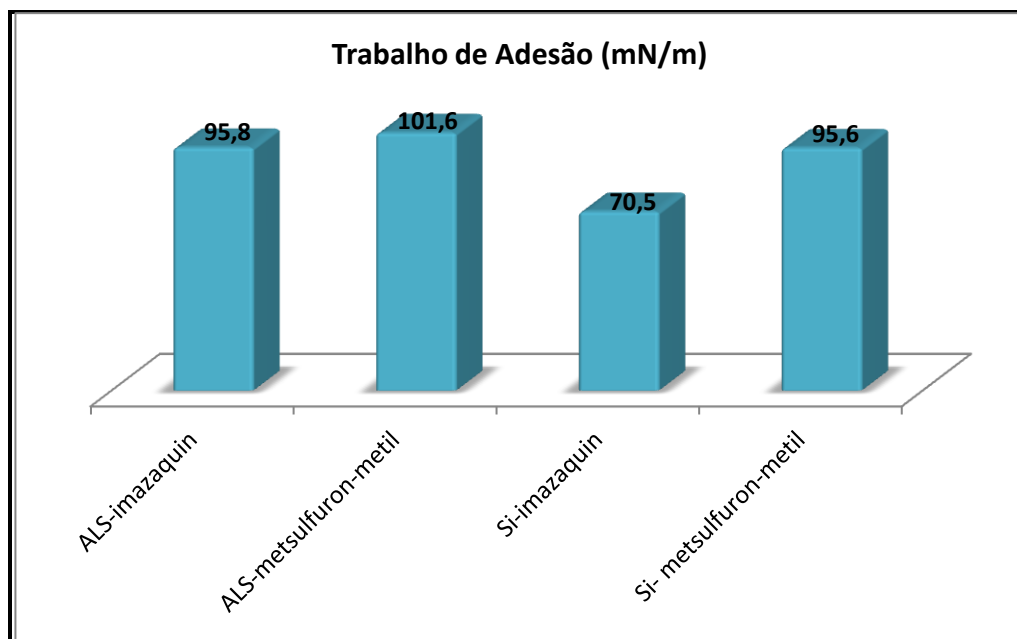
Utilizando a Equação 5 calculou-se o trabalho de adesão entre os sistemas: herbicida-enzima e herbicida-ponta. Tais resultados estão representados na FIG.28, do qual se observa que o trabalho da adesão entre a ponta funcionalizada com a enzima ALS e os substratos contaminados com imazaquin e metsulfuron-metil é maior quando comparado com a ponta não funcionalizada. Esses resultados serão utilizados para calcular a força de adesão total entre a ponta do AFM e o herbicida. O valor total permite explicar a afinidade entre o herbicida e a enzima. Ressalta-se que o trabalho de adesão não permite calcular a interação específica entre o herbicida e a enzima, o que acarretaria numa diferença mais drástica entre os valores apresentados na FIG. 28. O trabalho de adesão leva em consideração somente a afinidade energética entre as amostras, conforme a Equação 5.

---

<sup>3</sup> Pesquisa realizada no ISI Web of Science no dia 17/02/2012.



FIGURA 28 - Representação do Trabalho de Adesão entre a ponta não funcionalizada (Si), ponta funcionalizada (ALS) e os substratos contaminados com imazaquin e metsulfuron-metil.



Fonte: SILVA, A.C.N.

### 5.2.2 Cálculos da Força de Adesão usando os modelos DMT e JKR

Os valores teóricos da força de adesão foram calculados aplicando as teorias discutidas no item 3.7.3, DMT e JKR. Foi utilizado um raio de curvatura de  $20 \pm 5$ nm para as pontas não funcionalizadas,  $30 \pm 5$ nm para as pontas funcionalizadas e  $\gamma_{LV}=0,072$  N/m para energia de superfície da água.

A TAB. 10 apresenta os resultados teóricos, para a ponta funcionalizada com a enzima ALS e para a ponta não funcionalizada, sendo que com ambas as pontas foram realizadas testes com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil. Os resultados alcançados neste tópico serão utilizados para calcular a força de adesão total entre a ponta do AFM e a amostra.

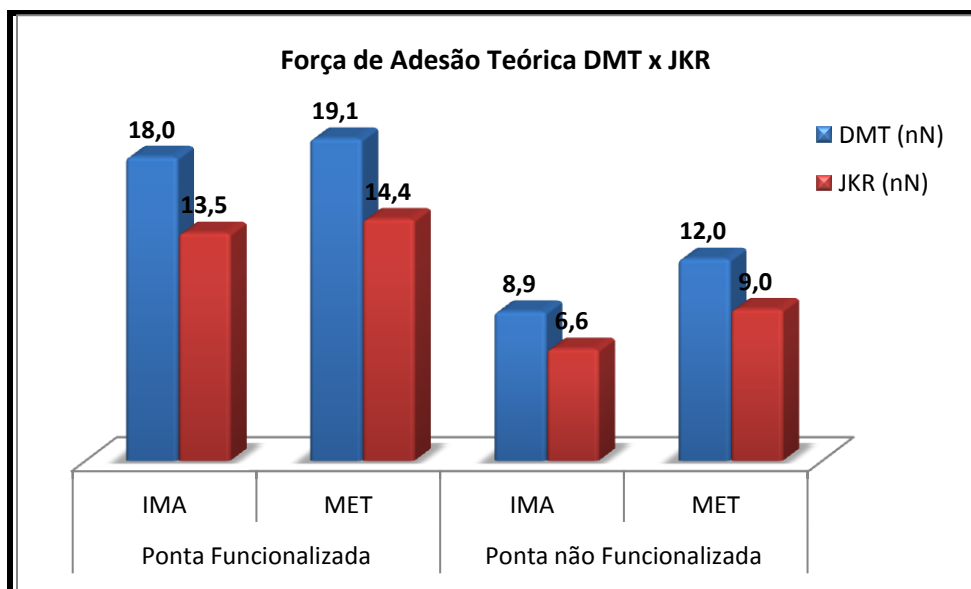
TABELA 10 – Apresentação dos resultados experimentais e teóricos da força de adesão determinada para a ponta funcionalizada com a enzima ALS e para a ponta não funcionalizada. Com ambas as pontas foram realizadas testes com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil.

