

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CECÍLIA FABIANA DA GAMA FERREIRA

**EFEITO DA APLICAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NA FORMAÇÃO DE FILMES PROTÉICOS
DE GlnB-Hs SOBRE SUBSTRATOS SÓLIDOS**

Curitiba

2012

CECÍLIA FABIANA DA GAMA FERREIRA

**EFEITO DA APLICAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NA FORMAÇÃO DE FILMES PROTÉICOS
DE GlnB-Hs SOBRE SUBSTRATOS SÓLIDOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de
Doutor. Área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais
- PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Paulo César de Camargo
Co-orientadora: Prof. Elaine Machado Benelli

Curitiba

2012

Ferreira, Cecília Fabiana da Gama
Efeito da aplicação do campo elétrico na formação de filmes
protéicos de GlnB-Hs sobre substratos sólidos / Cecília Fabiana da
Gama Ferreira. - Curitiba, 2012.
135 f. : il.; graf., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência
dos Materiais – PIPE.

Orientador: Paulo César de Camargo
Coorientadora: Elaine Machado Benelli

1. Polímeros – Campos elétricos. 2. Filmes finos. 3. Proteínas. I.
Camargo, Paulo César de. II. Benelli, Elaine Machado. III. Título.

CDD 668.43



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais
Setor de Tecnologia

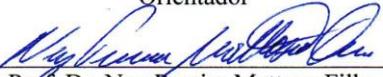
RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos 31 dias do mês de julho de 2012, na Sala de Defesas do PG-Mec - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Dante Homero Mosca Jr., coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a quinquagésima defesa de tese de doutorado na área de concentração: Engenharia de Materiais. Estiveram presentes no ato, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: José Viriato Coelho Vargas (UFPR), Ney Pereira Mattoso Filho (UFPR), Paulo Cesar de Camargo (UFPR), Marco Krieger (Fio Cruz-IBMP), Fabiano Yokaichiya (LNLS). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **CECÍLIA FABIANA DA GAMA FERREIRA** a fazer a apresentação da tese de doutorado intitulada **“EFEITO DA APLICAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO NA FORMAÇÃO DE FILMES PROTEICOS DE GlnB-Hs SOBRE SUBSTRATOS SÓLIDOS.”** Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela Aprovação do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 31 de julho de 2012.



Prof. Dr. Paulo Cesar de Camargo
Orientador



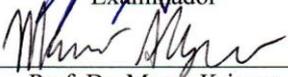
Prof. Dr. Ney Pereira Mattoso Filho
Examinador



Prof. Dr. Fabiano Yokaichiya
Examinador



Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas
Examinador



Prof. Dr. Marco Krieger
Examinador

“Embora o óbvio nem sempre seja evidente,
é revolucionário”

A. H. Albuquerque

Agradecimentos

- 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 a frente do microscópio de força atômica, confiança e muita paciência.
- A Prof. Elaine Machado Benelli pela amizade, auxílio em geral, orientação nas pesquisas, sugestões oportunas e por discussões construtivas.
- Ao Prof. Ivo A. Hümmelgen pela utilização do laboratório e dos equipamentos e ao seu aluno de doutorado Wagner Moura e Serbena pelo apoio nas medidas.
- Ao Divo e todos os demais professores e amigos pelas horas de treino, cuidados e descontração.
- Ao Juliano e a equipe de Travessias da ASUFEPAR pelas horas de treino/relaxamento na piscina.
- Ao Leonardo Schneider pelas conversas construtivas e destrutivas no MFA.
- Ao Eduardo Bach pela amizade, atenção e carinho de todos esses anos.
- Ao Atair dos Santos por me mostrar o caminho.
- A Alcione A. Savariani e aos amigos pelo suporte fundamental.
- Ao Pai

Resumo

O efeito do campo elétrico externo sobre a formação de filmes de proteína GlnB-Hs e sobre os componentes da solução tampão foi analisado por curvas de corrente em função do campo elétrico e por microscopia de força atômica (MFA). A proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* (GlnB-Hs) é globular, homotrímica (36 kDa) e com estrutura tridimensional já determinada por difração de Raios-X. Concentrações de 10 nM e 100 nM de GlnB-Hs nativa e 10 nM de proteína desnaturada foram depositadas sobre lamínula siliconizada e mica sob temperatura e umidade ambientes. Imediatamente após a deposição, campos elétricos máximos de 30 kV/m e 75 kV/m foram aplicados, com taxas de variação de 3 e 30 V/s. As correntes medidas são correntes de superfície e foram analisadas como sendo de corrente de transporte. Para todos os sistemas analisados é necessário um campo elétrico mínimo (valor crítico) para a corrente ser significativa. Dependendo do substrato e dos componentes da solução este campo pode variar de 10 kV/m a 37 kV/m. As imagens de MFA mostraram filmes com alto grau de organização direcional. Tanto nas curvas de I-E quanto nas imagens de MFA, o componente Tris-HCl do tampão tem papel determinante no comportamento das curvas de corrente elétrica e na interpretação das imagens de MFA. Sobre a lamínula siliconizada somente as soluções contendo proteína mostraram evidências de orientação com o campo elétrico aplicado. Enquanto que, sobre a superfície da mica a formação de filmes com orientação preferencial devido ao **E** foram obtidos na presença e ausência de GlnB-Hs. O transporte da proteína GlnB-Hs sobre a mica observado pelas imagens de MFA foi comprovado por imunodeteção. Estes resultados mostram que o campo elétrico aplicado favoreceu a organização direcional dos filmes de proteína GlnB-Hs e podem contribuir para o entendimento da formação de filmes protéicos sob campo elétricos aplicados.

Palavras chave: campo elétrico, filme de proteína GlnB-Hs, mica, lamínula siliconizada, corrente em função do campo elétrico, microscopia de força atômica.

Abstract

The effect of an external electric field on the formation of protein GlnB-Hs films and on its buffer solution on solid surfaces has been analyzed by current vs electric field curves and atomic force microscopy (AFM). The *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein (GlnB-Hs) is a globular, soluble homotrimer (36 kDa) and the three-dimensional structure was already determined by X-Rays diffraction. Concentrations of 10 nM and 100 nM native GlnB-Hs and 10 nM denatured protein were deposited on siliconized glass slides and on mica at ambient conditions. Immediately after solutions deposition a maximum electric field of 30 kV/m and 75 kV/m where applied with rates of 3 and 30 V/s. The measured currents were current surfaces and were analyzed as transport current. Electric current started to flow only after a minimum electric field (critical value) for all systems analyzed. Depending on the substrate and components of the solution the threshold electric field varies from 10 kV /m to 37 kV/m. The AFM images showed films with high degree of directional organization. The Tris-HCl buffer compound has a decisive role both in the electric current curves pattern as in the AFM images interpretation. On siliconized glass slides evidence of film orientation with the applied electric field was only observed in the AFM images when native and denatured protein were present in the solution. On mica surface films with preferred orientation with applied **E** were obtained in the presence and absence of GlnB-Hs. The protein GlnB-Hs transport on mica observed by AFM images was confirmed by imunoblotting. These results showed that the applied electric field favored directional organization of the protein GlnB-Hs films and may contribute to understand the formation of protein films under applied electric fields.

Keywords: electric field, GlnB-Hs protein film, mica, siliconized glass slide, current vs electric field, atomic force microscopy.

Lista de Figura

Figura 2.1: Unidade básica da proteína formando o esqueleto polipeptídico. R_1 e R_2 simbolizam o radical [Adaptado de 15].....	6
Figura 2.2: Desenho esquemático da α -hélice (direita) e da folha- β 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 β em modelos esquemáticos de proteínas. [Adaptado de 15].....	8
Figura 2.3: Diagrama do trímero da proteína GlnB de <i>H. seropedicae</i>	9
Figura 2.4: Estado de cargas (a-c) e superfície molecular (d-f) da proteína GlnB-Hs. a) e d) face inferior, b) e e) face lateral e c) e f) face superior [Adaptado de 20]. Imagem e convenção de cores (RASMOL).....	11
Figura 2.5: Desenho esquemático da dupla camada elétrica formada na interface da superfície carregada em contato com um líquido iônico e a correspondente distribuição do potencial elétrico ψ vs a distância z da parede. Ψ_s representa o potencial negativo da superfície, ψ_i corresponde a camada interna composta por co- e contraíons e ψ_a referente a camada externa composta somente por contraíons hidratados. A distância característica da camada de difusão é dada pelo comprimento de Debye ($1/k$) [Adaptado de 25].....	13
Figura 2.6: Diagrama das possíveis orientações de adsorção para uma proteína retangular de dimensões $a \times b \times c$ em relação às demais proteínas.....	17
Figura 2.7: Resumo dos modelos cinéticos de adsorção. Um desenho esquemático de cada mecanismo de adsorção [Adaptado de 30].....	17
Figura 2.8: 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 [44].....	20
Figura 2.9: Esquema do fluxo eletrosmótico. A) Dimensões de um microcanal, W é a largura, h a altura e L o comprimento e a direção do fluxo e B) Desenho esquemático do fluxo osmótico em um tubo capilar de superfície negativa [Adaptado de 9].....	25
Figura 2.10: Desenho esquemático da técnica de monitoramento de corrente. Dois reservatórios com soluções eletrolíticas com diferentes concentrações estão ligados por um microcanal. Inicialmente a solução menos concentrada (em preto) do reservatório B preenche o microcanal. Quando um campo elétrico é aplicado a solução mais concentrada (em cinza), reservatório A, escoo pelo microcanal via EOF, substituindo a solução inicial [8].....	29

Figura 2.11: Curva típica de corrente em função do tempo obtida pela técnica de monitoramento de corrente [8].....	29
Figura 2.12: Desenho esquemático de um dipolo.....	31
Figura 2.13: Desenho da orientação das moléculas polares sob a influência de um campo elétrico externo [Adaptado de 63].....	31
Figura 2.14: Desenho esquemático da interação dipolo-dipolo. a) Campo elétrico externo induz dipolos (flechas brancas) nas partículas coloidais e interações entre as mesmas com distância R e b) quando o campo é forte suficiente partículas coloidais formam uma cadeia ao longo do campo aplicado [69].....	34
Figura 2.15: Desenho esquemático da dupla camada elétrica formada na interface da partícula em contato com um líquido iônico [Adaptado de 9].....	35
Figura 2.16: Desenho ilustrativo da eletroforese. Uma dupla camada elétrica origina na superfície de uma partícula carregada negativamente e forças resultantes de um campo elétrico externo [Adaptado de 9].....	36
Figura 2.17: 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 [78].....	39
Figura 2.18: Desenho esquemático dos componentes do microscópio de força atômica [Adaptado de 83].....	40
Figura 2.19: Desenho esquemático do modo contraste de fase. A sonda oscila sob o efeito de um atuador e a diferença de fase D entre o atuador e o fotodetector, gerada durante a passagem da sonda por materiais diferentes [Adaptado de 15].....	42
Figura 4.1: Desenho esquemático do substrato mica. A mica foi cortada em retângulos de 20 mm X 5 mm. As extremidades foram pintadas com tinta condutiva para fazer contato com eletrodos. As superfícies limpa da mica para formação do filme de proteína é de 4 mm ou 10 mm.....	44
Figura 4.2: Desenho esquemático do substrato lamínula siliconizada. A) substrato lamínula siliconizada e B) design da canaleta feita com pasta de silicone sobre lamínula siliconizada (0,43 X 0,43 X 4 mm). A lamínula foi cortada em retângulos de 20 mm X 10 mm e sobre esta canaletas de silicone em pasta com uma máscara rígida. As extremidades foram pintadas com tinta condutiva para fazer contato como eletrodos.....	45
Figura 4.3: Desenho esquemático da detecção da proteína GlnB-Ab sobre mica.....	48
Figura 4.4: Desenho esquemático do arranjo experimental para aplicação de tensão nas soluções depositadas sobre mica. A amostra foi ligada em série com dois resistores. O multímetro ligado ao resistor R1 de 43.7 KΩ. Na mica, as soluções foram depositadas imediatamente adjacentes a tinta	

condutiva no eletrodo negativo. Na lamínula siliconizada, as soluções preencheram o espaço entre os eletrodos. Na equação calculada pelo software V_A é a voltagem sobre a amostra, V é o valor de tensão medido sobre o resistor R1 e V_T é a tensão aplicada.....50

Figura 5.1: Topografia da lamínula siliconizada (sem aplicação do campo elétrico). A) somente o substrato lamínula siliconizada e B) sistema lamínula siliconizada com a canaleta de polisiloxano.....51

Figura 5.2: Topografia do substrato lamínula siliconizada após tensão de 0 a 300 V. A) - B) sem canaleta e C) - D) com canaleta de polisiloxano. A) e C) sob umidade relativa acima de 70 % e B) e D) com H₂O miliQ preenchendo o espaço entre os eletrodos. Após a água de o volume ter evaporado a superfície das lamínulas foram analisadas.....52

Figura 5.3: Gráfico corrente vs campo elétrico aplicado sobre a lamínula siliconizada. Curvas obtidas sob A) umidade relativa do ar de 100 % a 40% e B) 15 µl de H₂O miliQ foram depositados sobre o substrato.....53

Figura 5.4: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado sobre o sistema lamínula revestida com organosilano com canaleta de polisiloxano. Curvas obtidas com umidade relativa do ar de 40% e acima de 70 % e com 5 µl de H₂O miliQ preenchendo todo o espaço entre os eletrodos.....53

Figura 5.5: Gráfico de corrente elétrica com voltagem constante de A) 100 V para a lamínula siliconizada e B) 500 V para a lamínula siliconizada e mica. A umidade relativa inicial é de 100 %. Depois de aproximadamente 450 s, a umidade é de 60 %. A umidade relativa final é de 40 %.....54

Figura 5.6: Gráfico de corrente em função do tempo com tensão constante: Linha em negrito: 100 V, linha contínua: 300 V e linha pontilhada: 500 V. A) Substrato + canaleta de polisiloxano em umidade relativa acima de 60 % e B) Substrato + canaleta de polisiloxano + 5 µl de H₂O miliQ. O ponto 2 indica quando a tensão atinge a voltagem determinada.....55

Figura 5.7: Topografia dos filmes obtidos pelos componentes da solução tampão sob efeito de um campo elétrico externo de 0 a 75 KV/m. A) 50 mM NaCl, B) 50 mM Tris e C) solução tampão.....56

Figura 5.8: Gráfico de corrente em função da tensão aplicada sobre os componentes da solução tampão na canaleta sobre lamínula siliconizada. Linha tracejada: solução tampão, linha contínua: solução de 50 mM NaCl e linha ponto-traço: solução de 50mM de Tris-HCl pH 8.....56

Figura 5.9: Topografia dos filmes obtidos pelas soluções de proteína GlnB-Hs sobre a lamínula siliconizada+canaleta de polisiloxano sob efeito de um campo elétrico externo de 0 a 75 KV/m. A) nativa 10 nM (solução A), B) nativa 100 nM (solução B) e C) desnaturada 10 nM (solução C).....57

Figura 5.10: Gráfico de I-E das soluções de proteína GlnB-Hs sob a influência do campo elétrico externo sobre a lamínula siliconizada. Linha contínua: solução de 10 nM de GlnB-Hs nativa, linha

tracejada: a solução de 100 nM de GlnB-Hs nativa e linha em negrito: solução 10 nM de GlnB-Hs desnaturada.....	58
Figura 6.1: Fórmula estrutural da molécula de organossilano, em que R são grupo químicos que podem ser orgânicos ou inorgânicos.....	60
Figura 6.2: Superfícies hidrofóbicas. Quanto maior o grau de hidrofobicidade da superfície, maior o ângulo de contato com a gota de água. Superfície (a) superhidrofílica $\theta = 0^\circ$, (b) com molhabilidade parcial $0^\circ < \theta < 180^\circ$ e (c) superhidrofóbica $\theta = 180^\circ$ [93]	61
Figura 6.3: Gráfico de corrente em função da umidade relativa. Quanto maior a umidade, maior o valor de corrente medido sobre a superfície da lamínula siliconizada.....	63
Figura 6.4: Desenho esquemático mostrando os caminhos formados pelos agregados de moléculas de água adsorvidas na superfície do substrato sólido e o possível caminho percorrido pela corrente (vermelho) [Adaptado de 99].....	64
Figura 6.5: Gráfico de fração revestida por umidade relativa nas condições em que as medidas de corrente por campo elétrico foram realizadas, temperatura de 30 °C e pressão de vapor de 4233 Pa.....	65
Figura 6.6: Gráfico de potências dissipadas x corrente da lamínula siliconizada e mica (referentes as Fig. 5.5-A e 5.6-B) com voltagens constantes de 100 V e 500 V.....	66
Figura 6.7: Cargas cruzando uma seção reta em um microcanal devido a um campo externo aplicado [Adaptado de 50].....	71
Figura 6.8: Gráfico da generalização do comportamento observado para as curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado, exceto para a solução 50 mM de NaCl.....	71
Figura 6.9: Desenho esquemático da molécula de Tris. Em vermelho são as OH^- e em azul é o NH_2^+ [103].....	72
Figura 6.10: Dipolo elétrico em um campo elétrico. Se as forças atuantes não forem iguais ($F_1 \neq F_2$) a molécula migrará no sentido do maior F [Adaptado de 50].....	72
Figura 6.11: Desenho esquemático de uma estrutura do grafite cristalino. Folhas com os átomos de carbono (roxa) em arranjo hexagonal [Adaptado de 104]. Resolução da rede atômica dos átomos de grafite (carbono ordenado hexagonalmente) no plano cristalinos. Imagens obtidas no modo de contato [105].....	73
Figura 6.12: Desenho esquemático das forças sobre a proteína GlnB-Hs sob um campo elétrico aplicado. A força de arraste se sobrepõe na proteína, que em pH 8 apresenta excesso de carga negativa na superfície.....	77
Figura 7.1: Topografia da superfície da mica muscovita recém clivada obtida por MFA operando no modo de contato. A) área de $100 \mu\text{m}^2$ e B) aumento de 6x da área maior.....	80

Figura 7.2: Topografia da água miliQ sob efeito de campo elétrico aplicado sobre mica. A) Próximo ao anodo (lado depositado) e B) próximo ao catodo.....	81
Figura 7.3: Imagens topográficas do efeito do campo elétrico de 75 kV/m nos componentes das soluções controles. A) – C) áreas próximas ao anodo (lado no qual a solução foi depositada) e de D) – F) áreas próximas ao catodo. A) e D) solução de 50 mM NaCl, B) e E) solução de 50 mM Tris-HCL pH 8 e C) e F) solução tampão.....	82
Figura 7.4: Gráfico de corrente em função do campo elétrico para as soluções controles depositadas paralelo ao anodo e um campo elétrico externo de 0 a 75 kV/m, com taxa de variação de 3 V/s. Linha contínua: substrato mica de 4 mm de comprimento, linha tracejada: água miliQ, linha em negrito: solução de 50 mM NaCl, linha com bolinhas brancas: solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e linha de bolinhas pretas: solução tampão.....	83
Figura 7.5: Topografia dos filmes de solução A (A e C) e B (B e D) sob efeito de um campo elétrico de 75 kV/m sobre a mica. Regiões próximas ao anodo A)-B) e ao catodo C)-D).....	84
Figura 7.6: Filme da solução de proteína GlnB-Hs 10 nM desnaturada sob efeito de um campo elétrico de 75 kV/m sobre a mica. Área próxima ao anodo A) Topografia e B) fase e área próxima ao catodo C) topografia.....	85
Figura 7.7: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado as soluções de proteína depositadas ao lado do anodo sobre mica. Linha contínua: Solução de GlnB-Hs 10 nM nativa, linha tracejada: solução de GlnB-Hs 100 nM nativa e linha em negrito: solução de GlnB-Hs 10 nM desnaturada.....	85
Figura 7.8: Efeito da tensão de até 300 V com passo de 3 V/s aplicados sobre as soluções controles na mica muscovita. Lado do anodo A)-C) e ao lado do catodo D)-F) das soluções: 50 mM NaCl A) e D), 50 mM Tris-HCl pH 8 B) e E) e da solução tampão C) e F).....	86
Figura 7.9: Gráfico de corrente em função do campo elétrico das soluções controles depositadas paralelo ao anodo e uma tensão de 0 a 300 V aplicada, com taxa de variação de 3 V/s. Linha contínua: substrato mica de 10 mm de comprimento, linha tracejada: água miliQ, linha em negrito: solução de 50 mM NaCl, linha com bolinhas brancas: solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e a linha com bolinhas pretas: solução tampão.....	87
Figura 7.10: Topografia dos filmes da solução de proteína 10 nM nativa (A e E), 100 nM nativa (B e D) e 10 nM desnaturada (C e F) expostas a um campo de 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s sobre mica. Áreas próximas ao anodo (lado no qual a solução foi depositada) A) a C) e áreas próximas ao catodo D) a F).....	88
Figura 7.11: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado às soluções de proteína depositadas ao lado do anodo sobre mica e expostas a uma tensão de 0 a 300 V com taxa de variação	

de 3 V/s. Linha contínua: solução de GlnB-Hs 10 nM nativa, linha tracejada: solução de GlnB-Hs 100 nM nativa e linha em negrito: solução de GlnB-Hs 10 nM desnaturada.....	89
Figura 7.12: Efeito da tensão de até 300 V com passo de 30 V/s aplicados sobre as soluções controles na mica muscovita. Lado do anodo A)-C) e ao lado do catodo D)-F) das soluções: 50 mM NaCl (A e D), 50 mM Tris-HCl pH 8 (B e E) e da solução tampão (C e F).....	91
Figura 7.13: Gráfico de corrente em função do campo elétrico das soluções controles depositadas paralelo ao anodo e uma tensão de 0 a 300 V aplicada, com taxa de variação de 30 V/s. Linha contínua: substrato mica de 10 mm de comprimento, linha tracejada: água miliQ, linha em negrito: solução de 50 mM NaCl, linha com bolinhas brancas: solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e linha com bolinhas pretas: solução tampão.....	92
Figura 7.14: Topografia dos filmes de solução de proteína GlnB-Hs nativa 10 nM (A e C) e 100 nM (B e D) sob efeito de um campo elétrico de 30 kV/m sobre a mica. Regiões próximas ao anodo A)-B) e ao catodo C)-D).....	93
Figura 7.15: Filme da solução de proteína GlnB-Hs 10 nM desnaturada sob efeito de um campo elétrico de 30 kV/m sobre a mica. Área próxima ao anodo A) Topografia e área próxima ao catodo B) topografia e C) fase.....	93
Figura 7.16: Corrente em função do campo elétrico aplicado as soluções de proteína depositadas ao lado do anodo sobre mica e expostas a uma tensão de 0 a 300 V com taxa de variação de 30 V/s. Linha contínua: solução de GlnB-Hs 10 nM nativa, linha tracejada: solução de GlnB-Hs 100 nM nativa e linha em negrito: solução de GlnB-Hs 10 nM desnaturada.....	94
Figura 7.17: Radiograma dos controles. A) Superfície recém clivada da mica, solução tampão depositada paralelamente ao eletrodo negativo (sinalizado na imagem) sobre a mica com B) 10 mm e C) 4 mm de comprimento entre os eletrodos.....	95
Figura 7.18: Radiograma das soluções de proteína depositadas paralelas ao eletrodo negativo sem aplicação de campo sobre mica de 4 mm (A a C) e 10 mm (D a F) de comprimento entre os eletrodos. Concentrações de GlnB-Hs de nativa 10 nM (A e D), nativa 100 nM (B e E) e desnaturada 10 nM (C e F).....	95
Figura 7.19: Radiograma das soluções de proteína sob efeito de campo elétrico sobre mica com 4 mm de distância entre eletrodos. Solução de GlnB-Hs de A) 10 nM nativa, B) 100 nM nativa e C) 10 nM desnaturada.....	96
Figura 7.20: Radiograma das soluções de proteína sob efeito de campo elétrico sobre mica com 10 mm de distância entre eletrodos e com taxa de variação de 3 V/s. Solução de GlnB-Hs de A) 10 nM nativa, B) 100 nM nativa e C) 10 nM desnaturada.....	96

Figura 7.21: Radiograma das soluções de proteína sob efeito de campo elétrico sobre mica com 10 mm de distância entre eletrodos e com taxa de variação de 30 V/s. Solução de GlnB-Hs de A) 10 nM nativa, B) 100 nM nativa e C) 10 nM desnaturada.....	97
Figura 8.1: Desenho esquemático de uma estrutura ideal de mica muscovita. Folhas tetraédricas duplas de $(\text{Si}, \text{Al})_2\text{O}_5$ são ligadas eletrostaticamente por íons de potássio. A distância perpendicular entre as folhas é de 10Å . [Adaptado de 79]. Topografia da mica muscovita (001) depois de ser atacada com ácido fluorídrico por 3 horas. Análise realizada em modo dinâmico e imagem de 512×512 pixel. Cantilever de $10\ \mu\text{m}$, frequência de ressonância de 4,6 MHz e velocidade de varredura de 40 Hz [113].....	98
Figura 8.2: Representação da molhabilidade da gota. A molhabilidade de uma superfície sólida é o resultado das interações moleculares existentes entre o fluido e o substrato sólido, se revelando como a relação entre forças de coesão e adesão. À medida que as forças de adesão aumentam em relação as forças de coesão, mais afinidade a superfície sólida terá com a fase líquida.....	99
Figura 8.3: Desenho esquemático do sistema analisado. A solução de proteína é depositada sobre a mica, ao lado do anodo (1). Imediatamente após uma tensão de até 300 V é aplicada com taxas de variação do campo elétrico diferentes. Através de forças agindo sobre os íons e moléculas da solução a interface líquido-ar começa a escoar (2). No final de um tempo t a solução reveste toda a superfície da mica entre os eletrodos (3).....	100
Figura 8.4: Gráfico da generalização do comportamento observado para as curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado.....	101
Figura 8.5: Sistema físico análogo a solução de proteína (dielétrico) entre os eletrodos. Campo elétrico entre as placas de um capacitor com dielétrico (cinza). A carga superficial no dielétrico enfraquece o campo original entre as placas [Adaptado de 50].....	102
Figura 8.6: Desenho esquemático da solução depositada paralelo ao polo negativo sobre a mica com a fonte desligada. A frente não uniforme e a molhabilidade da solução foram observados opticamente.....	105
Figura 8.7: Movimentação da proteína causada pelo momento de dipolo induzido em um campo elétrico não uniforme [Adaptado de 116].....	107
Figura 8.8: Interação das moléculas presentes na solução com 50 mM Tris-HCl pH 8. Interação A) Tris-Tris, B) Tris- H_2O e C) moléculas de água.....	108
Figura 8.9: Modelo esquemático da molécula de água coadsorvida com átomo de Na sobre Ru (0 0 1) [Adaptado de 123]. A molécula de água reorienta-se com o aumento de Na presente na superfície.....	109

Figura 8.10: Espectro de FTIR/ATR para filmes formados por 100 nM GlnB-Hs nativa (linha em preto) e a solução tampão. As duas além de apresentarem pico na região característica da proteína também tem um sinal muito pequeno (destacado em vermelho).....	111
Figura 8.11: Análise por MEV-CL. A) Imagem de MEV, B) imagem por catodoluminescência do filme formado pela deposição de 10 nM GlnB-Hs nativa paralela ao anodo. Espectro obtido do filme formado pela solução controle Tris-CL pH 8. Observa-se no espectro que a faixa de emissão para os aminoácidos da proteína GlnB-Hs apresenta sinal para o Tris.....	112
Figura 8.12: Trajetórias de partículas em escoamentos unidimensionais laminar e turbulento [93].....	115
Fig. Ap. 2.1: Desenho esquemático do arranjo experimental para aplicação de tensão nas soluções.....	131
Fig. Ap. 3.1: Topografia dos filmes de proteína GlnB-Hs 10 nM nativa (A e C), 100 nM (B e E) e desnaturadas (C e F) formados sobre mica (A a C) e lamínula siliconizada (D a F).....	133
Fig. Ap. 3.2: Topografia dos filmes formados pela deposição de A) água miliQ e B) solução de 50 mM de Tris-HCl pH 8 sobre mica.....	134

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Concentração final de proteína GlnB-Hs e dos componentes da solução tampão nas soluções após diluição.....	45
Tabela 5.1: Análise das curvas das soluções de proteína sobre lamínula siliconizada (referente a Fig. 5.10).....	59
Tabela 6.1: Potência dissipada para a curva corrente em função do tempo com tensão constante da lamínula siliconizada com canaleta de polisiloxano sob umidade relativa acima de 70 % (referente a Fig. 5.6-A).....	67
Tabela 6.2: Potência dissipada para a curva corrente em função do tempo com tensão constante da lamínula siliconizada com canaleta de polisiloxano e 5 µl de H ₂ O miliQ preenchendo o espaço entre os eletrodos (referente a Fig. 5.6-B).....	68
Tabela 6.3: Força de arraste sofrida pelas proteínas GlnB-Hs sob campo elétrico externo.....	77
Tabela 7.1: Análise das curvas das soluções de proteína sobre mica com taxa de variação de 3 V/s (referente a Fig. 7.11).....	89
Tabela 8.1: Comprimento de onda de excitação e emissão para os aminoácidos tirosina e fenilalanina presentes na proteína GlnB-Hs.....	111
Tabela 8.2: Número de Reynolds para a água miliQ depositada sobre mica exposta ao campo elétrico em diferentes taxas de variação.....	114

Nomenclatura

Abreviações

Ab – *Azospirillum brasiliense*

CL – catodoluminescência

DCE – dupla camada elétrica

DEF - dieletroforese

EF – eletroforese

EOF – fluxo eletroosmótico

FTIR – espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

FTIR/ATR – espectroscopia de reflectância total atenuada

Hs – *Herbaspirillum seropedicae*

MEV – microscópio eletrônico de varredura

MFA – microscopia de força atômica

MVS – microscopia de varredura por sonda mecânica

PALS – espalhamento de luz com fase alternada

RSA – adsorção randômica sequencial

XPS – espectroscopia de fotoelétrons gerados por Raios-X

Lista de símbolos

a raio da partícula (m)

A área da seção transversal (m^2)

A_0 amplitude livre (m)

A_r amplitude real (m)

c concentração das espécies de íons (mol/l)

c_p calor específico (J/gK)

C capacitância (F)

d distância da parede do canal (m)

D coeficiente de difusão (m^2/s)

e carga do elétron (C)

E vetor campo elétrico (V/m)

F força (N)

Fws fração revestida (%)

h altura do canal (m)

I corrente elétrica (A)

J densidade de corrente (A/m^2)

$1/k$ comprimento de Debye (m^{-1})

k constante dielétrica do material (C/Vm)

K constante de Boltzmann (J/K)

k_{cant} constante de mola do cantilever (N/m)

$K(\omega)$ fator Clausius-Mossotti

L comprimento do canal (m)

L_0 comprimento característico (m)

n número total de espécies carregadas no sistema

p momento de dipolo (C.m)

P pressão (Pa)

P_{PV} pressão de vapor (Pa)

P_e perímetro (m)

P_d potência dissipada (W)

q magnitude da carga (C)

Q carga (C)

Q_{cant} fator de qualidade

R distância de separação entre os dois átomos (m)

Re número de Reynolds

R_i resistência (Ω)

t tempo (s)

t_w espessura atribuída para molécula de água (\AA)

T temperatura absoluta (K)

\mathbf{u} vetor velocidade (m/s)

u magnitude da velocidade (m/s)

U potencial de interação (V)

UR umidade relativa (%)

V tensão (V)

ω_{cant} frequência de ressonância (Hz)

W largura do canal (m)

z valência do íon

Letras gregas

ϵ_0 permissividade do vácuo (C/Vm)

ϵ_m permissividade do meio (C/Vm)

ϕ ângulo de separação (graus)

λ_s condutância da superfície (S)

ω frequência do meio aplicada (Hz)

ψ potencial elétrico (V)

μ mobilidade (m^2/Vs)

η viscosidade (Pa.s)

ρ densidade de carga

ρ_i resistividade (S/m)

σ_f condutividade do meio (S/m)

σ_p condutividade da partícula (S/m)

τ_{MW} tempo de relaxação da partícula (s)

∇ gradiente

Δt variação de tempo (s)

θ ângulo de contato (graus)

φ variação de fase

ζ potencial zeta (V)

