



ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ALBUMINA EM SUBSTRATOS DE NITRETO DE SILÍCIO VIA ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

Claudio Victor dos Santos Junior

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Renata Antoun Simão

Rio de Janeiro

Março de 2015

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ALBUMINA EM SUBSTRATOS DE NITRETO DE
SILÍCIO VIA ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

Claudio Victor dos Santos Junior

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM
ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Profª Renata Antoun Simão , D. Sc.

Prof. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

Dr. Gustavo Miranda Rocha, D.Sc.

Drª. Marcia Soares Sader, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2015

Santos junior, Claudio Victor dos

Estudo da Imobilização da Albumina em Substratos de Nitreto de Silício via Espectroscopia de Força / Claudio Victor dos Santos Junior. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XIII, 116 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Renata Antoun Simão

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 105-116.

1. Microscopia de Força Atômica. 2. Funcionalização. 3. Biomoléculas. I. Simão, Renata Antoun. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e Materiais. III. Título.

A existência de um homem só faz sentido quando em algum momento de sua vida ele se inquieta e questiona sobre sua própria existência. Uns vão para religião para procurar suas respostas. Outros estudam a natureza para encontrar explicações. Há aqueles que vão para filosofia, História ou antropologia. Alguns simplesmente vivem.

Há os que buscam ferramentas para os questionamentos naturais, filosóficos e religiosos. Talvez, eu me inclua neste último. Não sei o motivo da minha vinda, mais procuro o sentido da minha existência.

(Autor: Claudio Victor dos Santos Junior)

AGRADECIMENTOS

Este projeto foi realizado no Laboratório de Superfície e Filmes Finos da COPPE/UFRJ e foi possível graças ao auxílio incondicional de muitas pessoas e do apoio financeiro da CAPES. Agradeço à Professora Renata Simão que me aceitou em seu laboratório de braços abertos, confiou e fez críticas construtivas sobre a minha formação como futuro pesquisador, além de ter me dado todo suporte teórico e experimental para construção desta tese. Em particular, gostaria de reforçar meus agradecimentos à pesquisadora Marcia Sader por todo seu apoio, entusiasmo, amizade e dedicação e por acreditar em meu trabalho. Os resultados aqui apresentados são oriundos não apenas de meu esforço, mas de uma equipe de trabalho.

Meus agradecimentos ao apoio constante da minha mãe e irmã que continuamente amparam minhas decisões e sempre estão comigo independente das minhas escolhas. Agradeço também a minha companheira Priscila Rodrigues que me acompanha desde os tempos do vestibular, nas mudanças de graduação e nas transformações da vida. E independente disso ela sempre estará ao meu lado, e por isso lhe dedico todo o meu carinho e gratidão.

Aos companheiros do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais; Javier, Felipe, Marceli, Omayra, Bianca, Iveth, Robson, Rodrigo, Augusto, Monica e Thaiz.

Um agradecimento especial para o Heleno pela amizade e sua importantíssima ajuda inicial com todos os equipamentos e pelo seu jeito sempre de bem com a vida.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ALBUMINA EM SUBSTRATOS DE NITRETO DE SILÍCIO VIA ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

Claudio Victor dos Santos Junior

Março/2015

Orientadora: Renata Antoun Simão

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Este trabalho estuda a modificação dos substratos de silício a partir da deposição de Nitreto de Silício, 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) e Glutaraldeído (GA) em diferentes tempos de reação e concentração. Para caracterizar as mudanças nas superfícies foi utilizada a Microscopia de Força Atômica (AFM) e para avaliar as modificações nos compostos orgânicos usou-se a técnica de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR*). Nas etapas de funcionalização da superfície foi possível observar que o Glutaraldeído favorece a fixação de um conjunto de macromoléculas tais como a Albumina do Soro Bovino (BSA), as quais ficam fortemente ligadas entre si. Para estimar as interações entre as macromoléculas na superfície funcionalizada foram utilizadas as curvas de força por meio da teoria da Elasticidade Entrópica, a qual possibilitou estudar o comportamento da macromolécula em diferentes pHs.

Para avaliar como ocorrem as ligações das macromoléculas entre si e o meio são usados os modelos matemáticos da cadeia vermiforme (WLC) que descreve as forças de estresses mecânicos bem como o modelo de Bell que se fundamenta na energia livre de Gibbs. Um dos resultados demonstra que no pH 6 a presença de água o Comprimento de persistência (CP) é próximo a 90nm o que caracteriza que a interação entre as macromoléculas é menor e em meio desidratado há o aumento desta interação para 201nm no CP, e isso demonstra que toda essa dinâmica dependerá do pH, da concentração da macromolécula e da energia da superfície.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

STUDY OF ALBUMIN IMMOBILIZATION ON SILICON NITRIDE SUBSTRATE
THROUGH FORCE SPECTROSCOPY

Claudio Victor dos Santos Junior

March/2015

Advisor: Renata Antoun Simão

Department: Metallurgical and Materials Science Engineering

Present work represents silicon substrate modification via Silicon Nitride, “3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), and Glutaraldehyde (GA) with various deposition runs and different concentration of polymerization agents. Atomic Force Microscope is used to characterize final deposited coatings. Fourier Transform Infrared Spectroscopy is used to study modifications in organic compounds present in coating. In functionalizing step, it is revealed that Glutaraldehyde provokes fixation of a set of macro-molecules such as Bovine Serum Albumin which are strongly interconnected. In order to stimate interactions among macro-molecules in functionalized surface, Entropic Elasticity force curves are plotted. Based on the mentioned method, it is possible to macro-molecule’s behavior in differetn pHs.

Two mathematical models are used to explain inter-connections among macro-molecules and medium; Worm-like Chain model that explores mechanical stress forces and Bell model that is based on Gibbs free energy. In the largest macro-molecule length which is achieved in pH 6 aquatic solvent, it was observed that persistent lenght (PL) is near $90nm$ which refers to less interaction among macro-molecules. In water-free solvent PL reached up to $201 nm$ which proves that all this dynamic realies on pH, macro-molecule concentration, and surface energy.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1 Biossensores	05
3.2 Proteínas: Conceito e Características	07
3.3 Albumina do soro bovino	12
3.3.1 Estrutura e Função	14
3.3.2 Mecanismos de adsorção	15
3.4 Biomateriais e propriedades de superfície	17
3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)	19
3.5.1 Modo Contato	20
3.5.2 Modo não Contato	21
3.5.3 Modo Contato-Intermitente	21
3.5.4 Análise de rugosidade	22
3.5.5 Frequência de ressonância e fator de qualidade	23
3.5.6 Constante de mola	23
3.6 Curvas de força X Distância no AFM	23
3.6.1 Aplicações da curva de força	24
3.6.2 Energias e taxas de reação molecular	24
3.6.3 Reações fora do equilíbrio	24
3.6.4 Modelo de espectroscopia de força de ruptura simples	25
3.7 Funcionalização da superfície com Organosilanos	30
3.7.1 Organosilanos	32
3.7.2 Hidrólise do APTES	33
3.7.3 Glutaraldeído	33
3.7.4 Silanização da superfície com APTES	34
3.8 Modificação da superfície por plasma	35
3.9 Macromoléculas como polímeros	37
3.10 Elasticidade entrópica e maximização da entropia	38
3.11 Modelo matemático da elasticidade entrópica em uma macromolécula	40

3.11.1	Conformações de equilíbrio-----	41
3.11.2	Conformações fora do equilíbrio-----	42
3.11.3	Conformações dentro e fora do equilíbrio-----	44
4.	MATERIAIS E MÉTODOS-----	45
4.1	Sistema de deposição por PVD-----	45
4.2	Funcionalização da superfície em diferentes meios reacionais-----	46
4.3	Técnicas de caracterização-----	48
4.3.1	Espectroscopia no infravermelho (FTIR) -----	48
4.3.2	Microscopia de força atômica (AFM) -----	50
4.3.3	Mapas de força-----	51
4.3.4	Análises de curvas de força -----	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	53
5.1.1	Caracterização das amostras funcionalizadas com APTES por (FTIR) -----	53
5.1.2	Caracterização das amostras reticuladas com GA por (FTIR) -----	58
5.1.3	Caracterização das amostras da albumina do soro bovino por (FTIR) -----	60
5.2	Curva de força X distância da (BSA) em diferentes pHs método WLC-----	62
5.2.1	pH 6.0 20µMol álcool 95%-----	63
5.2.2	pH 7.4 20µMol álcool 95%.-----	69
5.2.3	pH 6.0 20µMol álcool absoluto-----	71
5.2.4	pH 7.4 20µMol álcool absoluto-----	74
5.2.5	pH 4 20 µMol álcool absoluto-----	76
5.2.6	pH 10 20µMol álcool absoluto-----	78
5.3	Curvas de força x distancia do BSA- Modelo de Bell / Evans-----	82
5.4	Força entrópica média x módulo de Young -----	90
5.5	Comprimento de contorno x módulo de Young -----	94
5.6	Medida da Topografia e rugosidade–AFM-----	97
5.6.1	Topografia do Si ₃ N ₄ -----	97
5.6.2	Topografia da amostra funcionalizada com APTES-----	98
5.6.3	Topografia da amostra reticulada com Glutaraldeido-----	99
5.6.4	Topografia da amostra imobilizada com BSA-----	100
5.6.5	Rugosidade média das amostras obtidas-----	102
6.	CONCLUSÃO-----	103
7.	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS-----	104
8.	REFERÊNCIAS-----	105

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais-----	06
Figura 2 : Estrutura geral dos aminoácidos com destaque para o carbono α e para a cadeia lateral “R” -----	09
Figura 3: Reação de condensação entre duas moléculas de aminoácidos levando a ligação peptídica. -----	09
Figura 4 : Estrutura da proteína -----	10
Figura 5: Modelo de enchimento de espaço da molécula de albumina sérica com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho, e os neutros em amarelo-----	13
Figura 6: As cinco formas de conformação da molécula de BSA -----	14
Figura 7: Etapas do processo de adsorção de proteínas-----	15
Figura 8: Etapas do processo de adsorção de proteínas globulares-----	16
Figura 9: Interações que ocorrem entre proteína e o substrato-----	18
Figura 10: Esquema típico de Microscopia de Força Atômica, em A) oscilando longe da superfície em B) oscila próximo a superfície. -----	19
Figura 11: Diferentes forças que ocorrem na aproximação ponta-superfície-----	20
Figura 12: Interações que ocorrem no AFM-----	22
Figura 13: Modelo simples de dois estados :A e B-----	28
Figura 14: Representação geral da estrutura do monossinalo funcional $X_3Si(CH_2)_nY$ -----	32
Figura 15: Reação de hidrólise de silano-----	33
Figura 16: Estrutura do Glutaraldeído-----	34
Figura 17: Modificação química da ponta ou superfície-----	35
Figura 18: Constituição do plasma-----	35
Figura 19: Representação de um reator, utilizado para depositar filmes-----	36
Figura 20: Representação esquemática de um polímero (a) Flexível, (b) Rígido, (c) e (d) suas soluções concentradas-----	37
Figura 21: Elasticidade entrópica de um polímero-----	39
Figura 22: Fotografia de parte do sistema de deposição no início deste trabalho-----	46
Figura 23: Representação do sistema adotado para a concentração e o tempo de reação do APTES na superfície de Nitreto de Silício-----	46
Figura 24: Representação das etapas de funcionalização da superfície-----	47

Figura 25: Modos de vibração molecular-----	48
Figura 26: Espectro Fotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier-----	49
Figura 27: Diagrama ilustrando o método do ATR-----	50
Figura 28: Microscópio de força atômica (AFM). -----	50
Figura 29: Forças de adesão-----	51
Figura 30: Constante de mola-----	51
Figura 31: Ajuste da curva de força pelo programa JPK DP 4.2-----	52
Figura 32: Substrato de Silício com deposição de Si_3N_4 na superfície e APTES-----	56
Figura 33: Histograma obtido pela tabela 4.3-----	57
Figura 34: Substrato de silício com deposição de Si_3N_4 na superfície e APTES 20mMol 4H e Gluraldeido -----	59
Figura 35: substrato de silício com deposição de si_3n_4 na superfície e APTES 20mMol 4H mais Glutaraldeido 2,5%-----	61
Figura 36 : Curva de força x distância do substrato de silício-----	62
Figura 37: pH 6.0 (álcool 95%) Força de ruptura(pN) , distância de separação ponta-amostra (nm), comprimento de persistência(nm) -----	64
Figura 38a : pH 7,4(álcool 95%)Histograma força (pN) -----	69
Figura 38b : pH 7,4 (álcool 95%) Histograma comprimento de contorno(nm) -----	69
Figura 38c: pH 7,4 (álcool 95%) Comprimento de persistência (pm)-----	70
Figura 39a: pH 6,0 (álcool abs) .Força ruptura -----	71
Figura 39b: pH 6,0comprimento de contorno (nm)-----	72
Figura 39c: pH 6,0 comprimento de persistência (nm) -----	73
Figura 40a: pH 7,4 Força-pN-----	74
Figura 40 b: pH 7,4 Comprimento de contorno (nm)-----	75
Figura 40 c : pH 7,4 Comprimento de persistência (nm)-----	75
Figura 41a: pH 4,0 Força(pN)_-----	76
Figura 42b: pH 4,0 comprimento de contorno (nm)-----	78
Figura 42c: pH 4,0 comprimento de persistência (nm)-----	79
Figura 43: Programa JPK data Processing-----	83
Figura 44a: pH 6.0 20µg. álcool 95%-----	86
Figura 44b: pH 6.0 20µg. álcool abs.-----	86
Figura 44c: pH 6.0 100µg. alcohol abs-----	86
Figura 45a : pH 7,4 20µg. álcool 95%-----	87
Figura 45 b: pH 7.4 20µg. álcool abs-----	87

Figura 45c: pH 7.4 100µg álcool abs-----	87
Figura 46a: pH 4 20µg. álcool abs-----	88
Figura 46b: pH 4 100µg. álcool abs-----	88
Figura 47 a: pH10 20µg. álcool abs-----	89
Figura 47b: pH 10 100µg. álcool abs.-----	89
Figura 48a: pHs 20µg. álcool 95% e ABS-----	90
Figura 48b: pHs Módulo de Young álcool 95 e ABS-----	91
Figura 49a: pHs 100µg. álcool 95% e ABS-----	93
Figura 49 b: pHs Modulo de Young álcool 95 e ABS-----	93
Figura 50a: pHs 100µg. álcool 95% e ABS-----	94
Figura 50b: pHs 100ug Modulo de Young álcool 95 e ABS-----	95
Figura 51a: PHs 100µg. álcool 95% e ABS-----	96
Figura 51b: pHs 100ug Modulo de Young álcool 95 e ABS-----	96
Figura 52a. Topografia (Si+Si ₃ N ₄ depositado superfície) -----	97
Figura 52b. Imagem 3D da deposição de Si ₃ N ₄ sobre si -----	97
Figura 52c. Contraste de fase (Si+Si ₃ N ₄ depositado superfície) -----	97
Figura 53a. Topografia (Si ₃ N ₄ +APTES)-----	98
Figura 53b. 3D Topografia-(Si ₃ n ₄ +APTES)-----	98
Figura 53c. Contraste de fase (Si ₃ N ₄ +APTES) -----	99
Figura 54a. Topografia (Glutaraldeido)-----	99
Figura 54b. 3DTopografia (Glutaraldeido)-----	100
Figura 54c. Contraste de fase (Glutaraldeido)-----	100
Figura 55a. Topografia (BSA)-----	101
Figura 55b. 3D Topografia (BSA)-----	101
Figura 55c. Força lateral (BSA)-----	101

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AFM- Microscopia de força Atômica

APTES- 3 amino propril trietoxisilano

ASP- Ácido aspártico

ARG- Arginina

BSA- Albumina do Soro Bovino

CC- Comprimento de persistência

CP-Comprimento de contorno

Cys/C- Cisteína

Da- Dalton

F – Força

FTIR- Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GA - Glutaraldeído

Gly/G -Glicina

HSA- Albumina sérica Humana

K_B – Constante de Boltzman

LYS- Lisina

nm- Nanometro (10^{-9}) m

pN- Pico Newtons (10^{-12})N

PSPD- Fotodiodo detector

WLC- Modelo da cadeia vermiforme

SPM - Microscopia de varredura por sonda

Ser- Serina

T - Temperatura

V - frequência das bandas de vibrações

1. INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico permitiu a busca por ferramentas que controlem processos orgânicos, os quais sejam capazes de monitorar as alterações ambientais e químicas utilizadas nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, agrícolas, etc. Neste sentido, a ciência que cada vez mais ganha destaque é a nanotecnologia porque ela auxilia e facilita a compreensão dos fenômenos físico-químicos em processos orgânicos.

As técnicas que se fundamentam em nanotecnologia permitem identificar com alta sensibilidade a relação do sinal\ruído, tempo\resposta e a estabilidade de diversos materiais. Desse modo, a nanotecnologia por ser uma técnica na escala nanométrica tem facilitado estudos de interações específicas em tempo real. Assim, a análise dos dados a partir desta ciência tornou possível desenvolver os resultados apresentados nesta dissertação, uma vez que este trabalho teve como um dos objetivos estudar a composição da molécula e as várias rotas de síntese por meio de um conjunto de monômeros funcionalizados na superfície.

Assim sendo, como um dos passos mais importantes no que se diz respeito à engenharia dos materiais é o estudo da estrutura-propriedade, uma das ferramentas que cada vez mais ganha espaço em nanotecnologia é a Microscopia de varredura por ponta de prova (SPM).

Dentre os SPM mais habituais podemos citar: a microscopia de tunelamento (STM) utilizada para mapear os detalhes atômicos devido à transferência de elétrons e a Microscopia de força atômica (AFM). Esta última técnica permite extrair imagens de espécies isolantes ou condutoras bem como pode ser operada em ambiente líquido, proporcionando estudos dinâmicos ligados às áreas da biologia.

Desse modo, tornam-se fundamentais trabalhos teóricos e experimentais na área de engenharia de materiais que investiguem meios de funcionalizar materiais e controlar as interações entre macromoléculas-material, porque é uma forma de realizar medidas de interações específicas para que haja maior controle da biocompatibilidade e bom emprego em adsorção de proteínas.

Nesse sentido, o emprego da microscopia de varredura por ponta de prova (SPM) nos auxilia a investigar as interações dinâmicas nas superfícies funcionalizadas e a sua utilização tende a aumentar devido aos desafios encontrados na preparação, manuseio e controle da disposição dos átomos na superfície.

Portanto, ao observar as respostas biológicas nos materiais funcionalizados usados neste presente estudo, os quais são o Glutaraldeído e o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) se verificou que eles podem nos ajudar a ter um entendimento complementar e quantitativo do estudo em superfícies em meios biológicos complexos.

Além do mais, a partir das técnicas de funcionalização é possível melhorar a potencialidade dos biomateriais usados em dispositivos médicos avançados. Dessa forma, a ciência da engenharia de superfície nos ajuda a observar que os biomateriais dependem criticamente da investigação dos mecanismos de interação e das funções que uma proteína adsorvida realiza, uma vez que esses fatores nos propiciam na obtenção de uma resposta biológica para os materiais funcionalizados.

Deste modo, para que se estabeleça a funcionalização dos materiais nas amostras biológicas há a necessidade de ligá-las com substrato alvo de interesse e o transdutor físico porque o transdutor físico depende do reconhecimento molecular biológico e tem a necessidade de possuir uma resposta precisa, reprodutível e linear sob a faixa de concentração do substrato de interesse através das reações com os analitos-alvo.

Como é indispensável que exista algum agente que favoreça a seletividade, a especificidade e dentre outros fatores com meio, a alternativa que vem sendo adotada como técnica de funcionalização de superfície é o emprego do 3-aminopropiltriétoxissilano o (APTES).

Na cadeia do APTES há uma terminação de grupo amino (NH_3) que irá ficar exposto na superfície do Silício-Si ou Nitreto de Silício- Si_3N_4 , visto que quando estão expostos ao ar formam naturalmente uma camada de óxido reativo o grupo Si-OH, esses grupos reagem fortemente com os silanóis que favorecem a ligação covalente com os compostos.

Posterior à ligação covalente na superfície é usado o Glutaraldeído-GA com o intuito de “aprisonar” a Albumina do Soro Bovino (BSA), porém esta ligação depende dos parâmetros de fixação do Glutaraldeído e da sua interação com a proteína visto que tais interações podem ser inter ou intra-moleculares.

Assim sendo, esta pesquisa tem como intuito estudar as interações entre: a ponta de Nitreto de Silício (não funcionalizada) com a superfície de Nitreto de Silício (funcionalizada por um conjunto de monômeros) alterando a concentração, o tempo de reação bem como outros parâmetros de reação na superfície com a finalidade de estimar as interações desse conjunto de monômeros através das curvas de força.

Como a funcionalização da superfície altera a conformação desses conjuntos de monômeros, foram utilizados modelos matemáticos para estudar este comportamento. Um dos modelos é chamado de modelo da cadeia Vermiforme (WLC) que estuda estresse mecânico em um conjunto de monômeros por meio de uma força externa aplicada e o outro modelo se chama modelo de Bell que se fundamenta nesta mesma força externa aplicada. Porém, o conceito empregado neste último modelo é o da variação da energia livre em um conjunto de monômeros. Ao estimar as forças de interação no meio é provável existir preferências de comportamento com o meio onde a proteína se encontra “imobilizada” e isso pode vir a revelar quais as tendências de conformação ou ligação da macromolécula com a superfície.

2. OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Esta pesquisa teve como objetivo principal quantificar as forças de interação entre a ponta de prova do AFM de nitreto de silício (Si_3N_4) não funcionalizada e albumina do soro bovino (BSA) imobilizada na superfície do (Si_3N_4), em função das mudanças de pH e da concentração do meio.

- Objetivos específicos

- Depositar Nitreto de Silício em substratos de Silício por meio das técnicas de Magnetron Sputtering assistida por Plasma (PEPVD);
- Funcionalizar a superfície do (Si_3N_4) por meio da reação com 3-Aminopropiltriétoxissilano (APTES);
- Utilizar o glutaraldeído como agente de reticulação para a albumina do Soro bovino.
- Caracterizar as amostras obtidas por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica;
- Estudar as interações das macromoléculas na superfície funcionalizadas, utilizando a teoria da elasticidade entrópica e o modelo matemático da cadeia Vermiforme (WLC);
- Comparar os resultados obtidos pelo modelo de WLC com o modelo de BELL e estimar os prováveis comportamentos entrópicos em função da força de ruptura, comprimento de contorno e persistência, assim como o módulo de Young.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

Este capítulo apresenta os principais fundamentos teóricos importantes para este tema bem como avalia os conceitos de biossensor e propriedade de proteína em superfície. Além do mais, nesta dissertação discutem-se as teorias que norteiam as técnicas de microscopia de força atômica e curvas de forças; métodos de funcionalização; reconhecimento molecular e a caracterização de estruturas.

3.1 BIOSSENSORES

O uso do termo biossensor iniciou-se na década de 70, apesar dos biossensores serem utilizados antes dessa época. O primeiro biossensor conhecido foi chamado de eletrodo enzimático, o qual foi demonstrado em 1962 por Clarck e Lions (GEORGE *et al*, 2000).

O eletrodo enzimático mais tarde denominado como biossensor foi produzido pela imobilização da glicose oxidase em um eletrodo amperométrico que detectava concentração do consumo de O₂ sob alto potencial de redução.

Assim, os autores citados avaliaram a quantificação da variação de oxigênio dissolvido que era proporcional à variação de glicose. A partir dessa experiência houve um interesse científico em analisar compostos químicos em aplicações biológicas que mais tarde estimulou o desenvolvimento de biossensores para os mais diversos tipos de análise com a finalidade de obter resultados mais instantâneos e concisos.

Estudos preliminares imobilizaram organismos vivos sobre a superfície de um sensor gasoso de amônia, chamando-o de sensor bio-seletivo (*bio-selective sensor*). Após certo tempo o nome sensor bio-seletivo foi abreviado para biossensor (RECHNITZ *et al*, 1977).

Segundo a definição da IUPAC (1998) sobre biossensor: “*é um aparato que utiliza reações mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras com o intuito de detectar compostos químicos por meio de sinais elétricos, térmicos ou ópticos*”.

Há trabalhos pioneiros como de LOWE, *et al* (1984), o qual define os biossensores como dispositivos analitos (amostras), que convertem uma resposta

biológica em um sinal confiável e processável. Conforme apresentado na figura 1, os biossensores são construídos a partir de um componente que introduz na amostra: a) um sistema de reconhecimento molecular, b) um transdutor e; c) uma unidade processadora de sinal LEE *et al*, (2008).

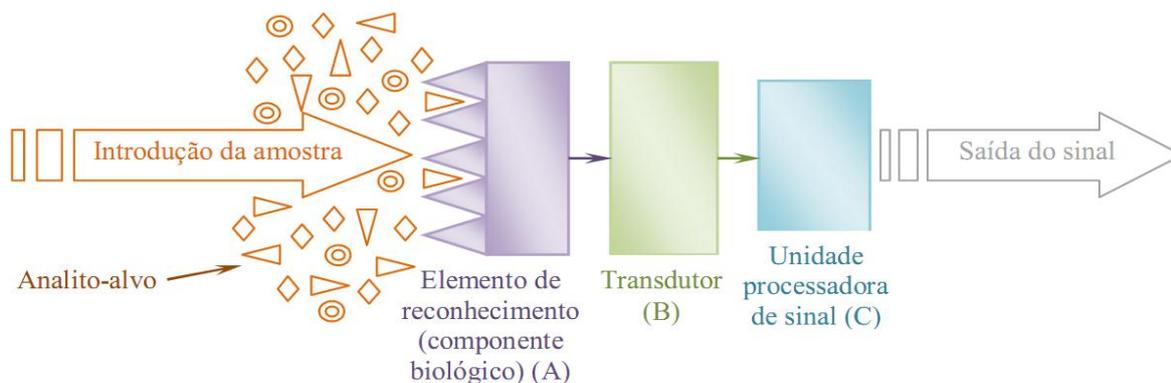


Figura 1- Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C). Adaptado por CALIL,*et al* (2011).

No princípio de reconhecimento o componente biológico entra em contato com o analito de interesse e produz um sinal. Este sinal pode ser um receptor, enzima, anticorpo, ácido nucléico (PATHAK *et al*, 2007; CHAMBERS *et al*, 2008; LEE *et al*, 2008).

Com a imobilização dos reagentes no sistema, o sensor desempenha a função de identificar a composição de espécies com o mínimo de influência humana.

A estabilidade das técnicas de imobilização determina a sensibilidade e a confiabilidade do sinal do biossensor, devido à preservação dos sítios ativos da molécula (MEHRVAR, ABDI, 2004; Embrapa Agroindústria tropical, 2008; MELO, 2008 apud CALIL *et al*,2011).

O transdutor age como uma interface, aferindo a alteração física ou química que ocorre na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável como: massa, carga, calor ou luz. Os transdutores podem ser de diferentes tipos, tais como: eletroquímico, óptico, piezoelétrico e calorimétrico (MEHRVAR *et al*, 2000; PATHAK *et al*,2007; LEE *et al*, 2008).

A unidade processadora de sinal trabalha como um detector que filtra, amplifica e analisa o sinal traduzido, transferindo para um monitor ou armazenando-o em algum dispositivo (RAITERI *et al*, 2002; PATHAK *et al*, 2007).

Em determinados eventos pode ser interessante priorizar a seletividade e a sensibilidade do sensor, ou dar preferência ao exame do intervalo de resposta ou habilidade de regeneração da superfície de interação. Dessa forma, o uso de biossensor por partes sensitivas através da nanotecnologia se torna atraente e viável, uma vez que estudos recentes feitos pela Universidade de Yale (EUA) desenvolveram um nanobiossensor que consiste em dois microelétrodos ligados por uma ponte de nanofios a um anticorpo. A união do biorreceptor ao tumor gera um sinal elétrico que permite detectar o tumor que não foi observado por outras técnicas de análise.

3.2 PROTEÍNAS: CONCEITO E CARACTERÍSTICAS

No encontro anual da Sociedade Americana de Física Richard P.Feynman, 29 de dezembro de 1959 apontou que:

“Quais seriam as propriedades dos materiais se nós pudéssemos arrumar os átomos da forma que nós queremos? Não posso ver exatamente o que aconteceria, mas não duvido quando tivermos algum controle sobre o arranjo das coisas em pequena escala nós teremos uma variedade enorme de propriedades que as substâncias podem ter e das diferentes coisas que podem fazer”.

O estudo das propriedades das proteínas começou no início do século XVIII com a descoberta de que certos componentes coagulam em altas temperaturas e em meio ácidos tais como: a clara de ovo (albúmen), o sangue e leite, entre outras.

Essas substâncias foram denominadas albuminoides (semelhantes ao albúmen) usualmente chamado de Albumina do (Latim: albus, branco) referem-se de forma genérica a qualquer proteína que é solúvel em água, moderadamente solúvel em soluções salinas, ou que sofra desnaturação com o calor.

Por volta de 1900, 12 aminoácidos diferentes liberados pela degradação da proteína haviam sido identificados. Em 1906 foram identificados outros quinze tipos de aminoácidos diferentes; em 1935 esse número aumentou para dezoito e em 1940 chegou a vinte, completando a lista de aminoácidos que existem nas proteínas dos seres vivos. (AMABIS; MARTHO,1997).

Em animais superiores, as proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes, representam cerca de 50 % do peso seco dos tecidos. Do ponto de vista funcional, seu papel é fundamental, não existindo processo biológico que não dependa da presença ou da atividade deste tipo de biomolécula. As proteínas desempenham inúmeras funções

distintas, como por exemplo: enzimas, hormônios, proteínas transportadoras, anticorpos e receptores de muitas células.

Todas as proteínas contêm carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio e muitas possuem enxofre. Há variações na composição de diferentes proteínas, porém a quantidade de nitrogênio, representa, em média 16 % da massa total da molécula. Dessa forma pode-se calcular a quantidade aproximada de proteína em uma amostra medindo-se a quantidade de nitrogênio da mesma.

Existem 21 aminoácidos, sendo que o organismo humano é capaz de sintetizar apenas 6 deles, chamados de aminoácidos não essenciais: alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cistina, serina e tirosina. Os demais aminoácidos 35 são adquiridos pela alimentação e são essenciais: fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, histidina, valina, arginina, cisteína, glicina, glutamina, prolina, hidroxiprolina (ALBERTS *et al*, 2006).

As proteínas são definidas como polímeros, cujas unidades constituintes fundamentais são os aminoácidos. Os aminoácidos (Figura 2), por sua vez, são moléculas orgânicas, as quais possuem ligação com: a) o mesmo átomo de carbono (denominado de carbono α); b) um átomo de hidrogênio; c) um grupo amina, d) um grupo carboxílico e uma cadeia lateral “R” (característica para cada aminoácido). (FRANCISCO *et al*, 2006)

A cadeia lateral é o que difere as propriedades físico-químicas dos aminoácidos, ou seja, sua estrutura, tamanho, cargas elétricas e solubilidade em água. Além do mais, as cadeias laterais são responsáveis por forças estabilizadoras advindas de interações fracas (ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, eletrostáticas etc.), que mantêm as estruturas conformacionais enoveladas das proteínas. (FRANCISCO *et al* 2006)

As unidades que se repetem são denominadas resíduos aminoácidos, o grupo carboxílico de um aminoácido se une a um grupo amina de outro aminoácido formando uma ligação peptídica (C-N) e liberando uma molécula de água. (SOUZA , 2010).

Figura 2¹: Estrutura geral dos aminoácidos com destaque para o carbono α e para a cadeia lateral "R"

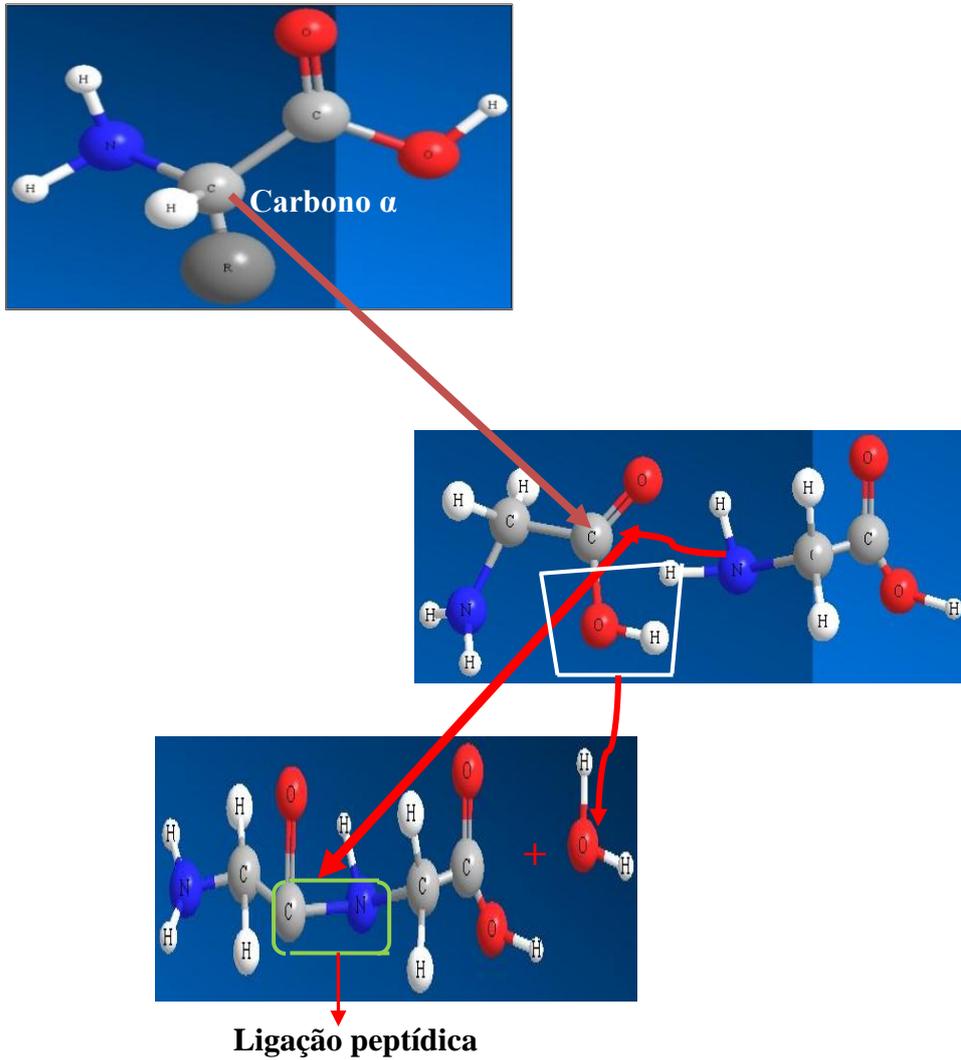


Figura 3: Reação de condensação entre duas moléculas de aminoácidos levando a ligação peptídica.

¹ As figuras foram construídas no programa Cambridge Soft, ChemOffice2008.

A definição da bioquímica a respeito das proteínas é que estas se comportam como polímeros complexos que se dobram e possuem uma fórmula estrutural química $H-(NH-HCR-CO)_n-OH$. Esta possui 20 aminoácidos naturais onde R representa um desses aminoácidos. Logo, como as proteínas geralmente são grandes moléculas existem quatro níveis de estruturas conhecidas que são ilustradas na figura 4 abaixo:

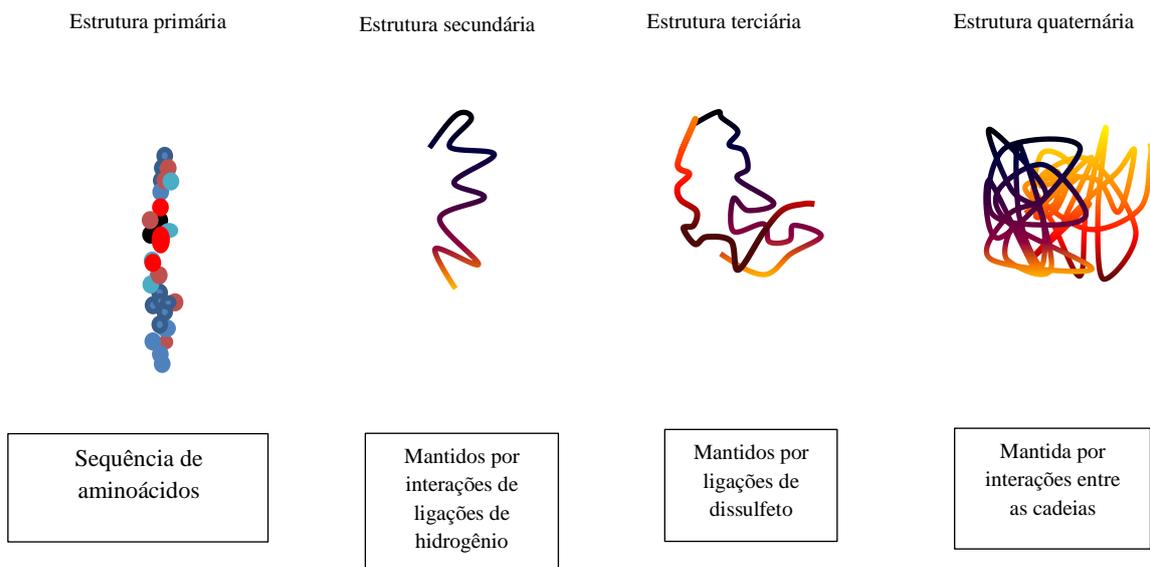


Figura 4 : Estrutura de uma proteína

- Estrutura primária

São sequências lineares de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. As estruturas primárias da proteína contem a sequência de resíduos amino ácidos ao longo da cadeia polipeptídica com função de localizar qualquer ligação de dissulfeto. Esta estrutura determina a função dos aminoácidos e a sequência das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias de proteína.

- Estrutura secundária

A estrutura secundária de uma proteína corresponde a regiões que são distribuídas e estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos -NH e C=O da cadeia principal que participam das ligações de hidrogênio, envolvendo as cadeias laterais. Os dois tipos principais de estrutura secundária são: a alfa hélice e a folha beta.

