

CECÍLIA FABIANA DA GAMA FERREIRA

**ADSORÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *Herbaspirillum seropedicae*  
SOBRE A SUPERFÍCIE DA MICA ANALISADA POR MICROSCOPIA  
DE FORÇA ATÔMICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre.

Curso de Pós-Graduação em Engenharia,  
Área de Concentração: Engenharia e Ciência dos  
Materiais. Setor de Tecnologia, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Paulo César de Camargo

Co-orientador: Prof. Elaine Machado Benelli

**Curitiba**

**2008**

Aos meus pais pelo apoio na  
realização deste trabalho.

## **Agradecimento**

- Aos meus pais, Sandra e Valentin, pelo apoio, incentivo e carinho incondicionais por toda a vida.
- Ao Prof. Dr. Paulo César de Camargo pela orientação de tantos anos frente ao microscópio de força atômica e confiança.
- A Prof. Dr. Elaine Machado Benelli pelo auxílio em geral, orientação nas pesquisas, sugestões oportunas e por discussões construtivas.
- Ao Prof. Mazzaro por disponibilizar o laboratório.
- Ao LSI e ao Prof. Wido Schreiner pela utilização do espectrômetro ESCA e ao Jorge Klein pelo apoio nas medidas.
- A Terral Expedições e ao Alessandro Schwonka pelas horas agradáveis em cima da bicicleta.
- A família Krav-Magá de Curitiba pelas horas de treino e descontração.
- Aos amigos pelo suporte fundamental.
- Ao Eduardo Bach.

## Sumário

Lista de Figuras .....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Símbolos de Unidade .....	viii
Resumo .....	ix
Abstract .....	x
1. Introdução .....	1
1.1 Organização da tese .....	3
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Proteínas.....	4
2.1.1 Estrutura tridimensional .....	4
2.1.2 Estrutura tridimensional da proteína GlnB-Hs .....	5
2.2 Filmes de Proteínas .....	7
2.2.1 Preparo de filmes finos protéicos .....	7
2.2.1.1 Solução .....	7
2.2.1.2 pH .....	8
2.2.1.3 Concentração iônica.....	9
2.2.1.4 Concentração de proteínas.....	10
2.2.1.5 Propriedades estruturais da proteína .....	10
2.2.1.6 Surfactante .....	11
2.2.1.7 Substrato .....	11
2.2.1.7.1 Mica .....	12
2.2.1.7.2 Funcionalização do substrato .....	12
2.2.1.8 Deposição .....	13
2.2.1.8.1 <i>Spin coating</i> .....	13
2.2.2 Formação de filmes protéicos sobre superfícies sólidas .....	14
2.3 Microscopia de Força Atômica .....	18
2.3.1 Princípio físico do funcionamento .....	18
2.3.1.1. Modo de contato .....	19
2.3.1.2 Modo dinâmico .....	19
2.3.1.2.1 Imagem da fase.....	20
2.3.1.2.2 Nanotribologia.....	20
2.3.2 Princípio mecânico de funcionamento do MFA .....	21
2.3.3 Limitações da técnica de MFA .....	22

2.3.3.1	Resolução .....	22
2.3.3.2	Não linearidade do <i>scanner</i> .....	24
2.3.3.3	Ruídos .....	24
2.3.3.4	Modo de varredura.....	25
2.3.3.5	Outros fatores.....	25
2.3.4	Tratamento da imagem .....	25
2.4	Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X .....	25
2.4.1	Equipamento de XPS.....	28
3.	<b>Procedimento Experimental</b> .....	30
3.1	Materiais .....	30
3.1.1	Mica muscovita.....	30
3.1.2	Solução de proteína GlnB-Hs .....	30
3.1.3	Soluções para o revestimento da mica .....	30
3.1.4	Solução de $\alpha$ -cetogluturato com proteína.....	30
3.2	Métodos.....	31
3.2.1	Deposição da proteína GlnB-Hs sobre a mica para análise por MFA .....	31
3.2.2	Deposição das soluções para funcionalização da superfície da mica .....	31
3.2.3	Deposição da GlnB-Hs sobre os revestimentos .....	31
3.2.4	Deposição das soluções A e A1 para análise de XPS.....	32
3.2.5	Análise por MFA dos filmes formados sobre a mica .....	32
3.2.6	Análise por XPS.....	32
4.	<b>Resultados e Discussão</b> .....	33
4.1	Análises por MFA dos Filmes Formados sobre a Mica.....	33
4.2	XPS dos Filmes de Proteína (solução A) e da Solução de Proteína (solução A1) sobre Mica .....	39
4.3	Análise por MFA dos Filmes Formados sobre a Mica Funcionalizada.....	45
4.3.1	Fosfato .....	46
4.3.2	Etanol.....	48
4.3.3	Polilisina.....	51
4.3.4	$\alpha$ -cetogluturato .....	52
4.3.5	Discussão sobre os revestimentos .....	54
4.4	Influência da Umidade Relativa do Ar sobre a Formação do Filme Protéico .....	55
5.	<b>Conclusões</b> .....	59
6.	<b>Sugestões para Trabalhos Futuros</b> .....	61
7.	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	62

## Lista de Figuras

Figura 1: Unidade básica da proteína formando o esqueleto polipeptídico .....	4
Figura 2: Desenho esquemático da $\alpha$ -hélice (direita) e da folha- $\beta$ anti-paralela (esquerda).....	5
Figura 3: Diagrama do trímero da proteína GlnB de <i>H. seropedicae</i> .....	6
Figura 4: Estado de cargas (a-c) e potencial eletrostático (d-f) da proteína GlnB-Hs.....	6
Figura 5: Modelo mostrando efeito do pH na interação proteína-proteína .....	8
Figura 6: Curva da solubilidade dependente da concentração iônica.....	9
Figura 7: Desenho esquemático de uma estrutura ideal de mica muscovita .....	12
Figura 8: Diagrama da deposição <i>spin coating</i> mostrando o perfil da velocidade radial e da concentração com o tempo .....	13
Figura 9: Representação da molhabilidade da gota .....	16
Figura 10: Desenho esquemático de uma “proteína” com quatro lados interagindo com substratos de superfícies compatíveis.....	17
Figura 11: Diagrama das possíveis orientações de adsorção para uma proteína retangular de dimensões a x b x c em relação as demais proteínas .....	17
Figura 12: Esquema mostrando a adsorção de uma proteína a) globular e b) retangular.....	18
Figura 13: Curva esquemática mostrando a dependência da força de interação sonda-amostra em função da distância entre elas .....	19
Figura 14: Desenho esquemático do modo contraste de fase.....	20
Figura 15: Desenho esquemático dos componentes do microscópio de força atômica.....	22
Figura 16: Diagrama esquemático ilustrando o menisco de água .....	22
Figura 17: Interação sonda-amostra .....	23
Figura 18: Distorção vertical do plano da imagem.....	24
Figura 19: Esquema do processo XPS.....	26
Figura 20: Diagrama de níveis de energia para elétron Auger .....	27
Figura 21: Esquema de um equipamento de XPS .....	28
Figura 22: Efeito da concentração de sal na estrutura supramolecular do filme protéico formado sobre a mica .....	33
Figura 23: Topografia dos filmes de NaCl e Tris formada sobre a mica .....	34
Figura 24: Efeito do tempo de adsorção na estrutura do filme protéico formado sobre a mica.....	35
Figura 25: Diagrama esquemático mostrando a expansão lateral do filme de proteínas através da adição lateral de proteínas às já existentes.....	36
Figura 26: Efeito do tempo de adsorção na estrutura do filme protéico formado sobre a mica.....	37
Figura 27: Topografia da superfície da mica obtida por MFA operando em modo contato ....	38
Figura 28: Espectros de XPS das superfícies da mica (preto) e da mica/solução A1 (azul) e da mica/ solução A (rosa).....	40

Figura 29: Curvas normalizadas e deconvoluidas dos elementos atômicos C 1s e K 2p dos filmes formados pelas soluções A e A1 por <i>drop deposition</i> .....	41
Figura 30: a) Fórmula estrutural de uma molécula de Tris e b) Desenho esquemático da distribuição das moléculas na solução A por microlitro na solução.....	42
Figura 31: Espectro dos fotoelétrons provenientes do elemento N 1s da mica/solução A1 (azul) e mica solução A (rosa).....	42
Figura 32: Espectro XPS do elemento Na 1s proveniente do NaCl (1072eV) da mica/solução A (rosa) e mica/solução A1 (azul) plotados com a subtração do <i>background</i> .....	43
Figura 33: Desenho esquemático das camadas de energia para o átomo de sódio.....	44
Figura 34: Topografia do revestimento da mica com solução fosfato (20µl).....	46
Figura 35: Topografia do filme da solução B formado sobre a mica funcionalizada com PO <sub>4</sub> (20µl) por <i>spin coating</i> .....	47
Figura 36: Topografia do revestimento da mica por imersão na solução fosfato por 12h .....	47
Figura 37: a) Fórmula estrutural da molécula de etanol e b) disposição das moléculas de etanol sobre a superfície da mica .....	48
Figura 38: Topografia dos filmes da solução A formados sobre a mica funcionalizada com etanol (20µl) depositado por <i>spin coating</i> .....	49
Figura 39: Topografia do filme da solução A formado sobre a mica funcionalizada por imersão no etanol por 12h .....	50
Figura 40: Fórmula estrutural da molécula de lilisina .....	51
Figura 41: Topografia dos filmes da solução A formados sobre a mica funcionalizada com polilisina 0,001mg/ml (20µl) depositado por <i>spin coating</i> por 30s.....	51
Figura 42: Topografia do filme formado pela solução A sobre a mica funcionalizada com polilisina. A deposição da polilisina 0,001mg/ml foi realizada por imersão durante 12h.....	51
Figura 43: Molécula de α-cetoglutarato .....	52
Figura 44: Topografia dos filmes da solução A e A1 depositados dinamicamente sobre a mica funcionalizada com α-cetoglutarato .....	53
Figura 45: Topografia do filme da solução A formado sobre a mica funcionalizada com α-cetoglutarato .....	53
Figura 46: Topografia do filme da solução A/α-cetoglutarato. A solução D (5µl) foi depositada por <i>spin coating</i> sobre a mica.....	53
Figura 47: Evolução da forma e tamanho das estruturas de água formada após contato imediato com a superfície da mica .....	56
Figura 48: Evolução do filme protéico formado pela solução C depositada dinamicamente com 30s de adsorção sobre a mica .....	57

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentração final de proteína GlnB-Hs e NaCl nas soluções após diluição.....	30
Tabela 2: Dimensões das estruturas formadas a partir das soluções A, B, NaCl 50mM e Tris 50mM depositadas por <i>drop deposition</i> sobre a mica com 24h de incubação .....	34
Tabela 3: Dimensões dos arranjos auto-organizado da GlnB-Hs na solução A sobre mica durante deposição por <i>spin coating</i> .....	38
Tabela 4: Energias de ligação XPS dos elementos N 1s, C1s, Si 2p e do Na 1s para suas diferentes formas encontrados nas superfícies analisadas da mica, mica/solução A e mica/solução A1 .....	39
Tabela 5: Energia de ligação do C 1s para suas diversas formas químicas presentes nos sistemas conteno solução analisados .....	41
Tabela 6: Energia de ligação do N 1s para suas diversas formas químicas presentes nos sistemas conteno solução analisados .....	43
Tabela 7: Energias de ligação para as camadas K, L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> e L <sub>3</sub> do elemento sódio .....	45
Tabela 8: Índices das soluções usadas para a funcionalização da superfície da mica.....	45
Tabela 9: Índices dos respectivos métodos de deposição .....	45
Tabela 10: Valores da rugosidade das dos filmes protéicos depositados sobre mica revestida com etanol por imersão e <i>spin coating</i> .....	50
Tabela 11: Rugosidade dos filmes protéicos obtidos pela deposição da solução A e A1 sobre os revestimentose da mica com PO <sub>4</sub> , etanol, polilisina e $\alpha$ -cetogluturato.....	55

## Símbolos de Unidades

Comprimento:	Å	ångström ( $10^{-10}\text{m}$ )
	m	metro
	nm	nanometro ( $10^{-9}\text{m}$ )
	µm	micrometro ( $10^{-6}\text{m}$ )
Força (F):	N	newton
Frequência:	Hz	hertz
Massa:	g	grama
	kg	quilograma
	ng	nanograma ( $10^{-9}\text{g}$ )
	Da	dalton ( $1\text{u} = 1,7 \cdot 10^{-23}\text{kg}$ )
Potencial elétrico:	V	volt
Tempo:	s	segundo

## Resumo

A adsorção da proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* (GlnB-Hs) sobre a superfície da mica com e sem revestimento foi analisada por microscopia de força atômica (MFA). A proteína GlnB-Hs é um homotrímero (36kDa), globular e solúvel, que faz parte da família das proteínas PII, que são proteínas transdutoras de sinal encontradas em procariotos, arquea e eucariotos. A solução da proteína GlnB-Hs foi depositada por diferentes métodos sobre a superfície da mica sem e com revestimento. Os revestimentos utilizados para funcionalizar a mica foram: fosfato 0,014g/L, etanol 98%, polilisina 0,001mg/ml e  $\alpha$ -cetogluturato 0,5mM. Os auto-arranjos encontrados nos filmes da proteína GlnB de *H. seropedicae* foram analisados por microscopia de força atômica em modo dinâmico. As imagens topográficas mostraram que as estruturas dos filmes protéicos são influenciadas pelo método de deposição, tempo de adsorção, pela presença de Tris e concentração de sal na solução de proteína, polaridade da superfície do substrato e estrutura molecular dos materiais utilizados no revestimento da mica. Os filmes protéicos formados sobre a superfície da mica e da mica revestida com fosfato apresentam estruturas supramoleculares em forma de anéis. Enquanto que, sobre a mica funcionalizada com polilisina, etanol e  $\alpha$ -cetogluturato apresentaram estruturas supramoleculares diferentes em forma e tamanho. Embora, a umidade interfira na formação dos filmes de proteína GlnB-Hs, houve reprodutibilidade no perfil das amostras preparadas sob diferentes condições ambientes. Ensaios iniciais de espectroscopia de fotoelétrons (XPS) foram realizados para caracterizar a adsorção da proteína sobre a mica. Os resultados sugerem que não houve reação química significativa da proteína com a superfície, indicando que os filmes formados pela proteína GlnB-Hs estão estabilizados por interações fracas. Estes resultados contribuem na interpretação de imagens de MFA resultantes da adsorção da proteína GlnB-Hs sobre superfícies sólidas e possíveis artefatos devido a sais presentes na solução.

## Abstract

The adsorption of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein (GlnB-Hs) on mica surface with and without treatment was visualized by atomic force microscopy (AFM). The GlnB-Hs is a homotrimer (36kDa), globular, soluble protein and a member of PII-like proteins family which are signal transducer protein found in prokaryote, arqueas and eukaryote. A GlnB-Hs solution was dispensed by different methods onto mica surface and mica functionalized. The mica surface was functionalized with  $\text{PO}_4$  0,0014g/L, ethanol 98%, polylysine 0,001mg/ml and  $\alpha$ -ketoglutaric acid 0,5mM. The self-organized structures observed in protein GlnB-Hs films were analyzed by atomic force microscopy in dynamic mode. The topographic AFM images showed that the protein films supramolecular structures are influenced by deposition methods, adsorption time, by the presence of Tris and salt concentration in the protein solution, substrates surface polarity and molecular structure of the material used to functionalize the mica. The protein films formed onto mica surface and mica functionalized with polylysine have supramolecular structures in doughnut-like shape, whereas mica functionalized with polylysine, ethanol and  $\alpha$ -ketoglutaric have supramolecular structures with spherical-like shape. Besides the relative humidity (RH) interference in the protein GlnB-Hs film formation, the samples pattern observed were reproducible under different conditions. X-Ray Photoelectrons Spectroscopy (XPS) results do not show any evidence of chemical reaction between solution compounds, protein and mica surface. These results contribute to the understanding of AFM image formation due to GlnB-Hs protein deposition on mica and possible artifacts due to salt contribution.

## 1. Introdução

A auto-organização de biomoléculas recentemente emergiu como método alternativo para fabricação de uma variedade de materiais na escala de poucos nanômetros à macroscópica. O revestimento de superfícies sólidas com monocamadas de materiais orgânicos tem atraído muita atenção no desenvolvimento de sensores, dispositivos moleculares eletrônicos e na organização de estruturas supramoleculares [1].

Auto-organização é definida como uma organização espontânea de componentes individuais em uma estrutura ordenada sem a intervenção humana. Os elementos que direcionam a auto-organização são complementares entre os componentes individuais, interações fracas e não covalentes. As proteínas são macromoléculas que apresentam maior diversidade funcional nos seres vivos. A função biológica de uma proteína está diretamente associada a sua estrutura tridimensional que é determinada pela sua seqüência de aminoácidos. Proteínas enrolam-se no meio intracelular devido a interações intramoleculares de seus aminoácidos. Estas interações dependem da estrutura e polaridade das cadeias laterais dos aminoácidos.

Especificamente, estudos sobre a adsorção de proteínas, polímeros orgânicos, sobre superfícies sólidas têm sido amplamente desenvolvidos devido a propriedade destas em aderir nas interfaces [2]. A adsorção das proteínas em superfícies sólidas pode ser usada para a construção de biosensores [3], implantes [2], testes imunológicos [4], sistemas de transporte de drogas [2], microarranjos de proteína [5], para a cristalização de proteínas usando os nanofilmes como molde [6].

Cristais formados por este método apresentam maior estabilidade à radiação. Esta técnica possibilitará um grande avanço no processo de cristalização devido à rapidez e a utilização de pequenas quantidades de proteínas, além de contribuir para a determinação de estrutura de proteínas pouco solúveis e proteínas que não cristalizam facilmente. Assim, estudos do mecanismo de auto-organização de macromoléculas podem gerar conhecimento em diferentes áreas.

Pode-se identificar a função de uma proteína desconhecida pelo método “culpado por associação” [5, 7], uma vez que as interações proteína-proteína são ordenadas na célula. Identificando a interação entre uma proteína com função desconhecida e uma outra com função conhecida é, muitas vezes, a chave para elucidar a função da proteína sem função descrita.

Uma das ferramentas que tem contribuído fortemente desde a sua invenção para o estudo de superfícies revestidas com macromoléculas biológicas (neste caso as proteínas) e suas interações (superfície/proteína e proteína/proteína) são os microscópios de varredura por sonda (SPM) [8, 9].

O microscópio de varredura por sonda (SPM) é uma família relativamente nova de microscópios que podem medir a superfície morfológica no nível atômico, em que os critérios de Rayleigh são superados, uma vez que para a obtenção de imagens não se faz uso de lentes [10].

Um microscópio de varredura por sonda é composto, basicamente, de uma sonda sensora, cerâmicas piezelétricas para posicionar a amostra e fazer varreduras, circuitos de realimentação para controlar a posição vertical da sonda e um computador para mover as sondas de varredura, armazenar dados e os converter em imagens por meio de programas de computador específicos para esse fim [9,11].

Através das técnicas de microscopia de varredura por sonda, a superfície dos materiais é observada em escala nanométrica, sendo manipuladas em ar, meio líquido ou vácuo, tendo à possibilidade de grandes ampliações na direção z, além de permitirem a

manipulação de átomos e moléculas e fornecer informações sobre condutividade elétrica, dureza e propriedades magnéticas das amostras [9, 12].

O MFA é o mais difundido entre a família dos SPMs e a interação sonda-amostra ocorre por força de van der Waals fornecendo informações sobre a topografia, elasticidade e plasticidade da superfície da amostra [12, 13, 14].

Para se obter resultados de alta resolução, confiabilidade e reprodutibilidade tais análises, tanto em ar quanto em meio líquido, o material biológico deve estar firmemente aderido à superfície de um suporte sólido (substrato), manter-se ativos, serem estáveis e não se soltarem (desorverem) com o tempo [15], pois nos modos operacionais do MFA forças laterais são exercidas pela sonda na superfície da amostra o que pode danificar a superfície da biomolécula [8] ou até mesmo ser arrastada pela sonda [13].

Apesar de várias décadas no estudo da adsorção de biomoléculas em sólidos, a habilidade de controlar a interação da proteína na superfície continua imperfeita, devido a complexidade das moléculas e, principalmente, ao direcionamento espacial da proteína na adesão [4].

Porém, importantes dados experimentais vêm contribuindo para elucidar este problema, mostrando o papel desempenhado pela polaridade dos grupos funcionais na interação com as proteínas [16], a molhabilidade da superfície [17] e as camadas de hidratação das proteínas na resistência à adsorção nas superfícies [18].

A habilidade de controlar a adesão das proteínas em substratos, além de importante para a construção de amostras para análise com o microscópio de força atômica também contribuem para os avanços na área de micro e nano-fabricação, separação por cromatografia e ensaios para desenvolvimento de drogas e diagnósticos [19].

O objetivo deste trabalho foi estudar os fatores que influenciam a formação de filmes da proteína GlnB da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (GlnB-Hs) sobre mica com e sem tratamento, para posteriormente otimizar condições para obtenção de uma monocamada de proteína.

A família de proteínas do tipo PII tem como principal representante a proteína GlnB, uma proteína transdutora de sinal envolvida na regulação da atividade das proteínas relacionadas com a utilização de fonte alternativas de nitrogênio [20]. A proteína GlnB-Hs é uma proteína globular, trimérica (36kDa) e sua estrutura tridimensional foi determinada por difração de Raios-X [21].

A mica é um cristal mineral formado por vários planos de clivagem atômica lisos por várias centenas de  $\mu\text{m}^2$  e que pode ser facilmente clivada com uma simples fita adesiva, produzindo uma superfície lisa, limpa e hidrofílica ao nível atômico [8] e por isso foi escolhida como substrato.

As estruturas supramoleculares formadas nos filmes de proteína GlnB-Hs sobre mica foram analisadas por microscopia de força atômica através de seu perfil de auto-organização sobre as superfícies. Neste contexto, procuramos contribuir para conhecimento geral de biofísica, estrutura de proteínas, compreensão da interação de proteínas com superfícies sólidas e suas implicações e posteriormente nanotecnologia.

Assim colaborando para concretizar todo o potencial desta nova área usando conhecimento das áreas envolvidas – biologia, física, química, farmácia, engenharia – cruzando barreiras, utilizando as habilidades e as linguagens das várias ciências que necessitam para fazer os sistemas vivos e os artificiais trabalharem lado a lado.

## 1.1 Organização da tese

Primeiramente, uma revisão sobre estrutura e sobre a proteína GlnB-Hs, os aspectos cruciais que devem ser levados em consideração no preparo e formação de um filme de proteína e os princípios de funcionamento do microscópio de força atômica e espectroscopia de fotoelétrons. E finalmente são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

No Capítulo 2 (Revisão Bibliográfica) traz uma visão geral sobre estruturas tridimensionais de proteínas, em particular a estrutura tridimensional e a distribuição de cargas na superfície da proteína GlnB-Hs. A influência das características da solução de proteína, da superfície do substrato e o método de deposição sobre a formação de um filme protéico também será discutida neste capítulo. E, como se dá a auto-organização dessas macromoléculas na interface sólido/líquido. Ainda será descrito os princípios das técnicas de microscopia de força atômica (MFA) e de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) usadas para analisar os filmes obtidos pela solução de proteína GlnB-Hs.

O Capítulo 3 (Procedimento Experimental) descreve os materiais utilizados e os métodos de deposição utilizados (*drop deposition*, imersão e *spin coating*) para a obtenção dos filmes protéicos sobre a mica sem e com revestimento.

No Capítulo 4 (Resultados e Discussão) é dedicado aos resultados da investigação por MFA e o XPS sobre os filmes de proteína GlnB-Hs formados sobre diferentes condições de deposição e polaridade da superfície do substrato obtida com os revestimentos. Correlações dos diferentes padrões e estruturas supramoleculares dos filmes são discutidos. Neste capítulo é discutido a influência da umidade relativa do ar na formação do filme de proteína e a interferência deste na formação da imagem de MFA.

O quinto capítulo (Conclusão) é dedicado as conclusões obtidas das imagens de MFA e os dados de XPS obtidos da adsorção da proteína GlnB-Hs sobre a mica com e sem funcionalização e o sexto e último capítulo é reservado as sugestões para trabalhos futuros.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Proteínas

Proteínas são macromoléculas de alto peso molecular que participam de todos os processos celulares. A multiplicidade de funções desempenhadas pelas proteínas resulta do grande número de diferentes formas tridimensionais que estas podem assumir já que a sua função é determinada pela estrutura [22].

As proteínas são polímeros orgânicos formada pela ligação covalente de aminoácidos (ligação peptídica). Os aminoácidos são formados: do grupo carboxila (-COOH) do primeiro aminoácido e com o grupo amina (R-NH<sub>2</sub>-) do segundo aminoácido formando as ligações peptídicas (ligação covalente) com a perda de uma molécula de água, formando o chamado esqueleto polipeptídico (Figura 1).

Normalmente, são encontrados 20 tipos de aminoácidos nas proteínas e sua seqüência é definida pelo código genético. Cada aminoácido possui uma cadeia lateral diferente ligada ao carbono  $\alpha$ .

As cadeias laterais (R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> da Figura 1) conferem a cada aminoácido suas características químicas próprias. As cadeias laterais são formadas por aminoácidos apolares e polares, carregados positiva ou negativamente.

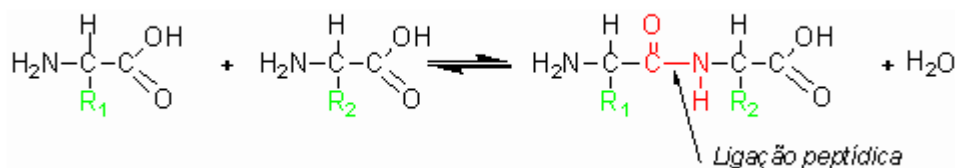


Figura 1: Unidade básica da proteína formando o esqueleto polipeptídico. R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> simbolizam o radical. Adaptado de [22].

A versatilidade química que os 20 aminoácidos comuns possuem é de importância vital para a função das proteínas. Assim, além dos 20 aminoácidos padrões cada qual com diferentes propriedades químicas, os resíduos na proteína podem, também, ser alterados quimicamente nas modificações pós-traducionais (eventos de processamento covalente que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos).

#### 2.1.1 Estrutura tridimensional

As proteínas podem ter quatro níveis estruturais:

1) Estrutura primária: nível estrutural mais simples e importante formado pela seqüência de aminoácidos ligados covalentemente ao longo da cadeia polipeptídica que originará todo o arranjo espacial da molécula.

2) Estrutura secundária: dado pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na seqüência primária da proteína, devido a rotação das ligações entre os carbonos  $\alpha$  dos aminoácidos e seus agrupamentos amina e carboxila.

As estruturas secundárias mais frequentes são: as  $\alpha$ -hélice e as folhas- $\beta$  (Figura 2).

Nas  $\alpha$ -hélice o esqueleto polipeptídico está estreitamente enrolado ao longo do maior eixo da molécula e os grupos R dos resíduos de aminoácido projetam-se para fora do esqueleto helicoidal em direção perpendicular ao eixo da hélice. A estabilização desta estrutura ocorre pelas ligações de ponte de hidrogênio entre o grupamento CO de cada

aminoácido, com o grupamento NH do aminoácido que está situado a quatro unidades adiante na seqüência linear, sendo que todos os grupamentos NH e CO formam pontes de hidrogênio.

A outra estrutura frequente é a folha- $\beta$ , em que a cadeia polipeptídica forma uma estrutura em zig-zag em que as cadeias laterais de aminoácidos distantes de dois resíduos interagem. A estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio formadas entre o NH de uma fita  $\beta$  com o CO de outra fita  $\beta$ , formando a estrutura em folha. Os grupos R (cadeia lateral) se alternam para cima e para baixo ao longo do esqueleto estendido.

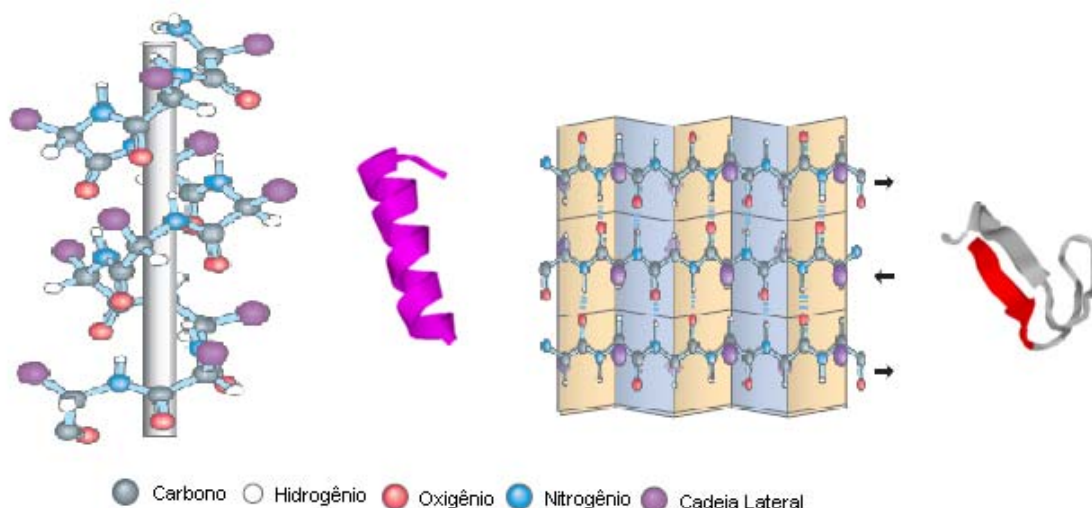


Figura 2: Desenho esquemático da  $\alpha$ -hélice (direita) e da folha- $\beta$  anti-paralela (esquerda). A primeira representação mostra todos os átomos no esqueleto polipeptídico, com as cadeias laterais representadas pela cor roxa enquanto que o segundo desenho mostra os símbolos usualmente utilizados para representar a alfa-hélice e a folha  $\beta$  em modelos esquemáticos de proteínas. [Adaptado de 22].

3) Estrutura terciária: resulta do enrolamento das estruturas secundárias. Neste caso, aminoácidos distantes na cadeia polipeptídica passam a interagir. A estrutura é estabilizada por interações fracas (pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas) e em alguns casos por interações fortes (ligações covalente), por exemplo, as pontes de sulfeto.

Se a proteína é monomérica, ou seja, só apresenta uma cadeia polipeptídica a estrutura terciária corresponde ao maior nível estrutural da proteína e a estrutura terciária confere a estas proteínas sua atividade biológica.

4) Estruturas quaternárias: quando as proteínas apresentam duas ou mais cadeias polipeptídicas a estrutura quaternária é o último nível estrutural da proteína. Esta estrutura é caracterizada pela interação de cadeias laterais de aminoácidos de cadeias polipeptídicas diferentes.