		<b>DMT</b> <b> F  (nN)</b>	<b>JKR</b> <b> F  (nN)</b>
<b>Ponta Funcionalizada</b>	Imazaquin	18,0	13,5
	Metsulfuron-metil	19,1	14,4
<b>Ponta não Funcionalizada</b>	Imazaquin	8,9	6,6
	Metsulfuron-metil	12,0	9,0

Fonte: SILVA, A.C.N.

A seguir será apresentado um gráfico (FIG. 29), com os dados teóricos mostrados na TAB 10 para melhor visualização dos resultados.

FIGURA 29–Força de Adesão Teórica obtida através das teorias DMT e JKR.



Fonte: SILVA, A.C.N.

### 5.2.3 Cálculos da força capilar

A TAB. 11 mostra os valores da força capilar que foi calculada de acordo com a Equação 13. A força capilar tem uma grande influência na força de adesão medida em atmosfera ambiente, pois as amostras expostas ao ar formam uma fina camada de água na superfície. Além disso, os resultados deste tópico serão utilizados no cálculo da força de adesão total.

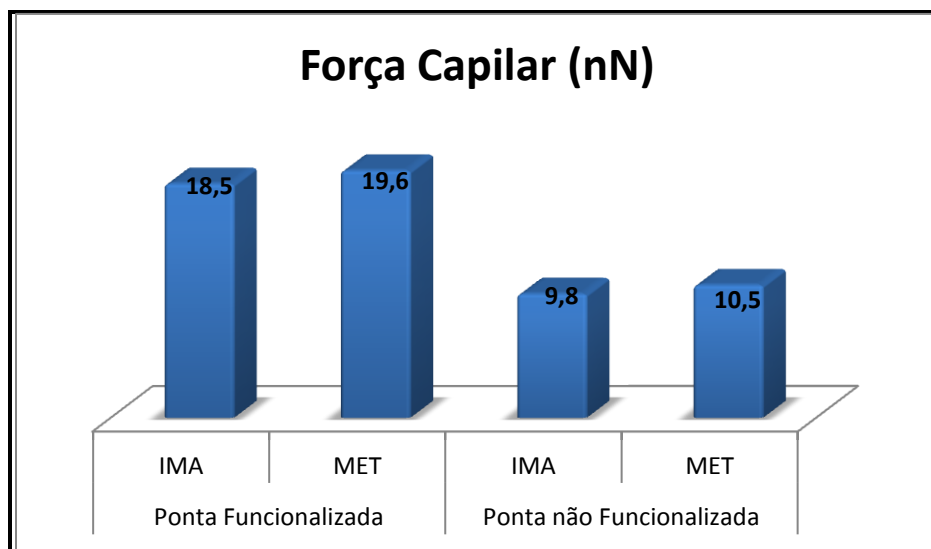
TABELA 11 – Cálculo teórico da força capilar.

		<b>Força Capilar (nN)</b>
<b>Ponta Funcionalizada</b>	Imazaquin	18,5
	Metsulfuron-metil	19,6
<b>Ponta não Funcionalizada</b>	Imazaquin	9,8
	Metsulfuron-metil	10,5

Fonte: SILVA, A.C.N.

A força capilar determinada com a ponta funcionalizada apresenta valores maiores devido à hidrofiliabilidade da enzima ALS, o que pôde ser comprovado com a determinação do ângulo de contato. A seguir será apresentado um gráfico (FIG. 30) para melhor visualização dos dados.

FIGURA 30 – Gráfico cálculo teórico da força capilar.



Fonte: SILVA, A.C.N.

#### 5.2.4 Cálculo da Força de Adesão Teórica Total

O valor teórico total da força de adesão entre dois materiais pode ser obtido utilizando a Eq. 17 ( $F_{\text{total}}^{\text{ar}} = F_{\text{cap}} + F_{\text{DMT/JKR}}$ ). Nessa equação são somadas as principais componentes da força de adesão. A seguir serão apresentados os valores calculados para força de adesão teórica total, aplicando a teoria DMT e JKR (TAB. 12).

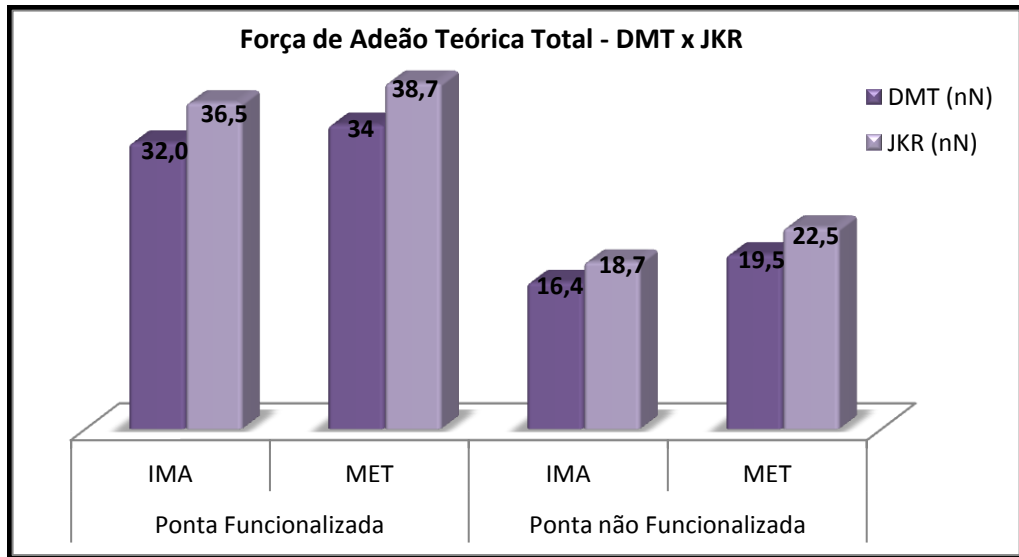
TABELA 12 – Apresentação do cálculo da força de adesão teórica aplicando a teoria DMT.