- Estrutura terciária

A estrutura terciária é formada pela disposição espacial das estruturas secundárias e das estruturas não regulares, constituindo a proteína toda. Este tipo de estrutura ocorre em proteínas globulares e também em estruturas mais complexas funcionalmente. As cadeias polipeptídicas muito longas podem se organizar em domínios e em regiões com estruturas terciárias semi-independentes ligadas entre si por segmentos lineares da cadeia polipeptídica. Os domínios são considerados as unidades funcionais e de estrutura tridimensional de uma proteína.

- Estrutura quaternária

São os arranjos entre cadeias polipeptídicas (subunidades) que constituem uma proteína ativa. Em certos casos alguns peptídeos (cadeias de aminoácidos) podem ser produzidos até este ponto depois vários deles se associam para formar uma estrutura quaternária, que corresponde à forma final da molécula. Na molécula de hemoglobina, por exemplo, a estrutura quaternária é atingida pela união de quatro cadeias polipeptídicas associadas, que se organizam em torno de um átomo de ferro.

3.3 ALBUMINA DO SORO BOVINO: ESTRUTURA E FUNÇÃO.

A albumina soro bovino (BSA) é a proteína mais abundante no sangue com cerca de 50µg/mL de concentração típica. Esta proteína também é importante para estudos devido as suas características serem muito próximas a estrutura do HSA (Albumina sérica humana). Além disso, ela é a maior e mais abundante proteína no sistema circulatório, que representa cerca de 55% do total de proteínas do plasma sanguíneo com concentração típica de 5g / 100mL de sangue.

A albumina também é importante pois regula 80% da pressão osmótica coloidal no plasma, o que a torna útil para regular o volume do sangue circulante. A albumina é também uma proteína transportadora, ligando-se naturalmente a produtos terapêuticos e tóxicos na circulação, elimina radical livre e mantém principalmente as funções do pH do sangue. Uma das propriedades mais excepcionais da albumina é a capacidade de se ligar de modo reversível a uma incrível variedade de ácidos “graxos”, lisolecitina, bilirrubina, a varfarina, o triptofano e os outros. O peso molecular do BSA é de cerca de 66 kDa e a albumina do Soro Bovino é uma das proteínas mais pesquisadas há anos (CARTER *et al*, 1994).

A estrutura primária do BSA é constituída por uma única cadeia simples polipeptídica com 582 resíduos de aminoácidos com sequência bem conhecida entre as cadeias. O comprimento do contorno da proteína desnaturada (ou completamente estirada) pode ser calculada a partir do número de resíduos de aminoácidos da ligação peptídica que é de 0,37nm e assim o comprimento de contorno é de 215nm. O BSA tem 100 cadeias laterais ácidas com 41 resíduos de Aspartato (Asp) e 59 resíduos de Glutamato (Glu) e 99 cadeias laterais básicas com 23 resíduos Argina (Arg), 59 resíduos de Lisina (Lys), e 17 de Serina (Ser). Sua estrutura secundária é formada por seis α hélice e 17 ligações de dissulfeto.

Além disso, a estrutura do BSA pode formar dímeros principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada (CARTER *et al*, 1994). O ponto isoelétrico (PI) do BSA está em torno de 4.7 e 5.6, segundo (FERRER, *et al*, 2001). O PI da molécula indica o pH no qual a molécula se encontra com cargas neutras. Dependendo da mudança de pH o BSA fica mais carregado negativamente ou positivamente. Por exemplo, no pH 7 o BSA fica mais negativamente carregado e entre os intervalos de pH (4 e 8) sofre

mudanças na conformação. Outra observação importante sobre o BSA é que ele não é carregado uniformemente na estrutura secundária. Em pH neutro o BSA possui uma rede de cargas de -10, -8, e 0 para os seus domínios I, II e III sendo estes três domínios homólogos (I, N-terminais; II; III, C-terminal), cada domínio contém dois subdomínios que se dividem em estrutura comumente helicoidal. Na figura 5 podemos analisar a distribuição da carga superficial :

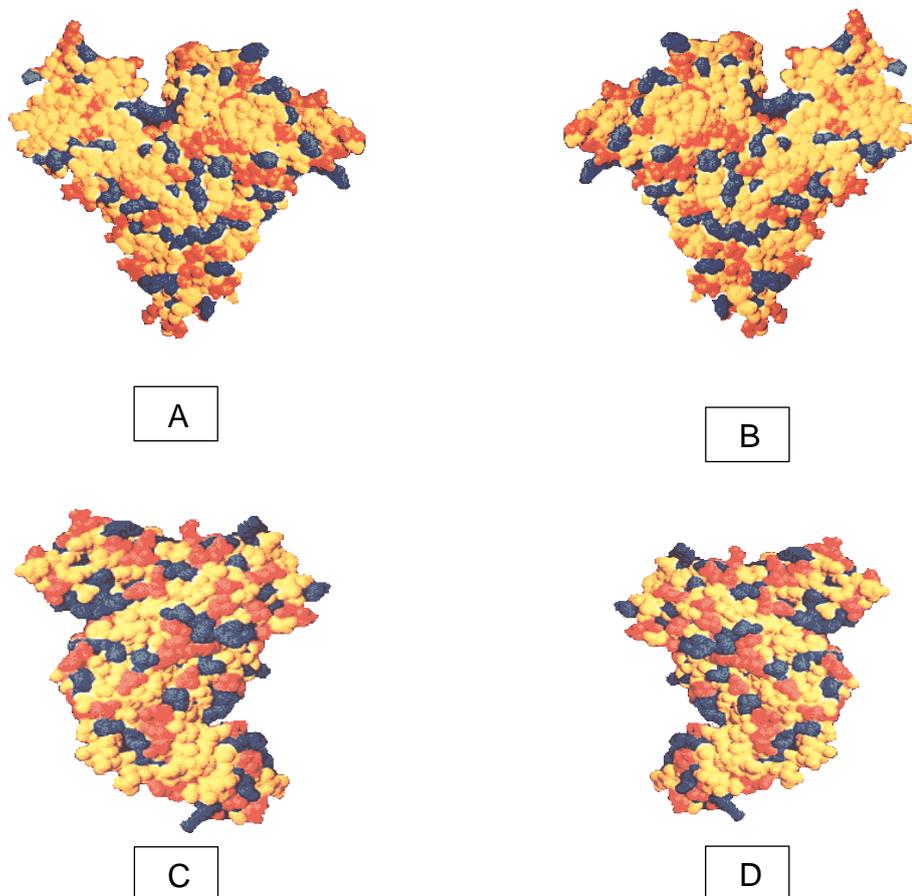


FIG 5: Modelo de enchimento de espaço da molécula de albumina sérica com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho, e os neutros em amarelo. (A) Vista de Anterior, (B) vista posterior, lateral (C) para a esquerda, e (D) para a direita (CARTER *et al*, 1994).

Recentemente os métodos computacionais desenvolvidos por meio de cálculos com base nas propriedades hidrodinâmicas concluiu que a conformação da BSA em solução de pH 7,4 apresenta a característica de uma molécula rígida, a qual é muito semelhante a estrutura em forma de coração observada em cristais de albumina sérica humana - HSA.(CARTER *et al*,1994)

3.3.1 Estrutura e conformação

A molécula de BSA possui várias alterações reversíveis de conformação que geralmente são distinguidas sob condições não fisiológicas, e segundo PEREIRA *et al* (2003) a conformação do BSA tem as seguintes características em cada pHs, conforme a tabela abaixo:

Tabela 3.1- Conformação da proteína em diferentes pHs.

pHs	CONFORMAÇÃO
2,3	Transição da forma F para E estendida
4,3	Transição da forma N para forma F rápida
4,7/5,6	Forma N
7	Carregado negativamente (-)
8,0	Transição de (-) para (básico)
10	Transição de (básico) para A (envelhecido)

Estas formas se caracterizam por um conteúdo de diferentes nas estruturas α hélice, folhas β e dentre outras estruturas que mudam a estrutura cristalina do BSA como na figura 6.

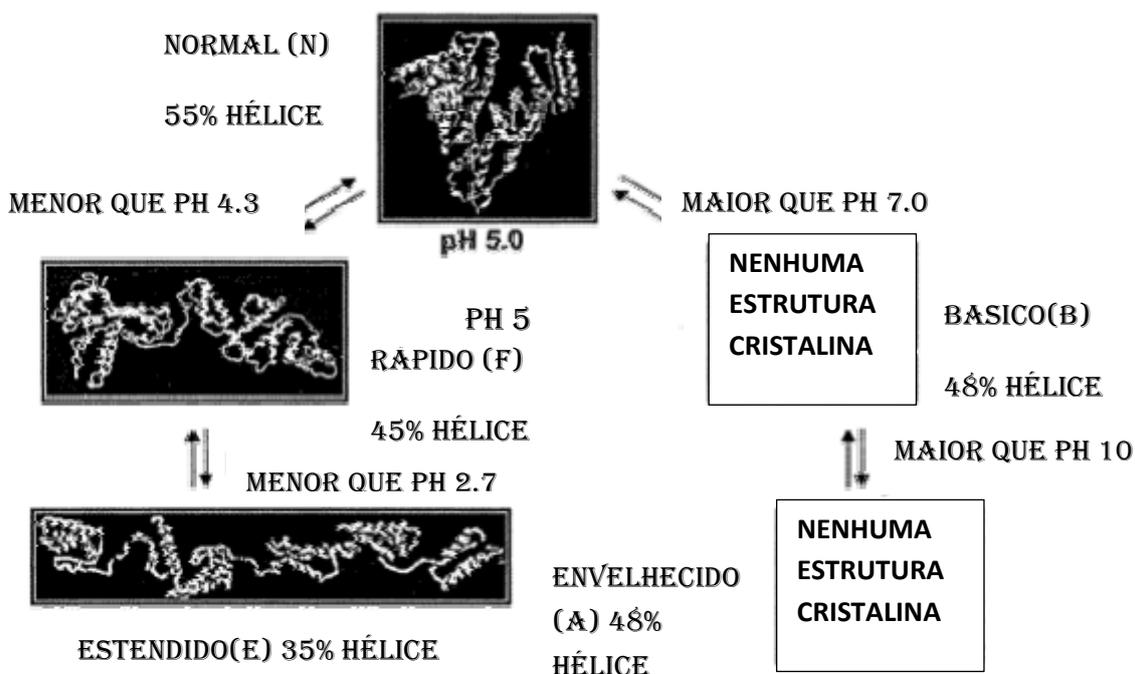


Figura 6: As cinco formas de conformação da molécula de BSA, segundo (CARTER *et al*, 1994).

3.3.2 Mecanismos de adsorção.

Quando ocorre o processo de adsorção das proteínas na superfície existe uma tendência das ligações hidrofílicas serem mais fracas do que em superfícies hidrofóbicas. Isso ocorre pelo fato da adsorção em superfícies carregadas hidrofílicas ter forte influência dos fatores externos, tais como: a carga da proteína, o pH do meio, a carga da superfície e a força iônica.

Assim quando a macromolécula está em uma superfície hidrofóbica, haverá um ganho na entropia do sistema devido à liberação de moléculas de água que solvatam a molécula da proteína e que gradualmente serão substituídas por ligações com a superfície. De uma maneira geral, o processo de adsorção envolve 5 etapas principais como representado na figura 7 (ROACH *et al*, 2005; NORDE *et al*, 2005):

- 1) Transporte da proteína até a superfície;
- 2) Ancoragem da proteína na superfície;
- 3) Mudança conformacional da proteína;
- 4) Dessorção da proteína;
- 5) Transporte da superfície para o meio.

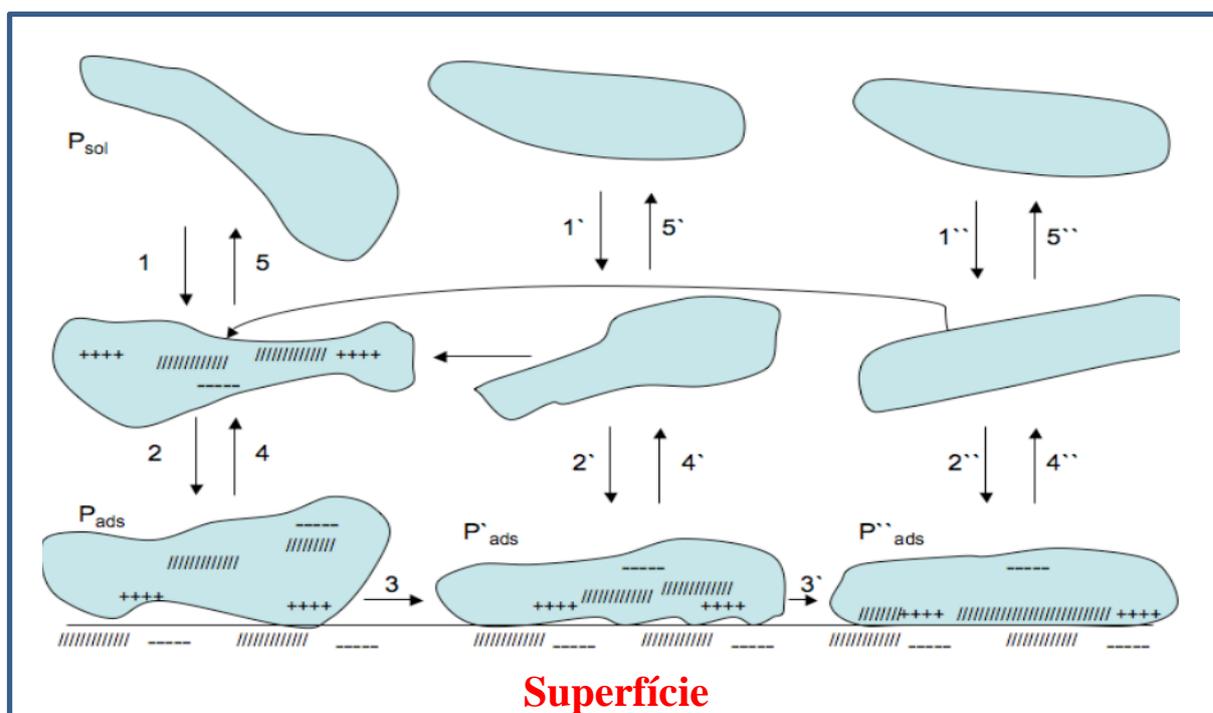


FIG.7: Etapas do processo de adsorção de proteínas segundo (NORDE *et al*, 2005)

Como de modo geral a proteína apresenta domínios espaciais com características químicas distintas estes irão interagir dependendo das características do meio e, assim as alterações na conformação podem ocorrer imediatamente durante a adsorção ou mais lentamente ao longo do tempo ou ainda após a proteína estar ligada à superfície. Assim as proteínas podem adotar conformações diferentes, já que existe uma relação entre a quantidade da proteína adsorvida com sua estabilidade (NORDE *et al*,1995).

Na figura 8 há um diagrama esquemático mostrando a adsorção de uma proteína globular como, por exemplo, a Albumina do soro bovino (BSA), que possui domínios individualizados, os quais podem passar por processos simultâneos. Em (a) temos a conformação da proteína que pode ficar distorcida a partir da interação com a superfície. E em (b) a mesma proteína tem a forma de bastonete que passa por múltiplos processos de adsorção, (i) representa a proteína inicialmente adsorvida ao longo do eixo paralelo à superfície; e em seguida em (ii) ocorrem reorganizações e o aumento da interação entre a proteína-proteína e a concentração da proteína na superfície (ROACH *et al*, 2005).

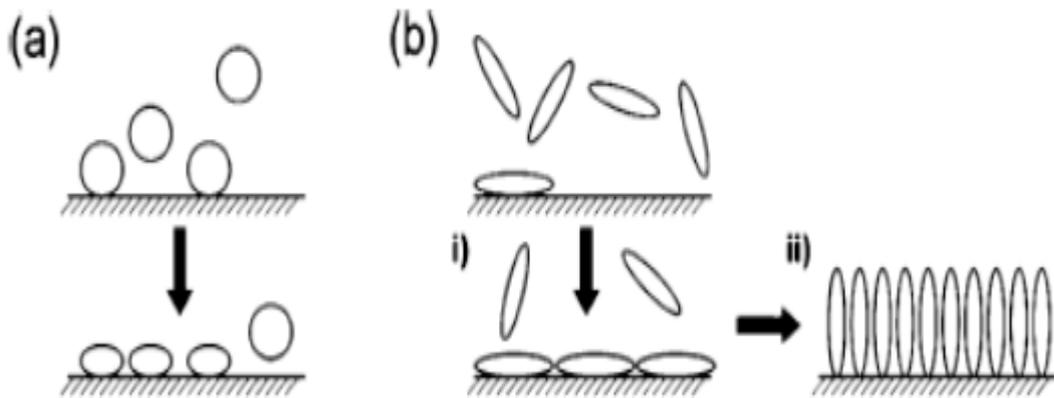


FIG.8: Etapas do processo de adsorção de proteínas globulares a partir de (ROACH *et al*, 2005).

3.4 BIOMATERIAIS E PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE.

A biocompatibilidade dos materiais está associada com as interações da superfície com as biomoléculas ou mais especificamente das proteínas adsorvidas na superfície (FENOGLIO *et al*, 2011).

Sabe-se que esta adsorção ocorre logo após a inserção do biomaterial no corpo celular e este processo influencia drasticamente as respostas dos biomateriais. Porém, tais respostas biológicas não são totalmente compreendidas em seu aspecto físico- químico. No entanto, o estudo demonstra que a energia de superfície tem influência no processo de adsorção das proteínas e, por conseguinte nas respostas nas células (FENOGLIO *et al*, 2011).

Deste modo, quando se adsorve proteínas em superfícies hidrofílicas esta interação tende a ser mais fraca do que em superfícies hidrofóbicas porque a adsorção em superfícies carregadas e hidrofílicas tem forte influência dos fatores externos, tais como: a carga da proteína, o pH do meio, a carga da superfície e a força iônica. Consequentemente, em superfície hidrofóbica, haverá uma desordem do sistema devido à liberação de moléculas de água que dispersam a molécula da proteína, a qual gradualmente será substituída por ligações com a superfície (RABE, *et al* 2011).

Deste modo, quando se faz uma química de superfície específica esta condiciona o tempo de residência, à energia inicial e a interação da proteína na superfície (ANDRADE *et al*, 1987).

Deste modo, a adsorção de proteínas na superfície do material irá impactar na distribuição de carga da superfície na disposição das ligações de hidrogênio e nas interações eletrostáticas ou de Van der Waals.

Além disto, a propriedade de interação protéica com a superfície também irá depender do ambiente químico ou biológico da superfície e dos biomateriais que exibem diferentes polaridades (RABE *et al*, 2011). Conforme ilustrado na figura 9 as interações dependem de diferentes fatores relacionados à proteína, conforme (tabela 3.2) e (tabela 3.3):

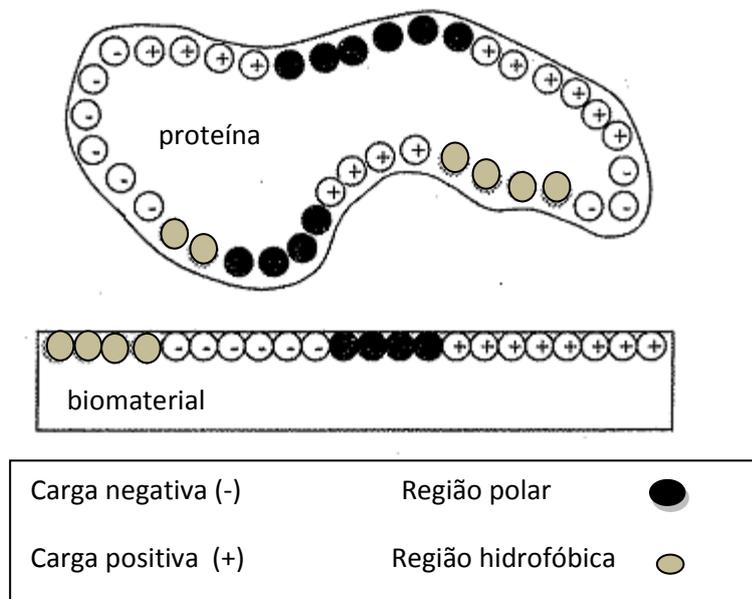


Figura 9: Interações que ocorrem entre proteína e o substrato.

Adaptado de: DEE, K.C *et al*, (2002).

Tabela 3.2: Propriedades de interação da proteína com a superfície (DEE, K.C *et al*, 2002)

PROPRIEDADE	EFEITO
TAMANHO	Moléculas maiores podem ter mais locais de contato com as superfícies.
CARGA	Moléculas próximas ao ponto isoelétrico geralmente adsorve mais.
ESTABILIDADE DA ESTRUTURA	Proteínas menos estáveis são as que possuem menos ligações intermoleculares cruzadas, assim esta se desdobra numa extensão maior para formar mais pontos de contato com a superfícies.
TAXA DE DESDOBRAMENTO	As moléculas podem se desenrolar mais rápido a partir de contato com a superfície.

Tabela 3.3 propriedades da superfície e interação com a proteína (DEE, K.C *et al*, 2002).

Características	EFEITO
TOPOGRAFIA	Maior exposição de área na superfície, maior interação com proteínas.
COMPOSIÇÃO	A química da superfície irá determinar os tipos de forças intermoleculares Que irão reagir com as proteínas
HIDROFOBICIDADE	Superfícies hidrofóbicas tendem a ligar mais proteínas na superfície
HETEROGENEIDADE	Quando a superfície é heterogênea pode ocorrer disparidade de interação entre os domínios das proteínas
POTENCIAL	O potencial de interação pode influenciar na distribuição de íons das proteínas

3.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A microscopia de força atômica é uma técnica de análise de superfície por uma ponta de prova. Esta ponta de prova é disposta sobre uma alavanca que funciona como uma mola sensível quando submetida a pequenas variações de força com uma constante de mola pré-determinada. Sabe-se que quando a ponta se aproxima da superfície da amostra ocorrem forças de interação que defletem a alavanca. Esta deflexão é avaliada por um fotodetector de (PSPD) como demonstra na figura 10.

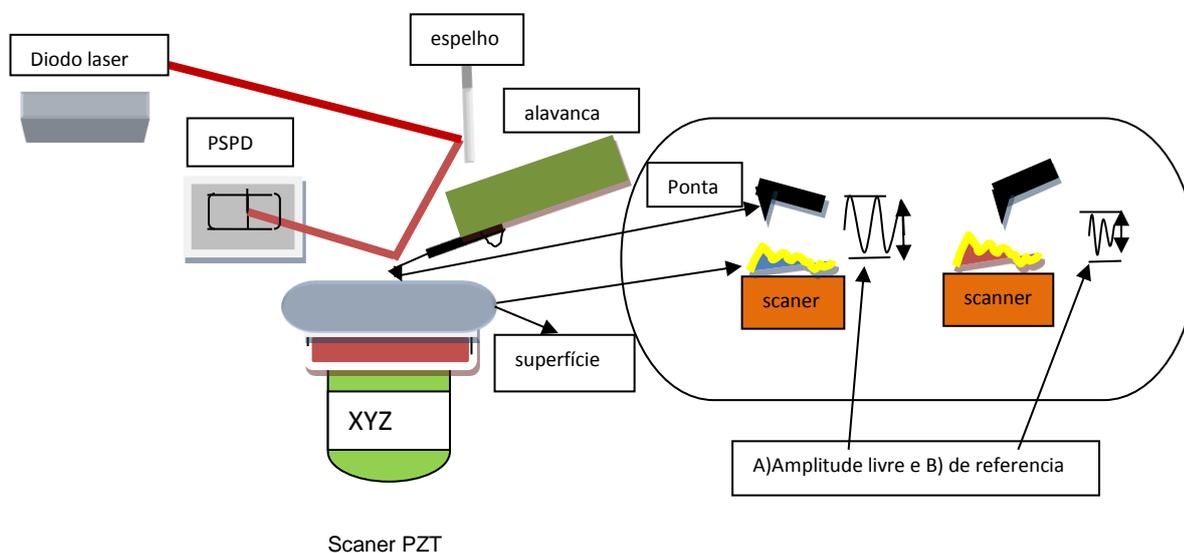


Figura 10: Esquema típico de Microscopia de Força Atômica, em A) oscilando longe da superfície em B) oscila próximo a superfície.

Assim sendo, a distância ponta-amostra é ajustada pela mudança da posição do scanner piezoelétrico de modo a manter a força constante do cantilever sobre a amostra. Tais variações de posição são calibradas como padrão de altura, fornecendo variações na topografia de superfície. Este comportamento depende do potencial da força interatômica entre a ponta de prova e a superfície da amostra.

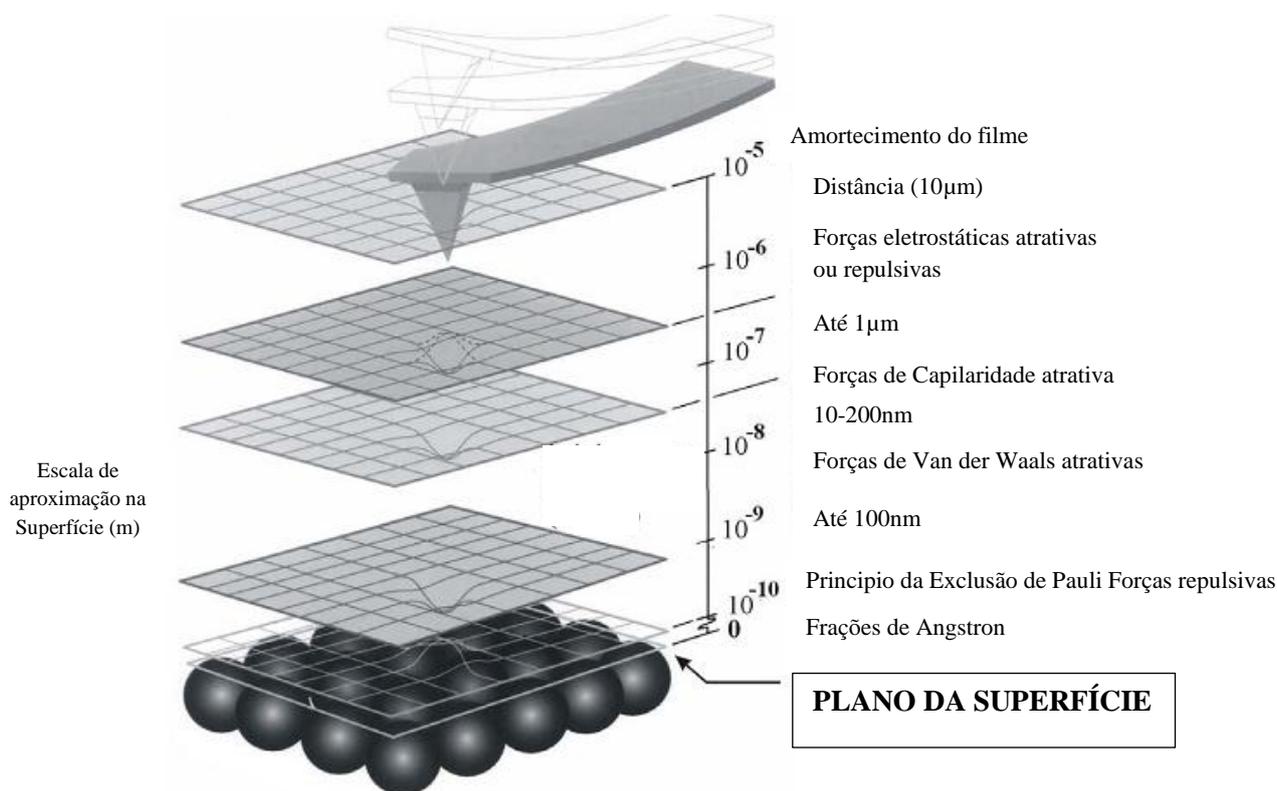


Figura 11: Diferentes forças que ocorrem na aproximação ponta-superfície adaptado a partir de (FARLEY *et al*, 1999).

Na figura 11 o gráfico ilustra as diferentes forças encontradas pela ponta de prova do AFM na medida em que esta se aproxima da superfície da amostra. A fina camada de ar no amortecimento é criada quando a ponta do AFM começa a oscilar próximo da superfície da amostra. Nessa distância, o ar que está na interface entre a ponta e a amostra fica cada vez mais próximo durante o movimento de descida da ponta, criando um vácuo parcial que é gerado pelos “ricochetes” da ponta de prova para cima e para baixo. Os “ricochetes” criam um efeito de bombeamento que amortece o movimento da ponta. Esse fenômeno desaparece logo após que a ponta se aproxima mais da superfície.

Portanto, o AFM é uma técnica que pode ser utilizada em função de diferentes distâncias da superfície estas interações podem ser classificadas em diferentes modos de operação: contato, não contato e contato intermitente (ZANGWILL *et al*, 1988).

3.5.1 Modo Contato

No modo contato a ponta é mantida próxima da superfície, ou seja, irá existir um contato físico com a superfície que será responsável pelas interações repulsivas entre a ponta e a superfície da amostra. As forças envolvidas neste modo são satisfatoriamente

baixas para que não venham ocorrer deformações permanentes na amostra ou na ponta, que podem impedir a reprodutibilidade e prejudicar a análise dos resultados (SARID, *et al* 1991). Quando se observa esta interação através de um ambiente exposto ao ar do mesmo modo teremos uma fina camada de água adsorvida sobre a superfície da amostra e a interação correspondente será a força de capilaridade.

A força de capilaridade depende da distância entre a ponta e a superfície da amostra. Porém, para que tal força ocorra ela tem que ser da ordem de 10 nN. Geralmente, no ar e com forças repulsivas a ponta não penetra na fina camada de água na superfície, todavia em intervalos de 0,1 a 1 μ N a ponta exerce contato físico com a superfície da amostra depois de perfurar a camada de água (SARID, *et al* 1991).

3.5.2 Modo não Contato

No modo não contato as interações são atrativas porque a ponta não entra em contato físico com a superfície. Além do mais, a ponta oscila entre valores de frequências específicas que são ligeiramente maiores que a frequência de ressonância pela qual é possível obter as forças de Van der Waals e as forças eletrostáticas (SARID, *et al* 1991).

Se analisarmos este modo de interação através de uma camada de água que é adsorvida sobre uma superfície no ar esta camada não será penetrada nesse modo de operação do AFM, pois a força entre a ponta e a camada de água é muito reduzida para que ocorra tal processo. Contudo, se a espessura da camada de água não for homogênea sobre a superfície que será varrida a imagem topográfica pode não corresponder a superfície real da amostra (ZANGWILL *et al*,1988).

Porém, este modo de análise apresenta forças de interação que são menores (<< nN), as quais diminuem a pressão na superfície analisada, o que viabiliza sua utilização em estudos biológicos (LIEBER *et al*, 1991).

3.5.3 Contato-Intermitente

O modo contato intermitente é a alternância entre o modo contato e não contato, ou seja, ora a ponta fica mais próxima da superfície da amostra em um tempo determinado e em outro momento a ponta se afasta da superfície da amostra ocorrendo uma variação entre forças atrativas e repulsivas na superfície que esta sendo analisada. Na figura 12

verificamos o comportamento qualitativo da dependência do potencial da força interatômica com a distância da ponta de prova e a superfície da amostra .

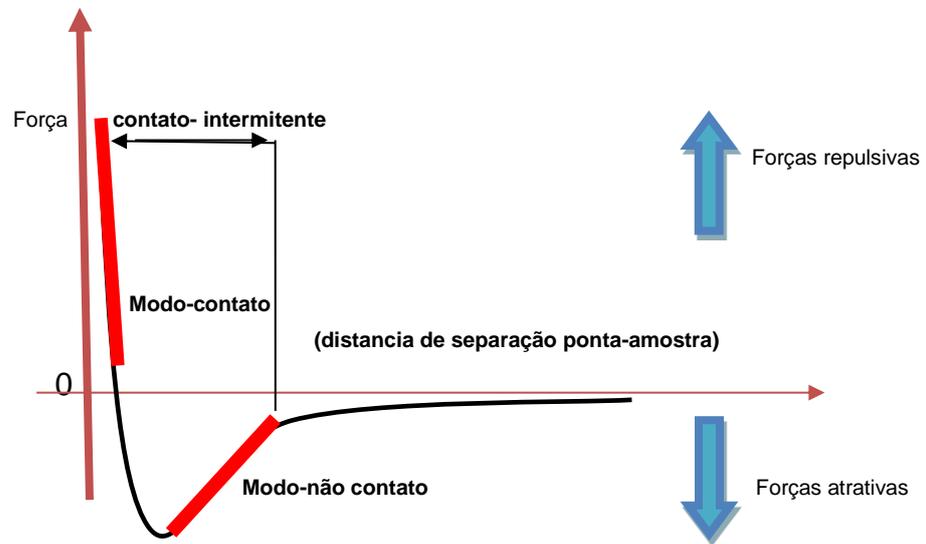


Figura 12: Interações que ocorrem no AFM.

3.5.4 Análise de rugosidade.

A análise da rugosidade superficial são valores estatísticos calculados de acordo com as alturas relativas, ou outros valores de fase de cada pixel na imagem de AFM. Os parâmetros mais utilizados para estatísticas da Rugosidade são rugosidade média (Ra) ou a média quadrada (Rq) no AFM que são representados na equação 2.1 e 2.2. Onde N é o número de pontos selecionados na imagem ou a região da imagem (Z_i) e Z é o valor da corrente.

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^i |Z_i| \quad 2.1$$

$$Rq = \sqrt{\sum_{i=1}^N Z_i^2 / N} \quad 2.2$$

3.5.5 Frequência de ressonância e fator de qualidade

A frequência de ressonância do cantilever e seu modo normal de vibração são determinados pelo material, pela geometria e o ambiente (ar ou líquido). No modo contato o cantilever oscila preferencialmente em frequências típicas de ressonância no ar: 900Hz a 88kHz para nitreto de silício; 60kHz a 400kHz para o silício (dependendo da geometria cantilever) (ALBRECHT, T. R *et al*, 1991).

O fator de qualidade do cantilever (Q) é outro parâmetro de interesse que afeta a velocidade e a sensibilidade porque ele é definido como o mecanismo de dissipação de amortecimento de oscilação do cantilever. Sabe-se que um (Q) elevado é desejável no contato intermitente para aperfeiçoar a sensibilidade, pois os valores típicos de (Q) do cantilever no ar são de 100 a 300 (BUTT *et al*, 1993).

Quando se utiliza a microscopia de força atômica na água o valor de (Q) é igual a 1 devido à hidrodinâmica de amortecimento da superfície ou também em casos que a amostra contém proteínas, resultando em dupla imagem (SCHAEFFER *et al* 1996).

3.5.6 Constante de mola

Para as medidas que envolvam análise de força é fundamental saber o valor da constante de mola. Vários métodos são utilizados para determinar a constante de mola como: o teorema da equipartição (deduz a constante da mola do espectro de vibração térmica do cantilever); a medida da alteração na frequência de ressonância com diferentes cargas; análise das dimensões geométricas ou do fator de qualidade para calcular a rigidez.

3.6 CURVAS DE FORÇA X DISTANCIA NO AFM

A curva de força é determinada pela deflexão da alavanca em função da distância (z) entre a ponta e a amostra medida pelo fotodetector. Através do cálculo da curva de força podemos obter informações quanto à adesão, elasticidade, o caráter hidrofílico ou hidrofóbico da amostra, dentre outras características.

A curva de força serve para quantificar interações entre a ponta e a amostra a partir de dois componentes: uma curva de aproximação, caracterizada por um evento de forças atrativas; e uma curva de retração, que pode apresentar componentes de forças

repulsivas quando há interação entre a ponta e o substrato. (MORRIS *et al*, 2004; HINTERDORFER, *et al* 1998).

3.6.1 Aplicações da curva de força

Uma curva de força é um conjunto composto por sucessivas aproximações e afastamentos da ponta que contem importantes informações a respeito das forças de interações. Por exemplo, a curva de aproximação pode conter informações valiosas sobre as seguintes forças na superfície: forças de van der Waals, força de dupla camada em solução, repulsão eletrostática, curva de indentação e propriedades elásticas sobre uma amostra. Na curva retração podemos observar: força de adesão, efeito capilaridade, extensão de um polímero (curva força-extensão), ruptura ligação da molecular específica (desligamento) ou em alguns experimentos a combinação deles.

3.6.2 Energias e taxas reação molecular

A partir das interações entre o AFM e a superfície outras questões interessantes começam a existir devido à dificuldade de interpretação dos resultados obtidos. Assim surge a necessidade de estudar a relação entre as energias e as taxas de reação dos dados obtidos a partir de uma única medida de força (espectroscopia de moléculas).

A partir de dados de espectroscopia de força podem-se distinguir duas classes fundamentais de reações: primeiro as reações que procedem a quase equilíbrio e segundo, aqueles que não o fazem. Para ambas as classes, modelos simples têm sido desenvolvidos a fim de relacionar uma única medida de força molecular com medidas de grande quantidade no volume.

3.6.3 Reações fora do equilíbrio no AFM

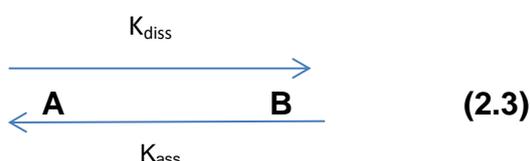
Esta classe de reação descreve a mudança, por meio de uma força aplicada que faz com que a variação termodinâmica se torne irreversível. Nessas reações, geralmente há histerese. O mais importante da força ruptura é que a ligação pode depender da velocidade na qual é aplicada a força (taxa de carregamento). Para descrever a ruptura de ligações fracas quando é aplicada uma força um modelo de estado de transição simples

foi desenvolvido por BELL, *et al* (1977) e mais tarde tal abordagem foi refinada por EVANS *et al*, (1997).