### 2.1.2 Estrutura tridimensional da proteína GlnB-Hs

A proteína GlnB é uma proteína globular e a principal representante da família de proteínas do tipo PII [20].

As proteínas da família PII são encontradas em bactérias, arqueas e plantas e auxiliam na coordenação do metabolismo de nitrogênio, carbono e energia controlando a atividade de proteínas e enzimas envolvidas nas respostas celulares a estes sinais.

GlnB é uma proteína transdutora de sinal envolvida na regulação da atividade das proteínas relacionadas com a utilização de fontes alternativas de nitrogênio [20] em muitas bactérias, incluindo a *Herbaspirillum seropedicae* [23].

*H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, diazotrófica que foi isolada da rizosfera de gramíneas, raízes de milho, sorgo e arroz e de caules e folhas de diferentes culturas de cana-de-açúcar, bananeira e abacaxizeiro [24, 25, 26].

Sua estrutura tridimensional foi determinada por difração de Raios-X [21]. As proteínas GlnB-Hs são homotrimeros de 36 kDa e cada monômero é formado por um núcleo que contém um duplo motivo  $\beta\alpha\beta$  que é bem conservado entre as proteína da família PII (Figura 3).

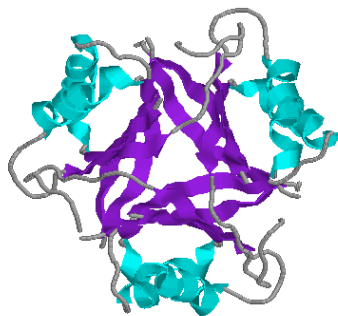


Figura 3: Diagrama do trímero da proteína GlnB de *H. seropedicae*

As folhas  $\beta$  do motivo  $\beta\alpha\beta$  estão alinhadas no interior da cavidade central formada pela união dos monômeros e as  $\alpha$ -hélices situam-se na periferia da proteína. O interior da cavidade central é hidrofóbico. Entre os monômeros formam-se três cavidades laterais que são constituídas majoritariamente por aminoácidos hidrofílicos.

A face inferior do trímero, por convenção, é a face que possui a volta C e contém resíduos carregados negativamente (Figura 4-a)). A outra face (face superior) da proteína também é negativamente carregada (Figura 4-c)). As cargas positivas são localizadas na face lateral da proteína, ao redor da volta B (Figura 4-b)).

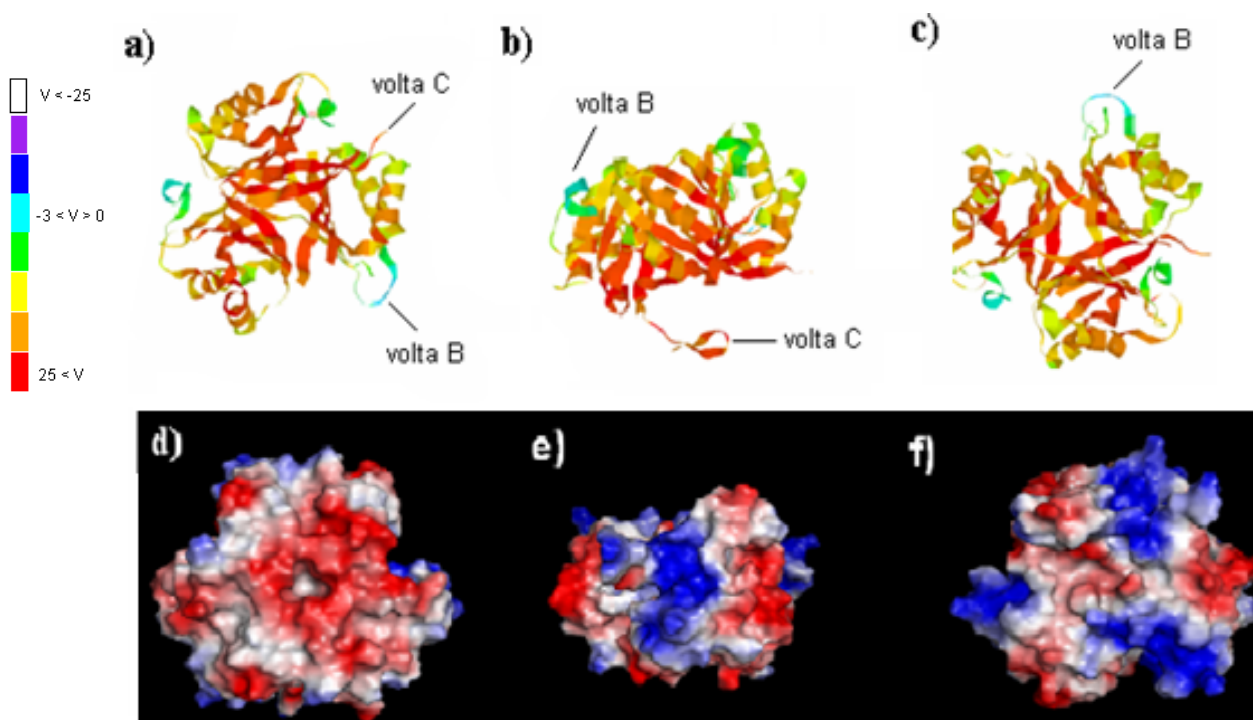


Figura 4: Estado de cargas (a-c) (Adaptado de [27]) e superfície molecular (d-f) da proteína GlnB-Hs. a) e d) face interior, b) e e) face lateral e c) e f) face superior. Imagem e convenção de cores (RASMOL).

As cargas de valor mais baixo (negativa) passam do vermelho até o azul, valor mais alto (positiva) (RASMOL) [27]. O azul claro corresponde à volta B, onde estão concentradas as cargas positivas.

A superfície molecular da GlnB-Hs (Figura 4-d, e) e f)) mostra a distribuição de cargas na superfície do trímero, na qual os resíduos ácidos da cadeia lateral estão representados em vermelho, os resíduos básicos em azul e os demais em branco. Os resíduos hidrofóbicos estão situados preferencialmente no interior da proteína (branco), nas folhas  $\beta$  e nas  $\alpha$ -hélices, e os resíduos polares encontram-se na superfície da proteína. A face inferior apresenta uma maior concentração de cargas negativas, a face superior um equilíbrio na distribuição de cargas e na lateral observa-se uma maior quantidade de cargas positivas, devido a presença da volta B.

## **2.2 Filmes de Proteína**

### **2.2.1 Preparo de filmes finos protéicos**

Uma das principais limitações para estudos de filmes finos biológicos tem sido o seu preparo. No caso de amostras com proteínas, a construção da interface substrato-proteína deve respeitar as exigências: a imobilização da proteína na superfície em seu estado ativo de maneira estável, que não desorvam com o tempo e que o método utilizado para a análise do filme não interfira nos resultados. Assim a adesão da molécula deve ser realizada de tal modo que um ambiente apropriado seja mantido, evitando mudanças conformacionais [5, 15].

A interação proteína-proteína varia dependendo do pH, concentração de sal, valência dos íons, polaridade do solvente e a presença de certos cofatores durante o período de incubação com as proteínas alvos. Algumas interações podem necessitar da presença adicional de outras proteínas [4, 5, 15].

Sendo assim, é importante utilizar um método que ligue a amostra fortemente ao substrato e que ao mesmo tempo não cause alterações estruturais e desnaturações devido a maior energia de ligação da superfície com a molécula [13, 28]. Estas mudanças conformacionais também podem ser induzidas pela mudança da tensão superficial da solução durante o processo de secagem ou congelamento do material ou, ainda, pelas distorções topográficas causadas pelo tipo de deposição [13].

#### **2.2.1.1 Solução**

As soluções também devem ser preparadas de modo a fornecerem condições estáveis e fisiológicas para interação da proteína na superfície do substrato [15]. As propriedades das proteínas como carga, tamanho, estabilidade da estrutura (dura ou mole – relacionada a conformação da proteína durante a adsorção), composição de aminoácidos e conformação podem afetar a quantidade de proteína adsorvida [29].

A adsorção de biomoléculas às superfícies sólidas pode ser otimizado ajustando-se pH, força iônica e a composição da solução que contém a biomolécula [8, 13, 30]. Estes fatores afetam uma ou mais forças que direcionam as interações das biomoléculas com o substrato, tais como as forças eletrostáticas, van der Waals, hidrofóbicas, hidratação e forças químicas específicas [30].

### 2.2.1.2 pH

Interações eletrostáticas são importantes na adesão da proteína e são dependes do pH e da força iônica do sistema que contém a proteína.

As interações eletrostáticas, bem como outros tipos de interação fracas fazem com que as proteínas tendam a se agregarem e a precipitarem no seu pH isoelétrico, chamado de ponto isoelétrico, pI. No pI há o equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína e a carga líquida da molécula, neste ponto, é zero. Por exemplo, a proteína  $\beta$ -lactoglobulina encontrada no leite forma agregados devido a mistura de caráter aniônico e catiônico no ponto isoelétrico de 5,3 (Figura 5) [31].

Acima ou abaixo do valor do pI, as proteínas possuem tanto cargas positivas quanto negativas na superfície, atraindo ou repelindo umas às outras (Figura 5).

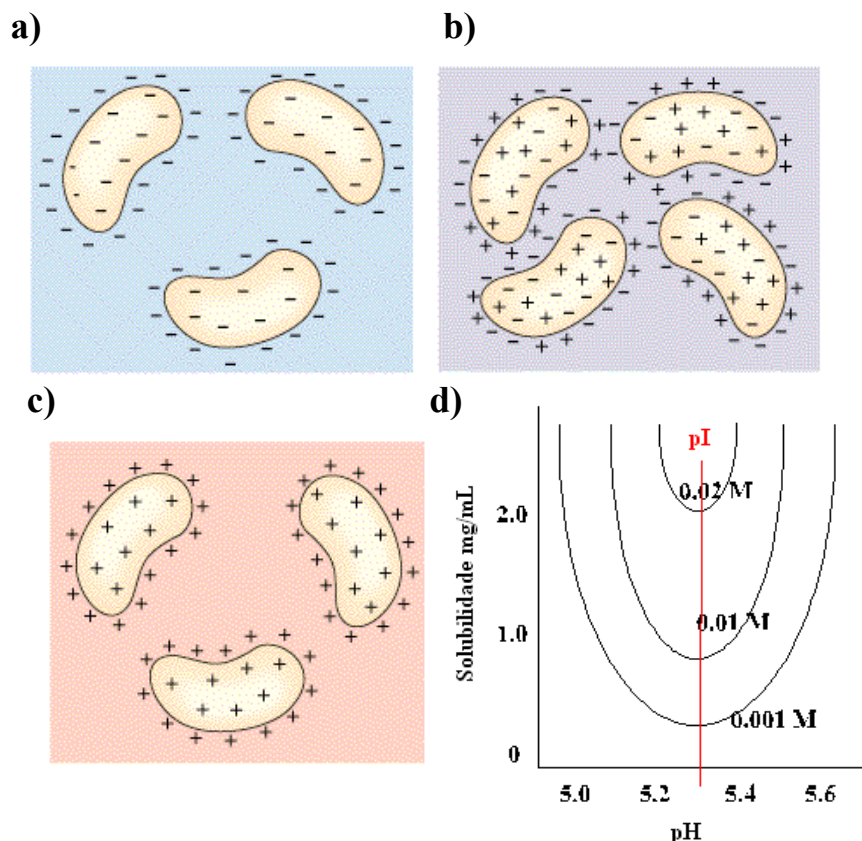


Figura 5: Modelo mostrando efeito do pH na interação proteína-proteína. a) alto valor de pH: proteína solúvel (desprotonada), b) no valor ponto isoelétrico: agregados, c) baixo valor de pH: proteína solúvel (protonada) [31] e d) gráfico da solubilidade versus o pH da proteína  $\beta$ -lactoglobulina em diferentes concentração de NaCl [32].

A mudança na adsorção das proteínas em função do pH pode ser atribuída a uma mudança nas pontes de hidrogênio que são mínimas em soluções com pH próximo do seu ponto isoelétrico, pois um aumento na força iônica da solução bloqueia, mais eficientemente, as cargas das proteínas e da superfície e, conseqüentemente, reduz a adsorção [30, 33].

Em baixos valores de pH, ocorre um aumento da quantidade de pontes de hidrogênio entre o grupo carboxil das proteínas e a superfície do substrato faz aumentar as forças de adesão. Já em valores maiores de pH a redução na adesão esta relacionada ao aumento das forças eletrostáticas repulsivas no sistema [30].

### 2.2.1.3 Concentração iônica

A adição de sal na solução comprime a camada de solvatação das proteínas e aumenta a interação entre as mesmas. Conforme a concentração de sal na solução vai aumentando, mais moléculas do solvente ficam associadas com os íons da solução. Como resultado, menos solvente fica disponível para participar da camada de solvatação das proteínas, expondo padrões hidrofóbicos na superfície da proteína. Assim, as proteínas podem exibir interações hidrofóbicas, agregarem-se e precipitarem na solução.

Os padrões hidrofóbicos expostos na superfície da proteína geram camadas altamente ordenadas de água, resultando num pequeno decréscimo da entalpia,  $\Delta H$ , e uma grande diminuição da entropia,  $\Delta S$ , da ordenação das moléculas de água em relação às moléculas presentes na solução. A variação total da energia livre,  $\Delta G$ , é dada pela equação de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.2.1),$$

em que  $\Delta G$  é a variação da energia livre,  $\Delta H$  é a variação da entalpia,  $\Delta S$  variação de entropia de acordo com a precipitação das macromoléculas na solução e  $T$  é a temperatura absoluta [34, 35].

O decréscimo na solubilidade da proteína segue uma curva de solubilidade normalizada como mostrada na Figura 6. A relação entre a solubilidade da proteína e a concentração iônica da solução pode ser representada pela equação de Cohn:

$$\log S = B - KI \quad (2.2.2),$$

em que  $S$  corresponde a solubilidade da proteína,  $B$  é a solubilidade ideal,  $K$  é uma constante (função do pH, mistura e do sal) e  $I$  é a concentração iônica da solução, a qual é atribuída ao sal acrescentado e é dado por [34, 35].

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (2.2.3),$$

em que  $z_i$  é a carga do íon do sal e  $c_i$  é a concentração do sal.

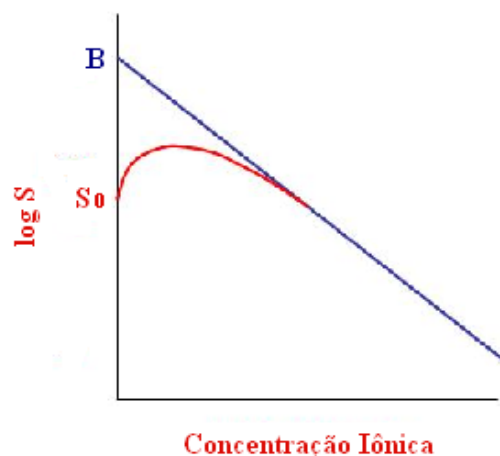


Figura 6: Curva da solubilidade dependente da concentração iônica.  $S$  corresponde a solubilidade da proteína e  $B$  é a solubilidade ideal. Adaptado de [34].

A redução das repulsões eletrostáticas devido ao aumento da concentração iônica que comprime a camada de solvatação dos biopolímeros [30] favorece uma melhor adesão das proteínas sobre as superfícies.

Porém, uma menor força de adesão aparece com o aumento da concentração iônica, que pode estar relacionada a mudança inicial do tamanho da proteína em uma solução com uma concentração iônica fixa [30]. Em uma concentração baixa de sal os biopolímeros estarão em um estado mais relaxado e mais expandido na solução, fornecendo maior potencial de ligação para os sítios, entretanto conforme a concentração iônica aumenta o polímero fica mais compacto e comprimido, formando um denso núcleo e fornecendo uma menor possibilidade de interação [30]. Assim, quanto mais condensada a estrutura em uma alta concentração iônica mais fraca a ligação com a superfície, levando a menores forças de adesão.

De acordo com os fatores explicados acima, conjuntos de biomoléculas e supramoléculas podem ser imobilizados na mica se a repulsão eletrostática for minimizada, o que pode ser alcançado variando a concentração de iônica e o pH das soluções [8].

#### **2.2.1.4 Concentração de proteínas**

A adesão também depende da concentração das proteínas [33, 36]. Em baixas concentrações de proteína, esta pode maximizar suas interações com a superfície tanto pela sua orientação espacial na superfície do substrato quanto pela sua desnaturação e adsorção irreversível. Em altas concentrações as proteínas sofrem menor interação com a superfície, mantendo sua conformação, e desorvem mais facilmente [33].

Adsorção de soluções com baixa concentração de lisozima aparentemente não causa significativa desnaturação das camadas protéicas que parecem assumir uma configuração de adesão paralela, lado a lado. Em altas concentrações de proteínas a adesão ocorre em dois tempos: inicialmente as moléculas de proteína adsorvem rápida e diretamente à superfície sem alterar a sua conformação; o segundo processo ocorre lentamente e a espessura de camadas aumenta gradativamente com a quantidade de proteína adsorvida na direção normal à superfície [29]

Ohnishi et al. (1998) [36] mostrou que o aumento da concentração da proteína A (proteína originalmente encontrada na parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* e utilizada em pesquisas bioquímicas devido a sua habilidade de ligar imunoglobinas) na solução depositada sobre a mica recém clivada aumentava a espessura do biofilme, além de cobrir toda a área do substrato por posicionarem-se lado a lado produzindo uma outra orientação preferencial de adsorção.

#### **2.2.1.5 Propriedades estruturais da proteína**

As propriedades estruturais da proteína também direcionam a sua adsorção e integridade conformacional na superfície do substrato [33].

Há proteínas que apresentam alta estabilidade interna e que aderem à superfícies hidrofílicas e são, geralmente, pequenas. Estas proteínas são chamadas de proteínas “duras”, como as lisozimas e RNAses [33, 37]. Por outro lado, proteínas com baixa estabilidade interna, chamadas de proteínas “moles”, como a BSA, HSA, imunoglobina (IgG) e hemoglobina tendem a adsorver em todas as superfícies independente das interações eletrostáticas, devido ao ganho na entropia conformacional, que provoca uma mudança conformacional significativa [33]. Por esta razão, as proteínas “moles” aderem até mesmo em superfícies eletrostaticamente repelentes [29].

Apesar, da razão adsorção/tempo depender de vários fatores, para as proteínas “duras” este processo é relativamente rápido, enquanto que para as proteínas “moles” é mais lento e acompanhado de mudança estrutural, principalmente, quando há uma repulsão eletrostática entre a proteína e a superfície [38]. Entretanto, mesmo para as proteínas “duras”, leva-se certo tempo para alcançar o equilíbrio na adsorção quando ocorre uma mudança conformacional ou um rearranjo da estrutura da proteína aderida [Lee 1989 apud 29].

#### 2.2.1.6 Surfactante

Surfactantes ou tensoativos são compostos orgânicos, constituídos por moléculas anfífilas contendo partes polares (cabeça) e apolares (cauda), com propriedades de atividade superficial, resultado da adsorção destes compostos na superfície de líquidos, na interface entre dois líquidos imiscíveis [39] ou na interface entre sólidos e líquidos. O padrão no qual eles adsorvem é bem definido devido às propriedades do final de cada molécula, formando assim uma película altamente orientada e estabilizada.

Os surfactantes são classificados em aniônico, catiônico e não-iônico, de acordo com a ionização do seu grupo polar [40]. Os grupos hidrofílicos em surfactantes aniônicos tornam-se carregados negativamente em solução aquosa, como é o caso dos carboxilatos, sulfonatos, sulfatos e fosfatos; já os grupos hidrofílicos em surfactantes catiônicos tornam-se carregados positivamente em solução aquosa, como por exemplo, as aminas [40]. Por outro lado, um surfactante não-iônico não produz carga quando dissolvido ou disperso em meio aquoso, sendo que a solubilidade desse tipo de surfactante deve-se a grupos hidroxilas e cadeias de grupos oxietileno [-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-] [40].

Quando as proteínas estabilizam-se em uma interface formam uma forte rede viscoelástica, na qual as moléculas ficam essencialmente imobilizadas [41], porém pequenas quantidades de surfactantes adicionadas a interface mudam as propriedades de uma suspensão devido à adsorção na interface sólido-líquido, orientação das moléculas adsorvidas, formação de agregados de moléculas na solução e orientação das moléculas nos agregados [40]; como consequência, diminuem a estabilidade, aumentando a pressão de superfície e fazendo com que as proteínas desorvam devido a competitividade das moléculas pela superfície na interface [41, 42, 43] e diminuindo as ligações não específicas entre proteínas, principalmente, anticorpo/antígeno [44].

#### 2.2.1.7 Substrato

O substrato ideal para estudos de adsorção de proteínas deve ser plano ao nível atômico, de forma que não influencie na interpretação dos resultados da análise. A superfície deve ter uma afinidade com a molécula estudada, permitindo a adesão, sem interferir na sua estrutura [13, 14].

As exigências básicas para que uma superfície seja hospedeira de proteínas são:

- 1) prover uma ótima capacidade de ligação para as proteínas [15],
- 2) manter as atividades biológicas das proteínas. Algumas proteínas tendem a desenovelar-se quando imobilizadas no suporte, com o intuito de permitir que as cadeias laterais hidrofóbicas internas formem ligações hidrofóbicas com a superfície sólida [Butler 2000 apud 15].
- 3) acessibilidade do sítio ativo do ligante aderido a superfície (interação proteína-substrato reduz a acessibilidade da proteína alvo, levando a falsos resultados),
- 4) baixo grau de interações inespecíficas. A obtenção de um baixo grau de ligações inespecíficas é extremamente difícil quando a amostra é uma mistura complexa de milhares de moléculas [Kusnezow 2003 apud 15]

### 2.2.1.7.1 Mica

A mica é um cristal mineral formado por vários planos de clivagem atômicamente lisos por várias centenas de  $\mu\text{m}^2$  e que pode ser facilmente clivada com uma simples fita adesiva, produzindo uma superfície lisa, limpa e hidrofílica ao nível atômico [8].

As folhas tetrahédricas de  $(\text{Si,Al})_2\text{O}_5$  da mica são ligadas ionicamente por uma camada central de  $\text{Al}_2(\text{OH})_2$  (Figura 7). A rede carregada negativamente dos oxigênios basais entre estas duas camadas é balanceada por uma camada de  $\text{K}^+$  coordenados hexagonalmente. Esta camada é perturbada após vários procedimentos de clivagem, expondo o plano basal coberto de íons [8].

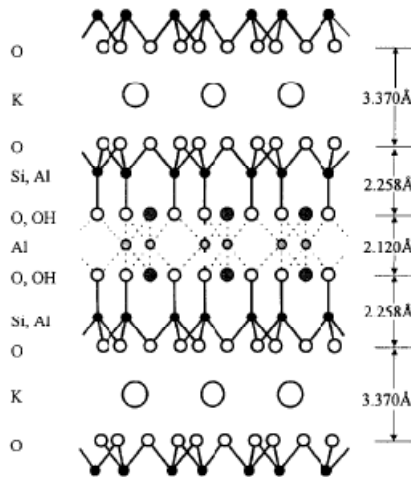


Figura 7: Desenho esquemático de uma estrutura ideal de mica muscovita. Folhas tetrahédricas duplas de  $(\text{Si, Al})_2\text{O}_5$  são ligadas eletrostaticamente por íons de potássio. A distância perpendicular entre as folhas é de  $10\text{Å}$ . Adaptado de [45].

Na presença de solução com pH neutro alguns desses íons dissociam da superfície, resultando em uma superfície carregada negativamente sendo que a extensão desta dissociação e substituição parcial dos  $\text{K}^+$  dependerá da concentração de eletrólitos [8], permitindo uma fácil adsorção das superfícies carregadas positivamente das proteínas [13].

Entretanto, a imobilização de cargas negativas é dificultada pela natureza fraca da ligação, insuficiente para evitar a mobilidade das moléculas [46]. A adsorção das cargas negativas pode ser favorecida pela presença de cátions divalentes na solução que irão atuar como intermediadores na interação entre as duas superfícies [13] ou pelo tratamento da própria superfície da mica.

### 2.2.1.7.2 Funcionalização do Substrato

A superfície do substrato pode ser modificada para aumentar a capacidade de adesão [46], além de possibilitar a orientação específica dos sítios ativos das proteínas, evitar uma possível desnaturação da biomolécula e deslocamento das moléculas com o tempo [4, 47].

A adsorção da proteína em superfícies hidrofílicas neutras tende a ser relativamente fraca, enquanto que a adesão em superfícies hidrofóbicas tende a ser mais forte e muitas vezes parcialmente irreversível. Já em superfícies carregadas as interações estão intimamente relacionadas com as cargas da superfície, o pH do meio e a concentração iônica da proteína [4, 5, 15].

### 2.2.1.8 Deposição

Escolhido o substrato e preparada a solução com as proteínas faz-se a deposição, que pode variar com o interesse do estudo.

O método de deposição mais comum para estudos de proteínas é a simples deposição direta da quantidade de solução desejada – *drop deposition* – com uma pipeta sobre a superfície do substrato, evitando-se que a ponteira da pipeta toque o substrato, para que não danifique a superfície ou o revestimento do substrato que podem afetar as varreduras. Outra maneira direta seria mergulhar o substrato na posição horizontal na solução – *deep coating* – na qual a deposição pode ser favorecida pela ação da gravidade, proporcionando filmes uniformes com relação ao tempo de exposição na solução e depois seco ao ar. As moléculas também podem ser depositadas por vaporização da solução aquosa, ou na presença de glicerol no substrato [48].

Depois de um período de exposição do substrato à solução (que varia de amostra para amostra) para fixação e estabilização das proteínas, este pode ser gentilmente lavado com o intuito de remover moléculas que não ficaram firmemente aderidas à superfície como mostra Müller et al. (1997) [8] para diversas amostras biológicas.

#### 2.2.1.8.1 Spin Coating

*Spin coating* (Figura 8) é uma técnica usada para a preparação de filmes finos uniformes, sendo usada na indústria de polímeros, na preparação de filmes para pintura, verniz, camadas refletoras em instrumentos óticos, na indústria de microeletrônicos, na fabricação de biofilmes uniformes sobre substratos planos, etc.

Este processo, muito simples, consiste em depositar dinamicamente ou estaticamente um volume pré-determinado da solução sobre o substrato. A deposição estática é a simples pipetagem da solução sobre o centro da superfície ou próxima desta, enquanto que a deposição dinâmica é a pipetagem sobre o substrato em movimento, o que pode resultar em uma menor perda de material, uma vez que não é necessária a mesma quantidade para cobrir toda a superfície.

Então, o sistema é rotacionado a uma alta velocidade,  $\omega$ , para espalhar o fluido através da força centrífuga. A rotação é mantida constante por um tempo determinado pelo usuário e o fluido vai afinando gradativamente, uma vez que é empurrado para fora do substrato, até a obtenção de um filme ultrafino. Efeitos de borda, geralmente, são vistos porque a solução é jogada para fora uniformemente, acumulando material na forma de agregados devido a tensão, viscosidade, velocidade de rotação [49] e até mesmo devido as propriedades das proteínas, como discutido anteriormente.

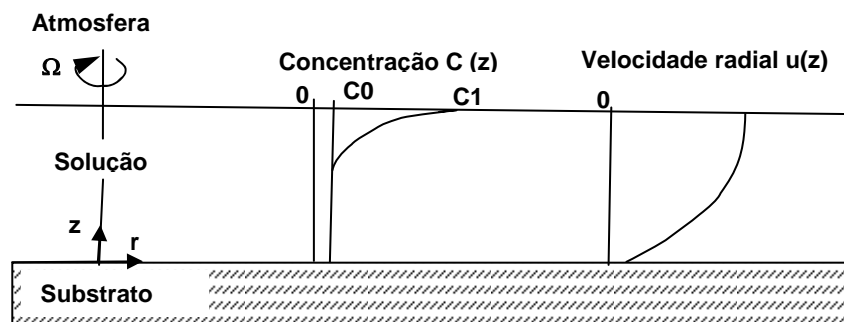


Figura 8: Diagrama da deposição spin coating mostrando o perfil da velocidade radial e da concentração com o tempo. A solução com uma dada concentração de proteínas é posta para rotacionar com velocidade,  $\omega$ , e é empurrada para fora do substrato pela força centrífuga. [50].

A princípio, os métodos mencionados acima formam filmes uniformes e estáveis (*drop deposition* e *deep coating*), mas que estão sujeitos a mudanças na espessura e uniformidade do filme devido ao tempo de evaporação e da estabilização das proteínas sobre os substratos. Quando a umidade é constante, durante a deposição da proteína, a taxa de evaporação está diretamente relacionada com a velocidade de rotação do substrato, assim a variação da concentração de material é diretamente proporcional a velocidade de rotação do substrato.

O passo da evaporação é crítico para definição da espessura final do filme biológico [49], pois esta ocorre, por necessidade, na interface superfície/ar e somente alguns dos componentes da solução evaporaram de forma constante, por exemplo, a água. Consequentemente haverá um aumento dos componentes não voláteis (proteínas e sais) na camada superficial; desta forma a viscosidade da solução aumenta e a mobilidade das proteínas diminui. Se a interação entre o substrato e as moléculas for repulsiva, as proteínas tendem a agregar para minimizar o contato com a superfície e se a interação entre substrato e as proteínas são atrativas, a solução terá uma molhabilidade maior na superfície [51].

O processo da formação do filme, assim, pode ser dividido em três fases [50]: a primeira fase é dominada por efeitos inerciais, tensão superficial e formação de uma fina camada concentrada na superfície livre. Na fase seguinte, o fluido é considerado newtoniano, a concentração da camada perto da superfície livre gradualmente aumenta por causa da evaporação do solvente. A última fase inicia-se devido a variação da concentração do soluto, o fluxo cessa e a evaporação. O processo termina quando a concentração é uniforme em todo o filme e a viscosidade é suficientemente alta para impedir o fluxo. O tempo total requerido para as três fases é curto. Porém, no presente trabalho, foram necessárias aproximadamente 24h para que o solvente residual evaporasse possibilitando a análise das amostras com o MFA.

Resumindo, o tempo de adsorção, o tempo de evaporação, a difusão molecular (uma vez que, moléculas individuais difundem mais rapidamente que agregados) e, ainda para o *spin coating*, a velocidade de rotação são importantes parâmetros para estes métodos. Com uma controlada preparação da amostra, que inclui o controle dos parâmetros físico-químicos (concentração, pH, concentração iônica) a evaporação pode ser gentil o suficiente de modo a não induzir modificações no biofilme [49]. Deste ponto de vista, o *spin coating* tem vantagem sobre o *drop deposition* e o *deep coating*, pois o biofilme é menos espesso e a evaporação se dá de forma homogênea por toda a superfície.