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Organização da tese.....	4
2. Revisão bibliográfica.....	6
2.1. Proteínas.....	6
2.1.1. Estrutura tridimensional das proteínas.....	7
2.1.2. Estrutura tridimensional da proteína GlnB-Hs.....	8
2.1.3. Propriedades iônicas das proteínas.....	9
2.1.4. Propriedades iônicas da proteína GlnB-Hs.....	10
2.2. Formação de filmes finos protéicos sobre substratos sólidos – Adsorção de proteína.....	12
2.3. Efeito do campo elétrico na adsorção de proteína.....	21
2.3.1. Fluxo eletrosmótico.....	25
2.3.1.1. Escoamentos eletrosmóticos em superfícies livres.....	27
2.3.1.2. Técnica de monitoramento de corrente.....	28
2.3.2. Dieletroforese.....	30
2.3.3. Eletroforese.....	34
2.4. Cristalização bidimensional de proteínas.....	37
2.5. Microscópio de força atômica.....	37
2.5.1. Princípio físico do funcionamento do MFA.....	38
2.5.2. Princípio mecânico do funcionamento do MFA.....	39
2.5.2.1. Modo dinâmico.....	41
2.5.2.2. Imagem da fase.....	41
3. Objetivos.....	43
3.1. Objetivo geral.....	43
3.1. Objetivos específicos.....	43
4. Procedimento experimental.....	44
4.1. Materiais.....	44
4.1.1. Mica muscovita.....	44
4.1.2. Lamínula siliconizadas.....	44
4.1.3. Solução estoque de proteína GlnB-Hs.....	45
4.1.4. Soluções controles.....	46
4.1.5. Soluções para imunodeteção.....	46

4.1.6. Fonte e Multímetro para aplicação de tensão.....	46
4.2. Métodos.....	46
4.2.1. Deposição das soluções sobre a mica para aplicação de tensão.....	46
4.2.2. Deposição das soluções sobre lamínula siliconizada para aplicação de tensão.....	47
4.2.3. Efeito da umidade nos valores de corrente na lamínula siliconizada.....	47
4.2.4. Detecção da proteína GlnB-Ab sobre a superfície da mica.....	47
4.2.5. Análise por microscopia de força atômica (MFA) dos filmes formados sobre a mica e lamínula siliconizada.....	48
4.2.6. Obtenção dos gráficos de corrente em função do campo elétrico.....	49
5. Resultados: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a lamínula siliconizada.....	51
5.1. Efeito da umidade relativa do ar nas medidas de corrente elétrica e imagens de MFA.....	51
5.2. Efeito do campo elétrico sobre as soluções controles depositadas na canaleta de polisiloxano.....	55
5.3. Efeito do campo elétrico sobre as soluções de proteína GlnB-Hs depositadas na canaleta de polisiloxano.....	57
6. Discussão: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a lamínula siliconizada.....	60
6.1. Efeito da umidade relativa do ar nas medidas de corrente elétrica e imagens de MFA.....	60
6.2. Efeito do campo elétrico sobre as soluções controles depositadas na canaleta de polisiloxano.....	68
6.3. Efeito do campo elétrico sobre as soluções de proteína GlnB-Hs depositadas na canaleta de polisiloxano.....	75
7. Resultados: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre mica.....	80
7.1. Efeito do campo elétrico sobre o substrato e na água miliQ depositada sobre mica.....	80
7.2. Campo elétrico de 75 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.....	81
7.2.1. Soluções controles.....	82
7.2.2. Soluções de proteína GlnB-Hs.....	84
7.3. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.....	86
7.3.1. Soluções controles.....	86
7.3.2. Soluções de proteína GlnB-Hs.....	88
7.4. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 30 V/s.....	90
7.4.1. Soluções controles.....	90

7.4.2. Soluções de proteína GlnB-Hs.....	92
7.5. Detecção da proteína GlnB-Ab sobre a superfície da mica.....	94
7.5.1. Controles: superfície da mica e solução tampão.....	95
7.5.2. Campo elétrico de 75 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.....	96
7.5.3. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.....	96
7.5.4. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 30 V/s.....	97
8. Discussão: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a mica.....	98
8.1. Efeito do campo elétrico sobre o substrato e água miliQ depositada sobre mica.....	98
8.2. Gráficos de I-E das soluções controles e soluções de proteína GlnB-Hs depositadas sobre mica.....	100
8.3. Imagens de microscopia de força atômica das soluções controles e soluções de proteína GlnB-Hs sobre mica.....	106
8.4. Detecção da proteína GlnB-Ab sobre a superfície da mica.....	110
9. Conclusões.....	117
9.1. Trabalhos futuros.....	119
10. Referência Bibliográfica.....	120
Apêndice 1. Resumo das amostras preparadas e resultados de corrente em função do campo elétrico e imagens de MFA.....	129
Apêndice 2. Medida de corrente em função do campo elétrico.....	131
Apêndice 3. Filmes formados sem campo elétrico aplicado.....	133

1. Introdução

A interação de biomoléculas com superfícies sólidas determina características de importância fundamental para o desenvolvimento de filmes finos e suas aplicações em nanotecnologia, biomateriais e processos biotecnológicos. As proteínas apresentam diversidade estrutural e de distribuição superficial de cargas o que favorece processos de adesão em substratos sólidos. Os processos de adesão envolvem tanto cinética de ligação quanto rearranjos estruturais de proteínas. Atualmente, vários estudos procuram medir, prever, controlar e entender a conformação de proteínas, superestrutura e os detalhes cinéticos das interações destas biomoléculas com a superfície [1, 2, 3, 4].

A função de uma superfície revestida com proteínas depende das propriedades estruturais da macromolécula, uma vez que sua função biológica está diretamente ligada a sua estrutura tridimensional que é determinada pela sua sequência de aminoácidos.

A possibilidade de controlar filmes protéicos tendo seus componentes adaptados e otimizados para uma dada aplicação seria uma situação ideal. Na realidade, estamos longe desta realidade. A complexidade das macromoléculas, a influência dos componentes da solução de proteína e as características polares da superfície sólida dificultam o controle no posicionamento espacial durante o momento da adesão das moléculas.

Filmes finos formados pela deposição de solução de proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* em mica foram caracterizados por MFA e XPS [5]. Na mica a interação da proteína GlnB-Hs é fraca e a estrutura dos arranjos supramoleculares formados depende da concentração de sal presente na solução de proteína [5]. Além disso, o NaCl e especialmente o Tris existentes na solução de proteína limitam a resolução e distinção de arranjos supramoleculares na superfície da mica, podendo influenciar na interpretação dos resultados [5].

A superfície do filme protéico formado pela deposição da solução de proteínas em diferentes concentrações sobre mica depositada por *spin coating* foi analisada por espectroscopia de infravermelho [dados ainda não publicados]. Os gráficos mostram a limitação da técnica de preparo na formação de filmes de proteína GlnB-Hs, devido a fraca adesão destas proteínas no substrato [dados ainda não publicados]. Além disso, os resultados mostram que os componentes da solução de proteína (Tris-HCl e NaCl) tem maior afinidade com a superfície da mica do que à própria GlnB-Hs.

Substratos diferentes foram usados na formação do filme de proteína GlnB-Hs com deposição por *drop deposition* para estudar a influência do substrato na organização de possíveis auto-arranjos dos componentes da solução de proteína por MFA [dados não publicados]. Superfícies de mica, grafite pirolítico e lamínula de vidro siliconizada foram utilizadas devido às diferentes

características polares e de molhabilidade. Pelas imagens de MFA observou-se arranjos lineares sobre os substratos de grafite e lamínula siliconizada [dados ainda não publicados]. A clivagem em diferentes planos do grafite e as cadeias poliméricas do silicone podem ser a causa da organização linear das proteínas observadas sobre estes substratos.

Uma maneira de controlar a homogeneidade espacial, orientação e razão de crescimento de camadas de proteínas é através da aplicação de um campo elétrico externo [6, 7, 8, 9]. Muitas proteínas alinham e migram na presença de um campo elétrico por apresentarem carga líquida e características polares.

A dificuldade de medir simultaneamente os mecanismos de adsorção e os efeitos de um campo elétrico externo atuando sobre proteínas em uma interface sólida faz com que o interesse no assunto aumente o número de pesquisas com diversas técnicas, contribuindo para elucidar a adesão de biomoléculas em sólidos [6, 7, 8, 9, 10].

Estudos anteriores investigaram a adsorção de proteína em uma superfície sólida sob a influência de um campo elétrico utilizando um dos eletrodos da célula eletroquímica para formação do filme e, assim, medir a influência da quantidade de material adsorvido e espessura de camada [6], orientação [10] e regulação de ligação entre antígeno-anticorpo [11].

Neste trabalho a migração da solução de proteína GlnB-Hs sob efeito de campo elétrico é utilizado como sistema alternativo para controlar arranjos formados na interface líquido-superfície sólida. Um volume de solução de proteína GlnB-Hs é depositado sobre um substrato sólido (mica e lamínula de vidro siliconizada) e submetida a campos elétricos variados. Os filmes obtidos podem ser usados como base para nucleação de cristais de proteína e estudos de interação entre as proteínas da família PII.

A proteína GlnB faz parte da família do tipo PII [12]. Esta biomolécula é transdutora de sinal envolvida na regulação da atividade das proteínas relacionadas com a utilização de fonte de nitrogênio [12, 13]. A proteína GlnB-Hs é globular, trimérica (36 kDa) e sua estrutura tridimensional foi determinada por difração de Raios-X [14].

As curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado foram analisadas procurando-se entender a formação do filme resultante de diversos fenômenos como a migração dos íons da solução, polarização e arraste da proteína e a evaporação da água de solução. A morfologia destes filmes foi avaliada por microscopia de força atômica (MFA) para caracterização das possíveis estruturas supramoleculares altamente organizadas formadas.

A influência do campo elétrico externo na organização dos componentes da solução de proteína na formação dos filmes foram avaliados em diferentes condições, como valor máximo de campo elétrico aplicado, taxa de variação do campo elétrico, concentração e estado da proteína GlnB-Hs na solução e característica hidrofóbica dos substratos.

Modificações feitas no protocolo de imunodeteção, método usado em bioquímica e biologia molecular para detecção específica de proteínas em uma dada amostra, permitiu a verificação da migração da proteína GlnB-Hs diretamente sobre a superfície da mica.

Com este estudo pretende-se contribuir para o entendimento dos fatores envolvidos na formação de filmes protéicos, suas estruturas supramoleculares e verificar se estes arranjos supramoleculares podem ser organizados de forma a facilitar a cristalização de proteínas, para estudar a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua função.

1.1. Organização da tese

A tese esta organizada como se segue:

No Capítulo 3 (Revisão Bibliográfica) faz-se uma revisão geral sobre os efeitos do campo elétrico sobre partículas carregadas em solução, em específico sobre proteínas. Primeiramente, uma visão geral sobre estruturas tridimensionais de proteínas, em particular a estrutura tridimensional e a distribuição de cargas na superfície da proteína GlnB-Hs. Segue-se uma introdução sobre adsorção de proteínas em substratos sólidos, os aspectos cruciais que devem ser levados em consideração no preparo do filme e interação da solução com as superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. A influência do campo elétrico sobre os componentes da solução e a introdução de conceitos relacionados com eletrocinética, como eletrosmose, dielectroforese e eletroforese também são discutidas neste capítulo. Ainda são descritos os princípios da técnica de microscopia de força atômica (MFA) usada para analisar os filmes obtidos pela deposição da solução de proteína GlnB-Hs em substratos sólidos expostas a um campo elétrico externo. Diversos conceitos apresentados neste capítulo têm o objetivo de situar o leitor nas diversas tecnologias disponíveis no uso de fluidos para a formação de filmes finos.

O Capítulo 4 (Procedimento Experimental) descreve os materiais utilizados e os métodos para aplicação do campo elétrico nas soluções. As diferentes condições de deposição e arranjo experimental e valores de campo aplicados para a obtenção de filmes protéicos altamente organizados sobre lamínula siliconizada e mica.

Os Capítulos 5 e 6 (Resultados e Discussão, respectivamente) são dedicados aos resultados e discussão dos filmes de proteína GlnB-Hs obtidos sobre a lamínula siliconizada quando expostos a um campo máximo de 75 kV/m. No Capítulo 6 é descrita a caracterização da superfície da lamínula siliconizada, apresentada a relação da umidade relativa do ar com as medidas de corrente e a interferência do substrato na organização do filme protéico. Neste capítulo descreve-se ainda a interpretação das curvas de corrente por campo elétrico, correspondentes às soluções e a influência dos componentes da solução tampão. A explicação da organização das proteínas observada por imagens de MFA complementa esta parte do trabalho.

No Capítulo 7 e 8 são apresentados os resultados e discussões, respectivamente, dos filmes organizados de proteína GlnB-Hs expostos a campos elétricos de 75 e 30 kV/m, em diferentes taxas de variação do campo. As soluções controle e de proteínas foram depositadas paralelamente ao polo negativo (por convenção nesta tese chamado de anodo). As medidas de curvas de corrente fornecem informações sobre a interação das partículas com o substrato, o número de portadores de carga e a sua mobilidade sobre a superfície da mica sob um campo elétrico aplicado. As imagens de MFA

mostram se há transporte de massa via eletroforese e dielectroforese e se as proteínas orientam-se. No Capítulo 8 ainda é discutida a eficiência da detecção direta da proteína GlnB-Hs adsorvida sobre mica e diferenciação desta das moléculas de Tris em relação a técnicas como espectroscopia no infravermelho e por catodoluminescência.

O nono capítulo (Conclusão) é dedicado às conclusões obtidas das imagens de MFA, das curvas de corrente por campo elétrico e a detecção da proteína GlnB-Hs por interação antígeno-anticorpo na superfície da mica, além da sugestão de aplicabilidade para os filmes altamente organizados obtidos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Proteínas

Proteínas são cadeias poliméricas flexíveis 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 [15].

Quimicamente, 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-NH₂-) do segundo aminoácido através de ligações covalentes (ligações peptídicas) com a perda de uma molécula de água, formando o chamado esqueleto polipeptídico (Figura 2.1).

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

As cadeias laterais (R₁ e R₂ da Figura 2.1) conferem a cada aminoácido suas características químicas próprias. As cadeias laterais são formadas por aminoácidos apolares e polares, carregados positiva ou negativamente.

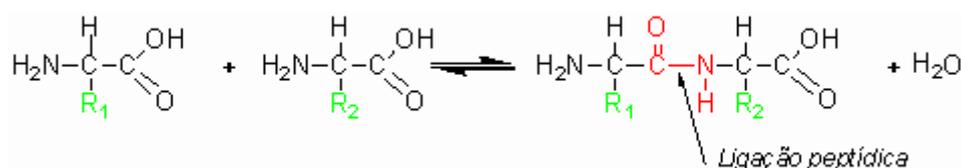


Figura 2.1: Unidade básica da proteína formando o esqueleto polipeptídico. R₁ e R₂ simbolizam o radical [Adaptado de 15].

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 por 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 das proteínas

As proteínas podem ter quatro níveis estruturais:

1) Estrutura primária: nível estrutural mais simples e importante formado pela sequência 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 na sequência primária da proteína, devido a rotação das ligações entre os carbonos α dos aminoácidos e seus agrupamentos amina e carboxila.

As estruturas secundárias mais frequentes são: as α -hélice e as folhas- β (Figura 2.2).

Nas α -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 (Figura 2.2). 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 sequência linear, sendo que todos os grupamentos NH e CO formam pontes de hidrogênio.

A outra estrutura frequente é a folha- β , em que a cadeia polipeptídica forma uma estrutura em zig-zag em que as cadeias laterais de aminoácidos distantes de dois resíduos interagem (Figura 2.2). A estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio formadas entre o NH de uma fita β com o CO de outra fita β , formando a estrutura em folha. Os grupos R (cadeia lateral) alternam-se para cima e para baixo ao longo do esqueleto estendido.

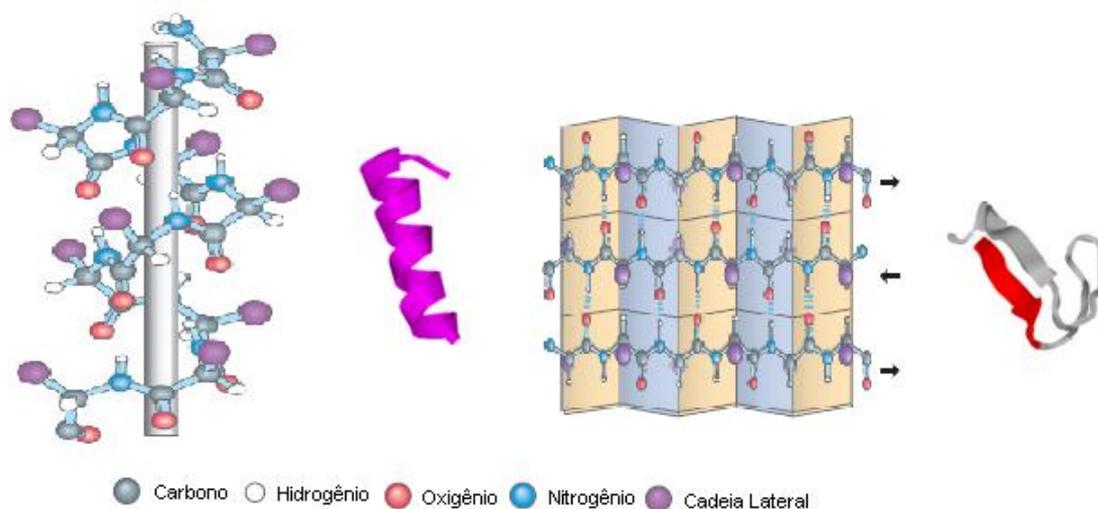


Figura 2.2: Desenho esquemático da α -hélice (direita) e da folha- β anti-paralela (esquerda). A primeira representação mostra todos os átomos no esqueleto polipeptídico, com as cadeias laterais representadas pela cor roxa, enquanto que o segundo desenho mostra os símbolos usualmente utilizados para representar a alfa-hélice e a folha β em modelos esquemáticos de proteínas. [Adaptado de 15].

3) Estrutura terciária: resulta do enovelamento 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 que faz parte da família de proteínas do tipo PII [12].

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 [12] em muitas bactérias, incluindo a *Herbaspirillum seropedicae* [13].

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 [16, 17, 18].

Sua estrutura tridimensional foi determinada por difração de Raios-X [14]. As proteínas GlnB-Hs são homotrímeros 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 proteínas da família PII (Figura 2.3).

As maiores diferenças estruturais são observadas nas 3 alças que se estendem a partir deste núcleo: as alças T, B e C. A alça B contém o motivo Walker A (GXGKX) que é responsável pela ligação a nucleotídeos (Fig. 2.3). A alça T, em geral, contém o resíduo Tyr51 ou Ser49 que em alguns organismos, podem sofrer modificações pós-traducionais por uridilação ou fosforilação, respectivamente. A alça C-terminal que pode apresentar estrutura do tipo α -turn ou hélice 3_{10} .

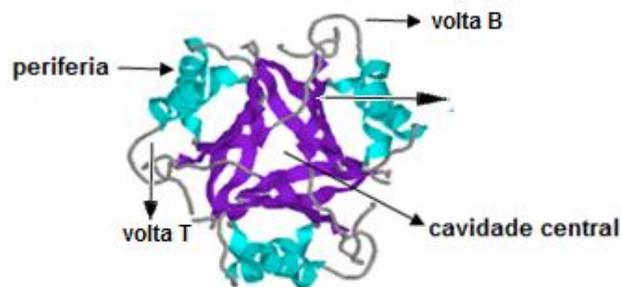


Figura 2.3: Diagrama do trímero da proteína GlnB de *H. seropedicae*.

As folhas β do motivo $\beta\alpha\beta$ estão alinhadas no interior da cavidade central e as α -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.

2.1.3. Propriedades iônicas das proteínas

As propriedades iônicas das proteínas, determinadas primeiramente pelas cadeias laterais dos aminoácidos, são dependentes do pH e da força iônica da solução que contém a proteína.

Quando há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína, a carga líquida da molécula é zero e o valor de pH em que isso acontece é conhecido como ponto isoelétrico, pI. Abaixo ou acima do pI, as proteínas possuem cargas positivas ou negativas na superfície, interagindo eletrostaticamente uma com as outras.

A adição de sal na solução comprime a camada de solvatação das proteínas e diminui a interação entre as mesmas. Conforme a concentração de sal na solução vai aumentando, mais moléculas do solvente associam-se aos íons da solução. Como resultado, menos solvente fica disponível para participar da camada de solvatação das proteínas, expondo padrões hidrofóbicos na superfície da proteína.

Em uma concentração baixa de sal os biopolímeros estarão em um estado mais relaxado e expandido na solução, fornecendo maior potencial de ligação para os sítios [19]. Conforme a concentração iônica aumenta o polímero fica mais compacto e comprimido, formando um denso núcleo e fornecendo uma menor possibilidade de interação [19]. Assim, quanto mais condensada a estrutura da biomolécula em alta concentração iônica mais fraca a ligação com a superfície, devido a menores forças de adesão com o substrato.

2.1.4. Propriedades iônicas da proteína GlnB-Hs

A face inferior do trímero, por convenção, é a face que possui a volta C e contém resíduos carregados negativamente (Figura 2.4-a e 2.4-d). A outra face (face superior) da proteína é positivamente carregada (Figura 2.4-c e 2.4-f). As cargas positivas são localizadas na face lateral da proteína, ao redor da volta B (Figura 2.4-b e 2.4-e).

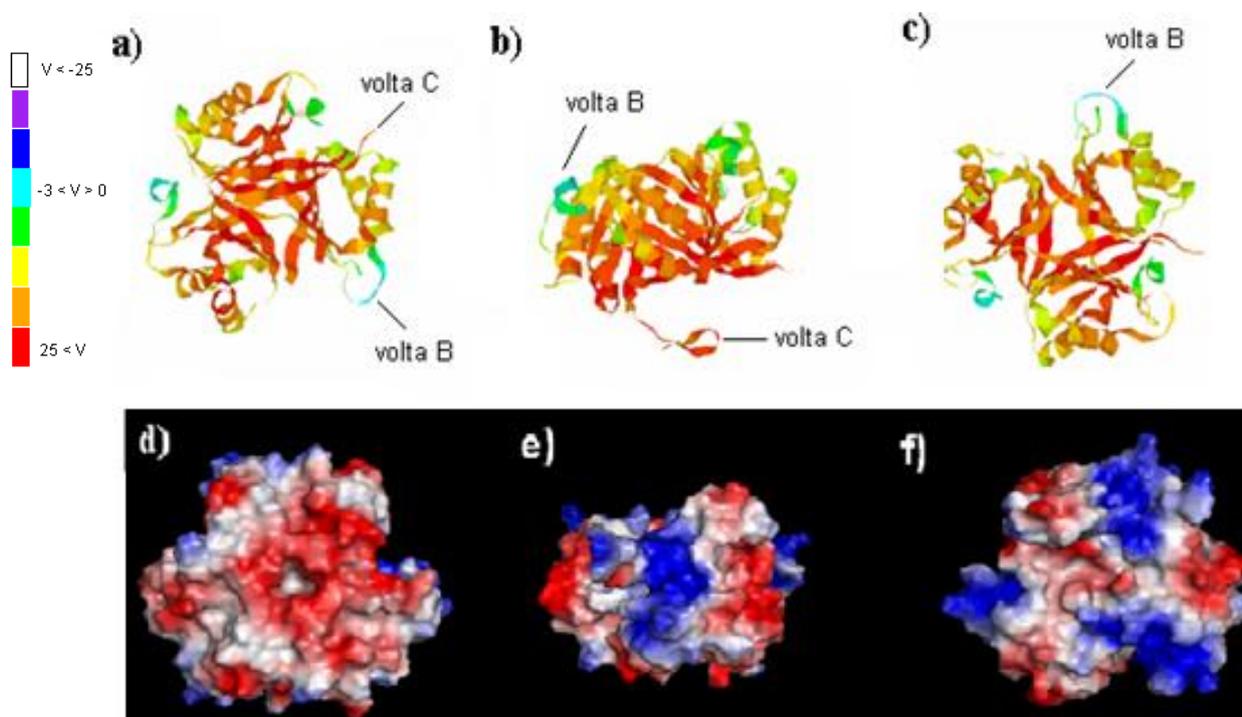


Figura 2.4: Estado de cargas (a-c) e superfície molecular (d-f) da proteína GlnB-Hs. a) e d) face inferior, b) e e) face lateral e c) e f) face superior [Adaptado de 20]. Imagem e convenção de cores (RASMOL).

As cargas de valor mais baixo (negativa) passam do vermelho até o azul, valor mais alto (positiva) (RASMOL) [20]. O azul claro corresponde à volta B, onde estão concentradas as cargas positivas.

A superfície molecular da GlnB-Hs (Figura 2.4-d, 2.4-e e 2.4-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), entre as folhas β e nas α -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 à presença da volta B.

Desta maneira, as proteínas apresentam diversidade estrutural e de distribuição superficial de cargas o que favorece processos de adesão em substratos sólidos. Os processos de adesão envolvem tanto cinética de ligação quanto rearranjos estruturais de proteínas. Atualmente, vários estudos procuram medir, prever, controlar e entender a conformação de proteínas, superestrutura e os detalhes cinéticos das interações destas biomoléculas com a superfície [1, 2, 3, 4].

2.2. Formação de filmes finos protéicos sobre substratos sólidos – Adsorção de proteínas

Adesão de proteínas em superfícies é realmente um fenômeno comum, em qualquer interface sólida que as proteínas entrem em contato muito provavelmente estas aderirão. O estudo da adsorção de proteína tem como objetivo primário entender o comportamento destas biomoléculas depositadas na superfície. Assim, os dados experimentais contem tipicamente informações macroscópicas resultante do comportamento individual de uma ou várias proteínas. Neste ponto o desenvolvimento de modelos que descrevam matematicamente um dado experimental pode desvendar ou confirmar detalhes do processo de adsorção. Entretanto, modelos são restritos aos limites experimentais nos quais suas hipóteses podem ser testadas e a generalização para outros sistemas deve ser feitas com cautela.

Muitas substâncias adquirem uma superfície carregada eletricamente quando colocadas em contato com um meio aquoso [8, 9, 21, 22]. A estabilidade da dispersão coloidal é sensível a adição de eletrólitos e a superfície carregada das partículas coloidais. As superfícies podem ficar carregadas eletricamente por meio de vários mecanismos, tais como [9]:

- 1) Ionização de grupos de superfície. Dissociação de grupos ácidos e básicos de óxidos resultando em cargas negativas e positivas, respectivamente;
- 2) Dissolução diferencial dos íons de superfície de cristais moderadamente solúveis. Por exemplo, dissolução preferencial de íons de Ag em relação a halogenetos de prata;
- 3) Substituição isomórfica. Argilas podem trocar íons adsorvidos ou estruturais com um de menor valência, produzindo uma superfície negativamente carregada;
- 4) Superfícies de cristais carregados. Pode acontecer quando um cristal é quebrado e superfícies com diferentes propriedades são expostas;
- 5) Adsorção específica de íons. Adesão específica de íons de surfactantes.

A presença da eletroneutralidade é intuitiva, pois não há distribuição espacial preferencial dos íons na solução. O movimento Browniano é suficiente para criar uma homogeneidade na distribuição dos íons na solução [9].

Entretanto, quando a superfície é colocada em contato com o líquido que possui propriedades polares e na ausência de reações químicas, uma superfície carregada se formará [8, 9, 21]. Este aparecimento do potencial eletrostático pode ocorrer devido a diferentes mecanismos químicos, como a ionização dos grupos da superfície e a adsorção de íons específicos, por exemplo [9].

Esta superfície carregada afeta os íons na solução. Os íons de cargas opostas a da superfície serão atraídos, enquanto que os de mesma carga serão repelidos. Este fenômeno ocorre para a neutralização da superfície carregada. A região próxima a superfície sólida na qual há a redistribuição de íons livres na solução devido aos íons na superfície dá origem a chamada dupla camada elétrica (DCE) [9, 23, 24, 25]. A Figura 2.5 apresenta um esquema da DCE.

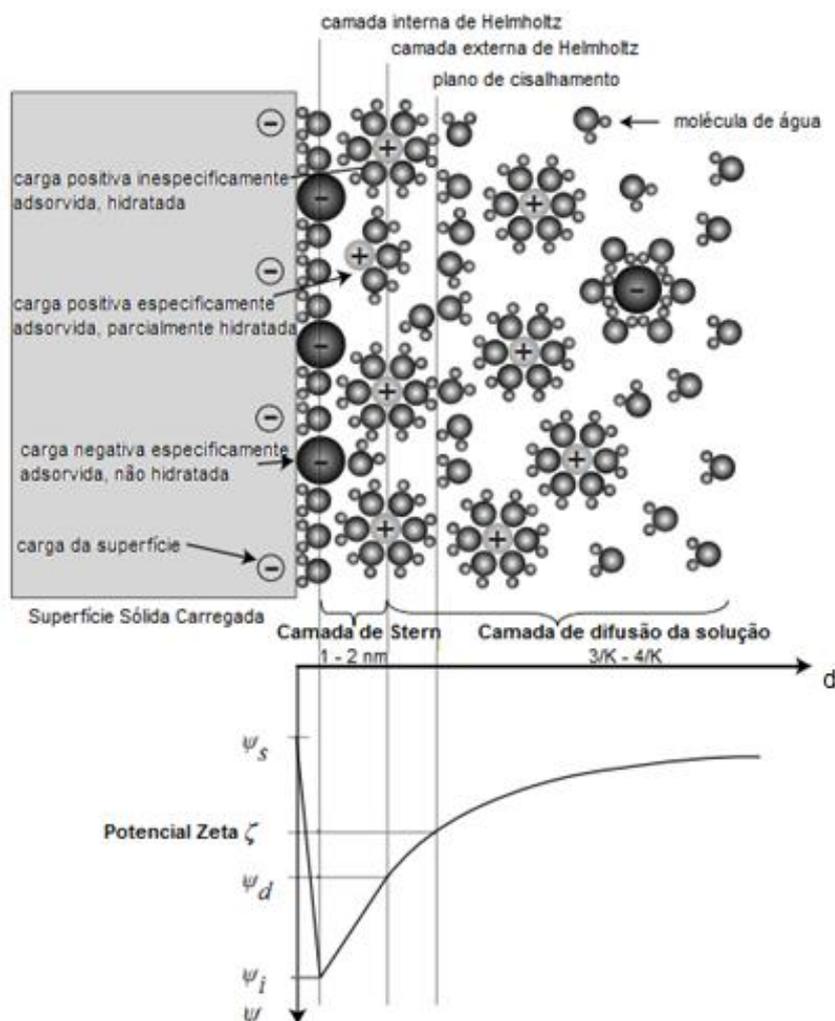


Figura 2.5: Desenho esquemático da dupla camada elétrica formada na interface da superfície carregada em contato com um líquido iônico e a correspondente distribuição do potencial elétrico ψ vs a distância d da parede. ψ_s representa o potencial negativo da superfície, ψ_i corresponde à camada interna composta por co- e contraíons e ψ_d referente à camada externa composta somente por contraíons hidratados. A distância característica da camada de difusão é dada pelo comprimento de Debye ($1/\kappa$) [Adaptado de 25].

Como representado na Figura 2.5, a carga da superfície é balanceada pelo acúmulo de um número igual de cargas opostas que podem estar tanto ligadas fisicamente à superfície e imóveis para formar a chamada camada de Stern (camada interna) como podem estar presentes na

atmosfera difusa acima da superfície, com os íons em rápidos movimentos para dentro e fora da camada de Stern, conhecida como camada de difusão [9, 21,23].

Os íons da camada de difusão podem mover-se para dentro e fora da dupla camada elétrica para a solução. A camada difusa expande-se a uma distância na ordem do comprimento de Debye ($1/\kappa$), que depende somente das propriedades da solução eletrolítica e não das características da superfície carregada [26]

$$\kappa = \left(\sum_i \frac{c_{\infty i} e^2 z_i^2}{\epsilon_m \epsilon_0 K T} \right)^{1/2} \quad (2.1)$$

em que $c_{\infty i}$ é a concentração de íons na solução, e e é a carga do elétron, z é a valência do íon, ϵ_0 e ϵ_m são a permissividade dielétrica do vácuo e do meio, respectivamente, K é a constante de Boltzmann e T a temperatura do sistema. O potencial através da camada difusa decresce exponencialmente.

Desta forma, a capacidade de um íon em determinar a espessura da dupla camada elétrica depende, principalmente, de sua valência e de seu tamanho (que influencia em sua polarizabilidade e facilidade em ser hidratado).