Segundo RIEF *et al* (1999), o conceito da reação de desacoplamento pode ser descrito por meio de uma força que induz um processo probabilístico de “pontapé” térmico sobre uma barreira de ativação. Em taxas de força muito lentas, o sistema tem simplesmente mais tentativas para fazer a transição do que em forças com taxas mais rápidas, ou seja, as rupturas das ligações irão ocorrer em forças mais baixas do que em taxas de forças mais elevadas. Portanto, trabalhos como o de OBERHAUSER *et al*, (1998) sobre o desdobramento de proteínas, bem como os casais de receptor-ligante de YERSIN *et al*, (2003), o processo do desligamento de proteínas adsorvidas GERGELY, *et al* (2000), além o corte STRUNZ *et al*, (1999) e a síntese de DNA CLAUSEN, *et al* (2000) foram descritos com sucesso por este modelo de espectroscopia de força de desacoplamento.

3.6.4 Modelo de espectroscopia de força de ruptura simples

Conforme as informações da cinética e termodinâmica as interações de forças mais complexas são de interesse fundamental para a compreensão das relações entre estrutura e função de uma biomolécula. A maioria dos sistemas pode ser aproximada por uma regra simples que consiste em apenas dois estados, A (estado ligado) e B (estado não ligado), que são separados por um estado de transição caracterizado por uma única barreira de energia. A qual é descrita pela relação (2.3).



As seguintes quantidades são tradicionalmente determinadas pelo volume.

- Velocidade constante de dissociação, $K_{diss} = V_{diss} \text{Exp}^{-\left(\frac{\Delta G_{diss}}{KbT}\right)}$ (2.4)

- Velocidade constante de Associação, $K_{ass} = V_{ass} \text{Exp}^{-\left(\frac{\Delta G_{ass}}{KbT}\right)}$ (2.5)

- Constante de equilíbrio (ou constante de afinidade), $K_{eq} = \frac{K_{diss}}{K_{ass}}$ (2.6)

- Energia livre de Gibbs na reação $\Delta G^\circ : \Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S = RT \ln K_{eq}$ (2.7)

Onde, k_B representa a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, e v é o fator antes da exponencial que denota a frequência das bandas de vibrações que é geralmente diferente para a associação e as reações de dissociação. Foi BELL *et al* (1978), o primeiro a introduzir um modelo de ruptura de ligação simples de forças externas aplicadas com base na teoria do estado de transição onde existe um tempo de vida de ligações não covalentes que seriam iguais ($1/K_{diss}(0)$) na ausência de forças externas consideravelmente altas.

No entanto, quando existe um tempo suficientemente longo para puxar uma ou a outra extremidade por meio de uma força externa pode ocorrer que eventualmente o sistema ultrapasse a barreira de potencial através das flutuações térmicas, as quais podem ajudar nas quebras de ligações.

Se o conceito fosse analisado por um ponto de vista químico quando se puxa um par de receptores-ligantes separados, isso pode ser comparado com uma diluição infinita de ambos os compostos. Porém, como o sistema está longe do equilíbrio térmico é necessário partir de um ponto de vista cinético de taxa de dissociação constante e, isso significa que a probabilidade de ocorrer a revinculação é zero.

De acordo com BELL *et al*, (1978), se a aplicação da força F é no sentido do favorecimento do estado desacoplado B, as energias de ativação são alteradas para:

$$\Delta G^*_{diss} = \Delta G_{diss} - F \cdot x_{diss} \quad \text{e} \quad \Delta G^*_{ass} = \Delta G_{ass} - F \cdot x_{ass} \quad (2.8)$$

Onde o fator de proporcionalidade x tem dimensão de comprimento e pode ser interpretado como a largura do potencial. É possível observar que x_{ass} é negativo, se a força aplicada é no sentido do estado B. Assim, as constantes de velocidade K_{diss} e k_{ass} são alteradas para:

$$K_{diss}(F) = v_{diss} \text{Exp} \left(-\frac{1}{k_b T} \left(\Delta G - \int_0^{x_{diss}} F dx \right) \right) = K_{diss}(0) \text{Exp} \left(\frac{F \cdot x_{diss}}{k_b T} \right)$$

(2.9a)

e

$$K_{ass}(F) = K_{ass}(0) \text{Exp} \left(-\frac{F \cdot x_{ass}}{k_b T} \right) \quad (2.9b)$$

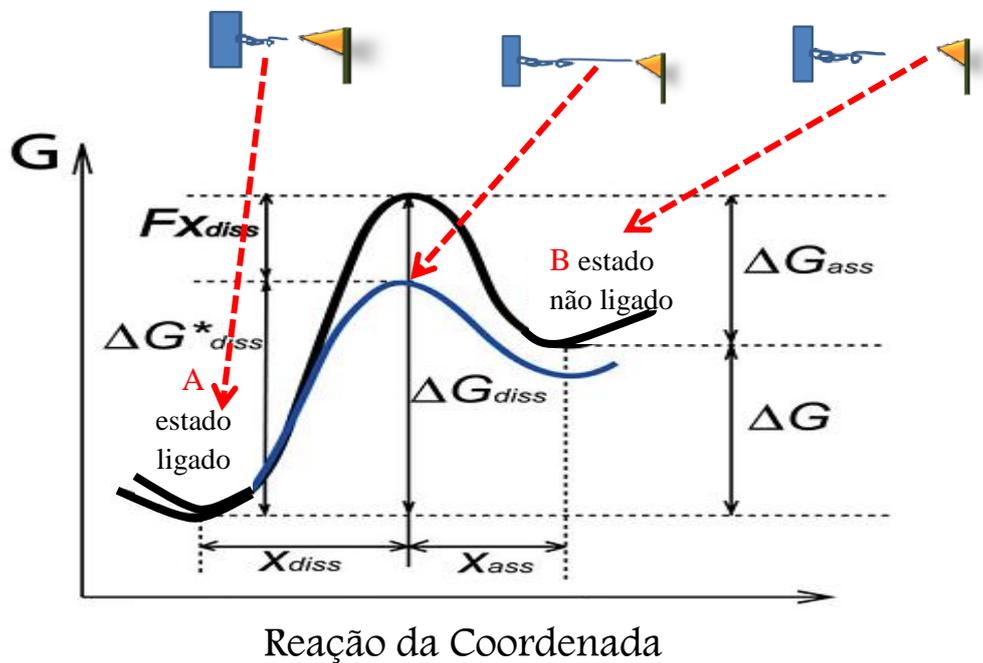


FIGURA 13: Modelo simples de dois estados o estado ligado A e o estado não ligado B. A reação de desvinculação continua por meio de um estado de transição com uma barreira de energia de característica. A força aplicada reduz a barreira de energia através Fx_{diss} , onde x_{diss} é a largura do potencial de um estado em particular (linha azul). figura baseada em (RIEF *et al*, 2002).

Logo, o conceito do modelo de *BELL et al*, (1978) denota que as taxas alteram exponencialmente à medida que a força é exercida, ou seja, quando a taxa de dissociação for K_{diss} , ocorre um acréscimo exponencial, e quando for, k_{ass} , ocorre um decréscimo exponencial.

Assumindo-se que a força exercida F aumenta linearmente com a taxa constante de carga r , (isto é, $\frac{dF}{dt} = r$), onde $P(t)$ é a probabilidade de o sistema estar no estado ligado A.

Após um tempo t esta probabilidade pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -K_{diss}(F) \cdot P(t) \quad 3.0$$

Partindo do princípio através da solução de contorno temos que quando $p(t=0) = 1$. Isto resulta em uma distribuição de forças de desvinculação (ou de uma densidade de probabilidade w).

$$w(F) = \frac{dp(F/r)}{dF} = K_{diss} \frac{F}{r} p^{F/r} \quad 3.1$$

O que resulta em uma solução de contorno com $p(t=0) = 1$.

$$w(F) = \frac{K_{diss}(0)}{r} \text{Exp} \left(\frac{F x_{diss}}{KbT} + \frac{K_{diss}(0)}{r} \frac{KbT}{x_{diss}} \left(1 - \text{Exp} \left(\frac{F x_{diss}}{KbT} \right) \right) \right) \quad 3.2$$

Por definição, a força de desvinculação mais provável é o valor máximo da distribuição (3.2) e está dada pela seguinte equação:

$$F^*_{desvinculação}(r) = \frac{KbT}{x_{diss}} \ln \left(\frac{r}{K_{diss}(0)} \frac{x_{diss}}{KbT} \right) \quad 3.3$$

A equação (3.3) refere-se às medidas de força de desvinculação em molécula simples por meio da taxa de dissociação medida experimentalmente no volume. Esta hipótese é baseada no modelo de BELL *et al*; (1978) de que a taxa de reação de uma ligação depende exponencialmente da força aplicada como é indicado nas equações 2.9 a, 2.9 b e 3.3.

O resultado demonstra que a cinética de dissociação de uma força aplicada é regida pela constante da taxa de dissociação térmica $K_{diss}(0)$ além de x_{diss} que é escala de comprimento interpretado como a largura do potencial de um estado ligado. Na prática, isso significa que o $K_{diss}(0)$ e x_{diss} podem ser determinados através da representação gráfica ($F^*_{desvinculação}$ versus $\ln(r)$).

A largura da distribuição da equação (3.3) depende da largura de x_{diss} e o potencial da energia térmica ($K_B T$). Uma descrição mais elaborada desta equação é dada por Evans e Ritchie aonde supõem que quando são consideradas as perdas por atrito, decorrentes do amortecimento intrínseco da hidrodinâmica a taxa de dissociação pode ser expressa como:

$$K_{diss}(F) = K_{diss}(0) \cdot g(F) \exp\left(\frac{\Delta E^*(F)}{k_B T}\right) \quad 3.4$$

Em que $g(F)$ e $\Delta E^*(F)$ representam as deformações do potencial sob a influência da força externa e o atrito entre as moléculas, respectivamente. Em consequência, o aumento da taxa de carregamento resulta em uma mudança na distribuição (3.3) que é acompanhado por uma força de desvinculação mais elevada. A análise estatística das forças de desvinculação proporciona uma força de ruptura de ligação não covalente, que também é determinada pelo histograma da taxa de carregamento.

Na hipótese de uma força F^* desvinculação estacionária válida, que possua flutuações térmicas que ocorram dentro de uma escala de tempo entre 10^{-12} s ou até mesmo mais curtas a taxa de carregamento mecânico possui um comportamento extremamente lento, visto que, no momento em que se compara o tempo aplicação da força media feita pela ponta do AFM estes são realizados em períodos de tempos entre 10^{-3} e 10^{-5} s, ou seja, um tempo muito maior quando se compara com as flutuações térmicas.

Assim segundo BARTELS, *et al* (2003), nem todas as medidas de espectroscopia de força podem ser ajustadas a um simples modelo de dois estados. Este é o caso de alguns pares de receptor- ligante onde há mais do que um estado de transição. Portanto, devido a grande complexidade do tema surgem algumas abordagens teóricas de ligações moleculares com intuito de compreender tais fenômenos de interface.

3.7 FUNCIONALIZAÇÕES DE SUPERFÍCIE COM ORGANOSILANOS

Por muitos anos os pesquisadores tentaram conciliar a alta resolução da microscopia eletrônica de varredura com a capacidade de se obter imagens em meio aquoso, próprio dos microscópios ópticos.

Os microscópios de varredura por sonda – SPM não utilizam lentes para obtenção das imagens e não necessitam de uma fonte de luz ou de um feixe de elétrons. Esta técnica se fundamenta na varredura da superfície por meio de sonda de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas (da ordem de alguns Å), sendo adequada para visualização de superfícies em diversos meios.

O AFM como um método não destrutivo tem a capacidade de produzir medições de forças de adesão entre a ponta e a superfície do material, o que permite avaliar informações sobre a energia de ligação em escala aproximada em nanonewton (nN).

Os materiais frequentemente utilizados na fabricação da haste, ou seja, as pontas do AFM são de silício (Si) e nitreto de silício (Si_3N_4), uma vez que elas podem ser facilmente micro usinadas. As interações com a ponta são influenciadas pelo material e pelo ambiente. Quando se trabalha em ambiente líquido a interação depende do pH e dos eletrólitos em solução.

Por exemplo, em condições fisiológicas (solução aquosa de eletrólitos com pH aproximadamente 7,4) a sílica (SiO_2) é carregada negativamente quando o ambiente fornece algum tipo de polaridade. Em muitas aplicações biológicas é necessário ter uma superfície de carga específica na ponta ou alterar as suas propriedades de hidratação (SEDEN *et al*, 1995).

Assim sendo, podemos conseguir estas alterações na superfície por processos químicos ou tratamento de plasma, porque ambos os processos podem modificar as propriedades da superfície.

Numerosas técnicas têm sido estudadas para empregar o AFM em meio líquido com o intuito de medir as interações específicas. Uma delas utiliza a silanização da ponta do AFM com Aminosilano, APTES (3-Aminopropiltrióxissilano), o qual é altamente reativo e tem a capacidade de reagir covalentemente com os átomos da superfície através da formação de ligações covalentes. (KAGESHIMA *et al*, 2001). Segundo THOMSON *et al*, (1996) as biomoléculas são imobilizadas na ponta do AFM, gerando uma interação específica entre o sistema e o substrato (amostra).

Dessa forma, há uma produção considerável de protocolos para ligar uma molécula de proteína à ponta, dentre os quais podemos citar: a utilização de um “espaçador” para se ligar covalentemente à proteína.

No que diz respeito à adsorção da proteína em superfícies funcionalizadas e a sua aplicação em líquido ocorrem várias interações complexas no interior e no exterior dos componentes, os quais são: a superfície sólida, a proteína, o solvente e quaisquer outros solutos presentes.

Já as forças de interação da adsorção entre os componentes apresentam momentos de dipolo induzido bem como forças de ligação de hidrogênio e potenciais eletrostáticos. Todas essas forças inter e intramoleculares irão contribuir para uma diminuição da energia livre de Gibbs durante a adsorção (THOMAS *et al*, 2000). Como existem numerosas técnicas para funcionalizar a superfície, uma das alternativas de protocolos é

empregar o APTES, visto que tais compostos químicos são muito utilizados os protocolos já são bem estabelecidas na literatura.

3.7.1 Organosilanos

Silanos são compostos híbridos orgânicos- inorgânicos utilizados para melhorar a aderência nas mais variadas aplicações por meio das interfaces orgânico-inorgânicos. Estes compostos orgânicos são formados a base de silício e quando aplicados em condições adequadas promovem a polimerização de um filme homogêneo na superfície, proporcionando excelentes propriedades de adesivas em camadas metálicas (RAMOS *et al*, 2005)

Os silanos são classificados como monosilanos ou bissilanos, ou seja, de acordo com os seus grupos hidrolisáveis nas moléculas. O monosilano apresenta um silício na cadeia principal e o bissilano tem dois silícios na cadeia principal. (RAMOS, 2005; VAN *et al*, 2005).

Uma molécula de monossilano apresenta três grupos hidrolisáveis X e um grupo funcional orgânico Y ou um CH₃ como na figura 14 abaixo:

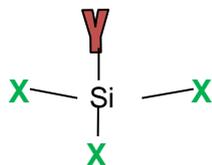


Figura 14: Representação geral da estrutura do monossilano funcional $X_3Si(CH_2)_nY$

Assim sendo, a representação do símbolo X da figura 14, pode representar um grupamento metoxi ou etoxi capaz de hidrolisar e Y representa o grupo orgânico funcional tal como clorina, amino, epóxi ou mercapto.

3.7.2 Hidrólise do APTES

O processo de hidrólise dos silanos ocorre antes de serem aplicados aos substratos com intuito de apresentar quantidades suficientes de grupos silanol - Si-OH, que em seguida este último irá interagir com o substrato, seja este metálico, polimérico ou cerâmico. Normalmente, os silanos quando são diluídos em soluções aquosas são hidrolisados e formam os grupos silanol, este tipo de reação é demonstrada na figura 15.

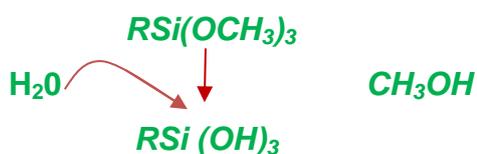


Figura 15: Reação de hidrólise de silano . Adaptada de WITUCKI,(1993)

É importante ressaltar na figura (15) que ocorre a liberação de um álcool na solução de acordo com o grupo hidrolisável do Silano. Se o grupo hidrolisável for um grupo metóxi ocorre à liberação de metanol na solução, mas se for etóxi ocorre a liberação de etanol.

Deste modo, os fatores que influenciam a cinética e o equilíbrio da hidrólise assim como a condensação dos silanos em solução são: a natureza do grupo funcional, o valor do pH da solução, a temperatura e o envelhecimento da solução.

3.7.3 Glutaraldeído

A primeira síntese bem-sucedida do glutaraldeído foi realizada por Harries e Tanque em 1908. O glutaraldeído foi catalogado como um dialdeído tipicamente reativo que foi utilizado em vários produtos de sínteses químicas mais complexas em laboratórios e sua estrutura esta apresentada na figura 16 (KIERNAN *et al*, 2000).

O glutaraldeído foi rapidamente aceito em microscopia eletrônica e laboratórios de patologia e histologia como uma alternativa superior ao formaldeído (RHIM *et al*,2000).

As secções do tecido mostram menos distorção, fragilidade, encolhimento, e mais fixação/tempo e maior elasticidade durante a manipulação e corte; além de possuir vida útil mais longa (*Werner et al, 2000*).

Essencialmente existem três modos de fixação do Glutaraldeído por: A) Reação rápida e coagulação reversível, B) Estabilização por ligação de hidrogênio, mas suscetível em ácido hidrolisado, C) Ligação de hidrogênio com alta resistência à hidrólise ácida, resultando numa fixação permanente. Os resultados da fixação da proteína são inter e intra-moleculares e em grande parte causam o aprisionamento de várias macromoléculas na matriz fixa das proteínas com ligação cruzada. Assim, a hidrofiliçidade generalizada leva a uma resistência química que é induzida por ação de enzimas e interações microbiológica por ataques químicos. Surpreendentemente, a fixação não altera a estrutura secundária das proteínas. (*MASON et al, 1991*).

Porém, as estruturas terciárias são as mais complexas e afetadas pelas coagulações e fixações. Em reação com o glutaraldeído é formado grupo amina que se condensa com outros grupos químicos para formar ligações de hidrogênio (*RHIM et al, 2000*).

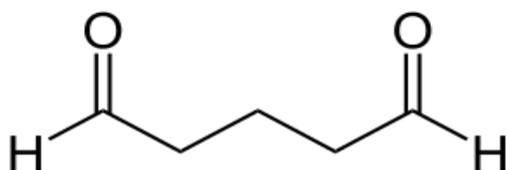


Figura 16: Estrutura do Glutaraldeído

3.7.4 Silanização da superfície com APTES

Apesar das vantagens da análise da curva de força nos materiais, deve-se ter cautela ao realizar a modificação química da superfície para essas medidas, uma vez que uma grande força aplicada pode destruir a interação com a superfície.

Para a análise da curva de força é importante funcionalizar com grupos químicos através do método de silanização com organosilanos reativos, os quais podem vir a oferecer melhor resolução e mapeamento das interações moleculares. A modificação química de superfície é fundamental para definir o modo como o material vai interagir com o ambiente circundante e, assim compreendendo estas forças podemos contribuir para aperfeiçoar as interações de base biomoleculares.

Conforme a literatura sobre a formação de filmes de APTES há um consenso que o processo ocorre através da silanização e a hidrólise de grupos etoxi num processo catalisado por água, conduzindo à formação dos grupos silanóis. Os silanóis se condensam na superfície, formando uma monocamada de APTES via rede lateral de siloxano, em que os grupos amina são orientados para longe da superfície do silício que são capazes de reagir com os grupos hidroxilas nas partículas das superfícies.

A adsorção do APTES na superfície de silício é seguida pela condensação do siloxano e depois de algum tempo as moléculas APTES se acumulam sobre a superfície ora por ligação covalente ora por outras interações. A neutralização da amina na superfície forma grupos carboxila que podem reduzir significativamente a interação eletrostática entre as partículas e as células, melhorando a biocompatibilidade do APTES modificado.

Porém, a complexidade da formação dos aminosilanos e do APTES decorre da presença de um grupo amina reativo que tem a propensão inerente de fazer uma reação concorrente.

E isto pode reduzir o número de grupos silanol disponíveis tanto na superfície de silício quanto para o APTES e, posterior condensação de siloxano como é ilustrado na Figura 17.

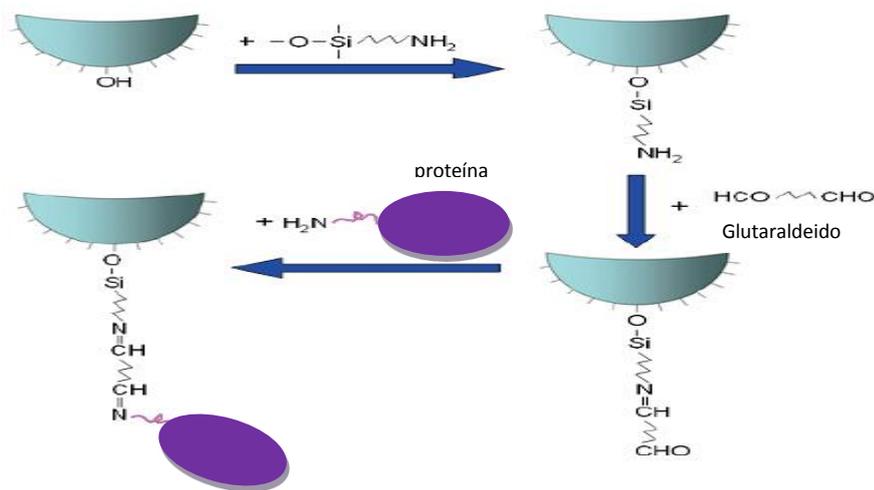


Figura 17: Modificação química da ponta ou superfície (BRUKERNANO, 2011).

3.8 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR PLASMA

A modificação da superfície tem por objetivo mudar e melhorar as propriedades do material tais como: adesão, desgaste, atrito, taxa de corrosão, propriedades anti-refletores, rigidez, dentre outras.

Porém, para que ocorram tais modificações na superfície são necessários estudos e metodologias de deposição visando à melhor técnica para o material em estudo. Existem diversos métodos empregados na deposição de filmes finos, porém a escolha adotada para este estudo é a técnica de deposição por PVD, por plasma mediado por uma reação de gases de Argônio e Nitrogênio que irão arrancar os átomos da sua superfície do Si_3N_4 que posteriormente são depositados no substrato de silício.

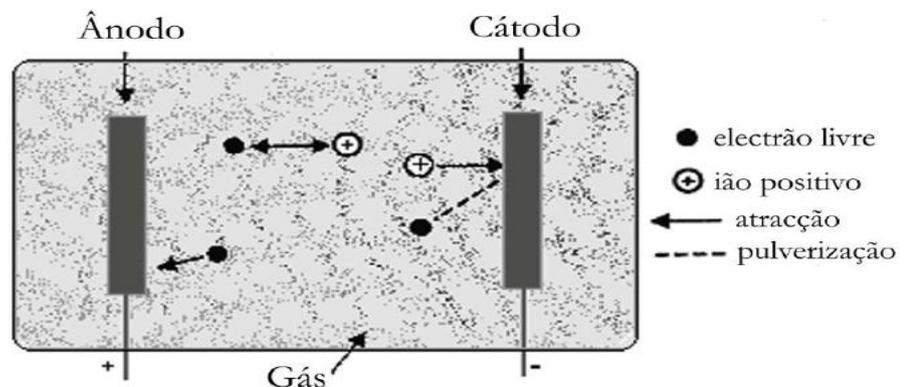


Figura 18: Constituição do plasma

A corrente gerada inicialmente, antes da formação do plasma é mantida praticamente constante e em geral é baixa, pois a carga decorre de colisões das partículas carregadas existentes no gás.

No entanto, com o aumento gradual da tensão, os elétrons primários vão adquirindo energia suficiente para ionizar os átomos do gás, como se pode observar na Figura 18. E assim os íons resultantes irão colidir com o cátodo, o que provocará a emissão de elétrons secundários, os quais contribuem para ionizar cada vez mais o gás (CHAPMAN B. *et al*, 1980).

Quando se utiliza a técnica de deposição por plasma normalmente a energia cinética (temperatura) dos elétrons é muito maior do que a dos íons (OHRING, M. *et al*, 2002).

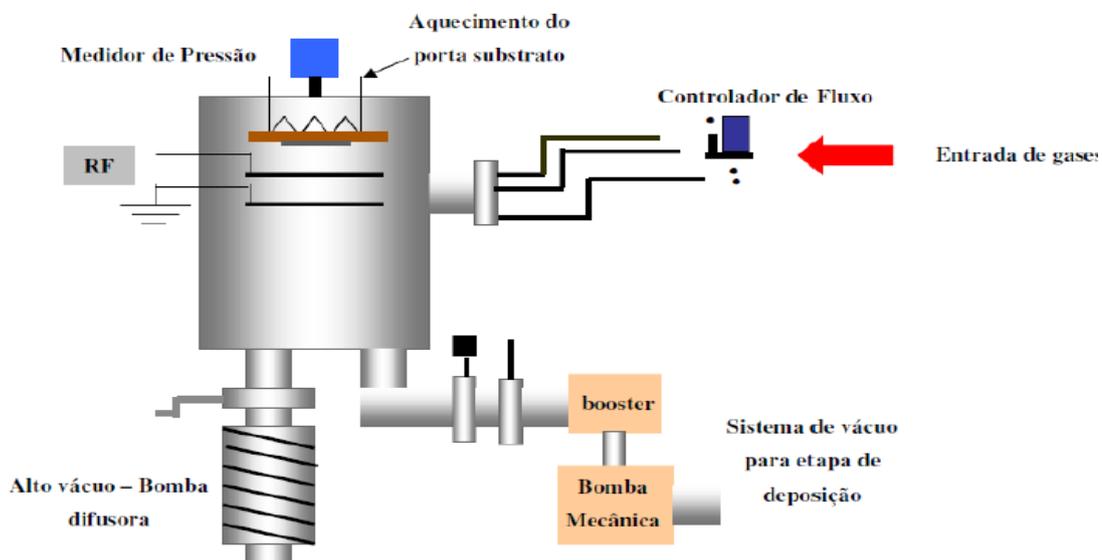


Figura 19: Representação de um reator, utilizado para depositar filmes.

A câmara de deposição é formada por dois eletrodos de diferente área conforme a figura 19. No catodo é onde o substrato é colocado. O outro eletrodo (anodo) é formado pelas paredes da câmara e é aterrado. Esse plasma é gerado por colisões dos elétrons acelerados por um campo de radiofrequência com os átomos e/ou moléculas da atmosfera precursora, provocando novas ionizações através de diversas reações envolvendo elétrons, íons, moléculas e radicais neutros.

Em aplicações biomédicas existem pesquisas que buscam relacionar as técnicas de funcionalização química com a imobilização de proteínas, enzimas, organelas e células com o intuito de orientar a distribuição das biomoléculas em superfície.

Isso, melhora a adesão das proteínas sobre as superfícies e se torna um importante recurso nas aplicações biomédicas e industriais.

Esta técnica de deposição pode ser uma alternativa para a silanização química quando se utiliza precursores contendo silício por exemplo. Além disso, a introdução de grupos NH_x , pode ser uma alternativa para funcionalização das pontas e da superfície.

3.9 MACROMOLÉCULAS COMO POLÍMEROS

Moléculas poliméricas ou simplesmente macromoléculas são formadas quando existem condições favoráveis para adição de mais uma unidade (monômero) e estes independem do tamanho atual da mesma. Por exemplo, as condições necessárias para sintetizar um composto $[A] - [A]$ a partir de $[A]$ podem ser muito diferente das necessárias para transformar $[A] - [A]$ em $[A] - [A] - [A]$.

No entanto, a partir de um composto $[A]_n$ ($[A] - [A] - [A] \dots [A]_n$) as condições necessárias para ativar o processo e $[A]_n \quad [A]_{n+1} \rightarrow$ podem ser muito parecidas com o processo para ativar $[A]_{n+1} \rightarrow [A]_{n+2}$ e assim por diante. Neste caso, o processo de adição de monômeros pode continuar indefinidamente, dando origem a cadeias enormes que chamamos de polímeros.

Os polímeros podem ser classificados em extremamente rígidos ou extremamente flexíveis, porém na maioria dos casos estes não são nem completamente rígidos ou completamente flexíveis caracterizando uma forma intermediária. Como os polímeros são moléculas muito grandes o comportamento macroscópico é governado principalmente pelos parâmetros de comprimento independente do tipo de monômero.



Figura 20. Representação esquemática de um polímero (a) Flexível, (b) Rígido, (c) e (d) suas soluções concentradas.

3.10 ELASTICIDADE ENTRÓPICA E A MAXIMIZAÇÃO DA ENTROPIA

Um polímero ou molécula que possui uma forma retilínea, bem definida e fixa comumente é chamado de comprimento de contorno (CC) ou L. Quando o polímero é imerso em solução aquosa irá dobrar sobre si mesmo até atingir um estado de equilíbrio termodinâmico com o meio no qual esta imerso. A molécula se dobra mais devido aos choques que as partículas do meio experimentam ao longo de todo seu comprimento.

Devido à flexibilidade que geralmente um polímero possui a intensidade dos choques sofridos com o meio fazem com que as moléculas saiam da conformação retilínea expandindo-se nas demais dimensões disponíveis.

Como o comprimento de contorno é fixo e geralmente bem definido a movimentação dos segmentos internos faz com que suas extremidades se aproximem umas das outras e o processo continua até uma conformação tal que os choques com o meio não sejam mais capazes de alterar as posições médias. Esta condição caracteriza um estado de equilíbrio, porém esta é uma configuração de enovelamento aleatória e de alta entropia.

Segundo Bustamante *et al* ,(1994), dá-se o nome de elasticidade entrópica a tendência de a molécula aumentar sua entropia para adquirir a estabilidade. A elasticidade entrópica não depende somente das propriedades do meio, mas também depende das características da própria molécula. Então para que as extremidades da molécula ou polímero sejam afastadas novamente, é necessária a aplicação de uma força \vec{F} capaz de compensar os efeitos dos choques com as partículas do meio.

A origem entrópica do comportamento elástico da molécula polimérica é relacionada com o número de configurações possíveis por meio da equação de Boltzmann (3.5)

$$S = K_b \ln \Omega \quad 3.5$$

Onde Ω representa o número de conformações possíveis.

Quando a distância entre as extremidades das moléculas é igual ao comprimento de contorno, a molécula se encontra completamente estirada, e só existe uma conformação possível que é aquela em que todos os segmentos da molécula se encontram sobre a mesma linha reta caso em que $\Omega=1$ e $S=0$.

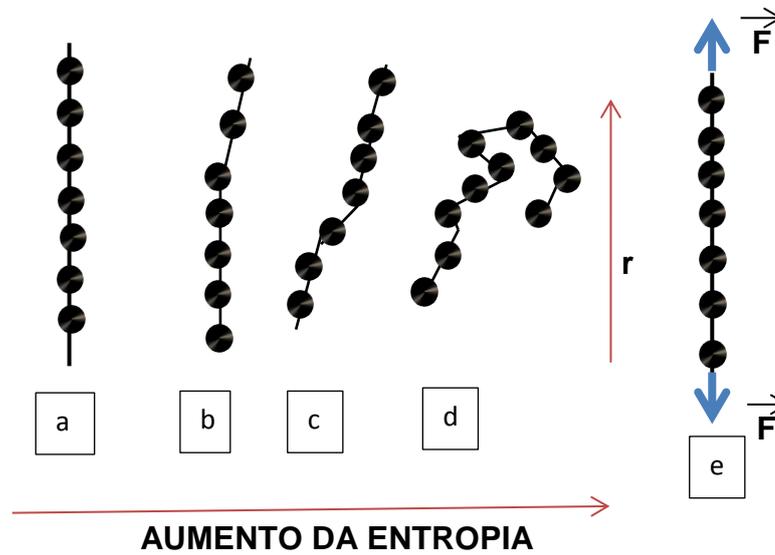


Figura 21: Elasticidade entrópica de um polímero: (a) - molécula inicialmente estirada. (b)–(c) - molécula sofrendo os efeitos dos choques com as partículas do meio em que está imersa. (d) - molécula em uma conformação de equilíbrio. Esta é uma configuração de enovelamento aleatório e de alta entropia (e) - *Força Entrópica*: para fazer com que as moléculas fiquem estiradas é necessário aplicar uma força F nas extremidades.

A força entrópica de recuo que tende a aproximar as extremidades das moléculas pode ser estimada a partir da energia livre do sistema

$$F = K_B T \ln Z \quad 3.6$$

Onde Z representa a função de partição da energia das moléculas.

3.11 MODELO MATEMÁTICO DA ELASTICIDADE ENTRÓPICA EM UMA MACROMOLÉCULA

Uma descrição mais concisa para os estudos que retratam a relação entre a força aplicada ao polímero com estiramentos resultantes é o modelo conhecido de cadeia vermiforme–Worm-Like Chain (WLC). Este modelo descreve satisfatoriamente o comportamento elástico entrópico de proteínas e o conjunto de monômeros tanto para estiramentos pequenos, próximos ao estado de equilíbrio, quanto para estiramentos grandes, próximos da conformação retilínea e, portanto, longe do equilíbrio.

No modelo WLC, uma molécula com comprimento de contorno fixo L , cuja conformação seja descrita por uma curva $R(s)$, com $0 \leq s \leq L$, tem sua energia dada por. (eq.3.7)

$$E_{WLC} = \frac{K_B T}{2} \int_0^L A \left| \frac{\partial \hat{u}}{\partial s} \right|^2 ds - F_z \quad 3.7$$

Onde a força F_z aparece como um multiplicador de Lagrange, representando o vínculo existente entre as extremidades do polímero onde $\hat{u}(s)$ é um vetor unitário tangente à curva $R(s)$. (eq.3.8)

$$\hat{u}(s) = \frac{\partial R_s}{\partial s} \quad 3.8$$

Em outras palavras F é a força necessária para manter a distância z entre as extremidades da molécula na conformação atual e o parâmetro A é definido como comprimento de persistência. A Equação de partição da energia será dada pela (eq.3.9) :

$$\int \mathbf{Z} = \int \text{Exp} \left[-\frac{E_{WLC}}{K_B T} \right] d\hat{u} = \int \text{Exp} \left[-\frac{1}{2} \int_0^L A \left| \frac{\partial \hat{u}}{\partial s} \right|^2 ds + \frac{F_z}{K_B T} \right] d\hat{u} \quad 3.9$$

O valor de A ou CP (comprimento de persistência) deve ser interpretado como a medida de alcance das perturbações locais na conformação global média da molécula

que apresenta certa forma do comprimento da cadeia ou como uma espécie de comprimento de correlação da cadeia polimérica. Deste modo, onde o valor de A for pequeno quando comparado com os valores de comprimento de contorno ($A \ll L$) irá ocorrer uma pequena alteração local na posição de um grupo de monômeros e este efeito afeta o monômero seguinte ao ponto da origem apenas até certa distância(A).Como consequência os trechos das moléculas podem ser movimentados uma em relação à outra com relativa facilidade, caracterizando a molécula como flexível.

E quando $A \gg L$, ou seja, limite em que A é grande em relação a L a perturbação local será sentida por todos os outros monômeros da cadeia que tenderam a manter sua posição relativa de equilíbrio inalterada. Neste caso, a molécula se comporta como rígida. Para estiramentos muito longos que levam a molécula a uma conformação longe do equilíbrio não é possível mais estimar a força entrópica pelas leis de Hooke.

É possível calcular a distância quadrática média entre as duas extremidades das moléculas poliméricas para a conformação de equilíbrio nos limites flexível e rígido, obtendo no limite flexível $A \ll L \langle R^2 \rangle \approx 2AL$ e para o limite rígido $A \gg L \langle R^2 \rangle \approx L^2$

3.11.1 Conformações de equilíbrio

Segundo Coelho (2001), para pequenas distensões próximas da conformação de equilíbrio, a força de recuo é aproximada por meio da Lei de Hooke, (eq.4.0).

$$F = -k.Z \quad 4.0$$

Onde a constante de força k é obtida a partir da equipartição da energia na conformação de equilíbrio COELHO *et al.*,(2001) .(eq.4.1)

$$\frac{3}{2}K_B T = \frac{1}{2}K \langle R^2 \rangle \quad (4.1)$$

Assim, combinando $\langle R^2 \rangle \approx 2AL$ e a equação (4.1), a constante de força k será dada por: (eq.4.2)

$$k = \frac{3K_B T}{2AL} \quad (4.2)$$

Logo a força de recuo para pequenos estiramentos próximos conformação de equilíbrio será então pela (eq. 4.3)

$$k = -\frac{3K_B T z}{2A L} \quad (4.3)$$

Este resultado é possível pelo fato de que para estados próximos a conformação de equilíbrio, o modelo WLC, prevê um comportamento linear para a força entrópica que pode ser aproximado pela Lei de Hooke.

3.11.2 Conformações fora do equilíbrio

Como mencionado anteriormente para estiramentos muito longos, ou seja, uma conformação longe do equilíbrio as leis de Hooke não podem prever as forças entrópicas. Logo, um método alternativo é o limite da força aplicada quando a molécula é puxada, ou seja, quando a molécula está em conformação quase ou completamente estirada, ($Z \approx L$), o vetor tangente \hat{u} é quase paralelo à curva $R(s)$, que descreve a conformação da molécula.

Assim, a componente de \hat{u} é paralela à direção do estiramento \hat{u}_z além de ser muito maior que as demais e se mantém praticamente constante devido ao alto grau de estiramento da molécula.

Assim as componentes restantes de \hat{u} , \hat{u}_x e \hat{u}_y , variam muito livremente dentro dos limites permitidos pela relação $\hat{u} = \hat{u}_z + \hat{u}_x + \hat{u}_y$.

Já que $|\vec{u}_z|^2 = |\vec{u}_z|^2 + |\vec{u}_x|^2 + |\vec{u}_y|^2 = |\vec{u}_z|^2 + |\vec{u}_\perp|^2 = 1$ é possível escrever que $|\vec{u}_z|^2 = 1 - |\vec{u}_\perp|^2$. Porém como $|\vec{u}_\perp|^2 \ll 1$ é feita a aproximação para $|\vec{u}_z| = 1 - \frac{|\vec{u}_\perp|^2}{2} + \vartheta(|\vec{u}_\perp|^4)$.