Depois da completa evaporação da água o biofilme adota a estrutura correspondente a de menor energia livre do sistema, lembrando que a estrutura resultante não necessariamente estará na sua posição de equilíbrio [51].

### **2.2.2 Formação de filmes protéicos sobre as superfícies sólidas**

Uma interface que é formada entre duas fases diferentes, neste caso sólido/líquido, geralmente possui uma energia livre mais alta que a maior parte da fase. Assim, a interface é apta a ser termodinamicamente estável quando adsorve qualquer substância que seja diferente das moléculas de solventes [29].

O modo mais simples de fixar uma proteína na superfície é através da adsorção, em que uma rede de forças atrativas “puxa” a amostra para a superfície [52]. Pode existir uma grande variedade de forças físicas atuantes na interface proteína-substrato durante a adsorção, tal como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou polares, forças de van der Waals, forças Coulombianas, forças ácido-base de Lewis, entropia conformacional e hidratação [52, 2]. Como a adsorção não envolve reação química, ou seja, não necessita de uma preparação mais elaborada da superfície, este é o ponto mais atrativo da adsorção física.

Nas ligações físicas, geralmente, há falta de especificidade, estequiometria e a força de direcionalidade das ligações covalentes [53]. Pensando desta maneira, as ligações físicas isoladas não deveriam ser consideradas ligações, uma vez que os átomos continuam com suas distribuições de cargas inalteradas, apenas com uma perturbação, e mesmo assim são fortes o suficiente para segurar todos, mas pequenos, átomos e moléculas juntos em sólidos e líquidos em temperatura ambiente [53].

A chegada da proteína na interface é direcionada por difusão, interações hidrofóbicas e eletrostáticas [15]. O processo de difusão depende da concentração da solução e do coeficiente de difusão, o que interfere na frequência de colisão das moléculas [Andrade 1987 apud 54]. Na realidade, as colisões não são todas igualmente efetivas na adsorção, uma vez que as proteínas não são partículas homogêneas, o que implica em energias de interação diferentes [54].

A superfície da proteína carregada eletricamente juntamente com os íons existentes na solução em contato com o substrato sólido forma uma camada difusa chamada dupla camada elétrica, resultante do mecanismo de atração e repulsão de íons e da adsorção dos mesmos [55] e do movimento aleatório das moléculas. A carga da superfície é balanceada pelo acúmulo de um número igual de cargas opostas que podem estar tanto ligadas à superfície para formar a chamada camada de Stern ou Helmholtz como podem estar presentes na atmosfera acima da superfície para formar uma dupla camada elétrica [55]. Como as proteínas são, geralmente, moléculas carregadas em soluções aquosas, a presença destas duplas camadas elétricas com seus campos elétricos associados irá influenciar na interação do substrato/proteína [55].

Quando um líquido é colocado sobre uma superfície, este pode se espalhar ou manter-se como uma gota (Figura 9), o comportamento irá depender das energias interfaciais relativas do líquido e da superfície do sólido [56, 57], conhecido como molhabilidade.

A habilidade de a gota espalhar-se pode ser avaliada pelo ângulo de contato (também conhecido como ângulo de molhabilidade) entre a interface sólido-líquido e líquido-ar [57, 58]. Considerando uma gota de solução em contato com um sólido e num meio de vapor, ilustrado na Figura 9-b). O ângulo de molhabilidade depende das forças adesivas que fazem a gota se espalhar sobre a superfície e as forças coesivas do líquido que contraem a gota a uma esfera com uma superfície de contato mínima. As tensões superficiais resultantes das interações entre os três meios (sólido, líquido e vapor), representadas por  $\sigma_{lv}$ ,  $\sigma_{sl}$  e  $\sigma_{sv}$  para as interfaces líquido-vapor, sólido-líquido e sólido-vapor, respectivamente, são as responsáveis pelas forças superficiais, que agem tangencialmente na interface. O ângulo de contato  $\theta$  é determinado a partir de um balanço de forças na direção horizontal devido as tensões superficiais ao longo da linha de contato. Para a gota estar em equilíbrio estático a soma das forças deve ser igual a zero, então pela equação de Young

$$\sigma_{sv} = \sigma_{sl} + \sigma_{lv}\cos\theta \quad (2.2.4),$$

se  $\sigma_{sv} > \sigma_{sl}$  o ângulo de contato será agudo e tem-se uma condição de molhabilidade, porém se  $\sigma_{sv} < \sigma_{sl}$  o ângulo de contato é obtuso e a condição é de não molhabilidade [58].

Então, para um volume da gota fixo, ou seja, se não ocorre vaporização nem condensação, o aumento do ângulo de contato  $\theta$  representa uma diminuição da área de interface sólido-líquido (Figura 9-a)). Por outro lado, uma diminuição deste ângulo representa um espalhamento do líquido, aumentando a área da interface entre sólido-líquido. No limite, quando  $0 \rightarrow \theta$  o líquido forma um filme fino, que se espalha por toda a superfície (Figura 9-a)).

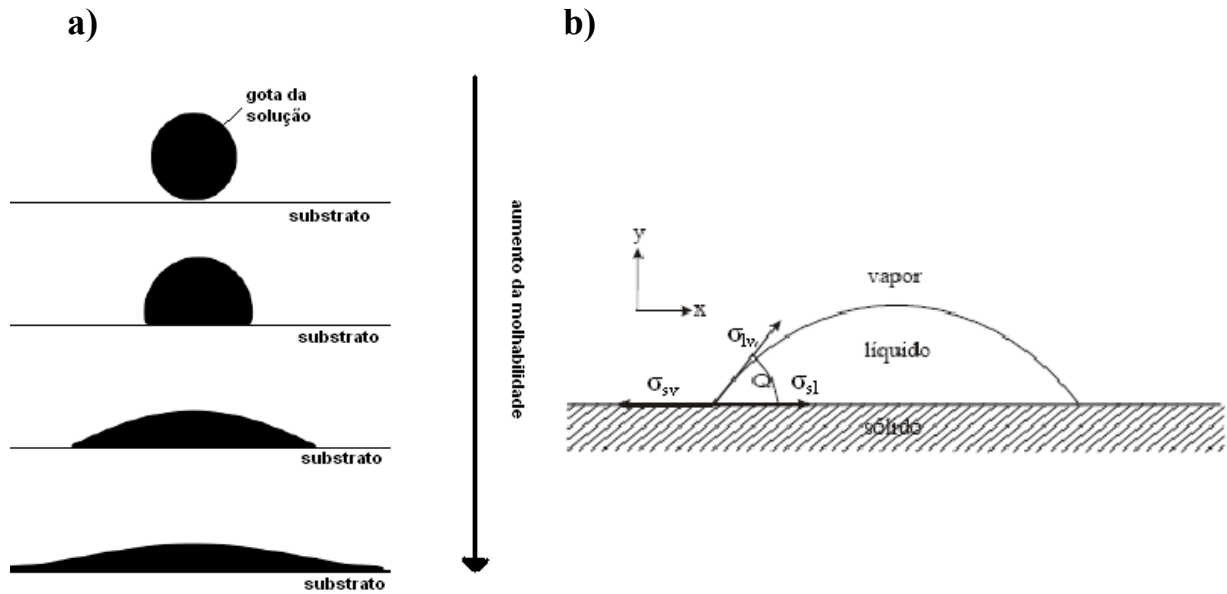


Figura 9: Representação da molhabilidade da gota. a) A molhabilidade de uma superfície sólida é o resultado das interações moleculares existentes entre os fluidos e o substrato sólido. Nota-se que à medida que as forças de adesão são aumentadas em relação as forças de coesão, mais afinidade a superfície sólida terá pela fase líquida (com maior densidade). b) Ângulo de contato de uma gota em descanso sobre uma superfície sólida.

A adsorção de proteínas em superfícies hidrofílicas neutras (Figura 10), por exemplo, tende a ser relativamente fraca, enquanto que adsorção de proteínas em superfícies hidrofóbicas é forte normalmente, parcialmente irreversível [54]. Adsorção em superfícies carregadas depende da carga da proteína, o pH e a concentração iônica da solução [54].

Quando a superfície é hidrofóbica (Figura 10), a adsorção é energeticamente mais favorável, sugerindo que a interação da proteína com superfícies hidrofóbicas é maior do que com superfícies hidrofílicas, a menos que a proteína em questão contenha poucas regiões hidrofóbicas na sua superfície [56]. Apesar de serem uma superfície alternativa, as superfícies hidrofóbicas não são, normalmente, recomendadas como substratos para alguns tipos de estudos, por apresentarem baixa molhabilidade, que contribui para distorcer a análise dos resultados devido ao aumento das forças de adesão, além de favorecerem a desnaturação da proteína [52].

As superfícies hidrofílicas carregadas negativamente (Figura 10) são as superfícies menos desnaturantes e que promovem orientações específicas, fazendo as proteínas nativas adsorverem entre si tanto lado-a-lado quanto final com final e as regiões carregadas positivamente adsorvem com a mica [59]. Na superfície mais desnaturante, hidrofóbica, a proteína parece adotar uma estrutura expandida [60].

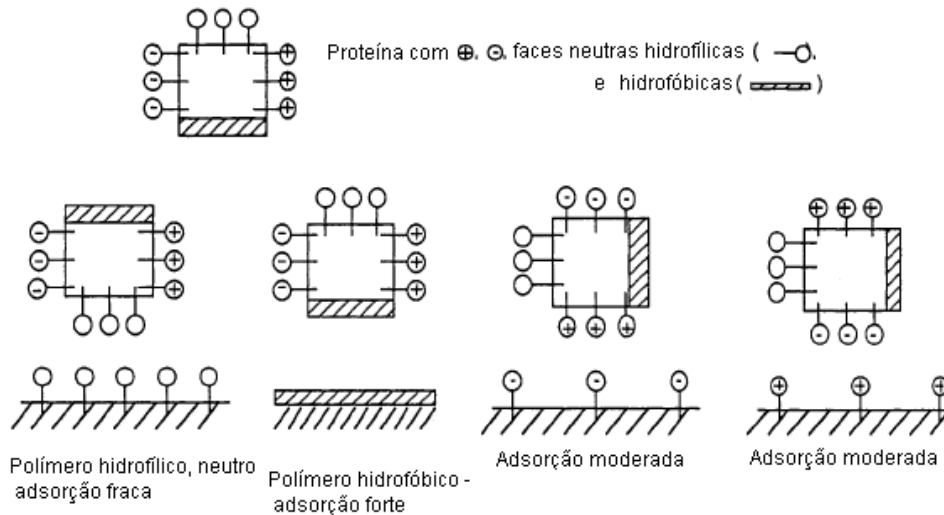


Figura 10: Desenho esquemático de uma “proteína” com quatro lados interagindo com substratos de superfícies compatíveis. Uma face da “proteína” é hidrofóbica, outra carregada negativamente, outra carregada positivamente, outra de caráter hidrofílico neutro. [54].

A orientação e o estado conformacional da proteína adsorvida a uma superfície são conseqüências das propriedades da proteína: estabilidade, desenovelamento, adsorção e desorção, efeito Vroman (relacionado com o tamanho das proteínas, as de menor peso molecular e de menor superfície ativa adsorvem antes) [61, 62, 63], potencial de superfície [Bower 1999 apud 60], composição de aminoácidos [29] e hidrofobicidade [64].

Quando a proteína tem a forma estimada retangular com dimensões  $a \times b \times c$  (Figura 11), considera-se que haja dois tipos de configurações na camada de adsorção, i.e., uma com o lado maior (união final com final) e uma com o lado menor (união lado-a-lado) perpendicular a superfície [29]. Algumas vezes, os tipos de configurações são estimados simplesmente pela quantidade de proteínas adsorvidas, entretanto a espessura, como a quantidade de camadas adsorvidas são necessárias para a obtenção de maiores detalhes da estrutura [29].

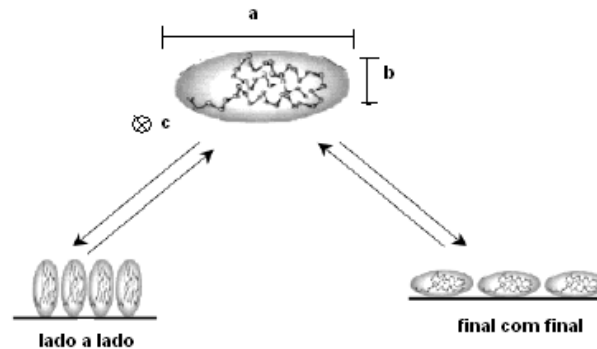


Figura 11: Diagrama das possíveis orientações de adsorção para uma proteína retangular de dimensões  $a \times b \times c$  em relação as demais proteínas. Adaptado de [102].

Claro que esta situação varia dependendo da combinação proteína/substrato, da deformação da proteína sobre o substrato [29]. Quando a concentração de proteína na solução é alta uma possibilidade é a cristalização destas na interface, fornecendo um arranjo mais empacotado e organizado [65, 66, 67] em relação a deposição randômica que ocorre a baixas concentrações de proteínas na solução.

A proteína deforma-se conforme a estrutura muda para maximizar qualquer interação com a superfície (Figura 12), em que o grau de mudança conformacional irá depender das ligações internas que mantêm a proteína na sua conformação particular [56].

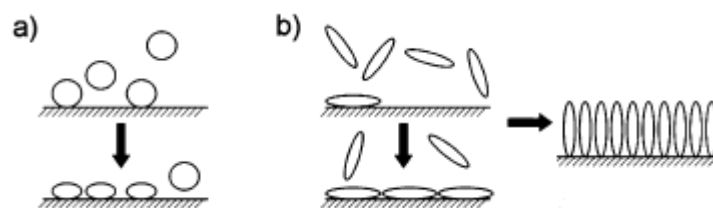


Figura 12: Esquema mostrando a adsorção de uma proteína a) globular, cuja conformação pode ficar destorcida devido a superfície e b) retangular que pode aderir com lado maior paralelo a superfície ou pode aderir com o final da proteína no substrato. Adaptado de [56].

Apesar dos mecanismos de adsorção das proteínas em suportes sólidos não ser completamente entendida, a superfície tratada quimicamente tem mostrado ser fundamental para a fixação da proteína [4, 17], pois as propriedades das proteínas nas camadas podem ser alteradas por tratamentos químicos, os quais influenciam no controle da conformação e/ou orientação do biofilme.

### 2.3 Microscópio de Força Atômica

Ao contrário do que acontece com a maioria das técnicas microscópicas (como também para vários outros métodos experimentais), somente dois anos se passaram desde a invenção deste microscópio para que os primeiros trabalhos sobre o uso do MFA em estudos biológicos fossem publicados.

Devido a sua simplicidade de mecanismo, os microscópios de força atômica são instrumentos surpreendentemente compactos.

#### 2.3.1 Princípio físico do funcionamento

O MFA é o mais difundido entre a família dos SPMs e a interação sonda-amostra ocorre por força de van der Waals fornecendo informações sobre a topografia, elasticidade e plasticidade da superfície da amostra [12, 13].

As forças de interação sonda-amostra podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da distância entre os mesmos. O potencial de interação pode ser descrito pelo potencial de Lennard-Jones entre dois átomos:

$$U(r) = - A/r^6 + B/r^{12} \quad (2.3.1)$$

A força derivada deste potencial é dada pela expressão abaixo

$$F(r) = 6A/r^7 - 12B/r^{13} \quad (2.3.2),$$

onde  $r$  é a distância de separação entre os dois átomos,  $A$  e  $B$  são constantes de interação com ordem de grandeza em torno de  $10^{-81} \text{Jm}^6$  e  $10^{-139} \text{Jm}^{12}$ , respectivamente [68].

Assim, para longas distâncias ( $d > 1 \mu\text{m}$ ), praticamente não há qualquer interação, mas a medida que a sonda aproxima-se da amostra ( $d \leq 50 \text{nm}$ ), forças atrativas passam a atuar entre a sonda e amostra – tipicamente, forças de van der Waals. A força atrativa aumenta com a aproximação da sonda até que a distância seja da ordem da separação interatômica ( $d \approx 0,5 \text{nm}$ ). A partir deste ponto, fortes forças eletrostáticas repulsivas entre as nuvens eletrônicas das camadas de valência da sonda e da amostra passam a atuar, e a força resultante total passa a ser repulsiva. Nesta região, diz-se que a sonda está em contato físico com a superfície da amostra [9].

Assim, o MFA funciona medindo as forças atrativas ou repulsivas (Figura 13) e, de acordo com o caráter da interação pode-se definir dois modos de operação: o modo contato, em que a interação sonda-amostra é repulsiva e o modo dinâmico (ou não contato), sendo que este divide-se no modo contato intermitente, em que temos o regime atrativo e repulsivo e o modo *tapping*, em que a interação é atrativa.

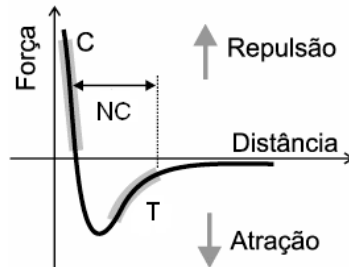


Figura 13: Curva esquemática mostrando a dependência da força de interação sonda-amostra em função da distância entre elas. A força é proveniente do potencial de interação entre dois ou mais átomos, as forças positivas são atrativas e acima da linha de força zero as forças são repulsiva e cada região determina um modo operacional do microscópio. Adaptado de [9].

### 2.3.1.1 Modo de contato

Neste modo a ponta da sonda entra em contato físico com a superfície da amostra e, desta forma, algumas propriedades da superfície podem ser medidas juntamente com a imagem topográfica, tal como a distribuição da força de atrito e algumas propriedades mecânicas.

O *cantilever* é tão flexível que é atraído pela superfície da amostra, porque o gradiente de força atrativa entre os dois é, normalmente, maior que a constante de mola da sonda [10]. Devido ao contato físico, uma força repulsiva aparece entre os dois e esta é usada como parâmetro de realimentação para um valor de deflexão desejado através de uma força constante determinada pelo ajuste da altura da amostra enquanto a sonda varre a superfície [10], ou seja, se a deflexão medida é diferente do valor desejado a realimentação aplica uma voltagem ao piezoelétrico para levantá-lo ou abaixá-lo. A voltagem que a realimentação aplica ao piezoelétrico é uma medida da altura da superfície da amostra e é mostrada como uma função lateral (torção) da posição da amostra [10].

### 2.3.1.2 Modo Dinâmico

O modo dinâmico monitora o *cantilever* em vibração ao contrário da deflexão (modo contato), então, a amplitude, frequência de ressonância e a mudança de fase da oscilação conectam a dinâmica de vibração da ponta com a interação sonda-amostra e qualquer um destes parâmetros pode ser usado para realimentar o sistema de forma a mapear a superfície da amostra.

Este modo opera oscilando o *cantilever* rígido em que a frequência e amplitude são pré-definidas pelo usuário. A movimentação do piezo faz o *cantilever* oscilar com uma alta amplitude (tipicamente acima de 20nm) quando a sonda não está em contato com a superfície. A sonda oscilante é, então, movida em direção a amostra até tocá-la suavemente, ou dar leves “socos” na superfície [9, 13]. Conforme o *cantilever* começa a tocar intermitentemente a amostra é necessário reduzir a oscilação da sonda devido a perda de energia causada pelo contato da sonda com a superfície [69, 70]. Durante a operação do modo dinâmico, a amplitude de oscilação do *cantilever* é mantida constante pela realimentação, a seleção da frequência de oscilação ótima é assistida pelo software, determinada pelas quantidades físicas

da topografia e interação sendo que a força sobre a superfície é automaticamente ajustada e mantida ao menor nível possível [69, 70].

### 2.3.1.2.1 Imagem da fase

A mudança de fase na oscilação do *cantilever*, mudanças na amplitude e na dissipação de energia induzidos pela interação com a amostra heterogênea são usados para obter um mapa alternativo da superfície, chamado contraste de fase ou *phase imaging* [9, 70]. A figura abaixo ilustra de maneira esquemática o modo de funcionamento do contraste de fase, em que a sonda operando no modo dinâmico é colocada para oscilar por meio de um atuador piezoelétrico colocado na base do *cantilever* que durante a leitura muda a fase da oscilação ao encontrar condições diferentes de interação sonda-amostra [9]. Fica estabelecido, assim, uma diferença de fase  $\Delta$  entre o sinal do atuador e o sinal que o fotodetector mede, que só será anulada quando a condição inicial de interação for restabelecida.

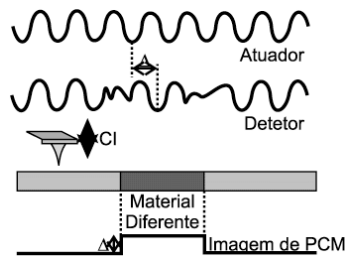


Figura 14: Desenho esquemático do modo contraste de fase. A sonda oscila sob o efeito de um atuador e a diferença de fase  $\Delta$  entre o atuador e o fotodetector, gerada durante a passagem da sonda por materiais diferentes. Adaptado de [9].

Isto é baseado no fato de que a energia média dissipada por ciclo deve ser equilibrada através do fornecimento de energia para o sistema para manter as oscilações constantes [70]. Assumindo que a movimentação do *cantilever* é estacionária na escala de tempo por pixel de imagem podemos escrever a relação entre a mudança de fase, amplitude e energia dissipada como sendo

$$2Q_{\text{cant}}/k_{\text{cant}}w_{\text{cant}}(E_{\text{diss}}) = AA_0\text{sen}\Delta - A^2 \quad (2.3.3),$$

em que  $A$  é a amplitude real,  $A_0$  é a amplitude livre,  $\Delta$  é a mudança de fase e o *cantilever* é descrito pela constante de mola  $k_{\text{cant}}$ , sua frequência de ressonância natural  $w_{\text{cant}}$  e seu fator de qualidade  $Q_{\text{cant}}$  e a energia média líquida dissipada por ciclo no contato amostra-sonda é denotada por  $E_{\text{diss}}$  [Cleveland 1998 apud 70].

Existe uma série de fatores que modificam a interação a superfície-*cantilever* durante o contato, tais como mudanças de material, de propriedades viscoelásticas e até mesmo de propriedades topográficas praticamente imperceptíveis [10, 9].

### 2.3.1.2.2 Nanotribologia

O termo tribologia é relativamente novo e refere-se ao estudo de todas as propriedades de materiais que envolvam interação de interfaces em movimento relativo [11]. Atrito, lubrificação, desgaste resultante de asperezas microscópicas e adesão, são fenômenos provenientes do movimento relativo de duas superfícies, assim como dureza, rigidez e rugosidade.

Com o MFA podemos estudar todo tipo de propriedades mecânicas de superfícies. Na técnica mais comum de tribologia em MFA, a leitura é feita com pontas com constante de

molhas pequenas e sob fortes forças de interação para analisar a dureza de um filme. Nesta técnica o material é removido do substrato em uma forma bem definida, deixando para trás vales com a característica da geometria da ponta usada, ou seja, um risco. Neste contexto, é bom sempre ter em mente a ordem de grandeza da força que pode levar a ruptura das uniões químicas.

### 2.3.2 Princípio mecânico de funcionamento do MFA

As partes funcionais de um MFA (Figura 15) são: uma sonda mecânica (Figura 15-A) montada sobre a extremidade livre de uma haste é colocada em contato, ou muito próxima, da superfície da amostra (Figura 15-F) da qual se quer investigar, originando uma interação altamente localizada através de forças de atração e repulsão que fazem a alavanca defletir (ou em alguns casos, torcer) [9]. Através de um dispositivo ótico composto por um laser, um espelho (parte superior da sonda) e um sensor de posicionamento vertical (fotodetector) (Figura 15-C), detecta-se a deflexão da sonda causada pelas forças de interação sonda-amostra durante a varredura, em geral, os MFA são capazes de medir deflexões de até  $0,1\text{Å}$  e forças entre  $10^{-7}$  a  $10^{-12}\text{N}$  [71], pois quando a sonda sofre deflexão (ou torção), a posição do feixe de laser no detector muda indicando um novo ponto de incidência e, conseqüentemente, a deflexão angular da sonda, além disso, a distância do espelho ao detector é suficientemente grande para que pequenas deflexões da sonda resultem em grandes deslocamentos no fotodetector [11, 71].

O suporte com a amostra é colocado sobre o *scanner* piezoelétrico (Figura 15-B), responsável pelo ajuste da distância entre a sonda e a superfície analisada (na direção z) e que provê movimentação lateral (direção x-y) da mesma, descrevendo um padrão de varredura [9, 11, 13]. Os microscópios modernos são equipados com cerâmicas piezoelétricas em formato de tubos ocos segmentados verticalmente em quatro partes, sendo que eletrodos posicionados na face externa do tubo são responsáveis pelo movimento lateral da amostra nas direções  $\pm x$  e  $\pm y$  e o eletrodo situado na parede interna do tubo responde pelo movimento na direção z, o que resulta em um mapa tridimensional da superfície [71].

Estas informações são passadas a um sistema de realimentação que controla a separação entre sonda e amostra. [9, 11]. Todo este processo é controlado por um computador (Figura 15-E), que movimenta o *scanner*, recebe os dados e os convertendo em um mapa topográfico, através da conversão de variação do sinal no fotodetector para variação de altura na amostra [9]. Entretanto, este processo de conversão é complicado e o método mais utilizado na geração de imagens topográficas é aplicar uma força constante sobre a amostra, ou seja, determina-se um valor do sinal que deve ser permanentemente observado pelo fotodetector [9, 11]. O computador, então, durante a varredura ajusta a posição vertical da amostra, através do *scanner* piezoelétrico, de maneira a manter a força, ou o sinal, constante, sendo assim a variação de altura no *scanner* corresponde exatamente à variação topográfica na amostra e a morfologia da amostra é revelada diretamente, sem a necessidade de conversão do sinal [9, 13].

Com o objetivo de se posicionar a sonda sobre uma determinada região da amostra, o sistema possui um mecanismo de aproximação (Figura 15-D) que coloca a sonda nas proximidades da localização desejada [9].

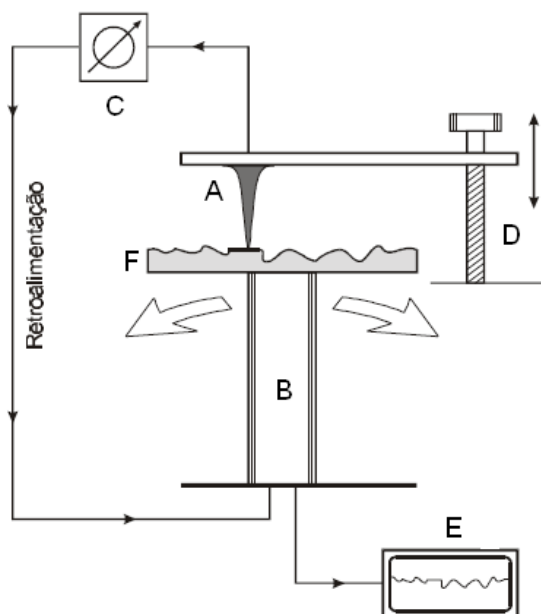


Figura 15: Desenho esquemático dos componentes do microscópio de força atômica. A: sonda mecânica; B: cerâmica piezoelétrica; C: fotodetector; D: sistema de posicionamento preliminar; E: computador. Adaptado de [71].

De acordo com a alta capacidade de resolução e suas dimensões reduzidas do equipamento era de se esperar que vibrações externas seriam uma grande dificuldade, porém este problema é facilmente resolvido colocando-se o microscópio em uma superfície sólida suspensa por cabos elásticos que dissipam a energia do sistema, reduzindo as vibrações à baixas frequências de oscilação que não interferem nas medidas.

### 2.3.3 Limitações da técnica de MFA

O principal cuidado a ser tomado quanto a caracterização de superfícies através das imagens topográficas de MFA é quão fiel as imagens são à superfície.

Para conseguir resolução de qualidade vários fatores devem ser levados em consideração, tais como o raio de curvatura da ponta e sua constante de mola, o modo operacional, umidade relativa do ar, presença de contaminantes na sonda e na amostra, o preparo e qualidade da superfície das amostras.

#### 2.3.3.1 Resolução

Para melhores resoluções é necessário conhecer os gradientes das forças de van der Waals que podem estender-se a um nanometro da superfície da amostra. Porém, o gradiente da força de van der Waals pode variar com o menisco de água formado entre a sonda e a superfície da amostra quando medidos em condições ambientes.



Figura 16: Diagrama esquemático ilustrando o menisco de água.

O menisco de água (Figura 16) é formado por contaminantes do ar ambiente e/ou da fina camada de contaminação (25 a 500Å) da superfície da amostra produzidos durante a sua preparação [11] e pela umidade relativa, pois a largura do menisco é proporcional a umidade relativa (RH) e a geometria da sonda usada. Estudos mostram que o menisco esta presente mesmo quando a umidade relativa é de 0% [72]. Quando a RH é maior que 45% até a sonda é recoberta por uma fina camada de água.

O menisco faz com que se origine uma força adesiva intensa ( $\sim 10^{-8}$ N) que “cola” efetivamente (força de capilaridade) o sistema sonda/superfície [73] podendo deformar e mover a amostra que não estiver bem aderida ao substrato.

O menisco pode ser eliminado trabalhando em ambiente com nitrogênio líquido, vácuo ou mergulhando o sistema em um líquido apropriado.

É importante conhecer os diferentes componentes das forças de van der Waals e/ou das outras forças da superfície a fim de minimizá-las ou eliminá-las [74]. Além disso, os fatores relacionados à sonda ou ponta são fundamentais para fazer uma imagem. A imagem é uma resultante da convolução da geometria da ponta com a amostra [11, 75], porque a área de interação da sonda é uma fração do raio de curvatura da ponta, ou seja, vários átomos da sonda interagem simultaneamente com vários átomos da amostra (Figura 17-b) [76].