Há um equilíbrio da distribuição iônica com a camada difusa, permitindo o uso da distribuição de Boltzmann para relacionar a concentração iônica com o potencial eletrostático [9]. A importância do potencial eletrostático ao alcance da DCE vem da força de corpo, que nesta escala não pode ser negligenciado. Para achar a força de corpo efetiva exercida pela DCE, a distribuição dos íons na região da dupla camada deve ser encontrada [21]. Sabendo-se que a distribuição iônica de uma certa espécie segue a distribuição de Boltzmann e é dada por [9, 21]:

$$c_i = c_{i\infty} \exp\left(-\frac{z_i e \psi}{K T}\right) \quad (2.2)$$

em que c_i é a concentração iônica das espécies i , $c_{i\infty}$ é a concentração iônica no estado neutro ($\psi = 0$), z_i é a valência dos íons, e é a carga do elétron, ψ é o potencial eletrostático da distribuição da parede, K é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

A densidade de carga iônica ρ_i afetada somente pelas cargas da parede é dada por [9, 21]:

$$\rho_i = -2 \cdot e \cdot z_i c_{i\infty} \cdot \sinh\left(\frac{z_i e \psi}{K T}\right) \quad (2.3)$$

A distribuição do potencial eletrostático da DCE pode ser achada através da relação de Poisson

$$\frac{d^2 \psi}{dy^2} = -\frac{\rho_i}{\epsilon_m} \quad (2.4)$$

substituindo a eq. (2.3) na (2.4) e para uma fina DCE o termo hiperbólico fica reduzido ao primeiro termo da expansão de Taylor (aproximação de Debye-Hückel), então temos que [9, 21]

$$\frac{d^2\psi}{dy^2} = k \cdot \psi \quad (2.5).$$

Uma propriedade importante da DCE é o potencial eletrostático no plano de cisalhamento imaginário, chamado de potencial zeta, denotado por ζ . Este corresponde ao plano que separa as parcelas de fluido que se movem em direções opostas em fenômenos físicos da camada fixa (camada de Stern) [8, 25].

Uma interface formada entre duas fases distintas, geralmente, possuem uma energia de superfície maior que a fase da solução. Como resultado, esta interface é apta para ser termodinamicamente estabilizada adsorvendo qualquer substância que difira das moléculas do solvente.

Como as proteínas são, geralmente, moléculas carregadas em soluções aquosas, a presença destas duplas camadas elétricas com seus campos elétricos associados influenciará na interação com o substrato [23].

As condições nas quais os experimentos de adsorção são realizados possuem uma influência decisiva no comportamento e arranjo final da proteína aderida.

A construção da interface substrato-proteína deve respeitar as exigências: a imobilização na superfície da proteína com estrutura tridimensional estável e preparo da amostra mantendo o ambiente apropriado para evitar ou minimizar mudanças conformacionais [27, 28].

Sendo assim, fatores como propriedades das proteínas, as características da superfície do substrato, a preparação da solução de proteína (e.g. concentração de moléculas, pH, concentração iônica, surfactantes), método de deposição da solução, condições ambientes, tais como temperatura e umidade e os limites de medida do meio de análise do filme obtido devem ser levados em consideração no preparo de um filme protéico.

Parâmetros externos como temperatura, pH, concentração iônica e composição do tampão determinam o estado de equilíbrio e a cinética de adsorção das proteínas através do controle de cargas na solução que podem modificar o estado de equilíbrio estrutural da proteína [29, 30, 31]. A estabilidade da dispersão coloidal é sensível à adição de eletrólitos e a carga de superfície das partículas dispersas.

Com relação às propriedades das proteínas, a carga, dimensões, estabilidade da estrutura, composição de aminoácidos e conformação são fatores que podem afetar a quantidade adsorvida [30, 31]. A estabilidade estrutural da proteína é de particular importância devido à possibilidade de

existir um ou mais estados de adsorção, diferindo em energia de adsorção. A complexa estrutura pode ser decomposta em domínios individuais exibindo propriedades específicas como carregado/não carregado ou polar/não polar [30].

Interações proteína/superfície são influenciadas pelas propriedades da biomolécula e da superfície do substrato. Características da superfície incluindo a energia de superfície, polaridade, carga e morfologia devem ser levadas em consideração [29, 30]. A escolha do substrato é determinada pelo contexto do projeto científico e pela técnica experimental utilizada, tais como a transparência ótica, condutividade elétrica ou planicidade da superfície. Comumente é utilizada a modificação química do substrato para ampliar seu uso em determinadas técnicas [29, 30].

Apesar da espessura da camada adsorvida ser geralmente considerada igual a uma monocamada, o detalhe morfológico das estruturas formadas depende do método de deposição. Os métodos de deposição variam em tempo de incubação, tempo de evaporação do solvente e difusão molecular que podem induzir modificações no filme [29].

A chegada da proteína na interface é direcionada por difusão, interações hidrofóbicas eletrostáticas, ganho de entropia das moléculas do solvente ou pela modificação da concentração de íons na solução [28, 30]. Em contato com a superfície do sólido os componentes da solução de proteína, na ausência de reações químicas, formarão uma superfície carregada e estática resultante de diferentes mecanismos químicos, tais como ionização de grupos de superfície, adsorção de íons específicos na superfície e do movimento aleatório das moléculas [23].

O modo mais simples de fixar uma proteína na superfície é através da adsorção, em que forças atrativas fixam as moléculas na superfície [32]. Pode existir uma grande variedade de forças físicas atuantes na interface proteína-substrato durante a adsorção, tais como forças eletrostáticas, forças capilares, interações hidrofóbicas ou polares, forças de van der Waals, forças Coulombianas, forças ácido-base de Lewis, entropia conformacional e hidratação [2, 32, 33].

Na adsorção, geralmente, há falta de especificidade, estequiometria e força direcional das ligações covalentes [33]. Pensando desta maneira, os átomos continuam com suas distribuições de cargas inalteradas, apenas com uma perturbação, e mesmo assim são fortes o suficiente para manter arranjos atômicos e moleculares estáveis em sólidos e líquidos em temperatura ambiente [33].

Proteínas são moléculas complexas e assimétricas, não se comportam como partículas rígidas simétricas que adsorvem/desorvem da interface. Quando a forma da proteína é estimada retangular com dimensões moleculares de $a \times b \times c$, geralmente são considerados dois tipos de configuração para a molécula adsorvida, i. e., uma através do eixo longo (união final com final) e outra pelo eixo menor (união lado-a-lado) perpendicular a superfície (Figura 2.6).

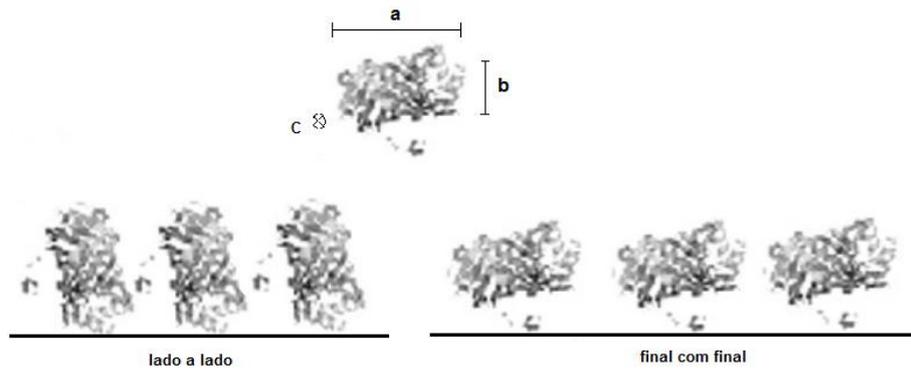


Figura 2.6: Diagrama das possíveis orientações de adsorção para uma proteína retangular de dimensões $a \times b \times c$ em relação às demais proteínas.

Proteínas podem adsorver em duas ou mais orientações distintas. Uma simplificação e uma revisão esquemática de alguns modelos cinéticos mais importantes desenvolvidos esta presente na figura 2.7.

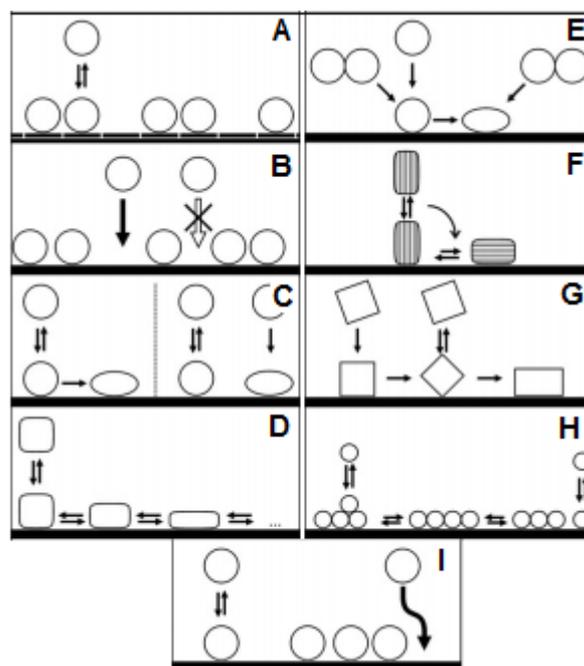


Figura 2.7: Resumo dos modelos cinéticos de adsorção. Um desenho esquemático de cada mecanismo de adsorção [Adaptado de 30].

O modelo mais simples de adsorção é o de Langmuir que leva em consideração a adsorção e desorção de partículas em sítios distintos da superfície (Fig. 2.7-A) [34, 35]. Uma das maiores desvantagens do modelo de Langmuir foi sanada pelo desenvolvimento do modelo de adsorção randômica sequencial (*random sequential adsorption*, RSA) que leva em consideração a adsorção das proteínas da solução em sítios de ligação aleatórios com proibição de um número de sítios por ocupação ou por restrição da vizinhança (Fig. 2.7-B) [36, 37].

McGuire et. al 1995 [38] propuseram um modelo de dois estados no qual as proteínas poderiam adsorver em um estado reversível ou irreversível na superfície, chamado de modelo de transição (Fig. 2.7-C). Dois mecanismos de adsorção são concebíveis: um em que todas as proteínas devem inicialmente adsorver em um estado reversível e pode subsequentemente mudar para um estado irreversível. O outro é uma adsorção paralela das proteínas em ambos os estados.

Uma extensão do modelo de transição foi proposta por Szöllösi et al. 2004 [39] pela introdução de um número indefinido de diferentes estados que a proteína pode adsorver, aumentando a afinidade com a superfície (Fig. 2.7-D). A transição de estados entre moléculas vizinhas na superfície é permitida, superando a limitação que somente duas conformações distintas de proteína são possíveis.

O modelo desenvolvido Wahlgren e Elofsson implementa explicitamente a interação lateral entre as proteínas adsorvidas (Fig. 2.7-E) [40]. O modelo inclui a adsorção de dois tipos de monômeros com diferentes resistências de desorção e a adsorção de dímeros que podem deslocar monômeros pré-adsorvidos na superfície. A transição dos monômeros da solução e aderidos são linearmente dependentes da concentração de dímeros presentes no substrato.

Wertz e Santore apresentaram dois modelos simples denominados de modelo de deslocamento e rolamento (*displacement and rollover model*) que pode explicar tanto o efeito de saturação que frequentemente ocorre na cinética de adsorção de proteínas (Fig. 2.7-F) [34]. O modelo de deslocamento é a princípio análogo ao efeito Vroman (relacionado com o tamanho das proteínas, as de menor peso molecular e de menor superfície ativa adsorvem antes), exceto que só há uma espécie de proteína. Esta proteína é adsorvida rápida e fracamente à superfície na união final com final e, lentamente vai sendo adsorvida mais fortemente com a lateral. Como consequência, no estado de não equilíbrio (inicial), a superfície esta revestida com proteínas unidas pelas extremidades. A longo prazo, as proteínas unidas lado-a-lado serão predominantes na superfície, conforme a sua afinidade com a superfície aumenta e sua taxa de desorção diminui.

Em contraste com o modelo de deslocamento, o modelo de rolamento permite a transição de proteínas adsorvidas unidas pelas extremidades para aquelas unidas lado-a-lado, sendo que a adsorção direta pela lateral não é possível [34].

Um modelo que implementa elementos de praticamente todos os modelos acima foi desenvolvido por Rabe et al. 2007 [41]. O modelo contém 3 tipos diferentes de estados adsorvidos, um estado inicial irreversível, um estado intermediária reversível e um final irreversível (Fig. 2.7-G). Inicialmente, enquanto a superfície esta vazia ou parcialmente coberta, as proteínas na solução adsorvem na superfície exclusivamente pelo estado irreversível. A transição entre o estado inicial e intermediário é um resultado da união lado-a-lado entre as proteínas e acontece quando um revestimento crítico da superfície é atingido. Proteínas no estado intermediário passam por mais

uma transição até o estado final. Esta transição é muito mais lenta e envolve algum rearranjo conformacional. O revestimento dependente das primeiras transições implica que um grande número de proteínas adsorvidas abruptamente muda sua afinidade com a superfície de irreversível para reversível.

O modelo proposto por Minton descreve o crescimento dos agregados bidimensionais de proteína na superfície (Fig. 2.7-H) [42]. Neste modelo cada ligação de i-mero ($i = \text{mono, dí, tri, etc}$) com a superfície tem a tendência específica de atrair mais proteínas, aumentando os agregados. As proteínas são adsorvidas como espécies individuais na superfície, as quais podem difundir e unir-se a agregados pré-existentes ou podem se depositar diretamente na borda do agregado bidimensional.

Mais tarde, Rabe et al. 2008 [43] usaram as ideais chaves de Minton em um novo e simplificado modelo de rastreamento (Fig. 2.7-I). Foi sugerido que a aproximação das proteínas da solução são atraídas verticalmente para a superfície devido à sobreposição das forças eletrostáticas das proteínas pré-adsorvidas na superfície. Na direção lateral para a superfície, entretanto, a distribuição das cargas das proteínas pré-adsorvidas e das proteínas que estão sendo adsorvidas leva a uma repulsão. A soma de todas as interações eletrostáticas leva a uma adsorção guiada pelas outras moléculas já adsorvidas. Este mecanismo necessariamente leva a uma formação de áreas que contém uma maior e menor densidade de moléculas.

A adsorção de proteínas em superfícies hidrofílicas neutras (Figura 2.8) tende a ser relativamente fraca, enquanto que adsorção de proteínas em superfícies hidrofóbicas é forte e parcialmente irreversível [44]. Adsorção em superfícies carregadas depende da carga da proteína, o pH e a concentração iônica da solução [44].

Assim, em interfaces hidrofílicas as proteínas expõem predominantemente os domínios que são ricos em resíduos hidrofílicos na direção da superfície. Na presença de superfícies hidrofóbicas as proteínas direcionam os domínios hidrofóbicos para o sólido (Fig. 2.8). Analogamente, as proteínas aderem a interfaces carregadas positiva ou negativamente expondo a região carregada com carga oposta (Fig. 2.8).

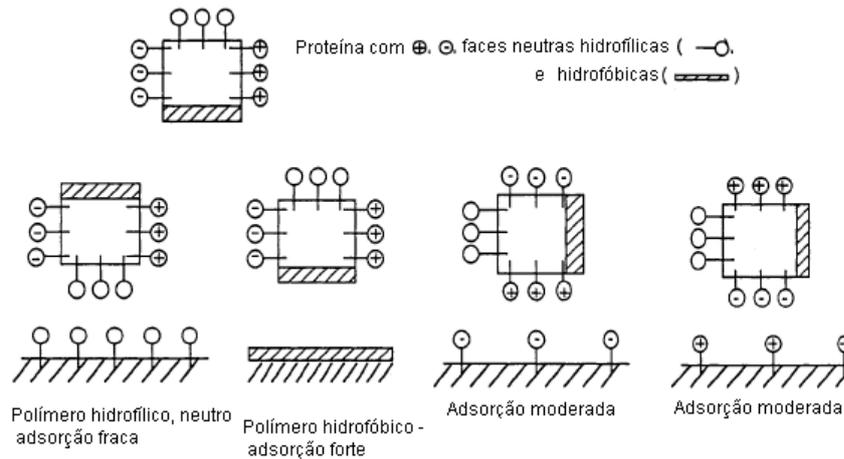


Figura 2.8: Desenho esquemático de uma “proteína” com quatro lados interagindo com substratos de superfícies compatíveis. Uma face da “proteína” é hidrofóbica, outra carregada negativamente, outra carregada positivamente, outra de caráter hidrofílico neutro [44].

Interações eletrostáticas são importantes quando superfícies são carregadas em soluções aquosas, já que as moléculas de proteína também são carregadas dependendo do pH e concentração iônica da solução. Proteínas consideradas estáveis dificilmente são adsorvidas por eletrostática na superfície quando as biomoléculas e a superfície possuem cargas opostas [31].

Proteínas com baixa estabilidade estrutural são adsorvidas na superfície alterando sua estrutura para adaptarem-se à superfície. Entretanto, proteínas estáveis são adsorvidas em superfícies de cargas opostas sem mudança conformacional aparente, a não ser na presença de fortes interações hidrofóbicas [30, 31, 44]. Desta forma, a região da proteína que interage diretamente com o sólido também é determinante no processo de adsorção.

Interações hidrofóbicas foram reportadas desempenhando papéis importantes na adsorção. Krisdhasima et al. 1993 [45] estudaram a adsorção de β -Lactoglobulina (β -Lg) sobre superfícies de silício quimicamente modificados e acharam que o aumento da hidrofobicidade da superfície induz um aumento de β -Lg aderido.

Buijs e Hlady 1997 [46] estudaram a adsorção do hormônio de crescimento humano recombinante e a lisozima em superfícies de sílica intacta e modificada com diferentes grupos químicos. Os autores concluíram que interações hidrofóbicas contribuem significativamente para fortes interações proteína/substrato e são acompanhadas por uma conformação de proteína menos compacta.

Filmes finos de proteína GlnB-Hs formados sobre silício (1 1 1) e (1 0 0) hidrofílicos e hidrofóbicos foram investigados por MFA e XPS [47]. Os resultados mostraram que esta proteína se auto-organiza na forma de anéis no silício hidrofílico e na forma de filamentos na superfície do Si hidrofóbico.

Quando a superfície é hidrofóbica, 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 [48]. Apesar de ser 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 [32].

2.3. Efeito do campo elétrico na adsorção de proteína

Na ausência de um campo elétrico externo as partículas da solução estão em um movimento aleatório e rotacional dentro da solução portadora. Se a solução composta por moléculas e íons é exposta a um campo elétrico, este induzirá perturbações na distribuição espacial das cargas livres e suas mobilidades, movimentação e orientação de moléculas, velocidade do solvente e do potencial induzido [9, 49].

O vetor campo elétrico (E) será uniforme e estará bem definido se o campo de força originado tiver em todos os pontos o mesmo valor em módulo, tiver mesma direção e sentido, resultando em linhas de força paralelas e equidistantes [50].

Quando a solução esta sob efeito de um campo elétrico externo, forças eletrocinéticas e campos locais não uniformes agem no fluido, nas partículas suspensas da dupla camada elétrica causando seus movimentos [9, 51]. Assim, como a camada interna da DCE tende a se mover em uma determinada direção, os íons livres na camada difusa migrarão com uma velocidade não uniforme na direção oposta, carregando o solvente juntamente com eles, desta forma causando o movimento do solvente [9, 51, 52].

O potencial elétrico do plano de cisalhamento que separa o fluido em movimento do fluido que permanece imóvel na superfície do sólido é chamado de potencial zeta, ζ [8, 9, 25, 52].

A magnitude do potencial zeta esta relacionada com a estabilidade de uma dispersão coloidal. O potencial zeta indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes e similares na dispersão [9]. Se todas as partículas na suspensão possuírem um alto potencial zeta (tanto negativo quanto positivo), estas tendem a se repelir, conferindo estabilidade, i.e., a solução ou dispersão não agregará. Entretanto, quando o valor do ζ é baixo, forças de atração superam as de repulsão e a dispersão tende a coagular ou flocular.

Uma vez que o potencial zeta, ao contrário de ser controlado diretamente pelo campo aplicado, é o resultado de uma química complexa e distribuição de íons na interface substrato/solução, torna-se difícil prever seu valor. Outro aspecto relevante é que se pode definir o potencial zeta da partícula isolada e sua vizinhança, como será abordado posteriormente.

A medição do valor de ζ (tipicamente de 1-100 mV em módulo) não é direta e pode ser difícil de determinar, uma vez que depende do potencial iônico da solução, do pH, concentração das partículas e condutividade do meio [22, 24, 53]. O efeito da concentração dos contraíons sobre o potencial zeta surge devido à mudança no equilíbrio da densidade de cargas líquidas na camada de Stern que deve ser balanceado pela camada difusa e pela mudança na espessura da DCE, pois o total de carga na camada difusa deve ser de sinal oposto e igual em magnitude às cargas na superfície sólida [22].

O pH afeta o equilíbrio de protonado/desprotonado na superfície e a densidade de carga, enquanto que a concentração de contraíons altera o grau no qual a superfície carregada é blindada e o ζ efetivo observado no escoamento [22].

A dependência do potencial zeta com a temperatura deriva de mudanças no equilíbrio de cargas e adsorção de íons e da espessura da camada de difusão da DCE [22]. A temperatura nos canais pode variar, aumentando na direção do eletrodo de saída [22]. A valência e o tamanho dos contraíons influenciam o potencial zeta através do equilíbrio de adesão na superfície, alterando a localização exata do plano de cisalhamento e a espessura da camada de difusão da DCE [22]. O efeito mais prático disto está na compressão da camada de difusão na presença de contraíons de valência mais alta.

O potencial zeta pode ser calculado usando-se medidas eletrocinéticas [8, 9, 21, 52].

Devido à geometria, a grande razão entre a área superficial-volume do sistema analisado (aplicação de campo elétrico em um pequeno volume de solução de proteína), diferentes fenômenos terão efeitos consideráveis no fluido, tais como forças eletrostáticas e a viscosidade se comparados com fatores como forças gravitacionais e o momentum convectivo.

As equações que governam o escoamento do líquido englobam o fenômeno de transporte de massa, momentum linear e aquecimento. Embora o cálculo do escoamento do líquido não seja tratado explicitamente nesta tese devido à dificuldade na determinação de parâmetros essenciais, descrevem-se as equações gerais com o objetivo de deixar documentado para um eventual procedimento de cálculo.

A conservação da massa para uma única espécie em um escoamento é dada pela equação [54]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot (\nabla c_i) = D_i \nabla^2 c_i - \frac{D_i z_i e}{KT} \nabla \cdot (c_i \mathbf{E}) + R_i \quad (2.6)$$

em que c_i é a concentração molar da espécie i , D_i é o coeficiente de difusão da espécie i , z_i é a valência da espécie, e é a carga do elétron e R_i é a razão de geração da espécie i .

As leis básicas que governam o momentum de transporte na eletrodinâmica são dadas pela equação de Navier-Stokes com o força de corpo $\rho_{el}\mathbf{E}$ [21, 54]. O momentum geral é governado por [54]:

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} \right] = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{u} + \rho_{el} \mathbf{E} \quad (2.7)$$

em que ρ é a densidade da solução, η viscosidade da solução, ∇p é o gradiente de pressão e $\rho_{el} = \epsilon_m \kappa \zeta$.

A equação (2.7) é diferencial, sua solução permite determinar os gradientes de velocidade e de pressão de um escoamento. Esta equação estabelece que mudanças no momento e aceleração de um fluido são o resultado das mudanças de pressão, da força elétrica e forças viscosas dissipativas (fricção).

Os termos à direita da equação (2.7) representam o gradiente de pressão, a viscosidade e forças eletrosmóticas, respectivamente. O primeiro termo da esquerda representa a aceleração do fluido e o segundo as forças convectivas. Assim, somente casos que envolvam fluxo não turbulento, no qual a viscosidade do fluido é grande ou sua velocidade pequena, podem ser resolvidos. Em outras palavras, qualquer escoamento convectivo envolverá não linearidade. A não linearidade torna o problema de difícil ou de impossível solução e é o principal contribuinte para o regime do fluido ser caótico (turbulento).

Se o escoamento do fluido for dominado pela viscosidade, o termo não linear $\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u}$ pode ser negligenciado [21, 54]. Assim, a equação poderá ser escrita na forma adimensional e de mais fácil resolução, pois leva a aproximação de Stokes para a conservação de momentum [21].

A maneira de verificar o regime de escoamento de um determinado fluido sobre uma superfície é através do número de Reynolds.

O número de Reynolds (Re) é adimensional e fornece a razão entre as forças inerciais (arraste) e as forças da viscosidade e, conseqüentemente, quantifica a relação entre os dois tipos de força para uma dada condição de escoamento [54]

$$Re \equiv \frac{\rho u_0 L_0}{\eta} \quad (2.8)$$

em que, L_0 é o comprimento característico, u_0 é a velocidade média da partícula no fluido. Se $Re \ll 1$ o termo da viscosidade $\nabla^2 \mathbf{u}$ domina, mas se $Re \gg 1$ o termo da inércia $(\mathbf{u}\nabla)\mathbf{u}$ será o mais importante [54].

Os altos campos elétricos utilizados para manipular micro/nanopartículas acarretam em uma grande densidade de energia gerada no fluido próximo ao eletrodo. A geração desta grande quantidade de energia em um pequeno volume pode dar origem a um aumento de temperatura na amostra. Para estimar este aumento de temperatura a equação de conservação de energia deve ser levada em consideração.

A equação da conservação de energia, dada pelo estado termodinâmico de um dado volume em um microcanal, é governado pelo balanço de energia [54]:

$$\rho c_p \left[\frac{\partial T}{\partial t} - \mathbf{u}\nabla T \right] = \nabla(k(T)\nabla T) + \sigma_f(T)\mathbf{E} \cdot \mathbf{E} \quad (2.9)$$

em que c_p é o calor específico da solução, T é a temperatura absoluta do campo, $\sigma_f(T)$ é a condutividade da solução em função da temperatura e \mathbf{E} é o campo elétrico aplicado. Devido à escala da geometria do sistema, a razão entre o volume e a superfície é grande e o calor dissipado é alto.

Um fenômeno importante que tem efeito crucial na estabilidade do fluxo é o efeito Joule. Este fenômeno acontece uma vez que a solução que esta escoando tem uma condutividade que irá originar uma contra corrente elétrica. Devido à presença de ambas as correntes e da tensão aplicada ocorrerá aquecimento interno que pode causar alterações nas propriedades da solução.

O escoamento da fase líquida sobre uma superfície sólida pode ser descrito pelas equações da hidrodinâmica. As equações regentes para a hidrodinâmica em geral e em particular para a microfluídica são derivadas de equações fundamentais que descrevem a taxas de variação das densidades de fluxo de massa, momentum e energia [54]. Se o escoamento do líquido ou soluto for controlado eletricamente, então é relevante estudar a eletrodinâmica, i.e., acoplando o eletromagnetismo e hidrodinâmica.

Fenômenos eletrohidrodinâmico estão relacionados à parte móvel da dupla camada elétrica [8]. Logo, os mesmos só podem ser interpretados em termos do potencial zeta e/ou da densidade da carga no plano de cisalhamento da dupla camada elétrica. Existem quatro fenômenos eletrocinéticos principais, quando há o movimento relativo entre a superfície sólida eletricamente carregada e a parte difusa da dupla camada elétrica [52]:

(i) eletroforese – partículas carregadas se movimentam em um líquido estacionário devido à aplicação de um campo elétrico externo;

- (ii) eletroosmose – líquido que se movimenta em relação às partículas carregadas estacionárias pela aplicação de um campo elétrico externo;
- (iii) potencial de escoamento – é o campo elétrico gerado quando um líquido flui sobre uma superfície estacionária carregada eletricamente;
- (iv) potencial de sedimentação – campo elétrico gerado quando partículas carregadas se movimentam em relação a um líquido estacionário.

2.3.1. Fluxo eletroosmótico

Fluxo eletroosmótico representa o movimento de escoamento da solução ao longo de uma seção da dupla camada elétrica sob a influência de uma componente tangencial do campo elétrico externo E (Figura 2.9-A) [21, 51].

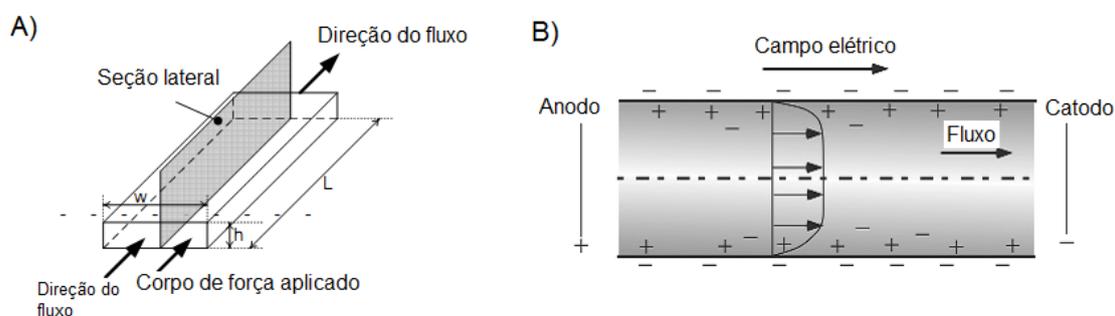


Figura 2.9: Esquema do fluxo eletroosmótico. A) Dimensões de um microcanal, W é a largura, h a altura e L o comprimento e a direção do fluxo e B) Desenho esquemático do fluxo osmótico em um tubo capilar de superfície negativa [Adaptado de 9].

O escoamento é originado pela força de corpo externa devido ao campo elétrico que afeta os íons livres da DCE, causando a migração destes em uma dada direção. O movimento dos íons pode ser afetado pela carga do substrato sólido e a direção do campo elétrico. A migração das partículas próximas a DCE movimentarão o soluto na região próxima com mesma velocidade devido aos efeitos

da viscosidade [55]. A Figura 2.9-B representa um esquema do fluxo eletroosmótico para uma superfície negativamente carregada sob a influência de um campo elétrico externo.

A velocidade de um fluido é zero na superfície do substrato e aumenta a um valor máximo no plano de cisalhamento, resultando em uma velocidade constante através da fase líquida da solução [51, 55].

A velocidade de fluxo por eletroosmose (FEO), u_{FEO} , é obtido pelo equilíbrio entre a força elétrica externa agindo no líquido e a força friccional (equação de Helmholtz-Smoluchowski) [8, 9, 56]

$$u_{FEO} = - (\epsilon_m \zeta E) / \eta_d \quad (2.10)$$

em que ϵ_m é a permissividade dielétrica do meio, η_d é a viscosidade dinâmica da solução, E é a intensidade do campo elétrico e ζ é o potencial de cisalhamento do plano.

Há duas dificuldades em medir-se o ζ através da eq. (2.10): 1) o uso da equação requer que a espessura da DCE seja muito pequena ($k < 0,01$) e 2) hidrólise ou outras reações eletrolíticas têm o mesmo efeito de aumentar $[H^+]$ no anodo e $[OH^-]$ no catodo, então o pH e/ou a condutividade podem ser alteradas significativamente durante o experimento [8].

Durante o fluxo eletroosmótico aparecerá uma densidade de corrente elétrica (I_{total}) devido ao fluxo de íons. Admitindo que o material do microcanal seja totalmente isolante e que nenhuma corrente é criada na camada de Stern da DCE, a corrente terá três componentes [9, 21]. A corrente originada da condutividade da solução tampão (I_{cond} da solução), a corrente da convecção dos íons na dupla camada elétrica (I_{conv} dos íons) e a corrente de difusão dos íons ($I_{difusão}$ dos íons). A corrente de difusão dos íons é muito pequena comparada com os outros dois termos, assim sendo negligenciada.

A equação abaixo é da densidade de corrente total [21, 52]

$$I_{total} = I_{cond} \text{ da solução} + I_{conv} \text{ dos íons} = \sigma_m \cdot A \cdot E + \lambda_s \cdot P_e \cdot E \quad (2.11)$$

em que σ_m é a condutividade do meio, A é a área da seção transversal do microcanal, λ_s é a condutância da superfície, P_e é o perímetro e E (V/m) é o campo elétrico aplicado. Como a condutividade da solução pode ser medida a condutância de superfície pode ser determinada rearranjando a equação (2.11) em

$$\lambda_s = \frac{I_{medido}}{P_e \cdot E} - \frac{\sigma_m \cdot A}{P_e} \quad (2.12)$$

sendo que I_{medido} é a corrente estável medida durante o fluxo eletrosmótico em um microcanal. Na maioria das vezes, a corrente de convecção dos íons é pequena comparada com a da condutividade da solução.