Assim é possível integrar $z = \int_0^L |\vec{u}_z| ds$ e utilizar a equação 3.7 como:

$$E_{WLC} = \frac{K_B T}{2} \int_0^L [A \left| \frac{\partial \vec{u}_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{K_b T} |\vec{u}_\perp|^2] - FL \quad (4.4)$$

Definindo a transformada de Fourier $u_\perp(q) = \int ds e^{iqs} \vec{u}_\perp(s)$, logo a energia é desacoplada em modos normais:

$$E = \frac{K_B T}{2} \int \frac{dq}{2\pi} \left[A q^2 + \frac{F}{k_b T} \right] |\vec{u}_\perp|^2 - FL \quad (4.5)$$

O valor médio de $|\vec{u}_\perp|^2$ é dado por:

$$\langle |\vec{u}_\perp|^2 \rangle = \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\vec{u}_\perp(q)|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \frac{1}{(Aq^2 + \frac{F}{K_b T})} = \sqrt{\frac{K_b T}{FA}} \quad (4.6)$$

Portanto, ao assumir que $\frac{Z}{L} \approx |\vec{u}_z|$, é possível escrever que:

$$\frac{Z}{L} = 1 - \frac{|\vec{u}_\perp|^2}{2} = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{K_b T}{FA}} \quad (4.7)$$

A partir disto, segundo BUSTAMANTE, *et al* (1994) e COELHO *et al*, (2001) obtemos a eq. 4.8:

$$F = \frac{K_b T}{A} \left[\frac{1}{4} \frac{1}{\left(1 - \frac{Z}{L}\right)} \right] \quad (4.8)$$

3.11.3 Conformações dentro e fora do equilíbrio

Com o objetivo de construir uma expressão para força entrópica que venha ser válida para pequenos estiramentos, inicialmente a partir da equação (4.8) é possível fazer uma expressão que satisfaça as duas situações partindo da seguinte premissa:

Na existência de pequenos estiramentos ($Z \sim 0$), o comportamento da equação (4.8) é possível fazer uma expansão até a primeira ordem.

$$F = \frac{K_b T}{A} \left[\frac{1}{4} \frac{1}{\left(1 - \frac{Z}{L}\right)} \right] \quad (4.9)$$

Para que a equação acima tenha a mesma validade da equação (4.3) que é a expressão utilizada para força entrópica de recuo em pequenos estiramentos, é necessário acrescentar a equação (4.8) duas correções que tem implicação da seguinte forma: quando ($Z \sim L$), o resultado torna-se insignificante resultando em uma expressão aproximada para força de recuo válida tanto para grandes estiramentos quanto para pequenos (DE GENNES, *et al* 1991). (eq.5.1)

$$F = \frac{K_b T}{A} \left[\frac{Z}{L} \frac{1}{4 \left(1 - \frac{Z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (5.0)$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sistema de deposição por PVD

Nesta tese o Sistema de Deposição utilizado é composto por:

- ✓ 2 canhões de magnetron sputtering (Mark Source, Us inc.);
- ✓ 1 fonte Dc (MDX 1K, Advance energy);
- ✓ 1 Fonte de RF (RFX 600 A, Advance energy),
- ✓ 1 casador de impedância para o sistema RF(ATX-600, Advance energy),
- ✓ 1 controlador de fluxo mássico de gás ambos MKS;
- ✓ 1 bomba mecânica rotatória (E2M-18, Edwards),
- ✓ 1 bomba difusora (160MM DIFFSTAK, Edwards),
- ✓ 2 sensores de vácuo um tipo parani para baixo vácuo (TPR 250, Balzers) e um tipo penning para alto vácuo (CP25-K, Edwards).

O alvo Nitreto de Silício (Si_3N_4) foi ligado a uma fonte DC. Os substratos de Silício foram fixados em quatro suportes, os quais ficaram apoiados sobre um disco. Este disco era conectado a um conjunto de engrenagens acionadas por uma manivela externa à câmara, possibilitando o posicionamento dos substratos sobre o alvo. Em seguida, ligou-se o controlador de fluxo mássico de gases na proporção de 40% de Nitrogênio para 60% de Argônio.

Com a pressão da bomba difusora próxima a 10^{-6} mbar ligamos a fonte DC para a deposição do Si_3N_4 na superfície do substrato de silício, porém essa deposição se realizou após a estabilização do plasma. O substrato de Silício foi colocado sobre a abertura do canhão por um tempo médio de 1 hora.

Nesta deposição não houve aquecimento prévio do substrato e estes foram colocados na câmara na temperatura ambiente, sendo que qualquer aquecimento dos substratos ocorre do processo de deposição conforme a figura 22, a qual mostra alguns desses componentes de deposição.

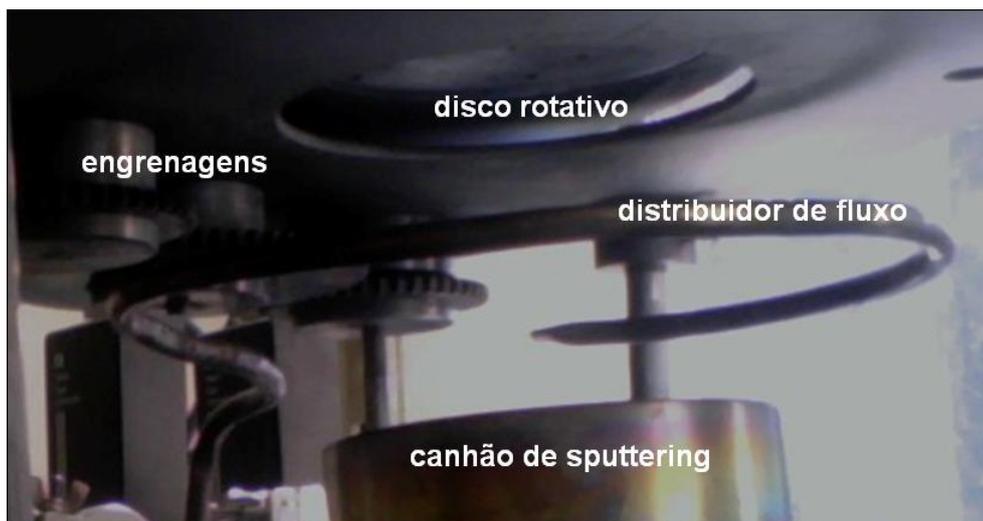


Figura 22: Fotografia de parte do sistema de deposição no início deste trabalho, mostrando o distribuidor de fluxo sobre o canhão de sputtering e as engrenagens de rotação manual para posicionamento dos suportes de substratos.

4.2 Funcionalização da superfície em diferentes meios reacionais

Após a deposição do Si_3N_4 nas superfícies, os substratos utilizados foram cortados em dimensões que variam entre $10 \times 10 \text{ mm}^2$ e $20 \times 20 \text{ mm}^2$. A seguir, os substratos foram limpos e sonicados em Etanol 95% duas vezes por 30 minutos antes da reação química com APTES, cujo valor adotado varia de 20mMol e 40mMol de concentração. O esquema do tempo de concentração bem como a quantidade das amostras é representado na figura 23:

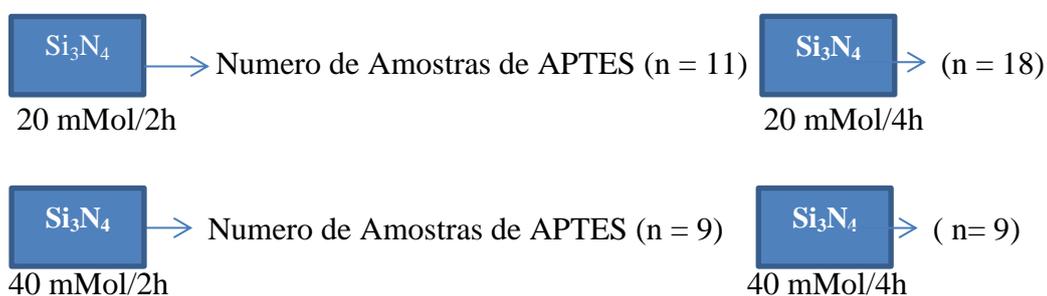


Figura 23: Representação do sistema adotado para a concentração e o tempo de reação do APTES na superfície de Nitreto de Silício.

Neste tempo de reação indicado pelas figuras 23 é adicionado 1mL de água na suspensão a fim de promover a hidrólise do grupo siloxano do APTES e formar o grupo silanol.

As amostras foram sonicadas com 20mL de Etanol 95% três vezes por cinco minutos e colocadas a 100°C/ 24h em uma estufa para que ocorra o processo de cura do APTES. Após essa etapa as amostras foram novamente sonicadas com 20mL de Etanol 95% três vezes por cinco minutos para retirar o excesso de APTES que não se ligou na superfície.

Os filmes de APTES foram mantidos em um dessecador, porque a exposição à umidade atrapalha as ligações de Hidrogênio no APTES que leva a formação de um polisiloxanos.

Assim, as amostras que continham o APTES na superfície reagiram com Glutaraldeído 2,5% por 2h e 4h , e posteriormente elas foram lavadas três vezes com água e 1 vez na solução tampão de fosfato 0,01M.

Em seguida as amostras foram postas em contato com a solução de albumina do soro bovino com as seguintes concentrações de 20µg/mL e 100µg/mL por 1 hora. Após esse tempo as amostras foram lavadas três vezes na solução de fosfato 0,01M e armazenadas na geladeira. Utilizaram-se tratamentos com alterações na concentração de álcool de 95% para álcool absoluto na molécula do BSA.

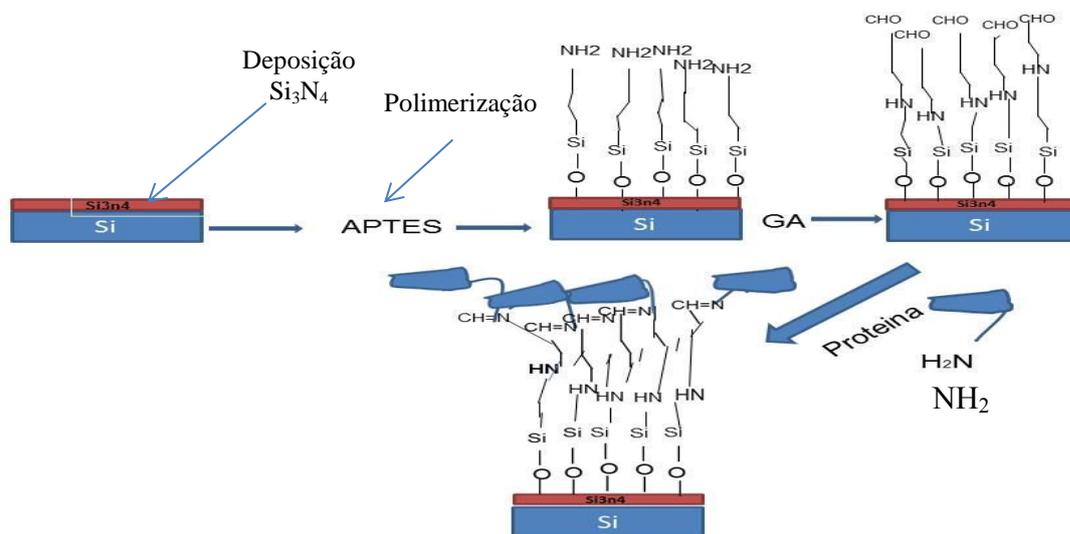


Figura 24 : Representação das etapas de funcionalização da superfície.

4.3 Técnicas de caracterização

As amostras funcionalizadas com APTES, Glutaraldeído e a albumina do soro bovino foram caracterizadas pelos equipamentos de Espectroscopia por Transformada de Fourier no infravermelho (FTIR) e Microscopia de Força Atômica no laboratório de caracterização de Superfície e Filmes finos PEMM COPPE- UFRJ.

4.3.1 Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Quando um movimento vibracional ou rotacional ocorre em uma molécula que possui uma distribuição de elétrons não simétrica, isto é, possui átomos de elementos químicos distintos, tem-se uma variação do momento dipolo. Essa pequena variação de energia do momento dipolo coincide com a faixa de infravermelho na região espectral.

Oscilações, rotações ou uma combinação de modos vibracionais da molécula são absorvidas na região do infravermelho, provocando alterações de amplitude em alguns modos vibracionais.

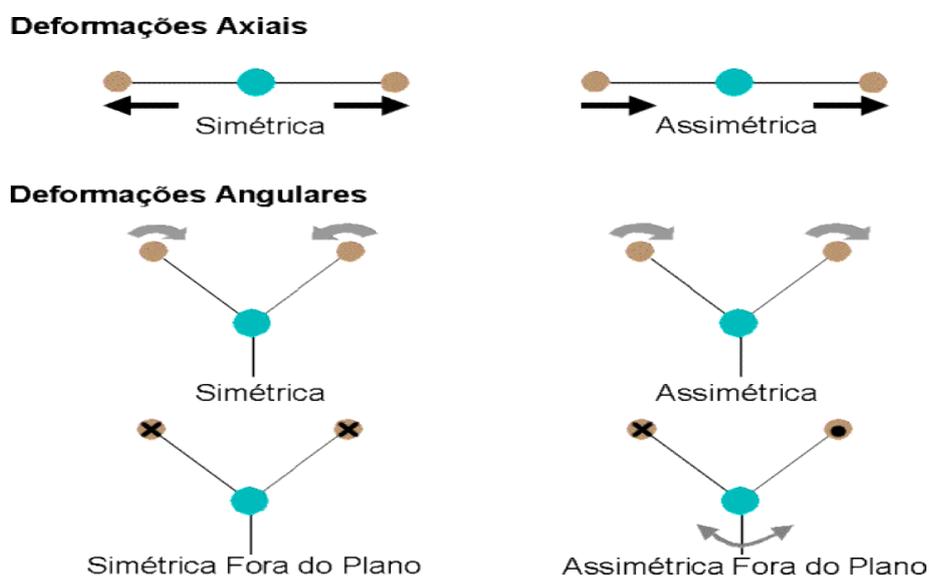


Figura 25. Modos de vibração molecular. Os sinais X e \bullet indicam movimentos para dentro e para fora do plano do desenho, respectivamente.

A técnica de FTIR se torna uma grande ferramenta porque ela determina os grupos funcionais presentes nas amostras após cada etapa de funcionalização da superfície, tais como: a cura do APTES, a fixação do GA e a imobilização do BSA.

O equipamento utilizado para a análise foi o espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier do modelo Nicolet 6700 do Laboratório de Superfícies, conforme a figura 26. As análises foram realizadas no modo ATR (Reflectância Total Atenuada) na região do infravermelho ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$), utilizando 256 scans com uma resolução de 4 cm^{-1} .

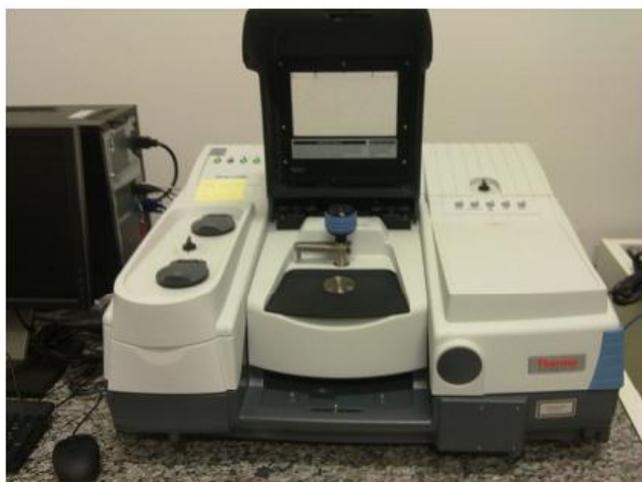


Figura 26: Espectro Fotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier

O método de ATR, também chamado de ATI (Reflectância Interna Total) permite que a amostra seja analisada diretamente no estado sólido, líquido ou gasoso sem nenhum tipo de preparação anterior.

O princípio desta espectroscopia se baseia na ocorrência de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de seleneto de zinco) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. Assim, a fração do feixe de luz incidente refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico a reflexão é completa.

No ponto de reflexão o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra, ou seja, a radiação de penetração na amostra cria um fenômeno chamado de onda evanescente. Logo, quando a amostra é colocada em contato direto

por meio de um bom cristal tal como diamante com alto índice de refração, a amostra absorve um certo comprimento de onda evanescente e ocorre uma atenuação do feixe a comprimentos de onda que são correspondentes as bandas de absorção no infravermelho, criando assim o espectro.

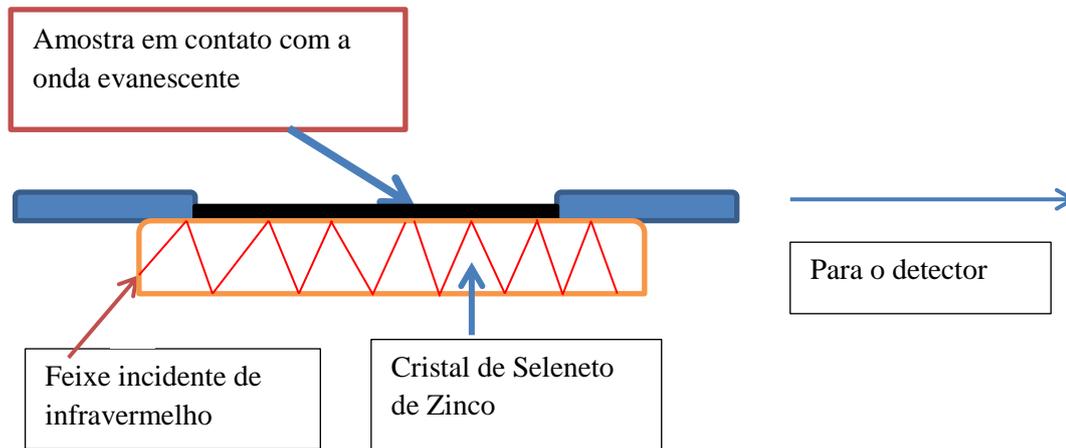


Figura 27: Diagrama ilustrando o método do ATR

4.3.2 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi realizada no modo contato em um microscópio JPK instruments Nanowizards IA com pontas de nitreto de silício com constante de mola 0,03N/m. As análises das superfícies funcionalizadas com (APTES / GA) foram feitas em ar e posteriormente em ambiente líquido após a imobilização da proteína (BSA).



Figura 28: Microscópio de força atômica (AFM).

4.3.3 Mapas de força

A microscopia de força atômica (JPK Instruments Nanowizards IA) no modo contato foi utilizada para obter informações a respeito das ligações na superfície funcionalizada em líquido, conforme a figura 29. Os mapas de força foram adquiridos numa região da amostra (20 x 20 μm) em uma rede de 16x16 (256 pontos). As imagens de mapas de força são representadas por diferentes quadrados de diversas cores que representam as propriedades físicas extraídas da curva. Estas propriedades podem ser forças de adesão ou inclinação.

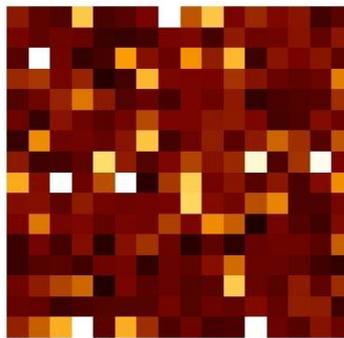


Figura 29: Forças de adesão.

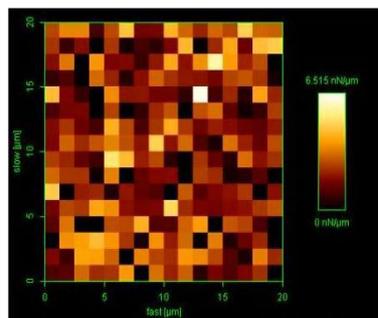


Figura 30: Constante de mola

4.3.4 Análises de curvas de força

Para a análise dos dados de curvas força foi usado Programa JPK DP 4.2 a partir do qual foi possível suavizar as curvas de força através de equações matemáticas tais como as gaussianas que identificavam os ruídos devido a altas frequências. Calculou-se a linha de base e o valor médio de uma região da curva antes de utilizar o modelo matemático WLC nos mapas de força adesiva. Consequentemente, realizaram-se correções para separar os valores mínimos das curvas de força com os valores relativos ao desdobramento do conjunto de monômeros que estão próximos das forças repulsivas. Cada intervalo selecionado pode ser ajustado separadamente conforme o resultado obtido pela figura 31 abaixo:

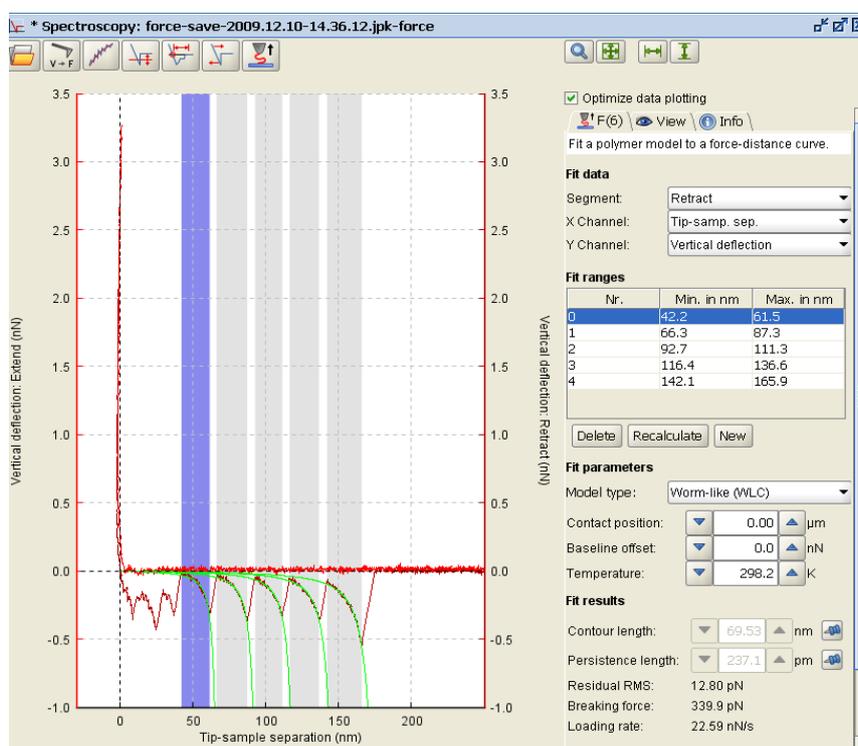


Figura 31: Ajuste da curva de força pelo programa JPK DP 4.2

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.1 Caracterização de amostras funcionalizadas com APTES por (FTIR)

Os resultados obtidos e listados na tabela são referentes às bandas características no FTIR do APTES na superfície do Si_3N_4 com os respectivos valores de concentração e tempo de reação.

Tabela 5.1 – Funcionalização - APTES

Figura A Si+ Si_3N_4	Figura B 20moL APTES 2H	Figura C 20moL- APTES 4H	Figura D 40mMol APTES 2H	Figura E 40mMol APTES 4H
Si-N 727 (cm^{-1})	Si-N 784 (cm^{-1})	Si-N 740 (cm^{-1})	Si-N 730 (cm^{-1})	Si-N 733(cm^{-1})
SiH (SiN_2) 2166(cm^{-1})	Si-O-C ₂ H ₅ 851(cm^{-1})	Si-O-C ₂ H ₅ 848(cm^{-1})	SiOC ₂ H ₅ 860(cm^{-1})	Si-O-C ₂ H ₅ 860(cm^{-1})
N-H est. 3341 (cm^{-1})	NH ₂ 1556(cm^{-1})	NH 21556(cm^{-1})	NH 1563(cm^{-1})	NH ₂ 1590(cm^{-1})
////////	SiH 2161(cm^{-1})	SiH (SiN_2) 2173(cm^{-1})	SiH (SiN_2) 2186(cm^{-1})	SiH (SiN_2) 2186(cm^{-1})
////////	NH est. 3341(cm^{-1})	N-H estir. 3354(cm^{-1})	N-H estir 3351(cm^{-1})	N-H estir 3329(cm^{-1})
////////	\\	\\	////////	////////

Os resultados obtidos na tabela 5.1, figura A (727 cm^{-1} , 2166 cm^{-1} e 3341 cm^{-1}), são referentes aos valores da deposição do Si_3N_4 na superfície do substrato de Si. Assim, quando comparamos os resultados encontrados com os da literatura mencionados abaixo, nota-se que:

Segundo FOUAD *et al*, (2012) as bandas próximas do valor de 727 cm^{-1} correspondem ao Si-N; 2010 cm^{-1} correspondem ao Si-H (SiN_2) ou Si-H; e a banda de 3360 cm^{-1} correspondem ao N-H de estiramento. Já segundo YOTA; *et al* 2011, as bandas de Si-N de estiramento estão entre 860 cm^{-1} , e as bandas de Si-H estão aproximadamente em 1160 cm^{-1} e N-H de estiramento em aproximadamente 3340 cm^{-1} . Deste modo, os valores obtidos através do FTIR, na figura A tabela 5.1 se aproximam

com os resultados experimentais encontrados por FOUAD *et al*, (2012), o que confirma experimentalmente a deposição do Si₃N₄ na superfície.

Todavia, os resultados experimentais alcançados no trabalho divergem com YOTA *et al*, (2011), quando se trata da banda de Si-N. Contudo, temos que os resultados obtidos do N-H de estiramento em ambos os trabalhos estão muito próximos, o que nos leva a pensar que a metodologia adotada no tratamento por YOTA *et al*,(2011) é diferente, uma vez que os trabalhos como o de BLECH *et al* (2009), retratam que há uma forte correlação entre as condições de deposição, a qualidade de passivação, constantes ópticas e estequiometria das camadas.

Por conseguinte, na figura B da tabela 5.1 temos os valores referentes ao APTES na superfície do Si₃N₄ que são:(784 cm, 851 cm, 1556cm, 2161 cm, 3341 cm)⁻¹, segundo KIM *et al*, (2009), a informação mais relevante sobre o filme de APTES é encontrado entre 1800 cm⁻¹ e 900cm⁻¹.

Deste modo, os valores referentes à 1556cm⁻¹ são do grupo amina que fica exposto pelo fato do APTES fazer ligação covalente com o óxido reativo da superfície do Si₃N₄. Apesar disso, pode haver igualmente outras bandas com valores entre 1460 cm⁻¹ a 1610 cm⁻¹ que são oriundos do grupo NH₂ presentes no filme de APTES. Todavia, estas bandas são dependentes da espessura do filme.

Além disso, segundo KIM *et al*, (2009) esses grupos comumente se associam aos silanóis presentes na superfície do silício e transferem os prótons da superfície ácida do silanol para os grupos básicos adjacentes, tais como o NH₂ do mesmo modo essa reação também pode formar SiO⁻, H e NH₂⁺.

As bandas próximas a 1195 cm⁻¹,1080cm⁻¹, e 960 cm⁻¹ na maioria das vezes são dos grupos etoxi (-OCH₂CH₃) que não foram hidrolisados pelo APTES. Esta observação denota que além de depender de fatores como a espessura para a adsorção e formação do NH₂, o APTES pode vir a ter dependência da quantidade de grupos etoxi no momento da hidrólise para formar ligação covalente.

Outro importante fator que estabelece a ligação covalente do APTES com a amostra são as bandas atribuídas a grupos siloxano (Si-O-Si) no substrato de silício que está em torno de 1045cm⁻¹.

Por conseguinte, o resultado da tabela 5.1, figura C possui o seguinte valor referente ao APTES 20mMoL-4H na superfície do Si₃N₄ que é de: (740 cm, 813 cm, 1089 cm-1,1610cm, 2171 cm, 3341 cm)⁻¹.

Na figura mencionada, existe uma banda no valor de 1089 cm^{-1} que geralmente é prevista quando os grupos etoxi ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) não são hidrolisados no APTES.

Logo, esta observação denota que além de depender de fatores como a espessura na adsorção e a formação do NH_2 , o APTES pode ter dependência na quantidade de grupos etoxi no momento da hidrólise para que se estabeleça a ligação covalente na superfície do Si_3N_4 .

Portanto, quando é confrontado o resultado obtido pela tabela 5.1 figura D com o resultado obtido pela tabela 5.1 figura B verificam-se que as bandas de NH_2 estão muito próximos mesmo quando há o aumento da concentração. Deste modo, é admissível mencionar que mesmo concentrações distintas quando são tratadas no mesmo tempo de reação estas tendem a ter a mesma influência no modo como o NH_2 do APTES vai estar orientado na superfície. Conjectura-se que a influência do NH_2 no APTES pode não estar somente associada às diferentes concentrações, mas sim na alteração do tempo de reação bem como no processo de cura e limpeza do APTES.

Na tabela 5.1 figura E, o resultado advém novamente do acréscimo da concentração do APTES, porém o tempo de reação é maior. Logo, quando se compara o valor obtido na tabela 5.1 figura E com o resultado adquirido na tabela 5.1 figura D é possível notar semelhanças nos resultados. A partir disso, o estudo de KIM *et al*; 2009, no que se refere ao acréscimo na concentração são relevantes para os resultados aqui mencionados, uma vez que as ligações do APTES são adsorvidas com os Silanois presentes sobre a superfície do Nitreto de Silício.

Assim, é possível analisar que o aumento na concentração com um tempo de reação maior pode vir a influenciar na densidade de ligação local, já que a ligação está relacionada com a eficiência da ligação covalente do grupo Si-O-Si com a superfície.

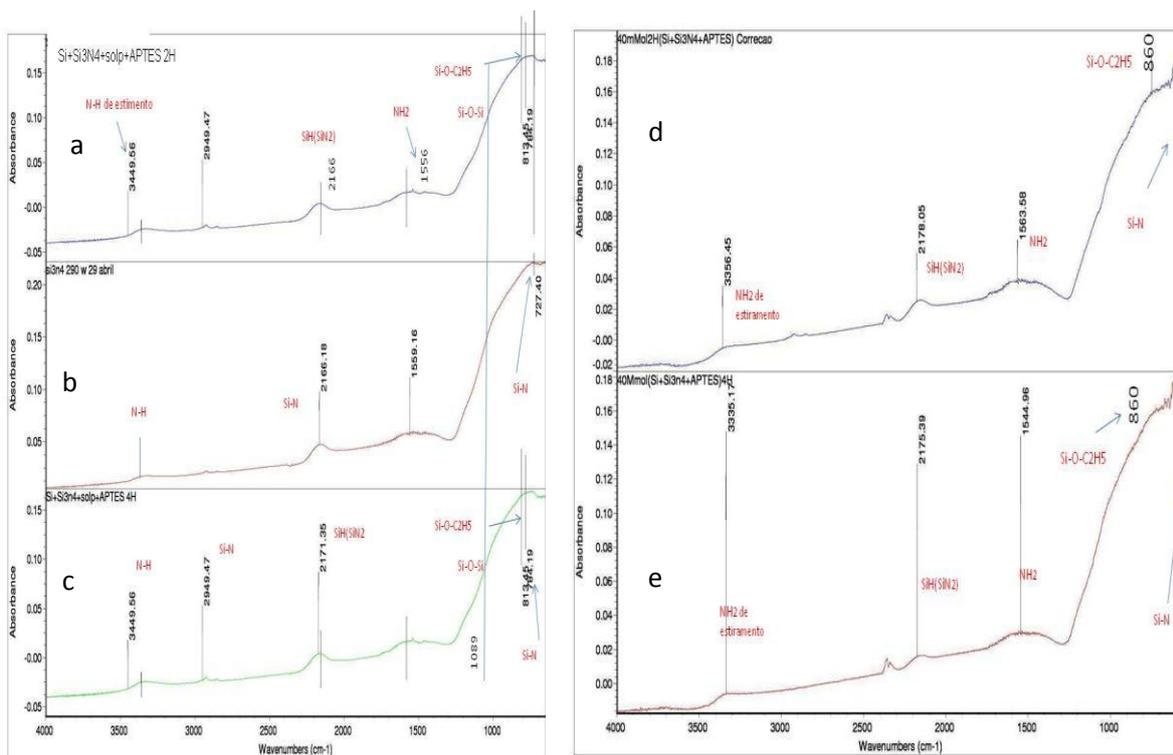


Figura 32: A) Substrato de Silício com deposição de Si_3N_4 na superfície e com solução piranha mais APTES 20mMol 2H B) substrato de silício com deposição de Si_3N_4 na superfície C) substrato de silício com deposição de Si_3N_4 na superfície com solução piranha e APTES 20mMol 4H. D) substrato de silício depositado com Si_3N_4 na superfície mais APTES 40mMol2H; E) substrato de silício depositado com Si_3N_4 na superfície e APTES 40mMol /4h.

A tabela abaixo possui a média e o desvio padrão da deposição no substrato de Silício em função dos diversos tratamentos com o intuito de observar o comportamento das bandas obtidas:

Tabela 5.2 – Média e desvio padrão - APTES

TRATAMENTOS	MÉDIA
Si_3N_4	$742,8 \text{ cm}^{-1} \pm 12,5$
$\text{Si-O-C}_2\text{H}_5$	$850,75 \text{ cm}^{-1} \pm 1,3$
NH_2	$1566,75 \text{ cm}^{-1} \pm 16,8$
SiH-SiN_2	$2174 \text{ cm}^{-1} \pm 11,4$
N-H de estiramento	$3343,2 \text{ cm}^{-1} \pm 7,44$

O resultado da tabela 5.2 exibe que a maior variação na média e desvio padrão é exatamente na banda de NH_2 que é próximo a 16,8%. Portanto, em consequência desse

resultado é plausível elucidar que os diferentes tratamentos influenciam na forma como o NH_2 vai estar norteado na superfície. Sabe-se que NH_2 do APTES pode mudar a dinâmica de vinculação no Glutaraldeído e modificar o ambiente aonde as biomoléculas vão se acoplar.

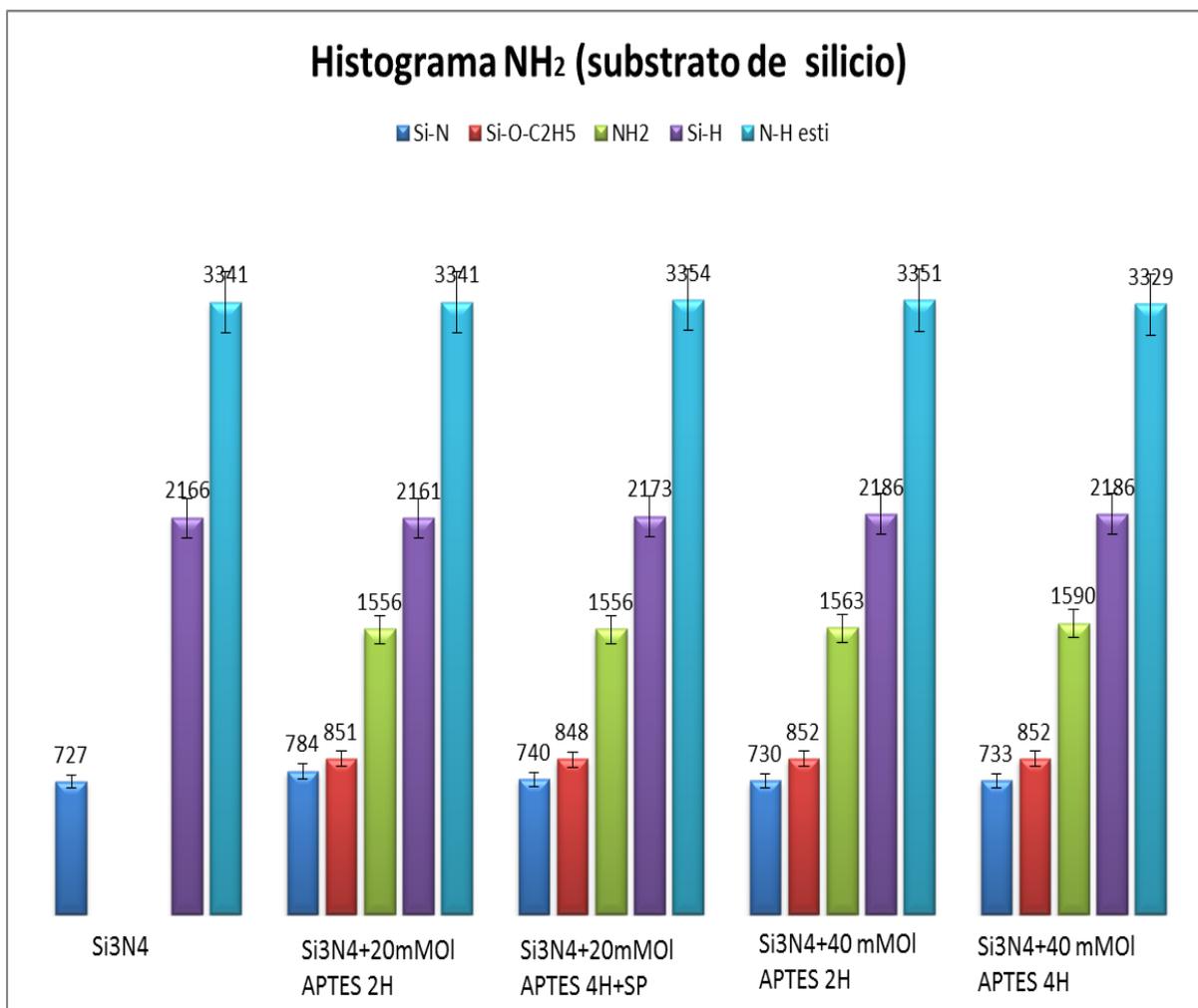


Figura 33: Histograma obtido pela tabela 4.3

5.1.2 Caracterização das amostras reticuladas com glutaraldeído por (FTIR)

O resultado da tabela 5.3 abaixo possui dois tempos de reação distintos para o glutaraldeído, contudo é possível observar que a mudança no tempo de reação não influenciou nos espectros obtidos para o (GA).