		<b>Módulo da Força Adesão Teórica Total com DMT (nN)</b>	<b>Módulo da Força Adesão Teórica Total com JKR (nN)</b>
<b>Ponta Funcionalizada</b>	Imazaquin	36,5	32,0
	Metsulfuron-metil	38,7	34,0
<b>Ponta não Funcionalizada</b>	Imazaquin	18,7	16,5
	Metsulfuron-metil	22,5	19,5

Fonte: SILVA, A.C.N.

A FIG. 31 apresenta os valores calculados para a força de adesão total utilizando as teorias DMT e JKR para auxiliar na visualização dos resultados.

FIGURA 31–Módulo da força de adesão total utilizando as teorias DMT e JKR.



Fonte: SILVA, A.C.N.

A força de adesão medida experimentalmente pode ser corroborada com a força de adesão teórica total por intermédio da TAB. 13. Os dados teóricos apresentados pelas duas teorias, para a ponta funcionalizada (linhas em azul) foram bem menores do que os dados experimentais, isso se deve a uma força específica presente entre a ponta funcionalizada e a amostra. As duas teorias não levam em consideração a ocorrência de uma força específica no sistema esfera-plano; E ressalta-se que não foi encontrada na literatura uma equação que permitisse o cálculo da força específica. Portanto, podemos considerar os resultados coerentes.

A força de adesão medida em ar é representada pela Eq. 20.

$$F_{experimental}^{ar} = F_{total} + F_{especifica} \quad (20)$$

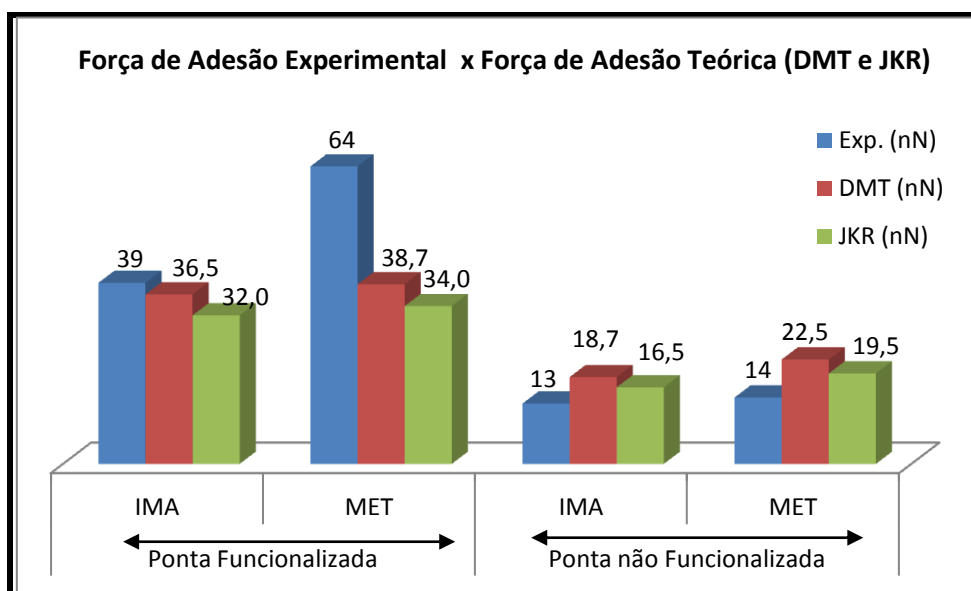
TABELA 13 - Apresentação dos resultados experimentais e teóricos da força de adesão determinada para a ponta funcionalizada com a enzima ALS e para a ponta não funcionalizada. Com ambas as pontas foram realizadas testes com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil.

		$F_{Exp}^{AD}$ (nN)	$F_{Teórica}^{AD}$ – DMT (nN)	$F_{Teórica}^{AD}$ – JKR (nN)
<b>Ponta Funcionalizada</b>	Imazaquin	39 ± 2	36,5	32,0
	Metsulfuron-metil	64,1 ± 0,4	38,7	34,0
<b>Ponta não Funcionalizada</b>	Imazaquin	13 ± 0,1	18,7	16,5
	Metsulfuron-metil	14,3 ± 0,2	22,5	19,5

Fonte: SILVA, A.C.N.

A seguir será apresentado um gráfico (FIG. 32) que compara os resultados experimentais e teóricos para melhor visualização.

FIGURA 32 – Gráfico comparativo entre os resultados experimentais e teóricos da força de adesão determinada para a ponta funcionalizada com a enzima ALS e para a ponta não funcionalizada. Com ambas as pontas foram realizadas testes com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil.



Fonte: SILVA, A.C.N.