2.3.1.1. Escoamentos eletrosmóticos em superfícies livres

A interface entre um gás e um líquido é normalmente chamada de superfície livre. Há grandes diferenças entre a densidade de um gás e de um líquido na interface. A única influência do gás é a pressão exercida na superfície do líquido e a superfície gás-líquido não é confinada, mas sim livre.

Há três características essenciais necessárias para descrever apropriadamente uma superfície livre [57, 58]: 1) um esquema é necessário para descrever a forma e localização da interface gás-líquido, 2) um algoritmo é preciso para desenvolver a forma e a localização com o tempo e 3) as condições de contorno da superfície livre devem ser aplicadas a superfície.

O escoamento de um eletrólito sobre uma superfície rígida carregada desenvolve potenciais zetas entre o eletrólito e a superfície ($\zeta_{\text{superfície}}$) e na interface eletrólito-ar ($\zeta_{\text{superfície livre}}$).

A superfície livre pode participar ativamente do mecanismo de direção do escoamento [59]. Dependendo do potencial zeta na interface ou da carga da superfície, a interface reage eletrostaticamente ao campo elétrico e pode arrastar o fluido para o eletrodo de polaridade oposta.

A tensão total no líquido é composta por contribuições hidrodinâmicas e eletrostáticas (tensão de Maxwell), assim a conservação do momento pode ser expressa por [59]

$$\frac{d\mathbf{u}}{dt} = -\nabla p + \nabla^2 \mathbf{u} + \frac{E_0}{E_r} \nabla^2 \psi \nabla \psi \quad (2.13)$$

em que p é pressão, \mathbf{u} é a velocidade, ψ é o potencial elétrico, $E_0 = (\epsilon_m \epsilon_{el} W \zeta_{\text{superfície}}) / \rho u^2$ é a força eletrosmótica, sendo que ρ é a densidade, u é a viscosidade cinemática e W largura média do canal e $E_r = \zeta_{\text{superfície}} / (E_{el} W)$ é o potencial zeta da interface líquido-sólido.

O potencial elétrico tem contribuições do campo elétrico externo aplicado e do potencial zeta. Para casos em que a camada de Debye é muito menor que o comprimento do microcanal, a equação (2.13) com a aproximação de Debye-Hückel, $\nabla^2 \psi = \psi / De$, expressa a distribuição de íons na DCE, em que $De = k/d$ [59], sendo De o coeficiente de difusão, k a constante dielétrica e d a distância da parede do canal.

A velocidade $u(y)$ para um fluxo eletroosmótico estável com superfície livre não perturbada é dada por [59]

$$u = E_0 \left[\cosh \frac{y}{De} + \frac{(Z_r - \cosh(\frac{1}{De}))}{\sinh(\frac{1}{De})} \sinh(\frac{y}{De}) - 1 \right] \quad (2.14).$$

A equação mostra a dependência linear do valor da força eletroosmótica E_0 e o potencial zeta da superfície livre Z_r , $Z_r = \zeta_{\text{superfície livre}} / \zeta_{\text{superfície}}$.

Para as condições de contorno da superfície livre, em caso simples, de tensão zero de cisalhamento ($u_y = 0$ para $y = 1$) temos que $u(1) = -E_0(1-Z_r)$. Através de simulações, Ray et. al. 2011 [59] mostram a influência do potencial zeta da superfície livre na velocidade do líquido. Para Z_r igual a zero, u aumenta de zero na superfície rígida com alto gradiente na DCE para formar um fluxo na superfície. Para $Z_r = 1$ a velocidade é a mesma para as condições de ambas superfícies serem rígidas. Se $Z_r < 0$ atração eletrostática da superfície livre gera um fluxo adicional e $Z_r > 0$ o fluxo é reduzido pela superfície livre devido a atração na direção oposta. Para casos em que $Z_r \gg 0$ o fluxo é reverso na superfície livre.

2.3.1.2. Técnica de monitoramento de corrente

Monitoramento de corrente é um método popular de medição da velocidade média do fluxo eletroosmótico (EOF) em uma interface sólida-líquida, determinando-se a variação na corrente elétrica para um processo de substituição de solução [8].

A técnica é útil porque a medida é relativamente simples, barata, precisando somente de uma fonte de tensão e um amperímetro e os resultados são lidos imediatamente.

O monitoramento da corrente é realizado pela conexão de dois reservatórios através de um microcanal. Os dois reservatórios possuem fluidos com uma diferença de 5 % de concentração, e, conseqüentemente, de condutividade [8].

É importante manter a pequena diferença na concentração para evitar: 1) mudanças dramáticas na corrente elétrica em um determinado ponto e pequenas mudanças no início e final do processo de substituição e 2) mudança na interface entre os líquidos [60].

Nesta técnica, o microcanal é inicialmente preenchido com a solução eletrolítica menos concentrada produzindo uma corrente elétrica constante e a resistência do sistema é dominada pela condutividade deste fluido. Quando um campo elétrico é aplicado, a solução mais concentrada desloca-se pelo microcanal via EOF até substituir a solução que estava no microcanal, Figura 2.10.

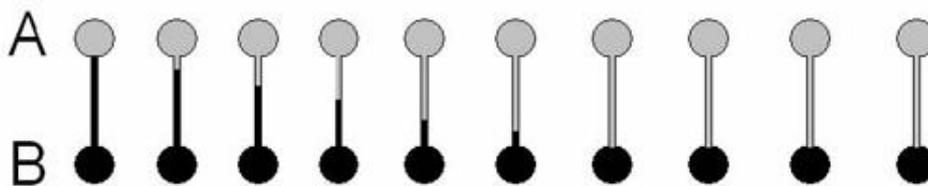


Figura 2.10: Desenho esquemático da técnica de monitoramento de corrente. Dois reservatórios com soluções eletrolíticas com diferentes concentrações estão ligados por um microcanal. Inicialmente a solução menos concentrada (em preto) do reservatório B preenche o microcanal. Quando um campo elétrico é aplicado a solução mais concentrada (em cinza), reservatório A, escoo pelo microcanal via EOF, substituindo a solução inicial [8].

O sentido do campo elétrico pode ser alterada, uma vez que o microcanal foi preenchido com o fluido mais concentrado, mudando a resistência do sistema. Assim, campos com sentidos alternadas são aplicados e a corrente do sistema pode aumentar ou diminuir, e o tempo necessário para a corrente alcançar o estado estável, especifica a velocidade média do fluido [8].

Depois que o processo de substituição via EOF começa, a resistência elétrica total do líquido varia, assim a corrente do microcanal muda. Uma vez que a substituição esta completa a corrente atinge um *plateau*, como pode ser observado na curva da Figura 2.11.

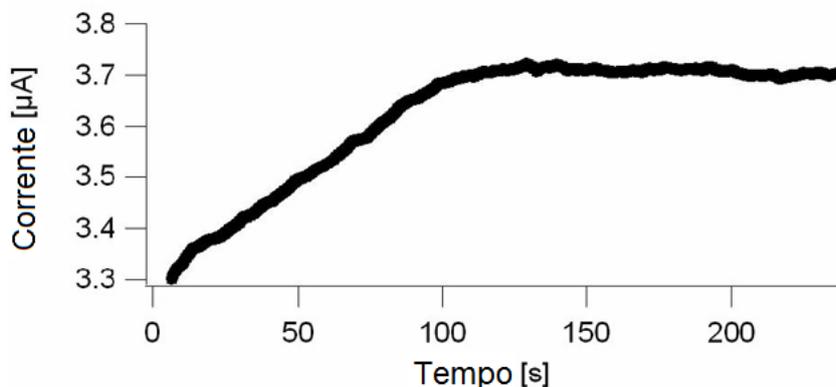


Figura 2.11: Curva típica de corrente em função do tempo obtida pela técnica de monitoramento de corrente [8].

A relação corrente-tempo permite que a velocidade média do EOF seja determinada usando o método do comprimento total ou o método da inclinação.

O método do comprimento total usa a seguinte relação para calcular a velocidade média

$$\mathbf{u}_{\text{EOF}} = \frac{L}{\Delta t} \quad (2.15)$$

em que Δt é o tempo medido entre os dois *plateaus* do valor da corrente, o qual também é o tempo necessário para que a segunda solução escoe por todo o comprimento L do microcanal [60].

O método do comprimento total requer a determinação do tempo inicial e final para a mudança na corrente durante o processo de substituição via EOF. Experimentalmente é difícil de determinar exatamente os pontos de início e término do processo devido à mudança gradual e a pequenas flutuações na corrente [60]. Além disso, para soluções de baixa concentração, a velocidade média eletrosmótica é muito pequena, necessitando de longos períodos de tempo para completar o processo de substituição [60].

O método da inclinação considera que as curvas de corrente-tempo medidas são lineares na maior parte do processo de substituição quando a diferença de concentração das soluções é pequena [61]. Isso porque, quando uma solução escoar para o interior do microcanal o mesmo volume da outra solução sai com a mesma velocidade. As duas soluções têm diferentes valores para a condutividade elétrica, sendo assim, a resistência elétrica total do líquido muda linearmente, e conseqüentemente a inclinação da curva corrente-tempo é constante durante o processo [61].

A inclinação da curva corrente-tempo pode ser descrita como

$$\text{inclinação} = \frac{\Delta I}{\Delta t} = \mathbf{u}_{\text{EOF}} \frac{EA (\sigma_2 - \sigma_1)}{L} \quad (2.16)$$

em que I é a corrente elétrica, E é o campo elétrica aplicado, A área da seção transversal e $(\sigma_2 - \sigma_1)$ é a diferença de condutividade das duas soluções [61].

As limitações desta técnica de monitoramento de corrente incluem difusão, incerteza sobre os gradientes de pressão e o aquecimento, que é dependente do tempo do processo de substituição, podendo ser um problema quando o material do microcanal possui baixa condutividade e baixa performance quando a mobilidade eletrosmótica aproxima-se de zero [8].

2.3.2. Dieletoforese

Acima de um determinado valor de E , a dieletoforese torna-se dominante sobre os fenômenos da eletrocinética e difusão [8, 9].

A dieletoforese (DEP) descreve o movimento translacional de partículas neutras causado pelo efeito de polarização em um gradiente de campo elétrico não uniforme [25, 62]. Há duas maneiras de gerar um campo elétrico não uniforme: aplicando uma voltagem através de uma matriz de eletrodos ou colocando obstáculos isolantes entre os pares de eletrodos.

Em um material composto por moléculas polares suas orientações são aleatórias na ausência de E . Quando um campo elétrico externo é aplicado à partícula suspensa em um meio líquido, tanto a partícula quanto o meio são polarizados. Sob a influência de um campo elétrico externo as moléculas poderão polarizar-se pela orientação de seus momentos de dipolo.

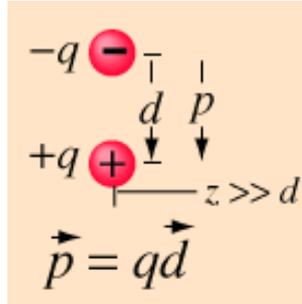


Figura 2.12: Desenho esquemático de um dipolo.

O momento de dipolo de um par de cargas opostas de magnitude q é definido como a magnitude das cargas vezes a distância entre eles e a direção é dada no sentido da carga positiva (Fig. 2.12). Assim, o campo elétrico do dipolo é dada por:

$$E_{\text{dipolo}} = \frac{P}{4\pi\epsilon_p z^3} \quad (2.17)$$

em que, P é o momento de dipolo e ϵ_p é a constante dielétrica da molécula [50].

O resultado é uma densidade de carga líquida ρ_i acumulada na interface entre a partícula e o meio líquido. Estas superfícies de carga geram um segundo campo elétrico alterando o E original (Figura 2.13).

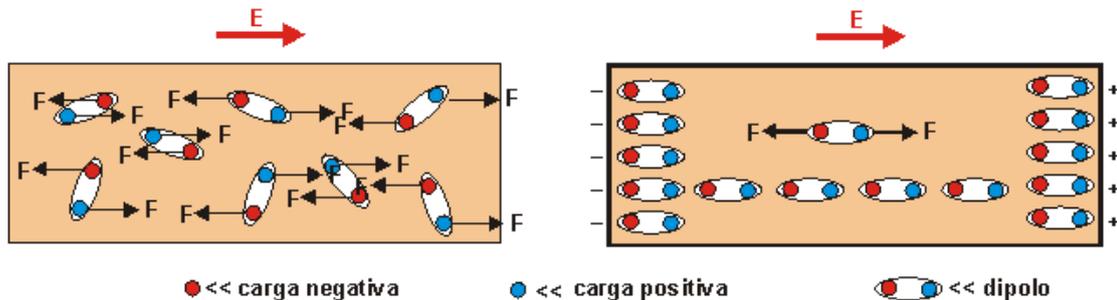


Figura 2.13: Desenho da orientação das moléculas polares sob a influência de um campo elétrico externo [Adaptado de 63].

A interação dos dipolos induzidos com o gradiente do campo elétrico dá origem a atração e repulsão das partículas em regiões com alto campo elétrico, dependendo da sua polarização em

comparação com o meio circundante. Na DEP a movimentação das partículas ocorre devido a um desequilíbrio de forças do momento de dipolo induzido na partícula causado pelo campo elétrico não uniforme: uma “extremidade” do dipolo esta em um campo mais fraco que a outra ponta, fazendo com que a partícula seja puxada eletrostaticamente ao longo do gradiente do campo elétrico [64].

Se o momento de dipolo induzido das partículas for maior que o do fluido, então a dielectroforese é positiva, na qual a força é exercida para as regiões de alta intensidade do E [64]. A dielectroforese negativa ocorre quando o fluido é mais polarizável que as partículas suspensas e estas estão dispostas longe da região de alta intensidade do campo elétrico [64].

Sendo assim, a DEP é um mecanismo eletrocinético não destrutivo e não invasivo com grande potencial para separação e manipulação de biopartículas em dispositivos microfluídicos. Macromoléculas como DNA e proteínas são o núcleo do processo de bioseparação. Grandes esforços têm sido feito para o desenvolvimento de técnicas de separação para concentração, separação e identificação destas macromoléculas. A realização destes processos em sistemas microfluídicos permitirá um aumento de sensibilidade específica em tempo reduzido [65].

A separação por dielectroforese é baseada nas diferentes propriedades dielétricas da partícula, i.e., DEP é uma técnica de separação física que não requer preparação especial ou modificações químicas/biológicas da amostra.

A força dielectroforese (F_{DEF}) em função do tempo médio da relaxação das partículas é dada por [25]

$$F_{DEF} = 2\pi\epsilon_m a^3 \text{Re} \left| K(\omega) \right| \nabla E^2 \quad (2.18)$$

em que a é o raio da partícula, ϵ_m é a permissividade elétrica do meio, E é a intensidade do campo elétrico e $K(\omega)$ é o fator Clausius-Mossotti, i.e., a polarização efetiva da partícula no meio

$$\text{Re} \left| K(\omega) \right| = \frac{\epsilon_m - \epsilon_f}{\epsilon_m + 2\epsilon_f} + \frac{3(\epsilon_m \sigma_p - \epsilon_p \sigma_f)}{\tau_{MW} (\sigma_p + 2\sigma_f)^2 (1 + \omega^2 \tau_{MW}^2)} \quad (2.19)$$

sendo que, σ_f é a condutividade do meio, ϵ_p e σ_p são a permissividade dielétrica e a condutividade da partícula, respectivamente, ω é a frequência do meio aplicada, τ_{MW} é o tempo de relaxação da partícula Maxwell-Wagner, expresso como $\tau_{MW} = (\epsilon_p + \epsilon_m)/(\sigma_p + 2\sigma_f)$. Assim sendo, a direção na qual a partícula se move é determinada tanto pelas propriedades da partícula e do meio quanto pela frequência do campo aplicado. Quando $\text{Re} \left| K(\omega) \right| > 0$, a partícula é atraída para o campo elétrico máximo, caso contrário a força na partícula a conduzirá para a região de menor campo [51, 66].

Desta forma, a intensidade da força depende do meio e das propriedades elétricas das partículas, do seu tamanho e estrutura, como da frequência do campo elétrico. As propriedades

elétricas importantes nestes casos são a condutividade e a permissividade, em que a condutividade é medida de quão fácil é para as partículas se moverem através de um meio e a permissividade é a medida da energia ou carga acumulada no sistema [50].

Uma partícula em um campo elétrico não uniforme fica sob influência de forças de dieletroforese e eletrocinéticas; e conforme o tamanho da partícula diminui, forças resultantes do movimento Browniano devem ser consideradas. Dependendo do microsistema, forças hidrodinâmicas podem ter um papel importante. Para realizar a concentração de partículas por dieletroforese, a força dieletroforética tem que ser maior que todas as demais forças presentes no sistema.

Proteínas podem ser consideradas partículas coloidais [67], uma vez que podem aderir a uma superfície sólida influenciadas, principalmente, por interações eletrostáticas e forças de van der Waals e apresentar pouca ou nenhuma alteração conformacional.

Partículas coloidais em um campo elétrico externo cuja constante dielétrica é diferente do solvente adquirem um momento de dipolo elétrico paralelo ao campo externo [68]. O comportamento dos colóides é governado pela interação dipolo-dipolo, assim um campo elétrico externo pode induzir perturbações na distribuição dos componentes da solução e na velocidade do solvente.

A energia de interação entre dipolos demonstrada na figura abaixo é dada por [69]

$$U_{\text{dip}}(R, \phi) = \frac{4\pi\epsilon_0\epsilon_m\beta^2 a^6 E_0^2}{R^3} \left(\frac{3\cos^2\phi - 1}{2} \right) \quad (2.20)$$

$$\beta = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p - 2\epsilon_m} \quad (2.21)$$

em que ϵ_p e ϵ_m são as constantes dielétricas para as partículas coloidais e o meio circundante, respectivamente, ϵ_0 permissividade do vácuo e a é o raio da partícula. E_0^2 é o campo elétrico local, originado pela orientação dos dipolos da solução, E_0 é o campo elétrico externo, θ é o ângulo de separação entre \mathbf{R} e \mathbf{E}_0 . R é limitado para ser maior que o raio da partícula, i.e. $R \gg a$, pois o dipolo induzido pelo campo elétrico externo não é afetado pelas partículas vizinhas.

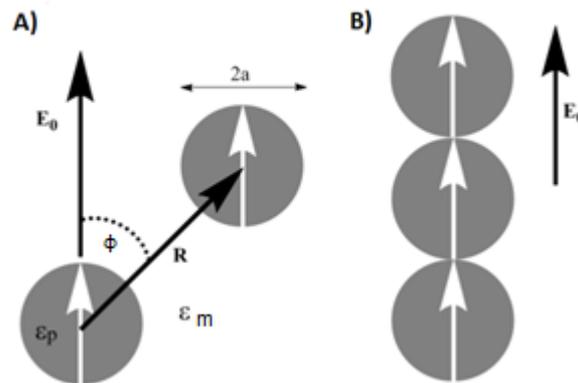


Figura 2.14: Desenho esquemático da interação dipolo-dipolo de partículas coloidais. a) Campo elétrico externo induz dipolos (flechas brancas) nas partículas coloidais e interações entre as mesmas com distância R e b) quando o campo é forte suficiente partículas coloidais formam uma cadeia ao longo do campo aplicado [69].

Da equação (2.20) têm-se a dependência angular, o tamanho da partícula e a influência da intensidade do campo aplicado. Se considerar $\phi_0 \sim 55^\circ$, então $3 \cos^2 \phi - 1 = 0$. Então, a interação dipolar é atrativa quando $\phi < \phi_0$ e repulsiva quando $\phi > \phi_0$. A velocidade angular e o nível de pré-polarização das partículas determinam quão efetivo o campo aplicado induzirá a formação de dipolo nas partículas. Quanto mais rápido os dipolos regenerarem, mais rápido as partículas formaram cadeias ou fios (Fig. 2.14-B) [69, 70].

Quanto à forma de interação entre as partículas na cadeia, estas podem se unir pelas extremidades (Figura 2.14). A energia do dipolo (U_{dip}) depende fortemente de a , uma vez que este varia com a^6 . As interações entre os dipolos podem ser rearranjadas pelo campo elétrico externo, fornecendo um conveniente método para formar filmes protéicos organizados. As interações dipolares entre moléculas do solvente tornam-se particularmente relevantes nas interfaces líquido-sólido, podendo inclusive ocorrer imobilização de moléculas do líquido.

A fluidez da solução decresce com o aumento da intensidade do campo elétrico quando as partículas ficam polarizadas na solução [70]. O decréscimo gradual na viscosidade da solução com o aumento do campo aplicado foi reportado como resultado da diminuição da permissividade dielétrica da partícula e a interação entre os componentes da solução [15 APUD 71].

2.3.3. Eletroforese

Eletroforese é o oposto da eletroosmose. Durante a eletroforese o líquido, como um todo, é considerado em repouso enquanto as partículas movem-se sob a influência de um campo elétrico

externo [9]. Como em ambos os fenômenos, a influência da DCE controla o movimento relativo tanto do líquido como das moléculas, o resultado obtido para a eletroosmose pode ser diretamente aplicado para obter-se a mobilidade eletroforética [9].

As partículas em dispersão possuem uma superfície carregada, nas quais um campo elétrico externo exerce uma força eletrostática. De acordo com a teoria da dupla camada elétrica, todas as superfícies carregadas em fluidos são envoltas por uma camada de difusão de íons, que têm carga de sinal oposto à carga da superfície, Figura 2.15 [33].

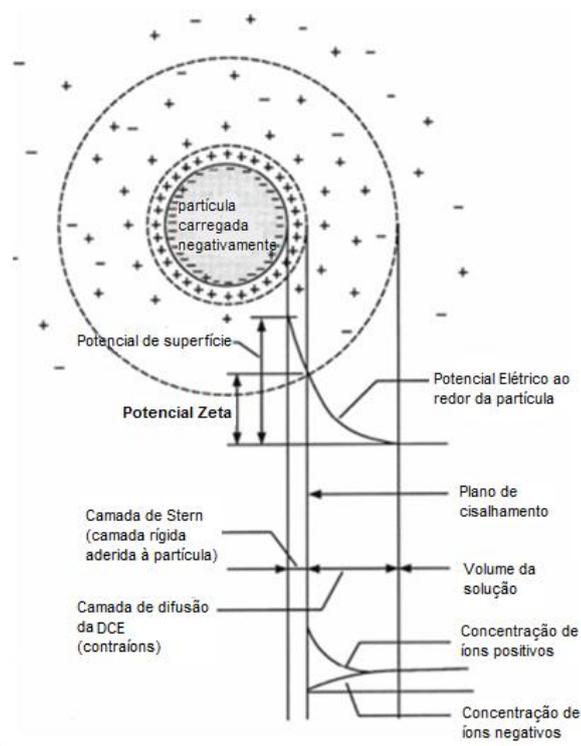


Figura 2.15: Desenho esquemático da dupla camada elétrica formada na interface da partícula em contato com um líquido iônico [Adaptado de 9].

Como ilustrado na figura abaixo (Fig. 2.16), o campo elétrico também exerce uma força nos íons da camada difusa da partícula, força de arraste, que tem direção oposta à força eletrostática. Esta força não age diretamente na partícula, mas sim nos íons da camada difusa da DCE da superfície da partícula e parte desta é transferida para a superfície da partícula através do cisalhamento viscoso, chamada de força de arraste eletroforético [33].

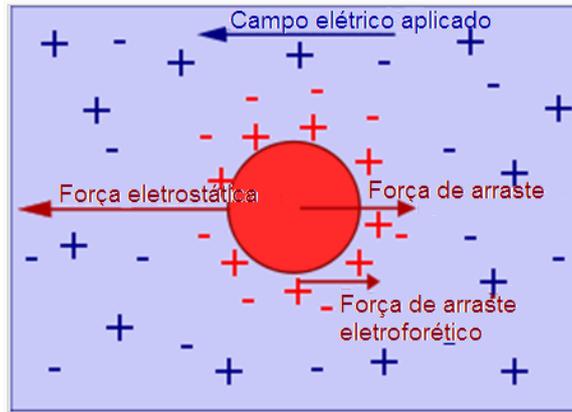


Figura 2.16: Desenho ilustrativo da eletroforese. Uma dupla camada elétrica origina na superfície de uma partícula carregada negativamente e forças resultantes de um campo elétrico externo [Adaptado de 9].

Quando o campo elétrico é aplicado e a partícula carregada a ser analisada esta em movimento estável através do soluto, a força total resultante é zero [33]

$$F_{\text{tot}} = 0 = F_{\text{eletrostática}} + F_{\text{arraste}} + F_{\text{arraste eletroforético}} \quad (2.22)$$

Considerando o arraste das partículas em movimento devido a viscosidade do solvente, e no caso para escoamento laminar (forças de viscosidade predominam) e intensidade do campo elétrico moderada, a velocidade eletroforética, u_{EF} , da partícula é proporcional ao campo aplicado E , o que leva a uma mobilidade eletroforética μ_{EF} definida como [52, 72]

$$\mu_{\text{EF}} = \frac{u_{\text{EF}}}{E} \quad (2.23)$$

A equação (2.23) pode ser rearranjada substituindo o valor da mobilidade da partícula, ou seja, a velocidade da partícula em relação ao meio em repouso fica

$$u_{\text{EF}} = (\epsilon_m \epsilon_0 \zeta E) / \eta \quad (2.24)$$

em que ϵ_m é a constante dielétrica do solvente, ϵ_0 é a permissividade do vácuo, η é a viscosidade do solvente e ζ é o potencial zeta da partícula [52].

O potencial zeta é proporcional a mobilidade eletroforética. O potencial é o parâmetro que determina a força de repulsão entre as partículas. Assim, é esta propriedade e não a mobilidade que é importante [72].

2.4. Cristalização bidimensional de proteínas

Cristalização de proteína é o mais difícil e demorado passo na determinação da estrutura atômica destas biomoléculas. Além, da técnica de raios-X utilizada na análise estrutural dos cristais ser limitadora em relação ao tamanho e qualidade dos cristais que podem ser estudados, há proteínas que não expressam em quantidade suficiente para o elaborado processo de fabricação de um cristal com dimensões mensuráveis por difratômetro de raios-X.

Pechkova et Nicolini 2004 [73] propuseram um novo método de cristalização em que um filme fino de proteína é utilizado como base para o processo de nucleação e crescimento do cristal. Os micro e nanocristais obtidos seriam analisados por radiação Síncrotron ou por difração de elétrons em microscópio de transmissão eletrônica.

Segundo os autores [73], cristais formados por este método apresentam maior estabilidade à radiação. Esta técnica possibilita um grande avanço nos 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 [73]. Assim, estudos do mecanismo de organização de macromoléculas em substratos sólidos podem contribuir para o avanço na determinação estrutural e funcional das proteínas.

Vários estudos *in situ* foram publicados sobre crescimento de cristais de proteínas, entre elas a lisozima [74, 75] e a α -amilase [76]. Estudando o processo de cristalização, Astier et al. 2001 [76] observou que para supersaturação ($\beta = 1.6$) a nucleação 2D é o mecanismo dominante de crescimento para porcina pancreática α -amilase, enquanto que a baixa saturação ($\beta = 1.3$) o processo de crescimento é em espiral. Com a análise da altura das ilhas de nucleação bidimensional (camadas monomoleculares de proteínas), do crescimento (duas moléculas na altura) e com os resultados do experimento de espalhamento de luz das soluções de proteína os resultados sugerem que uma única molécula de proteína é a unidade básica de crescimento do cristal.

2.5. Microscópio de força atômica

Uma das ferramentas que tem contribuído fortemente para o estudo de superfícies revestidas com macromoléculas biológicas e suas interações (superfície-biomolécula e biomolécula-biomolécula) são os microscópios de varredura por sonda (MVS) [77, 78].

Os MVSs são uma família de microscópios que podem medir a superfície morfológica no nível atômico através de uma sonda sensora, cerâmicas piezoelétricas para posicionar a amostra e fazer varreduras, circuitos de realimentação para controlar a posição vertical da sonda e um computador para controlar o movimento das sondas de varredura, armazenar dados e convertê-los em imagens por meio de programas [78, 79].

Por meio destes microscópios as superfícies das amostras podem ser estudadas em escalas micro e nanométricas, sendo manipuladas em ar, meio líquido ou vácuo, tendo possibilidade de ampliações na direção z, além de permitirem a manipulação de átomos e moléculas e fornecer informações sobre propriedades físicas e elétricas das superfícies [78, 80].

2.5.1. Princípio físico do funcionamento do MFA

O microscópio de força atômica (MFA) é o mais difundido entre a família dos MVSs e a interação sonda-amostra ocorre por força de van der Waals fornecendo informações sobre a topografia, elasticidade e plasticidade da superfície da amostra [80, 81].

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:

$$U(r) = - A/R^6 + B/R^{12} \quad (2.25)$$

A força derivada deste potencial é dada pela expressão abaixo

$$F(r) = 6A/R^7 - 12B/R^{13} \quad (2.26),$$

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} Jm^6 e $10^{-139} \text{ Jm}^{12}$, respectivamente [82].

Assim, para longas distâncias ($R > 1\mu\text{m}$), praticamente não há qualquer interação, mas à medida que a sonda aproxima-se da amostra ($R \leq 50\text{nm}$), 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 ($R \approx 0,5 \text{ nm}$). 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, a sonda está em contato físico com a superfície da amostra [78].

Assim, o MFA funciona medindo as forças atrativas ou repulsivas (Figura 2.17) 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 se divide no modo contato intermitente, em que temos o regime atrativo e repulsivo e o modo *tapping*, em que a interação é atrativa.

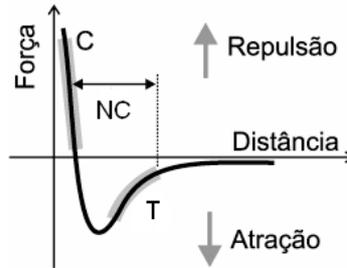


Figura 2.17: Curva esquemática mostrando a dependência da força de interação sonda-amostra em função da distância entre elas. A força é proveniente do potencial de interação entre dois ou mais átomos, as forças positivas são atrativas e acima da linha de força zero as forças são repulsiva e cada região determina um modo operacional do microscópio [78].

2.5.2. Princípio mecânico do funcionamento do MFA

As partes funcionais de um MFA (Figura 2.18) são: uma ponta mecânica montada sobre a extremidade livre de uma haste (*cantilever*) é colocada muito próxima da superfície da amostra 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) [78]. Através de um dispositivo ótico composto por um laser, um espelho (parte superior da sonda) e um sensor de posicionamento vertical (fotodiodo), 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 \AA e forças entre 10^{-7} N a 10^{-12} N [83], 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 [48, 83].

O suporte com a amostra é colocado sobre o *scanner* piezoelétrico, 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 [78, 79, 81]. 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 [83].

Estas informações são passadas a um sistema de realimentação que controla a separação entre sonda e amostra [76, 78]. Todo este processo é controlado por um computador (Figura 2.18), que movimenta o *scanner*, recebe os dados e os converte em um mapa topográfico, através da conversão de variação do sinal no fotodetector para variação de altura na amostra [78]. Entretanto, este processo de conversão é complexo e o método mais utilizado na geração de imagens topográficas consiste em aplicar uma força constante sobre a amostra, ou seja, determina-se um valor do sinal que deve ser permanentemente observado pelo fotodetector [78, 79]. O computador, 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 [78, 81].

Com o objetivo de posicionar a sonda sobre uma determinada região da amostra, o sistema possui um mecanismo de aproximação que coloca a sonda nas proximidades da localização desejada [78].