Tabela 5.3: Funcionalização - Glutaraldeído

Glutaraldeído 2,5%/2H	Glutaraldeído 2,5%/4H
Si-N 742 (cm ⁻¹)	Si-N 742 (cm ⁻¹)
Si-O-C2H5 892 (cm ⁻¹)	Si-O-C2H5 892 (cm ⁻¹)
Si-O-Si 1001 (cm ⁻¹)	Si-O-Si 1001 (cm ⁻¹)
O-CH3 1197 (cm ⁻¹)	O-CH3 1197 (cm ⁻¹)
C=O 1411 (cm ⁻¹)	C=O 1411 (cm ⁻¹)
NH ₂ 1541 (cm ⁻¹)	NH ₂ 1541 (cm ⁻¹)
NH ₂ 1597 (cm ⁻¹)	NH ₂ 1597 (cm ⁻¹)
SiH (N ₂ Si) 2153 (cm ⁻¹)	SiH (N ₂ Si) 2153 (cm ⁻¹)
CH ₃ 2928 cm ⁻¹	CH ₃ 2928 cm ⁻¹
N-H 3251 cm ⁻¹	N-H 3302 cm ⁻¹

Este resultado pode ser compreendido, uma vez que estudos como os de *TRIMUKHE et al* (2009) mostram que quando ocorre a reação de ligação cruzada dos grupos aldeídos do glutaraldeído estes reagem rapidamente com o grupo hidroxila do polímero através de uma solução ácida que em seguida forma pontes acetal.

Deste modo, segundo HUY *et al*, (2011) as bandas que são geralmente obtidas são picos próximos a 1550cm^{-1} que são característicos de ligações de C-N de estiramento e N-H de deformação angular. O pico do modo de vibração C=O também pode ser encontrado em valores próximos a 1720 cm^{-1} e a banda de NH_2 pode ser encontrada em valores próximos a 1590 cm^{-1} .

Por meio dos resultados obtidos é possível dizer que o glutaraldeído está ligado ao APTES visto que os valores se aproximam das citações mencionadas. Porém, é importante ressaltar que existem regiões do APTES que não reagiram com o Glutaraldeído, visto que é possível observar através da tabela 5.3 bandas de NH_2 com valores próximos a 1597cm^{-1} .

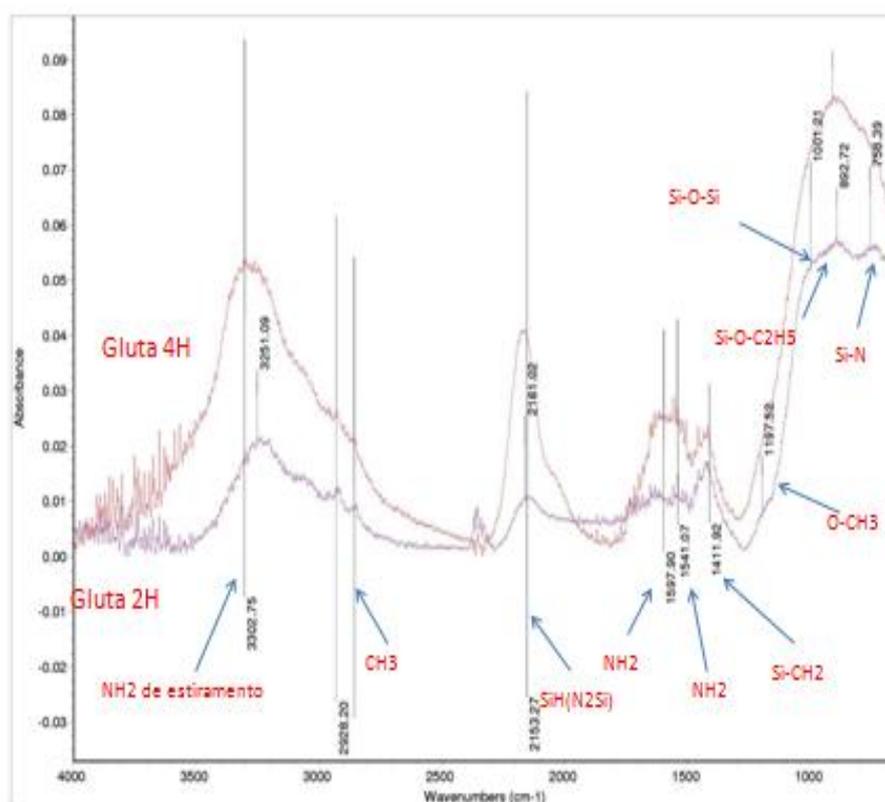


Figura 34: A) substrato de silício com deposição de Si_3N_4 na superfície e APTES 20mMol 4H mais glutaraldeído Glutaraldeído 2,5% por 4H B) substrato de silício depositado com Si_3N_4 na superfície e APTES 20 mMol 4H mais Glutaraldeído 2,5% por 2H.

5.1.3 Caracterização das amostras da albumina do soro bovino por (FTIR)

O resultado obtido pela tabela 5.4 possui diferentes concentrações do BSA no ligante cruzado (G.A 2,5%), porém o tempo de reação é o mesmo. Assim sendo, segundo *ZHANG et al*,(2014) é comum encontrar a amida primária nas regiões entre 1600-1700 cm^{-1} . Porém é importante saber que diferentes proteínas possuem diferentes absorções geralmente nas estruturas secundárias. Outro fator importante sobre a estrutura do BSA segundo *KONG et al*, (2007) é que a banda da amida III está localizada nos intervalos entre 1400-1200 cm^{-1} , que geralmente está compassiva às alterações da estrutura secundária.

Tabela 5.4- Funcionalização BSA 20 μMol e 100 μMol

Ga 2,5%4h+proteína 100μMol	Ga 2,5%4h+proteína 20μMol
Si-N 757 cm^{-1}	Si-N 757 cm^{-1}
Si-O-C2H5 879 cm^{-1}	Si-O-C2H5 887 cm^{-1}
Si-O-H 959 cm^{-1}	Si-O-H 975 cm^{-1}
Amida III 1172 cm^{-1}	Amida III 1179 cm^{-1}
Amida II 1422 cm^{-1}	Amida II 1587 cm^{-1}
Amida I 1635-1731 cm^{-1}	COO- 1411 cm^{-1}
SiH(N2Si) 2162 cm^{-1}	Amida I 1731 cm^{-1}
CH3 2920 cm^{-1}	SiH(N2Si) 2166 cm^{-1}
N-H 3247 cm^{-1}	CH3 2917 cm^{-1}
	N-H 3247 cm^{-1}

Portanto, ao analisar o resultado obtido para estrutura primária as bandas encontradas estão dentro do intervalo mencionado. Nota-se que para a estrutura primária a alteração na concentração não influencia no resultado obtido.

Para estrutura II o valor obtido é próximo aos valores definidos por WANG *et al.*,(2011), segundo ele a banda da amida II está em uma região entre 1500-1600 cm^{-1} . Logo o resultado de 1587 cm^{-1} pode ser justificado para a concentração de 100 μMol visto que o valor da banda está próximo desse intervalo. Porém, ao analisar o resultado para 20 μMol , percebe-se que este está fora da citação mencionada e muito mais próximo daquela adotada por ZHANG *et al.*,(2014) para o valor referente a estrutura III da amida.

Já quando é analisado o valor obtido da estrutura III este possui um valor próximo ao mencionado acima, no entanto o valor obtido é justificado, visto que já foram mencionado que a estrutura III é sensível as alterações da estrutura secundária.

Deste modo, é importante ressaltar também que para variar os resultados obtidos na amida II e III também pode se dar devido às diferenças nos valores de pH e método de funcionalização da superfície adotado. Outro fator importante é que os trabalhos citados obtiveram o espectro do BSA em água pura, o que é considerado como um espectro de condição nativa para o BSA que consiste em pelo menos 50% de estruturas em α hélice.

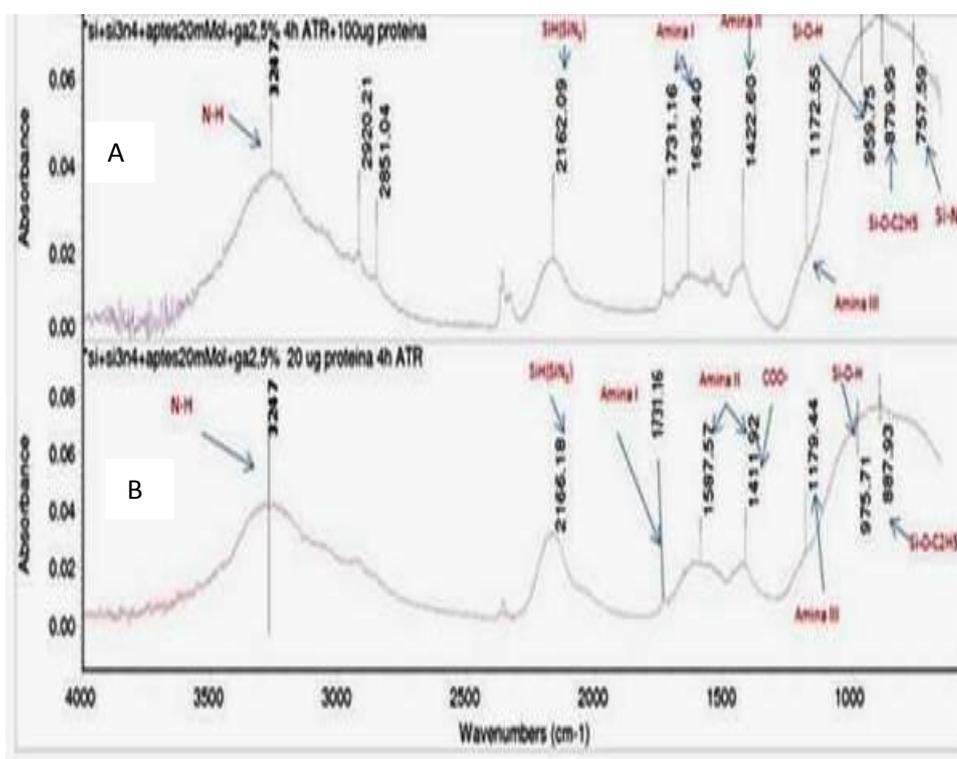


Figura 35: A) substrato de silício com deposição de Si_3N_4 na superfície e APTES 20mMol 4H mais Glutaraldeo 2,5% + 100 μg de proteína B) substrato de silício depositado com Si_3N_4 na superfície e APTES 20 mMol 4H mais Glutaraldeo 2,5%+ 20 μg de proteína.

5.2 CURVA DE FORÇA X DISTÂNCIA DA (BSA) EM DIFERENTES pHs MÉTODO WLC

Quando o BSA é imobilizado covalentemente na superfície ou na ponta do AFM é possível perceber que a curva de força/distância apresenta múltiplas forças de interação que são de complexa interpretação em razão do conjunto de monômeros que são formados.

Segundo SIEDLECKI *et al*, (2007) esta força de interação complexa entre a ponta e a biomolécula tem característica de curva de força dente de serra. Esta se manifesta geralmente quando uma macromolécula, neste caso a proteína é estendida e tem que modificar sua conformação de equilíbrio com o meio. Este padrão é claramente observado na figura 36.

Portanto, a metodologia de análise experimental que foi empregada é o método WLC. Este descreve estatisticamente o provável comportamento mecânico dos diferentes domínios de um conjunto de monômeros em função dos desdobramentos que estas sofrem quando se aplica uma força.

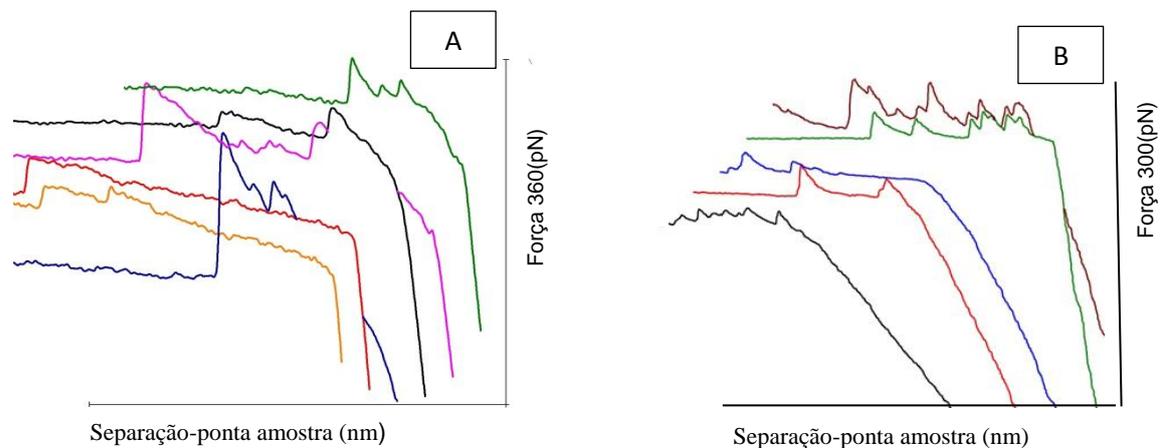


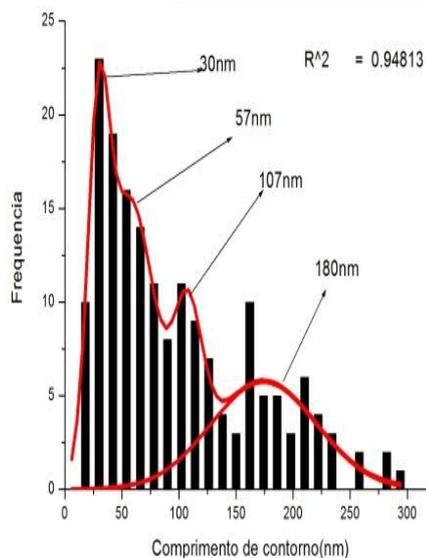
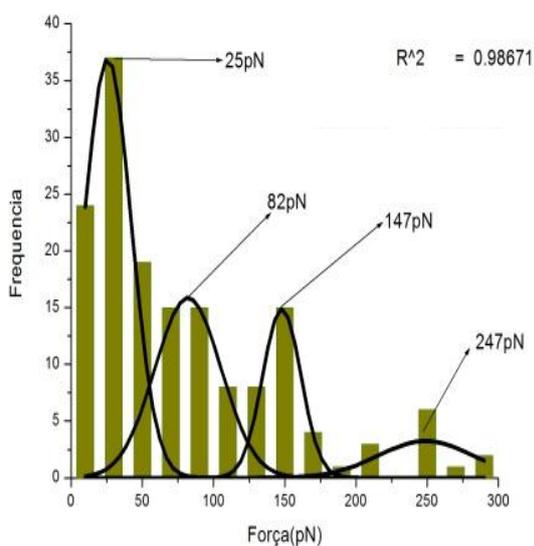
Figura 36 :A) Curva de força x distância pH 6 -BSA ligado covalentemente na superfície com 20 μ g de proteína B) Curva de força x distancia em diferente localização da amostra.

A figura 36 representa as interações do valor médio da força de ruptura desse conjunto de monômeros, ou seja, a força entrópica de recuo que o BSA possui quando este tem um pH 6,0. Além disso, este resultado também demonstra como as deflexões se alternam em diferentes pontos da amostra em função das variações da força entrópica de recuo.

A partir disso é possível delinear as tentativas de retorno gradual da conformação média do BSA e perceber as alterações do equilíbrio termodinâmico até que aconteça o rompimento da proteína com a ponta. Todavia, a forma com que é contrabalanceada a conformação da proteína com a força entrópica de recuo depende de forças importantes que orientam as interações da proteína. Essas interações podem ser hidrofóbicas e iônicas que combinadas com o ganho de entropia determinam as mudanças na conformação durante a adsorção.

Deste modo, ao analisar o histograma da (figura 37 A) podemos obter valores médios correspondentes a (25pN,82pN,147pN, 201pN e 247pN). Portanto, este resultado da força entrópica denota que a proteína está covalentemente imobilizada, porém a forma com que ela se encontra pode ser distinta devido às reações de polimerização e o agente de ligação cruzado, os quais podem se orientar e crescer nos diversos defeitos da superfície do Si₃N₄.

5.2.1 pH 6.0 20 μMol álcool 95%.



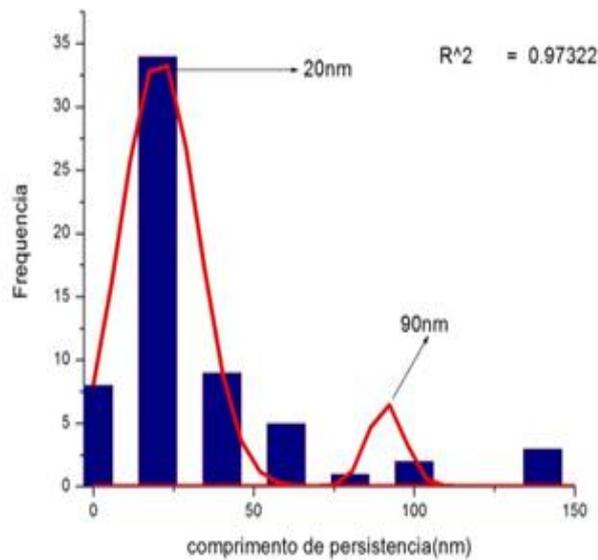


Figura 37: A) Força de ruptura (pN) pH 6 20 μ g amostras preparadas em álcool PA 95% no substrato de sílcio depositado com Si₃N₄ na superfície e APTES 20 mMol 4H mais Glutaraldeido2,5%+20 μ g de proteína em diferentes localização da amostra. B) Separação-ponta amostra(nm) pH 6 20 μ g preparadas em álcool PA 95% depositado com Si₃N₄ na superfície e APTES 20 mMol 4H mais Glutaraldeido2,5% + 20 μ g de proteína.: pH6 comprimento de persistência (nm)

Tabela 5.5: Valores de adesão do BSA em distintos tratamentos com APTES.

F(pN)	Referência	F(pN)	Referência
122 \pm 25	Sagvolden <i>et al</i> (1999)	260	Moye <i>et al.</i> (1994 ^a)
232 \pm 24	Sagvolden <i>et al</i> (1999)	340	Lee <i>et al.</i> (1994b)
321 \pm 2	Sagvolden <i>et al</i> (1999)	110	Dammer <i>et al.</i> (1996)
160	Moye <i>et al.</i> (1994 ^a)	250	Hinterdorfer <i>et al.</i> (1996)

A tabela 5.5 lista valores das forças de adesão encontrados nas literaturas, para comparação com as forças de adesão encontradas nas figuras (37 A e B).

SAGVOLDEN,*et al.*(1999) funcionalizaram a superfície utilizando substratos de vidro e empregaram como método o γ (aminopropil) trietoxissilano para sinalização com o tempo médio de reação de 2h. Nesta reação eles usaram o Glutaraldeido 2,5%, com o tempo médio de 2h, em seguida utilizou o BSA na superfície.

Porém, é importante ressaltar que o resultado encontrado por SAGVOLDEN,*et al.*(1999),na tabela 5.5 acima, estuda somente os eventos de adesão individual e não em um conjunto de monômetros.

ZLATANOVA *et al*, (2000) estudam distintos grupos de AFM com o intuito de encontrar valores de adesão no BSA e também em outras proteínas. O objetivo do seu trabalho era mostrar que o AFM pode ser capaz de revelar através das curvas de força a relação entre as forças inter e intra moleculares em biomolécula e como estas afetam o sistema biológico em macromoléculas.

No pH 6,0 encontramos probabilidade (12,5%) para valores menores que 147pN e valores ≤ 147 pN são próximos a (62,5 %) que são relativos a eventos de adesão individual. Logo, a força obtida de 147pN é similar a encontrada por SAGVOLDEN, *et al*,(1999), MOYE *et al*, (1994) e DAMMER *et al*, (1996). A maior parte dos eventos ocorre com forças menores que podem ser relacionadas com a adesão específica de domínios individuais nesta região do filme ou pode ocorrer também que o comprimento de persistência deva ser maior em algumas regiões. E assim consequentemente, é possível que no momento em que a ponta toca no BSA este resista mais ao puxá-la, o que em tese cria maior dificuldade para os desdobramentos e estiramentos, fazendo que o valor da força entrópica de recuo diminua.

Em contrapartida, ao analisar o valor de 247pN a probabilidade de ocorrência de valores maiores que 247pN é próximo de 10% e ≤ 247 é (30,5%). Assim sendo, este valor pode denotar duas hipóteses: a primeira é a existência de um comprimento de contorno bem próximo à força entrópica direcional aplicada, fazendo com que exista uma tendência na força direcional do BSA quando a ponta do AFM se retrai. Esse valor de 247pN se justifica porque segundo LENNE *et al*,(2000) as longas forças são devido a longos afastamentos.

A segunda hipótese é que comprimento de persistência deve ser menor em alguma região da amostra, visto que os valores entre $147\text{pN} \leq p(F(x) \leq 247\text{ pN})$ estão entorno de 49%. Isso é compreensível porque conforme BOZEC *et al*,(2005) os monômeros nos substratos geralmente se ligam por fisissorção a ponta, e por isso não é possível saber onde ocorrem os locais de afastamentos quando a ponta interage ou se liga a molécula no substrato.

Não obstante, segundo CHTCHEGLOVAET *et al*, (2004) as múltiplas forças de interação podem ser classificadas em: rompimento de ligação simples ou seja forças de desvinculação(130pN), rompimento de ligação dupla (295 pN) e forças não específicas. Assim sendo, ao analisar a referência é possível verificar que o valor obtido para rompimento de ligação simples é próximo do valor citado. Este resultado sugere que ao funcionalizar a superfície estes tipos de rompimentos ocorra.

Outro fator relevante sobre o conceito de ligação simples diz que na existência ou na presença de uma banda de barreira de energia idêntica de força sobre o conjunto de monômeros, estes cooperam integralmente para respectivamente se desassociar. Portanto, quando tais elementos ocorrem a ligação irá agir como ruptura de ligação simples que é dada pela soma das forças de rompimentos individuais. No entanto, na maior parte das situações é pouco provável a combinação desses eventos, já que é difícil as ligações romperem no momento exato ou em posições idênticas no interior de um dado conjunto de energia. É importante ressaltar que múltiplos estiramentos também podem ocorrer, porém em menor proporção, visto que a probabilidade entre $147\text{pN} \leq p(F(x) \leq 82\text{ pN})$ está em torno de 34,7%.

Este resultado de múltiplos estiramentos ocorre por causa dos vários alongamentos (“desnaturação mecânica”) e também das alterações no pH. Outro fator relevante é que o BSA é uma proteína globular “enrijecida” que contém 17 ligações de dissulfeto que têm diferentes formas de conformação (N, F, B, A, e E), caracterizado por distintos conteúdos nas folhas B, alfa hélice e outras estruturas (CARTER E HO, 1994).

Com este valor de probabilidade de 34,7% talvez seja possível descrever a possível preferência de conformação, visto que na pesquisa de PEREIRA *et al*, (2003) a forma expandida da BSA está próximo a (35% de alfa hélice na conformação E) que corresponde a máxima extensão de ligação permitida na estruturas de dissulfeto.

Quando se analisa a figura 37 B, é possível ver regiões de parcelas de frequências que são maiores e não são ajustadas nas gaussianas pelos comprimentos de contornos. Isso se deve ao fato de que vários monômeros se uniram uns com os outros e o conjunto foi sendo esticados mais em regiões preferencias ao longo das medidas realizadas com a ponta do AFM. (BOZEC *et al*,2005).

Assim sendo, com esse resultado é provável que o comportamento elástico do monômero dá todo o seu comprimento de contorno, o qual é resultante da extensão sofrida da molécula do monômero (LENNE *et al*, 2000; BOZEC *et al*, 2005).

Deste modo, os comprimentos de contorno efetivos foram analisados também por distribuição normal, conforme a (figura 37 A) devido aos distintos estiramentos.

Tabela 5.6 Valores do comprimento de contorno (CC)- Figura 37 b

Comprimento de Contorno-CC.(nm)	CC (nm) < (%)	CC (nm) \leq (%)
30	1	52
57	4	30
107	0,4	15
180	0,5	5

Logo, a partir dos valores encontrados, mensura-se que realmente existam estiramentos curtos devido às múltiplas moléculas que se prendem a ponta na hora que ela se afasta visto que este fenômeno predominante está em torno de 52%.

Quando se adquire os valores do comprimento de contorno, é razoável compará-los com os valores da força entrópica, uma vez que *LENNE et al* (2000), sugerem que longas forças se devem a longos estiramentos e, portanto é importante correlacioná-los. Deste modo, como a probabilidade no valor da força entrópica ficou em 247pN e está próximo à (30,5%), é provável que existam longos estiramentos mencionados por *LENNE et al*,(2000), porém quando se analisa o comprimento de contorno o resultado obtido é o oposto visto que o maior valor encontrado é justamente para o menor valor no CC 52%.

Assim sendo, ao correlacionar os valores médios da (figura 37 A) com os valores encontrados nas literaturas mencionadas, percebem-se que os resultados encontrados não se diferem muito quando se correlacionam as forças encontradas. Porém, é importante ressaltar que as medidas alcançadas nos trabalhos citados são diferentes porque os objetivos destas pesquisas são de analisar a adesão ou os domínios individuais em comum em um único evento de força aplicada.

Deste modo, o resultado na (figura 37 A) é análogo somente ao valor médio da força individual, entretanto sua interpretação é diferente porque o procedimento de análise adotado foi o de mapeamento de força.

Esta metodologia oferece no mínimo 64 curvas de força em uma única região da amostra. Deste modo, para a aquisição da curva de força para a BSA foram analisados 20 pontos nas diferentes regiões da amostra, totalizando em no mínimo 4000 mil curvas de força.

Logo, a existência de dois valores médios proeminentes da BSA possui coerência, uma vez que a força entrópica direcional advém do momento em que a ponta

do AFM toca a superfície e trás consigo um conjunto de biomoléculas acopladas que tendem a resistir a esta força.

Desta forma, a força entrópica direcional no BSA é altamente influenciada pelas modificações no comprimento de persistência. O comprimento de persistência mostra informações relevantes sobre a tendência da força entrópica de ruptura assim que a biomolécula é ligada covalentemente ao filme.

Para compreensão dos múltiplos estiramentos na força de ruptura a alternativa adotada foi metodologia da distribuição normal. A distribuição normal pode demonstrar por meio da análise estatística como os estiramentos estão próximos ou longe da conformação de Equilíbrio.

O resultado da figura 37 C, acima é obtido com intuito de avaliar se a funcionalização do BSA altera consideravelmente o comprimento de persistência - (CP) fazendo com que as moléculas se tornem mais rígidas ou flexíveis à medida que são alteradas as condições físico-químicas. Portanto, a provável tendência da molécula de BSA no pH 6,0 é de uma molécula mais flexível porque em presença de água desfavorece as ligações de hidrogênio dos conjuntos de monômeros na estrutura secundária do BSA. Assim a média obtida é de 55nm com probabilidade 15% para valores ≤ 20 nm e 54% para valores ≤ 90 nm.

5.2.2 pH 7.4 20 μ Mol álcool 95%.

Conforme observamos na figura 38 abaixo há um decréscimo considerável na força entrópica de recuo que pode ser devido ao aumento do comprimento de persistência ou da mudança de polaridade da BSA, a qual faz a interface (biomolécula / composto orgânico) mudar toda a interface termodinâmica de tal maneira que quando a ponta começa tocar na superfície do BSA ela pode se ligar a poucas moléculas ou até mesmo a grandes aglomerados, ocasionando a queda da força entrópica de recuo.

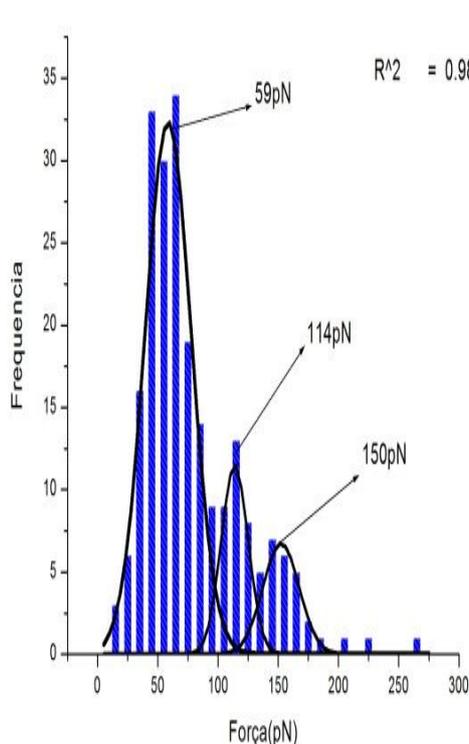


Figura 38 a: Histograma força (pN)

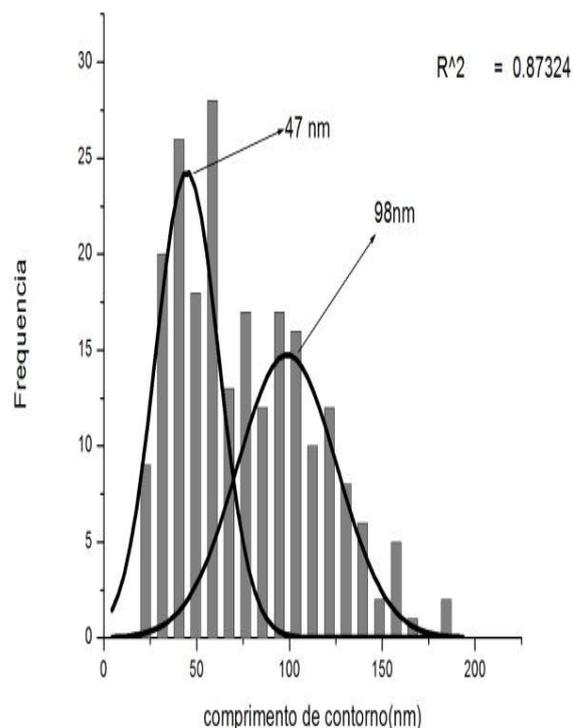


Figura 38 b: Histograma comprimento de contorno(nm)

Isto é possível, pelo fato de proteínas com mais de 100 resíduos ou moléculas grandes procurar a estabilidade no dobramento, geralmente em módulos tal como sugere trabalhos como os de DOBSON *et al*, (2003); DINNER *et al*, (2000).

Em outras palavras, o dobramento de proteínas é em grande parte concretizada de forma independente com subdivisão de diferentes segmentos de modo que as ligações que envolvem Interações específicas fazem com que a forma no dobramento se assemelhe as regiões de domínios locais.

Assim ao analisar o resultado da figura 37 a temos que: para valores menores que 150pN a probabilidade é próxima a 59%. Para valores ≤ 150 pN está em torno de 35, % e maior que 150 pN e próximo de 6% .

Com este resultado é possível afirmar que existem diferentes interações devido à mudança no pH. Como consequência o número de ligações entre a ponta e o substrato não garantem que as medidas consistam em maior probabilidade de interação porque a BSA exibe mudança de conformação e carga.

A figura 38 b, apresenta um comprimento de contorno máximo-(CC) próximo a 98nm, o que se caracteriza em um desdobramento “prematureo”. Este CC pode ocorrer porque há a desestabilização da superfície devido as forças de longo alcance, resultando no desdobramento parcial no BSA. Outra hipótese importante já mencionada é que na presença de água diminui a interação do conjunto de monômeros. Como a força entrópica é baixa o provável valor de CC também será baixo.

Uma terceira possibilidade seria que as proteínas podem desnaturar parcialmente sobre a superfície, fazendo com que esta perca a sua propriedade. Ao analisar a probabilidade no CC obtido temos que para valores maiores que 98nm a probabilidade é próximo a 36% para valores ≤ 98 nm é próximo 44% e menor que 98nm está próximo a 20%. Esse resultado mostra que o valor médio encontrado de 98nm é baixo, o que caracteriza incerteza na preferência de interação da BSA quando se altera o pH para 7,4 na superfície funcionalizada.

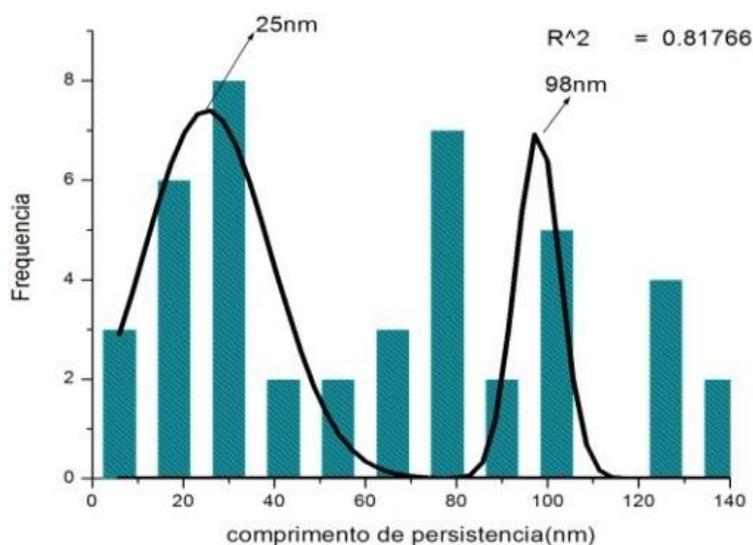


Figura 38c: pH 7.4 Comprimento de persistência (pm)

O comprimento de persistência do pH 7,4, figura 37c possui um resultado importante porque o comprimento de contorno possui uma alta frequência tanto para valores grandes e pequenos. Este resultado demonstra que o comprimento de persistência pode ser um dos principais vínculos responsáveis para que a força entrópica de recuo diminua, visto que a média total do comprimento de persistência é próximo a 61nm e do CC é próximo a 72,5nm. Outro fato relevante é que o valor do CP obtido na figura 38c está em presença de água e em um pH mais neutro. E isto muda a polaridade do conjunto de monômeros com o meio e podem ocorrer mais eventos repulsivos entre a ponta e o conjunto de monômeros.

5.2.3 pH 6.0 20μMol álcool absoluto.

O resultado da figura 39 a, caracteriza um provável evento de força de desvinculação, visto que o valor médio de 90pN pode não ser considerado uma força de ruptura de ligação simples porque a força aplicada na BSA pode não ser suficiente para desdobrar domínios importantes da estrutura, visto que nestas condições o CP pode ser maior que CC . Outra hipótese provável é que a ausência de água em certas regiões tornam as moléculas mais rígidas, levando o conjunto de monômeros a se ligar mais entre si antes da ponta do AFM começar a se aproximar da superfície ou se afastar na curva de força.

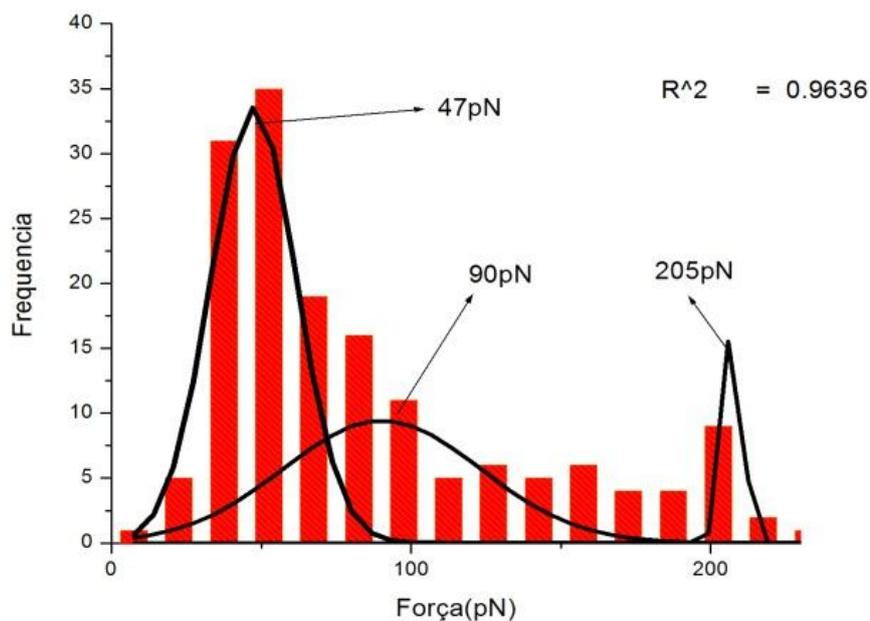
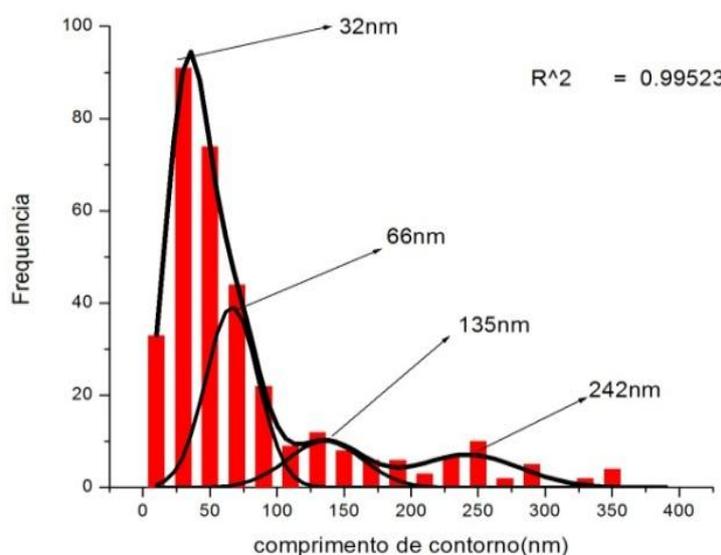


Figura 39a: pH 6 Força ruptura

Segundo os trabalhos como de *RATTO, et al* 2006, a curvatura da ponta na superfície ou outro agente físico pode impedir e limitar as ligações químicas entre as moléculas bem como a formação de vínculos específicos na superfície. Além disso, outro resultado relevante é que o valor referente a 205pN explica a força de rompimento de dupla ligação.