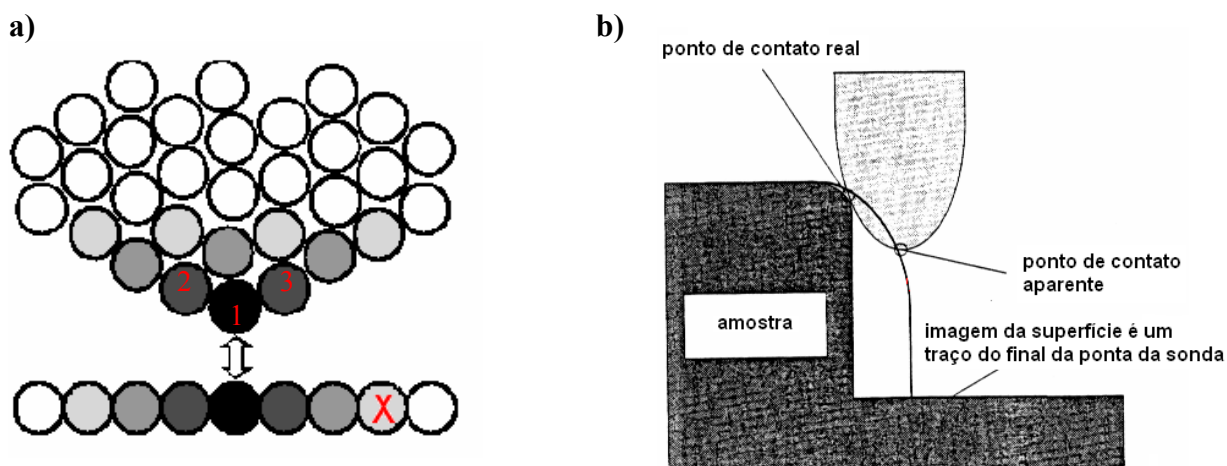


Figura 17: Interação sonda-amostra. a) átomos da sonda em interação com os vários átomos da amostra Adaptado de [76] e b) ponto de contato real da sonda com as irregularidades da superfície. Adaptado de [75].

Assumindo que os três átomos da ponta da sonda (Figura 17-a), numerados de 1 a 3, interagem com vários átomos da superfície da amostra o sinal da interação de cada um será diferente em relação ao tempo [76]. Considerando o movimento da sonda da esquerda para a direita, se somente o átomo 1 interagir com a superfície o sinal apresentará duas “lombadas”, uma depressão correspondente ao átomo faltante e mais uma “lombada”; a vacância seria detectada na sua posição real e uma resolução atômica real seria adquirida [76]. Supondo, agora, que os três átomos interagem com a superfície o primeiro sinal registrado será do átomo 3, então, no instante seguinte o átomo 1 detecta o primeiro átomo da superfície, o átomo 3 detecta o segundo átomo da superfície e o átomo 2 não registrará nenhum sinal e no instante seguinte todos os três átomos registraram um sinal que variará de intensidade de acordo com a sua distância da superfície [76]. A soma destes diferentes sinais levará a uma mudança de posição da vacância [76].

Resumindo, uma sonda de alto raio de curvatura e baixo *aspect ratio* tem uma grande área para interagir com a amostra e com a camada de contaminação, já uma sonda de alto

*aspect ratio* tem uma área menor de contato e, portanto, a interação real da sonda é menor e os detalhes das superfícies ficam mais perceptíveis.

Fica fácil, assim, concluir que a integridade da sonda é importante na qualidade da imagem. Se a sonda estiver trincada, quebrada ou suja produzirá estruturas deformadas ou até mesmo inexistentes levando a erros de interpretação [28, 77].

### 2.3.3.2 Não linearidade do scanner

Os microscópios de varredura atuais são equipados com cerâmicas piezelétricas em formato de tubos ocos segmentados verticalmente em quatro partes, sendo que eletrodos posicionados na face externa do tubo são responsáveis pelo movimento lateral da amostra nas direções  $\pm x$  e  $\pm y$  e o eletrodo situado na parede interna do tubo responde pelo movimento na direção  $z$  feita por alongamento, o que resulta em um mapa tridimensional da superfície.

Para movimentar o tubo nas direções  $\pm x$  e  $\pm y$  aplica-se uma tensão positiva à cerâmica para dilatar um dos lados e de sinal oposto para contraí-lo. Estes dois movimentos são proporcionais ao potencial aplicado e ao quadrado do comprimento do tubo ( $d_{(x,y)} \propto V_{(x,y)} \cdot L^2$ ). Para o movimento na direção  $z$  o resultado é um alongamento do tubo proporcional ao seu comprimento e ao potencial aplicado ( $d_z \propto V_z \cdot L$ ).

Como resultado o *scanner* varre a superfície da amostra em arco e não em plano. Este movimento complexo provém de diferentes fontes, por exemplo, da não uniformidade do campo elétrico ao longo do tubo. O maior efeito é geométrico e reflete a maneira em que o *scanner* é construído. Assim, quando a amplitude da varredura é muito grande, a torção do tubo causa movimentos relativamente grandes fora do plano da amostra criando uma distorção vertical, como mostra a Figura 18 [78].

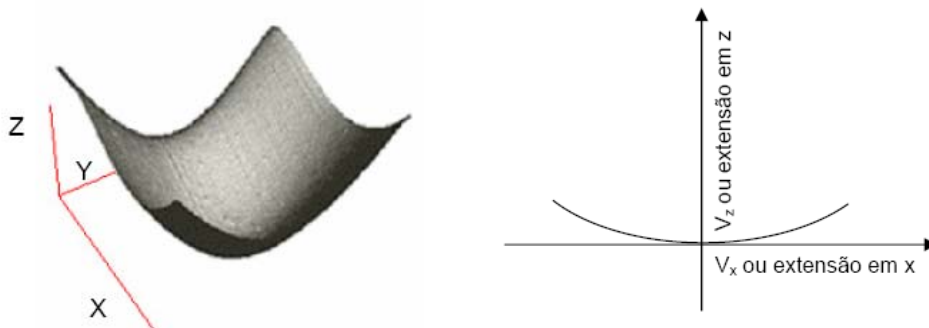


Figura 18: Distorção vertical do plano da imagem. a) curvatura de fundo típica de MFA com scanner tubular e b) corte no plano  $y,z$  no centro da imagem mostrando a trajetória da ponta. Adaptado [79]

### 2.3.3.3 Ruídos

A resolução está intimamente limitada por ruídos, que são produzidos pela própria vibração termal da movimentação do *cantilever*. A direção  $y$  é mais suscetível a variações de sinal provocadas por flutuações no *setpoint* do scanner ou mesmo vibrações mecânicas ambientes (solo ou sonora) [78, 80]. Isso ocorre devido a uma assimetria entre as direções  $x$  e  $y$  imagem causada pela diferença na velocidade da leitura em cada eixo, uma vez que a imagem é construída linha a linha. Este problema é facilmente amenizado com o isolamento do equipamento.

#### 2.3.3.4 Modo de varredura

Para o modo contato, a força do menisco de água é maior que as demais forças mascarando a força de van der Waals [74]. A sonda não pode ser levantada o suficiente sobre as moléculas, destruindo o filme fino ou pelo arrasto das moléculas ou por um defeito da superfície do substrato, levando a irreprodutibilidade das imagens [9, 73]. Entretanto, é com este modo que são obtidos as imagens de melhor resolução, chegando a nível atômico (definição horizontal inferior a 10 Å e definição vertical menor do que 1 Å) [9]. A alta resolução é favorecida pela geometria da ponta e a constante de mola da sonda de nitreto de silício, geralmente usada neste modo e, além disso, a sonda estar em contato constante com a superfície da amostra.

O modo dinâmico apresenta a vantagem de não danificar a amostra, pois como não há contato físico com a sonda. Assim, as forças de atrito entre a sonda e amostra são reduzidas, eliminando os problemas de deformação da amostra presentes no modo contato, porém a resolução normalmente fica limitada a algumas dezenas de nanômetros, que a é distância sonda-amostra [9].

Para ambos os modos operacionais a sonda utilizada deve ter raio de curvatura menor que as características físicas da amostra, se a sonda for maior um artefato conhecido como “imagem da sonda” pode ocorrer, em que a imagem é dominada pela geometria da sonda [76].

#### 2.3.3.5 Outros fatores

O ajuste dos parâmetros também merece atenção. Se os parâmetros estiverem superestimados o sistema pode oscilar, gerando ruídos periódicos na imagem e as regiões altas que estarão saturadas podem gerar sombras que encobriram detalhes mais baixos da superfície. Se os parâmetros estiverem com ganhos baixos, a sonda não acompanhará as alterações da superfície satisfatoriamente, perdendo detalhes e deixando a imagem com aspecto de embasada [76, 77].

#### 2.3.4 Tratamento da imagem

Alguns dos defeitos mencionados podem ser tratados com os sofisticados softwares que acompanham os MFAs que filtram os ruídos, retocam áreas com resolução ruim, magnificação ou redução na escala vertical, representação 3D e grade de cores são alguns dos tratamentos realizados [76, 79].

### 2.4 Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X

A espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) permite a investigação da superfície, sendo principalmente usada para quantificar os elementos que compõe a monocamada e investigar mudanças química com interpretação e teoria relativamente fáceis e rápidas. Porém, para tal a amostra deve ser estável sob alto vácuo, a área iluminada não pode ser focalizada, a resolução em energia é de 0,1 – 1eV e o carregamento da amostra pode ser um problema para a obtenção das energias de ligação de referência [81].

O princípio básico desta técnica é o efeito fotoelétrico que pode ser explicado pelo diagrama abaixo de níveis de energia (Figura 19). Consiste em irradiar a amostra com raios-X de preferência monoenergético e analisar a emissão de elétrons pela energia.

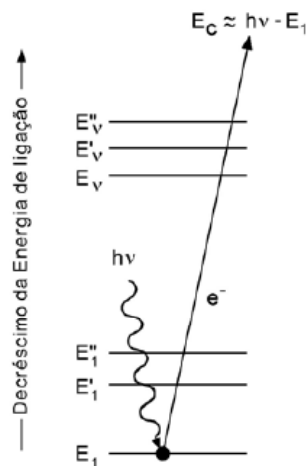


Figura 19: Esquema do processo XPS. As linhas superiores,  $E_v$ ,  $E'_v$  e  $E''_v$  representam alguns dos níveis de energia de outros elétrons de valência ou de uma camada e as linhas  $E_i$ ,  $E'_i$  e  $E''_i$  representam as energias dos elétrons das camadas mais internas K e L de um átomo.

Experimentalmente, fótons de raios-X de alta energia ( $h\nu$ ) são utilizados para ionizar átomos e moléculas através da transferência de toda a sua energia para o elétron (espalhamento elástico). Determinando-se a energia cinética,  $E_c$ , dos elétrons emitidos das camadas eletrônicas mais internas do átomo pela interação da luz com a amostra obtém-se valores para os potenciais de ionização dos orbitais envolvidos.

A energia cinética  $E_c$  do fotoelétron que deixa o átomo alvo depende da energia do fóton incidente,  $h\nu$ , e é expressa pela lei fotoelétrica de Einstein

$$E_c = h\nu - E_i - \phi \quad (2.4.1),$$

em que  $E_c$  é a energia cinética medida no detector,  $E_i$  é a energia de ligação do elétron emitido no orbital atômico,  $h\nu$  é a energia do fóton incidente, sendo  $h$  a constante de Planck ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$ ) e  $\nu$  a frequência da radiação, e  $\phi$  é a função-trabalho do material [82].

Pela medida da energia cinética pode-se calcular a energia de ligação e relacioná-la com o átomo emissor e suas ligações químicas.

A identificação dos elementos presentes na superfície é feita diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos dos fotoelétrons de caroço. A intensidade (área integrada da linha de emissão fotoelétrica) é proporcional ao número de átomos no volume detectado, permitindo, portanto, obter-se informação sobre a composição da superfície [83].

No XPS a intensidade dos fotoelétrons  $N(E)$  depende de três fatores principais [84]: características da amostra, seção de choque de fotoionização e fator instrumental. Mas, os espectros são usualmente apresentados na forma de gráficos (o número de elétrons detectados por intervalo de tempo versus a energia de ligação) no qual  $N(E)$  é uma função de  $E_i$ . A técnica de XPS reproduz diretamente as estruturas eletrônicas desde as camadas mais internas até a camada mais superficial, revelando os elementos presentes na superfície da amostra.

Nesta técnica os fotoelétrons possuem energia cinética na faixa de 10 a 1500eV, o que a torna bastante adequada ao estudo da superfície de sólidos, uma vez que o livre caminho médio dos elétrons nos sólidos é da ordem de algumas camadas atômicas (0,5 a 3,0nm). Assim, os elementos presentes na superfície da amostra são caracterizados diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos fotoelétricos. Isso se dá pelo fato de que os níveis de energia do processo de fotoemissão são quantizados e os fotoelétrons possuem uma

distribuição de energia cinética de picos discretos relativos às camadas eletrônicas do átomo foto-ionizado.

Informações sobre a composição superficial da amostra são obtidas através da área integrada do pico, que é proporcional ao número de átomos no volume detectado.

As energias de ligação não são somente específicas para cada elemento como também contêm informações químicas, pois os níveis de energia dos elétrons de caroço dependem fracamente do estado químico do átomo. Estes deslocamentos químicos podem ser explicados assumindo que a atração do núcleo por um elétron interno é diminuída pela presença de outros elétrons. Quando um desses elétrons é removido, a carga efetiva sentida por um elétron interno aumenta, ocorrendo assim um aumento nas energias de ligações.

Os picos fotoelétricos são superpostos por um fundo (*background*) de elétrons secundários e a presença de um buraco de caroço após a ionização, resultado de fotoelétrons produzidos dentro do ânodo da fonte de raios-X que estiveram sujeitos a um ou mais processos de espalhamento inelástico antes de serem emitidos da superfície. Acarretando em deslocamentos, separação das linhas de emissão e o surgimento de picos satélites. Por isso, a análise das energias de ligação do material deve ser acompanhada da análise de um padrão para que sejam avaliados estes deslocamentos químicos.

Em 1923 o físico francês Pierre Auger foi o primeiro a interpretar o processo de emissão secundária de elétrons [85], quando estava investigando o efeito fotoelétrico em gases usando uma câmara de nuvens.

A Figura 20 mostra um diagrama de níveis envolvendo a ejeção de um elétron de um nível interno causado por um feixe de partículas incidente como fótons. O íon formado eventualmente perde parte de sua energia potencial pelo preenchimento do buraco por um elétron de um nível mais externo, junto com a emissão de um fóton ou a emissão de um terceiro elétron, que deixa o átomo com uma energia cinética característica. Essa energia cinética do chamado elétron Auger é independente da energia da fonte excitadora.

Os elétrons Auger são denominados de acordo com os níveis de energia envolvidos, empregando-se a seguinte notação: K representa a camada eletrônica mais interna e L, M, N representam as camadas mais externas.

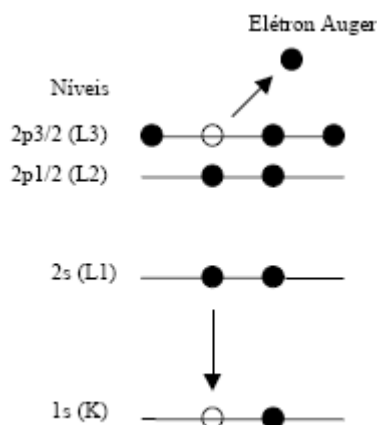


Figura 20: Diagrama de níveis de energia para elétron Auger. Adaptado de [85]

Entre as vantagens do XPS como técnica de análise superficial pode-se citar a não degradação da amostra. É sensível a praticamente a todos os elementos e é uma das poucas técnicas que fornece informação sobre a natureza química da ligação. Além disso, cada elemento tem um único grupo de energia de ligação. Então, o XPS pode ser usado para identificar e determinar a estequiometria dos elementos de superfície [86].

## 2.4.1 Equipamento de XPS

Basicamente um equipamento de XPS é composto de uma câmara de ultra-alto vácuo (*ultra high vacuum*, UHV), uma fonte de raios-X, um canhão de íons, um manipulador de amostra, um espectrômetro, um detector de elétrons e um computador para aquisição e tratamento de dados (Figura 21) [87]. Obviamente que dependendo do equipamento utilizado a sua configuração pode mudar com os diferentes acessórios que podem compô-lo.

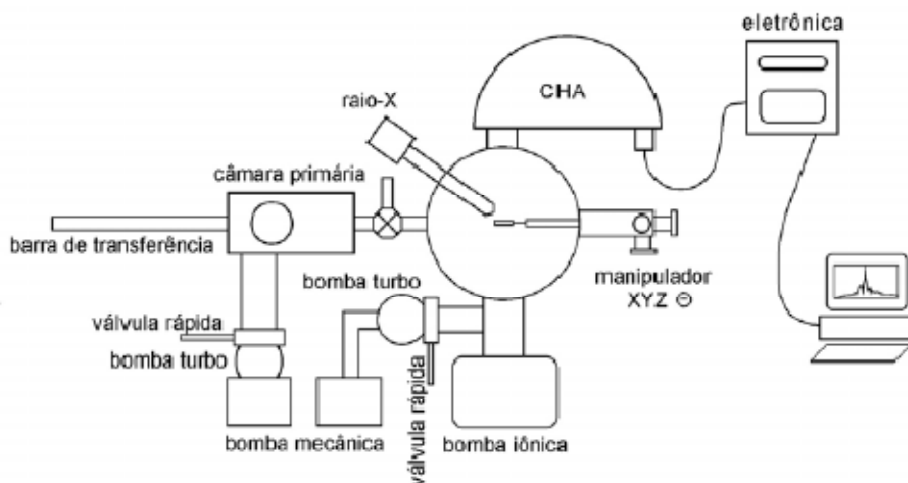


Figura 21: Esquema de um equipamento de XPS, em que a UHV é composta por duas câmaras isoladas por uma válvula.[87].

A amostra sólida é fixada em um porta-amostra de alumínio por meio de uma fita adesiva condutora e transferida para uma câmara. A câmara primária é dedicada à transferência de amostras da atmosfera para a segunda câmara (principal), praticamente sem alterar o vácuo desta última. Na parte inferior está o sistema de bombeamento composto por duas bombas mecânicas. Por último uma segunda bomba é utilizada para bombear isoladamente a câmara principal, o que proporciona uma pressão residual menor. A câmara principal é dedicada exclusivamente a análise de amostras e é equipada com um tubo de raios-X, um canhão de íons para gases inertes, um manipulador XYZ que permite um ajuste fino da posição da amostra, um sistema de aquecimento da amostra e um analisador CHA equipado com um detector de elétrons [87].

A câmara de UHV se faz necessária para que a superfície a ser analisada esteja livre de gases adsorvidos e de contaminantes [87]. Isso se dá pelo fato de que os elétrons podem colidir com as moléculas de gases residuais, atingindo a amostra ou o detector, desta maneira é preciso pressões menores que  $10^{-5}$  Pa. As bombas mais utilizadas para atingir a condição de UHV na câmara são a bomba de difusão, a bomba turbo-molecular e a bomba iônica.

Em geral, as amostras são introduzidas dentro do ambiente da câmara do UHV através de sistemas tipo *air-lock* que permitem uma transferência em questão de segundos [87]. O principal contaminante da superfície da amostra é o carbono, além do oxigênio, cloro, enxofre, cálcio e nitrogênio. O bombardeamento sobre a superfície por íons de gases inertes pode ser feito com o propósito de obter uma superfície mais limpa, o aquecimento também pode ser utilizado.

A fonte de fótons em um equipamento de XPS gera raios-X “moles” (de baixa energia) produzidos a partir de um ânodo de alumínio (1486,7eV) ou de magnésio (1253,6eV) [87]. Para o caso do alumínio o intervalo do espectro de raios-X utilizado é de 0 a 1200eV e

para o magnésio é de 0 a 1400eV banhando a amostra com radiação. Os fótons interagem com a amostra e os fotoelétrons emitidos são coletados por um analisador de energia.

O livre caminho médio em combinação com a orientação da emissão fotoelétrica dá origem à chamada “profundidade de escape” na ordem de 2-10 monocamadas atômicas do material analisado.

O analisador de elétrons mais usado em XPS é o hemisférico concêntrico (*concentric hemispheric analyser*, CHA) e tem o papel de discriminar o número de elétrons emitidos em função de sua energia cinética. Fazendo o uso da equação 4.1 a energia dos fotoelétrons é relacionada ao elemento e suas ligações químicas. Para muitos materiais uma alta resolução em energia de elétrons ( $< 0,1\text{eV}$ ) é necessária na análise da superfície para que os deslocamentos químicos sejam medidos com precisão.

A área integrada sob os picos característicos, quando aplicados os fatores de correção necessários, fornecerá a fração molar deste elemento químico presente na amostra.

### 3. Procedimento Experimental

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Mica muscovita

A mica muscovita foi cortada em pedaços de 1cm<sup>2</sup> e 0,25cm<sup>2</sup> e clivada imediatamente antes da deposição das soluções, para garantir uma superfície atômicamente plana e livre de contaminantes do ambiente.

##### 3.1.2 Solução estoque de proteína GlnB-Hs

A proteína GlnB-Hs (50mM de Tris/HCl pH 8, 50mM de NaCl, 0,1 mM EDTA e 50% de glicerol) [21] foi diluída para a concentração final de 10nM em **solução A** (50mM Tris/HCl, pH8, 50mM de NaCl), em **solução B** (50mM de Tris/HCl pH 8, 200mM de NaCl) e para a concentração final de 100pM na **solução D** (50mM de Tris/HCl pH 8, 200mM de NaCl). Uma **solução A1**, contendo os constituintes da solução tampão, foi preparada (50mM Tris/HCl, pH8, 50mM de NaCl).

Solução	Concentração de Tris	Concentração do NaCl na solução	Concentração de Proteína
A	50mM	50mM	10 nM
B	50mM	200nM	10 nM
D	50mM	50mM	100pM
A1	50mM	50mM	-

Tabela 1: Concentração final de proteína GlnB-Hs e NaCl nas soluções após diluição.

##### 3.1.3 Soluções para o revestimento da mica

A solução de fosfato utilizada para a funcionalização da mica continha 0,14g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Para o revestimento com etanol usou-se o etanol 98% (Merck). A polilisina (Sigma Aldrich) utilizada para o revestimento da mica, fornecida pelo IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná), tem peso molecular desconhecido e foi diluída com água Milli-Q até a concentração de 0,001mg/ml. Para funcionalização do substrato com  $\alpha$ -cetogluturato foi usado  $\alpha$ -cetogluturato (Sigma) na concentração final 0,5mM.

##### 3.1.4 Solução de $\alpha$ -cetogluturato com proteína

A **solução E** (5 $\mu$ l) contendo 50mM Tris/HCl pH8,0, 50mM NaCl, 10nM GlnB-Hs e 1mM de  $\alpha$ -cetogluturato foi depositada sobre a mica à 1000rpm. Após 30s de adsorção a superfície da amostra foi lavada três vezes com 20 $\mu$ l de solução Tris/HCl 10mM pH8,0 para remoção das proteínas/  $\alpha$ -cetogluturato não aderidas.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Deposição da proteína GlnB-Hs sobre a mica para análise por MFA

Uma alíquota de 5 $\mu$ l das soluções A e B foi depositada sobre a mica previamente clivada. Os dois métodos de deposição utilizados foram o *drop deposition* e o *spin coating*.

Nas deposições por *drop deposition* as soluções A e B foram depositadas sobre a mica e incubadas por 24h à 21°C sem controle de umidade.

Nas deposições por *spin coating* (*sp*) 5 $\mu$ l da solução A foram pipetados no centro do substrato. Dois tipos de deposição foram realizadas, a deposição estática com velocidade angular  $\omega=0$ rpm e a deposição dinâmica com  $\omega=1000$ rpm [27]. Os tempos de adsorção para as amostras foram de 30segundos, 1minuto e 5minutos. Após a adsorção a superfície foi lavada três vezes com 20 $\mu$ l de solução Tris 10mM para remoção de partículas que não ficaram aderidas. Depois de 30s a 1000rpm e alguns segundos em rotação máxima (4000rpm) as amostras foram incubadas por 24h a 21°C antes das medidas com o MFA.

Duas amostras controle foram preparadas pelo método de *drop deposition* sobre a mica. Em uma foi depositado 5 $\mu$ l de solução de NaCl 50mM e na outra 5  $\mu$ l de solução de Tris 50mM. As amostras foram incubadas por 24h a 21°C.

### 3.2.2 Deposição das soluções para funcionalização da superfície da mica

As substâncias utilizadas para o revestimento da mica foram depositadas por *spin coating* (*sp*) dinamicamente e por imersão.

O etanol 98% (20 $\mu$ l) foi depositado sobre o substrato em rotação de 1000rpm. Após 30s de adsorção do etanol sobre a mica o *spin coating* foi desligado ( $\omega=0$ rpm) por 15segundos para estabilização do filme. Em seguida, o equipamento foi novamente ligado a velocidade de 4000rpm, por poucos segundos, para retirar o excesso de material.

A polilisina 0,001mg/ml (10 $\mu$ l), tampão fosfato diluído 10X (0,014g/L) (20 $\mu$ l) e o  $\alpha$ -cetogluturato 0,5mM (20 $\mu$ l) foram depositados dinamicamente a 1000rpm sobre a mica recém clivada. Depois de 30s de adsorção das soluções de revestimento sobre a mica a velocidade de rotação foi aumentada para 4000rpm por poucos segundos.

A eficiência de cobertura dos revestimentos depositados sobre a mica por *spin coating* foi comparada com o método de deposição por imersão. Os quadrados de 0,25 cm<sup>2</sup> de mica foram mergulhados em etanol 98%, polilisina 0,001mg/ml, fosfato 0,014g/L e  $\alpha$ -cetogluturato 1mM por 12h. O excesso de material foi retirado utilizando-se *spin coating* a  $\omega=4000$ rpm por poucos segundos.

### 3.2.3 Deposição da GlnB-Hs sobre os revestimentos

Para determinar as condições ideais de deposição da proteína GlnB-Hs sobre a mica funcionalizada, utilizando-se o método de deposição por *spin coating* com dispensa estática e dinâmica e variando-se o tempo de adsorção da solução A sobre a mica funcionalizada.

A solução A (5 $\mu$ l) foi depositada dinamicamente a 1000rpm e após 30s de adsorção ou por 1minuto nas deposições estáticas, a superfície foi lavada 3X com 20 $\mu$ l de solução Tris 10mM para remoção das proteínas não aderidas. Após 30s do término da lavagem, a velocidade foi aumentada para 4000rpm por alguns segundos.

O controle foi realizado com deposição dinâmica com 30s de adsorção da solução tampão A1 (50mM Tris/HCl, pH8, 50mM de NaCl) sobre as micas revestidas. Após 30s de adsorção a superfície foi lavada 3X com 20 $\mu$ l de solução Tris/HCl 10mM, pH8.

A solução B (5µl) foi depositada dinamicamente a 1000rpm sobre a mica revestida com  $\text{PO}_4^{3-}$ . Após 30s de adsorção a superfície foi lavada seis vezes: 3X com 20µl de solução tampão alto sal (50mM Tris/HCl, pH8 e 200mM NaCl) e 3X com 20µl de solução Tris/HCl pH8 10mM. Após de 30s do término das lavagens aumentou-se a velocidade para 4000rpm por alguns segundos.

As amostras ficaram em repouso por 24h à 21°C antes de serem analisados por MFA.

### **3.2.4 Deposição das soluções A e A1 para análise de XPS**

Duas amostras foram preparadas por *drop deposition* sobre 1 cm<sup>2</sup> mica. Na primeira foi depositado 5µl da solução A e na outra 5µl de solução tampão A1. As amostras foram incubadas por 24h a 21°C.

Uma amostra de 1cm<sup>2</sup> mica muscovita recém clivada foi analisada para controle.

Os filmes formados pela solução A e A1 sobre a mica serão denominados mica/solução A e mica/solução A1, respectivamente.

### **3.2.5 Análises por Microscopia de força atômica (MFA) dos filmes formados sobre a mica**

Em cada amostra quatro regiões distintas e aleatórias foram analisadas por microscopia de força atômica. O microscópio utilizado foi Shimadzu modelo SPM9500J3 operando no modo dinâmico com frequência de varredura de 1,3Hz, *cantilever* de silício (Nanosensors) de constante de mola de 42 N/m e raio de curvatura de 10nm, à temperatura e umidades ambientes. Todas as imagens foram tratadas com o *software* da Shimadzu para correção de inclinação do piezoelétrico e eliminação de ruídos mecânicos.

### **3.2.6 Análise por Espectroscopia de Fotoelétrons (XPS)**

O equipamento usado foi um ESCA 3000 V.G. Microtech, no laboratório de Superfícies e Interfaces (LSI) na UFPR. A radiação utilizada foi a monocromática  $\text{MgK}_\alpha$  (1253,6eV). A espectroscopia de fotoelétrons foi realizada em uma câmara de ultra alto vácuo (UHV) que opera em  $10^{-9}$  mBar aproximadamente.

Os espectros obtidos das três amostras resultam da acumulação de 30 espectros em passos de 100eV.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Análises por Microscopia de Força Atômica (MFA) dos Filmes Formados sobre a Mica

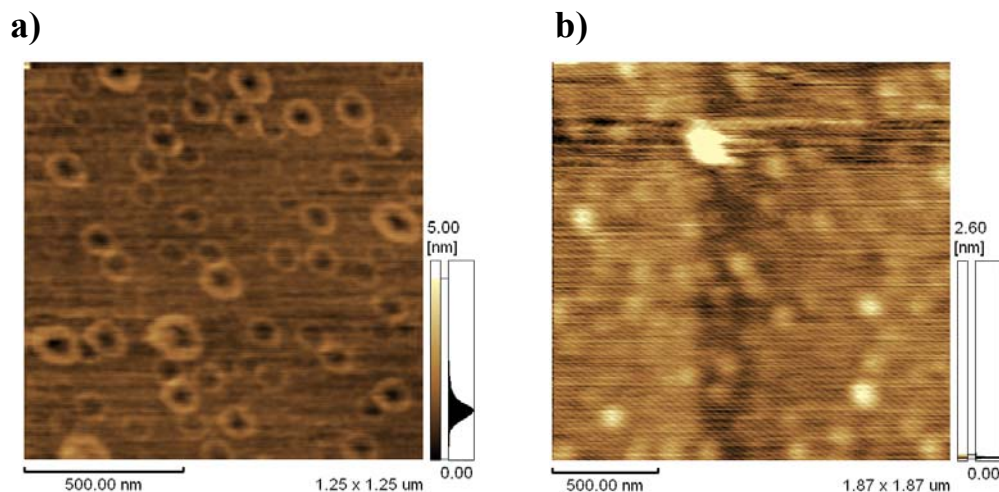


Figura 22: Efeito da concentração de sal na estrutura supramolecular do filme protéico formado sobre a mica. Topografia do filme da proteína GlnB-Hs sobre a mica depositada pelo método *drop deposition*. a) solução A e b) solução B.

Nas amostras preparadas por *drop deposition* com solução A (Figura 22-a)) nota-se estruturas em forma de anéis com diâmetro de  $125 \pm 19 \text{ nm}$  e altura de  $1,0 \pm 0,3 \text{ nm}$  que revestem completamente as áreas varridas. Estas estruturas podem se formar por processos de nucleação e crescimento sobre o substrato ou estas estruturas já existem em solução quando são adsorvidas sobre a mica.

A Figura 22-a) mostra que existe mais de uma camada de proteína depositada sobre a mica. A imagem da superfície do filme mostra que os anéis estão dispostos aleatoriamente na camada mais externa do filme protéico.