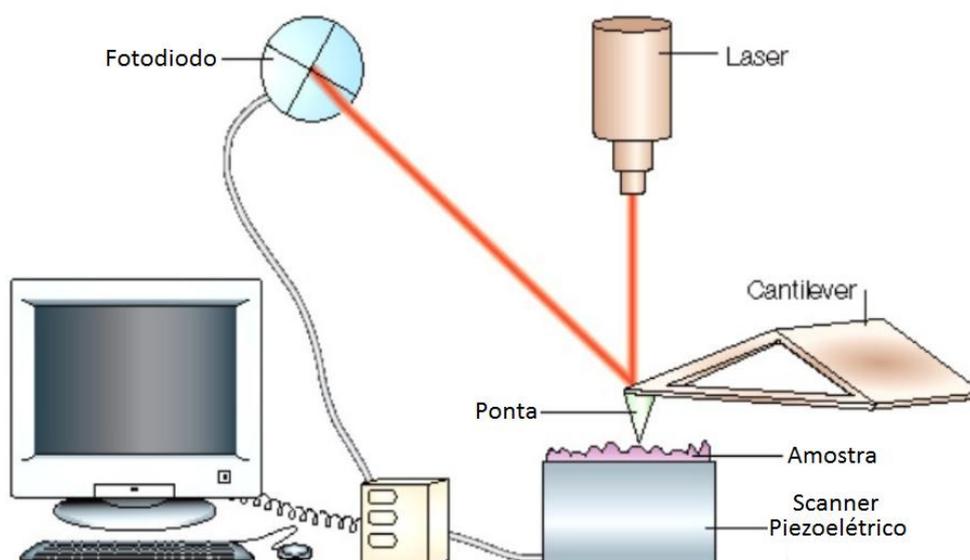


Figura 2.18: Desenho esquemático dos componentes do microscópio de força atômica [Adaptado de 83].

As vibrações externas representam uma grande dificuldade para obtenção de imagens usando MFA devido à alta capacidade de resolução e suas dimensões reduzidas. Entretanto, 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 a baixas frequências de oscilação que não interferem nas medidas.

2.5.2.1. Modo dinâmico

O modo dinâmico monitora a amplitude e a frequência de oscilação do *cantilever* enquanto que no modo contato monitora estaticamente sua deflexão. A amplitude, frequência de ressonância e a mudança de fase da oscilação conectam a dinâmica de vibração da ponta com a interação sonda-amostra. 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* em que a frequência e amplitude são pré-definidas pelo usuário. A movimentação do piezo faz o *cantilever* oscilar com amplitudes acima de 20 nm. Conforme o *cantilever* começa a interagir intermitentemente com a amostra, a amplitude de oscilação da sonda diminui devido à perda de energia [84, 85]. 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 segundo parâmetros escolhidos inicialmente [84, 85].

2.5.2.2. 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* [15, 85]. 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 [15]. Uma diferença de fase ϕ entre o sinal do atuador e o sinal que o fotodetector mede é estabelecida e esta só será anulada quando a condição inicial de interação for restabelecida.

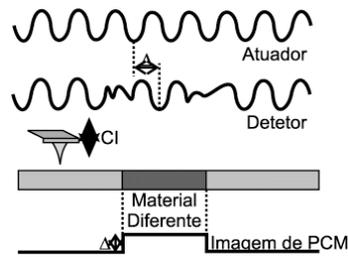


Figura 2.19: Desenho esquemático do modo contraste de fase. A sonda oscila sob o efeito de um atuador e a diferença de fase D entre o atuador e o fotodetector, gerada durante a passagem da sonda por materiais diferentes. Adaptado de [15].

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 [85]. Admitindo que a movimentação do *cantilever* seja estacionária na escala de tempo por pixel de imagem podemos escrever a relação entre a mudança de fase, amplitude e energia dissipada como sendo

$$2Q_{\text{cant}}/k_{\text{cant}}w_{\text{cant}}(E_{\text{diss}}) = A_r A_0 \sin\varphi - A_r^2 \quad (2.27),$$

em que A_r é a amplitude real, A_0 é a amplitude livre, φ é a mudança de fase e o *cantilever* é descrito pela constante de mola k_{cant} , sua frequência de ressonância natural w_{cant} e seu fator de qualidade Q_{cant} e a energia média líquida dissipada por ciclo no contato amostra-sonda é denotada por E_{diss} [Cleveland 1998 APUD 85].

Uma série de fatores modifica a interação a superfície-*cantilever* durante o contato, tais como mudanças de material e de propriedades viscoelásticas [29].

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Caracterizar os filmes de proteína GlnB de *H. seropedicae* formados em substratos sólidos em diferentes condições. Obter informações sobre adsorção de biomoléculas em suportes sólidos e interação proteína-biomoléculas via microscopia de força atômica.

3.2. Objetivos específicos

- obter filmes protéicos com alto grau organizacional através da aplicação de um campo elétrico externo.
- caracterizar topografia dos filmes de proteína GlnB-Hs em substrato sólido por MFA.
- caracterizar parâmetros que controlam a formação do filme de proteína GlnB-Hs sob um campo elétrico externo através da análise das curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado.
- identificar as mudanças morfológicas do filme protéico e das estruturas supramoleculares do filme de proteína causadas por: variação das características da solução e do substrato; pela intensidade do campo elétrico e sua taxa de variação.
- verificar a presença de arranjos organizados que poderiam servir como centros de nucleação de cristais de proteína.

4. Procedimento Experimental

4.1. Materiais

4.1.1. Mica muscovita

A mica muscovita foi cortada em tiras de 20 mm de comprimento e 5 mm de largura, como mostra o desenho abaixo. Nas duas extremidades foi aplicada tinta condutiva (grafite) com distâncias de 10 mm e 4 mm. A mica foi clivada imediatamente antes da deposição das soluções, para garantir uma superfície plana e livre de contaminantes do ambiente.

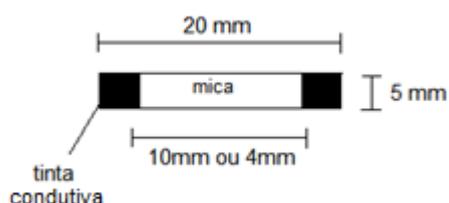


Figura 4.1: Desenho esquemático do substrato mica. A mica foi cortada em retângulos de 20 mm X 5 mm. As extremidades foram pintadas com tinta condutiva para fazer contato com eletrodos. As superfícies limpa da mica para formação do filme de proteína é de 4 mm ou 10 mm.

4.1.2. Lamínula siliconizadas

Lamínulas circulares revestidas com um organossilano (Hampton Research HR 3-231 de 22 mm) foram cortadas em retângulos de 20 mm X 10 mm. As extremidades foram pintadas com tinta condutiva (grafite) com uma distância de 4 mm (Figura 4.2-A).

Com o auxílio de uma máscara rígida de 0,43 mm de diâmetro, canaletas de 4 mm de comprimento foram confeccionadas sobre a lamínula com pasta de silicone (polisiloxano) (Sikasil-AC, Sika S.A) sobre a lamínula (Figura 4.2-B). Após a secagem do silicone as extremidades foram pintadas com tinta condutiva.

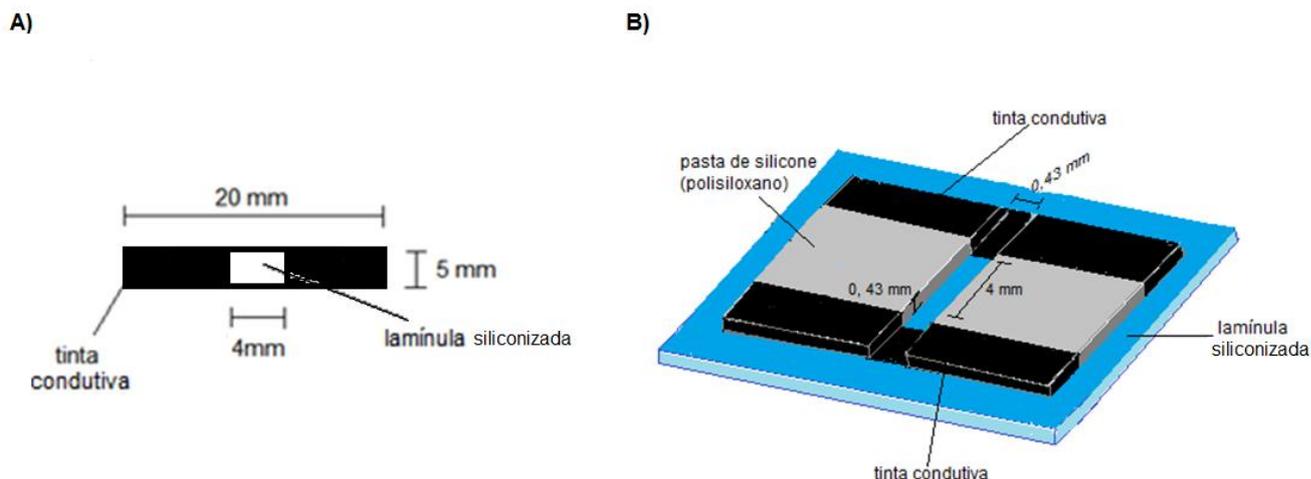


Figura 4.2: Desenho esquemático do substrato lamínula siliconizada. A) substrato lamínula siliconizada e B) design da canaleta feita com pasta de silicone sobre lamínula siliconizada (0,43 X 0,43 X 4 mm). A lamínula foi cortada em retângulos de 20 mm X 10 mm e sobre esta canaletas de silicone em pasta com uma máscara rígida. As extremidades foram pintadas com tinta condutiva para fazer contato como eletrodos.

4.1.3. Solução estoque de proteína GlnB-Hs

A proteína GlnB-Hs nativa (50 mM de Tris/HCl pH 8, 50 mM de NaCl, 0.1 mM EDTA e 50% de glicerol) [21] foi diluída para a concentração final de 10 nM e 100 nM em 50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl.

A solução de 10 nM de proteína GlnB-Hs foi fervida em banho-maria a 100 °C por 15 minutos para desnaturar a proteína, denominada solução C.

Tabela 4.1: Concentração final de proteína GlnB-Hs e dos componentes da solução tampão nas soluções após diluição.

Solução	Concentração de Tris (mM)	Concentração de NaCl na solução (mM)	Concentração de Proteína GlnB-Hs (nM)
A	50	50	10
B	50	50	100
C	50	50	10 desnaturada

4.1.4. Soluções controles

Amostras controles foram preparadas com os componentes da solução de proteína. Soluções contendo 50 mM de NaCl, outra com 50 mM Tris-HCl pH 8 e a solução tampão com 50 mM de NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 8.

4.1.5. Soluções para imunodeteção

Tampão de lavagem (TBS-T): TBS com 0,05 % (v/v) de Tween 20.

Bloqueadora: 5 % de leite em tampão de lavagem 1x.

Anticorpo primário: diluição do anticorpo anti-GlnB-Ab 1:500 em tampão de lavagem 1x.

Anticorpo secundário: diluição do anticorpo anti-IgG de rato 1: 5000 de em tampão de lavagem 1x.

4.1.6. Fonte e Multímetro para aplicação de tensão

Uma fonte Agilent Technologies N5752A foi utilizada para aplicar uma tensão de até 300 V nas amostras e monitoradas por um multímetro Keithley. O *software* LabView forneceu os gráficos de tensão X corrente.

4.2. Métodos

4.2.1. Deposição das soluções sobre a mica para aplicação de tensão

Uma alíquota de 1 μ l e 0,5 μ l das soluções de proteína e das soluções controles foi depositada na mica de 4 mm e 10 mm de comprimento previamente clivadas.

As soluções foram depositadas na extremidade do polo negativo (nesta tese convencionado de anodo), imediatamente adjacente a tinta condutiva, procurando molhar somente a região adjacente ao anodo.

Imediatamente após a deposição, aplicou-se uma tensão de 0 a 300 V.

As amostras ficaram armazenadas no dessecador por no mínimo 24h até análise por MFA. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em condições ambientes.

4.2.2. Deposição das soluções sobre lamínula siliconizada para aplicação de tensão

Alíquotas de 5 μ l das soluções de proteína e das soluções controles foram depositadas nas canaletas de pasta de silicone, preenchendo-as por completo. Imediatamente aplicou-se o campo elétrico e as amostras foram mantidas em dessecador por, no mínimo, 1 mês antes das análises por MFA. Todas as amostras foram preparadas em condições ambientes.

4.2.3. Efeito da umidade nos valores de corrente na lamínula siliconizada

A umidade relativa do ar influencia diretamente as medidas de corrente elétrica sobre os substratos. Nestas medidas a umidade relativa do ar foi monitorada utilizando-se um MT242 – Relógio Termo Hidrômetro Minipar com precisão de 5 %.

A superfície do substrato foi saturada com vapor de água (umidade relativa acima de 90 %), com o auxílio de um umidificador. Em seguida, a tensão foi aplicada com ciclos consecutivos de 0 V a 300 V até a umidade relativa ficar abaixo de 45 %.

Os valores de corrente também foram monitorados com voltagem constante durante a variação de umidade de 100 % a 40 %. Ensaios de voltagem em função do tempo utilizaram voltagens constantes de 100 V, 300 V e 500 V.

4.2.4. Detecção da proteína GlnB-Ab sobre a superfície da mica

Os filmes de proteína GlnB-Hs sobre a mica foram preparados com pelo menos 5 dias de antecedência.

A presença e distribuição da proteína GlnB-Hs sobre a mica foi verificada através da imunodeteção da proteína com um anticorpo heterólogo (IgG de rato anti-GlnB-Ab) (Figura 4.3). As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, com a solução bloqueadora para que as proteínas do leite ocupassem os espaços vazios da superfície do substrato. Em seguida, as amostras foram lavadas com TBS-T 1x e a solução contendo o anticorpo primário (anti-GlnB-Ab) foi depositada sobre os filmes e incubada por 15 minutos, a temperatura ambiente. Nesta etapa acontece a ligação específica do anticorpo anti-GlnB-Ab a proteína GlnB-Hs. Após este período, as amostras foram lavadas 2x com TBS-T 1x. A solução do anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG de rato conjugado com peroxidase), que reconhece o anticorpo primário, foi adicionada e incubada por 15 min. Finalmente, as amostras foram lavadas 2x com o TBS-T 1x.

A revelação por quimioluminescência foi realizada utilizando o Kit ECL (*Labelling and Detection System* - GE Healthcare) e seguindo as recomendações do fabricante [86].

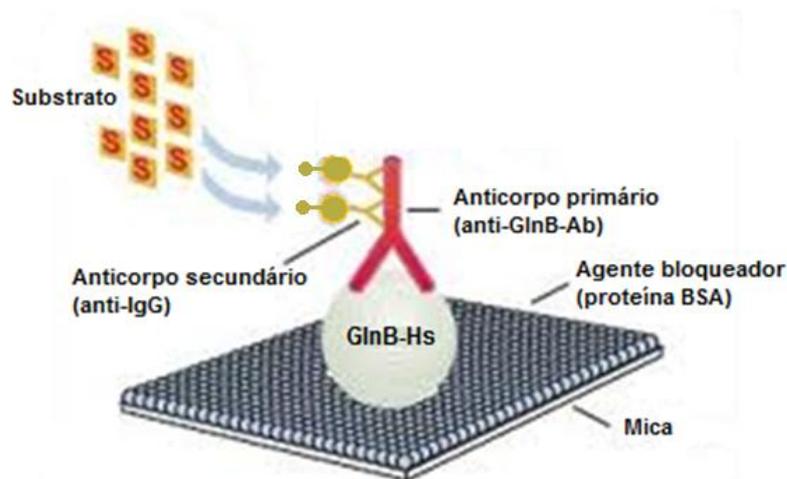


Figura 4.3: Desenho esquemático da detecção da proteína GlnB-Ab sobre mica.

4.2.5. Análise por microscopia de força atômica (MFA) dos filmes formados sobre a mica e lamínula siliconizada

Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Nas amostras preparadas sobre a lamínula siliconizada três regiões distintas e aleatórias foram analisadas por microscopia de força atômica. Nos filmes obtidos sobre a mica três regiões próximas ao eletrodo negativo (lado no qual a solução foi depositada) e três regiões próximas ao eletrodo positivo foram analisadas. As imagens apresentadas na tese são as mais representativas do conjunto de imagens obtidas de todas as áreas analisadas.

O microscópio utilizado foi um Shimadzu modelo SPM9500J3 operando no modo dinâmico com frequência de varredura de 1.5 Hz, *cantilever* de silício (Nanosensor) de constante de mola de 42 N/m e raio de curvatura de 10 nm e 5 nm, à temperatura ambiente e umidade ambiente de 45 % a 80 %.

As amostras foram colocadas sobre o *scanner* e orientadas com direção de varredura na mesma direção na qual o campo elétrico foi aplicado.

Todas as imagens foram tratadas com o *software* da Shimadzu para correção da inclinação do piezoelétrico e eliminação de ruídos mecânicos. Os valores ao lado das imagens e o histograma são referentes à variação máxima da altura das estruturas medidas pelo *software* (direção z) e a frequência de ocorrência destas alturas, respectivamente.

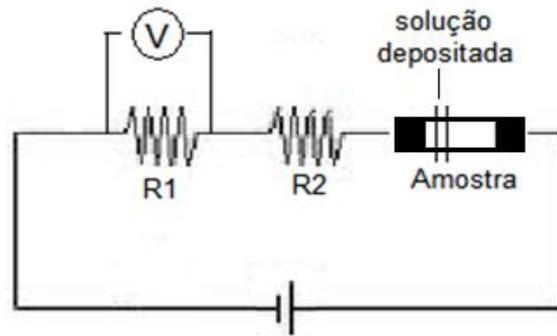
As medidas de diâmetro das estruturas e rugosidade das imagens de MFA foram feitas no *software* livre Gwyddion (gwyddion.net) e as incertezas calculadas por desvio padrão.

4.2.6. Obtenção dos gráficos de corrente em função do campo elétrico

Os substratos de mica e lamínula siliconizada foram ligados em série com um resistor de 43,7 K Ω (R1) e 8,37 K Ω (R2) para medir com segurança (devido a altas tensões utilizadas e evitar a possibilidade de curto circuito) a resistência do sistema formado pelo substrato-soluções (Figura 4.4). A mudança na corrente foi detectada através do monitoramento da queda de tensão no resistor R1 utilizando-se o multímetro. A queda de tensão foi medida a cada 1 s usando um programa escrito em casa no *software* LabView.

Todas as medidas foram realizadas à umidade e temperatura ambientes.

Para as curvas de corrente X campo elétrico, o valor inicial da tensão foi ajustado para 0 V e o valor final para 300 V, sendo que nos experimentos realizados a corrente foi limitada principalmente pela resistência da amostra (maior que $10^7 \Omega$). O tempo para completar cada medida foi de 10 e 100 segundos.



$$V_A = V_T - [(R1 + R2)/R1]V \quad (4.1 - \text{Apêndice 2})$$

Figura 4.4: Desenho esquemático do arranjo experimental para aplicação de tensão nas soluções depositadas sobre mica. A amostra foi ligada em série com dois resistores. O multímetro ligado ao resistor R1 de 43.7 KΩ. Na mica, as soluções foram depositadas imediatamente adjacentes a tinta condutiva no eletrodo negativo. Na lamínula siliconizada, as soluções preencheram o espaço entre os eletrodos. Na equação calculada pelo software V_A é a voltagem sobre a amostra, V é o valor de tensão medido sobre o resistor R1 e V_T é a tensão aplicada.

Para as curvas de corrente em função do tempo com tensão constante sob umidade variável, o valor inicial de tensão foi ajustado para 5 V. Após 10 s, a voltagem aumentou em taxa constante para o valor final desejado (100 V, 300 V ou 500 V). As correntes foram monitoradas por mais de 1000 s.

A incerteza experimental nos valores de corrente obtidos são de 0,01 % devido a precisão do multímetro (5 dígitos), enquanto que a incerteza do campo elétrico ($E = V/m$) de 10 % foi estipulada pelo erro de medida da distância entre os eletrodos ($\pm 0,5$ mm), uma vez que a fonte de tensão fornece resolução de 3 dígitos com erro máximo de 0,1 %.

5. Resultados: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a lamínula siliconizada

5.1. Efeito da umidade relativa do ar nas medidas de corrente elétrica e imagens de MFA

Inicialmente o substrato lamínula siliconizada foi caracterizado para controle da influência da canaleta de polisiloxano sobre a organização das proteínas.

As curvas de I-E da lamínula siliconizada e da lamínula com a canaleta de polisiloxano foram obtidas sob umidade ambiente acima de 50 % e a superfície das amostras analisadas por MFA.

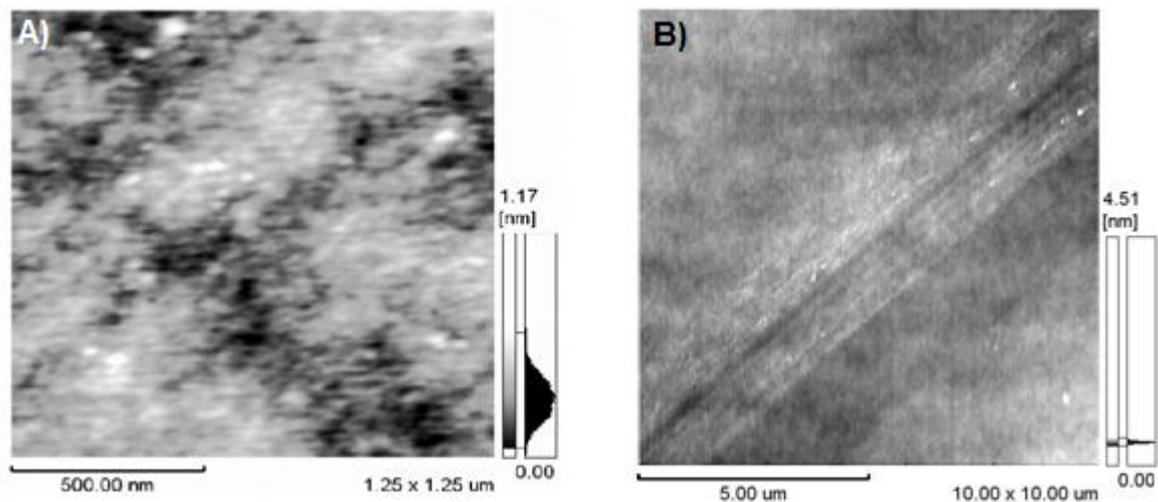


Figura 5.1: Topografia da lamínula siliconizada (sem aplicação do campo elétrico). A) somente o substrato lamínula siliconizada e B) sistema lamínula siliconizada com a canaleta de polisiloxano.

As imagens da figura 5.1 mostram a superfície da lamínula siliconizada sem e com a canaleta de polisiloxano (Fig. 5.1-A e 5.1-B, respectivamente) antes da aplicação de campo elétrico. As superfícies, apesar de não homogêneas, apresentam uma rugosidade menor que 2 nm.

O filme de organossilano que reveste a superfície da lamínula de vidro não apresenta mudança na topografia após aplicação de tensão tanto para medidas realizadas sob umidade relativa acima de 60 % quanto com 15 μ l de água miliQ preenchendo a superfície entre os eletrodos (Figura 5.2-A e 5.2-B, respectivamente).

No substrato com a canaleta de polisiloxano também não foi observada nenhuma alteração significativa na morfologia após a aplicação do campo elétrico tanto sob alta umidade quanto na presença de um volume de água (Fig. 5.2-C e 5.2-D, respectivamente).

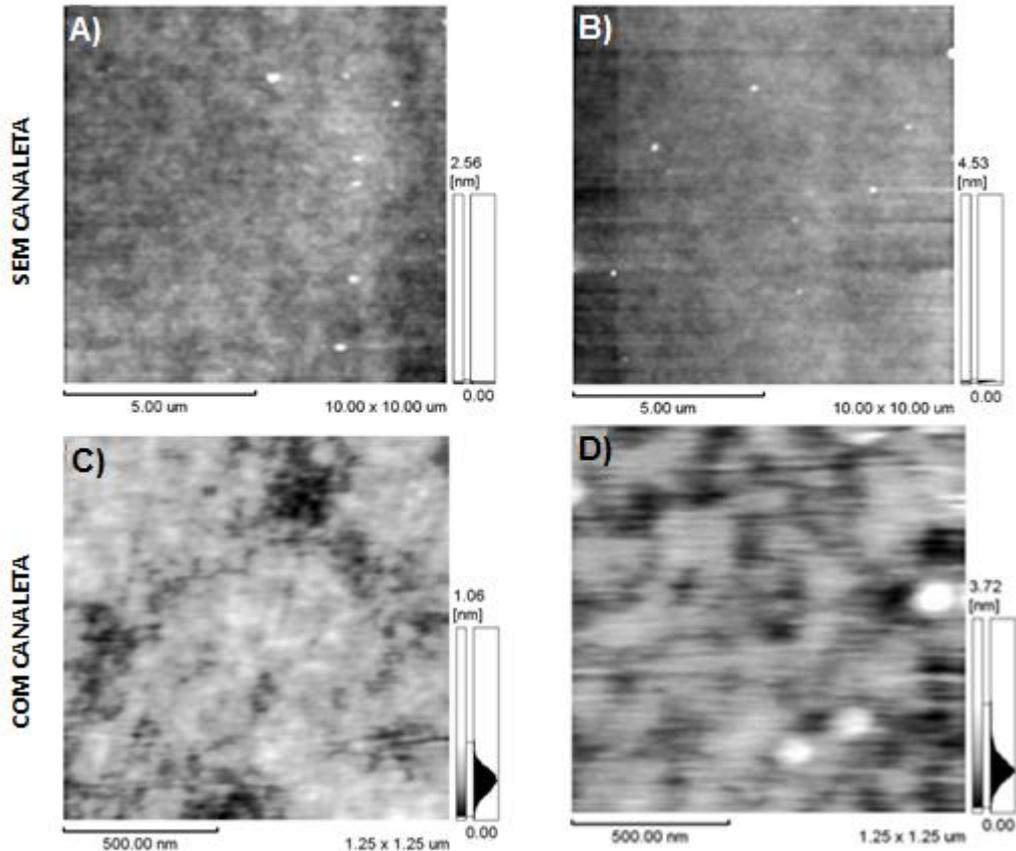


Figura 5.2: Topografia do substrato lamínula siliconizada após tensão de 0 a 300 V. A) - B) sem canaleta e C) - D) com canaleta de polisiloxano. A) e C) sob umidade relativa acima de 60 % e B) e D) com H₂O miliQ preenchendo o espaço entre os eletrodos. Amostras analisadas após a evaporação do volume de água.

Um volume de 5 µl de H₂O miliQ foi depositado na canaleta e E aplicado. Após a evaporação da água, a superfície foi analisada por MFA. Estas amostras são de difícil análise por MFA devido à instabilidade na interação da ponta do *cantilever* com a superfície da amostra. O substrato apresentou uma topografia heterogênea e sem estruturas definidas (Figura 5.2-D).

Com o intuito de analisar a influência da pressão do vapor de água nas medidas de corrente, corrente por campo elétrico foram medidos em diferentes condições de umidade relativa.

A figura 5.3-A mostra as variações da corrente em função do campo elétrico aplicado para umidade relativa de 100 % a 40 %. A corrente máxima obtida é de 9,4 µA com umidade saturada. Os valores de correntes caem com a diminuição da umidade. Abaixo de 55 % de umidade a corrente elétrica é desprezível.

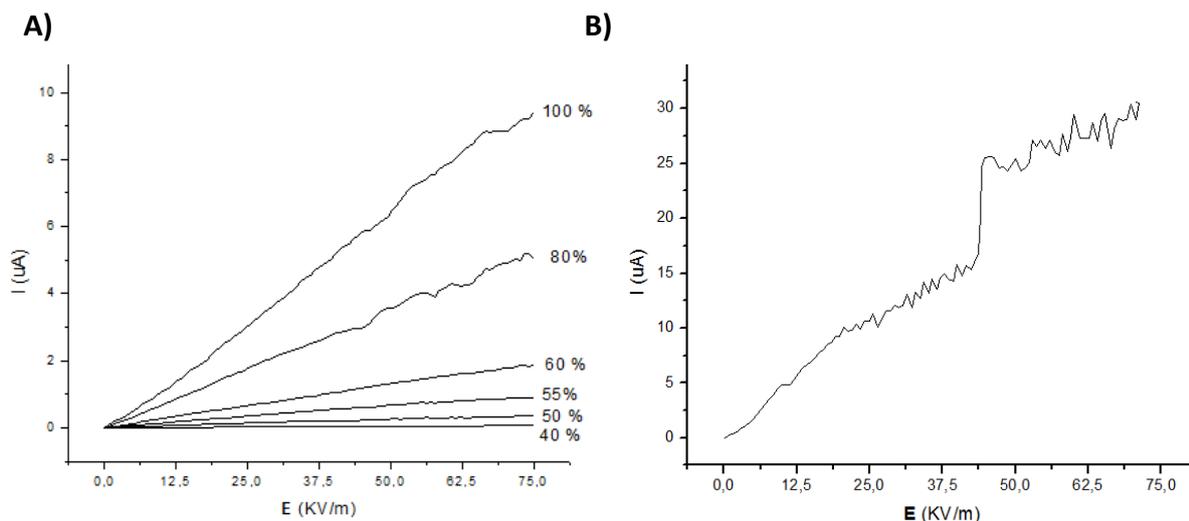


Figura 5.3: Gráfico corrente em função do campo elétrico aplicado sobre a lamínula siliconizada (revestida com organosilano). Curvas obtidas sob A) umidade relativa do ar variando de 100 % a 40% e B) 15 μl de H_2O miliQ foram depositados sobre o substrato.

Quando água miliQ foi adicionada entre os eletrodos, as curvas de corrente em função do campo elétrico apresentaram um aumento constante da corrente até 45 KV/m , quando ocorre um salto no valor da corrente, figura 5.3-B. A corrente máxima foi obtida no valor máximo de campo elétrico. O valor da corrente obtido com água depositada foi aproximadamente 3x maior em relação ao valor de corrente na umidade de 100 %.

As curvas de corrente para o sistema substrato com a canaleta de polisiloxano estão apresentadas abaixo, figura 5.4.

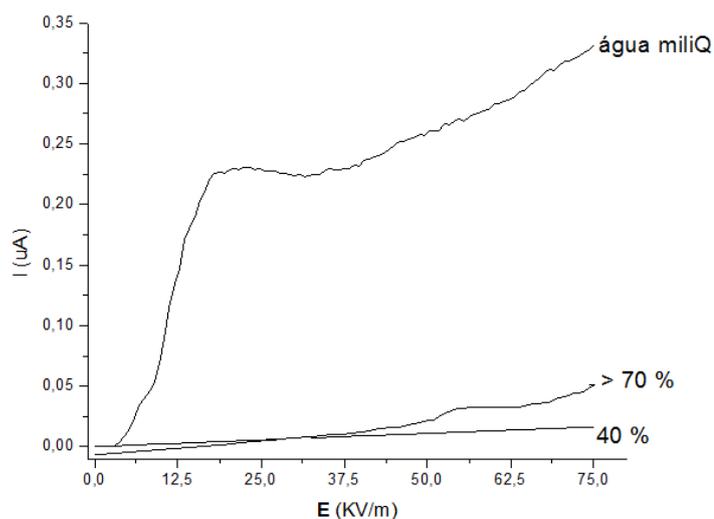


Figura 5.4: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado sobre o sistema lamínula revestida com organosilano com canaleta de polisiloxano. Curvas obtidas com umidade relativa do ar de 40% e acima de 70 % e com 5 μl de H_2O miliQ preenchendo todo o espaço entre os eletrodos.

Quando água miliQ é acrescentada ao sistema substrato-canaleta, as curvas de corrente em função do campo elétrico apresentaram um rápido aumento na corrente (Fig. 5.4). Abaixo de 50 % de umidade relativa a corrente é desprezível. Acima de 70 % de umidade a corrente cresce com a tensão aplicada, em 51 kV/m a corrente cresce rapidamente e atinge o máximo de 0,05 μA no campo elétrico máximo aplicado. Com o volume 5 μl de água preenchendo a canaleta a corrente aumenta rapidamente com o campo elétrico até 18 kV/m, então a corrente cresce suavemente até atingir o máximo de 0,33 μA .

A contribuição da corrente de superfície foi avaliada através das curvas de $I \times t$ com voltagem constante de 100 V e 500 V na lamínula siliconizada (Fig. 5.5). Após saturar a umidade do ar com vapor de água a corrente foi monitorada sob tensão constante de 100 V (Fig. 5.5-A) e 500 V (Fig. 5.5-B) por aproximadamente 1100 s, até a umidade ficar abaixo de 45 %. A corrente máxima de 3,1 μA foi obtida para a tensão de 100 V.