Ao analisar a probabilidade das forças entrópicas de recuo temos que para valores menores que 90pN a probabilidade é próxima a 12% ,para valores ≤ 90 pN está próximo a 41,1% , maior que 90pN a probabilidade é de 47 %. Este resultado demonstra que a interação das distribuições da força de ruptura para o rompimento de ligação simples assume dois eventos de transições: um desdobramento curto caracterizado por pequenas forças que são consecutivas na maioria dos casos e; outro resultado caracterizado por forças muito maiores que produzem uma média sequencial de desdobramentos na BSA. Deste modo ao analisar a probabilidade de múltiplas forças por meio da figura temos que para valores < 205 pN a probabilidade é próxima a 38,78%, para valores ≤ 205 pN - 51,1% e, valores maiores que 205pN 10,5%. Portanto, com o resultado obtido se verifica que existe uma média sequencial de múltiplos desdobramentos devido as múltiplas forças de interação que se alternam entre grandes, médias e pequenas forças de rupturas. Porém, com maior probabilidade de evento para forças menores em $90\text{pN} \leq p(F(x)) \leq 223\text{pN}$ é de 29,82%.



Assim sendo, quando é correlacionada a probabilidade de comprimento de contornos da figura 39b com as forças obtidas temos a tabela 5.7

Tabela 5.7 –Probabilidade comprimento contorno(CC)

Comprimento de Contorno-CC.(nm)	CC (nm) < (%)	CC (nm) ≤ (%)
32	5	58
66	2	10
135	8	20
242	11	18

A probabilidade da tabela 5.7 demonstra que o comprimento de contorno passa por longas forças e em seguida elas são amortecidas em alguma região da amostra, levando a redução da força entrópica de recuo . Em seguida a força aumenta e estira a molécula, porque a probabilidade para valores menores 242nm é próximo a 11%, para valores ≤ 242 nm a probabilidade é de 18%, e valores entre $66\text{nm} \leq p(x) \leq 242\text{nm}$ está entorno de 52,2%.

O resultado obtido é coerente, uma vez que *PELASEYED et al*, (2014) demonstram que após os domínios da proteína se desenrolar a força aplicada no conjunto de monômeros se aproxima da linha de base e “relaxa”. E pouco antes do próximo domínio da proteína ser esticado a força aumenta novamente se caracterizando por diferentes domínios individuais.

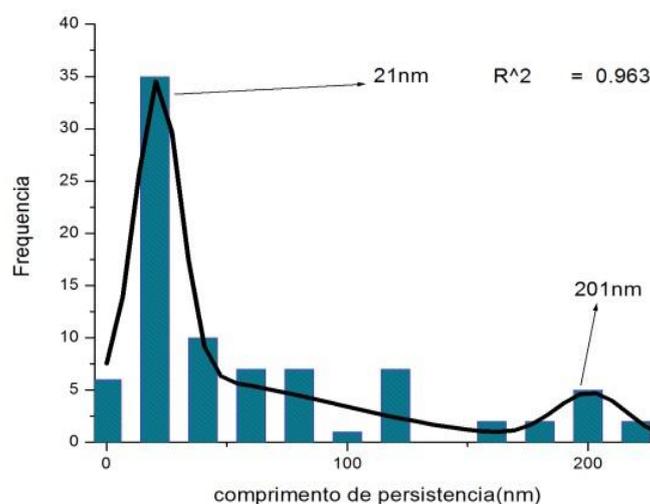


Figura 39 c: pH .6 comprimento de persistência (nm)

Na figura 39 c acima é possível notar um aumento expressivo no comprimento de persistência, já que a média obtida é de 113nm.

Esse resultado ocorreu somente após a mudança de tratamento para álcool absoluto, o que favorece a rigidez da molécula de BSA porque o meio desidratado possibilita que as ligações de hidrogênio do conjunto de monômeros permaneçam mais ligados uns aos outros. Portanto, o CP varia entre 21 a 201nm com maior probabilidade para valores próximos a 201nm, sendo este de 71%.

Tal resultado comprova que algumas regiões do BSA estão mais rígidas porque a força entrópica de recuo reduziu no momento em que a ponta tocou a superfície. Desse modo, não é possível ter o acesso imediato a alguns domínios da proteína, justificando o amortecimento drástico da força e a frequência alta em pequenos valores do comprimento de contorno.

5.2.4 pH 7.4 20μMol álcool Absoluto

Ao analisar o resultado das figuras abaixo temos que a probabilidade de encontrar valores menores que 57pN está entorno de 0,5% , ≤ 57 pN está próximo a 26% e maior que 74pN está em torno de 60% . Este resultado demonstra que deve existir pouca resistência no momento quando a ponta puxa a molécula, tornando o comprimento de contorno alto e o comprimento de persistência baixo.

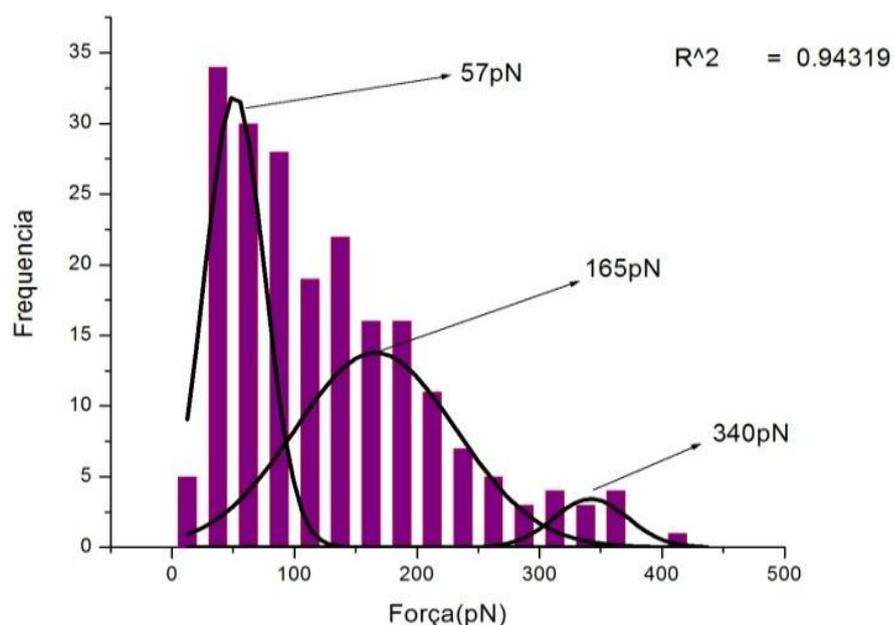


Figura 40 a: pH 7.4 Força-pN

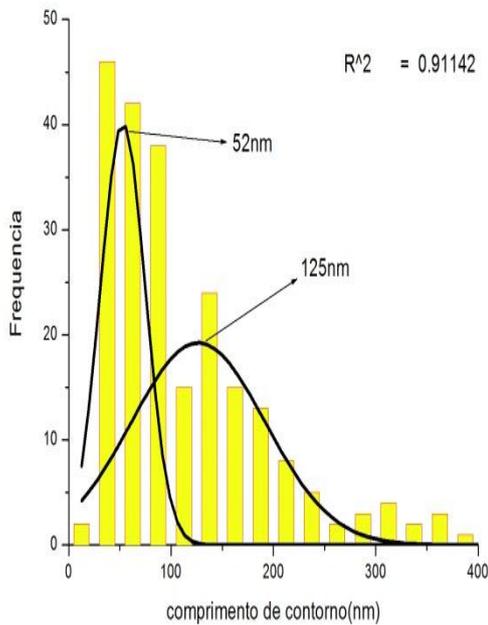


Figura 40 b: pH 7.4 Comprimento de contorno (nm)

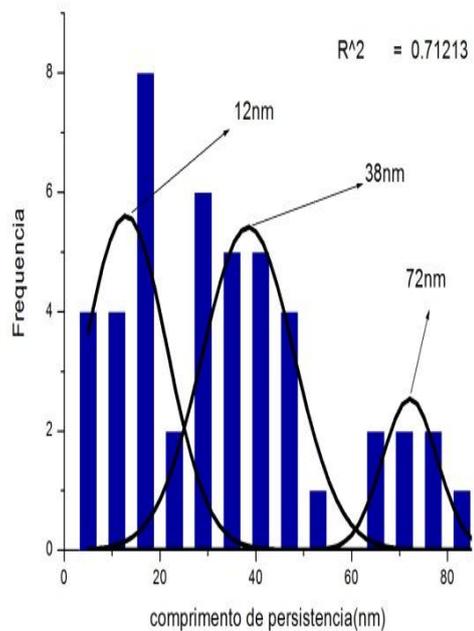


Figura 40 c : pH 7.4 Comprimento de persistência (nm)

Ao realizar as medidas das forças intramoleculares entre a ponta de nitreto de Silício e uma molécula “imobilizada” em uma superfície plana, podem-se acessar informações sobre a estabilidade da molécula na superfície.

Deste modo, sabendo que existem vínculos entre a ponta e a molécula na superfície, verifica-se que no pH 7,4 a probabilidade de encontrar valores menores que 340pN é próximo a 68%, enquanto valores ≤ 340 pN a probabilidade é próxima a 30%. E os valores maiores que 340pN estão próximos a 2% , assim sendo este resultado mostra que as forças de ruptura se dão preferencialmente nos domínios intramoleculares.

As figuras 40 b e c apresentam os comprimentos de contorno e persistência e suas relações com as forças citadas anteriormente. Assim sendo, quando é analisado o resultado obtido para o CC o valor é baixo, apesar de existir uma força entrópica alta perto do comprimento máximo de contorno da molécula de BSA. Logo, é provável que a estabilidade desses aglomerados, ou seja, conjuntos de monômeros da proteína dependam das ligações químicas estabelecidas no momento em que são alteradas as condições das reações físico - químicas na superfície.

Ao analisar a mudança no CP o tratamento tornou a molécula mais rígida, contudo a rigidez alcançada não é suficiente para fazer com que existam grandes amortecimentos na força. Assim, essa pequena recuperação dos domínios quando são desenrolados, não é o suficiente para interromper o início da quebra de ligação entre a ponta e as moléculas quando estas estão próximas ao valor limite da força.

5.2.5 pH 4.0 20µMol álcool Absoluto

O resultado obtido na figura abaixo no pH 4,0 mostra sequenciais eventos de força com probabilidade de 21% para valores ≤ 24 pN, 45% para 129pN e 79% para valores ≤ 234 pN. Esse resultado pode caracterizar que existem forças em moléculas individuais, duplas ou inespecíficas.

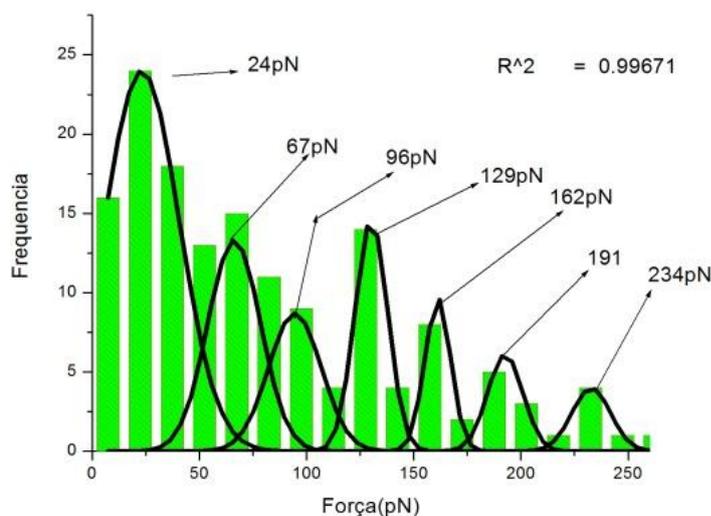


Figura 41 a: pH 4,0 Força(pN)

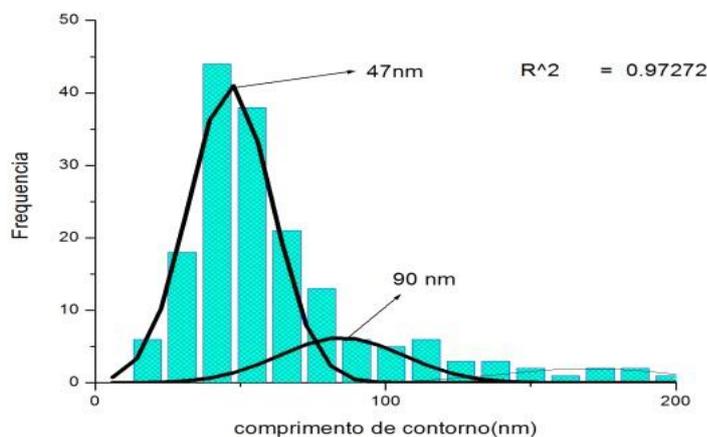


Figura 41b: pH 4,0 comprimento de contorno (nm)

Apesar de a força entrópica ser alta é possível observar dois comprimentos de contorno pequenos com probabilidades de 16% para valores $\leq 47\text{nm}$ e para valores maiores que 47nm está próximo a 82% bem como para valores $\leq 90\text{nm}$ a probabilidade é próxima a 43%; e valores maiores que 90nm são próximos a 42%. Com este valor é possível dizer que alguns domínios da macromolécula (BSA) que eram mais acessíveis ficam menos ao passo que o comprimento de contorno se torna mais difícil com as mudanças de pH do meio.

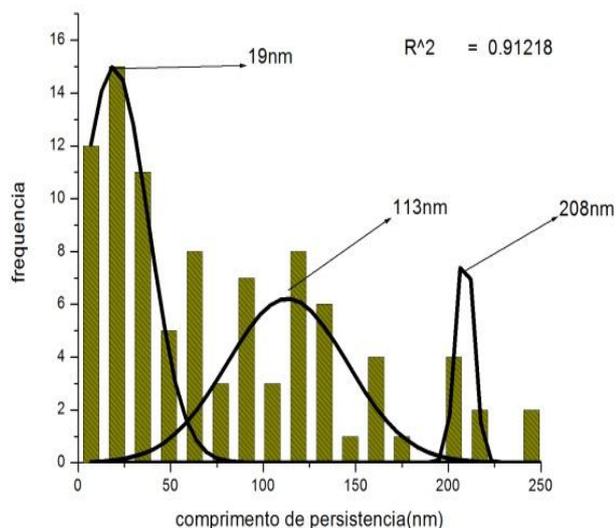


Figura 41c: pH 4,0 comprimento de persistência (nm)

Os resultados dos CPs quando o BSA está imerso em soluções apresentando pH 4,0 é um pouco maior do que o pH 7,4, porém como o meio está mais ácido é provável que exista maior quantidade de H^+ no meio, provocando a repulsão com as ligações de

hidrogênio da macromolécula (BSA). Deste modo, o resultado do comprimento de persistência é produto das interações com os grupos de dissulfetos ou grupos hidrofóbicos da macromolécula. Conseqüentemente, os conjuntos de monômeros se recuperam em uma escala de tempo mais rápida em meio ácido, o que justifica a grande distribuição de forças e a redução no CC ao longo das medidas.

5.2.6 pH 10 20µMol álcool absoluto

O valor da força entrópica na figura 41a exibe o menor valor dentre os tratamentos obtidos. Deste modo, o resultado adquirido pode caracterizar que a molécula de BSA tenha sofrido envelhecimento neste pH como sugere *PEREIRA, et al* (2003), ou exista um aumento de carga negativa que causa um acréscimo na repulsão eletrostática nos domínios circundantes do BSA. Este fenômeno cria uma barreira eletrostática da macromolécula com o meio que dificulta a ligação do BSA na superfície e sua ligação com a ponta. Tal afirmação se justifica, uma vez que o valor do comprimento de contorno é 112nm e próximo a 46% e o CP é alto e igual a 208nm.

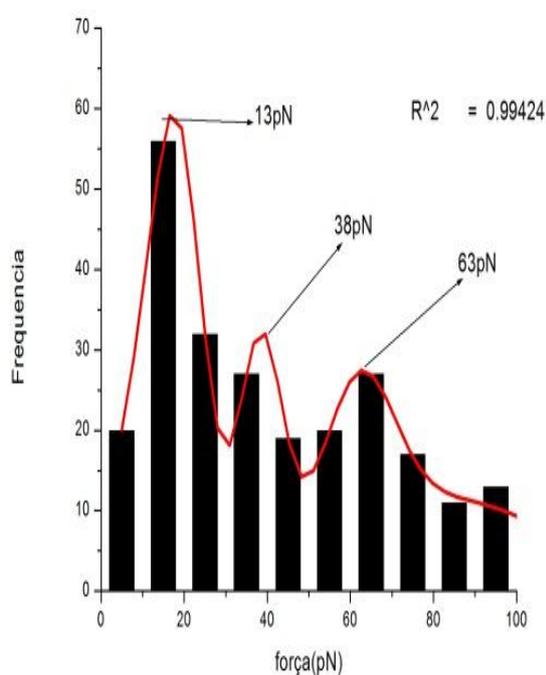


Figura 42 a: pH 10 Força –pN/20 µMol álcool abs.

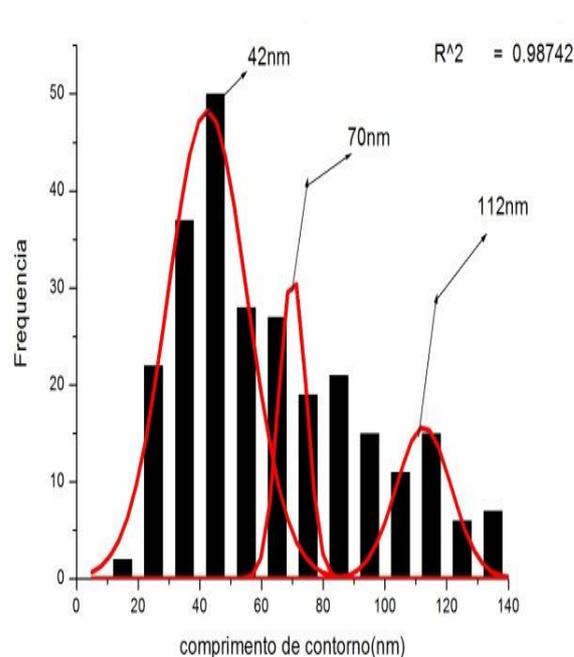


Figura 42b : pH 10 Comprimento de contorno (nm) 20µMol álcool abs.

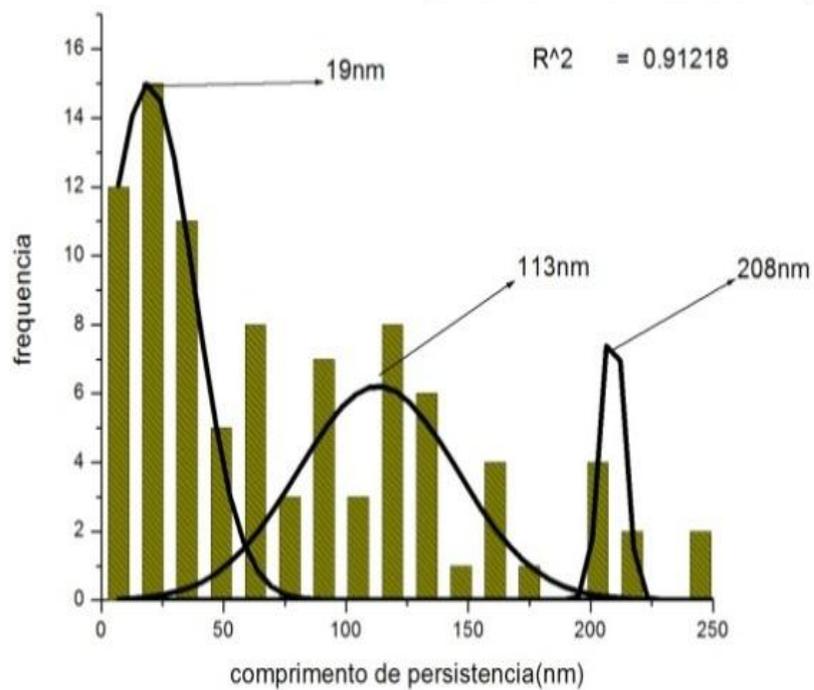


Figura 42c: pH10 comprimento de persistência-nm

A partir dos resultados obtidos foram feitas mudanças na concentração com a finalidade de observar como esta alteração pode determinar o comportamento das moléculas e os domínios individuais na superfície. Os valores de F,CC e CP estão apresentados na tabela 5.8.

Tabela 5.8: Quadro comparativo de valores Min e Max/BSA - (F,CC e CP)

pH 6,0						
	20µMol álcool 95%		20µMol álcool abs		100µMol álcool abs	
	Valores (MIN)	Valores (MAX)	Valores (MIN)	Valores (MAX)	Valores (MIN)	Valores (MAX)
F (pN)	35±3,0	247±23	47±1,5	205±38	83±4,6	263±29
CC (nm)	30±2,4	180±21	32,2±18	242±18	52±0,98	104±12
CP (nm)	20±1,3	90±12,9	21±15	201±9,7	37±22	286±42
pH 7,4						
	20µMol álcool 95%		20µMol álcool abs		100µMol álcool abs	
	Valores (MIN)	Valores (MAX)	Valores (MIN)	Valores (MAX)	Valores (MIN)	Valores (MAX)
F (pN)	43±5,5	150±2,8	57±12	340±57	68±1,5	313±5,8
CC (nm)	47±4,1	98±10	52±4,3	125±62	50±1,3	163±38
CP (nm)	25±4,3	98±9,4	12±5,8	72±7,3	15±0,29	143±11
pH4,0						
			20µMol álcool abs		100µMol álcool abs	
			Valores (MIN)	Valores (MAX)	Valores (MIN)	Valores (MAX)
F (pN)			20±4,2	237±13	18±1,3	205±38
CC (nm)			18±2,3	180±35	46±4,4	238±18
CP (nm)			16±1,1	94±13	13±1,9	97±2,4
pH 10						
			20 µMol álcool abs		100 µMol álcool abs	
			Valores (MIN)	Valores (MAX)	Valores (MIN)	Valores (MAX)
F (pN)			13±1,7	63±7,0	9,4±0,2	42±4,6
CC (nm)			45±6,0	100±21	67±1,8	225±10
CP (nm)			19±3,1	208±23	26±0,5	283±43

Por meio da tabela 5.8, nota-se que em função dos diversos tratamentos existe uma discrepância dos resultados obtidos para a mesma estrutura. Esta mudança evidencia que a força entrópica e os desdobramentos são altamente dependentes do pH e da concentração para que o conjunto de monômeros se desdobre mais ou menos em relação a força aplicada.

Os resultados obtidos de comprimento de contorno e persistência podem ser vinculados ao contexto da diferença da energia livre de Gibbs e a posição de equilíbrio entre as moléculas do meio. Essa afirmação pode ser feita quando se observa o resultado obtido pelo pH 6,0 e 7,4 e pH 10 na tabela 5.8, uma vez que a alteração de concentração no pH 6 e 7,4 para 100 μ Mol, faz com que o CP fique três vezes maior no pH 6 e dobre no pH 7,4. Entretanto, no pH 6 a molécula é estendida até (104nm), o que é esperado porque a BSA se tornou mais rígida. Porém, no pH 7,4 apesar do CP estar maior a molécula foi mais estendida do que resultado anterior, tornando a molécula nestas condições mais flexível. Este resultado é incoerente com o valor obtido anteriormente, visto que a molécula não se estendia mais do que 98 nm, o que caracteriza a rigidez no comportamento da molécula.

O resultado do pH 10 com acréscimo de concentração é contrário ao obtido anteriormente, uma vez que o CP pode ser alto e o CC se desenrola totalmente por uma força entrópica mínima mesmo com o aumento na concentração, o que a caracteriza uma molécula flexível. Outra hipótese é que nesta concentração as moléculas estão muito aglomeradas e de algum modo a força aplicada sobre a molécula sofre muitos amortecimentos e assim ocorre um decréscimo da força ao longo dos estiramentos.

Portanto, os valores obtidos de comprimento de contorno mínimo e máximo bem como o comprimento de persistência são fatores indiscutíveis para entender o comportamento molecular. Porém, para discutir ao mesmo tempo os fenômenos que ocorrem na interface biomolécula/superfície são necessários outros meio integrantes de análises físico-químicas.

5.3 CURVAS DE FORÇA X DISTÂNCIA (MODELO DE BELL – EVANS) NO BSA.

As literaturas de WILLIAMS *et al*, (2003) e HUMMER *et al*, (2004) utilizam na análise das curvas de forças as diferenças na taxa carregamento e estudam a intensificação da distribuição térmica na quebra não linear e pode favorecer as leis de ruptura. Quando uma ligação conduz mais carregamentos, conseqüentemente, as escalas da força de ruptura sobem linearmente com o número de ligação.

Assim, quando são observadas as escalas de tempo e as transições internas se percebe a dependência da taxa com os perfis de força (mudança na conformação e processos de desvinculação) e se utiliza a taxa de carregamento como um modo alternativo para observar o sistema biofísico ou bioquímico.

Segundo as experiências de estiramento não existem forças aplicadas instantaneamente, mas sim por razão de algum aumento finito eventual que ocorra na ruptura ligação. A trajetória de desvinculação é caracterizada por uma única barreira de dissociação que aumenta linearmente com o logaritmo da força aplicada. Se a força é progressiva, a taxa de dissociação da ligação igualmente continua a aumentar com o tempo. Sob essas condições, a força de ruptura mais provável varia em função dos valores da taxa de carregamento e K_{eqq} da equação (2.6) cujo valor experimental obtido para $K_{eqq} = 1,34164 \times 10^{-09}$ M.

Os valores da taxa de carregamento na tabela 5.9 são referentes à energia mecânica aplicada sobre uma molécula quando esta é estirada por meio do cantilever da Microscopia de Força atômica (AFM). As diferenças no carregamento juntamente com a intensificação da distribuição térmica e a quebra não linear favorecem as leis de ruptura. Quando uma ligação conduz mais carregamentos, conseqüentemente as escalas da força de ruptura sobem linearmente com o número de ligação, fazendo o potencial de conformação mudar por meio da energia livre.

Tabela 5.9 –Valores de taxa de carregamento BSA, segundo *SHIU LO et al,2001*

Taxa de Carregamento (Load Rate) pH 7
3,90E+4
3,90E+5
1,95E+6
3,74E+6
6,28E+6

Assim sendo, as propriedades de equilíbrio entre a banda de ligação mais fraca e as forças de ruptura não possuem valores constantes nas ligações químicas. Em vez disso dependem de condições experimentais que são em particular a taxa com que é aplicada a força no complexo receptor do ligante (a taxa de carga) como pode ser observado pela figura 43.

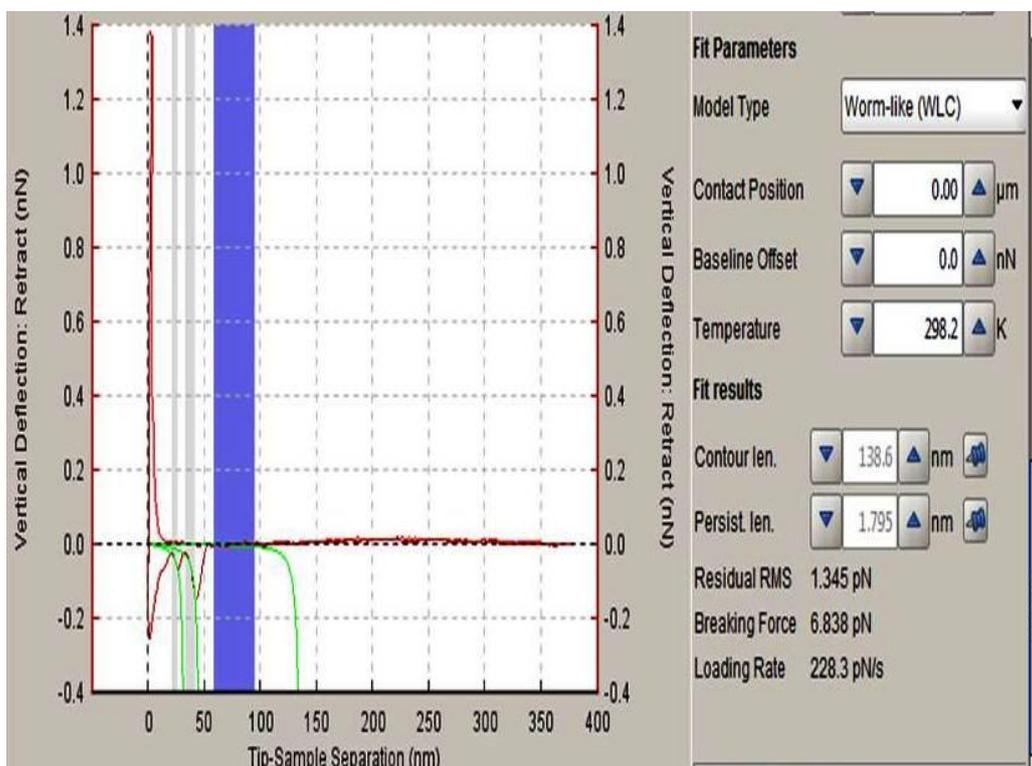


Figura 43: Programa JPK data Processing

Deste modo para empregar os valores da taxa de carregamento se utilizou a fórmula da equação (3.3) com o intuito de comparar as forças obtidas pelo método WLC. Para aplicar da equação (3.3) foram necessários os valores de taxa de carregamento que são listados na tabela 5.10:

Tabela 5.10 – Tabela de Valores de taxa de carregamento- (load Rate) LR em diferentes pHs.

LR pH 4.0 20μMOL álcool absoluto (pN/s)	LR pH 6.0 20μMOL álcool absoluto (pN/s)	LR pH 7.4 20μMOL álcool absoluto (pN/s)	LR pH 10 20μMOL álcool absoluto (pN/s)
510	240	215	272
404	228	333	373
691	137	475	384
404	270	442	161
512	298	396	195
340	147	446	297
544	179	326	234
251	175	391	380
148	225	459	515
415	632	579	152
620	197	445	144
569	169	317	201
695	480	364	180
118	259	382	320
108	322	168	142
LR pH 4.0 100μMOL álcool absoluto (pN/s)	LR pH 6.0 100μMOL álcool absoluto (pN/s)	LR pH 7.4 100μMOL álcool absoluto (pN/s)	LR pH 10 100μMOL álcool absoluto (pN/s)
258	110	165	173
223	437	189	310
319	590	102	222
120	481	409	132
144	425	301	157
103	754	476	121
267	155	320	291
241	226	436	236
193	454	189	120
103	512	578	112
140	407	402	250
170	790	370	126

Portanto, quando se analisa os resultados obtidos pelo método WLC é provável que os eventos de ligação não específicos ocorram simultaneamente, uma vez que segundo ASHCROFT *et al*, (2008) as discrepâncias nos tipos de força e tipos de desdobramentos experimentais demonstram a importância do fator distância para os estados de transição das moléculas. Por conseguinte, é possível concluir que as modificações na superfície ou na ponta podem ocasionar sítios específicos para a formação de aglomerados e, assim as taxas de carregamento com a ruptura do primeiro agregado poderá ser significativamente maior do que as condições de equilíbrio na própria molécula, levando a possibilidade de discrepâncias nos resultados obtidos.

Para investigar o significado das baixas transições das forças no estiramento a hipótese de BELL *et al* (1978) assume um papel importante como assinalado na pesquisa de KETEN *et al*, (2008). Para KETEN *et al*, (2008) a teoria de BELL *et al*, (1978) adota o pressuposto que apenas as ligações que deixam de possuir K_{eqq} rompem ao mesmo tempo com uma força constante. Isto conduz a uma força de ligação independentemente nas ligações de hidrogênio presentes. O modelo de BELL *et al*, (1978) oferece um vínculo que é ativado por um processo térmico e de difusão além de ser de natureza eletrostática. Contudo, é importante ressaltar que o modelo de Bell também foi refinado por Evans (1999) e outros autores.

Os resultados das figuras abaixo apresentam um comportamento diferente para cada gráfico obtido. Com isso, verifica-se que as mudanças de pHs influenciam na força de ligação entre as moléculas porque existe uma força limite aplicada nas ligações em função das larguras de potenciais das moléculas. Quando as moléculas deixam de ter essas ligações ocorre a ruptura das ligações que podem ser hidrogênio ou outros tipos de ligações eletrostáticas, as quais se propagam rapidamente como uma “rachadura” localizada. Essa propagação local da ruptura é controlada pela taxa de liberação da energia livre que neste caso se inicia localmente ou na interface dos grupos que fazem essas ligações entre o conjunto de monômeros.

Segundo KETEN *et al*, (2008) este processo pode ser imaginado semelhante a uma fenda de um cristal quebradiço, que se espalha e eventualmente conduz uma falha em todo cristal.

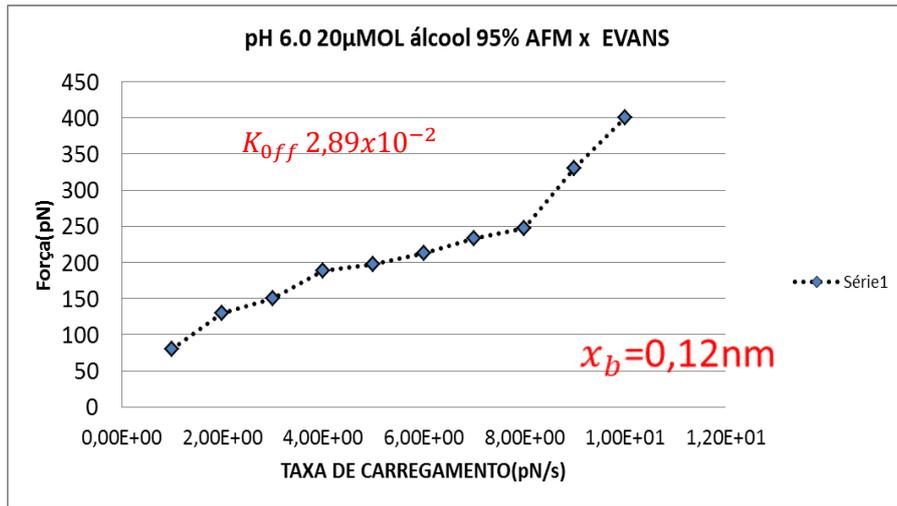


Figura 44a: pH 6.0 20μg. álcool 95%

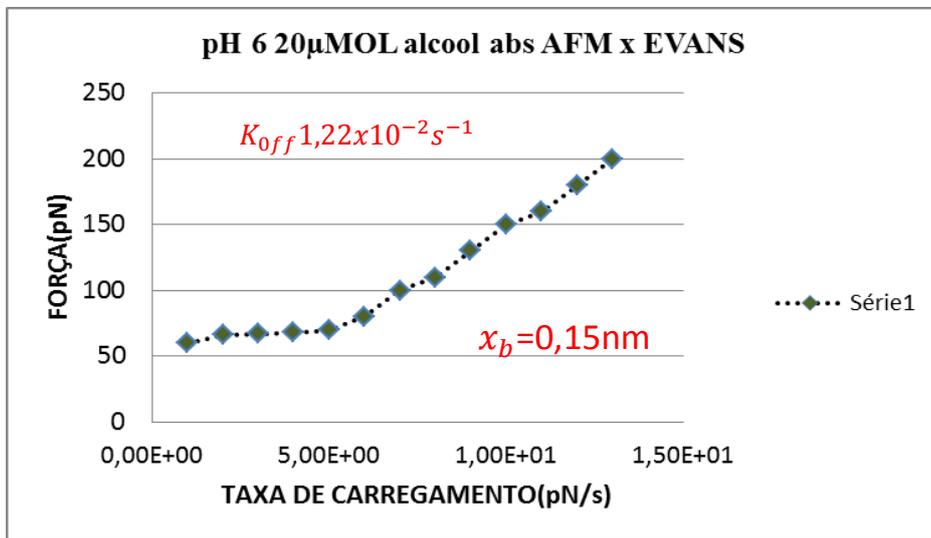


Figura 44b: pH 6.0 20μg. álcool abs.

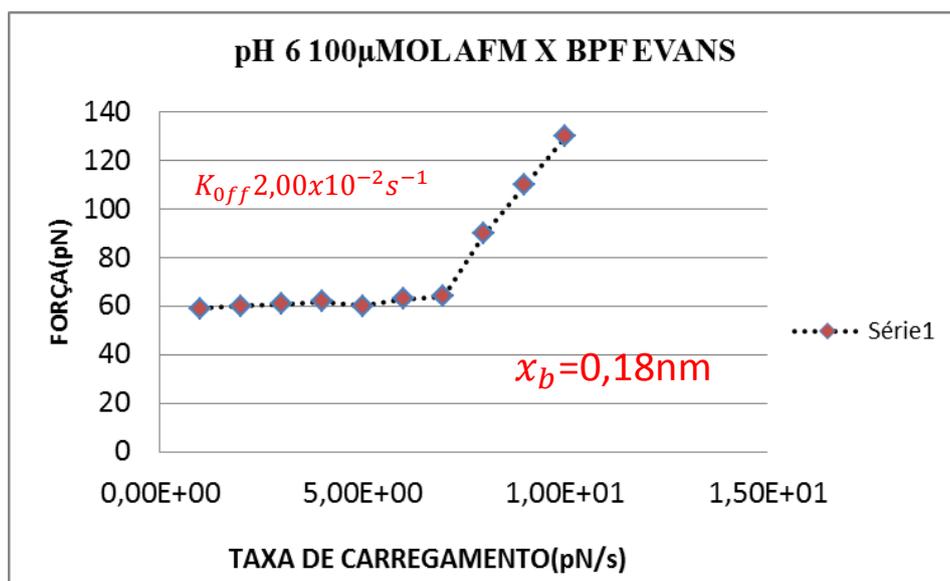


Figura 44c: pH 6.0 100μg. álcool abs

Os resultados das figuras 45 (a,b,c) mostram que existe uma relação linear entre a força com o logaritmo da taxa de carregamento que neste caso pode se dar devido às ligações de um pequeno conjunto de aglomerados. Cada ligação se rompe quando os valores críticos de taxa de carregamento passam para valores maiores ou próximos das ligações de limites de cada molécula em função de x_b e K_{off} .