Para verificar o efeito da força iônica na formação do filme a concentração de NaCl na solução foi aumentada para 200mM (solução B). A Figura 22-b) mostra que o filme formado apresenta um grande número de estruturas menores e compactas, diâmetro de  $104 \pm 13 \text{ nm}$  e altura média de  $0,4 \pm 0,1 \text{ nm}$ , quando comparadas com as estruturas observadas na solução A. O aumento da concentração iônica nas solução diminui a área superficial de contato da proteína, diminuindo a possibilidade de interação entre estas macromoléculas [30].

Um controle negativo foi feito pela deposição dos constituintes da solução tampão sobre a mica por *drop deposition*. Os arranjos auto-organizados da solução NaCl 50mM e da solução Tris 50mM Figura 23-a) e b), respectivamente, assemelham-se as estruturas encontradas nas soluções A e B (Figura 22-a) e b)), dificultando a distinção entre as estruturas formadas pela GlnB e as formadas pelas moléculas de outros constituintes das soluções A e B.

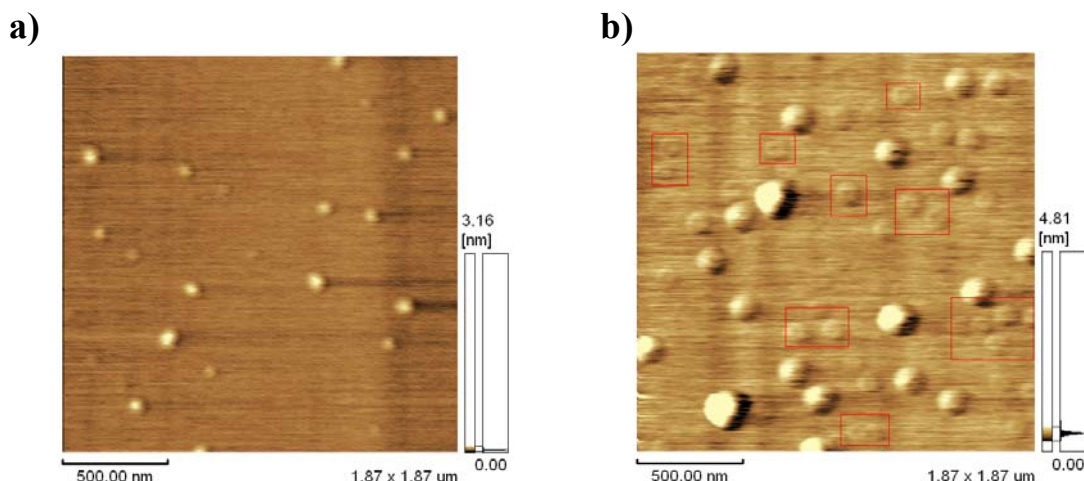


Figura 23: Topografia dos filmes de NaCl e Tris formada sobre a mica. Estas soluções (5 $\mu$ L) foram depositadas por drop deposition. a) solução de NaCl 50mM e b) solução de Tris 50mM, em destaque as estruturas menores com depressão central.

O NaCl forma estruturas esféricas de diâmetro  $75\pm 14$ nm e altura de  $0,6\pm 0,2$ nm espaçadas entre si. No Tris ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> - tris(hidroximetil)aminometano, componente da solução tampão que auxilia na estabilidade da proteína) observamos dois padrões de auto-organização: 1) aglomerados esféricos maiores, com diâmetro de  $129\pm 25$ nm e altura de  $1,0\pm 0,7$ nm e 2) aglomerados menores (diâmetro  $104\pm 15$ nm e altura  $0,3\pm 0,1$ nm) com uma depressão central, como observado na Figura 23-b). Os aglomerados com depressão central podem consistir a unidade básica do filme que se combina para formar os aglomerados maiores.

Condições experimentais	Diâmetro dos agregados nm( $\pm$ dp)	Altura dos adregados nm( $\pm$ dp)	Rugosidade RMS nm
Solução A	125( $\pm$ 19)	1,0( $\pm$ 0,3)	0,3
Solução B	104( $\pm$ 13)	0,4( $\pm$ 0,1)	0,4
NaCl 50mM	75( $\pm$ 14)	0,6( $\pm$ 0,2)	0,2
Tris 50mM	129( $\pm$ 25)	1,0( $\pm$ 0,7)	0,7
	104( $\pm$ 15)	0,3( $\pm$ 0,1)	0,7

Tabela 2: Dimensões das estruturas formadas a partir das soluções A, B, NaCl 50mM e Tris 50mM depositadas por drop deposition sobre a mica com 24h de incubação.

Para uniformização da adesão das proteínas da solução A sobre o substrato e obtenção de um filme fino e contínuo de proteína foram realizadas deposições dinâmicas e estáticas por *spin coating*. Três tempos diferentes de adsorção foram testados a 1000rpm que correspondem a velocidade de rotação mais adequada para formação de filmes homogêneos de GlnB em Si [88].

Os filmes formados pela deposição dinâmica da solução A (5  $\mu$ l) sobre a mica em diferentes tempos de adsorção não ficaram uniformes, como o esperado, provavelmente porque as interações entre partículas/partículas da solução são maiores que as interações partículas/mica ou o tempo de adsorção foi insuficiente.

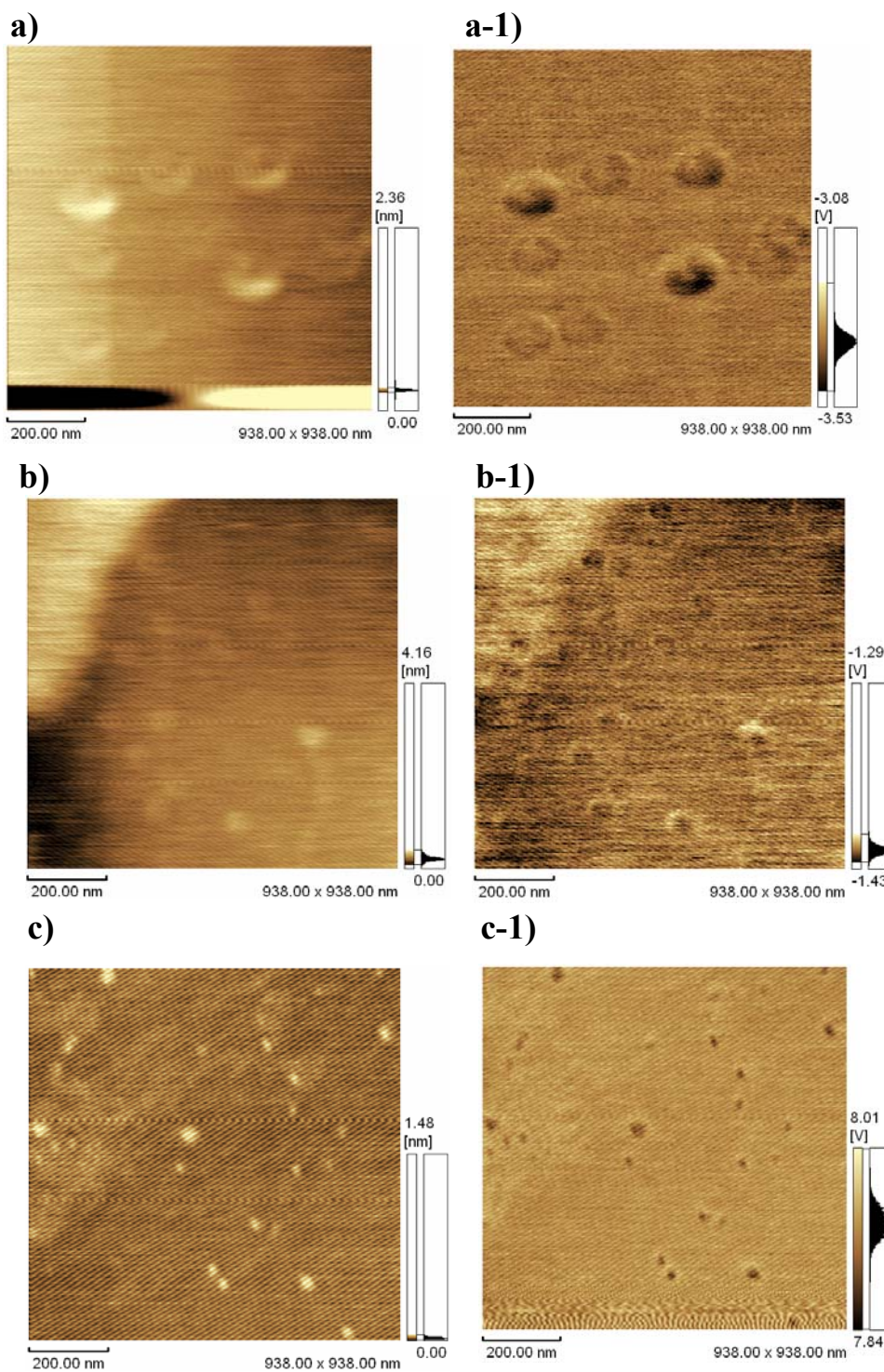


Figura 24: Efeito do tempo de adsorção na estrutura do filme protéico formado sobre a mica. A solução A foi depositada dinamicamente por spin coating. a) 30 segundos b) 1 minuto e c) 5 minutos de adsorção. As imagens da esquerda são de topografia e da direita são de fase.

Uma notável diferença foi observada no padrão de auto-organização, distribuição e dimensões das estruturas formadas com os diferentes tempos de adsorção por deposição dinâmica (Figura 24-a, b) e c)). O diâmetro das estruturas mostradas nas imagens de MFA acima decresce, enquanto que o número de estruturas observadas por região aumenta com o tempo de adsorção. Além disso, observou-se um aumento do ruído e, conseqüentemente diminuição da qualidade das imagens com o aumento de tempo de adsorção.

Utilizou-se o scanner de 3 $\mu$ m (Shimadzu) na tentativa de melhorar a qualidade das imagens, entretanto, não houve melhora na resolução das imagens, provavelmente pela interferência da umidade relativa do ar e instabilidade do filme que leva ao aumento do ruído.

Nos filmes formados com tempos de adsorção de 30 segundos e 1 minuto foram observados arranjos semelhantes aos obtidos no filme formado em presença de Tris (Figura 23-b)). No tempo de adsorção de 5 minutos, formaram-se estruturas de forma esférica lembrando aquelas obtidas no filme formado apenas com NaCl (Figura 23-a)).

As estruturas formadas com 30s de adsorção são maiores e aparecem em número reduzido, sugerindo que a proteína interage fracamente com a mica e que a lavagem com Tris removeu a maior parte do material depositado. No tempo de 1 minuto parece que maior quantidade de material aderiu, recobrimdo toda a superfície da mica. No caso da amostra de 5 minutos o recobrimento da superfície é quase uniforme, sendo que as estruturas esféricas podem ser cristais de sal resultantes da evaporação da água.

A diminuição do diâmetro das estruturas formadas nos filmes com o aumento do tempo de adsorção pode ser consequência de uma maior difusão das moléculas anteriormente aderidas ocasionando a extensão lateral do filme (Figura 25).



Figura 25: Diagrama esquemático mostrando a expansão lateral do filme de proteínas através da adição lateral de proteínas às já adsorvidas.

Possivelmente, a solução já presente estruturas supramoleculares de diferentes tamanhos que aderem sobre a mica. Em tempos de adsorção menores a adesão das estruturas de maior massa seria controlada pela força gravitacional durante a deposição e pela aceleração centrífuga resultante da velocidade angular.

Nas imagens de fase da Figura 24-a-1) e c-1) os tons mais escuros estão associados com uma maior dissipação de energia durante a interação da ponta com o material, podendo ser causado por uma maior concentração de material menos aderido na região. Na Figura 24-b-1) a imagem da fase apresenta um tom mais homogêneo, indicando uma maior regularidade na adesão do material na superfície da mica.

A seguir, deposições estáticas ( $\omega=0$ ) por *spin coating* da solução A com tempos de adsorção de 30s, 1 minuto e 5 minutos foram realizadas para aumentar a adsorção de proteínas sobre a mica.

A primeira mudança verificada é uma maior dificuldade de varredura destas amostras ocasionada pela camada de água e/ou solução, como mostra a Figura 26- a) e b). A superfície instável favorece o deslocamento de material pela ponta durante a varredura (visível no lado esquerdo da Figura 26-a)) diminuindo a resolução das imagens.

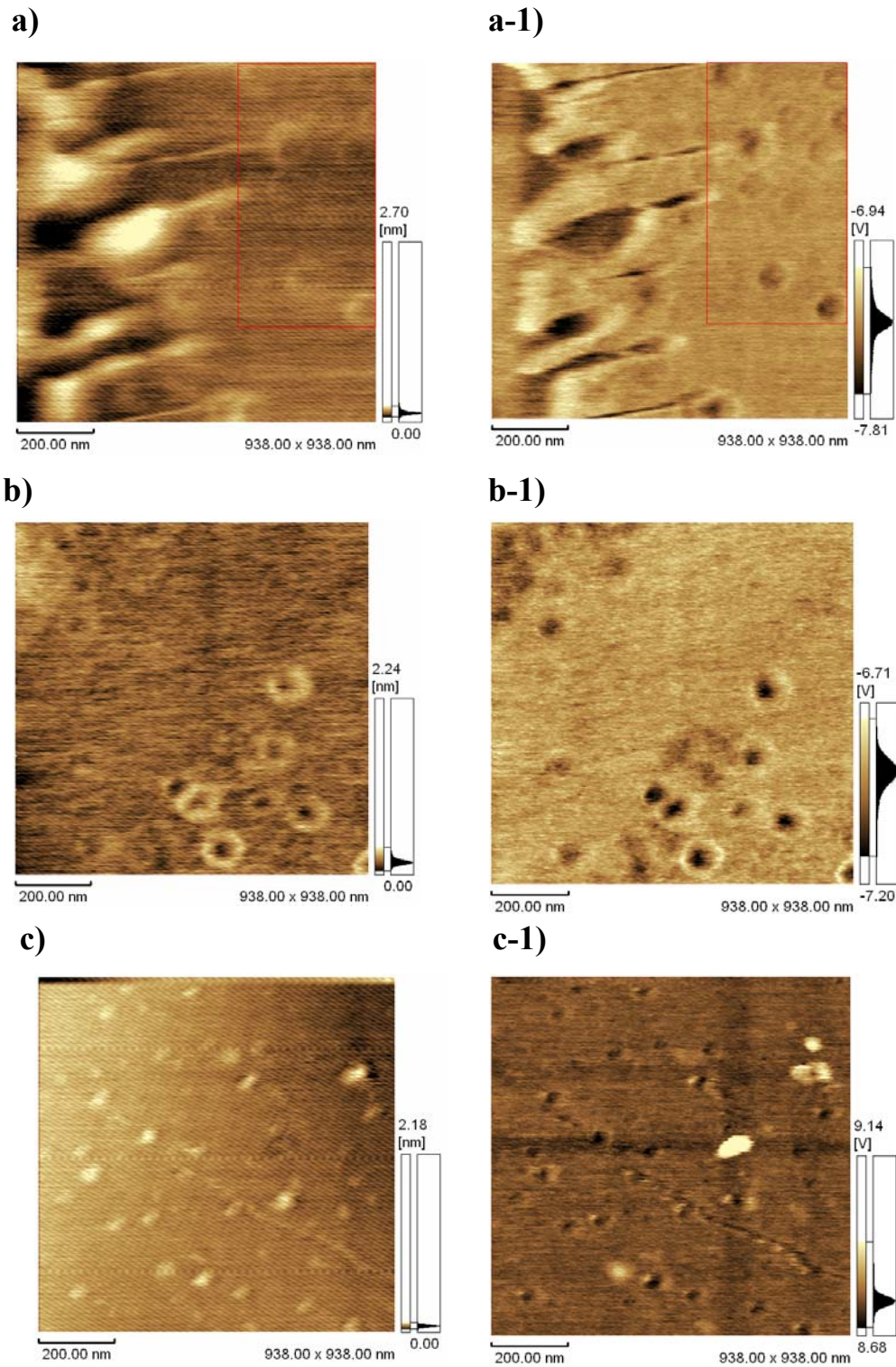


Figura 26: Efeito do tempo de adsorção na estrutura do filme protéico formado sobre a mica. A solução A foi depositada por spin coating de forma estática. a) 30segundos, b) 1minuto e c) 5minutos de adsorção. As imagens da esquerda são topografia e da direita são imagens de fase.

Condições experimentais	Diâmetro dos agregados nm( $\pm$ dp)	Altura dos agregados nm( $\pm$ dp)	Rugosidade RMS nm
30s dinâmico	142( $\pm$ 14)	0,6( $\pm$ 0,2)	1,1
1 min dinâmico	67( $\pm$ 8)	0,4( $\pm$ 0,1)	0,7
5 min dinâmico	41( $\pm$ 8)	0,3( $\pm$ 0,1)	0,2
30s estático	119( $\pm$ 25)	0,7( $\pm$ 0,1)	0,3
1min estático	117( $\pm$ 10)	1,4( $\pm$ 0,3)	0,3
5min estático	32( $\pm$ 7)	0,2( $\pm$ 0,1)	0,2

Tabela 3: Dimensões dos arranjos auto-organizado da GlnB-Hs na solução A sobre mica durante deposição por *spin coating* em diferentes tempos de adsorção com deposição dinâmica e estática.

A tabela 3 compara a dimensão das estruturas observadas nos filmes protéicos formados em diferentes condições de deposição por *spin coating*. As médias de diâmetro e altura foram calculadas a partir de 4 áreas distintas varridas da mesma amostra, enquanto que a rugosidade é relativa às imagens mostradas.

As estruturas destacadas pelo quadrado vermelho na imagem da amostra de 30segundos com deposição estática da solução A sobre a mica (Figura 26-a)) são semelhantes aos agregados menores observados na amostra da solução de Tris 50mM, Figura 23-b), diferenciando apenas no diâmetro.

As estruturas em forma de anéis observadas no filme formado pela solução A, depositada por *drop deposition* (Figura 22-a)) aparecem em uma menor quantidade em relação ao filme formado pela solução A depositada estaticamente com tempo de adsorção de 1minuto (Figura 26-b)). O diâmetro dos anéis são 6% menores do que os observados na deposição por *drop deposition*. Na imagem de fase da amostra preparada estaticamente (Figura 26-d)) o centro dos anéis aparecem em tom mais escuro, sugerindo que o material nesta região pode estar menos aderido ou apresentar-se mais viscoso dissipando mais energia mecânica do sistema sonda do MFA e a superfície.

Os filmes formados pela solução A depositada estaticamente (Figura 26-c)) ou dinamicamente (Figura 24-c)) com 5minutos de adsorção são semelhantes e as estruturas formadas nestes filmes têm aproximadamente 36nm de diâmetro e aparecem em maior quantidade no filme depositado estaticamente.

Todos os filmes formados pelas soluções A e B depositadas em diferentes condições não são uniformes e contínuos, com disposição aleatória das estruturas sobre a superfície. Porém, o padrão da superfície da mica (ondas) (Figura 27) não é perceptível, indicando que foram formados filmes com mais de uma camada de proteína. Os filmes preparados por *spin coating* indicam que a velocidade de rotação do substrato na deposição precisa ser ajustada para se obter uma taxa de evaporação maior e um filme mais homogêneo.

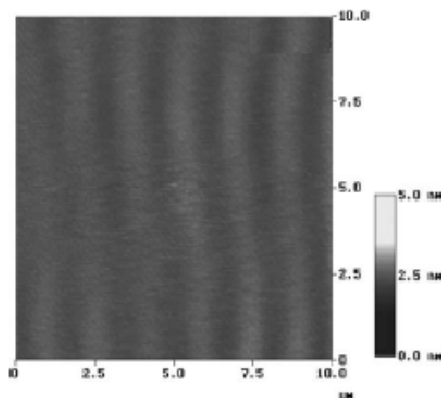


Figura 27: Topografia da superfície da mica obtida por MFA operando em modo contato. Área de  $100\mu\text{m}^2$ . Adaptado de [89]

Mesmo com os diferentes tempos de adsorção e métodos de deposição os arranjos das soluções A e B em todas as amostras analisadas apresentam repetição de um padrão com geometria globular, porém com variação da forma, dimensões e disposição das estruturas supramoleculares.

Possivelmente porque a interação entre as partículas, principalmente entre o sal e a proteína é mais forte do que entre estas e o substrato.

Assim sendo, a presença de Tris e sal interferem na resolução das imagens de MFA dificultando a distinção da proteína GlnB nos filmes finos.

Vários modelos descrevem a formação de filmes de proteína (nucleação e crescimento) [53, 90, 91, 92, 93]. Entretanto, devido a fraca adesão da GlnB-Hs na mica e pela formação da camada de água, não é possível usar estes modelos neste caso. Não se pode afirmar que as estruturas observadas são formadas pela nucleação progressiva ou pela coalescência do filme durante as varreduras seqüenciadas no MFA. Além disso, os experimentos deixam claro que a organização do filme depende da concentração de sal da solução, da camada de água, além de depender do coeficiente de difusão da proteína, que por sua vez é função da temperatura, umidade ambiente e concentração de íons da solução.

#### 4.2 Espectroscopia de Fotoelétrons (XPS) dos Filmes de Proteína (solução A) e da Solução Tampão (solução A1) sobre Mica

Um ensaio preliminar das amostras descritas na seção (3.2.4) foi realizado para avaliar os filmes e caracterizar possíveis reações químicas entre os constituintes da solução A e A1 e a mica.

A primeira varredura (*survey*) das 3 amostras, Figura 28, nos fornece uma investigação rápida e qualitativa dos elementos químicos e compostos presentes na superfície.

Após localizar as linhas dos elementos e compostos de interesse, um número maior de varredura foi realizado nestas regiões para melhorar a relação sinal-ruído dos espectros. Os elementos selecionados foram o N 1s, Si 2p do SiO<sub>2</sub>, o C 1s e o Na 1s proveniente do NaCl.

As energias de ligação das diferentes formas do Na possuem uma pequena variação que não foram identificadas por falta de resolução das medidas. Assim, o elemento Na além da forma iônica pode estar na forma de NaOH (1071,9eV) ou oxidado pelo oxigênio do SiO<sub>2</sub> (1071,8eV)

Elementos atômicos	Energia de ligação (eV)
N 1s	398,1
C 1s	285,0
Si 2p do SiO <sub>2</sub>	103,3
Na 1s	1072,0
Na 1s do NaCl	1072,0
Na 1s do OH	1071,9
Na 1s do 2O-SiO <sub>2</sub>	1071,8

Tabela 4: Energias de ligação XPS dos elementos N 1s, C1s, Si 2p e do Na 1s para suas diferentes formas encontrados nas superfícies analisadas da mica, mica/solução A e mica/solução A1. [Handbook XPS apud 94]

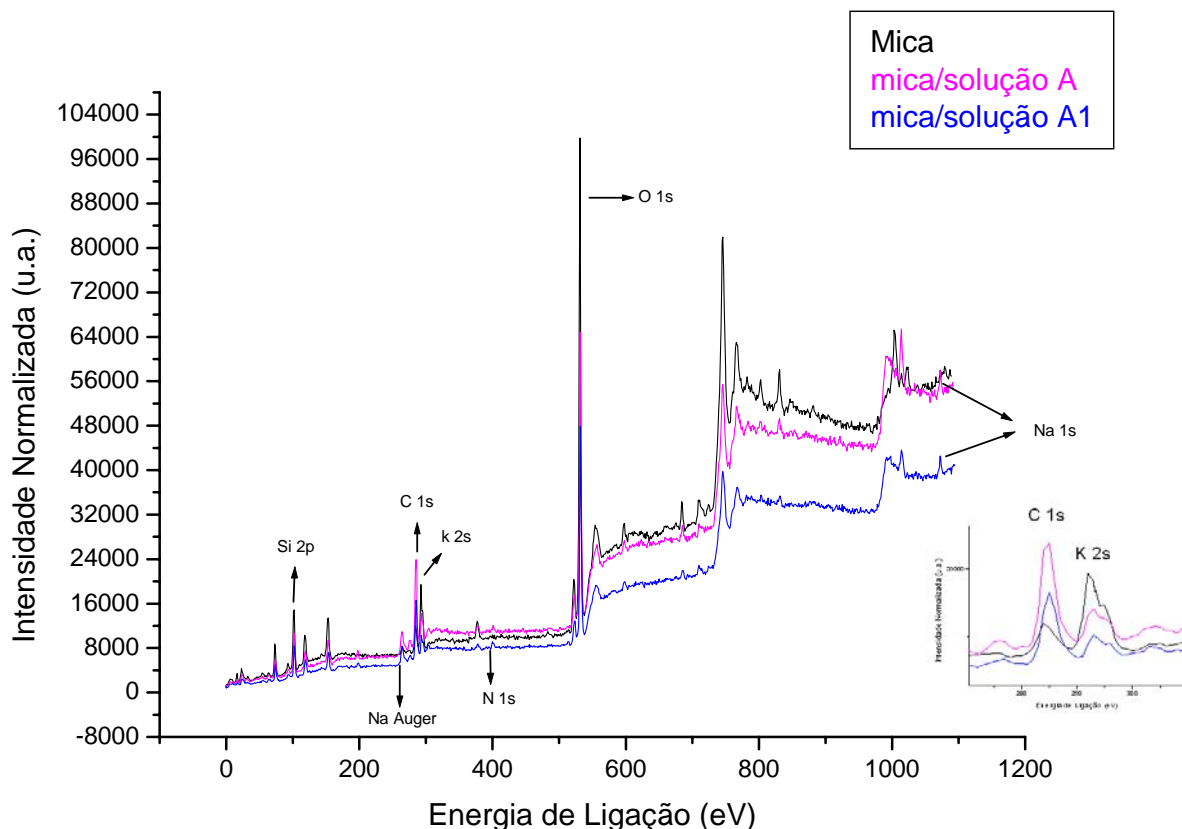


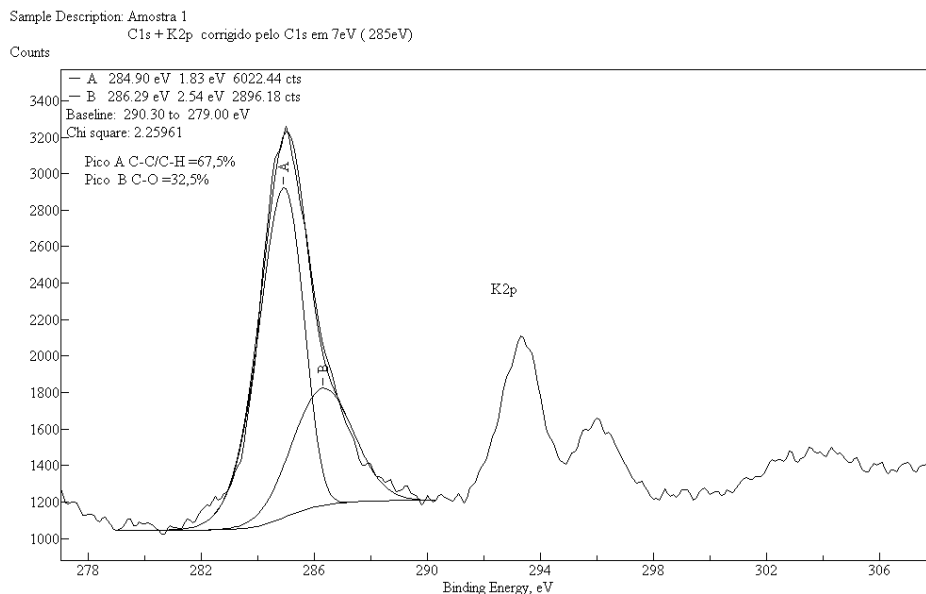
Figura 28: Espectros de XPS das superfícies da mica (preto) e da mica/solucão A1 (azul) e da mica/ solucão A (rosa) preparadas por drop deposition com tempo de incubação de 24h.

Devido ao efeito de carregamento das superfícies as curvas da Figura 28 da mica/solucão A e mica/solucão A1 foram corrigidas com o valor do C 1s (285eV), enquanto que a da superfície da mica foi corrigida pelo O 1s do  $Al_2O_3$  (531eV).

Os espectros do *survey* (Figura 28) mostram uma mudança nas intensidades dos picos da mica, mica/solucão A e mica/solucão A1. A intensidade dos picos do K 2s (377,2eV), do O 2s<sup>2</sup> (531eV), do Si 2p (103,3eV) correspondentes aos fotoelétrons provenientes da superfície da mica decresce devido aos filmes formados pela deposição das soluções A e A1 por *drop deposition*.

A intensidade do pico do C 1s (285eV) proveniente da amostra mica/solucão A é maior em relação ao pico C 1s (285eV) da mica/solucão A1. O pico do C 1s (285eV) observado na mica é proveniente de contaminantes do ambiente [95]. A Figura 28 apresenta a deconvolução do pico do C 1s das amostras com filme formado pelas soluções A e A1, após a normalização das curvas utilizando a função de Shirley [96, 97]. A deconvolução é uma curva ajustada por computador para o espectro do C 1s e resolve completamente dois picos associados com dois diferentes estados ligados do carbono, o C-C/C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> e o C-N/C-O-C.

a)



b)

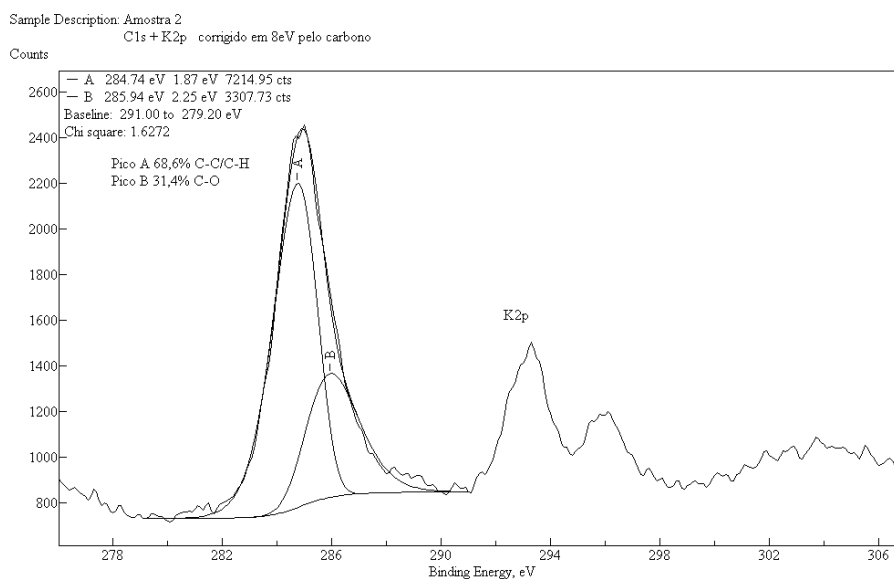


Figura 29: Curvas normalizadas e deconvoluídas dos elementos atômicos C 1s (285eV) e K 2p(377,2eV) dos filmes formados pelas soluções A e A1 por drop deposition. a) mica/soluçãoA1 e b) mica/solução A..