Na seqüência, será apresentada uma tabela (TAB. 14), com os resultados semi-empíricos do cálculo da força específica. O cálculo foi efetuado de acordo com a Eq. 21.

$$F_{\text{específica}} = F_{\text{experimental}} - F_{\text{total}} \quad (21)$$

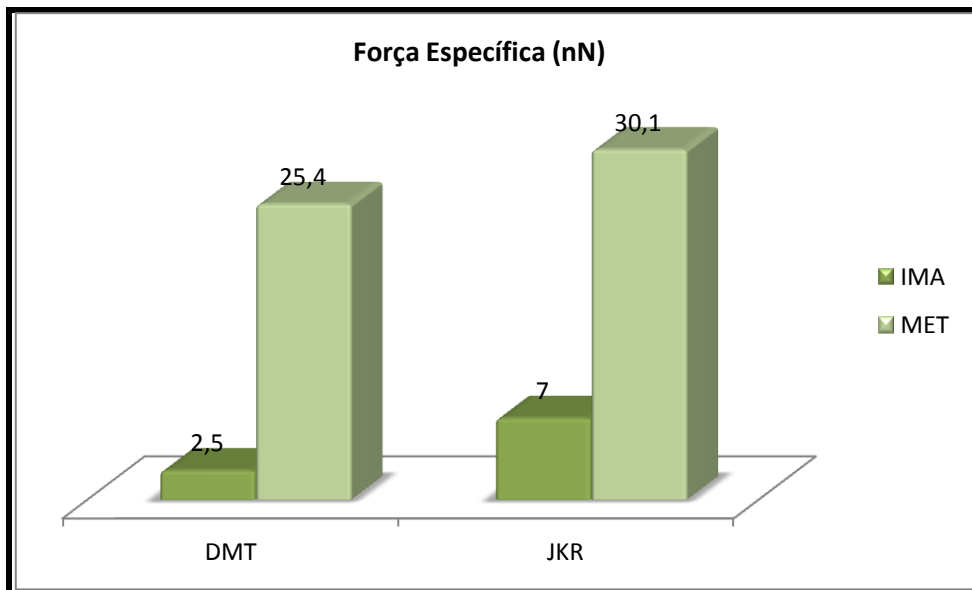
TABELA 14 – Resultados semi-empíricos do cálculo da força específica.

		$F_{Exp}^{AD}$ (nN)	$F_{Teórica}^{AD}$ (nN)	$F_{Específica}^{AD}$ (nN)
<b>DMT</b>				
<b>ALS</b>	IMA	$39 \pm 2$	36,5	2,5
	MET	$64,1 \pm 0,4$	38,7	25,4
<b>JKR</b>				
<b>ALS</b>	IMA	$39 \pm 2$	32,0	7,0
	MET	$64,1 \pm 0,4$	34,0	30,1

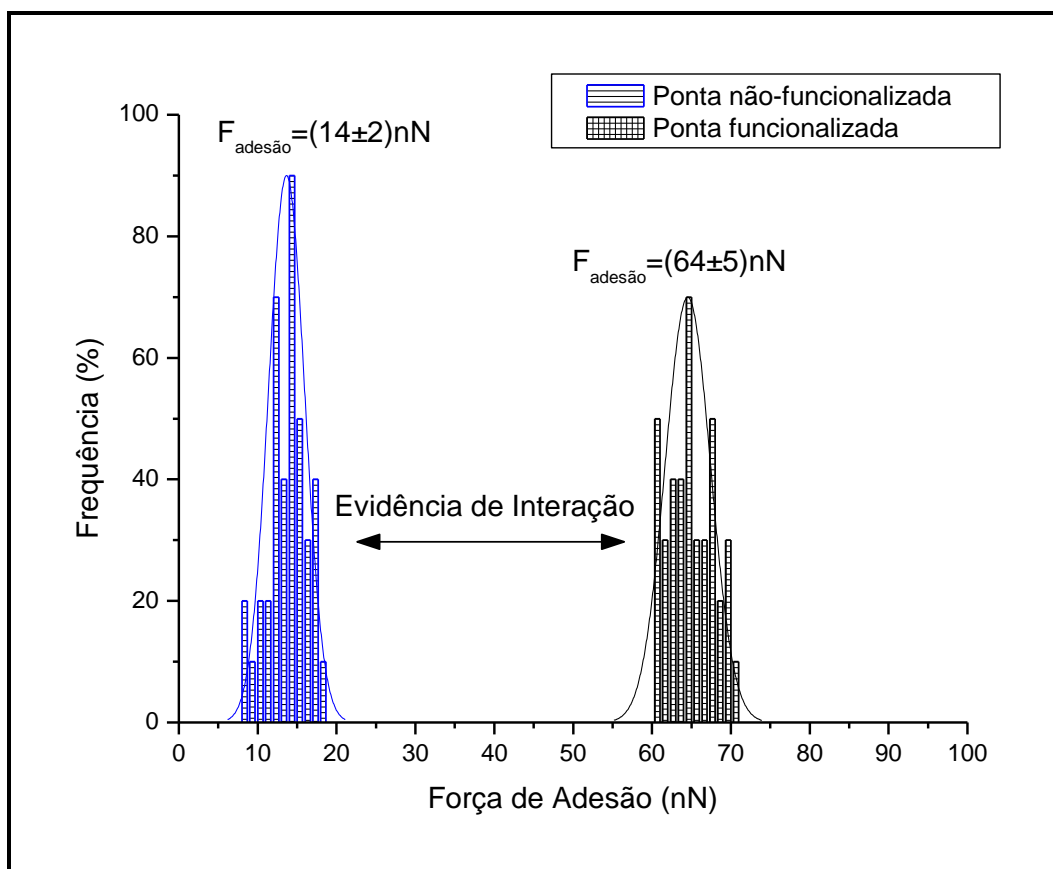
Fonte: SILVA, A.C.N.