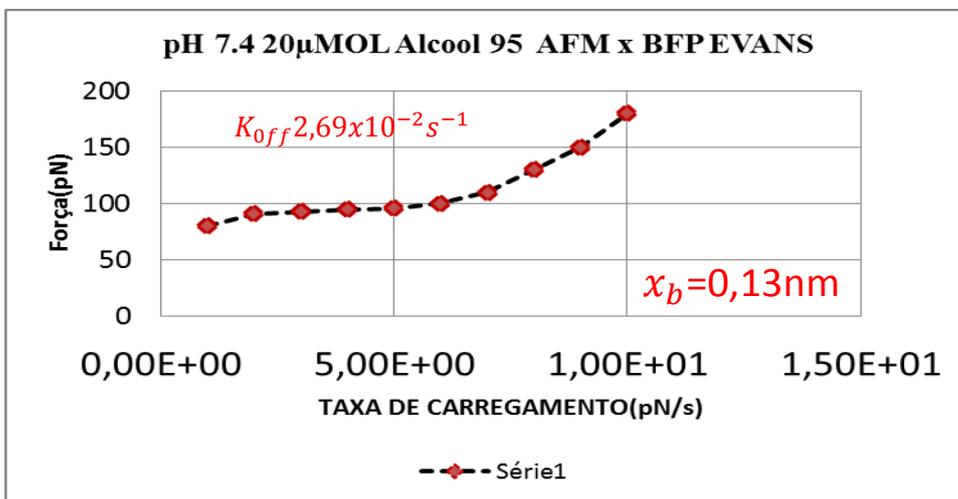


Figura 45 a: pH 7,4 20µg. Ausente álcool abs

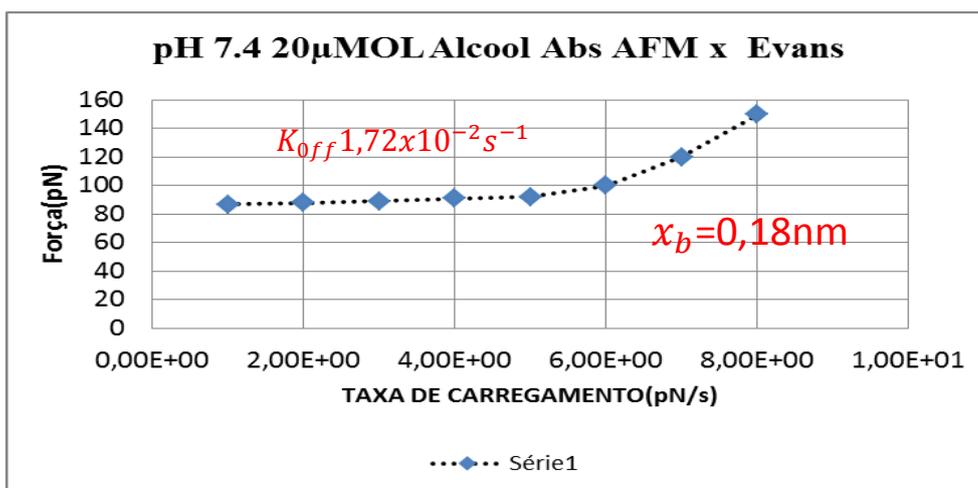


Figura 45 b: pH 7.4 20µg. álcool abs.

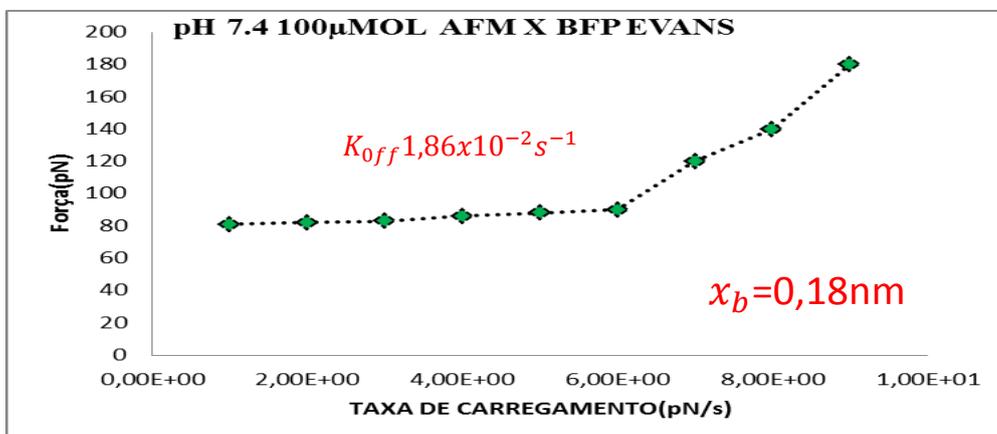


Figura 45c: pH 7.4 100µg álcool abs.

Os resultados das figuras (45a e 45b) mostram que quando a força é distribuída em relação às várias ligações as teorias devem ser generalizadas para dar conta ao comportamento coletivo das ligações sob a força.

Assim, segundo CHTHEGLOVA *et al.*(2004) quando existem forças relativamente fracas as ligações são quebradas antes do rompimento nas ligações de dissulfeto, o que permitiria ocorrer mais alongamento.

Deste modo, as formulações do modelo de Bell ou semelhantes podem ser usadas para calcular o tamanho da força nos aglomerados e nas ligações de hidrogênio e também eletrostáticas, além de ser utilizadas para vincular os valores das barreiras energéticas com o valor do pico da força.

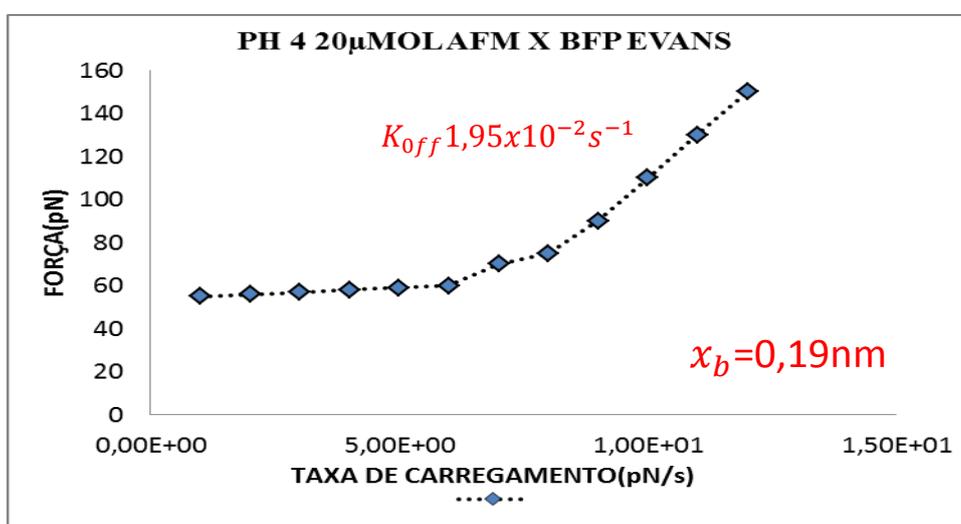


Figura 46a: pH 4 20µg. álcool abs

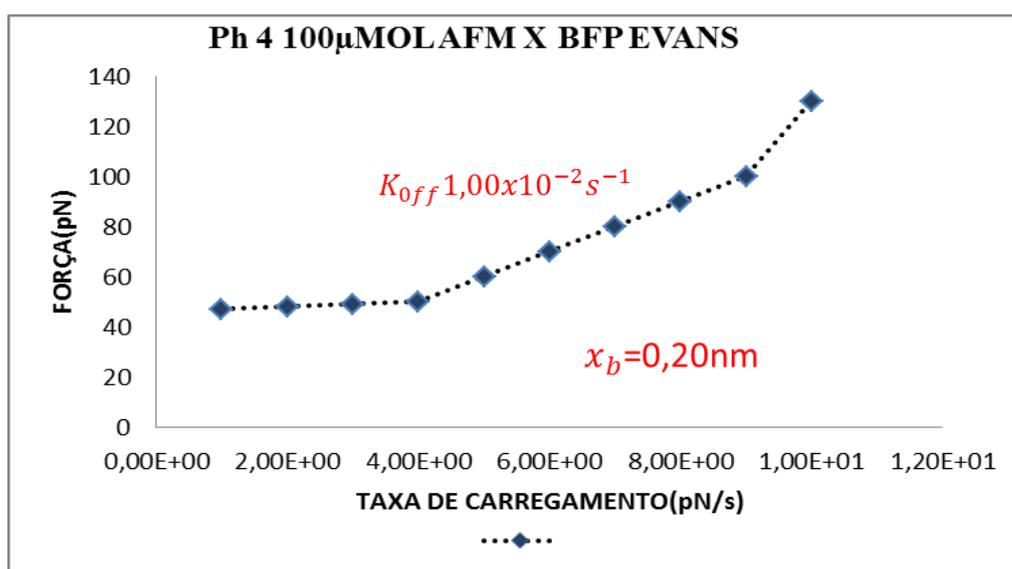


Figura 46b: pH 4 100µg. álcool abs.

No entanto, quando se utiliza o mesmo modelo de Bell para calcular as forças da figura abaixo, percebe-se que no mesmo pH com variação da concentração (figura 47 e 47 b) o comportamento da curva é muito diferente porque há o aumento na largura da barreira de potencial, que em grande parte tem haver com o aumento de concentração . Os estudos de KETEN *et al*, (2008) demonstram que as ligações de hidrogênio podem se romper porque o meio mais básico favorece a quebra de um conjunto de aglomerados.

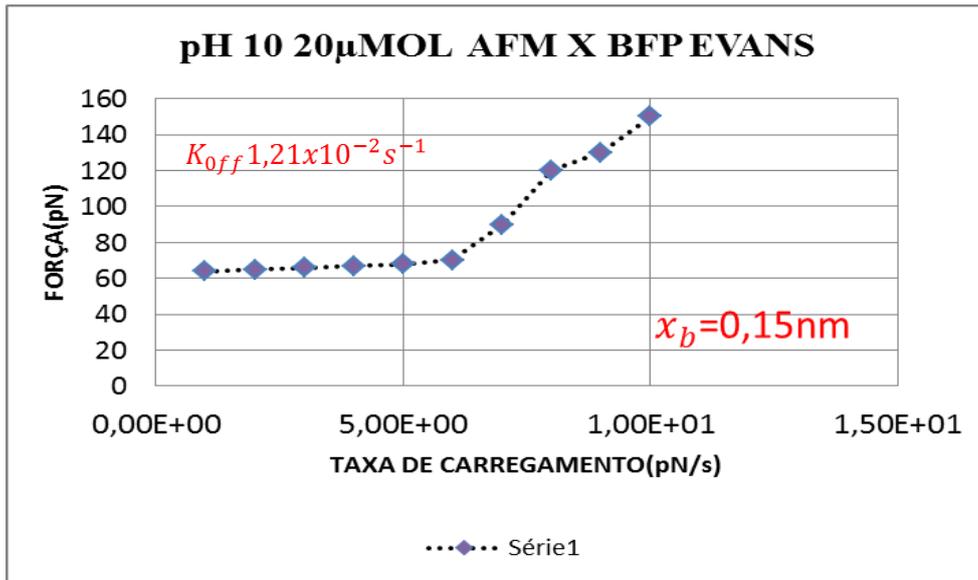


Figura 47 a: pH10 20μg. álcool abs

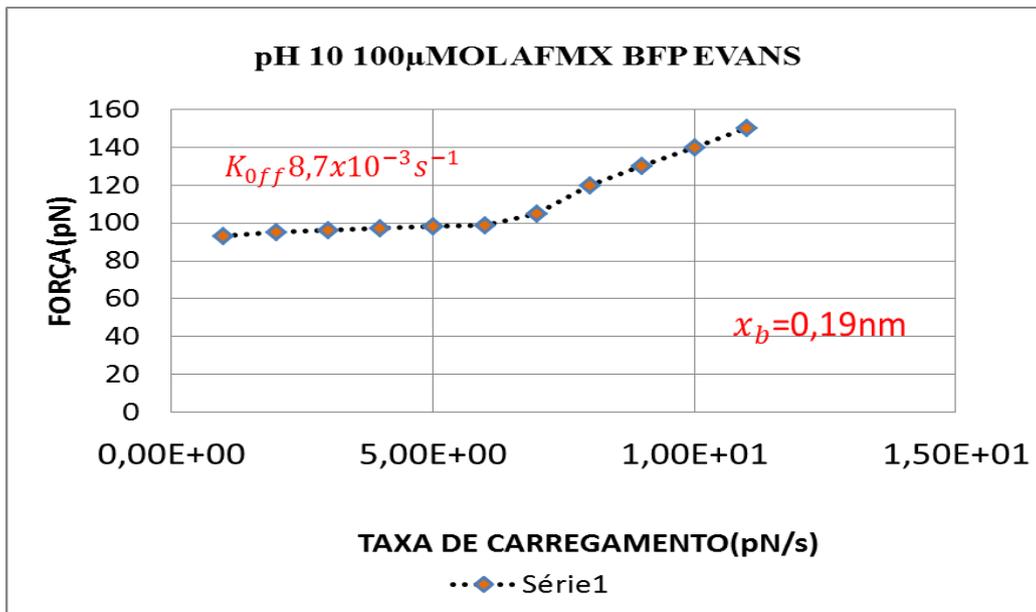


Figura 47b: PH 10 100μg. álcool abs.

5.4 FORÇA ENTRÓPICA MÉDIA X MÓDULO DE YOUNG

A relação necessária para a possível compreensão das forças entrópicas bem como para os modelos matemáticos que buscam identificar o comportamento coletivo das ligações durante o processo de ruptura podem ser conceitualmente compreendidos através da relação do regime visco elástico da molécula.

É possível observar por meio do histograma (fig.48 a) que a maior força adesiva foi de 128 pN e 104 pN para os pHs 7,4 e pH 6,0 , respectivamente em álcool absoluto. Intervalos entre 76pN correspondem ao pH 7,4 álcool 95% e entre 84 pN e 49 pN) correspondem ao pH 4 e o pH 10.

Logo, o resultado obtido mostra que o aumento do pH até o intervalo de 7,4 favoreceu para que as forças adesivas na superfície do BSA fossem maiores, porém com o aumento progressivo do pH a força adesiva diminui drasticamente tal como foi verificado por (TRAN *et al*,2012).Segundo ele as forças de adesão são progressivamente reduzidas com o aumento do pH do meio.

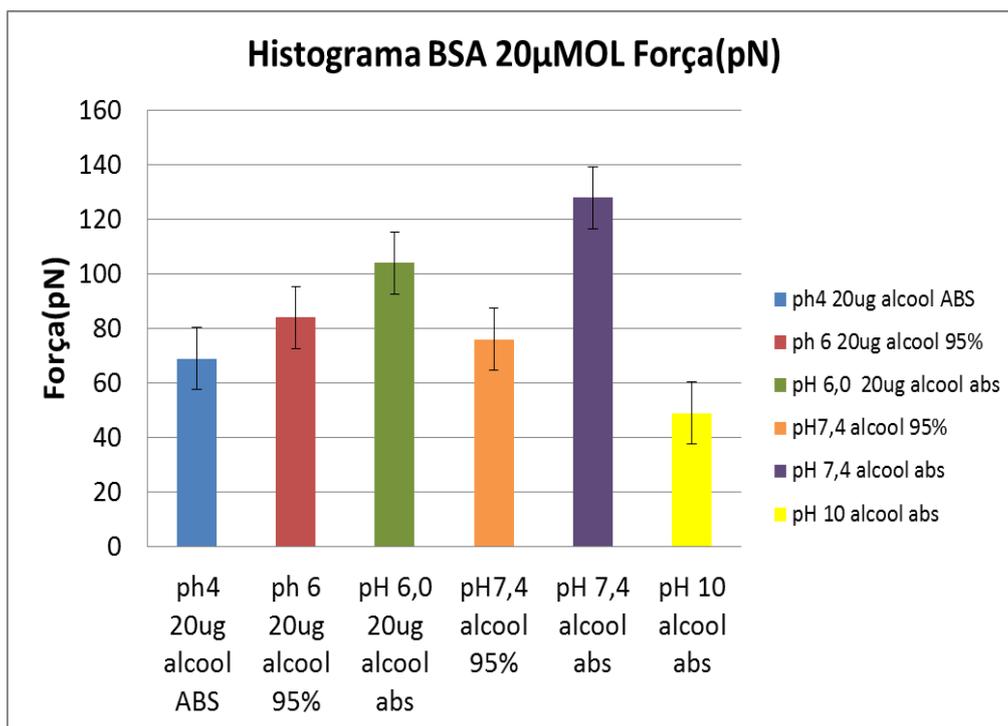


Figura 48a: pHs 20µMOL. álcool 95% e ABS

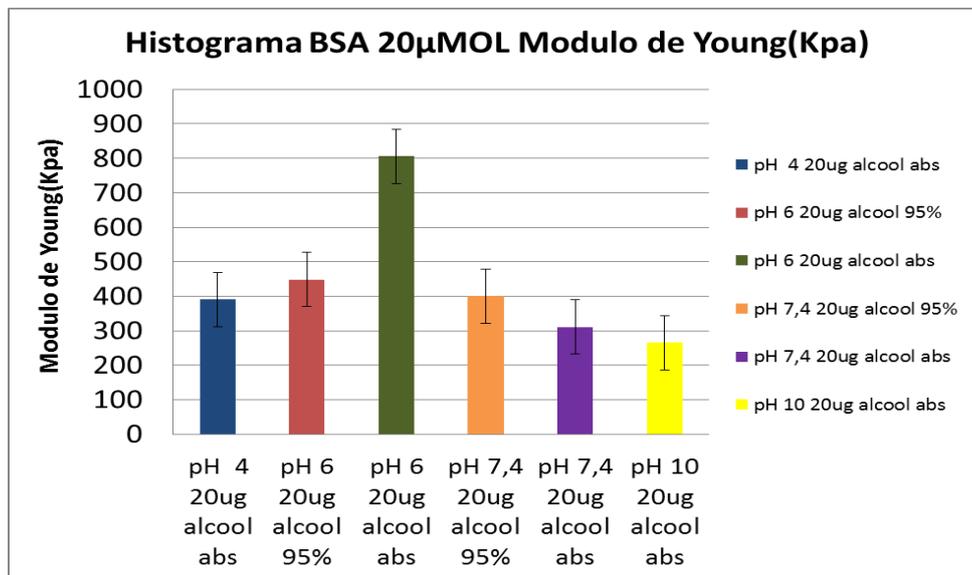


Figura 48b: pHs Módulo de Young álcool 95 e ABS

Assim, é possível dizer que as forças entrópicas aplicadas pelo método (WLC) provavelmente são mais baixas no pH 10 pelo fato dele possuir uma estrutura cristalina envelhecida como sugere CATER *et al*, (1994).

Além disso, quando o pH está muito acima do ponto isoelétrico as interações entre as cargas são facilmente comprometidas mudando a estabilidade da molécula e a tendência desta estar mais ou menos ligada com a superfície. Portanto, o aumento do pH causa um aumento na repulsão nos domínios das cargas negativas circundantes do BSA, as quais aumentam a barreira da energia potencial do meio, o que pode dificultar a ligação da BSA na superfície.

Quando são analisados os valores do modulo de Young acima ocorre que o maior valor obtido é de 800(Kpa) que corresponde ao pH 6.0 onde a estrutura cristalina está mais próxima a conformação normal (N) e o modulo de Young é de 250(kPa), o que provavelmente demonstra a conformação mais envelhecida no pH 10.

Deste modo, os domínios do BSA quando estão em um pH acima do ponto isoelétrico fazem com que as interações entre as cargas comprometam a estrutura e a estabilidade interna da proteína.

Outro ponto relevante é que as forças de adesão sobre BSA necessitam ser conduzidas por diferentes tipos de forças: eletrostáticas, hidrofóbicas e rearranjo estrutural. Portanto, o resultado obtido é coerente com as análises NAKANISHI *et al*, (2001), pois ele relata que a proteína da BSA dispõe de longas cadeias de aminoácidos, as quais tem uma alta estabilidade interna. Aliás, sabe-se que parte dos aminoácidos

possuem partes hidrofóbicas e hidrofílicas, as quais podem mudar conforme as condições de estabilidade.

Além disso, a literatura sobre o tema aponta que perto do ponto isoelétrico a atração de Coulomb entre os resíduos de cargas opostas na proteína favorecem o rearranjo das moléculas, o que torna a estrutura da proteína mais compacta.

Portando, o resultado do pH (4 e 6) se aproximam das análises realizadas por Pereira *et.al*, (2003) , já que o maior valor do módulo de Young estão próximos do ponto isoelétrico e a macromolécula fica mais ligada com ela mesma .

Deste modo o resultado obtido mostra que o pH do meio reacional é vital para a mudança de conformação da interface proteína /material funcionalizado de interesse.

Ao analisar o resultado dos histogramas das figuras 49 a e 49b abaixo observamos que o maior valor de força adesiva novamente corresponde ao pH 6 que corresponde ao valor de 118(pN).

Assim, a afirmação do resultado obtido por TRAN *et al*,(2012) a respeito do pH pode ser confirmada mesmo quando existe um aumento na concentração, pois o pH 10 possui valor próximo a 28pN e o pH 4 possui um valor de 80 pN .

Além do mais, TRAN *et al*, (2012) em seu estudo sobre as forças adesivas em função do pH observou um resultado semelhante acerca do comportamento do BSA. Nesse sentido, suas análises confirmam quanto mais básico for o meio menor a força adesiva e o módulo de Young .

Os resultados pelo módulo de Young em ambos os histogramas demonstram que no pH 10 o módulo de Young é baixo , por isso o comprimento de contorno (CC) se estira totalmente porque não é necessário que grandes forças sejam aplicadas para que a molécula se estire inteiramente. Isso justifica o resultado da força entrópica na tabela 6.8 para o pH 10 diferente do que ocorre para o pH 6 100ug , uma vez que neste último pH uma grande força é aplicada e a molécula do BSA não se estira mais do que 104nm.

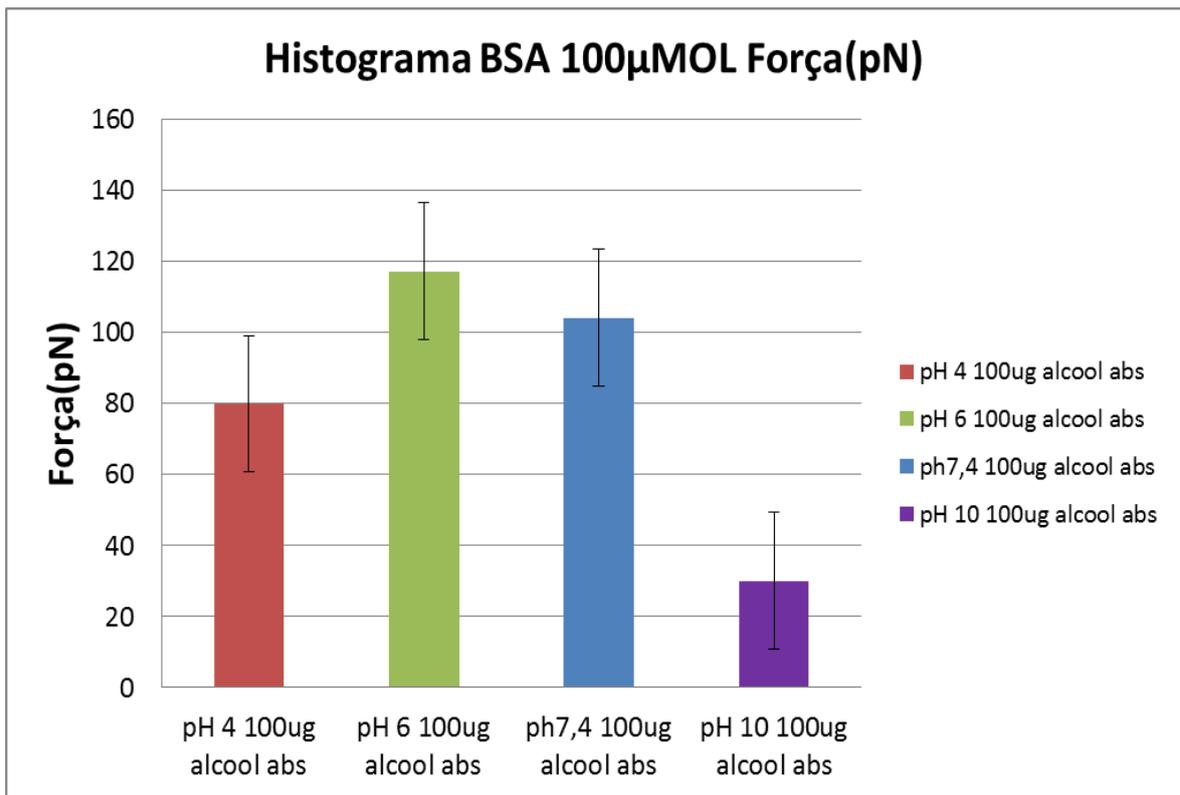


Figura 49a: pHs 100 μ MOL. alcool ABS

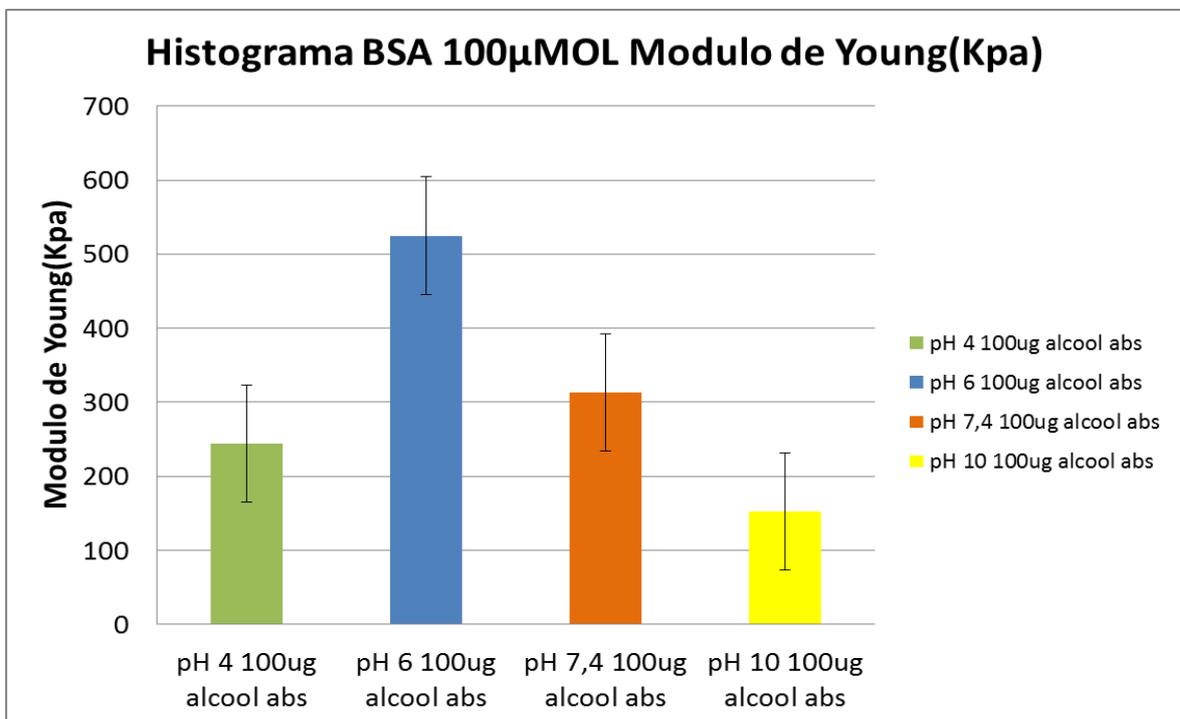


Figura 49 b: pHs Modulo de Young álcool ABS

5.5 COMPRIMENTO DE CONTORNO X MÓDULO DE YOUNG

Os histogramas das figuras 50a e 50b relacionam o comprimento de contorno com o módulo de Young com o intuito de avaliar o quanto a molécula se estende em função do módulo elástico. É possível perceber que em álcool absoluto o CC do pH 7,4 se estende mais pela média. Porém, é importante ressaltar que esta possui maior força adesiva dentre as obtida além de o módulo de Young ser o mais baixo depois do pH 10. Outro dado relevante é que o menor comprimento de contorno obtido pela média foi o pH 10 que é 58nm.

Logo, conforme os resultados obtidos por *RATTO et al*, (2006) é possível confirmar que os tratamentos analíticos simplesmente fornecem a prova teórica para o comportamento não linear das forças e as medições em conjunto. Essas medições tendem a produzir valores médios em que os intervalos possua um único valor, e estes intervalos ocultam aspectos importantes de interações tais como as forças de não equilíbrio que mudam a conformação da proteína bem como o comprimento de contorno.

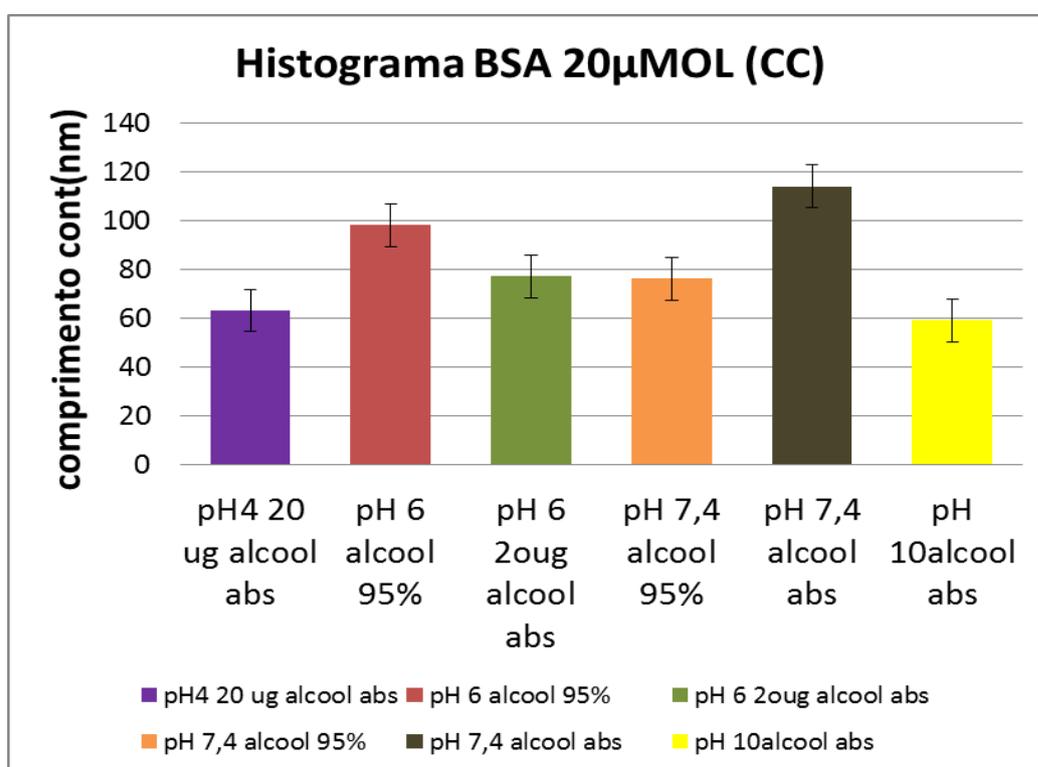


Figura 50 a: pHs 20µg. álcool 95% e ABS

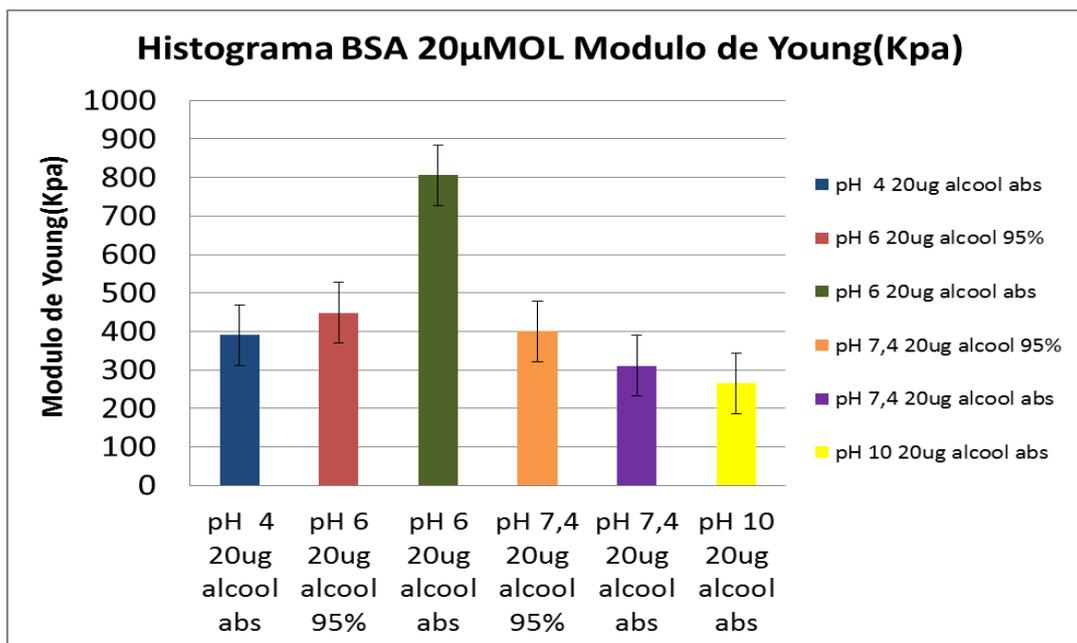


Figura 50 b: pHs 20 Modulo de Young álcool 95 e ABS

O resultado do histograma do comprimento de contorno com aumento na concentração para 100ug tem o maior valor para CC próximos ao pH 10. Esse resultado é esperado, uma vez que o pH 10 possui o menor módulo de Young como já foi mencionado acima. Assim, para as diversas condições experimentais como indicado no estudo de *RIXMAN et al, (2003)* as moléculas de albumina do soro bovino ou a molécula de albumina sérica humana podem se estirar até um comprimento do contorno próximo a 200nm , o que representa o comprimento de contorno completo.

Deste modo, por meio da análise das médias o CC não se estirou mais do que 141nm e assim o resultado obtido pode admitir que *RIXMAN et al, (2003)* esteja correto sobre o valor máximo do comprimento de contorno. Porém, é importante perceber que os resultados possuem uma interpretação tão individualizada que é possível que o mesmo complexo possua diferentes preferencias de ruptura quando se altera o tratamento e a concentração.

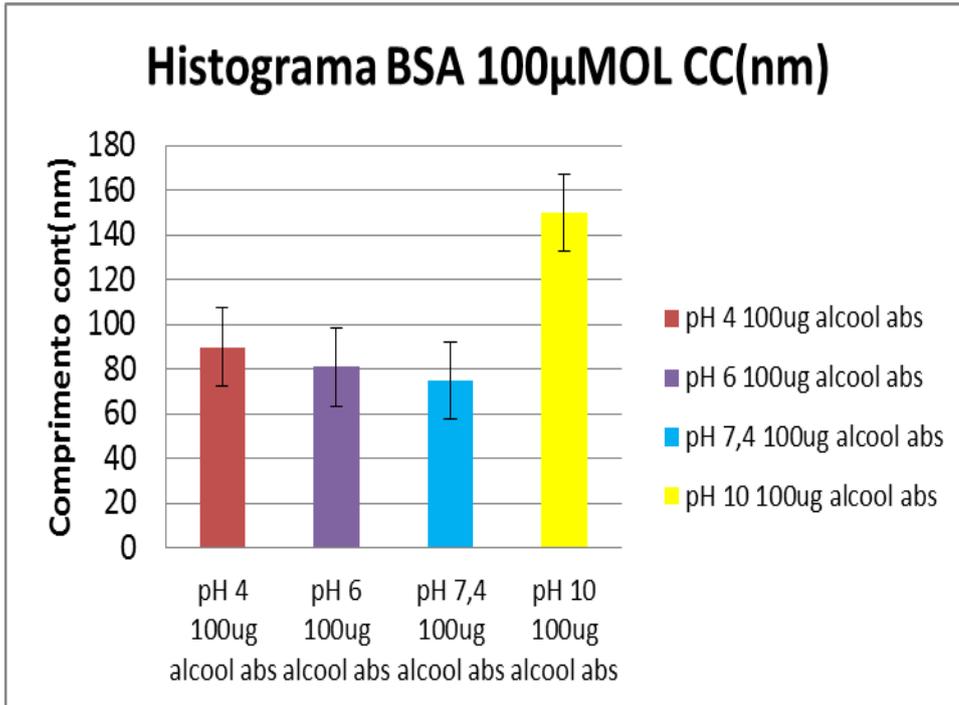


Figura 51a: pHs 100μg. álcool 95% e ABS

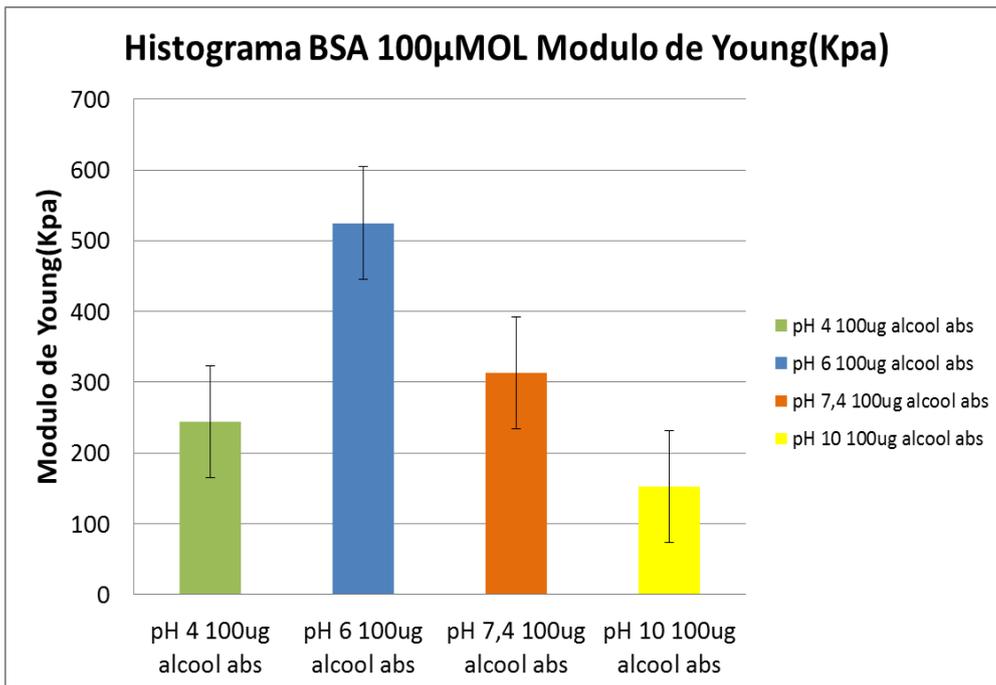


Figura 51b: pHs 100ug Modulo de Young álcool 95 e ABS

5.6 MEDIDA DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE - AFM

5.6.1 Topografia do Si_3N_4

O resultado das figuras 52 a, b, c mostram que a superfície é lisa e pouco homogênea, possuindo vários defeitos. Estas variações topográficas observadas nas imagens mostram que foi depositado Si_3N_4 na superfície, uma vez que o substrato de Si é pouco homogêneo e muito liso.