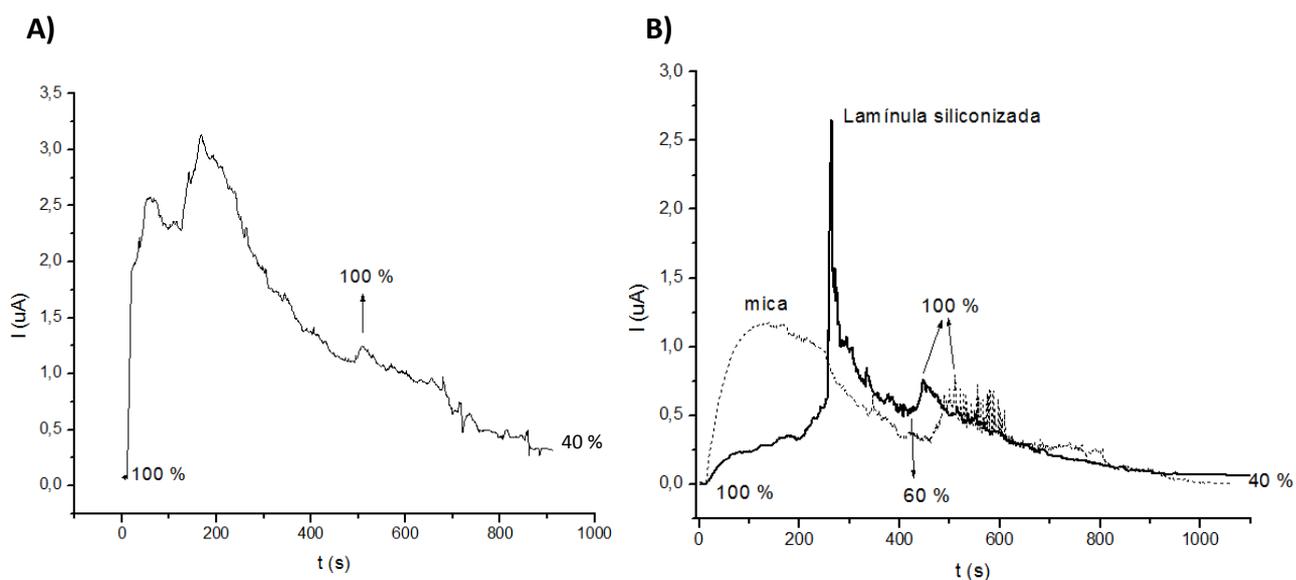


Figura 5.5: Gráfico de corrente elétrica com voltagem constante de A) 100 V para a lamínula siliconizada e B) 500 V para a lamínula siliconizada e mica. A umidade relativa inicial é de 100 %. Depois de aproximadamente 450 s, a umidade é de 60 %. A umidade relativa final é de 40 %.

Quando a umidade relativa estabilizou em 60 % por volta dos 450 s para todos os sistemas, o umidificador foi ligado novamente até a umidade relativa atingir 100 % (pontos indicados nas figuras 5.5-A e 5.5-B). Com o aumento da umidade, a corrente cresceu e decresce com a diminuição de vapor de água no ambiente.

A figura 5.5-B apresenta a corrente com voltagem de 500 V constantes com umidade relativa de 100 % a 40 % para a superfície da mica. A corrente máxima obtida é de 1,2 μA com umidade saturada em 100 s, quando a tensão atinge os 500 V.

As correntes em função do tempo com voltagens constantes de 100 V, 300 V e 500 V foram medidas para o sistema lamínula siliconizada-canaleta de polisiloxano (Fig. 5.6). O monitoramento da corrente começou com 5 V sendo aplicados por 10 s (ponto inicial i), então a voltagem foi alterada para 100 V, 300 V e 500 V, implicando em um crescimento rápido da corrente até atingir a voltagem constante (ponto i ao ponto 2). Após atingir a tensão determinada o sistema foi monitorado por mais 70 s (ponto 2 ao ponto final f).

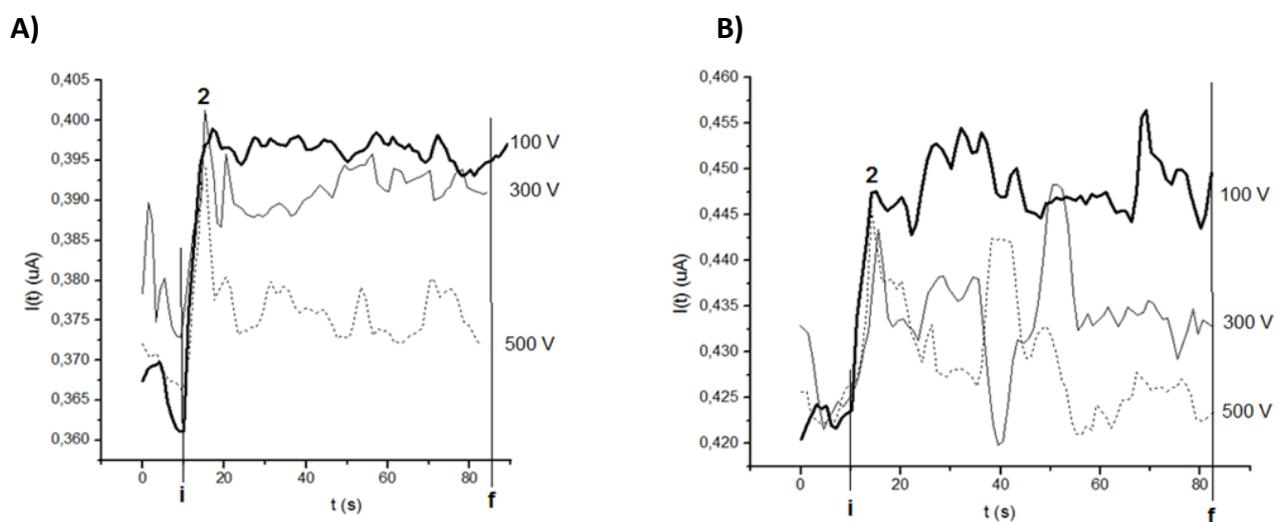


Figura 5.6: Gráfico de corrente em função do tempo com tensão constante: Linha em negrito: 100 V, linha contínua: 300 V e linha pontilhada: 500 V. Sistema A) Substrato/canaleta de polisiloxano em umidade relativa acima de 60 % e B) Substrato/canaleta de polisiloxano/5 μl de H_2O miliQ. O ponto 2 indica quando a tensão atinge a voltagem determinada.

Os valores de corrente são maiores para as menores tensões aplicadas, tanto para o substrato sob umidade relativa acima de 60 % (Fig. 5.6-A) quanto para o sistema substrato/canaleta/água miliQ (Fig. 5.6-B).

5.2. Efeito do campo elétrico sobre as soluções controles depositadas na canaleta de polisiloxano

Quando solução tampão é depositada na canaleta de polisiloxano e um campo elétrico é aplicado, os íons Na^+ e Cl^- e as moléculas de Tris sofrem ação das forças eletrostáticas.

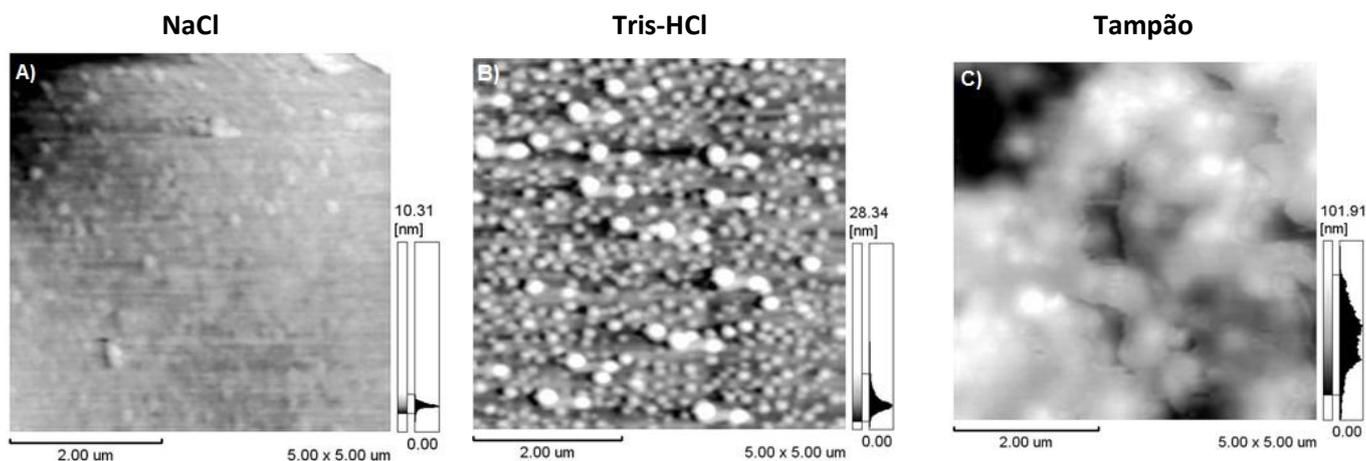


Figura 5.7: Topografia dos filmes obtidos pelos componentes da solução tampão sob efeito de um campo elétrico externo de 0 a 75 kV/m. A) 50 mM NaCl, B) 50 mM Tris e C) solução tampão.

O filme obtido pela deposição da solução tampão sob efeito do campo elétrico foi heterogêneo e apresentou agregados dispersos (Fig. 5.7-C). O controle foi feito pela deposição dos constituintes da solução tampão. O NaCl (Fig. 5.7-A) e o Tris (Fig. 5.7-B) formaram estruturas esféricas de diâmetro $127 (\pm 31)$ nm e $155 (\pm 36)$ nm, respectivamente, revestindo toda a superfície varrida.

As curvas de I-E dos controles são mostradas abaixo (Figura 5.8).

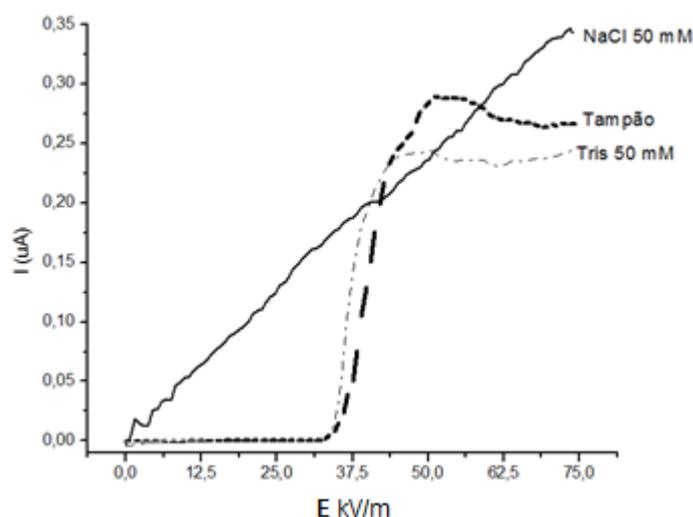


Figura 5.8: Gráfico de corrente em função da tensão aplicada sobre os componentes da solução tampão na canalita sobre lamínula siliconizada. Linha tracejada: solução tampão, linha contínua: solução de 50 mM NaCl e linha ponto-traço: solução de 50mM de Tris-HCl pH 8.

A curva da solução de 50 mM de NaCl aumentou linearmente com o campo elétrico, tratando-se de um simples caso de transporte iônico. Enquanto que a curva da solução tampão apresentou um comportamento similar a curva da solução de 50 mM de Tris-HCl pH 8, indicando uma forte contribuição das moléculas de Tris na migração dos íons. A corrente elétrica mantém-se desprezível até atingir um campo de 34 kV/m, quando passa a crescer rapidamente até saturar (Fig. 5.8). A corrente máxima obtida pelo tampão foi 0,29 μ A e pela solução de Tris 0,24 μ A.

5.3. Efeito do campo elétrico sobre as soluções de proteína GlnB-Hs na canaleta de polisiloxano

A influência da concentração da proteína na condutividade da solução e as estruturas nos filmes formados sobre a lamínula siliconizada foi avaliada pela deposição de GlnB-Hs nativa em diferentes concentrações e GlnB-Hs desnaturada na canaleta de polisiloxano com uma variação de campo elétrico de 0 até 75 kV/m (Fig. 5.9).

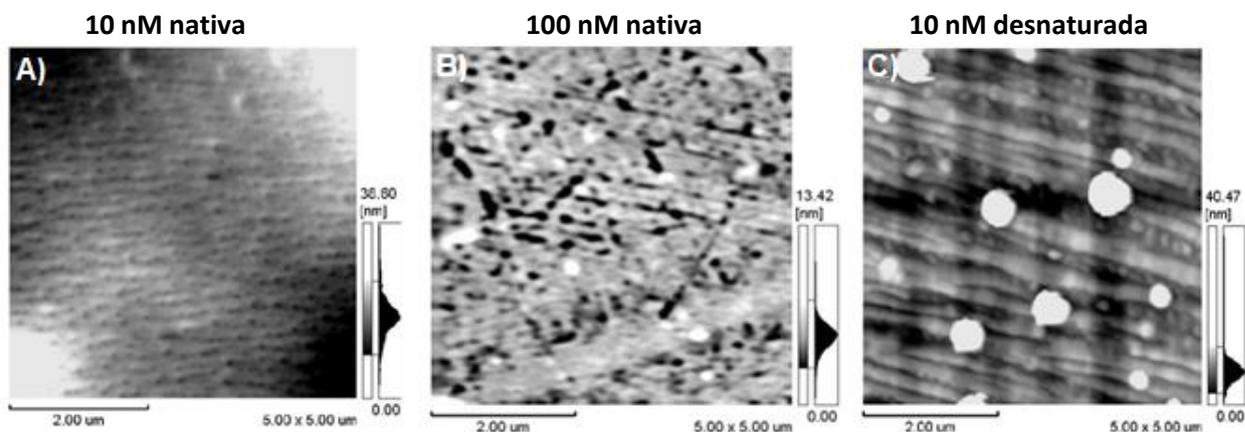


Figura 5.9: Topografia dos filmes obtidos pelas soluções de proteína GlnB-Hs sobre a lamínula siliconizada+canaleta de polisiloxano sob efeito de um campo elétrico externo de 0 a 75 KV/m. Solução de proteína GlnB-Hs: A) nativa 10 nM B) nativa 100 nM e C) desnaturada 10 nM.

A figura 5.9-A e 5.9-B mostram a topografia dos filmes de proteína GlnB-Hs de 10 nM e 100 nM, respectivamente. O filme com 10 nM de proteína apresenta orifícios de 50 (\pm 10) nm alinhados paralelamente com as linhas de campo cobrindo completamente a área varrida. Enquanto que, o filme formado pela solução de 100 nM de GlnB-Hs possui descontinuidades lineares tanto na mesma direção do campo aplicado como em ângulos maiores que 50°.

Como controle da possível mudança estrutural e até mesmo desnaturação das proteínas devido a alta tensão aplicada, 10 nM de GlnB-Hs já desnaturada foram depositadas. A imagem topográfica de MFA mostra que as moléculas de proteína desnaturadas da solução C estão alinhadas paralelamente ao campo elétrico externo, formando um filme contínuo (Fig. 5.9-C). Os fios possuem diâmetro de $166 (\pm 33)$ nm com mais de $5 \mu\text{m}$ comprimento. As estruturas supramoleculares esféricas presentes no filme têm $168 (\pm 27)$ nm de diâmetro.

As curvas I-E das soluções de proteína (Fig. 5.10) mostram que a corrente obtida é desprezível até o campo elétrico aplicado atingir um valor crítico de 10 kV/m e 15 kV/m para a GlnB-Hs nativa de 100 nM e 10 nM, respectivamente, e de 18 kV/m para a GlnB-Hs desnaturada.

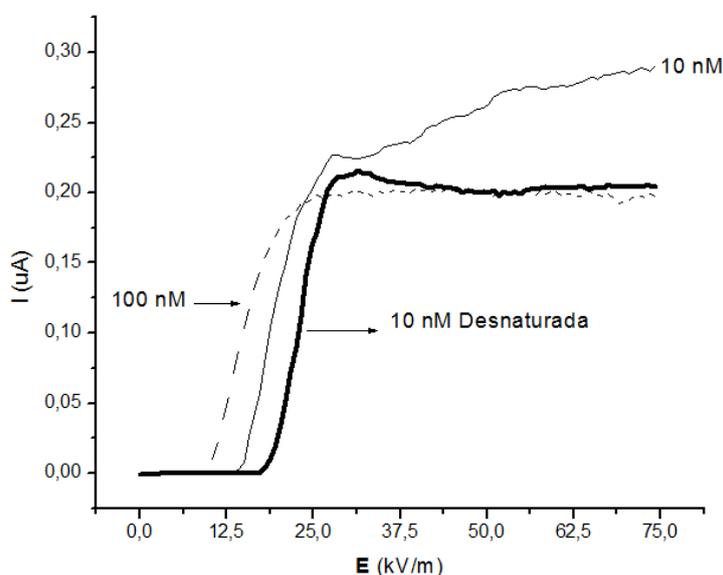


Figura 5.10: Gráfico de I-E das soluções de proteína GlnB-Hs sob a influência do campo elétrico externo sobre a lamínula siliconizada. Linha contínua: solução de 10 nM de GlnB-Hs nativa, linha tracejada: a solução de 100 nM de GlnB-Hs nativa e linha em negrito: solução 10 nM de GlnB-Hs desnaturada.

A corrente então cresce rapidamente até um determinado valor de acordo com o campo aplicado (tabela 5.1). A curva referente à solução de 10 nM de GlnB-Hs nativa continua a aumentar suavemente com a voltagem, porém para as soluções de 100 nM nativa e 10 nM desnaturada as correntes atingem um valor máximo que se mantém aproximadamente constante com o aumento do valor do campo externo até o campo máximo de 75 KV/m.

Tabela 5.1: Análise das curvas das soluções de proteína sobre lamínula siliconizada (referente a Fig. 5.10).

Solução de GlnB-Hs (nM)	Valor Crítico (kV/m)	Δt (s)	ΔI (μA)	ΔE (kV/m)	I_{max} (μA)	$E_{m\acute{a}x}$ (kV/m)
10 nativa	15	19	0,23	15	0,29	75
100 nativa	10	22	0,20	12	0,19	32
10 desnaturada	18	19	0,20	13	0,20	31

Na tabela 5.1 o valor crítico é o potencial antes da corrente começar a aumentar, Δt , ΔI e ΔE são as variações do aumento da corrente e I_{max} é o maior valor de corrente atingido e o E_{max} corresponde ao valor de **E** na corrente máxima.

6. Discussão: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a lamínula siliconizada

6.1. Efeito da umidade relativa do ar nas medidas de corrente elétrica e imagens de MFA

As lamínulas de vidro utilizadas como substrato são da empresa Hampton Research. Segundo o fabricante, o material de revestimento da lamínula é um organossilano de poucos micrometros de espessura.

Silano é um composto químico de fórmula química SiR_4 , em que R são grupos químicos que podem ser iguais ou diferentes entre si, reativos orgânicos e inorgânicos ou não reativos. Quando um silano apresenta pelo menos uma ligação carbono-silício o composto é chamado de organossilano.

A forma de organossilano mais utilizada é o silicone. Na biologia as lamínulas de vidro são revestidas com silicone com diferentes grupos funcionais químicos, para a adesão de biomoléculas na sua superfície, para estudos de microarranjos de DNA, estudos em microscópios e na cristalização de proteínas, por exemplo [45, 87].

Os silicones são elastômeros (polímeros que suportam grandes deformações antes da ruptura) inteiramente sintéticos formados por uma cadeia principal do tipo Si-O e radicais orgânicos ligados no átomo de Si através de ligações silício-carbono, como mostra a figura 6.1.

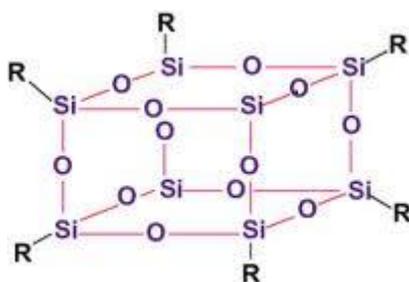


Figura 6.1: Fórmula estrutural da molécula de silicone genérico, em que R são grupo químicos que podem ser orgânicos ou inorgânicos.

A habilidade de vários silicones formarem filmes esta relacionada com sua estrutura molecular. Estes polímeros possuem baixa tensão superficial, o que facilita o espalhamento e penetração nos substratos [88].

Os filmes formados por silicone são hidrofóbicos, possuem alta plasticidade, alta resistência a altas temperaturas e flexibilidade a baixas temperaturas, são quimicamente inertes e possuem alta resistividade elétrica de superfície ($> 10^{13} \Omega \cdot \text{m}$) [89]. Além disso, os silicones são polímeros dielétricos

com grande polarizabilidade devido à grande eletronegatividade do carbono (2,55) em relação ao silício (1,90) [88, 90].

No cotidiano, substâncias hidrofóbicas entram constantemente em contato com água (como as folhas das plantas e micelas, por exemplo) e os mecanismos envolvidos ainda são motivo de estudo.

Para que qualquer líquido seja adsorvido por qualquer material é necessário que: 1) existam espaços livres suficientes no material para que a água interagir e 2) água sofra algum tipo de atração pelo outro material a nível molecular.

A estrutura e a dinâmica das moléculas de água são modificadas pela presença de uma superfície sólida, tanto pela mudança nas ligações de hidrogênio quanto pela alteração da movimentação molecular que depende da distância das moléculas de água em relação à superfície [91].

As superfícies hidrofóbicas têm baixa energia de superfície, o que implica em uma ausência de fortes atrações das moléculas de água com a superfície. Superfícies hidrofóbicas não formam ligações de hidrogênio. Quando água é colocada em contato com um material hidrofóbico, há minimização da área de contato da água com a superfície (Fig. 6.2). A atração entre as moléculas na gota puxa a água para sua forma esférica característica de gota [92]. O ângulo entre a superfície do líquido com a do sólido no ponto de contato é chamado de ângulo de contato (θ) [93].

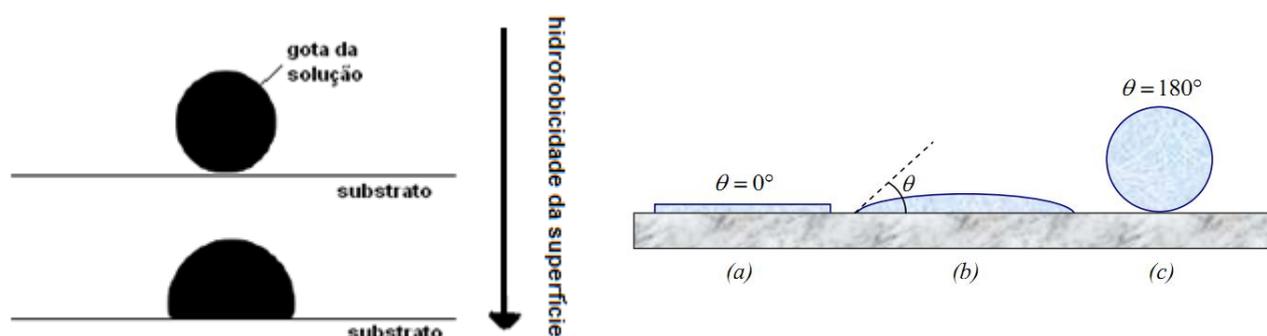


Figura 6.2: Superfícies hidrofóbicas. Quanto maior o grau de hidrofobicidade da superfície, maior o ângulo de contato com a gota de água. Superfície (a) superhidrofílica $\theta = 0^\circ$, (b) com molhabilidade parcial $0^\circ < \theta < 180^\circ$ e (c) superhidrofóbica $\theta = 180^\circ$ [93].

Apesar da água a tempos ser objeto de estudo, é pouco entendida devido ao seu comportamento anômalo quando comparada a outros líquidos. A dinâmica da água sobre superfícies é estudada através de modelos, experimentos ou simulações computacionais [92]. As teorias de interação água-superfície hidrofóbica envolvem as diferentes interações hidrofóbicas. As teorias mais difundidas sobre as interações hidrofóbicas são as que envolvem uma região ultrafina de baixa

densidade perto das áreas em contato. As atrações hidrofóbicas de longo alcance seriam por *depletion areas* [90] ou pela presença de nanobolhas nas áreas de baixa densidade [92, 94].

Outra explicação para a adsorção de água no substrato hidrofóbico seria a presença de sítios de impureza hidrofílicos que favorecem a adsorção de água e contaminantes na superfície do substrato [95].

Como o interesse principal desta tese não é a análise da interação da água com superfícies hidrofóbicas, postula-se que moléculas do vapor de água da atmosfera são adsorvidas na superfície da lamínula siliconizada, conforme estudos estabelecidos [91].

Moléculas de H₂O na forma de vapor estão presentes no ar. Além disso, devido às forças de van der Waals e ligações de hidrogênio alguns agregados moleculares também estão presentes na fase de vapor [8 APUD 96]. Como resultado, tanto moléculas de água quanto agregados estarão presentes na superfície do substrato no equilíbrio com o vapor de água do meio ambiente.

No equilíbrio, mesmo na ausência de sítios específicos de adsorção para a água na superfície hidrofóbica, ainda existirá uma quantidade de vapor de água na superfície e esta quantidade é dependente da umidade relativa [91, 96]. Estas moléculas de água são fracamente ligadas à superfície através das forças de van der Waals na interface [97].

A umidade relativa na superfície de qualquer dielétrico cria uma camada monoatômica parcial e que age para criar o precursor de um caminho, que permitirá à corrente fluir quando a amostra for exposta a um campo elétrico [96, 97].

As curvas de corrente em função do campo elétrico da lamínula de vidro siliconizada foram realizadas sob umidade relativa variando de 100 % a 40 % (Fig. 5.3-A). Antes da primeira medida o ambiente foi saturado com vapor de água e observou-se a formação de gotículas na superfície do substrato.

O valor de corrente aumenta com a umidade conforme mostrado na figura 5.3-A. Para umidades relativas abaixo de 55 %, observa-se que corrente é desprezível. Com os dados da figura 5.3-A um gráfico da corrente x umidade mostra a dependência da quantidade de água adsorvida sobre a lamínula com a corrente, figura 6.3.

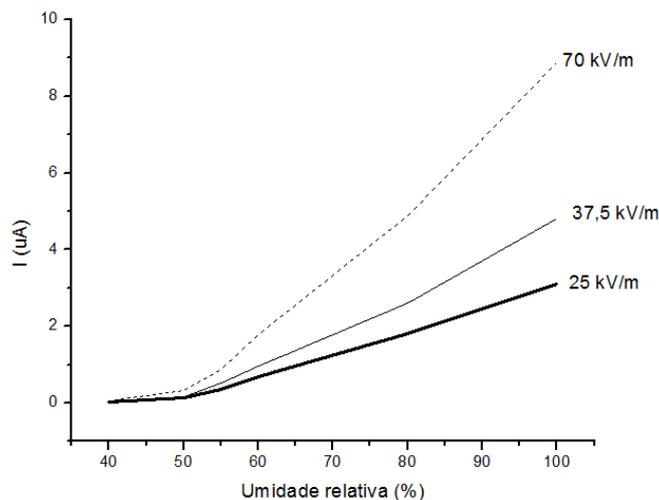


Figura 6.3: Gráfico de corrente em função da umidade relativa. Quanto maior a umidade, maior o valor de corrente medido sobre a superfície da lamínula siliconizada.

Este resultado indica que a corrente total medida é de superfície, ou seja, é a corrente que flui pela camada de água adsorvida na superfície e não pelo substrato. A corrente elétrica fluirá pelo material que oferecer menor resistência [50]. A resistividade da água ($1,82$ a $4,00 \cdot 10^5 \Omega \cdot m$) [98] é menor do que da superfície do organossilano que reveste a lamínula ($1,2 \cdot 10^{13} \Omega \cdot m$) [dado fornecido por Hampton Research].

Na presença de um campo elétrico aplicado ao longo da superfície, as moléculas polares de água na camada monoatômica parcial tendem a alinhar-se na direção do campo elétrico devido ao torque exercido no dipolo [9 APUD 96]. O alinhamento dos agregados de moléculas de água produz uma cadeia com grande momento de dipolo. Este alinhamento causa uma força de atração dipolo-dipolo entre as cadeias de agregados e as moléculas de água adjacente [96].

Podem surgir forças entre o campo elétrico não uniforme originado pela cadeia estendida e os momentos de dipolo de uma molécula de água adjacente [96, 97]. Se o campo elétrico for suficientemente alto, o gradiente nas interfaces da água tenderão a formar cadeias de dipolos conectando as moléculas, o que é análogo a cadeias de percolação [96], e estas cadeias efetivamente produzem um segmento na superfície que pode ter a habilidade de conduzir eletricidade.

Por isso, a aplicação de um campo elétrico não somente orienta os agregados de moléculas de água em pequenas cadeias, como também o campo elétrico não uniforme favorece o aumento do comprimento da cadeia devido às forças de dieletroforese [96].

Como resultado, o crescimento das cadeias ocorre ao longo da direção do campo elétrico aplicado até a formação de caminhos contínuos entre os eletrodos (Fig. 6.4). De fato, estes caminhos

de cadeias contínuas são equivalentes a ter um pequeno segmento na superfície recoberta com uma monocamada de moléculas de água.

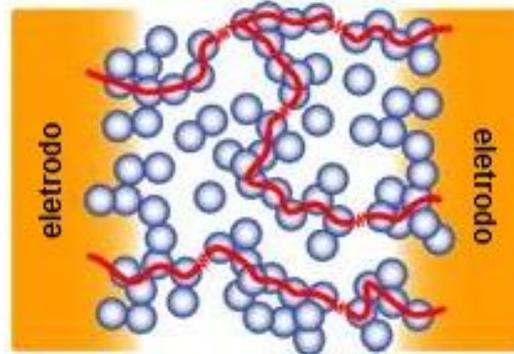


Figura 6.4: Desenho esquemático mostrando os caminhos formados pelos agregados de moléculas de água adsorvidas na superfície do substrato sólido e o possível caminho percorrido pela corrente (vermelho) [Adaptado de 99].

Segundo Seaver 2005 [96] uma estimativa do recobrimento da superfície devido à percolação das cadeias de moléculas de água pode ser substituída pela fração equivalente da superfície revestida (F_{ws}) em relação à superfície total. Uma vez que, se as moléculas de vapor de água são forçadas a ligarem-se em caminhos condutivos devido ao campo elétrico, então a área coberta por estas cadeias dependerá tanto da espessura (espessura correspondente a uma molécula de água) quanto da quantidade de cadeias [96].

A fração revestida (F_{ws}) por cadeias condutoras formadas por moléculas de água, para um caso ideal em que a superfície é ideal com encadeamento perfeito, é dada por [96]

$$F_{ws} = t_w^2 \left(\frac{f_{UR} p_{pv}}{KT} \right)^{2/3} \quad (6.1)$$

em que t_w é a espessura de molécula de água igual a $2,7 \text{ \AA}$ [96], f_{UR} é a fração da umidade relativa em % ($\% \text{ UR} = f_{UR}$), p_{pv} é a pressão de vapor para a temperatura T e K é a constante de Boltzmann igual a $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$.

Para as condições ambientes na qual as medidas de I-E foram realizadas, temperatura de 30°C e p_{pv} igual a 4233 Pa [100], temos que a fração revestida é dada pelo gráfico abaixo (Fig. 6.5).

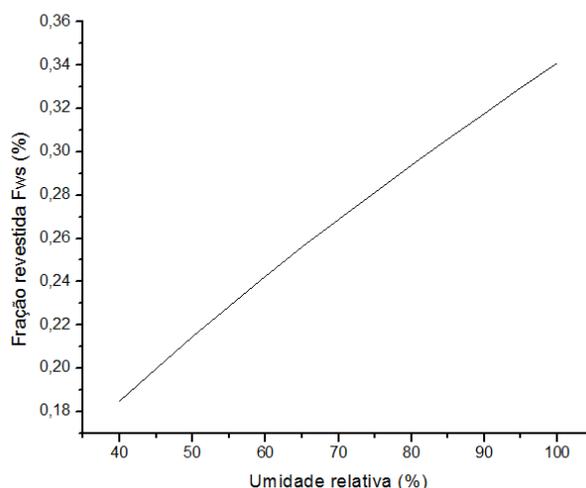


Figura 6.5: Gráfico de fração revestida por umidade relativa nas condições em que as medidas de corrente por campo elétrico foram realizadas, temperatura de 30 °C e pressão de vapor de 4233 Pa.

Considerando a figura 5.3-A, as correntes de superfície medidas acima de 55 % de umidade, indicam que o recobrimento é de 0,23 % da superfície. Assim, a cobertura de 0,23 % da superfície da lamínula siliconizada com moléculas de água adsorvidas é suficiente para percolar caminhos entre os eletrodos. Estes resultados estão de acordo com experimentos realizados sobre membrana de polieliteno oxidado em diferentes umidades, em que a corrente de superfície aumenta com a umidade relativa sobre o polietileno a 25 °C e em altas voltagens (300 kV/m) a corrente começa a ser detectada a partir de 52 % de umidade relativa [101].