Elemento, ligação	Energia de Ligação (eV)
C-C	284,9
C <sub>x</sub> H <sub>y</sub>	285
C-N / C-O-C	286,4

Tabela 5: Energia de ligação do C 1s para suas diversas formas químicas presentes nos sistemas conteno solução analisados.

Os picos A da Figura 29-a) e b) são referentes aos carbonos participantes das ligações C-C e C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>. O aumento de 1,1% da contribuição do pico A (284,7eV) da amostra mica/solução A para o espectro nesta região em comparação ao da mica/solução A1 (284,9eV) não é suficiente para indicar presença de proteína na superfície da mica, pois pode estar relacionado ao erro da medida.

Vale a pena lembrar que a concentração de NaCl e Tris das soluções A e A1 é igual (50mM) e a concentração de moléculas de proteína por microlitro de solução é muito menor em relação a concentração de moléculas da solução de proteínas, como ilustrado na Figura 30-b). Entretanto, a proteína possui uma quantidade maior de C 1s em relação a molécula de Tris, justificando o pequeno aumento de 1,1% da contribuição do pico do C 1s das ligações C-C e C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> da amostra mica/solução nesta região.

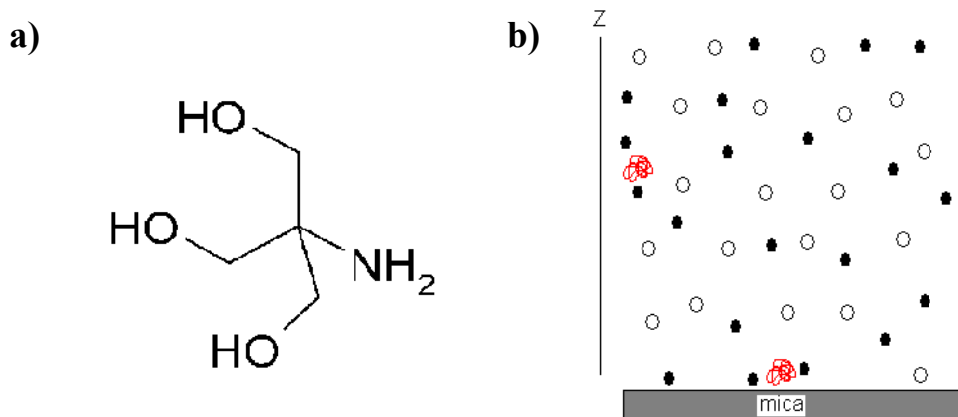


Figura 30: a) Fórmula estrutural de uma molécula de Tris e b) Desenho esquemático da distribuição das moléculas na solução A por microlitro na solução. As bolinhas pretas representam ions de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, as brancas moléculas de Tris e em vermelho as proteínas.

Os picos B do C 1s (Figura 29-a) e b)) proveniente das ligação C-N das amostras mica/solução A (285,9eV) e mica/solução A1 (286,3eV) apresentam pouca variação na porcentagem da concentração existente nos filmes das amostras. Este resultado consiste com a análise feita para os picos A e é compatível com as curvas do elemento N 1s (Figura 31) que apresentam também pouca variação entre as amostras.

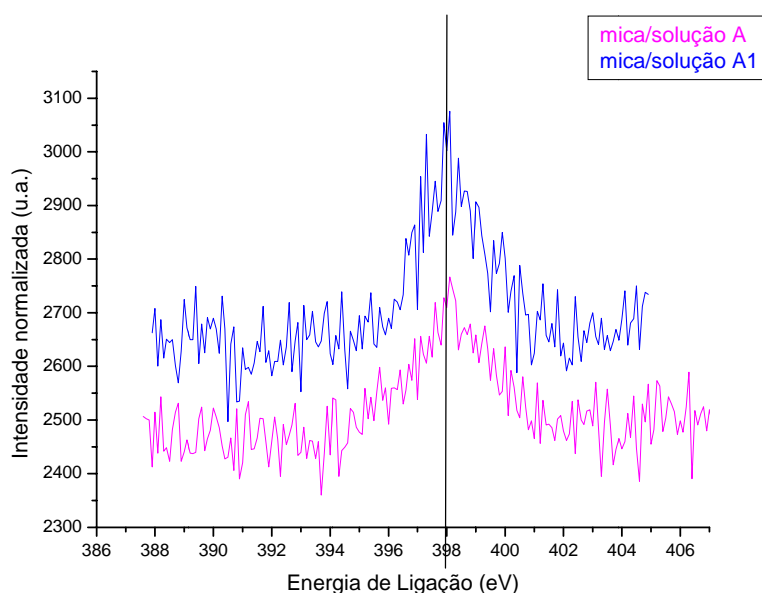


Figura 31: Espectro dos fotoelétrons provenientes do elemento N 1s da mica/solução A1 (azul) e mica solução A (rosa).

A relação sinal-ruído presente nas curvas do elemento N 1s (398,1eV) das amostras mica/solução A e mica/solução A1 (Figura 31) decorre da baixa quantidade deste elemento

nos filmes, impedindo maiores informações da contribuição deste elemento na formação do filme. Pelas curvas da Figura 31 não há variações significativas na intensidade, energia e perfil destes picos.

Elemento, ligação	Energia de Ligação (eV)
N-Si	398,3
N-C	399,2

Tabela 6: Energia de ligação do N 1s para suas diversas formas químicas presentes nos sistemas contendo solução analisados.

Os valores cobertos pelo pico sugerem que o N 1s pode estar ligado com o Si e C.

Os picos do elemento Na 1s (Figura 32) da mica/solução A1 e mica/solução A apresentam comportamento semelhante ao dos picos dos elementos N 1s e C 1s. Nenhuma variação significativa do pico e do perfil dos picos de Na 1s é observada.

O *background* das curvas do Na 1s da mica/solução A1 e mica/solução A foi subtraído utilizando uma reta ajustada visualmente. A superposição das curvas mostra uma pequena assimetria, irrelevante frente a resolução da medida. Com base na literatura poder-se-ia especular a contribuição de picos de energia de ligação menor que 1073 eV. Por exemplo, a literatura mostra o valor de 1071,8eV correspondente a ligação do tipo Na 1s proveniente da ligação com o 2O do SiO<sub>2</sub>, sugerindo a oxidação do Na pelo oxigênio do SiO<sub>2</sub> presente na mica. Assim, a seguir buscamos evidências destas reação.

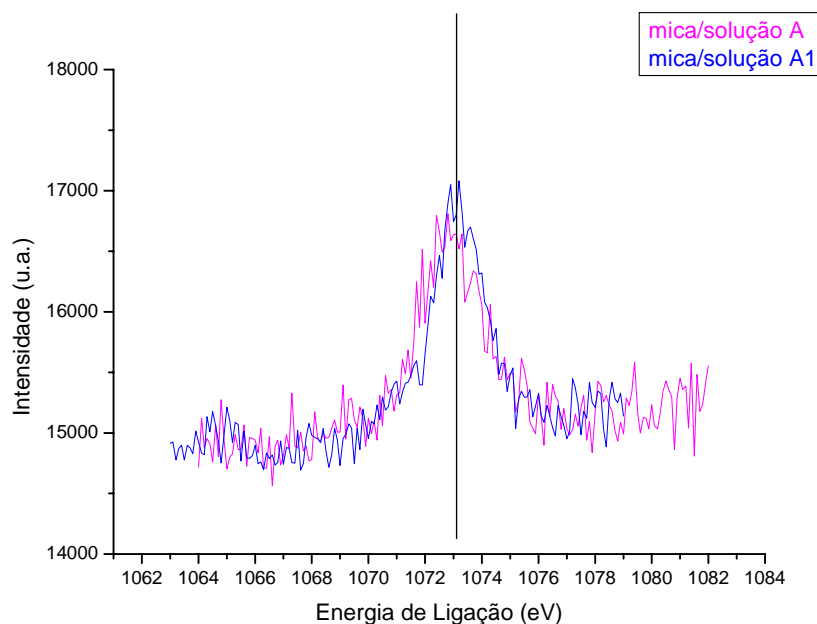


Figura 32: Espectro XPS do elemento Na 1s proveniente do NaCl (1072eV) da mica/solução A (rosa) e mica/solução A1 (azul) plotados com a subtração do background.

A utilização de métodos matemáticos como, a função Shirley [96, 97] para subtração do *background* da curva não se justifica no caso do Na 1s devido a baixa qualidade das medidas obtidas.

O valor da energia de ligação do Na 1s (1073,0eV) está 2,2eV acima da energia de ligação dos elétrons 1s do estado fundamental do Na [98]. Já na tabela *BE Lookup Table for Signals from Elements and Common Chemical Species* [Handbook XPS apud 94] o valor do íon Na 1s e do Na 1s proveniente do NaCl é 1072,0eV. Estas diferenças podem ser provenientes do ambiente onde o elemento Na está presente. Para o íon Na dos filmes

analisados existe várias possibilidades de interação do ion  $\text{Na}^+$  proveniente do NaCl da solução com os demais elementos atômicos presentes nas superfícies da amostra (ver tabela 1).

Outro aspecto que merece atenção é a presença dos picos do Na 1s Auger na energia de 264eV (valor independente do processo de formação do elétron Auger) do *survey*, que na realidade correspondem a energia cinética de 989,9eV [Fundamental AES Data apud 94] correspondentes as transições Auger das linhas KL's do sódio do NaCl. Note que considerando a energia incidente do foton do  $\text{MgK}_\alpha$  (1253,6eV) menos 264 eV da energia de ligação do elétron 1s do Na teremos 989,6 eV disponíveis para a energia cinética daquele fotoelétron.

Quando um elétron decai de um nível de energia maior (camada  $L_1$ , por exemplo) para preencher o espaço vazio na camada K (1072eV) deixado pelo elétron arrancado pela radiação  $\text{MgK}_\alpha$  (1253,6eV) a energia do foton emitido, pode arrancar um segundo elétron ( $e^-$  Auger) no sódio (Figura 33). Uma fração desta energia absorvida pelo  $e^-$  Auger do sódio é usada para superar a sua energia de ligação removendo o elétron de seu nível e a fração restante é mantida na forma de energia cinética ( $E_{c\ e^- \text{ Auger}}$ ).

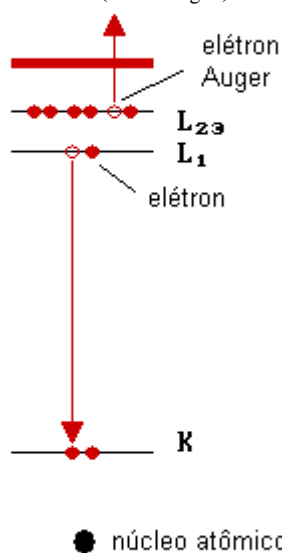


Figura 33: Desenho esquemático das camadas de energia para o átomo de sódio. Um elétron decai da camada  $L_1$  para preencher o espaço deixado pelo elétron arrancado pelo foton de raios X de 1253,6eV emitido pelo alvo de Mg. A energia liberada neste processo arranca um elétron da camada superior (camada  $L_{23}$ ), o elétron Auger.

Uma estimativa grosseira desta energia cinética do  $e^-$  Auger é dada por

$$E_{c\ e^- \text{ Auger}} = E_k - (E_{KL1} + E_{KL23}) \quad (4.2.1),$$

em que  $E_{c\ e^- \text{ Auger}}$  (989,9eV para o sódio) é a energia de ligação do e- Auger,  $E_k$  é a energia de ligação da camada K (para o Na é 1072eV),  $E_{KL1}$  a energia de ligação da camada  $L_1$  e  $E_{KL23}$  é a energia de ligação da camada  $L_{23}$ .

As energias  $E_{c\ e^- \text{ Auger}}$  e a  $E_k$  possuem valores determinados, enquanto que os dois termos das energias de ligação da camada  $L_1$  e  $L_{23}$  podem combinar-se de várias maneiras, isto quer dizer que, é impossível afirmar qual elétron preenche o espaço vazio da camada K e qual é emitido na forma de elétron Auger; eles são indistinguíveis.

Camada	Energia de Ligação (eV)
K	1070,8
L <sub>1</sub>	63,5
L <sub>2</sub>	30,4
L <sub>3</sub>	30,5

Tabela 7: Energias de ligação para as camadas K, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub> do elemento sódio. [98].

Os picos do Na Auger confirmam que o pico de 1073eV é proveniente do Na do NaCl, mas sem determinar em qual forma química. Os fotoelétrons Auger são mais sensíveis às variações e como nenhuma evidência de alteração foi observada pode-se dizer que não houve reação do Na 1s.

Resumindo os dados obtidos por XPS, pode-se dizer que nenhuma evidência de reação química significativa foi observada. As imagens de MFA das amostras da solução A depositada por *drop deposition* indicam que a proteína interage preferencialmente com sal. As medidas de XPS confirmam que o processo de adesão do filme com a mica se dá por adsorção, ou seja, sem evidências de reação química. A presença de Na proveniente da solução é confirmada pela ausência de pico deste elemento na mica sem filme.

#### 4.3 Análises por Microscopia de Força Atômica (MFA) dos Filmes Formados sobre a Mica Funcionalizada

A superfície da mica foi modificada com a finalidade de aumentar a capacidade de adesão da proteína GlnB-Hs. As modificações foram realizadas pelo tratamento da superfície da mica com fosfato (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>), etanol, polilisina e com  $\alpha$ -cetogluturato.

Para facilitar a leitura do texto sobre a funcionalização da mica, os sistemas formados pelos filmes obtidos pelas soluções de revestimento sobre mica e os filmes obtidos pelas soluções A, A1 e B foram resumidos nas tabelas abaixo.

Solução de Revestimento	Respectiva Letra
Fosfato (PO <sub>4</sub> ) 0,014g/L	F
Etanol 98%	E
Polilisina 0,001mg/ml	P
$\alpha$ -cetogluturato 0,5mM	C

Tabela 8: Índices das soluções usadas para a funcionalização da superfície da mica.

Método de Deposição	Tempo de adsorção	Respectivo Índice
<i>spin coating</i> (sc) – dinâmico	30s	scd
<i>spin coating</i> (sc) – estático	1minuto	sce
imersão	12h	i

Tabela 9: Índices dos respectivos métodos de deposição

Assim, um sistema composto pelo filme de proteína formado pela solução A (5 $\mu$ l) depositada dinamicamente com 30s de adsorção e lavada 3X com 20 $\mu$ l de solução Tris/HCl 10mM pH8,0 sobre o revestimento obtido pela imersão da mica na solução de polilisina 0,001mg/ml por 12h será representada por: sistema Pi/Ascd.

### 4.3.1 Fosfato

O fosfato é um íon poliatômico consistindo de um átomo de fósforo e quatro de oxigênio. A solução de fosfato 0,014g/L foi depositada sobre a mica para deixar a superfície carregada negativamente por íons  $\text{PO}_4^{3-}$ .

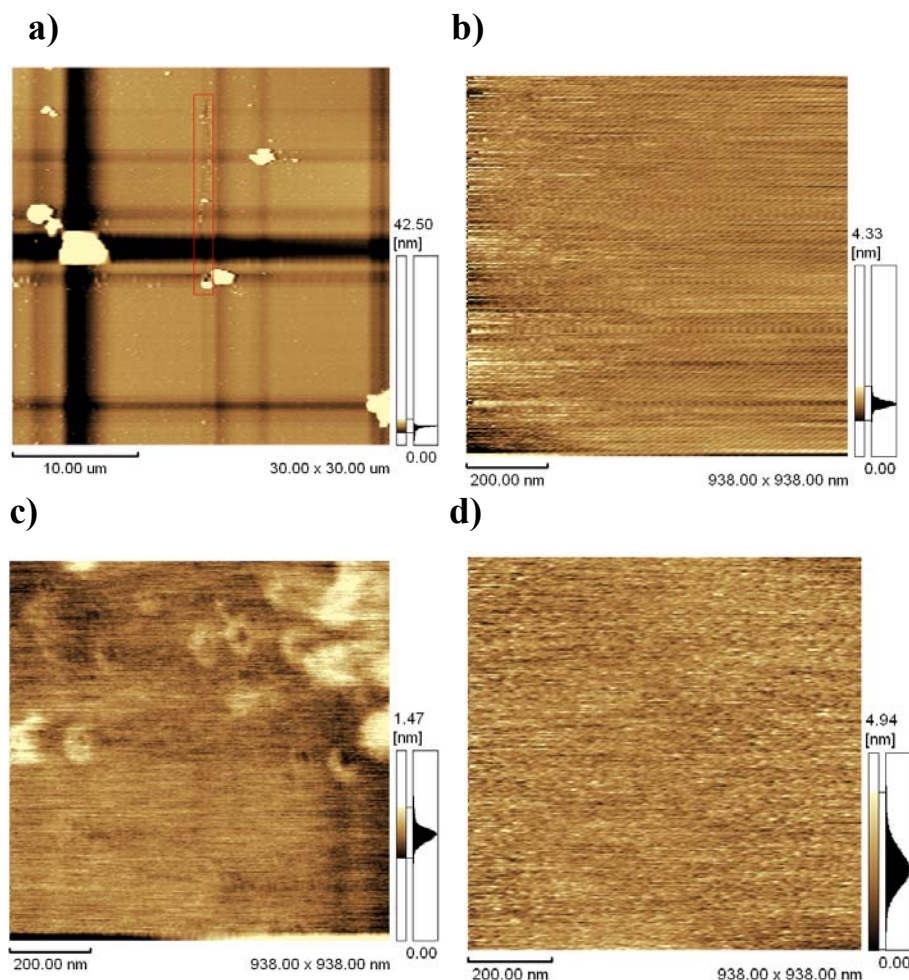


Figura 34: Topografia do revestimento da mica com solução fosfato (20 $\mu\text{l}$ ). A deposição da solução de fosfato 0,014g/L realizada por spin coating a 1000rpm por 30s (sistema Fscd). a) sistema Fscd com o risco no eixo Y (caixa vermelha), b) sistema Fscd/Alscd para controle, c) sistema Fscd/Ascd e d) sistema Fscd/Asce.

O sistema Fscd mostrou-se regular e homogêneo (Figura 34-a)). Neste filme foram observadas poucas estruturas esféricas de  $50\pm 5\text{nm}$  de diâmetro. A rugosidade média da área é de 1,0nm.

No filme obtido pelo sistema Fscd/Alscd as estruturas esféricas desaparecem e a rugosidade caiu para 0,6nm, diminuindo a qualidade da imagem devido a maior quantidade de ruído, Figura 34-b).

O filme formado pelo sistema Fscd/Ascd com adsorção de 30s, não é homogêneo e apresenta alguns anéis de  $96\pm 8\text{nm}$  de diâmetro e rugosidade de 0,3nm. Porém, o filme formado pelo sistema Fscd/Asce é homogêneo e com rugosidade de 0,6nm, indicando uma difusão das partículas e com adesão lado-a-lado sobre o substrato (Figura 34-d)).

As estruturas supramoleculares em forma de anéis foram observadas nos sistemas Fscd/Asce (Figura 34-d)), Fscd/Ascd (Figura 34-c) e Fscd/Bscd (Figura 35), sendo que no último a quantidade de estruturas presentes no filme foi maior. Os anéis visualizados na Figura 34 possuem  $85\pm 8\text{nm}$  de diâmetro e rugosidade da área de 0,42nm. Estes resultados

sugerem que quando a mica é revestida com fosfato a concentração de sal na solução não interfere na formação das estruturas supramoleculares dos filmes protéicos com deposição por *spin coating*.

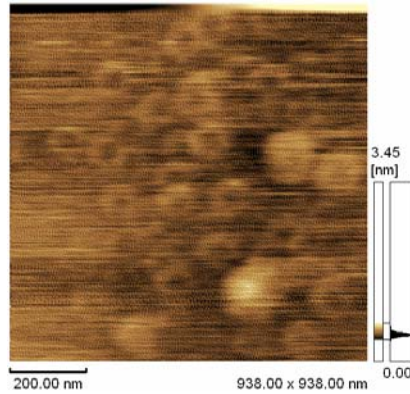


Figura 35: Topografia do filme da solução B formado sobre a mica funcionalizada com PO<sub>4</sub> (20μl) por *spin coating*. A solução B foi depositada dinamicamente como 30s de adsorção. A superfície foi lavada 3X com 20μl de solução alto sal e mais 3X com 20μl de Tris/HCl 10mM pH8,0 (sistema Fscd/Bscd).

A imersão da mica em fosfato 0,014mg/ml (sistema Fi) garantiu uma cobertura total da superfície, mas não garantiu a homogeneidade da cobertura com estruturas esféricas 44±4nm .

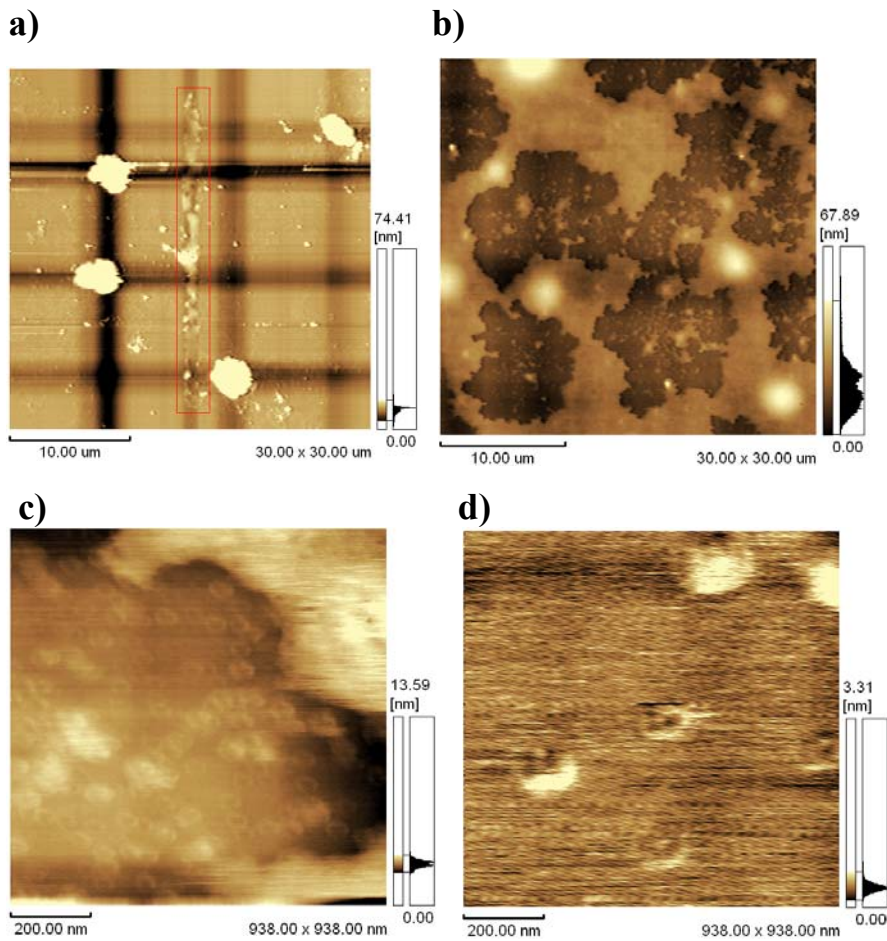


Figura 36: Topografia do revestimento da mica por imersão na solução fosfato por 12h. Controles: a) sistema Fi com o risco no eixo Y (caixa vermelha). Os filmes da solução A sobre a mica revestida com fosfato com; b) deposição dinâmica e 30s de adsorção (sistema Fi/Ascd), c) ampliação de uma região da imagem b) e d) deposição estática e de 1minuto adsorção (sistema Fi/Asce)

O filme nas áreas de  $900\mu\text{m}^2$  formado pelo sistema Fi/Ascd (Figura 36-b)) é descontínuo e com acúmulo de material em algumas áreas. Uma varredura de  $938 \times 938 \text{nm}$  desta amostra revela estruturas em forma de anel (Figura 36-c)).

Na amostra do sistema Fi/Ascd (Figura 36-c)) observam-se anéis, com diâmetro de  $54 \pm 5 \text{nm}$ , em maior quantidade do que observadas na amostra preparada por deposição estática (Figura 36-d)). As estruturas aneladas da Figura 36-d) têm diâmetro de  $126 \pm 11 \text{nm}$ . A altura de  $0,6 \pm 0,2 \text{nm}$  dos anéis indica que o filme de proteína com deposição estática e 1 minuto de adsorção pode ter as moléculas mais difusas em comparação as das estruturas da Figura 36-c).

Nos filmes obtidos pelo sistema Fscd, Fi e Fi/ascd foram realizados riscos na tentativa de se estimar suas espessuras. As características dos riscos dependem do método de deposição utilizado, da dureza e viscoelasticidade do material e da geometria da sonda.

Porém, como os riscos não ficaram nítidos devido o material deslocado para as laterais durante a sua formação, o que dificulta a análise e quantificação das medidas de largura e espessura do risco, pois criam artefatos (sombras) que o maqueiam. Além disso, o risco não é estável durante as varreduras seqüenciais, devido a força de atrito e o menisco de água formado entre a sonda e a superfície da amostra.

Resumindo, o revestimento da mica com  $\text{PO}_4^{-3}$  por *spin coating* (sistema Fscd) e imersão (sistema Fi) são homogêneos e uma menor quantidade de estruturas são observadas em relação à deposição por *drop deposition*. As estruturas supramoleculares observadas nos filmes protéicos formados sobre a mica revestida com o fosfato são similares aos filmes de GlnB-Hs formados diretamente sobre mica. O filme formado pelo sistema Fscd/Asce foi mais regular que o obtido pelo sistema Fscd/Ascd e não foram observadas estruturas supramoleculares em forma de anel neste caso.

Em todas as áreas varridas dos sistemas Fscd/Ascd e do sistema Fi/Ascd apresentam estruturas em forma de anel, variando a quantidade e diâmetros.

#### 4.3.2 Etanol

A mica foi revestida com etanol 98% para a análise da formação do filme protéico da solução A depositado em diferentes condições sobre uma superfície provavelmente hidrofóbica.

A superfície da mica recém clivada é hidrofílica e quando exposta a água e pequenas cadeias de álcoois adsorve rapidamente estas moléculas [99]. O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) - um composto que possui grupos hidroxilo ligados a átomos de carbono  $\text{sp}^3$ , esquematizado na figura abaixo. Wang et al. 2004 [99] sugere que as moléculas de etanol adsorvam verticalmente na superfície da mica através do grupo hidróxi e deixando a cauda hidrofóbica para fora na primeira camada.

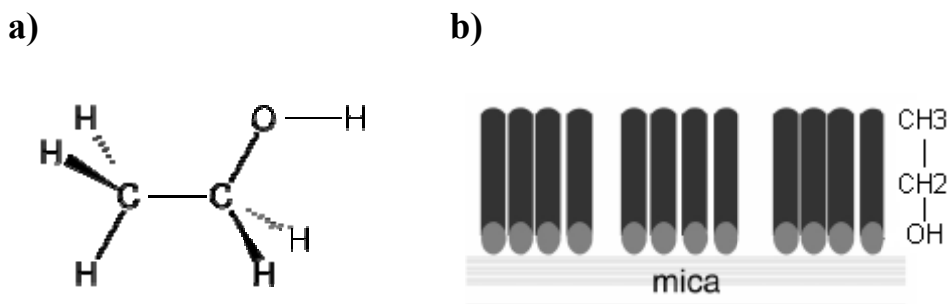


Figura 37: a) Fórmula estrutural da molécula de etanol e b) disposição das moléculas de etanol sobre a superfície da mica. Adaptado de [99].

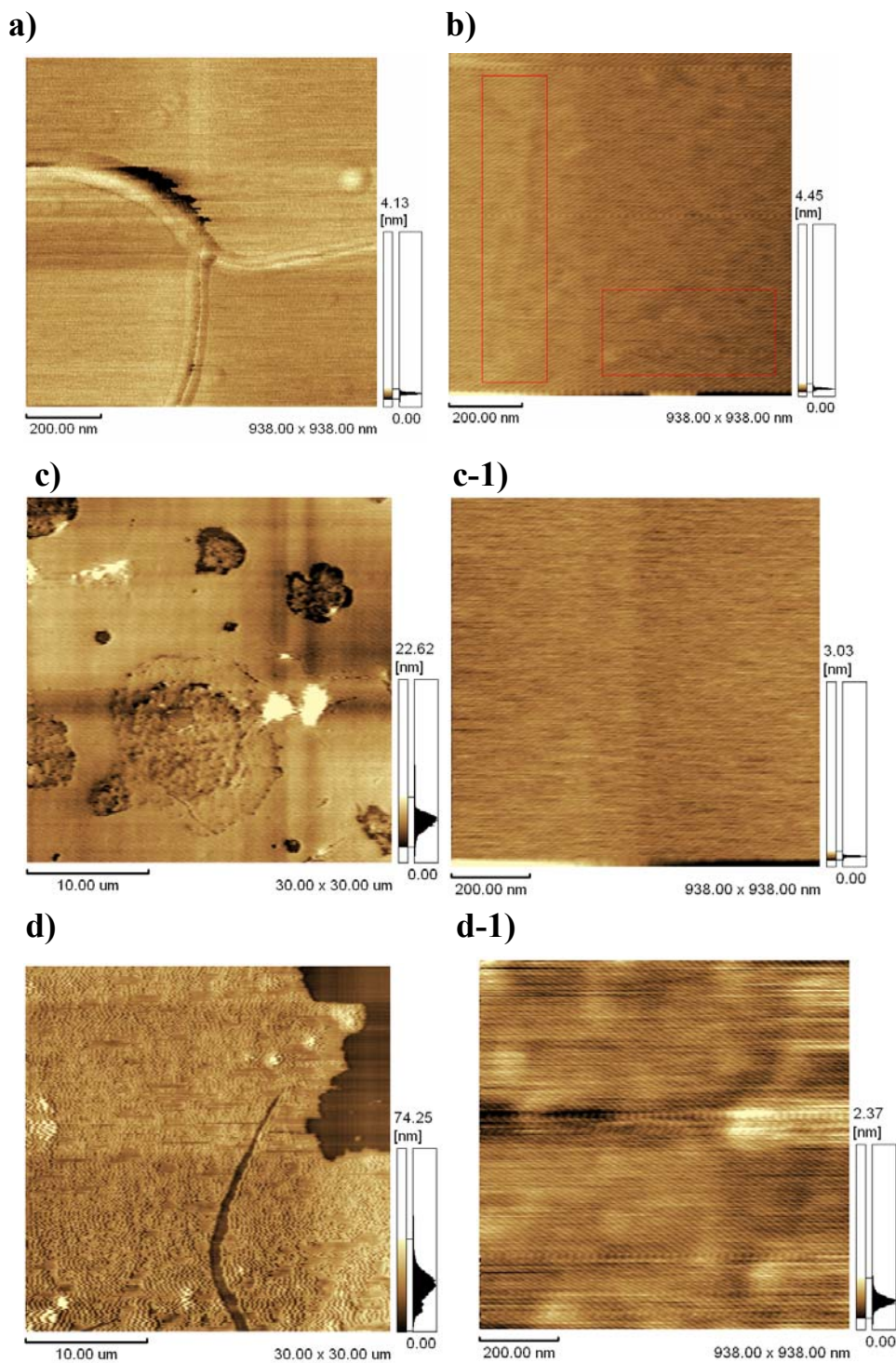


Figura 38: Topografia dos filmes da solução A formados sobre a mica funcionalizada com etanol (20 $\mu$ l) depositado por spin coating. Controles: a) sistema Escd e b) sistema Escd/A1scd. Os filmes da solução A sobre o revestimento de etanol com; c) deposição dinâmica e 30s de adsorção (sistema Escd/Ascd) e d) deposição estática e de 1minuto adsorção (sistema Escd/Asce). As imagens da esquerda são de 30X30 $\mu$ m e as da direita são uma ampliação de uma região qualquer das áreas de 900 $\mu$ m<sup>2</sup>.