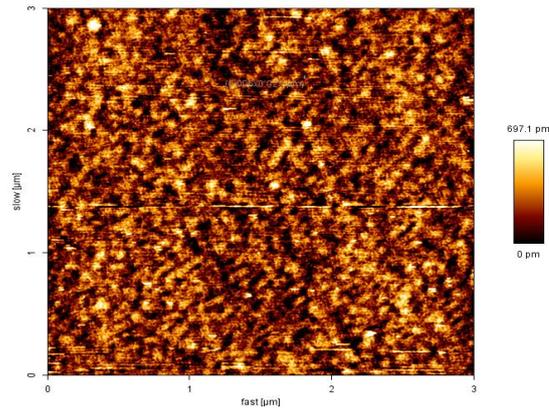


Figura 52a. Topografia ($\text{Si}+\text{Si}_3\text{N}_4$ depositado superfície)

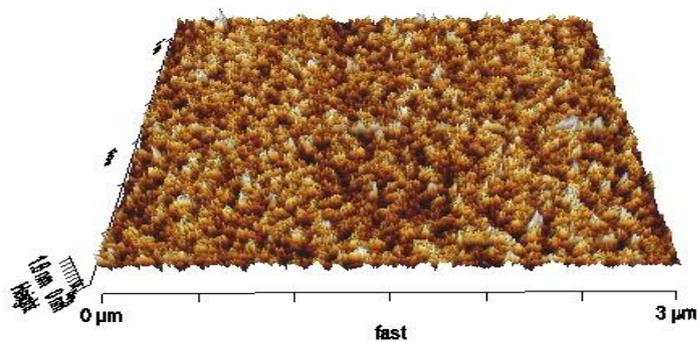


Figura 52b. Imagem 3D da topografia do Si_3N_4

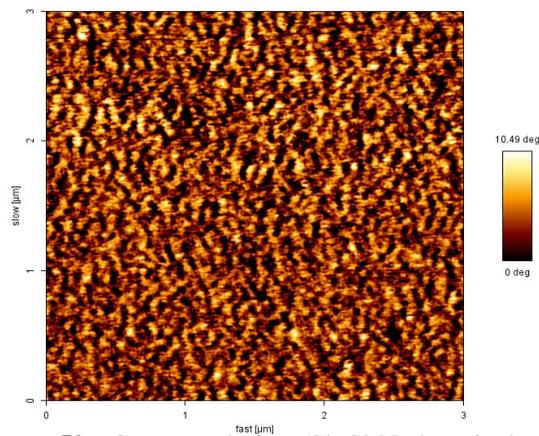


Figura 52c. Contraste de fase ($\text{Si}+\text{Si}_3\text{N}_4$ depositado superfície)

5.6.2 Topografia da amostra funcionalizada com APTES

As Imagens das figuras 53 (a, b, c) correspondem às modificações químicas dos filmes de APTES. Observou-se que os filmes finos APTES exibem uma topografia da superfície mais homogênea e um pouco rugosa .

Segundo HOWARTER *et al*, (2006) podemos observar a rugosidade através da presença de agregados e a formação de multicamadas do filme de APTES. Além disso, KIM *et al*, (2010) demonstra que os agregados do filme de APTES são frequentemente formados nas superfícies devido aos crescimentos laterais do filme que ocorrem quando a silanização é conduzida por um tempo de 4h e uma cura igual 24 h num solvente orgânico.

Outra relação importante para a formação de agregados verificada no trabalho de SMITH *et al*, (2006) aponta que a reação de silanização do APTES quando realizada em 4 horas forma monocamadas relativamente lisas. Quando não há o processo de cura em um tempo de 24 horas ocorre a formação de multicamadas com rugosidade e características em forma de ilhas.

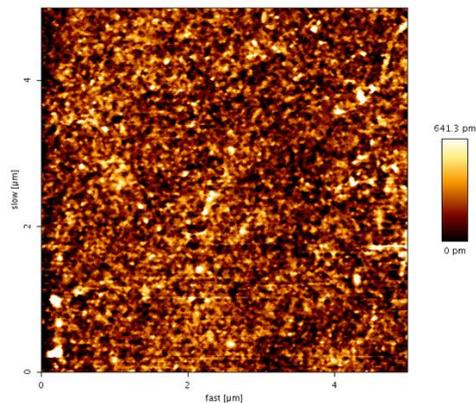


Figura 53a. Topografia (Si₃N₄ + APTES)

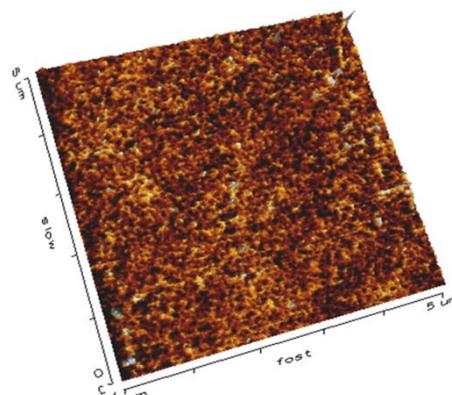


Figura 53b. 3D Topografia-(Si₃n₄+APTES)

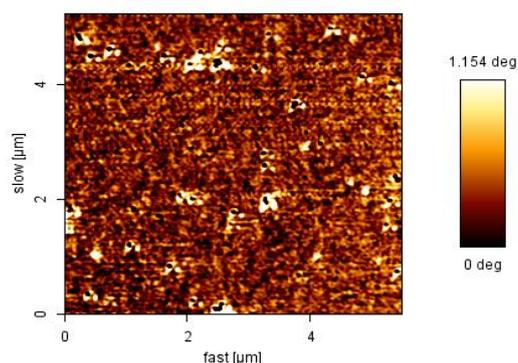


Figura 53c. Contraste de fase (Si_3N_4 +APTES)

5.6.3 Topografia da amostra reticulada com glutaraldeído (GA)

É possível perceber que as imagens da superfície de Si_3N_4 apresentam aglomerados, isto implica que a modificação com o APTES produz ligações em que os possíveis sítios da superfície foram modificados pelo agente de ligação. Assim, conclui-se que o agente de ligação não se une apenas aos defeitos da superfície criados na deposição de Nitreto de silício visto que o APTES forma camadas poliméricas provenientes da silanização, as quais favorecem a fixação do NH_2 ao glutaraldeído.

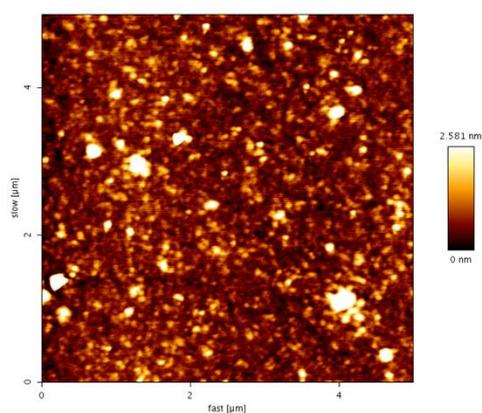


Figura 54a. Topografia (Glutaraldeído)

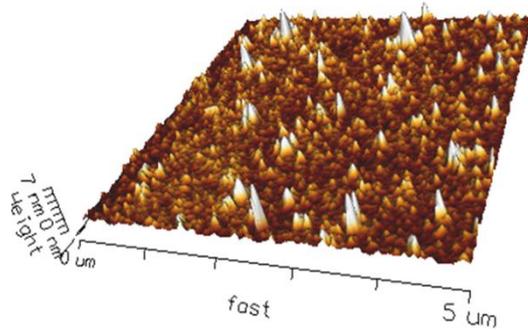


Figura 54b. 3DTopografia (Glutaraldeido)

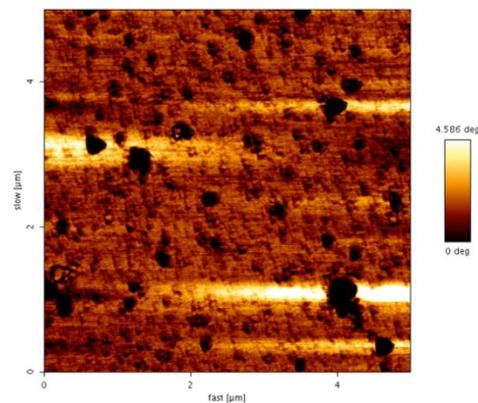


Figura 54c. Contraste de fase (Glutaraldeido)

5.6.4 Topografia da amostra imobilizada com BSA

As imagens das figuras 55 (a,b,c) mostram que o BSA está ligado covalentemente na superfície e possui uma estrutura globular. O BSA é uma proteína enrijecida e globular, porém tal enrijecimento provavelmente dependa do pH do meio e do tempo de reação. Essa observação foi confirmada pelo estudo de *MACIEL et al*, (2013), o qual demonstrou que o número de agregados deve estar em função do tempo de reação com a superfície.

Essa observação denota que em tempos curtos a interação é mais alta com o solvente, e assim o número de agregados será menor conforme o tempo de contato. O número de agregados será maior se o tempo de contato aumentar, dessa forma se

justificam as imagens das figuras 54 (a,b,c) porque elas possuem muitos agregados visto que neste trabalho o BSA funcionalizado foi utilizado em um tempo médio de 24H.

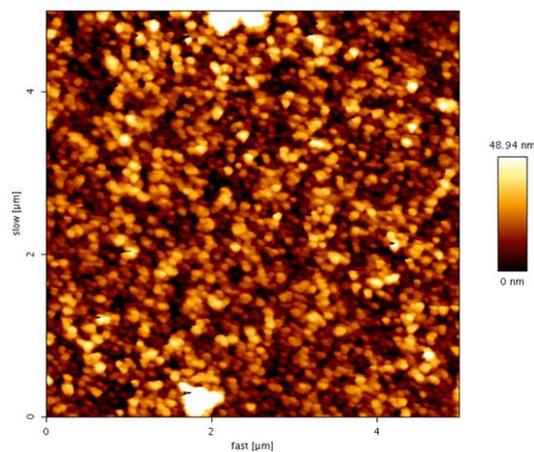


Figura 55a. Topografia (BSA)

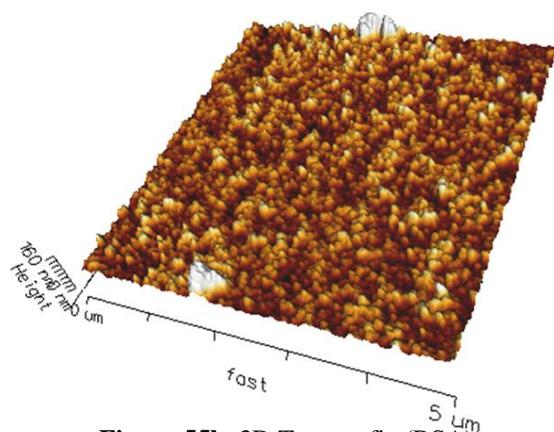


Figura 55b. 3D Topografia (BSA)

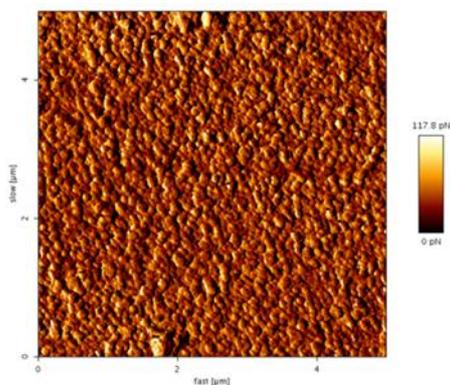


Figura 55c. Força lateral (BSA)

5.6.5 Rugosidade média das amostras obtidas

Os valores de rugosidade média podem confirmar que a funcionalização da superfície do Si+Si₃N₄ apresenta uma rugosidade média baixa porque a superfície do Nitreto de silício é lisa. Após o tratamento com APTES 20 mM/4h a rugosidade média aumenta , caracterizando o processo de polimerização da superfície, a qual tem a tendência de formar uma monocamada mais homogênea e densa. Quando se utiliza o GA a rugosidade média aumenta novamente porque este composto tem a tendência de se ligar ao NH₂ do APTES.

Ao utilizar o BSA na superfície com APTES 20 mM/4h + GA 2,5% o comportamento da rugosidade média aumenta drasticamente , o que caracteriza que o tratamento utilizado para funcionalizar favorece a fixação do BSA na superfície devido a ligação covalente proveniente do APTES na superfície do Si₃N₄

Tabela 5.11- Valor da rugosidade media em função dos tratamentos.

Tratamentos	Valor médio Rugosidade (Ra)
Si+Si ₃ N ₄	Rug: 103pm
APTES 20 mM/4h	Rug: 940pm
GA 2,5%	Rug: 1,2 nm
BSA 20 µMol/ml	Rug:8,72 nm

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de funcionalização de superfície com o emprego do APTES 20mM/4h e Glutaraldeido 2,5% com o intuito de “aprisionar” o BSA. Deste modo é possível por meio dos resultados experimentais obtidos indicar que:

- Por meio do método matemático WLC foi possível perceber que a maior força entrópica de 263 pN esta próxima do ponto isoelétrico da macromolécula (pH 6);
- Na presença de água é possível perceber que a interação da BSA com o meio muda o CP devido à interação de hidrogênio com a água, o que desfavorece a interação da macromolécula com ela mesma;
- Com o aumento da concentração do BSA existem mais moléculas ligadas entre si, favorecendo que o CP fique maior;
- No pH 10 apesar do CP ser alto a molécula se estira totalmente, porque a molécula não apresenta uma estrutura cristalina definida;
- A partir da teoria de Bell podemos observar que em presença de água as larguras da barreira de potencial são menores e em álcool absoluto esta barreira aumenta, aproximando-se com os valores de aumento do CP pelo método WLC;
- Por fim, a partir do módulo de Young foi possível observar que no pH 6 com álcool Absoluto o BSA tem maior módulo visco elástico porque a regularidade estrutural da molécula se aproxima do ponto isoelétrico.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Os estudos das técnicas de funcionalização descritos e discutidos nesta tese contribuem de forma fundamental para a compreensão dos fenômenos físico-químicos em materiais funcionalizados. Porém, seria extremamente interessante buscar rotas alternativas de funcionalização e também estudos que possam auxiliar na compreensão dos fenômenos que ocorrem nesta interface.
2. Seria de grande relevância na área de funcionalização de materiais verificarem técnicas tais como Spin Coat ou deposição química a vapor (CVD) por meio de compostos químicos que formam monocamadas de Silanos. Outra proposta também seria utilizar ligantes cruzados bem como outros ligantes via Spin coat ou até mesmo por CVD.
3. Sabe-se que os filmes funcionalizados por biomoléculas são muito dependentes das interações hidrofílicas e hidrofóbicas, assim sendo uma alternativa que pode ser utilizada para verificar tal argumento é usar o Hexametildissiloxano (HMDS) que forma camadas muito hidrofóbicas.
4. Os resultados obtidos pelos métodos matemáticos utilizados nesta tese apesar de exibirem informações relevantes sobre o processo de ruptura por um ponto de vista termodinâmico, contudo ainda não explorou os potenciais de interação. Seria de grande relevância ao invés de utilizarmos exclusivamente o conceito de forças adesivas também usarmos o conceito de energia potencial $F = \frac{dU}{dX}$ nas curvas de força. De tal modo, seria razoável posteriormente utilizar o potencial de Morse para estudar os mínimos locais bem como as energias de ligação e dissociação, relacionando-as com as equações da mecânica quântica.

8. REFERÊNCIAS

AHUJA, T., et al. “Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications”. **Biomaterials**, 28(5): p. 791-805, 2007.

ALBRECHT, T. R., GRUETTER, P., HORNE, D. AND RUGAR, D. “Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity”. **Journal of Applied Physics**, 69(2): 668-673.64,1991.

ANDRADE J.D; HLADY, V. , WEI, A-P; HO, C-H; LEA, AS; JEON, S.I.; LIN, Y.S.; STROUP, E.; PISKIN, E. “ Proteins at Interfaces: Principles, Multivariate Aspects, Protein Resistant Surfaces, and Direct Imaging and Manipulation of Adsorbed Proteins” In: **Biologically Modified Biomaterial Surfaces**. EUA: Elsevier Science, p.p 67-84,1992.

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. “Recent advances in cholesterol biosensor”. **Biosens. Bioelectron**. Department of Chemistry, University of Delhi, India: v. 23(7), p. 1083–1100, Feb- 2008.

BARATTIN, R. and VOYER, N. “Chemical modifications of atomic force microscopy tips”. **Methods Mol. Biol**. v: 736,p.p 457–483, 2011 .

BARTELS, F. W., BAUMGARTH, B., ANSELMETTI, D., ROS, R., BECKER, A. “Specific Binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti* – a combined molecular biology and force spectroscopy investigation”. **Journal. Struct. Biol**. v:143, p.p145-152, 2003.

BELL, G. I. “Models for the specific adhesion of cells to cells”. **Science**. v: 200 p.p 618-627, 1978.

BELLUZO, M. S.; RIBONE, M. E.; LAGIER, C. M. “Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics”. **Sensors**, v.8, p.1366-1399, Fev -2008.

BENOIT, M., GABRIEL, D ; GERISCH, G. and GAUB, H. E. “Discrete Interactions in Cell Adhesion Measured by Single Molecule Force Spectroscopy”. **Nature Cell Biology**: v :2: p.p 313-317, 2000.

BILLINGSLEY, K ,et al. “Fluorescent nano-optodes for glucose detection”. **Analytical Chemistry**. Washington/DC , v: 82, p.p 3707 -3713 , May- 2010 .

BLECH, Michael, LAADES,Abdelazize, RONNING Carsten, SCHRÖTER Bernd, BORSCHEL Christian, RZESANKE Daniel, LAWERENZ Alexander. “Detailed Study of PECVD Silicon Nitride and Correlation of Various Characterization Techniques Advanced Photovoltaics Fundamental Studies24th”. *European Photovoltaic Solar Energy Conference*: v.4, p.p 21-25, Hamburg, Germany September -2009.

BOZEC, L., Horton, M. “Topography and mechanical properties of single molecules of types I collagen using atomic force microscopy” . **Biophysical Journal**: v.88(6), p.p 4223–4231, 2005.

BRUKERNANO. *Tip Functionalization Approaches for Molecular Recognition Measurements*. Virtual Book, 2011. Disponível em: <http://www.bruker.jp/axs/nano/imgs/pdf/AN130.pdf>. Acesso em : 10 de novembro, 2014, 15:30.

BUSTAMANTE,C., MARKO,J.F., SIGGIA, E.D. SMITH,S. “ Entropic elasticity of lambda-phage DNA”. **Science**, v. 265,p.p 1599–1600,1994.

BUTT, H.-J., SIEDLE, P., SEIFERT, K.,FENDLER, K., SEEGER, T., BAMBERG, E.,WEISENHORN, A. L., GOLDIE, K. AND ENGEL, A. “Scan speed limit in atomic force microscopy”. **J. Microsc**,v. 169(1): p.p.75-84, 1993.

CALIL, Simone Saad; SILVA, Paulo Roberto Queiroz da : *Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade*. Virtual Book, 2011. Disponível em : <http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>. Acesso em: 15 dezembro de 2014, 23:00.

CARTER, D. C. and Ho, J. X. "Structure of serum albumin". **Advances in Protein Chemistry**. v:45, p.p 153-203,1994.

CHAMBERS, J. P. et al. "Biosensor Recognition Elements". **Curr. Issues Mol. Biol.** v.10, p.p 1-12, 2008.

CHAPMAN, B. "Glow Discharge Processes, Sputtering and Plasma Etching". **John wiley & sons Chem.** v:45,p.p153–203, 1980.

CHETCHEGLOVA, lilia, SHUBEITA, Geoge, SEKATSKII, Sergeyk DIETLER,Giovanni: "Force Spectroscopy with a small dithering of AFM tip: A method of direct and continuous measurement of the spring constant of single molecules and complexes". **Biophysical journal** :v 86 ,p.p 1177–1184, february 2004.

CHIANG, C.-H., ISHIDA H., KOENIG J.L. "The structure of γ -aminopropyltriethoxysilane on glass surfaces". **J. Colloid Interface Sci.** v.74,p.p. 396-404,1980.

CHIU, Tai-Chia; HUANG, Chih-Ching. "Aptamer -Functionalized Nano-Biosensors". **Sensors**: v: 9,p.p 10356-10388 , 2009.

COELHO, J.N. *Medida da Elasticidade Entrópica de Uma Molécula de DNA*-. *Dissertação* (Mestrado em Física). Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.

DAMMER, U., HEGNER M., ANSELMETTI, WAGNER D. P., Dreier M., Huber W., and H.-J. GUNTHERODT.. "Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy". **Biophys. J.** v:70,p.p 2437–2441, 1996.

DAMMER, U., M. HEGNER, D. ANSELMETTI, P. WAGNER, M. DREIER, W. HUBER, H.-J. GUNTHERODT. " Specific antigen/antibody interactions Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface". **Langmuir**. V:19,p.p 2349–2356, 1996.

DE GENNES, P-G. “Scaling Concepts in Polymer Physics”. **Cornell University Press**,. Chapter I, (sections I.1 and I.2), 4th print , 1991.

DUPRES V, ALSTEENS D, WILK S, HANSEN B, HEINISCH JJ, DUFRENE YF. “The yast Wsc1 cell surface sensor behaves like ananoprins in vivo”. **Nat Chem Biol** v.5:p.p 857–862, 2009.

ELNASHAR,M.M.M: “Review Article: Immobilized Molecules using biomaterials and nanobiotechnology”. **Journal of biomaterials and nanobiotechnology** .v 1; p.p 61-77, 2010.

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. Fortaleza: Documentos,. v.117, 2008.

EVANS, E., LUDWIG, F. “ Dynamic strengths of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes”. **J. Phys. Condens. Matter**.v. 12 p.p A315-A320. 2000.

EVANS, E.; RITCHIE, “Dynamic strength of molecular adhesion bonds”. **Biophys J**. v.72 ,p.p 1541-1555,1997.

FATIBELLO-FILHO, O; CAPELATO, M. D. “Biossensores”. **Quim.Nova**: v.15, p.28-39,1992.

FENOGLIO,I., FUBINI, B., GHIBAUDI, E. M., TURCI, F., “ Multiple Aspects of the Interaction of Biomacromolecules with Inorganic Surfaces”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 63, p.p 1186 – 1209 , 2011.

FERRER, M. L., DUCHOWICZ, R., CARRASCO, B., DE LA TORRE, J. G., ACUÑA, A. U. “The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization hydrodynamic modeling study”. **Biophys. J**. v. 80, p.p 2422-2430, 2001.

FONG, S., HAMILL, J, PROCTOR, M, FREUND, M; STEFAN, M. V., BENIAN, G. M., CHOTHIA, C., BYCROFT, M., CLARKE, J. “Structure and stability of an immunoglobulin superfamily domain from titin, a muscle protein of the nematode *Caenorhabditis elegans*”. **JMB**. v: 264, p.p 624-639,1996.

FOUAD, Karouta; KAUSHAL, Vora; TIAN, Jie, JAGADISH, “Chennupati Structural, compositional and optical properties of PECVD silicon nitride layers”. **J. Phys. D: Appl. Phys.**v:45(44), 2012.

FRITZ, J., KATOPODIS, A. G., KOLBINGER, F. and ANSELMETTI, D. “Force-mediated kinetics of single Pselectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,v. 95: p.p 12283-12288,1998.

Ge, H.C.; Chen, H.; HUANG, S.Y. “Microwave preparation and properties of O-crosslinked maleic acyl chitosan adsorbent for Pb²⁺ and Cu²⁺” . **J. Appl. Polym. Sci** , v.125, p.p 2716–2723, 2012.

GEORGE, J.; MENON, C.S “Electrical and optical properties of electron beam evaporated ITO thin films”. **Surface and coatings technology**. v.132, n 1, p.p 45-48, 2000.

GERGELY, C., VOEGEL, J.-C., SCHAAF, P., SENGER, B., MAALOUM, M., HÖRBER, J. K. H., and HEMMRLÉ, “J. Unbinding process of adsorbed proteins under external stress studied by *AFM*”. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v.97 ,p.p 10802-10807, 2000.

HANSMA, H. G., VESENKA, J., KELDERMAN, G., MORRETT, H., SINSHEIMER, R. L., ELINGS, V., BUSTAMANTE, C. and HANSMA, P. K. “Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the AFM”. **Science** ,v 256, p.p180-1184,1992.

HINTERDORFER, BAUMGARTNER P., W., H. J. SCHILCHER Gruber, K., H. SCHINDLER. “Detection and localization of individual antibodyantigen recognition events by atomic force microscopy”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v 93, p.p 3477–3481,1996.

HOWARTER, J. A.; YOUNGBLOOD, J. P. “Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane” . **Langmuir**, v. 22, p.p 11142–11147, 2006.

HUMMER, G.; SZABO, A. “Intermolecular interactions between human serum albumin and alkanethiol self-assembled monolayers” . **Langmuir**. v.19, p.p 6202–6218, 2004.

IUPAC. “Reconsider new biosensor definition”. **Biosensors & Bioelectronics**,v 13(2): p.p I-I, 1998.

KETEN, Sinan , BUEHLE Markus J. “Strength limit of entropic elasticity in beta-sheet protein domains”. **Physical Review** . v. 78, 061913, 2008.

KIERNAN,JA. “Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde”. **Microscopy Today**; (1), p.p 8-12, 2000.

KIM, J.; SEIDLER, P.; WAN, L. S.; FILL, C. “Formation, structure,and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates”. **J. Colloid Interface Sci.** v: 329 (1), p.p 114–119, 2009.

KIM, Joonyeong , CHO jungmo , SEIDLER Paul M. , E.KURLAND Nicholas AND YADAVALLI, Vamk. . “Investigations of Chemical Modifications of Amino-Terminated Organic Films on Silicon Substrates and Controlled Protein Immobilization” **Langmuir**, v. 26 (4), pp 2599–2608, 2010.

KIRBY,A.R.,GUNNING,P.,K.W.,W.,Morris,V.J.and Ng, A. “ Visualization of Plant Cell Walls by Atomic Force Microscopy”. **Biophysical Journal**, v:70: p.p1138-1143,1996.

KONG, J.; Yu, S. “Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures”. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v.39(8), p.p 549-559, 2007.

LEE, G. U., CHRISEY L. A., COLTON R. J. “Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA”. *Science*: v. 266, p.p 771-773, 1994.

LEE, T. MING-HUNG. “Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future”. **Sensors**, v.8, p.5535-5559, set. 2008.

LENNE P.-F. , RAAE A.J., ALTMANN S.M., SARASTE M., HORBER J.K.H. “States and transitions during forced unfolding of a single spectrin repeat”. **FEBS Letters**, v. 476 (3), 2000.

LOWE, C. R. “Biosensors” **Trends Biotechnol.**, v. 2, p. 59–65, 1984.

LYUBCHENKO, Y. L., Gall, A. A.,SHLYAKHTENKO, L. S., HARRINGTON, R. E.,JACOBS, B. L., ODEN, P. I., LINDSAY, S.M. “Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA”. **J.Biomol. Struct. Dyn.** , v.10(3),p.p 589-606,1992.

MACIEL Rafael R. G., ALMEIDA A. , ODIN G. C; GODINHO, F.D. S. GORZA, G. C. PEDRO, T. F. TRESCHER, SILVA, J. R., SOUZA N. C. “Ascorbic Acid and BSA Protein in Solution and Films:Interaction and Surface Morphological Structure”. **BioMed Research International**. 2013

MASON, JT., O’Leary, TJ., “Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation”. **J Histochem Cytochem**. Feb; v.39(2): p.p 225-9, 1991.

MEHRVAR, M. et al. “Fiber-Optic Biosensors – Trends and Advances”. **Analytical Sciences**, v.16, p.677-692, jul 2000.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. “Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors”. **Analytical Sciences**, v.20, p.1113-1126, ago 2004.

MELO, A. F. *Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis*. (Dissertação Mestrado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

MUELLER, D. J., FORIADIS, D., SCHEURING, S., MUELLER, S. A. ENGEL, A. “Electrostatically Balanced Subnanometer Imaging of Biological Specimens by Atomic Force Microscope”. *Biophysical Journal* , v 76, p.p 1101-1111,1999.

NAKANISHI K., T. Sakiyama, K. Imamura: “On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon” **J. Biosci. Bioeng.**v. 91, p.p 233–244, 2001.

NORDE W. “Biologically Modified Polymeric Biomaterial Surfaces”. **Clinical Materials**, v. 11, p.p 1-4, 1992.

NOY, A; DMITRI V. V; LIEBER, C.M.”Chemical Force Microscopy”; **Mater. Sci.** v: 27:p.p. 381-421,1997.

OBERHAUSER, MARSZALEK A. F. P. E., ERICKSON, H. P., FERNANDEZ, J. M. “The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin”. **Nature**. v.393 p.p 181-185,1998.

OHRING, M. “Materials Science of Thin Films Deposition”. **Academic Press**, v.2 , 2002.

OSADA, T., TAKEZAWA, S., ITOH, A., ARAKAWA, H., ICHIKAWA, M., IKAI, A. “The distribution of sugar chains on the vomero nasal epithelium observed with an atomic force microscopy”. **Chem. Senses** . v.24, 16,1999.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. “Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research”. **Azono Journal of Nanotechnology** , v.3, set 2007.

PELASEYED .T; ZACH. M , PETERSSON A. C., SVENSSON. F, DENNY G. A; J GUNNAR; C. HANSSON. “Unfolding dynamics of the mucin SEA domain probed by force spectroscopy suggest that it acts as a cell-protective device”. **The FEBS Journal Volume** v. 280, (6) ,p.p 1491–1501,2014.

PEREIRA, L. G. C., THÉODOLY, O., BLANCH, H. W., and Radke, C. J. “Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface”. **Langmuir**. v.19 , p.p 2349-2356, 2003.

RABE. M, VERDES.D, SEEGER. S: “Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces”. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.162, p.p 87–106,2011.

RAITERI, R.; GRATAROLA, M.; BERGER, R. “Micromechanics Senses Biomolecules”. **Materials Today**, p.p 22-29, jan 2002.

RATTO T. V., ROBERT RUDD E., KEVIN C. LANGRY,R, BALHORN .L., MCELFRISH . W.M. “ Nonlinearly Additive Forces in Multivalent Ligand Binding to a Single Protein Revealed with Force Spectroscopy”. **Langmuir** ,v 22, p.p1749-1757,2006.

RHIM, J.W, WELLER, C.L., “Properties of formaldehyde absorbed soy protein isolate films“ **Food Sci Biotechnol**. v.9(4): p.p 228-33,2000.

RICHARDS J.F., “Scanning Electron Microscopy Analysis of Fiber Free Toner Agglomeration”, J. Craig Small, R. A. Venditti and , J.A. Heitmann, TAPPI Proceedings of the 1997 Recycling Symposium, pp. 501-506, 1997.

RIEF, M., SCHAUMAN, CLAUSEN-N, H, GAUB and, H. E. “ Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules”. **Nature Struct. Biol.** v.6 ,pp. 346-349(1999).

RIEF, Matthias; GRUBLLER, H “Force Spectroscopy of Single Biomolecules” **Chemphyschem** , v3, p.p 255-261 26, 2002.

RIXMAN, M. A., DEAN D., MACIAS C. E., and ORTIZ C. “ Nanoscale Intermolecular Interactions between Human Serum Albumin and Alkanethiol Self-Assembled Monolayers” **Langmuir** v.19 p.p 6202-6218, 2003.

ROACH,PAUL; FARRAR,DAVID AND CAROLE C. PERRY, “Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes”, **J. AM. CHEM. SOC.**, v.127 , p.p 8168-8173, 2005.

SAGVOLDEN, G. –“Protein Adhesion Force Dynamics and Single Adhesion Events” **Biophysical Journal** v.77 p.p 526 –532,1999.

SAGVOLDEN,G.,GIAEVER,I.,FEDER,J. “Manipulation force microscopy”. **Rev. Sci. Instrum.** v.70 p.p 2769–2775,1999.

SAN PAOLO, A. GARCIA, R. “High resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: *Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes*”. **Biophys. J.** v 78 p.p29-51, 2000.

SARID, D.; “Scanning Force Microscopy; With Application to Electric, Magnetic, and atomic forces” **Oxford Univ. Press**, v.47, 1991.

SASSOLAS, A., BLUM, L.J., B.D. BOUVIER.L, “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors”. **Biotechnology Advances** v.30(3) p.p 489-511, 2012.

SCHAEFFER, T. E., CLEVELAND, J. P., OHNESORGE, F., WALTERS, D. A. HANSMA, P. K. “Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid”. **Journal of Applied Physics** v.80(7) p.p 3622-3627 ,1996,.

SCHMITT, L.,LUDWIG, M., GAUB, H. E. and TAMPE, R. A “Metal-Chelating Microscopy Tip as a New Toolbox for Single-Molecule Experiments by Atomic Force Microscopy”. **Biophys J.** v.78: p.p 3275-3285, 2000.

SENDEN, T. J; DRUMMOND, C. “Surface Chemistry and Tip-sample interactions in atomic force microscopy”. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v.94: p.p 1599-1605, 1995.

SIEDLECKI C.A. L.-C. Xu “Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces” *Biomaterials* .v. 28,p.p 3273–3283,2007.

STRUNZ, T., OROSZLAN, K., SCHÄFER, R., GÜNTHERODT, H-J. “Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules”. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** v. 96 ,p.p 11277-11282,1999.

THEDGOLD, R. H. “Order in thin organic films”. New York: **Cambridge University Press**, 2005.

THOMSON, N. H., FRITZ, M.,RADMACHER, M., HANSMA, P.K. “Protein tracking and observation of protein motion using atomic force microscopy”. **Biophys. J.** ,v.70(5):p.p. 2421-2431,1996.

TORMOEN, G.W; DRELICH, J.; “Analysis of Atomic Force Microscope Pull-off Forces for Gold Surfaces .Portraying Nanoscale Roughness and Specific Chemical Functionality”. **J. Adhesion Sci. Technol.**, v.18 (1):p.p1–17, 2004.

TRAN ,T , ANH T., Bryony J. JAMES- A. “study the interaction forces between the bovine serum albumin protein and montmorillonite surface Colloids and Surfaces” . **Physicochem. Eng. Aspects:** v. 414 p.p 104– 114, 2004.

TRIMUKHE, K.D.; VARMA, A.J. “Metal complexes of crosslinked chitosans: Correlations between metal ion complexation values and thermal properties”. *Carbohydr. Polym.*, v: 75, p.p 63–70,2009.

ULMAN, A., An. Introduction to Ultrathin Organic Films. **Academic Press**, Sandiego
VANDENBERG E.T., BERTILSSON L., LIEDBERG B., UVDAL K., R. ERLANDSSON, ELWING H., LUNDSTRÖM I. “struture of 3-aminopropiyl trithoxy silane on silicon oxide” **J. Colloid Interface Sci.** v.147 ,103,1991.

VOS, J. G., FORSTER, R. J., KEYES, T. E. “Interfacial Supramolecular Assemblies”. **Wiley.** pp. 88–94, 2003.

WANG, H.D. et al. "Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin". **Biophysical journal**: v.83,p.p 3619-3625 ,dec. 2009.

WEI, H.; ZHOU, L.; Li, J.; LIU, J.; WANG, E. "Electrochemical and electrochemiluminescence study of Ru(bpy)₂+3-doped silica nanoparticles with covalently grafted biomacromolecules " **J. Colloid Interface Sci**,p.p, v 321, 310–314, 2008.

WERNER,M.,et.al. "Effect of formalin tissue fixation and processing on immunochemistry". **Am J Surg Pathol**. Jul; 24(7): 1016-92, 2000.

WETTERÖ, J.; ASKENDAL, A.; BENGTSSON, T.; TENGVALL, "On the binding of complement to solid artificial surfaces in vitro" **P. Biomaterials** ,v. 23, p.p 981–991, 2002.

WILLIAMS, P. M. "Analytical description of dynamic force spectroscopy: behavior of multiple connections" **Anal. Chim. Acta** , v.479, p.p107-115, 2003.

YERSIN, A., HIRLING, H., STEINER, P., MAGNIN, S., REGAZZI, R., HÜNI, B., Huguenot, P., De Los Rios, P., Dietler, G., Catsicas, S., and Kasas, S. "Interactions between synaptic vesicle fusion proteins explored by AFM". **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v.100 p.p 8736-8741,2003.

YOTA, JIRO. "Effects of Deposition Method of PECVD Silicon Nitride as MIM Capacitor Dielectric for GaAs HBT Technology". **Electrochemical Society (ECS) Meeting**, Montreal, Canada: p.p 1-6, , 2011.

ZHU, H. et al. "Aptamer Based Microsphere Biosensor for Thrombin Detection". **Sensors**:, v.6, p.785-795, ago 2006.

ZLATANOVA, J., LINDSAY S. M., LEUBA , S. H. "Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope". **Prog.Biophys. Mol. Biol**. v. 74:p.p .37–61, 2000.