Realizando-se testes com herbicidas de vários grupos (ANEXO I), é possível obter uma curva de calibração, assim futuramente, a partir dessa curva, traçar uma equação semi-empírica que descreve a **Força Específica**. A seguir será mostrado um gráfico (FIG. 33a), que compara a força específica aplicando as teorias DMT e JKR para os herbicidas imazaquin (IMA) e metsulfuron-metil (MET). Observa-se claramente que a adesão entre a ponta funcionalizada com a enzima ALS e o substrato contaminado com imazaquin (IMA) é menor quando comparado com a ponta funcionalizada com a enzima ALS e o substrato contaminado com o herbicida metsulfuron-metil (MET) (FIG. 33a). Esse fenômeno pode ser explicado pela maior inibição da enzima ALS pelos herbicidas pertencentes ao grupo sulfoniluréias<sup>56</sup>. A FIG. 33b mostra um gráfico que compara a força de adesão medida com uma ponta não funcionalizada, com uma ponta funcionalizada com a enzima ALS sobre substratos contaminados com o herbicida metsulfuron-metil para mais de 5000 medidas consecutivas. É possível observar o grande aumento na força de adesão, esse aumento pode ser atribuído à presença da interação específica. Observa-se um desvio maior para as duas medidas comparado com as medidas anteriores, isto se deve ao número maior de medidas de curva de força.

FIGURA 33 – (a) Gráfico comparativo da força específica semi-empírica aplicando as teorias DMT e JKR. (b) Gráfico comparativo da força de adesão medida com uma ponta não funcionalizada, com uma ponta funcionalizada com a enzima ALS sobre substratos contaminados com o herbicida metsulfuron-metil.



(a)



(b)

Fonte: SILVA, A.C.N.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos e apresentados nesse trabalho, foram possíveis as seguintes conclusões:

As medidas de ângulo de contato permitiu calcular as energias de superfície das pontas não funcionalizadas, das modificadas quimicamente com a enzima ALS, e dos substratos contaminados com os herbicidas imazaquin e metsulfuron-metil.

Através de cálculos matemáticos foi possível determinar o trabalho de adesão nas interfaces analisadas, o que demonstrou maior afinidade entre a superfície da ponta modificada quimicamente e os substratos contaminados com os herbicidas estudados, do que a ponta não funcionalizada. Esses resultados corroboraram com as curvas de força que apresentaram maior força de adesão entre as pontas funcionalizadas e os substratos contaminados com os herbicidas.

Os resultados de curva de força mostraram que os substratos contaminados com o herbicida imazaquin apresentam menor força de adesão quando comparados com os substratos contaminados com o herbicida metsulfuron-metil. Tais resultados evidenciam que o herbicida imazaquin é menos eficiente na inibição da enzima ALS.

As imagens de MEV e os espectros de FTIR permitem verificar a funcionalização das pontas em escala microscópica; os espectros de FTIR apresentam evidências da efetiva funcionalização das pontas, já as imagens de MEV permitem verificar o que ocorre com as pontas antes e após a determinação das curvas de força.

A força de adesão determinada com a ponta funcionalizada com a enzima ALS teve um aumento de aproximadamente 172%, quando comparada com a ponta não funcionalizada, para os substratos contaminados com imazaquin, e 323%, quando comparada com a ponta não funcionalizada, para os substratos contaminados com metsulfuron-metil. Tais resultados são promissores, pois sugerem que pontas de AFM funcionalizadas quimicamente têm um grande potencial para aplicação em nanobiossensores para detecção dos herbicidas imazaquin e metsulfuron.

Os modelos teóricos utilizados em nosso trabalho corroboraram de forma satisfatória com os resultados experimentais o que evidencia a potencialidade da técnica para a construção de nanossensores específicos utilizando a microscopia de força atômica.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho as principais sugestões para trabalhos futuros são:

1. Realizar testes com herbicidas inibidores enzimáticos de outros grupos (ANEXO I), e verificar a influência da concentração da solução na determinação das curvas de força.
2. Funcionalizar quimicamente pontas de AFM com outras moléculas, com o objetivo de detectar outros contaminantes como toxinas e metais pesados.
3. Realizar a funcionalização química em pontas de AFM distintas, variando o tamanho do raio de curvatura, para verificação da influência de raios maiores e menores na força de adesão medida através das curvas de força.
4. Variar a umidade relativa do ar, a fim de investigar a influência da força capilar na determinação das curvas de força.
5. Realizar testes em líquido, com o objetivo de estudar a interação específica quando estão ausentes a força capilar e força VDW.
6. Modelar a interação enzima-herbicida utilizando dados experimentais e teóricos (modelagem semi-empírica);
7. Encontrar a equação teórica da interação específica.
8. Estudar o sistema ponta-amostra com Microscopia de Força Lateral.