Os dados da figura 5.4, lamínula siliconizada com a canaleta de polisiloxano, também mostram a dependência da corrente medida com a umidade relativa. Os valores de correntes medidos são maiores com o aumento da umidade relativa e, conseqüentemente, da concentração de moléculas de água adsorvidas na superfície.

Como um resultado de possíveis sítios hidrofílicos adicionais na superfície de dielétricos, a fração recoberta F_{ws} é sempre maior quando na presença dos mesmos [96]. A imagem topográfica da lamínula siliconizada+canaleta de polisiloxano com 5 μ l de água miliQ (Fig. 5.2-D), apresenta uma superfície heterogênea e instável em relação ao controle (Figura 5.2-B), indicando que uma camada de contaminação em equilíbrio com o ambiente reveste a superfície, lembrando que as amostras ficaram aproximadamente 1 mês no dessecador antes de serem analisados por MFA.

Os valores de corrente medidos para o substrato lamínula siliconizada são proporcionais a área. A ordem de grandeza da corrente de superfície para a lamínula siliconizada é 10 vezes maior do que os medidos para a lamínula com a canaleta de polisiloxano (Fig. 5.4). Este resultado está de acordo com a área total maior exposta a umidade do substrato de 20 mm², enquanto que a área da canaleta é de aproximadamente 2 mm². Estes resultados indicam a adequação do polisiloxano como material para a fabricação de um canal que não interferirá na análise das curvas de corrente em função do campo elétrico para as soluções com proteína.

Em altos teores de vapor de água (acima de 200 %), as propriedades da água adsorvida são muito similares aquelas de um volume de água depositado [91]. As curvas obtidas em umidade saturada (Fig. 5.3-A e 5.4) tem um mesmo comportamento para o volume de água miliQ depositado entre os eletrodos (Fig. 5.3-B e 5.4). A rápida subida da corrente corresponde ao transporte de cargas livres presentes na água adsorvida.

Considerando a resistividade da água igual a $2 \times 10^5 \Omega \cdot m$ [98] e a canaleta de 4 mm de comprimento com um volume de água de $5 \mu l$ e lembrando que $R_i = \rho_r \cdot L/A$, tem-se uma corrente de aproximadamente $0,2 \mu A$ para um campo de 30 kV/m , que esta de acordo com a ordem de grandeza das correntes obtidas nas figuras 5.3-B e 5.4. Assim, considera-se que a corrente medida é relativa a resistência da água.

Após atingir a saturação as correntes continuam a subir nas figuras 5.3-B e 5.4, possivelmente devido ao movimento de cargas resultantes de impurezas na superfície. A mobilidade dos íons presentes na superfície depende da presença de camadas completas de água adsorvidas, quanto maior a quantidade de água adsorvida maior a mobilidade dos íons presentes no sistema [97].

A dependência do valor de corrente com a quantidade de água adsorvida na superfície do substrato pode ser analisada pelas curvas de corrente x tempo com voltagem constante (Fig. 5.5 e Fig. 5.6).

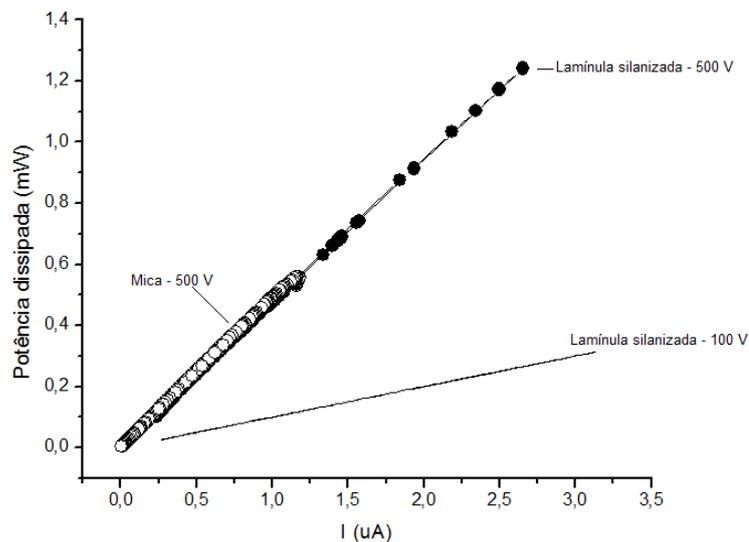


Figura 6.6: Gráfico de potências dissipadas x corrente da lamínula silicizada e mica (referentes às Fig. 5.5-A e 5.6-B) com voltagens constantes de 100 V e 500 V.

A figura 6.6 mostra a potência dissipada em função da corrente medida, $P_d \times I(t)$, para as figuras 5.5-A e 5.6-B. A potência $P_d = V \cdot I$ [50], em que V é 100 V e 500 V, com as respectivas correntes

medidas. Quanto maior a voltagem aplicada ao sistema, maior foi a potência dissipada, o que significa uma maior quantidade de energia térmica passando pelo mesmo.

Com a voltagem de 500 V a potência dissipada é maior fazendo com que as moléculas de água fracamente adsorvidas evaporem da superfície e, conseqüentemente, as correntes de superfícies medidas sejam menores. A corrente máxima de 0,33 μA é obtida para a menor voltagem aplicada (100 V).

O calor fornecido para a água na superfície para a tensão de 500 V ($\sim 0,112$ J) é suficiente para evaporar parcialmente a água adsorvida, mas não para causar danos a integridade estrutural da proteína. Lembrando que o calor específico para a água é de 4,18 J/gK [50] e que o volume de água utilizado no experimento é de 5 μl , mesmo considerando que todo o calor seja absorvido pela água, tem-se uma variação de temperatura máxima de aproximadamente 5 K. Este fato pode ser evidenciado comparando as imagens de MFA da GlnB-Hs nativa e desnaturada (Figura 5.9-A e 5.9-C). Nos filmes formados pela proteína nativa não foram observados fios, estrutura característica de proteína desnaturada, na imagem do filme formado por proteínas nativas.

Os substratos usados, mica e lamínula siliconizada, são dielétricos com características hidrofóbicas diferentes. A corrente de superfície medida depende da umidade relativa do ambiente, mas não depende das características dos substratos utilizados, como observado na figura 6.6.

Calculou-se a potência dissipada para as figuras 5.6-A e 5.6-B referentes às correntes por tempo com voltagens constantes de 100 V, 300 V e 500 V, apresentada nas tabelas 6.1 e 6.2, respectivamente. A potência inicial corresponde ao tempo de 10 s, a corrente mínima (ponto i) das figuras 5.6-A e 5.6-B, a potência 2 corresponde a corrente atingida logo após a tensão atingir o valor constante determinado. A potência máxima corresponde a corrente máxima atingida e a potência final corresponde ao último valor de corrente medido em 70 s.

Tabela 6.1: Potência dissipada para a curva corrente em função do tempo com tensão constante da lamínula siliconizada com canaleta de polisiloxano sob umidade relativa acima de 70 % (referente a Fig. 5.6-A).

Tensão aplicada (V)	Potência inicial i (μW)	Potência 2 (μW)	Potência máxima (μW)	Potência final (μW)
100	1,8	40	40	40
300	1,8	78	78	117
500	1,8	93	190	190

Tabela 6.2: Potência dissipada para a curva corrente em função do tempo com tensão constante da lamínula siliconizada com canaleta de polisiloxano e 5 μl de H_2O miliQ preenchendo o espaço entre os eletrodos (referente a Fig. 5.6-B).

Tensão aplicada (V)	Potência inicial (μW)	Potência 2 (μW)	Potência máxima (μW)	Potência final (μW)
100	2	13	46	46
300	2	110	135	129
500	2	84	84	210

A potência inicial para ambos os sistemas são semelhantes. Para ambos os sistemas a potência dissipada aumenta com o valor da tensão aplicada e, por isso a corrente medida é menor devido a uma menor concentração de moléculas de água na interface sólida/líquido para conduzir o fluxo de corrente. As potências dissipadas para a lamínula siliconizada/canaleta de polisiloxano com 5 μl de água miliQ são maiores, uma vez que a corrente medida é 0,05 ($\pm 0,01$) μA maior (Fig. 5.6-B). O valor da corrente medido depende da quantidade de água preenchendo a canaleta.

Estes resultados mostram que não há interferência da lamínula siliconizada e da canaleta de polisiloxano nas medidas de corrente por campo elétrico. As correntes medidas são de superfície e dependem da quantidade de solução preenchendo o espaço entre os eletrodos.

As imagens da topografia das lamínulas siliconizadas (Figuras 5.1 e 5.2) corroboram as curvas de corrente em função do campo elétrico sob variação de umidade relativa do ar, mostrando que não há alteração da superfície do substrato.

6.2. Efeito do campo elétrico sobre as soluções controles depositadas na canaleta de polisiloxano

Como discutido anteriormente o sistema formado pela lamínula siliconizada/canaleta de polisiloxano é um bom isolante de corrente elétrica (resistividade de superfície $> 10^{11} \Omega\cdot\text{m}$). Quando a canaleta é preenchida com um material mais condutor, a solução oferece uma resistência menor ao escoamento da corrente em relação ao substrato. Assim, a corrente passa através da solução entre os eletrodos. Para esta situação a resistência total é considerada como sendo a resistência da solução.

Os eventos que podem estar ocorrendo com os componentes da solução são: a migração dos íons (correntes iônicas), a polarização das macromoléculas, arraste e difusão dos componentes da solução.

As soluções depositadas na canaleta começam o processo de adsorção imediatamente após entrarem em contato com a superfície, entretanto não há tempo suficiente para chegar ao equilíbrio antes do campo elétrico ser aplicado.

Medidas de corrente em função do campo elétrico foram realizadas procurando estabelecer parâmetros que controlam o transporte de carga e massa atuantes na formação dos filmes de proteína obtidos na canaleta de polisiloxano sob a influência do campo elétrico aplicado.

A corrente total das soluções é dada pela corrente de transporte e pela corrente de deslocamento. Aqui a corrente de transporte é definida como a contribuição da migração dos íons e a movimentação de partículas carregadas positiva ou negativamente. A corrente de deslocamento é dada em termos da taxa de variação do campo elétrico, permitindo reter a noção de continuidade de corrente através de um capacitor, entretanto sem a transferência de cargas.

Considerando que o espaço entre dois capacitores de placas paralelas seja preenchido por material isolante (solução de proteína), pode-se obter a contribuição da corrente de deslocamento sobre a corrente total do sistema.

Um capacitor é um dispositivo utilizado para armazenar carga e energia. Um capacitor bastante comum é o de placas paralelas, formado por dois condutores muito próximos um do outro, com um isolante entre eles. Quando ligados a uma fonte de diferença de potencial, uma placa tem carga positiva e a outra carga negativa, e as cargas atraem-se mutuamente, até que a distribuição de cargas alcance o equilíbrio e a variação de corrente seja nula.

A razão entre a carga e o potencial, conhecido como capacitância C , de um capacitor de placas planas paralelas é dada por $C = Q/V = \epsilon_0 A/d$, em que Q é a carga, V é o potencial, ϵ_0 é a permissividade do vácuo, A é a área de cada placa e d a separação entre elas [50]. Assim, a capacitância depende do tamanho, forma e da disposição geométrica dos condutores e também do material isolante entre os condutores [50].

Quando um material dielétrico, neste caso a solução de proteína, é posto entre as placas do capacitor a capacitância aumenta por um fator K , característico do dielétrico, devido à diminuição do campo elétrico provocada pelo dielétrico [50]. Isto porque as moléculas do dielétrico provocam um campo em direção oposta à do campo original quando os momentos de dipolo das moléculas ficam alinhados com o campo externo em virtude do torque deste sobre as moléculas, polarizando-as.

A corrente de deslocamento para os sistemas analisados pode ser obtida pela derivada da carga $Q(t)$ que é dada por

$$Q(t) = C.V(t) = \frac{K.\epsilon_0.A}{L}.V(t) \quad (6.2)$$

em que K é a constante dielétrica do meio, ϵ_0 é a permissividade do vácuo, A a área do capacitor, L é o comprimento total do substrato entre os eletrodos e $V(t)$ é a tensão dependente do tempo. A geometria deste experimento não é de um capacitor de placas paralelas. No entanto, o cálculo tem caráter estimativo dos valores das correntes máximas que estariam envolvidas no processo de carga do capacitor.

Substituindo as variáveis na eq. (6.2) pelos dados experimentais para todos os sistemas formados sobre a lamínula siliconizada/canaleta, em que K da água utilizado foi 80, K_{NaCl} foi de 60, K_{Tris} igual a 1,76 [102] e uma aproximação para o $K_{tampão}$ de 56, ϵ_0 8.85 pF/m, A de 1,72 mm².

Os $dQ(t)/dt$ foram calculados no programa ORIGIN 6.0 (OriginLab) e os valores de corrente obtidos são da ordem de picoAmpère, indicando que a contribuição da corrente de deslocamento devido ao acúmulo de cargas nos eletrodos é desprezível.

Desta forma, pode-se dizer que a corrente total corresponderá à corrente de transporte, ou seja, a corrente medida é dada pelo **movimento** orientado dos íons **livres**, dissociação dos íons do Tris-HCl, arraste e polarização das proteínas devido ao campo elétrico externo. A corrente pode ser definida através da mobilidade dos portadores [50]

$$I = \sigma_f E = q\mu n E = qnu \quad (6.3)$$

em que σ_f é a condutividade do material em que o fluxo da corrente é estabelecido e é dependente da carga q dos íons, mobilidade μ e do número de portadores n.

A equação (6.3) representa uma corrente de condução, definida como o movimento de carga que se alinham mediante a atuação de um campo elétrico externo. Desta maneira, a densidade de corrente de condução num dado meio é proporcional a **E**. Esta relação é válida para meios eletricamente lineares ou de comportamento ôhmico.

A corrente para a solução 50 mM de NaCl depositada na canaleta (Fig. 5.8) apresenta crescimento linear com o campo elétrico aplicado.

A figura 5.8 do NaCl pode ser interpretada através da densidade de corrente. A densidade de corrente para cargas livres e uniformemente distribuídas é dada por

$$J = I/A \quad (6.4)$$

em que J é a densidade de corrente, I é a corrente elétrica dependente da velocidade de transporte (u) e do número de portadores (n) e A a área da seção reta.

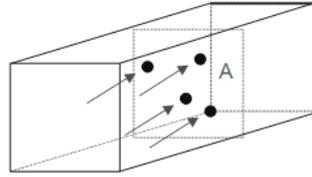


Figura 6.7: Cargas cruzando uma seção reta em um microcanal devido a um campo externo aplicado [Adaptado de 50].

A figura 5.8 da solução salina comporta-se como um resistor ôhmico linear, os íons Na^+ e Cl^- migram para os respectivos eletrodos. Os íons agregam-se por toda a área da canaleta, Figura 5.7-A.

As curvas de corrente em função do campo elétrico para as soluções de Tris-HCl, tampão e de proteínas apresentam um mesmo comportamento (Fig. 6.8). Podem ser divididas em 3 regiões: 1) a corrente desprezível no começo da medida até um valor crítico de campo elétrico. Está relacionada com a parte capacitiva do sistema, acumulando um desequilíbrio interno das cargas elétricas. 2) a corrente cresce rapidamente com o aumento de E até um determinado valor, chamado aqui de ponto de saturação. Este rápido crescimento foi atribuído predominantemente pela migração de cargas já livres na solução (intrínseco da solução, gerado por dissociação e ionização ou injetados). 3) a corrente permanece constante ou continua aumentando com o campo elétrico dependendo da solução, causado pela dissociação de íons Na^+ e Cl^- do sal e H^+ e Cl^- do Tris-HCl da solução tampão e/ou injeção de elétrons pelo anodo e de buracos pelo catodo.

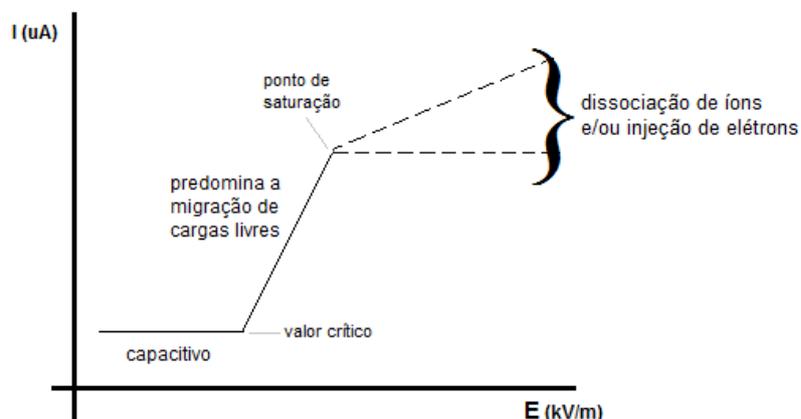


Figura 6.8: Gráfico da generalização do comportamento observado para as curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado, exceto para a solução 50 mM de NaCl.

O Tris ((HOCH₂)₃CNH₂ – tris(hidroximetil)aminometano) é um receptor amina primária de prótons de pK_a de 8.06 a 25 °C , usado na bioquímica como componente da solução tampão que auxilia na estabilidade da proteína. Uma forma comum de Tris é o Tris-HCl, que é um sal ácido e quando titulado até que o pH = pK_a com os correspondentes contra-íons (OH⁻ para o Tris-HCl e H⁺ para o Tris básico) apresentarão concentrações equivalentes [103].

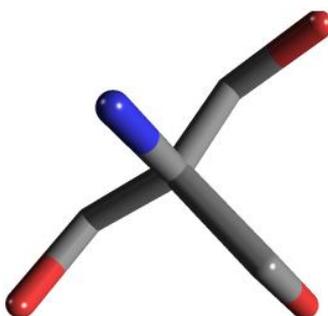


Figura 6.9: Desenho esquemático da molécula de Tris. Em vermelho são as OH⁻ e em azul é o NH₂⁺ [103].

As soluções usadas têm pH 8 e encontram-se próximo ao pK_a do Tris. Neste pH o Tris teria uma carga líquida próxima de zero, implicando em uma baixa migração destas moléculas. Considerando que a partir de aproximadamente 34 kV/m a corrente elétrica do Tris-HCl na canaleta de polisiloxano cresce rapidamente, julga-se que este valor de campo é suficiente para romper o equilíbrio elétrico do Tris-HCl com os íons atraídos pelas regiões de cargas opostas (Fig. 5.8).

Mesmo se o total de cargas em uma molécula é igual zero, os centros das cargas positivas e negativas pode não coincidir, resultando em um momento de dipolo elétrico permanente. Tais moléculas são ditas polares, como a molécula de Tris. Moléculas sem momento de dipolo permanente podem ter induzido um momento de dipolo através de um campo elétrico externo.

Quando o dipolo elétrico é posto em um campo elétrico uniforme, forças iguais e de sinais opostos agem na molécula (Figura 6.10). Na presença de um gradiente de campo elétrico o dipolo sofrerá uma força resultante que puxará a partícula eletrostaticamente.

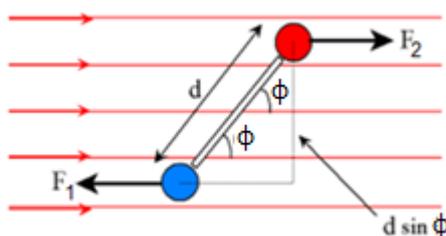


Figura 6.10: Dipolo elétrico em um campo elétrico. Se as forças atuantes não forem iguais ($F_1 \neq F_2$) a molécula migrará no sentido do maior F [Adaptado de 50].

Quando NaCl e Tris-HCl são misturados (solução tampão pH 8), os íons livres Cl^- podem interagir com o NH_2^+ da molécula de Tris. Devido ao valor de pH a ionização da solução tampão também ocorre aproximadamente em 34 kV/m (Fig. 5.8). Entretanto, como o número de portadores é maior o ponto de saturação é atingido para um valor de corrente 0,5 μA maior do que a solução Tris-HCl.

Após atingir o ponto de saturação, as correntes das soluções Tris-HCl e tampão mantêm-se constantes com o aumento do campo elétrico. Para isso ocorrer é preciso que o fluxo de portadores na solução seja constante. A concentração constante de íons pode ser obtida através da dissociação ou pela injeção de elétrons. Se a energia fornecida for suficiente, o eletrodo terá capacidade de doar elétrons, i.e., o anodo agirá como um gerador de cargas que encontrarão estados disponíveis nos componentes da solução. De fato, o catodo também poderá gerar cargas pela deficiência de elétrons (buracos).

Para a fabricação dos eletrodos foi utilizado tinta condutiva de grafite. Os átomos no grafite estão organizados como hexágonos (Figura 6.11), onde cada átomo de carbono ocupa um vértice. Neste arranjo cada carbono fica com um elétron livre, que formam uma ligação “deslocalizada” entre os átomos, semelhante à ligação metálica, o que resulta em uma boa condutividade ao longo do plano.

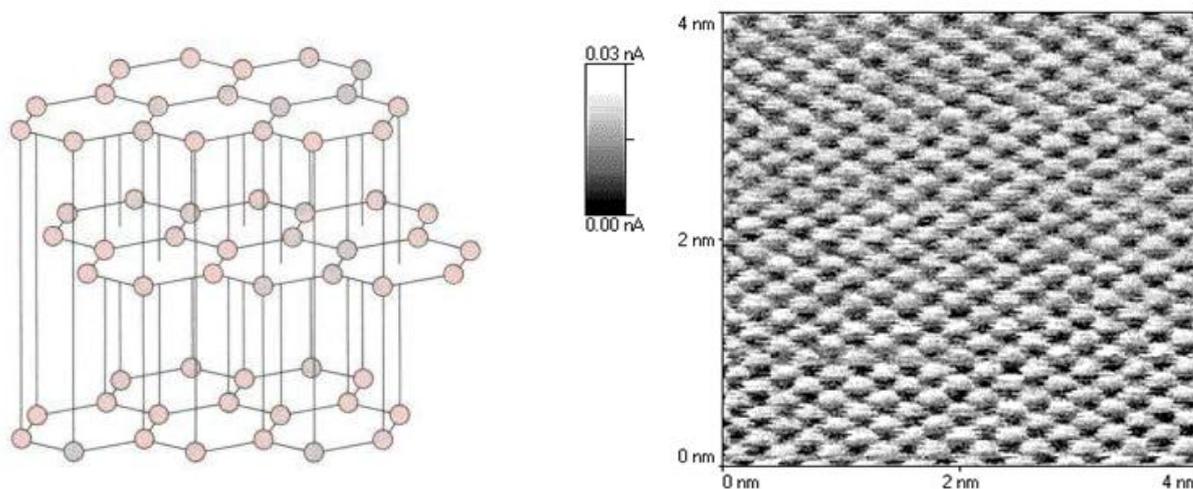


Figura 6.11: Desenho esquemático de uma estrutura do grafite cristalino. Folhas com os átomos de carbono (roxa) em arranjo hexagonal [Adaptado de 104]. Resolução da rede atômica dos átomos de grafite (carbono ordenado hexagonalmente) no plano cristalinos. Imagens obtidas no modo de contato [105].

Os elétrons de valência dos átomos de carbono podem se mover através de toda a área do eletrodo através de interações eletrostáticas. Assim, admite-se que o eletrodo é composto por dois tipos de cargas: partículas móveis carregadas negativamente (entretanto, presas ao eletrodo) e as espécies imóveis carregadas positivamente (íons da rede) [106, 107].

Na ausência do campo elétrico externo, os eletrodos são eletricamente neutros devido à presença da mesma quantidade de cargas opostamente carregadas. Quando um campo elétrico é aplicado, elétrons são redistribuídos na interface do eletrodo para compensar esta distorção externa, formando uma blindagem eletrostática, restringindo a migração dos elétrons ao corpo do eletrodo [106]. Por sua vez, isto leva a uma formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução. Conforme a densidade de carga nos eletrodos aumenta aparece um desequilíbrio na densidade de cargas na dupla camada elétrica, o que implica numa redistribuição das cargas livres na camada de difusão da solução para que a carga líquida do sistema seja zero.

No anodo, quando um E aplicado faz com que o potencial do elétron dentro do eletrodo seja maior do que o da solução e havendo estado de energia disponível na solução, o elétron tem a possibilidade de atravessar a DCE, através de um tunelamento quântico e proceder à migração pelo canal com a energia derivada do campo aplicado [108]. Argumento semelhante pode ser utilizado para o catodo, considerando que neste caso um elétron disponível na solução poderá encontrar estados disponíveis no eletrodo de grafite, gerando uma carga positiva junto ao catodo.

Quando a canaleta é preenchida com a solução Tris-HCl, as espécies carregadas de interesse que surgem da reação de protólise da água com as moléculas são o Tris neutro, sua forma protonada (TrisH^+), Cl^- e íons OH^- e H_3O^+ e mais os íons Na^+ e Cl^- na solução tampão [106]. Como a solução esta próxima do pK_a (8,06) as espécies encontram-se em equilíbrio de cargas.

Na presença de um campo elétrico externo, os íons de cloro e hidróxido podem receber elétrons do anodo



e a reação no catodo levam a um desequilíbrio na reação de protólise, aumentando a concentração de hidróxido próximo ao catodo e, conseqüentemente, reduzindo o TrisH^+ [106]



Na imagem de MFA do controle Tris-HCl pH 8 (Fig. 5.7-B) os agregados são aproximadamente 30 nm maiores em relação as observadas na imagem controle do NaCl (Fig. 5.7-A). Quando os dois componentes são misturados (solução tampão), a maior quantidade de material na solução e a interação entre as moléculas faz com que o filme obtido seja heterogêneo e sem agregados de estrutura definida (Fig. 5.7-C).

6.3. Efeito do campo elétrico sobre as soluções de proteína GlnB-Hs depositadas na canaleta de polisiloxano

Os mecanismos de adsorção para a proteína começam imediatamente quando colocados em contato com a superfície do substrato. A interação da proteína com a superfície hidrofóbica é forte [33, 44]. Assim, a presença de proteínas na solução origina uma nova dinâmica e equilíbrio entre as partículas da solução e na interface com o substrato.

A interação das proteínas da solução com o substrato leva ao aumento da concentração de moléculas de água e íons livres na solução. Os íons e moléculas do solvente antes ligados à proteína para estabilizar sua estrutura ficam livres quando a biomolécula adere fortemente à superfície hidrofóbica. A superfície da biomolécula que fica voltada para a interface sólida sofre fortes forças atrativas, direcionando os íons, moléculas de água e Tris para o volume da solução.

Íons livres, que se encontram afastados dos eletrodos, terão dificuldade em interagir com as proteínas sob efeito de um campo elétrico, afetando a distribuição de carga superficial da biomolécula, enquanto que outra parte dos íons estará participando da neutralização da densidade de cargas nas áreas próximas aos eletrodos.

Seguindo as mesmas hipóteses utilizadas para a análise das curvas de corrente das soluções controles, temos que a corrente obtida a baixos valores de campo refere-se à parte capacitiva, um valor crítico de campo elétrico é necessário para que as partículas livres comecem a migrar até atingir um ponto de saturação. Neste ponto, para manter-se a corrente constante ou para um novo aumento será necessária a formação de novos portadores de carga e/ou injeção destes pelos eletrodos em função do campo aplicado (figura 6.8).

Os valores de corrente total atingidos, os valores críticos de campo elétrico e os pontos de saturação da corrente são afetados pela presença das proteínas. Sendo uma macromolécula com dimensões maiores do que qualquer outro componente presente na solução, mesmo com a concentração de um milhão de vezes menor do que o Tris, esta deverá afetar o número líquido de portadores na solução, a mobilidade das moléculas, mudar os potenciais de ionização e de interação entre as moléculas e destas com a superfície.

A mobilidade da proteína deve ser levada em consideração, pois esta relacionada com as interações eletrostática entre as proteínas e as espécies do tampão, com as interações carga-dipolo e carga-dipolo induzido, bem como a dependência com o pH e o potencial zeta.

Entretanto, como a concentração (mM) dos componentes da solução tampão é 10^6 vezes maior que a concentração de proteínas (nM), a contribuição efetiva da proteína GlnB-Hs nas

correntes analisadas não se destaca. O efeito da orientação das soluções com proteína pelo campo aplicado é observado apenas pelas imagens de MFA.

Os valores críticos do campo elétrico necessários para que as partículas livres comecem a migrar são menores para as soluções contendo proteína (Fig. 5.10) em relação aos controles (Fig. 5.8) e é diretamente dependente do estado e concentração da GlnB-Hs. Quanto maior a concentração de GlnB-Hs, maior a probabilidade de mais proteínas estarem mobilizadas na interface líquido/sólido, de maneira a disponibilizar mais íons na solução. Já a proteína desnaturada apresenta mais sítios de interação devido à exposição dos radicais polares dos aminoácidos, além de uma mobilidade menor, necessitando de campos elétricos maiores para o transporte iônico.

As correntes de saturação também são menores nas soluções de proteína (Fig. 5.10), pois apesar do número efetivo de portadores ser maior, a mobilidade menor das proteínas e a interação forte com o substrato agem como obstáculos para o escoamento dos íons, além da velocidade e o livre caminho médio das biomoléculas poder ser afetado por colisões entre as partículas.

A grande concentração de sal no tampão aumenta a condutividade da solução e, assim, aumenta o valor da corrente total medida. Entretanto, ao mesmo tempo, esta maior concentração implica em uma concentração maior de contraíons na solução que se movem na direção oposta ao vetor campo elétrico, arrastando moléculas e diminuindo a mobilidade das macromoléculas.

Através do número de Reynolds pode-se fazer uma estimativa de como a proteína comporta-se na solução.

O número de Reynolds para um objeto em um fluido, chamado de número de Reynolds da partícula Re_p , é importante quando se considera a natureza do escoamento em volta da partícula [109]. Indicando sua velocidade de escoamento e a possibilidade de formação de vórtex.

Para uma partícula no fluido, o comprimento característico é o diâmetro da esfera e a velocidade característica é a velocidade relativa ao fluido [109]. A densidade e a viscosidade são as do fluido [109]. Assim, o Re para a GlnB-Hs na canaleta de polisiloxano é

$$Re = \rho u_0 L_0 \eta^{-1} \approx 10^{-12} \quad (6.7)$$

em que ρ é 1000 kg/m^3 e η é $1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, L_0 é o diâmetro da GlnB-Hs em nanômetros e a velocidade é da ordem de 10^{-3} m/s , levando-se em conta que o Δt é dado pelo tempo de subida da corrente (referente ao transporte das partículas na solução como foi estipulado anteriormente).

Para número de Reynolds muito pequenos, o fluxo ao redor da partícula é simétrico e não se separa e o arraste é considerado somente devido às forças de fricção na superfície da partícula [110]. Define-se que um fluxo laminar só existe para $Re \leq 0,1$, sendo que sob uma condição de baixo Re , a relação entre a força e a velocidade de escoamento é dada pela lei de Stoke [109, 110]

$$F = - (6\eta\pi a)u \quad (6.8)$$

a qual fornece a força de arraste para uma esfera de raio a em um fluxo estável e uniforme.

Uma aproximação da força de arraste para as proteínas GlnB-Hs sob o campo elétrico aplicado esta apresentado na tabela 6.3. A dificuldade de calcular e modelar o sistema reside em determinar a contribuição da corrente de arraste das proteínas na corrente total medida (migração dos íons). A velocidade u foi calculada supondo que as proteínas percorram os 4 mm de comprimento da canaleta e o tempo para isso é dado pelo Δt da rampa (Fig. 5.10).

Tabela 6.3: Força de arraste sofrida pelas proteínas GlnB-Hs sob campo elétrico externo.

Concentração de GlnB-Hs (nM)	Velocidade (mm/s)	Força (pN)
10	0,21	0,012
100	0,18	0,010
10 desnaturada	0,25	0,014

A tabela acima (tabela 6.3) indica que as proteínas desnaturadas sofrem uma maior força de arraste, pois a cadeia estendida tem menor mobilidade e um número maior de sítios de interação com íons da solução e com as paredes da canaleta. A força de arraste é predominante na migração da proteína (Figura 6.12), pois a ordem de grandeza da força elétrica que age diretamente sobre a proteína, que neste pH apresenta um excesso de carga negativa, é de 10^{-15} N.