O filme de etanol (sistema Escd) (Figura 38-a)) é homogêneo e com estruturas semelhantes as encontradas no filme de Tris depositado por *drop deposition* (Figura 23-b)).

A deposição do sistema Escd/A1scd (Figura 38-b)) foi realizado como controle dos filmes protéicos obtidos pelas deposições dinâmica e estática da solução A. As imagens menores que 1 $\mu$ m<sup>2</sup> do filme da solução A1 são homogêneas, uniformes e com deformações no filme como ressaltado na figura 38-b).

O filme protéico obtido do sistema Escd/Asce nas áreas de  $900\mu\text{m}^2$  é descontínuo e apresenta pequenas aglomerados de material (Figura 38-c)). Porém, nas ampliações destas áreas (938nm), o filme da solução A (Figura 38-c1)) é homogêneo e com rugosidade de 0,3nm. O padrão da superfície da mica (Figura 27) não é visível, o que indica a formação de mais de uma camada de material sobre a mica.

O filme do sistema Escd/Asce nas áreas de  $30\mu\text{m}$  é descontínuo (Figura 38-d)), provavelmente causada pela menor evaporação homogênea da solução. A rugosidade deste filme de proteína (Figura 38-d)) é de 11,8nm. Na ampliação, (Figura 38-d1)) o filme é irregular, mas com uma rugosidade de 0,3nm.

As estruturas esféricas observadas no sistema Ei/Ascd (Figura 39-a) e b)) possuem  $53\pm 14\text{nm}$  de diâmetro e  $5,5\pm 3,2\text{nm}$  de altura nas áreas de  $30\times 30\mu\text{m}$ . Quando ampliada (Figura 39-b)), as estruturas medem  $39\pm 10\text{nm}$ . A quantidade e tamanho destas estruturas sugerem que houve uma adesão maior de material quando o método de revestimento por imersão de 12h na solução de etanol foi utilizado.

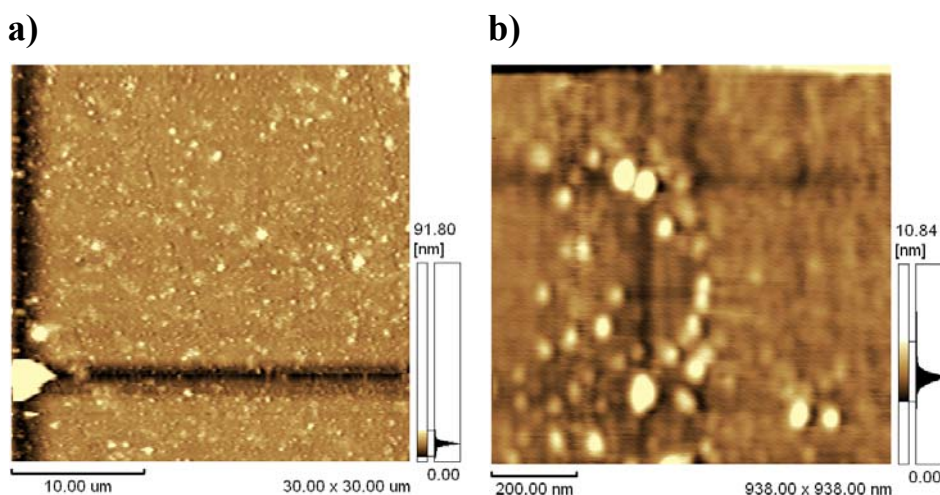


Figura 39: Topografia do filme da solução A formado sobre a mica funcionalizada por imersão no etanol por 12h. A solução A foi depositado dinamicamente com 30s de adsorção e lavada 3X com  $20\mu\text{l}$  de solução Tris 10mM (sistema Ei/Ascd). a) Imagem de  $900\mu\text{m}^2$  e b) Imagem de 938nm.

Nas áreas de  $30\times 30\mu\text{m}$ , o filme do sistema Ei/Ascd mostra-se saturado, enquanto que os filmes obtidos nos sistemas Escd/Ascd e Escd/Asce são homogêneos e descontínuos e com rugosidade menor (tabela 10). As imagens de MFA sugerem que a deposição do etanol por *spin coating* é mais adequada do que a por imersão para a formação dos filmes protéicos, pois além da espessura reduzida são mais homogêneos e menos rugosos.

Solução A	30s	1minuto
Etanol		
Imersão	28,3nm	Não realizado
Spin coating	4,3nm	11,8nm

Tabela 10: Valores da rugosidade das dos filmes protéicos depositados por *spin coating* sobre mica revestida com etanol por imersão e *spin coating*. Sistemas Escd/Ascd, Escd/Asce e Ei/Ascd

O padrão dos filmes protéicos formados sobre o revestimento de etanol foi diferente para cada método de deposição do etanol, possivelmente devido a concentração de etanol que ficou adsorvida a superfície da mica. Os filmes protéicos formados sobre os revestimentos com etanol nos dois métodos de deposição (*spin coating* e imersão) não apresentaram padrões super-estruturais em anéis como observado para os filmes protéicos formado sobre a mica ou

sistema Fi e Fscd, sugerindo que a provável mudança de polaridade da superfície interfere na estrutura do filme, como observado anteriormente por Lubambo et al. 2006 [88].

### 4.3.3 Polilisina

A polilisina, polímero formado de lisinas que é um aminoácido com cadeias laterais carregadas positivamente (grupo amina) em pH neutro, pode aumentar a polaridade da superfície da mica e a fixação iônica de moléculas carregadas negativamente.

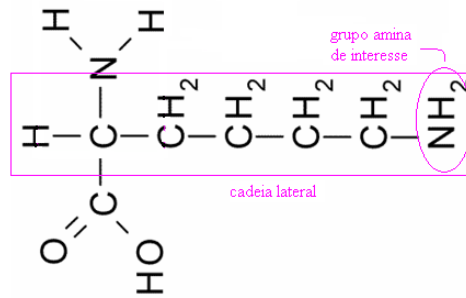


Figura 40: Fórmula estrutural da molécula de lisina.

O revestimento da superfície da mica com polilisina forneceria uma superfície carregada positivamente e aumentaria a capacidade de adesão não específica de proteínas [4].

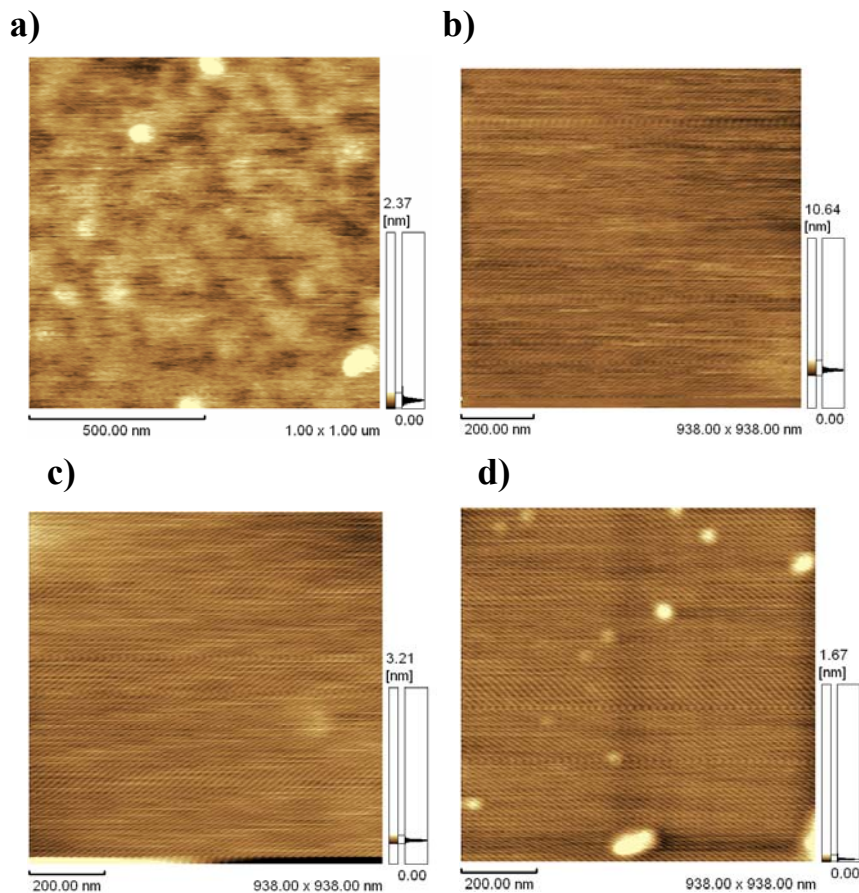


Figura 41: Topografia dos filmes da solução A formados sobre a mica funcionalizada com polilisina 0,001mg/ml (20µl) depositado por spin coating por 30s. Controles: a) sistema Pscd e b) sistema Pscd/Alscd. Os filmes da solução A sobre o revestimento de polilisina com; c) deposição dinâmica e 30s de adsorção(sistema Pscd/Ascd) e d) deposição estática e de 1minuto adsorção (sistema Pscd/Asce). As imagens da esquerda são de 30X30µm e as da direita são uma ampliação de uma região qualquer das áreas de 900µm<sup>2</sup>.

O sistema Pscd é homogêneo e irregular (Figura 41-a)) e a superfície apresentou rugosidade média de 0,3nm. A imagem do sistema Pscd/A1scd mostra um filme homogêneo e regular com rugosidade de 0,8nm. Os filmes protéicos tanto do sistema Pscd/Ascd (Figura 41-c)) quanto do sistema Pscd/Asce (Figura 41-d)) não apresentam mudanças significativas nas suas características em relação ao filme formado pela solução A1, sistema Pscd/A1scd (Figura 41-b)). O filme protéico formado por deposição estática apresenta algumas estruturas esféricas de  $40\pm 5$ nm de diâmetro e altura de  $0,2\pm 0,1$ nm, que podem ser acúmulo de material durante o período de adsorção.

O sistema Pi/Ascd (Figura 42-a) e b)) apresenta estruturas esféricas,  $109\pm 12$ nm de diâmetro e altura de  $0,6\pm 3$ nm, com uma depressão central. A rugosidade da área é de 0,34nm. Pela imagem da fase do filme protéico (Figura 42-b)) vê-se que o filme é homogêneo e as estruturas estão em tom mais escuro.

A Figura 42 sugere que o filme do sistema Pi é irregular como o sistema Pscd (Figura 41-a)). As irregularidades do filme do sistema Pi aumentam causadas pela maior adesão das moléculas de polilisina. Possivelmente o tamanho da molécula de polilisina seja outro fator a ser levado em consideração, experimentos com polilisininas de peso molecular diferentes devem ser realizados para confirmar tal hipótese.

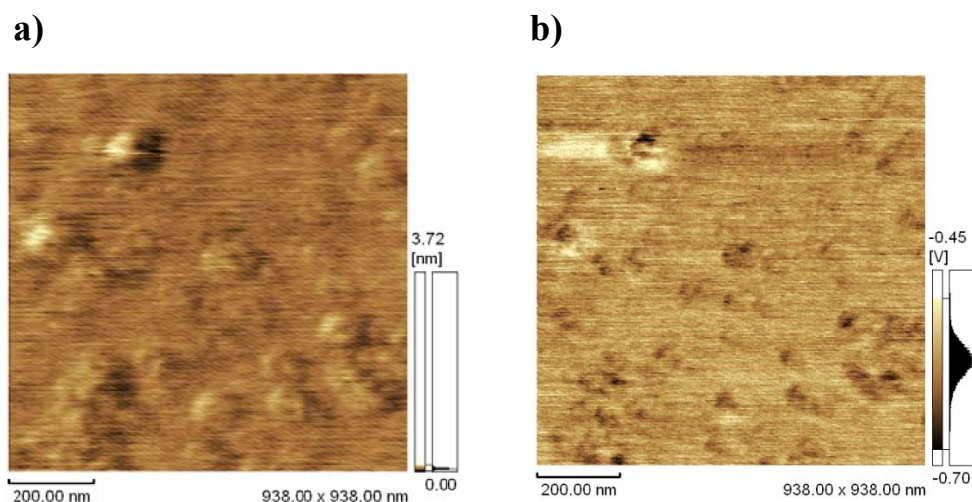


Figura 42: Topografia do filme formado pela solução A sobre a mica funcionalizada com polilisina. A deposição da polilisina 0,001mg/ml foi realizada por imersão durante 12h (sistema Pi). A solução A foi depositada dinamicamente com 30s de adsorção e lavada 3X com 20 $\mu$ l de solução Tris/HCl 10mM pH8 (sistema Pi/Ascd). a) Imagem da topografia e b) Imagem de fase.

#### 4.3.4 $\alpha$ -cetogluturato

O  $\alpha$ -cetogluturato é um ácido tricarbóxico que provavelmente liga a proteína GlnB-Hs *in vivo*, servindo como sinalizadora dos níveis de carbono do meio extracelular para a *H. seropedicae* [21], sua fórmula estrutural esta representada na Figura 43. O  $\alpha$ -cetogluturato utilizado na concentração de 0,5mM.

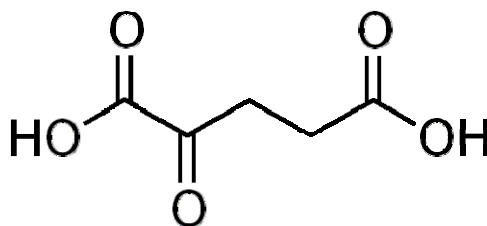


Figura 43: Molécula de  $\alpha$ -cetogluturato.

Os filmes formados pelos sistemas Cscd/Ascd e Cscd/A1scd são observados na Figura 44.

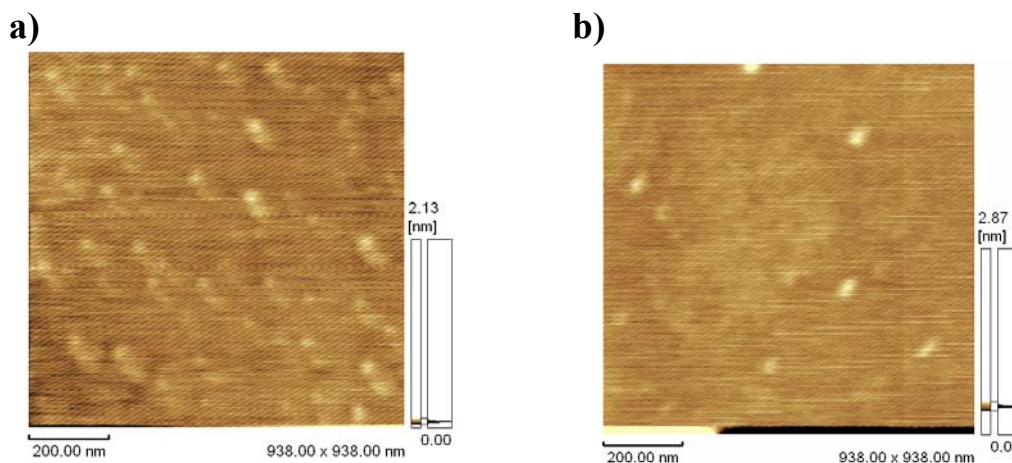


Figura 44: Topografia dos filmes da solução A e A1 depositados dinamicamente sobre a mica funcionalizada com  $\alpha$ -cetogluturato. O  $\alpha$ -cetogluturato foi utilizado na concentração de 0,5mM (20 $\mu$ l) e foi depositado por spin coating por 30s. a) sistema Cscd/Ascd e b) sistema Cscd/A1scd..

O sistema Cscd/Ascd (Figura 44-a)) apresenta várias estruturas de forma ovóide de  $34\pm 5$ nm e altura de  $0,2\pm 0,1$ nm de altura.

A Figura 44-b) do sistema Cscd/A1scd é homogêneo com poucas estruturas esféricas de  $37,8\pm 5,7$ nm de diâmetro

A imagem do filme formado pelo sistema Ci/Ascd é homogêneo e regular, com um único agregado de 100nm de diâmetro (Figura 45). A rugosidade da área de 938nm é de 0,14nm.

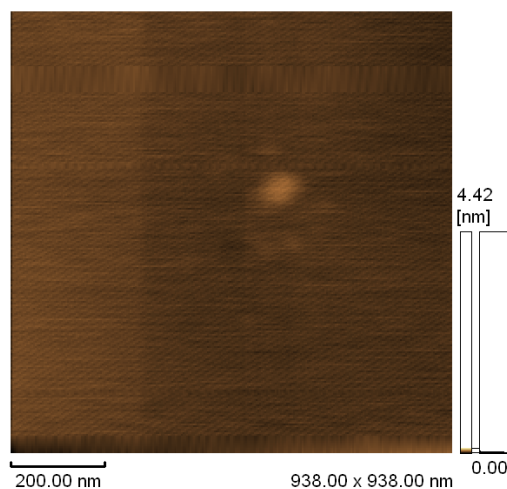


Figura 45: Topografia do filme da solução A formado sobre a mica funcionalizada com  $\alpha$ -cetogluturato. A mica foi imersa por 12h em solução de  $\alpha$ -cetogluturato 0,5mM (sistema Ci). Em seguida, a solução A foi depositada dinamicamente com 30s de adsorção e lavada 3X com 20 $\mu$ l de solução Tris/HCl 10mM pH8 (sistema Ci/Ascd)

Como o  $\alpha$ -cetogluturato liga-se a proteína GlnB de maneira específica [21], foi adicionado 1mM de  $\alpha$ -cetogluturato a solução A (solução E). Esta solução foi depositada por spin coating nos tempos de adsorção de 30s e 1minuto.

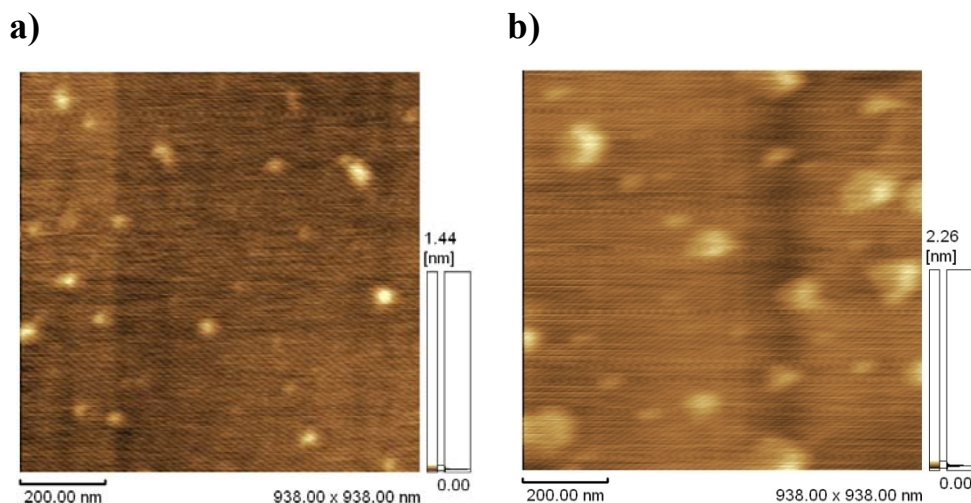


Figura 46: Topografia do filme da solução A/ $\alpha$ -cetogluturato. A solução E ( $5\mu\text{l}$ ) foi depositada por spin coating sobre a mica. a) deposição dinâmica com tempo de adsorção de 30s e b) deposição estática com tempo de adsorção de 1minuto.

As imagens dos filmes da solução E depositada por diferentes métodos de deposição (Figura 46-a) e b)) mostram que estes filmes apresentam características estruturais semelhantes aos filmes do sistema Cscd/Ascd e Ci/Ascd, Figuras 44-a), 44-b) e 45).

As estruturas esféricas presentes no filme da solução E com 30s de adsorção e deposição dinâmica (Figura 46-a)) possuem diâmetro de  $43\pm 5\text{nm}$  e no filme com adsorção de 1minuto com deposição estática tem diâmetro de  $65\pm 10\text{nm}$  (Figura 46-b)). A rugosidade média da amostra obtida com deposição dinâmica,  $90,1\text{nm}$ , é a metade da obtida com deposição estática, sugerindo que as características do filme obtido são proporcionais ao tempo de adsorção.

Os filmes protéicos obtidos nos diferentes métodos em presença de  $\alpha$ -cetogluturato apresentaram características semelhantes. Como o  $\alpha$ -cetogluturato interage especificamente com a proteína GlnB-Hs uma investigação mais detalhada faz-se necessário.

#### 4.3.5 Discussão sobre os revestimentos

Os filmes protéicos formados pela funcionalização da mica com polilisina (sistema P), etanol (sistema E) e  $\alpha$ -cetogluturato (sistema C) apresentaram estruturas diferentes. Quando a superfície da mica foi revestida com fosfato (sistema F) a proteína GlnB formou estruturas supramoleculares em forma de anéis como obtido pela deposição da solução A diretamente sobre a mica por *drop deposition* (Figura 22-a)). A presença de fosfato na superfície da mica manteve a estrutura supramolecular em forma de anéis mesmo quando concentração de sal na solução foi aumentada (Figura 36) contrastando com o padrão observado para proteína GlnB diretamente adsorvida a mica (Figura 22-b)).

Nas demais funcionalizações (etanol, polilisina e  $\alpha$ -cetogluturato) o filme obtido pela deposição estática com 1minuto de adsorção resultou em filmes menos rugosos, o que indica maior difusão das partículas da solução. As estruturas dos filmes dos sistemas Pscd/Ascd, Pscd/Asce e Pi/Ascd são diferentes das estruturas obtidas nos outros métodos de deposição sobre a mica com (sistemas F, E e C) ou sem revestimento. Isso provavelmente ocorre pela mudança da polaridade da superfície da mica. O etanol tornaria a superfície da mica hidrofóbica, enquanto que as superfícies da mica e nos sistemas F, P e C são polares e, conseqüentemente, hidrofílicas. Assim, a formação de estruturas supramoleculares de GlnB-Hs depende da estrutura e polaridade da superfície, além de depender também do método de preparação.

Os filmes obtidos nas diferentes condições de deposição (imersão e *spin coating*) das soluções de fosfato, etanol, polilisina e  $\alpha$ -cetogluturato, em geral, são homogêneos e sem mudança na qualidade. A diferença é a espessura dos filmes, como foi verificado com os riscos nos filmes de fosfato e medindo a profundidade dos mesmos.

Os filmes obtidos por *spin coating* e imersão da polilisina foram os mais irregulares e, portanto, de menor qualidade. Isso provavelmente é devido ao tamanho e estrutura da molécula da polilisina.

<b>Solução A</b>	<b>Revestimento</b>	<b>Tempo de adsorção:</b>	<b>Tempo de adsorção:1min</b>	<b>Solução A1</b>
<b>Revestimento</b>	<b>imersão (nm)</b>	<b>30s(nm)</b>	<b>(nm)</b>	<b>(nm)</b>
<b>PO4</b>	1,6	0,3	0,6	0,6
<b>Etanol</b>	2,1	0,3	0,3	0,3
<b>Polilisina</b>	0,3	0,6	0,2	0,8
<b><math>\alpha</math>-cetogluturato</b>	0,1	0,2	Não realizado	0,9

Tabela 11: Rugosidade dos filmes protéicos obtidos pela deposição da solução A e A1 por *spin coating* sobre os revestimentos da mica com PO4, etanol, polilisina e  $\alpha$ -cetogluturato.

Os valores da rugosidade descritos na tabela 11 foram obtidos das imagens aqui analisadas (938X938nm) e não pode ser considerada como a rugosidade total da superfície das amostradas. Os valores da rugosidade dos filmes da solução A1 são maiores quando comparados com os filmes da solução A depositados dinamicamente com 30s de adsorção, provavelmente devido ao maior tempo de adsorção. Para os revestimentos por imersão da mica nas soluções de  $\text{PO}_4^{-3}$  e o etanol os filmes protéicos produziram superfícies mais rugosas do que as feitas por deposição dinâmica, possivelmente por causa da maneira que estas moléculas interagem com a mica e do tempo de adsorção.

#### 4.4 Influência da Umidade Relativa do Ar sobre a Formação do Filme Protéico

Todos os experimentos foram realizados sob temperatura e umidade relativa ambiente (RH). Nestas condições, devido ao menisco de água, a interação da sonda do MFA com o filme protéico torna-se mais complexa e a sua influência deve ser levada em consideração.

A mica possui uma alta energia de superfície e a superfície da mica recém clivada pode ser rapidamente coberta com uma camada de contaminação para reduzir sua energia de superfície [100], ocorrendo uma adsorção maior de água proveniente do ambiente.

Mica muscovita recém clivada foi observada no MFA. A Figura 47 mostra uma série de imagens de fase da superfície, indicando que a água condensada forma pequenos pontos sobre a superfície que coalescem com o tempo formando ilhas depois de repetidas leituras na mesma área. Cada imagem levou dois minutos para ser adquirida começando a primeira imagem do meio do quadro e sentido de varredura para baixo, concluindo a mesma na parte superior e as imagens subsequentes obedecendo ao sentido de varredura do microscópio, sendo que a área foi varrida por 10 minutos.

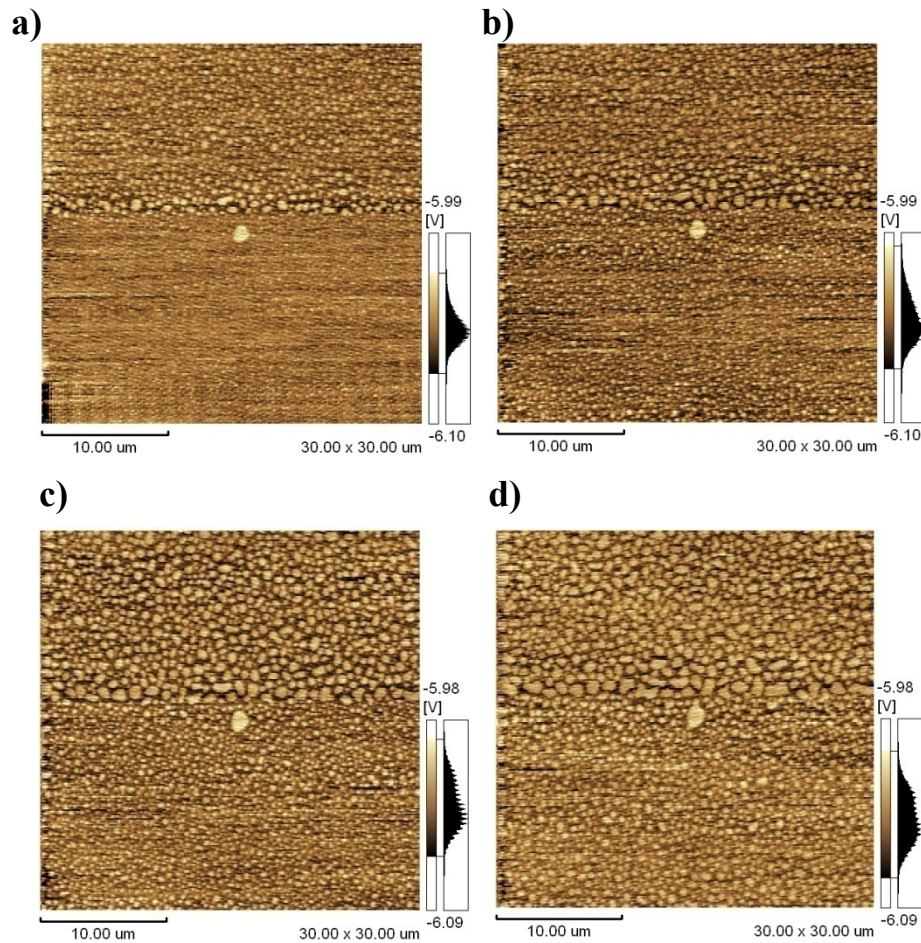


Figura 47: Evolução da forma e tamanho das estruturas de água formada após contato imediato com a superfície da mica. As imagens de fase adquiridas, com varreduras iniciadas na aresta inferior, no modo dinâmico e com velocidade de 2Hz depois de (a) 4, (b) 6, (c) 8 e (d) 10 minutos.

Segundo Liu et al. 2005 [100] um menisco de água forma-se quando a sonda entra em contato com a superfície da mica. Durante a varredura o menisco não muda de posição simultaneamente com a mudança de posição da sonda, mas há variação do ângulo formado entre a sonda e a superfície da amostra. Em algum momento, o menisco se rompe da sonda e esta pequena quantidade de água condensa na superfície da mica, aparecendo em forma de pontos na imagem. Um novo menisco pode formar-se rapidamente, durante uma varredura contínua, e um novo menisco de água rompido pode coalescer ao anterior, produzindo uma “ilha” de água. O menisco entre a sonda de MFA e a superfície da mica continua a ser formado até um equilíbrio ser alcançado.

Uma região de 10X10 $\mu$ m da amostra preparada com a solução D por deposição dinâmica e 30s de adsorção foi acompanhada por 24h com o MFA em condições ambiente (RH acima de 45%).