## REFERÊNCIAS

- 
- <sup>1</sup> MOHAMMAD, R., KHALILI, Z., YADOLLAH, Y., NAJMEH, Y., SHAHAB, S., Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection, *Ana. Chi. Acta* v. 606, n.2, p. 202-208, 2008.
- <sup>2</sup> RICE, P., J., ARTHUR, E., L., BAREFOOT, A., C., Advances in Pesticide Environmental Fate and Exposure Assessments, *J. Agric. Food Chem.* v.55,n. 14, p. 5367-5376, 2007.
- <sup>3</sup> MARC, C., Environmental toxins and health – the health impact of pesticides, *Aus. Fam. Phy.* v. 36, n. 12, p. 1002-1004, 2007.
- <sup>4</sup> SCORDINO, M, SABATINO, L., TRAULO, P., GARGANO G., G., M., PANTÓ, V., GAMBINO, G., L., Detection of fungicide guazatine residues for quality assessment of commercial citrus fruit, *Eur. Food Res. Tec.* v. 227, n. 5, p. 1339–1347, 2008.
- <sup>5</sup> SONGA, E., A., SOMERSET, V., S., WARYO, T., BAKER, P., G., L., IWUOHA, E., I., Amperometric nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples, *Pur. And Apl. Che.*, v. 81, n. 1, p. 123-139, 2009.
- <sup>6</sup> SONGA, E., A., WARYO, T., JAHED, N., BAKER, P., G., L., KGARABE, B., V., IWUOHA, E., I., Electrochemical nanobiosensor for Glyphosate Herbicide and Its Metabolite, *Ele.*, v. 21, n 3-5, p. 671-674, 2009.
- <sup>7</sup> ALFINITO, E., MILITHALER, J., F., PENNETA C., REGGIANE, L., A single protein based nanobiosensor for odorant recognition, *Mic. Jou.*, v. 41, n. 11, p. 718-722, 2010.
- <sup>8</sup> CHENG, M., S., LAU, S., H., CHOW, V., T., TOH, C., S., Membrane-Based Electrochemical Nanobiosensor for Escherichia coli Detection and Analysis of Cells Viability, *Env.Sci. & Tec.*, v. 45, n. 15, p. 6453-6459, 2011.
- <sup>9</sup> BORISOV, S., M., WOLFBEIS, O., S., Optical Biosensors, *Che.Rev.*, v. 108, n. 2, p. 423-461, 2008.
- <sup>10</sup> NOY A., VEZENOV D. V., LIEBER C. M., Chemical Force Microscopy, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, v. 27, p. 381–421, 1997.
- <sup>11</sup> FLORIN, E., MOY, V., T., GAUB H., E., Adhesion forces between individual ligand receptor pairs, *Sci.*, v. 264, n. 5157, p. 415-417, 1997.
- <sup>12</sup> BUTT, H., CAPPELLA, B., KAPPL, M., Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Sur. Sci. Rep.*, v. 59, n. 1-6, p. 1-152, 2005.

- 
- <sup>13</sup> SARANGAPANI, K., TORUN, H., FINKLER, O., ZHU, Z., DEGERTEKIN, L., Membrane-based actuation for high-speed single molecule force spectroscopy studies using AFM, *Eur. Bio. Jou.*, v. 39, p. 1219–1227, 2010.
- <sup>14</sup> TANG, J., EBNER, A., KRAXBERGER, B., LEITNER, M., HYKOLLARI, A., , KEPPLINGER, C., GRUNWALD, C., GRUBER, H., J., TAMPÉ R., SLEYTR, U., B., ILK, N., HINTERDORFER, P., Detection of metal binding sites on functional S-layer nanoarrays using single molecule force spectroscopy, *Jou. ofStru. Bio.*, v. 168, p. 217–222, 2009.
- <sup>15</sup> KIM, D., CHUNG, N., KIM, J., S., PARK, J., W., Immobilizing a single DNA molecule at the apex of AFM tips through picking and ligation, *Sof. Mat.*, v. 6, p. 3979–3984, 2010.
- <sup>16</sup> ZIEGLER, C., Cantilever-based biosensors, *Ana.and Bio. Che.*, v. 379, n. 7-8, p. 946-959, 2004.
- <sup>17</sup> BINNING, G., ROHRER, H., GERBER, C., WEIBEL, E., Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy, *Phi. Rev. Let.*, v. 49, n. 1, 1982.
- <sup>18</sup> HANSMA, P., K., TERSOFF, J., Scanning tunneling microscopy, *Jou. Appl. Phy.*, v. 61, n. 2, 1987.
- <sup>19</sup> ABRAHAM, D.,W., MAMIN, H., J., GANZ, E, CLARKE, J, Surface modification with the scanning tunneling microscope, *IBM Jou. of Res. and Dev.*, v. 30, n.5, p.492-499,1986.
- <sup>20</sup> ABRAHAM, D.,W., SATTLER, K, GANZ, E, MAMIN, H., J., THOMSON, R., E., CLARKE, J, Direct imaging of Au and Ag clusters by scanning tunneling microscopy, *Appl. Phy. Let.*, v. 49, n. 14, p. 853-855,1986.
- <sup>21</sup> BINNING, G., QUATE, C., F., GERBER, C., Atomic Force Microscope, *Phy. Rev. Let.*, v. 56, n. 9, p. 930-934, 1986.
- <sup>22</sup> FUKUI, M., “Técnicas de Microscopia de Tunelamento de Elétrons (MTE) e Microscopia de Força Atômica (MFA) aplicadas ao estudo de superfícies de grafite e diamante”, UNICAMP, 1992.
- <sup>23</sup> ALBRECHT, T., R., AKAMINE, S., CARVER, T., E., QUATE, C., F., Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope, *Jou. of Vac. Sci. & Tec. Vac. Sur. and Fil.*, v.8, n. 4, p. 3386-3396, 1990.
- <sup>24</sup> BUTT, H., J., JASCHKE, M., DUCKER, W., Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope, *Bio.and Bio.*, v. 38, p. 191-201, 1995.
- <sup>25</sup> JASCHKE, M., BUTT, H., J., MANNE, S., GAUB, H., E., HASEMANN, O., KRIMPHOVE, F., WOLFF, E., K., The atomic force microscope as a tool to study and manipulate local surface properties, *Bio. & Bio.*, v. 11, n. 6-7, p. 601-612, 1996.