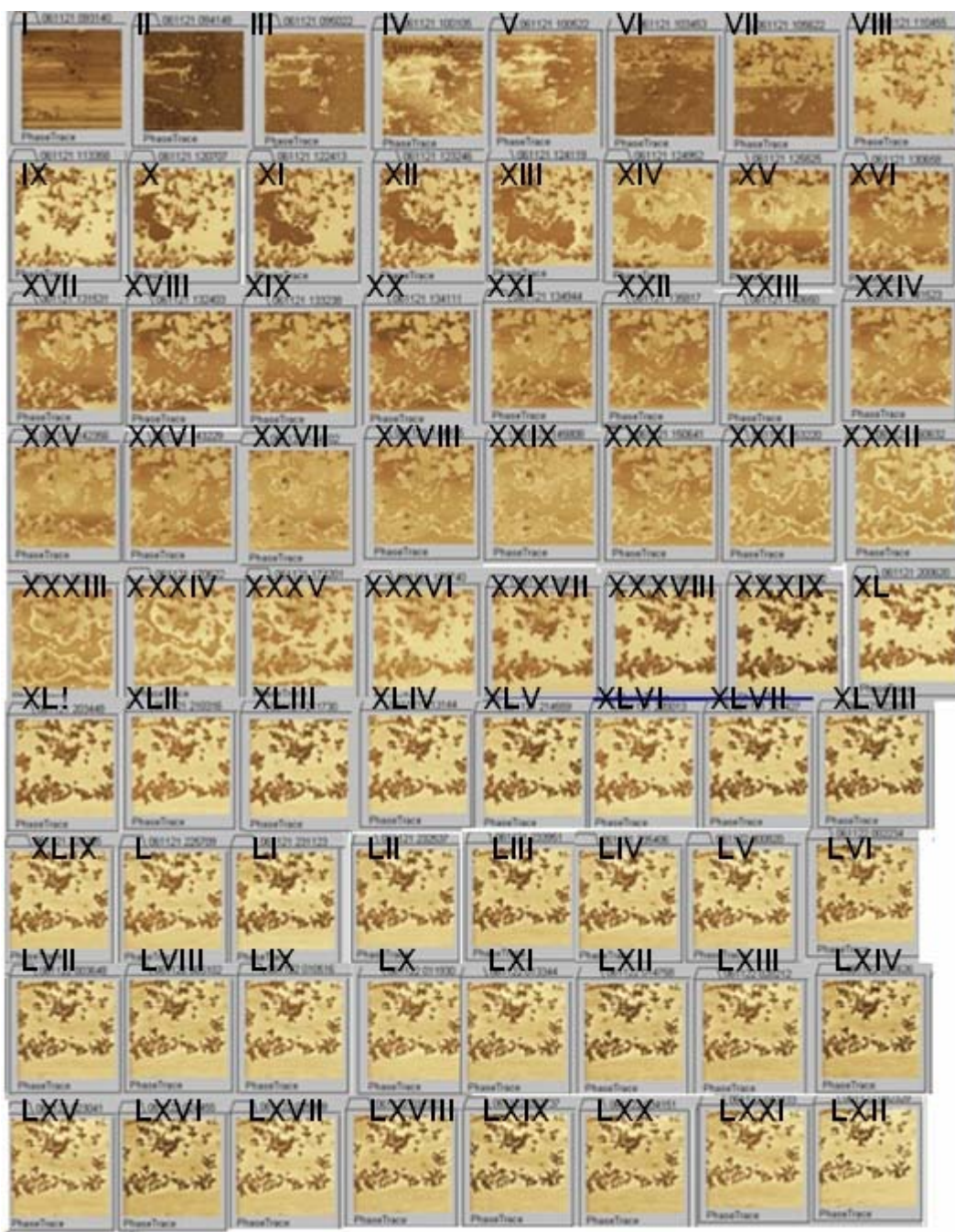


Figura 48: Evolução do filme protéico formado pela solução C depositada dinamicamente com 30s de adsorção sobre a mica. As imagens de fase adquiridas no modo dinâmico e com velocidade de 1 e 0,3Hz logo após a deposição. As imagens foram obtidas continuamente de 10 em 10 minutos na primeira hora (as 7 primeiras imagens) e depois 30 em 30 minutos até a décima nona hora. A última imagem foi feita 24h após a deposição da solução

As imagens de fase (Figura 48) foram escolhidas por não exigirem tratamento. Na primeira hora, que corresponde às figuras de I a VIII a superfície é bem instável, dificultado a varredura e dando mensagem de erro (*Large Z Range* – a rugosidade limite de 5 $\mu$ m é ultrapassada) frequentemente. De duas horas após a deposição (Figura 48-VIII) até a décima nona hora (Figura 48-LXXI) a varredura é contínua e sem interrupção. Observa-se neste período mudança na forma do filme. Xu et al. (1998) [101] propõe que acima de 45% RH mais água esta presente nas ilhas, aumentando a mobilidade do filme. Após a décima hora o filme fica estável, sem mudança visível na forma (Figura 48-XXXIX) .

A influência do menisco na formação do filme protéico é nítida. A característica polar dos filmes protéicos e a difusão iônica na superfície da mica [101] favorecem a formação e expansão do menisco.

Não foi possível separar as contribuições do filme de água na formação das imagens de MFA. A origem da evolução exigiria um bom controle de umidade. Certamente a interação das moléculas de água com a proteína GlnB nas soluções A e C, e com a superfície da mica afetam a dinâmica das imagens mostradas(Figura 48).

## 5. Conclusões

Este trabalho mostrou relevantes aspectos da interação da proteína GlnB-Hs com a superfície da mica com e sem funcionalização, considerando-se características da solução que contém a proteína, diferentes polaridades e estruturas moleculares da superfície do substrato e diferentes métodos de deposição.

As imagens de MFA mostraram que as estruturas supramoleculares dos filmes de proteína GlnB-Hs sobre a mica são influenciadas pelo método de deposição, tempo de adsorção, pela presença do Tris e concentração de sal e de proteína na solução.

Os filmes protéicos formados pela deposição por *drop deposition* da solução A e B sobre a mica mostraram diferença na espessura, forma e padrão de auto-organização das estruturas supramoleculares. A maior concentração de NaCl na solução provoca a dissociação dos complexos supramoleculares presentes na solução A. Isto demonstra que a auto-organização em estruturas supramoleculares em forma de anel depende também da concentração de sal na solução.

Os filmes de GlnB-Hs formados sobre a mica pela deposição da solução A por *spin coating* não ficaram uniformes e mostraram ser dependentes do tempo de adsorção. Conforme o tempo de adsorção aumenta a quantidade de estruturas supramoleculares aumenta enquanto que seus diâmetros diminuem. Indicando que as estruturas presentes nos filmes são devido à interação proteína-proteína e não pela interação mica-proteína.

As imagens de MFA dos componentes da solução de proteína, Tris e NaCl, também apresentam estruturas esféricas semelhantes às observadas nos filmes protéicos depositados sobre a mica. Este fato causa dificuldades na resolução e discriminação das estruturas de proteína GlnB-Hs no filme fino analisadas por MFA.

Os espectros de XPS mostram que a superfície da mica foi coberta pela solução com proteína (solução A) e com os componentes da solução (solução A1), uma vez que há um decréscimo na intensidade dos picos do Al 2p<sup>2/3</sup>, O 1s e K 1s provenientes da mica, um aumento do pico do C 1s correspondente a presença de C-C da proteína e da molécula de Tris e o aparecimento do pico de Na 1s proveniente do NaCl da solução.

Os resultados de XPS ainda sugerem que não houve reação química significativa da proteína com a mica, indicando que os filmes formados pela proteína GlnB-Hs sobre a mica são estabilizados por interações fracas do tipo pontes de hidrogênio e força de van der Waals.

A superfície da mica foi modificada com a finalidade de aumentar a capacidade de adesão da proteína GlnB-Hs e favorecer a obtenção de uma camada homogênea. O revestimento da mica foi realizado com a deposição por *spin coating* e imersão das soluções de fosfato 0,014g/L, etanol 98%, polilisina 0,001mg/ml e  $\alpha$ -cetogluturato 0,5mM. Os filmes obtidos propiciaram a formação do filme de proteína sobre superfícies com características hidrofóbicas (etanol) e hidrofílicas (fosfato, polilisina e o  $\alpha$ -cetogluturato).

Apesar da característica polar da superfície da mica revestida, o padrão dos filmes de proteína varia, mostrando que além da polaridade a formação das estruturas supramoleculares é dependente da estrutura molecular do revestimento.

Os filmes protéicos formados pela funcionalização da mica com polilisina (sistema P), etanol (sistema E) e  $\alpha$ -cetogluturato (sistema C) apresentaram estruturas supramoleculares diferentes. Quando a superfície da mica foi revestida com fosfato (sistema F) a proteína GlnB formou estruturas supramoleculares em forma de anéis em todas as diferentes condições, indicando que o fosfato reduz a força iônica do sistema.

Apesar da influência da umidade relativa na formação de filmes de proteínas, o perfil dos filmes formados em diferentes dias e condições experimentais foi reprodutivo.

O monitoramento e a caracterização por MFA destes filmes protéicos têm como objetivo de otimizar uma metodologia para a formação de uma monocamada de proteína GlnB-Hs, para futuramente desenvolver estudos sobre interação desta proteína com as demais macromoléculas pertencentes a cadeia de transdução de nitrogênio, conformação e função da família PII.

## 6. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar o efeito do fosfato na redução da concentração iônica na formação do filme de proteína.
- Verificar se compostos semelhantes ao fosfato, como sulfatos, também reduzem o efeito da concentração iônica no processo de formação do filme.
- Estudar o processo de nucleação do filme em presença de alto e baixo sal na solução de proteína. Realizar o *cross-linking* da proteína com glutaraldeído em solução para verificar se os filmes mantêm as estruturas pré-formadas em solução.
- Utilizar o filme protéico obtido sobre a mica com e sem funcionalização como centro de nucleação para crescimento de um cristal de proteína através do método da gota pendurada e correlacionar com a cristalização da mesma proteína por meios clássicos.
- Estudar a influência da umidade relativa na influência da formação do filme de proteína através do controle e variação da mesma.
- Variar as demais características da solução de proteína, bem como o método de deposição e tempo de adsorção com o intuito de se obter uma camada homogênea para estudos de interação proteína-proteína com o MFA.
- Investigações da adsorção da proteína GlnB-Hs sobre mica com outras técnicas como microscopia eletrônica, infravermelho, FTIR teria como objetivo otimizar o método de deposição e evolução do filme protéico.

## 7. Referências Bibliográficas

- [1] LOWE C. R. **Nanobiotechnology: The Fabrication and Applications of Chemical and Biological Nanostructures.** *Curr. Opi. Struct. Biol.* 2000 **10**: 428-434.
- [2] HLADY V, BUIJS J. **Protein Adsorption on Solid Surfaces.** *Current Opinion in Biotechnology* 1996 **7**: 72-77.
- [3] GRAY J. **The Interaction of Proteins with Solid Surfaces.** *Curr. Opi. In Struct. Biology* 2004 **14**: 110-115.
- [4] ZHU H, SNYDER M. **Protein Chip Technology.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2003 **7**: 55-63.
- [5] FEILNER T, KREUTZBERGER J, NIEMANN B, KRAMER A, POSSLING A, SEITZ H, KERSTEN B. **Proteomic Studies Using Microarrays.** *Current Proteomics* 2004 **1**: 283-295.
- [6] PECHKOVA E, NICOLINI C. **Protein Nanocrystallographie: A New Approach to Structural Proteomics.** *Trends in Bio* 2004 **22**: 117-122.
- [7] AUERBACH D, THAMINY S, HOTTINGER M, STAGLJAR I. **The Post-Genomic Era of Interactive Proteomics: Facts and Perspectives.** *Proteomics* 2002 **2**:611–623.
- [8] MÜLLER D, AMREIN M, ENGEL A. **Adsorption of Biological Molecules to a Solid Support for Scanning Probe Microscopy.** *J. of Struct. Biology* 1997 **119**:172-188.
- [9] NEVES B, VILELA J, ANDRADE M. **Microscopia de Varredura por Sonda Mecânica: Uma Introdução.** *Cerâmica* 1998 **44** (290).
- [10] NIE H. **A Brief Note on Scanning Probe Techniques.** Disponível em: < <http://publish.uwo.ca/~hnie/spmman.html> >. Acesso em: 12 set 2006.
- [11] ZANETTE S. Apostila: **“Funcionamento de um Microscópio de Força Atômica”** site do CBPF 1997. Disponível em:< [www.cbpf.br/~nanos/Apostila/index.html](http://www.cbpf.br/~nanos/Apostila/index.html) >. Acesso em: 04 set 2006.
- [12] LEHENKARI P, NESBITT S, CHARRAS G, HORTON M. **New Technologies in Scanning Probe microscopy for Studying Molecular Interactions in Cells.** *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2000: 1-15.
- [13] SANTOS N, CASTANHO M. **An Overview of the Biophysical Applications of Atomic Force Microscopy.** *Biophysical Chemistry* 2004 **107**: 133–149.
- [14] SILVA LP. **Atomic Force Microscopy and Proteins.** *Protein and Peptide Letters*, 2002 **9**(2): 117-125.
- [15] CRETICH M, DAMIN F, PIRRI G, CHIARI M. **Protein and Peptide Arrays: Recent Trends and New Directions.** *Biomolecular Engineering* 2006 **23**: 77–88.
- [16] FELDMAN K, HÄHNER G, SPENCER N, HARDER P, GRUNZE M. **Probing Resistance to Protein Adsorption of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers by Scanning Force Microscopy.** *J. Am. Chem. Soc.* 1999 **121**: 10134-10141.
- [17] SIGAL G, MRKSICH M, WHITESIDES G. **Effect of Surface Wettability on the Adsorption of Proteins and Detergents.** *J. Am. Chem. Soc.* 1998 **120**: 3464-3473.
- [18] HARDER P, GRUNZE M, DAHINT R, WHITESIDES G, LAIBINIS P. **Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability to Resist Protein Adsorption.** *J. Phys. Chem. B* 1998 **102**: 426-436.
- [19] MA H, NATH N, HYUN J, CHILKOTI A. **Surface Engineering Strategies for Control of Protein and Cell Interactions.** *European Cells and Materials* 2003 **6**(1): 16-17.
- [20] NINFA, A. J.; ATKINSON, M.R. **PII signal transduction proteins.** *Trends Microbial. Limerick* 2000 **8** (4): 172-179.

- [21] BENELLI E, BUCK M, POLIKARPOV I, de SOUZA E, CRUZ I, PEDROSA F. ***Herbaspirillum seropedicae* protein PII is structurally similar to the enteric GlnK.** *Eur. J. Biochem* 2002 **269**: 3269-3303.
- [22] ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, W P. **Fundamentos da Biologia Celular.** Artmed, 2005.
- [23] BENELLI E, SOUZA E, FUNAYAMA S, RIGO L, PEDROSA F. **Evidence for two possible glnB-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*.** *J. Bacteriol.* 1997 **179**: 4623-4626.
- [24] WEBER O, BALDANI V, TEXEIRA K, KIRCHHOF G, BALDANI I, DOBERREINER J. **Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants.** *Plant Soil* 1999 **210**: 103-113.
- [25] PIMENTEL J, OLIVARES F, PITARD R, URQUIAGA S, AKIBA F, DOBEREINER J. **Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*.** *Plant Soil* 1991 **137**: 61-65.
- [26] BALDANI V, BALDANI J, OLIVARES F, DOBEREINER J. **Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*.** *Symbiosis* 1992 **13**: 65-73.
- [27] LUBAMBO A, **Arranjos Auto-Organizados da Proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* em Silício.** Tese UFPR 2005.
- [28] IKAI A. **STM and MFA of Bio/Organic Molecules and Structures.** *Surface Science Reports* 1996 **26**: 261-332.
- [29] NAKANISHI K, SAKIYAMA T, IMAMURA K. **On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001 **91**(3): 233-244.
- [30] XU L, VADILLO-RODRIGUEZ V, LOGAN B. **Residence Time, Loading Force, pH, and Ionic Strength Affect Adhesion Forces between Colloids and Biopolymer-Coated Surfaces.** *Langmuir* 2005 **21**:7491-7500
- [31] MATHEWS C, VAN HOLDE K, AHERN K. **Solubility and Isoelectric Point.** Disponível em: < <http://www.aw-bc.com/mathews/ch02/solubpi.htm> >. Acesso em: 16 jan 2008.
- [32] LANDRY. **Biochemistry 601. Protein Solubility, Purification, and Analysis.** Disponível em: < <http://www.tulane.edu/~biochem/med/pure.htm> > Acesso em: 16 jan 2008.
- [33] NATH N, HYUN J, MA H, CHILKOTI A. **Surface Engineering Strategies for Control of Protein and Cell Interactions.** *Surface Science* 2004 **570**: 98–110.
- [34] WIKI. **Protein Precipitation.** Disponível em: < [http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_precipitation#Protein\\_solubility](http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_precipitation#Protein_solubility) > Acesso em: 11 jan 2008.
- [35] SOSNICK. **Protein Precipitation.** Disponível em: < <http://sosnick.uchicago.edu/precipintro.html> > Acesso em: 11 jan 2008.
- [36] OHNISHI S, MURATA M, HATO M. **Correlation between Surface Morphology and Surface Forces of Protein A Adsorbed on Mica.** *Biophys. J.* 1998 **74**: 455-465.
- [37] BARON M, REVAULT M, SERVAGENT-NOINVILLE S, ABADIE J, QUIQUAMPOIX H. **Chymotrypsin Adsorption on Montmorillonite: Enzymatic Activity and Kinetic FTIR Structural Analysis.** *J. Colloid and Interface Sci.* 1999 **214**: 319–332.
- [38] BILLSTEN P, WAHLGREN M, ARNEBRANT T, McGUIRE J, ELWING H. **Structural Changes of T4 Lysozyme upon Adsorption to Silica Nanoparticles Measured by Circular Dichroism.** *J. Colloid Interface Sci.* 1995 **175**: 77-82.
- [39] LOHN K, SOUZA E. **Ação de surfactantes catiônicos e não-iônicos em limpeza de Superfícies.** Disponível em: <[www.puccamp.br/pesquisa/i\\_semana\\_cientifica/tcc\\_resumos/EA5AB36A-36DE-4817-8DD0-E769ABE8E.pdf](http://www.puccamp.br/pesquisa/i_semana_cientifica/tcc_resumos/EA5AB36A-36DE-4817-8DD0-E769ABE8E.pdf)>. Acesso em: 04 fev 2007.

- [40] OLIVEIRA I, STUDART A, SILVA JÚNIOR F, PANDOLFELLI V. **Estabilização de suspensões aquosas contendo grafite.** *Cerâmica* 2000 **46**(300): 186-196.
- [41] MACKIE A, GUNNING A, WILDE P, MORRIS V. **Orogenic Displacement of Protein from the Air/Water Interface by Competitive Adsorption.** *J. Colloid Interface Sci.* 1999 **210**: 157-166.
- [42] MORRIS V. **Probing Molecular Interactions in Foods.** *Trends in Food Science & Technology* 2004 **15**: 291–297.
- [43] WOODWARD N, WILDE P, MACKIE A, GUNNING A, GUNNING P, MORRIS V. **Effect of Processing on the Displacement of Whey Proteins: Applying the Orogenic Model to a Real System.** *J. Agric. Food Chem.* 2004 **52**: 1287-1292.
- [44] BROGAN K, SHIN J, SCHOENFISH M. **Influence of Surfactants and Antibody Immobilization Strategy on Reducing Nonspecific Protein Interactions for Molecular Recognition Force Microscopy.** *Langmuir* 2004 **20**: 9729-9735.
- [45] BROWN N, LIU Z. **An Investigation Using Atomic Force Microscopy and X-ray Photoelectron Spectroscopy of the Modification of the Surface of Mica with an Argon RF-Plasma Discharge.** *Applied Surface Science* 1995 **90**: 155-164.
- [46] COSTA L, PINTO J, MORAES M, SOUZA G, SORENSON M, BISCH P, WEISSMÜLLER G. **Chemical Treatment of Mica for Atomic Force Microscopy Can Affect Biological Sample Conformation.** *Biophysical Chemistry* 2004 **109**: 63–71.
- [47] YUK J, KWON-SOO H. **Proteomic Applications of Surface Plasmon Resonance Biosensors: Analysis of Protein Arrays.** *Experimental and Molecular Medicine* 2005 **37**(1):1-10.
- [48] UEMATSU I, MATSUMOTO H, MOROTA K, MINAGAWA M, TANIOKA A, YAMAGATA Y, INOUE K. **Surface Morphology and Biological Activity of Protein Thin Films Produced by Electrospray Deposition.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2004 **269**: 336–340.
- [49] BIRNIE III, D. **The Key Stages in Spin Coating.** 2000. Disponível em: < <http://www.mse.arizona.edu/faculty/birnie/Coatings/KeyStages.htm> >. Acesso em: 21 set 2006.
- [50] LAWRENCE C. **The mechanics of spin coating of polymer films.** *Phys. Fluids* 1988 **31**: 2786-2795.
- [51] PETRI, D. **Characterization of Spin-Coated Polymer Films.** *J. Braz. Chem. Soc.* 2002 **13**(5): 695-699.
- [52] WAGNER P. **Immobilization Strategies for Biological Scanning Probe Microscopy.** *FEBS Letters* 1998 **430**: 112-115.
- [53] ISRAELACHVILI J. **Intermolecular & Surface Forces**, Academic Press, 1991.
- [54] ANDRADE J, HLADY V, WEI A. **Adsorption of Complex Proteins at Interfaces.** *Pure & Appl. Chem.* 1992 **64**(11): 1777-1781.
- [55] LUBARSKY G, BROWNE M, MITCHELL S, DAVIDSON M, BRADLEY R. **The Influence of Electrostatic Forces on Protein Adsorption.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2005 **44**: 56–63.
- [56] ROACH P, FARRAR D, PERRY C. **Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes.** *J. Am. Chem. Soc.* 2005 **127**: 8168-8173.
- [57] SETHUARAMAN A, HAN M, KANE R, BELFORT G. **Effect of Surface Wettability on the Adhesion of Proteins.** *Langmuir* 2004 **20**: 7779-7788.
- [58] LABSOLAR. **Tensão Superficial e Molhabilidade.** Disponível em: < [www.labsolar.ufsc.br/disciplinas/emc5416/aulas/aula02.pdf](http://www.labsolar.ufsc.br/disciplinas/emc5416/aulas/aula02.pdf) > Acesso em: 26 jan 2008
- [59] KARLSSON M, EKEROTH J, ELWING H, CARLSSON U. **Reduction of Irreversible Protein Adsorption on Solid Surfaces by Protein Engineering for Increased Stability.** *The J. of Biol. Chem.* 2005 **280**(27): 25558–25564.

- [60] KARLSSON M, CARLSSON U. **Protein Adsorption Orientation in the Light of Fluorescent Probes: Mapping of the Interaction between Site-Directly Labeled Human Carbonic Anhydrase II and Silica Nanoparticles.** *Biophysical Journal* 2005 **88**: 3536–3544.
- [61] JUNG S, LIM SY, LIM SM, KIM F, GURAU M, YANG R, HOLDEN M, CREMER P. **The Vroman Effect: A Molecular Level Description of Fibrinogen Displacement.** *J. Am. Chem. Soc.* 2003 **125**: 12782-12786.
- [62] BALL V, BENTALEB A, HEMMERLE J, VOEGEL J, SCHAAF P. **Dynamic Aspects of Protein Adsorption onto Titanium Surfaces: Mechanism of Desorption into Buffer and Release in the Presence of Proteins in the Bulk.** *Langmuir* 1996 **12**: 1614-1621.
- [63] LASSEN B, MALSTEM M. **Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces.** *J. of Colloid and Interface Sci.* 1997 **186**: 9–16.
- [64] MALMSTEN M. **Ellipsometry Studies of the Effects of Surface Hydrophobicity on Protein Adsorption.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1995 **3**: 297-308.
- [65] MALKIN A, THORNE R. **Growth and Disorder of Macromolecular Crystals: Insights from Atomic Force Microscopy and X-ray Diffraction Studies.** *Methods* 2004 **34**: 273–299.
- [66] MCPHERSON A, KUZNETSOV Y, MALKIN A, PLOMP M. **Macromolecular Crystal Growth as Revealed by Atomic Force Microscopy.** *Journal of Structural Biology* 2003 **142**: 32–46.
- [67] MCPHERSON A. **Protein Crystallization in the Structural Genomics Era.** *Journal of Structural and Functional Genomics* 2004 **5**: 3–12.
- [68] KITTEL C. **Physique de l'état solide.** Dunod, Paris, 1983.
- [69] LI HQ. **The Common MFA Modes.** Disponível em: <<http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm729/MFA/details.htm>>. Acesso em: 04 set 2006.
- [70] STARK M, MÖLLER C, MÜLLER D, GUCKENBERGER R. **From Images to Interactions: High-Resolution Phase Imaging in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy.** *Biophysical Journal* 2001 **80**: 3009–3018.
- [71] FILHO, G. Dissertação: **Medidas do Perfil da Permissividade Elétrica em Interfaces Sólido-Líquido Usando Microscopia de Força Atômica.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- [72] ROSZHOK S, SUN P, PINER R, LIEBERMAN M, MIRKIN C. MFA Study of Water Meniscus Formation Between an MFA tip and NaCl. *J. Phys. Chem. B* 2004 **108**: 7814-7819.
- [73] MORRIS V, MACKIE A, WILDE P, KIRBY A, MILLS E, GUNNING P. **Atomic Force Microscopy as a Tool for Interpreting the Rheology of Food Biopolymers at the Molecular Level.** *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 2001 **34**: 3-10.
- [74] CAPPELLA B, DIETLER G. **Force-Distance curves by Atomic Force Microscopy.** *Surface Sci Reports* 1999 **34**: 1-104.
- [75] CHINAGLIA E. **Artefatos.** *II Encontro de Usuários de SPM – Shimadzu* 2005 Maceió-Al.
- [76] BENATAR L. **Chapter Three “Cantilevers”.** Disponível em: <<http://mechmat.caltech.edu/~kaushik/park/3-0-0.htm>>. Acesso em: 16 set 2007.
- [77] HANSMA H, HOH J. **Biomolecular Imaging with the Atomic Force Microscope.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994 **23**:115-39.
- [78] PACIFIC NANOTECH. **A Guide to MFA Image Artifacts.** Disponível em: <[http://www.pacificnanotech.com/MFA-artifacts\\_scanner-artifacts.html](http://www.pacificnanotech.com/MFA-artifacts_scanner-artifacts.html)>. Acesso em: 25 nov 2007.
- [79] ARAÚJO A. **Nucleação e Evolução da Rugosidade em Filmes Eletrodepositados de CuCo.** Dissertação UFSC 2005.

- [80] THUNDAT T, MAJUMDAR A. **Microcantilevers for Physical, Chemical and Biology Sensing**. *Sensors and Sensing in Biology and Engineering* 2003 Barth, Humphry, Secomb (eds.) Springer Wein, NewYork.
- [81] ANDRADE J. **Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers**. V.1, Plenum Press, New York, 1985.
- [82] DAMIANI F, TATSCH P, NELI R. **X-Rays Photoelectron Spectroscopy XPS/ESCA** 2000.
- [83] NASCENTE P. **Análise de Superfície por Espectroscopia de Elétrons**. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo* 1998 **17**: 17-22.
- [84] NEFEDOV V. **X-ray photoelectron spectroscopy of Solid Surfaces**. VSP BV, Netherlands, 1988
- [85] PEREIRA M. **Espectroscopia Auger**. Curso: Medidas para Caracterização e Análise de Materiais, UNICAMP 2000. Disponível em: < <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/Auger.pdf> >. Acesso 23 dez 2007
- [86] MOULDER J, STICKLE W, SOBOL P, BOMBEM K. **Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy**. 1995: 9-252.
- [87] RIBEIRO E, FRANCISCO M, GUSHIKEM Y, GONÇALVES J. Princípios Básicos de XAS e XPS. Disponível em: < [http://www.chemkeys.com/bra/md/ede\\_5/edrxex\\_1/edrxex\\_1.htm#](http://www.chemkeys.com/bra/md/ede_5/edrxex_1/edrxex_1.htm#) >. Acesso em: set 2007.
- [88] LUBAMBO, A. F.; BENELLI, E. M.; KLEIN, J; SCHREINER, W.; CAMARGO, P. C. **Adsorption of protein GlnB-Hs of *Herbaspirillum seropedicae* on Si(111) investigated by MFA and XPS**. *Cell Bioch Bioph* 2006 **44**: 503-511.
- [89] LI Z, ZHOU H, WEI G, SONG Y, WANG L. **Observation of the mica surface by atomic force microscopy**. *Micron* 2005 **36**: 525-531.
- [90] FANG F, SZLEIFER I. **Kinetics and Thermodynamics of Protein Adsorption: A Generalized Molecular Theoretical Approach**. *Biophysical Journal* 2001 **80**: 2568–2589.
- [91] WERONSKI P. **Application of the Extended RSA Models in Studies of Particle Deposition at Partially Covered Surfaces**. *Adv. in Coll. and Interface Sci.* 2005 **118**: 1-24
- [92] ADAMCZYK Z, ZEMBALA M, SIWEK B, WARSZYNSKI P. **Formation of Multilayered Structures in the Layer by Layer Deposition of Colloid Particles**. *J. Colloid Interface Sci.* 1990 **140**: 123-137
- [93] BRANT J, CHILDRESS A. **Membrane–Colloid Interactions: Comparison of Extended DLVO Predictions with MFA Force Measurements**. *Environmental Engineering Science* 2002 **19**(6): 413-427.
- [94] UKSAF. **Fundamental AES Data from Pure Elements, Native Oxides, and Chemical Compounds**. Disponível em: < <http://www.uksaf.org/data.html#1> >. Acesso em: 18 dez 2007.
- [95] POPPA H, ELLIOT G. **The Surface Composition of Mica Surface**. *Surface Science* 1971 **24**: 149-163.
- [96] CASTLE J, CHAPMAN-KPODO H, PROCTOR A, SALVI A. **Curve-Fitting in XPS using Extrinsic and Intrinsic Background Structure**. *J. of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 2000 **106**: 65–80.
- [97] SHIRLEY D. **High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold**. *Physical Review B* 1972 **5**(12): 4709-4714.
- [98] CHEMISTRY: PERIODIC TABLE. **Binding Energy Data**. Disponível em: < <http://www.webelements.com/webelements/elements/text/Na/bind.html> >. Acesso em: 1 dez 2007.
- [99] WANG L, SONG Y, ZHANG B, WANG E. **Adsorption behaviors of methanol, ethanol, *n*-butanol, *n*-hexanol and *n*-octanol on mica surface studied by atomic force microscopy**. *Thin Solid Films* 2004 **458**: 197–202.

- [100] LIU Z, LI Z, ZHOU H, WEI G, SONG Y, WANG L. **Observation of the Mica Surface by Atomic Force Microscopy.** *Micron* 2005 **36**: 525–531.
- [101] XU L, LIO A, HU J, OGLETREE D, SALMERON M. **Wetting and Capillary Phenomena of Water on Mica.** *J. Phys. Chem. B* 1998 **102**: 540-548.
- [102] PUSKAS J, MARGARITIS A. **Novel Thymine-Functionalized Polystyrenes for Applications in Biotechnology. 2. Adsorption of Model Proteins.** *Biomacromolecules* 2004 **5**: 1412-1421