- 
- <sup>26</sup> LEITE, F. L., Fundamentos Teóricos. Estudos de Filmes de Polímeros Condutores por Microscopia de Força Atômica: Processos de Adsorção e Propriedades Eletrônicas: Cap 1, p. 19-22. Tese. Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- <sup>27</sup> ITO, T., GRABOWSKA, I., IBRAHIM, S., Chemical-force microscopy for materials characterization, *Tre.in Ana. Che.*, v. 29, n. 3, 2010.
- <sup>28</sup> TANINAKA, A., TAKEUCHI, O., SHIGEKAWA, H., Reconsideration of Dynamic Force Spectroscopy Analysis of Streptavidin-Biotin Interactions, *Int. J. Mol. Sci.*, v. 11, n. 5, p.2134-2151, 2010.
- <sup>29</sup> SCHRODER, T., GEISLER, T., WALHORN, V., SCHNATWINKEL, B., ANSELMETTI, D., MATTAY, J., Single-molecule force spectroscopy of supramolecularheterodimeric capsules, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 12, n. 36, p. 10981–10987, 2010.
- <sup>30</sup> JOHNSON, W., T., Immobilizing Biological Molecules on AFM Probes for MRFM and TREC Studies, Agilent technologies, Application note, retirado de <http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5989-7702EN.pdf>
- <sup>31</sup> TSAPIKOUNI, T., S., MISSIRLIS, Y., F., Measuring the force of single protein molecule detachment from surfaces with AFM, *Col. and Sur. B Bio*, v. 75, n. 1, p. 252–259, 2010.
- <sup>32</sup> HINTERDORFER, P., SCHILCHER, K., BAUMGARTNER, W., GRUBER, H. J., SCHINDLER, H., A Mechanistic study of the Dissociation of Individual Antibody-Antigen Pairs by Atomic Force microscopy, *Nan.*, v. 4, p. 177-188, 1998.
- <sup>33</sup> KIENBERGER, F., EBNER, A., STROH, C., GRUBER, H., HINTERDORFER, P., Fishing Out Individual Proteins with AFM, *BIOforum*, p. 66-68, 2004.
- <sup>34</sup> WANG, H., BASH, R., YODH, J., G., HAGER, G., L., LOHR, D., LINDSAY, S., M., Glutaraldehyde Modified Mica: A New Surface for Atomic Force Microscopy of Chromatin, *Bio. Jou.*, v. 83, n. 6, p. 3619-3625, 2002.
- <sup>35</sup> RICHARDS, F., M., KNOWLES, J., R., Glutaraldehyde as a Protein Cross-linking Reagent, *Jou. Mol. Bio.*, v. 37, n. 1, p. 231-233, 1968.
- <sup>36</sup> LUZ, A., P., RIBEIRO, S., PANDOLFELLI, V., C., Uso da molhabilidade na investigação do comportamento. de corrosão de materiais refratários. *Cer.*, v.54, p. 174-183, 2008
- <sup>37</sup> WONG, S., C., RAMKISSOON, Y., D., LOPEZ, M., PAGE, K., PARKIN, I., SULLIVAN, P., M., Use of hydroxypropylmethylcellulose 2% for removing adherent silicone oil from silicone intraocular lenses, *Bri.Jou.ofOph.*, v. 93, n. 8, p. 1085-1088, 2009.
- <sup>38</sup> OWENS, D.K., WENDT, R.C., Some Thermodynamic Aspects of Polymer Adhesion, *Jou. of App. Pol. Sci.*, v. 13, p. 1741–1749, 1969.

- 
- <sup>39</sup> FOWKES, F., M., Attractive Forces at Interfaces, *Ind. and Eng. Che.*, v. 56, n. 12, p. 40-52, 1964.
- <sup>40</sup> CARVALHO, A., J., F., CURVELO, A., A., S., GANDINI, A., Surface Chemical Modification of Thermoplastic Starch: Reactions with Isocyanates, Epoxy Functions and Stearoyl Chloride, *Ind. Cro. and Pro.*, v. 21, p. 331-336, 2005.
- <sup>41</sup> HARKINS, W., D., Surface Energy and The Orientation of Molecules in Surfaces as Revealed by Surface Energy Relations, *Z. Phys. Che.*, v. 139, p. 647-691, 1928.
- <sup>42</sup> MANGIPUDI, V.S., FALSAFI, A., Adhesion Science and Engineering: Surfaces, Chemistry & Applications, ed. A.V. Pocius, Elsevier, v.2, Capítulo 2, 2002.
- <sup>43</sup> PACKHAM, D., E., Adhesion Science and Engineering: Surfaces, Chemistry & Applications, ed. A.V. Pocius, Elsevier, v. 2, Capítulo 7, 2002.
- <sup>44</sup> ISRAELACHVILI, J., N., Intermolecular and Surface Forces, Second Edition, Academic Press, London, 1985.
- <sup>45</sup> DERJAGUIN, B.V., MULLER, V. M., TOPOROV, Y.P., Effect of Contact Deformations on the adhesion of particles, *Jou.of Col. and Int.Sci.*, v. 53, n. 2, 1975.
- <sup>46</sup> CAPPELLA, B., DIETLER, G., Force-distance Curves by Atomic Force Microscopy, *Sur. Sci. Rep.*, v. 34, p. 1-104, 1999.
- <sup>47</sup> JOHNSON, K., L., KENDALL, K., ROBERTS, A., D., Surface Energy and the Contact of Elastic Solids, *Pro.of the Roy. Soc. of Lon.*, v. 324, p 301-313, 1971.
- <sup>48</sup> LEITE, F., L., HERRMANN, P., S., P., DA RÓZ, A., L., FERREIRA, F., C., CURVELO, A., A., S., MATTOSO, L., H., C., Investigation of Sisal Fibers by Atomic Force Microscopy: Morphological and Adhesive Characteristics, *Jou. of Nan. and Nan.*, v. 6, n. 8, p. 2354-2361, 2006
- <sup>49</sup> MAUGIS, D.; POLLOCK, H., M., Surface Forces, Deformation and Adherence at Metal Microcontacts, *Acta Met.*, v. 32, n. 9, p. 1323-1334, 1984.
- <sup>50</sup> LECKBAND, D., ISRAELACHVILI, J., N, Intermolecular forces in biology, *Qua. Rev. of Bio.*, v. 34, n. 2, p. 105-267, 2001.
- <sup>51</sup> LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. DRELICH, J.; MITTAL, K.L. Atomic Force Microscopy in Adhesion Studies, Boston, Leiden, p. 03-43, 2005.
- <sup>52</sup> NELSON, D., L., COX, M., Lehninger Principles of Biochemistry, third edition, RR Donnelley, USA, p. 189-221, 2002.



- 
- <sup>53</sup> MACHADO, R., F., BARROS, A., C., S., A., ZIMMER, P., J., AMARAL, A., S., Reflexos do Mecanismo de Ação de Herbicidas na Qualidade Fisiológica de Sementes e na Atividade Enzimática em Plântulas de Arroz, *Rev. Bra. de Sem.*, v. 28, n. 3, p. 151-160, 2006
- <sup>54</sup> GAZZIERO, D., L., P., BRIGHENTI, A., M., MACIEL, C., D., G., CHRISTOFOLLETTI, P., J., ADEGAS, F., S., VOLL, E., Resistência de amendoim - bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS, *Pla. Dan.*, v. 16, p. 117-125, 1998.
- <sup>55</sup> HERSHEY, H., P., SCHWARTZ, L., J., GALE, J., P., ABELL, L., M., Cloning and functional expression of the small subunit of acetolactate synthase from *Nicotianaplumbaginifolia*, *Pla. Mol. Bio.*, v. 40, n. 5, p. 795-806, 1999.
- <sup>56</sup> DUGGLEBY, R., G., MC COURT, J., A., GUDDAT, L., W., Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase, *Pla.Phy.and Bio.*, v. 46, p. 309-324, 2008.
- <sup>57</sup> MC COURT, J., A., DUGGLEBY, R., *G Ami.Aci.*, v. 31, n. 2, p. 173-210, 2006.
- <sup>58</sup> CHIPMAN, D., BARAK, Z., A., SCHLOSS, J., V., Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases, *Bio. et Bio. Acta*, v. 1385, p. 401-419, 1998.
- <sup>59</sup> MC COURT, J., A., PANG, S., S., KING-SCOTT, J., GUDDAT, L., W., DUGGLEBY, R., G., Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase, *Pro.of The Nat. Aca. Of Sci. of The Uni. Sta. of Ame.*, v. 03, n. 3 , p. 569-573, 2006.
- <sup>60</sup> VARGAS, L., BORÉM, A., SILVA A., A., Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbiaheterophylla*, *Pla. Dan.*, v. 19, p. 331-336, 2001.
- <sup>61</sup> TANIGUCHI, Y., KAWATA, W, ANDO, I., SHIMIZU T., OHSHIMA, M. Selecting genetic transformants of indica and indica-derived rice cultivars using bispyribac sodium and a mutated ALS gene, *Plant Cell Rep.*, v. 29, p. 1287–1295, 2010.
- <sup>62</sup> WESTERFELD, W., W., A colorimetric determination of blood acetoin, *Jou.Of Bio.Che.*, v. 161, n. 2, p. 495-502, 1945.
- <sup>63</sup> BRADFORD, M., M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ana. Bio.*,v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- <sup>64</sup> BARATTIN, R., VOYER, N., Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events, *Che. Com.*, v. 13, p. 1513–1532, 2008.
- <sup>65</sup> TOUHAMI, A., HOFFMANN, B., VASELLA, A., DENIS, F., A., DUFRÊNE, Y. F. Probing Specific Lectin-Carbohydrate Interactions Using Atomic Force Microscopy Imaging and Force Measurements, *Lan.*, v.19, p. 1745-1751, 2003.

---

<sup>66</sup> HUTTER, J., L., BECHHOEFER, J., Calibration of atomic-force microscope tips, *Rev. Sci. Ins.*, v. 64, n. 7, p. 1868-1873, 1993

<sup>67</sup> <http://www.brukerafmprobes.com/Product.aspx?ProductID=3370>, acessado 15/01/2012 às 16:40h.

<sup>68</sup> LEITE, F.L, RIUL JR, A., HERRMANN, P. S. P., Mapping of adhesion forces on soil minerals in air and water by atomic force spectroscopy (AFS). *J. Adhesion Science and Technology*, v. 17, p. 2141-2156, 2003.

<sup>69</sup> LIMANSKII, A., P., Functionalization of Amino-Modified Probes for Atomic Force Microscopy, *Bio.*, v. 51, p. 225-235, 2006.

<sup>70</sup> SILVERSTEIN, R., M., BASSLER, G., C., MORRIL, T., C., Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5ª Ed., Nova York, 1991.

<sup>71</sup> THUNDAT, T., ZHENG, X., Y., CHEN, G. Y., SHARP, S. L., WARMACK, R.J. Characterization of atomic force microscope tips by adhesion force measurements, *Appl. Phys. Lett.*, v. 63 n. 15, p. 2150-2152, 1993

<sup>72</sup> CALLISTER JR., W. D. Ciência e Engenharia de Materiais - Uma Introdução. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

<sup>73</sup> SPIEGEL, M., R., Estatística, Ed. Pearson Makron Books, 3ª Ed., São Paulo, 1993.

<sup>74</sup> NETO, P., L., O., C., Estatística, Ed. Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1977.

<sup>75</sup> ZHANG, X., YADAVALLI, V., K., Functionalized self-assembled monolayers for measuring single molecule lectin carbohydrate interactions, *Ana. Chi. Acta* , v. 649, 2009.

<sup>76</sup> KAUR, J., SINGH, K., V., SCHMID, A., H., VARSHNEY, G., C., SURI, C., R., RAJE, M., Atomic force spectroscopy-based study of antibody pesticide interactions for Characterization of immunosensor surface, v. 20, n. 2, p. 284-293, 2004.

<sup>77</sup> FRANCA, E., F., LEITE, F., L., CUNHA R., A., OLIVEIRA, O., N., FREITAS, L., C., G., Designing an enzyme-based nanobiossensor using molecular modeling techniques, *Phy. Che. Che. Phy.*, v. 13, n. 19, p. 8894-8899, 2011.