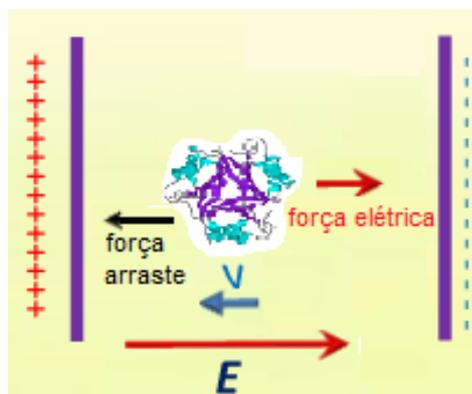


Figura 6.12: Desenho esquemático das forças sobre a proteína GlnB-Hs sob um campo elétrico aplicado. A força de arraste se sobrepõe na proteína, que em pH 8 apresenta excesso de carga negativa na superfície.

A eletrocinética da proteína GlnB-Hs na canaleta de polisiloxano é complexa e envolve todos os pontos ressaltados acima. As curvas de corrente em função do campo elétrico fornecem uma

pequena idéia de todo o processo de migração da GlnB-Hs. O uso de outras técnicas é necessário para fornecer mais dados sobre o sistema. Por exemplo, medidas do potencial zeta através do potencial de escoamento e informações sobre a mobilidade das proteínas obtidas por espalhamento de luz.

As imagens de topografia MFA das soluções de proteína (Figura 5.9) mostram filmes com alto grau de organização direcional. Para concentrações menores (Fig. 5.9-A e 5.9-C) a orientação é completa com as linhas de campo, enquanto para a solução de maior concentração as estruturas supramoleculares arranjam-se de modo que as descontinuidades não estão completamente orientadas com o campo (Fig. 5.9-B).

A orientação do polieletrólito através do campo elétrico externo resulta da interação entre os momentos elétricos moleculares (momento de dipolo permanente e dois momentos de dipolo induzidos) e a orientação do campo. Os momentos de dipolo podem ser de polarização covalente (eletrônica e atômica) ou devido à redistribuição dos íons na superfície das partículas.

Assim, a orientação das proteínas na presença do campo elétrico externo ocorre devido a um alto campo elétrico local. A não uniformidade do campo local implica em uma força no sentido para onde o campo é mais intenso, causando a sua migração e polarização da proteína.

Quando a proteína é colocada em um campo elétrico uniforme, cada carga do dipolo experimenta uma força igual e sentido oposto tendendo alinhar o dipolo paralelamente com o campo, i.e., ela experimenta um torque. Um tempo finito é necessário para que o momento de dipolo alinhe com o vetor do campo, ou seja, existe um tempo de relaxação (τ_{MW}) entre o campo estabelecido e a formação do dipolo induzido dependente das características condutivas do sistema [26, 62]. Desta maneira, se o vetor campo elétrico muda de direção, o vetor do momento de dipolo induzido deve realinhar-se com o vetor do campo elétrico, causando a rotação da partícula.

Quando a partícula rotaciona, esta experimenta torque e velocidade angular limitada pelo coeficiente de arraste, que depende da viscosidade do meio, geometria e propriedades da superfície da partícula [62].

Além da complexidade do comportamento individual das partículas em solução sob efeito do campo elétrico, estas interagem entre si. Existem pelo menos três tipos diferentes de mecanismos pelos quais uma partícula pode ligar-se a outra sob efeito de um campo elétrico: polarização da dupla camada elétrica, polarização através dos íons da camada de água e pela polarização do momento de dipolo da própria molécula [70]. As duas primeiras condições são fenômenos da interface partícula-soluto. A terceira condição é formada pelas moléculas em diferentes condições [70]:

- 1) Polarização da nuvem eletrônica dos átomos;
- 2) Movimento dos átomos em equilíbrio de carga na rede cristalina;
- 3) Polarização dos dipolos, especialmente das proteínas;
- 4) Pelas cargas criadas pelo aquecimento da solução;
- 5) As cargas que acumularam na superfície das partículas em movimento ao longo do substrato.

O gradiente de campo elétrico sobre as proteínas GlnB-Hs em solução resulta em filmes com alto grau organização das estruturas supramoleculares sobre a superfície da lamínula siliconizada. A não uniformidade do campo elétrico local altera a distribuição das concentrações de portadores adjacentes as biomoléculas, causando um desequilíbrio nas forças atuantes sobre a partícula. O grau de orientação da estruturas no filme depende da concentração da proteína. Para concentrações de 10 nM as estruturas supramoleculares de proteína GlnB-Hs, tanto nativa quanto desnaturada, orientaram com as linhas de campo.

Apesar do papel na orientação e migração da proteína, os componentes do tampão não formam arranjos organizados linearmente ao longo do campo elétrico (Fig. 5.7), como no caso da proteína (Fig. 5.9). Somente quando há proteína na solução arranjos lineares ao longo do campo elétrico são observados. Desta maneira, os componentes da solução tampão não interferem na análise da topografia obtida por MFA, consistindo em uma maneira efetiva de diferenciar os efeitos do campo elétrico na proteína depositada sobre lamínula siliconizada.

7. Resultados: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a mica

Para avaliar o efeito de um campo elétrico externo sobre a homogeneidade espacial, orientação e organização dos filmes de proteínas vários fatores foram analisados como taxa de variação de tensão de 3 V/s e 30 V/s, campos elétricos máximos de 30 e 75 kV/m e concentrações de GlnB-Hs. As soluções foram depositadas sobre mica muscovita imediatamente adjacentes ao eletrodo negativo e submetidas a campos elétricos de até 75 kV/m.

O possível transporte de massa e as mudanças morfológicas das estruturas supramoleculares dos filmes protéicos foram caracterizados por MFA. As curvas de corrente em função do **E** externo foram obtidas procurando entender-se a formação do filme resultante na migração dos íons e moléculas de Tris da solução e possível polarização das proteínas GlnB-Hs.

7.1. Efeito do campo elétrico no substrato e na água miliQ depositada sobre mica

Como controle a superfície da mica recém clivada foi analisada por MFA sob umidade controlada.

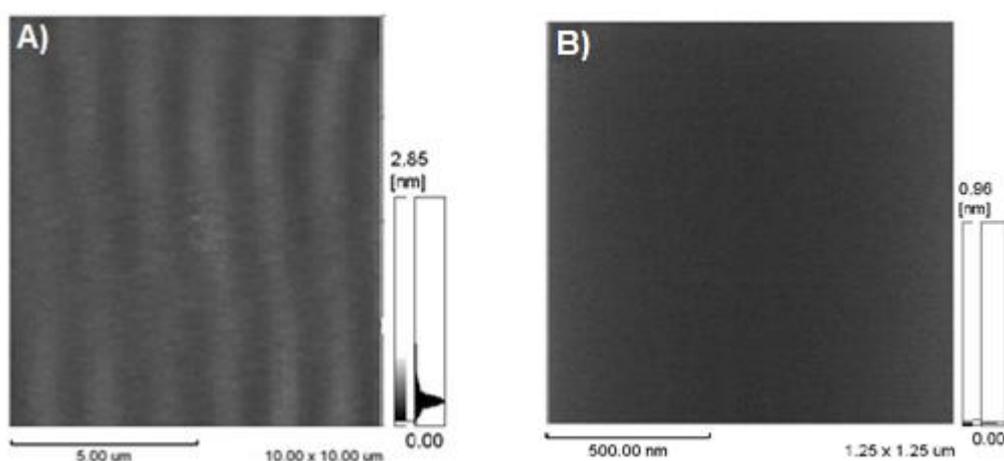


Figura 7.1: Topografia da superfície da mica muscovita recém clivada obtida por MFA operando no modo de contato. A) área de 100 μm^2 e B) aumento de 6x da área maior.

Nas figuras 7.1-A e 7.1-B a topografia da superfície da mica limpa próximas aos eletrodos antes da deposição das soluções e sem aplicação de campo é observada. As imagens mostram que a superfície do substrato é lisa e limpa com uma rugosidade de 0,11 nm.

Todos os experimentos foram realizados sob umidade relativa entre 45 – 70 %. Nestas condições, devido à alta energia de superfície da mica, água de contaminação do ambiente pode formar um menisco de água entre a sonda do MFA e a superfície da mica [29, 111]. Para verificar uma possível influência desta camada de contaminação na organização dos filmes, H₂O miliQ foi depositada na superfície da mica imediatamente adjacente ao eletrodo negativo e aplicado o campo elétrico com todos os diferentes procedimentos experimentais (campos elétricos de 75 kV/m e 30 kV/m com taxas de variação de 3 e 30 V/s).

As áreas próximas aos eletrodos de todas as amostras de H₂O miliQ sob efeito de campo foram analisadas por MFA. A formação de um filme descontínuo e homogêneo proveniente da água remanescente do volume depositado em equilíbrio com a camada de contaminação do ambiente foi observado (Figura 7.2).

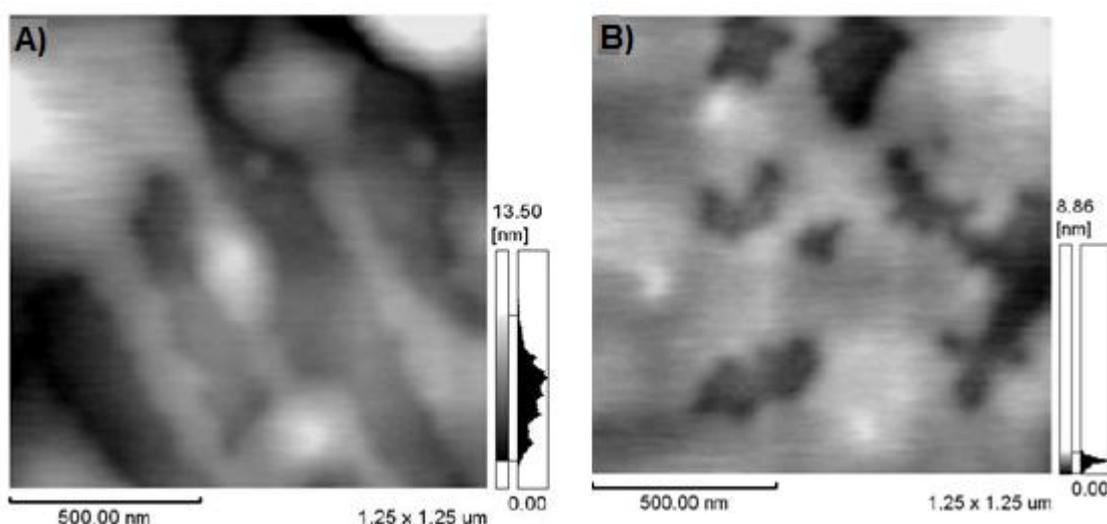


Figura 7.2: Topografia da água miliQ sob efeito de campo elétrico aplicado sobre mica. A) Próximo ao anodo (lado depositado) e B) próximo ao catodo. Campos elétricos de máximo de 75 kV/m e 30 kV/m com taxa de variação de 3 e 30 V/s.

7.2. Campo elétrico de 75 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.

As soluções foram depositadas na região adjacente ao anodo sobre a superfície da mica recém clivada de comprimento de 4 mm. Uma tensão de 0 a 300 V foi aplicada, com taxa de variação de 3 V/s. Desta forma, o campo elétrico máximo aplicado é de 75 kV/m, alcançado em 100s.

7.2.1. Soluções controles

Os filmes formados em ambos os lados adjacentes aos eletrodos pelas soluções de 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 e a solução tampão (50 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 8) sob efeito do campo elétrico são mostrados nas imagens topográficas da figura 7.3.

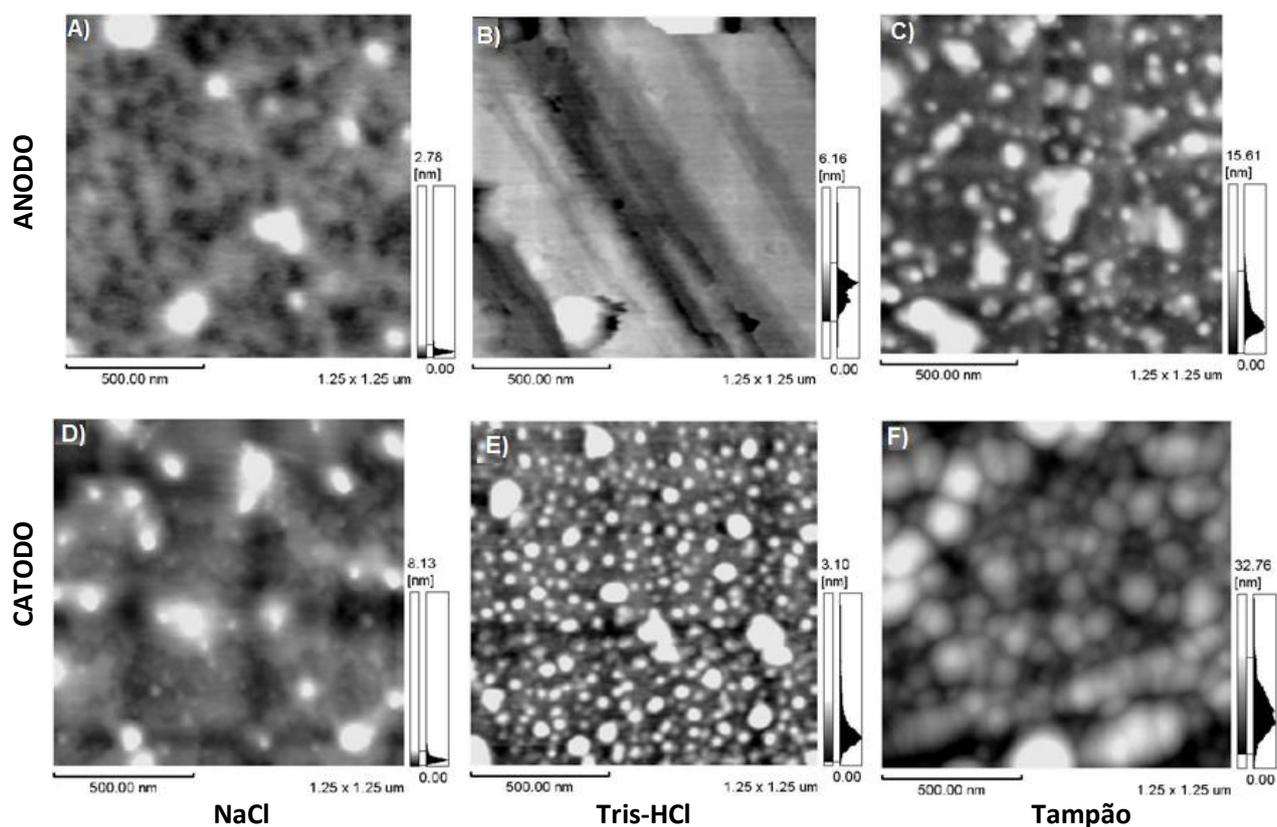


Figura 7.3: Imagens topográficas do efeito do campo elétrico de 75 kV/m nos componentes das soluções controle. A) – C) áreas próximas ao anodo (lado no qual a solução foi depositada) e de D) – F) áreas próximas ao catodo. A) e D) solução de 50 mM NaCl, B) e E) solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e C) e F) solução tampão.

O filme formado pela solução de NaCl em ambos os lados do substrato são heterogêneos e recobrem toda a área analisada (Fig. 7.3-A e 7.3-D). No lado próximo ao catodo os agregados de NaCl variam de 36 (\pm 8) nm a 200 nm.

As áreas varridas próximos aos eletrodos das amostras de solução de 50 mM de Tris-HCl (Fig. 7.3-B e 7.3-E) e da solução tampão (Fig. 7.3-C e 7.3-F) mostram filmes com padrões distintos. A figura 7.3-B mostra um filme com sulcos em ângulos de aproximadamente 57°, enquanto que ao lado do catodo a área apresenta agregados de 48 (\pm 8) nm revestindo toda a área analisada (Fig. 7.3-E). Para o filme obtido da solução tampão as áreas estão cobertas de agregados, sendo que na área próxima ao

anodo formam agregados com dimensões médias de 44 (± 8) nm e estão distribuídos aleatoriamente sobre a superfície, enquanto que próximo ao catodo os agregados globulares têm dimensões maiores que 50 nm, formando um filme descontínuo.

As curvas de I-E das soluções controles são apresentadas a seguir (Figura 7.4).

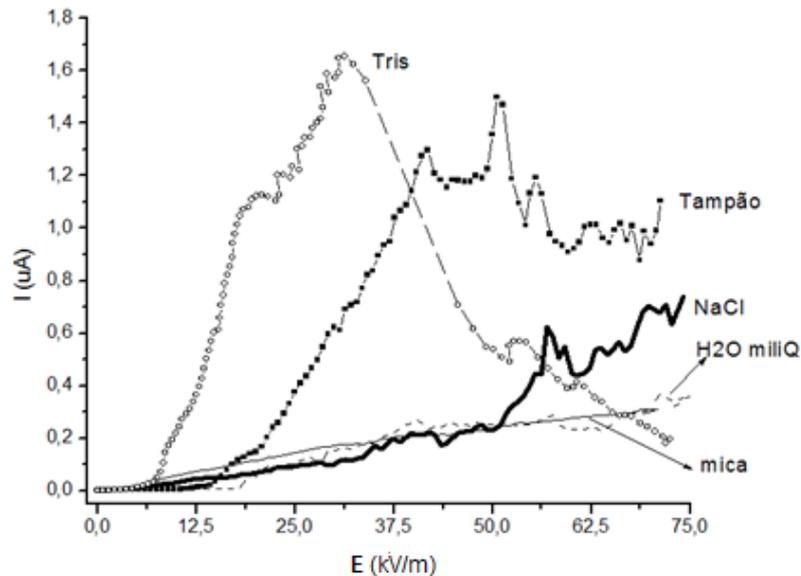


Figura 7.4: Gráfico de corrente em função do campo elétrico para as soluções controles depositadas paralelo ao anodo e um campo elétrico externo de 0 a 75 kV/m, com taxa de variação de 3 V/s. Linha contínua: substrato mica de 4 mm de comprimento, linha tracejada: água miliQ, linha em negrito: solução de 50 mM NaCl, linha com bolinhas brancas: solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e linha de bolinhas pretas: solução tampão.

As curvas controles do substrato mica recém clivada (Fig. 7.4, linha contínua) e da H₂O miliQ depositada adjacente ao anodo (Fig. 7.4, linha tracejada) apresentam o mesmo comportamento. A corrente aumenta de forma praticamente linear com o aumento da tensão aplicada. A corrente máxima de 0,35 μA é atingida no valor de campo elétrico máximo (75 kV/m).

A corrente medida para a solução de NaCl cresce suavemente até atingir um campo de 50 kV/m, então aumenta rapidamente de forma irregular até atingir o valor máximo de 0,74 μA (Fig. 7.4, linha em negrito). A corrente da solução Tris-HCl pH 8 (Fig. 7.4, bolinha branca) cresce rapidamente com o aumento da tensão e atinge uma corrente máxima de 1,42 μA para um valor de campo elétrico de 54 kV/m, então a corrente decai rapidamente com o aumento da tensão. A curva obtida pela solução tampão (Fig. 7.4, bolinha preta) cresce rapidamente com a tensão aplicada até 1,33 μA em 50 kV/m, decai suavemente e se mantém aproximadamente constante até o final da medida.

7.2.2. Soluções de proteína GlnB-Hs

As imagens de MFA das soluções A e B de proteína GlnB-Hs nativa mostram padrões diferentes (Figura 7.5).

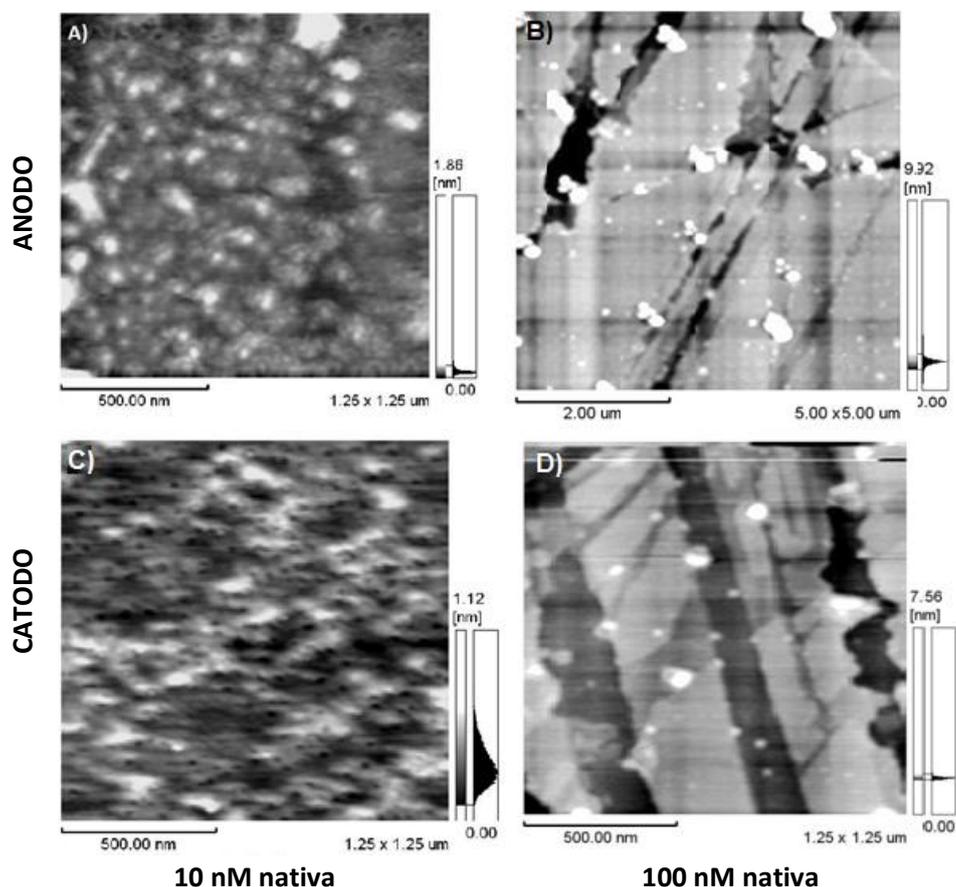


Figura 7.5: Topografia dos filmes de solução de proteína GlnB-Hs nativa de 10 nM (A e C) e 100 nM (B e D) sob efeito de um campo elétrico de 75 kV/m sobre a mica. Regiões próximas ao anodo A)-B) e ao catodo C)-D).

A topografia da área próxima ao anodo da solução de 10 nM de GlnB-Hs nativa apresenta um filme heterogêneo (Fig. 7.5-A), enquanto que próxima ao catodo estruturas supramoleculares de 52 (± 8) nm cobrem toda a área analisada (Fig. 7.5-C). Estas estruturas estão orientadas paralelamente com o campo aplicado. As imagens referentes ao filme obtido com a solução de maior concentração de proteína mostram filmes heterogêneos e descontínuos cobrindo toda a área varrida tanto próxima ao anodo quanto ao catodo (Fig. 7.5-B e 7.5-D, respectivamente). As descontinuidades variam de dezenas de nanômetros em largura e de 2 a 9 nm de profundidade e os agregados menores são de 50 (± 7) nm de diâmetro.

A proteína desnaturada também formou filmes descontínuos e heterogêneos (Fig. 7.6). As estruturas supramoleculares de 50 (± 8) nm de diâmetro (casas em destaque na Fig. 7.6-A) formadas

no lado no qual a solução foi depositada são mais nítidas na imagem de fase correspondente, Fig. 7.6-B. Enquanto que no lado oposto as estruturas possuem $36 (\pm 7)$ nm de diâmetro e se orientam em ângulos de aproximadamente 53° .

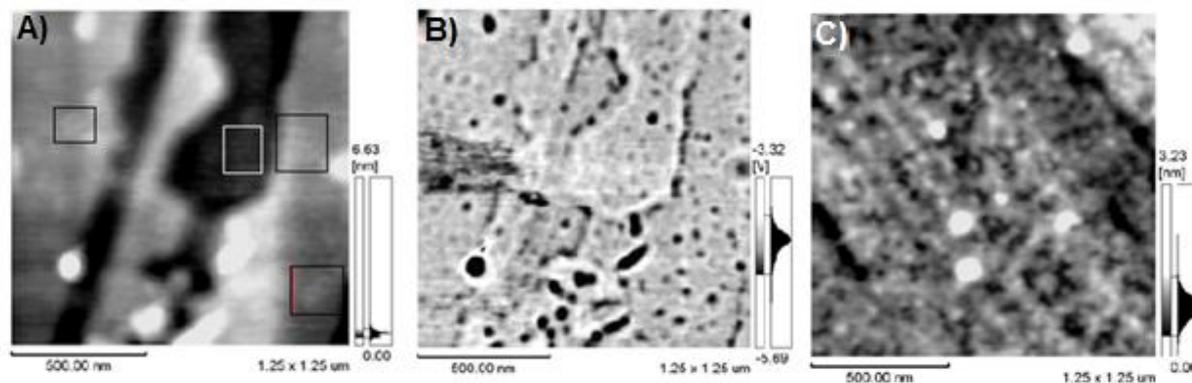


Figura 7.6: Filme da solução de proteína GlnB-Hs 10 nM desnaturada sob efeito de um campo elétrico de 75 kV/m sobre a mica. Área próxima ao anodo A) Topografia e B) fase e área próxima ao catodo C) topografia.

As curvas da corrente das soluções de proteína apresentam comportamentos diferentes (Figura 7.7). As soluções de 10 nM nativa (Fig. 7.7, linha contínua) e desnaturada (Fig. 7.7, linha em negrito) crescem rapidamente com o aumento da tensão até atingirem um $I_{\text{máx}}$ de $3 \mu\text{A}$ em 51 kV/m e de $2,5 \mu\text{A}$ em 40 kV/m , respectivamente. Enquanto a corrente da proteína nativa mantém-se aproximadamente constante após o pico máximo, a da proteína desnaturada decai até o valor de $1,3 \mu\text{A}$.

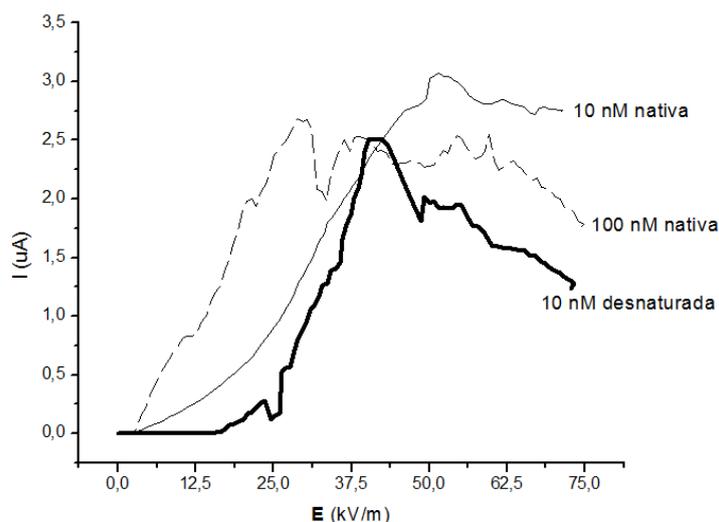


Figura 7.7: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado as soluções de proteína depositadas ao lado do anodo sobre mica. Linha contínua: Solução de GlnB-Hs 10 nM nativa, linha tracejada: solução de GlnB-Hs 100 nM nativa e linha em negrito: solução de GlnB-Hs 10 nM desnaturada.

A curva referente à solução de 100 nM de GlnB-Hs nativa (Fig. 7.7, linha tracejada) apresenta uma inflexão no campo de 3 kV/m. A corrente máxima é de 2,7 μ A em 29 kV/m.

7.3. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.

As soluções foram depositadas sobre a superfície da mica recém clivada de comprimento de 10 mm adjacente ao anodo. Uma tensão de 0 a 300 V foi aplicada, com taxa de variação de 3 V/s. Desta forma, o campo elétrico máximo aplicado é de 30 kV/m em 100s.

7.3.1. Soluções controles

A solução controle de NaCl formou agregados em ambas as áreas próximas aos eletrodos (Figura 7.8-A e 7.8-D). Ao lado do anodo os agregados são de 36 (\pm 7) nm de diâmetro e revestem toda a área analisada. Próximo ao catodo são em menor quantidade, com diâmetros de 45 (\pm 10) nm e aleatoriamente distribuídos.

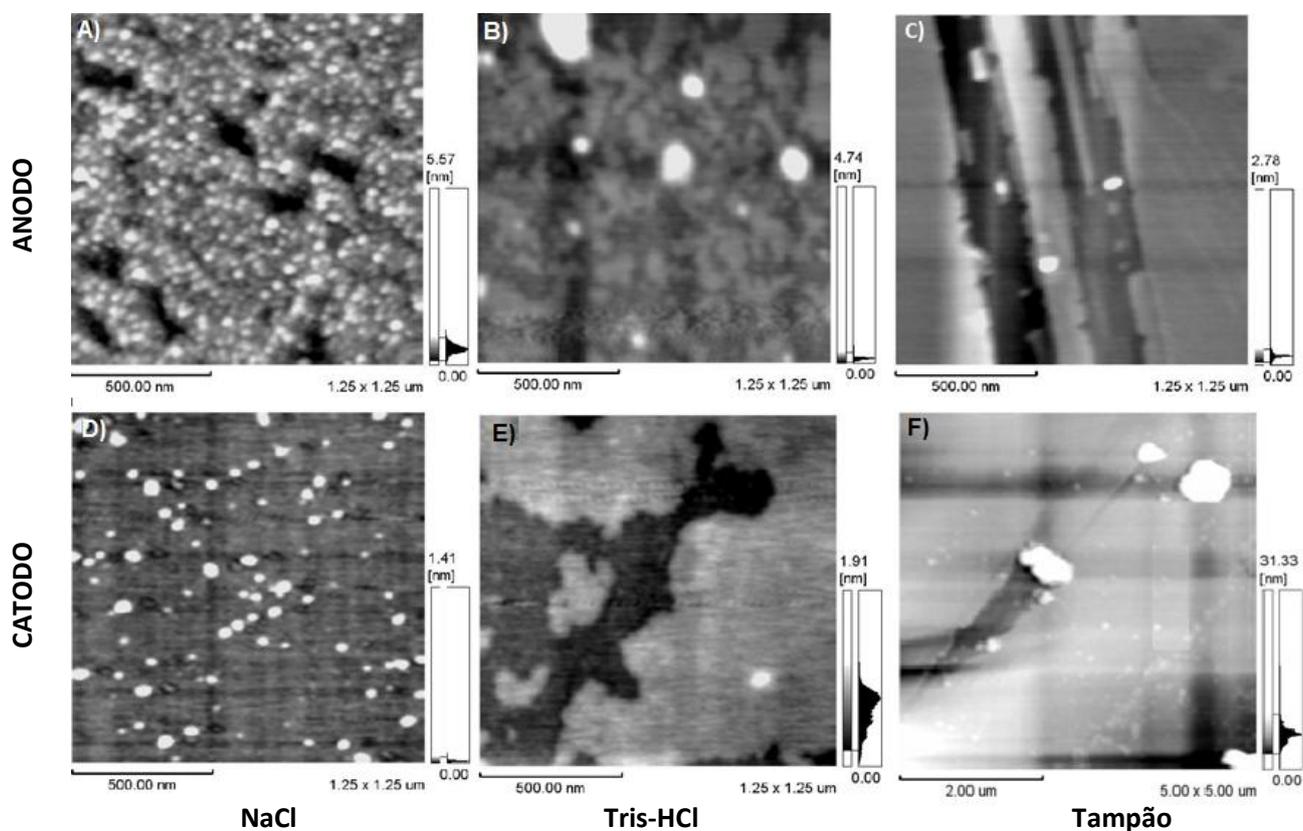


Figura 7.8: Efeito da tensão de até 300 V com passo de 3 V/s aplicados sobre as soluções controles na mica muscovita. Lado do anodo A)-C) e ao lado do catodo D)-F) para as soluções: 50 mM NaCl A) e D), 50 mM Tris-HCl pH 8 B) e E) e da solução tampão C) e F).

A solução de 50 mM de Tris-HCl (Fig. 7.8-B e 7.8-E) e a solução tampão (Fig. 7.8-C e 7.8-F) formam filmes descontínuos com poucos agregados maiores que 60 nm em todas as áreas analisadas. Os filmes da solução tampão cobrem melhor a superfície do substrato em relação ao da solução de Tris.

As curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado dos controles são mostrados abaixo (Figura 7.9).

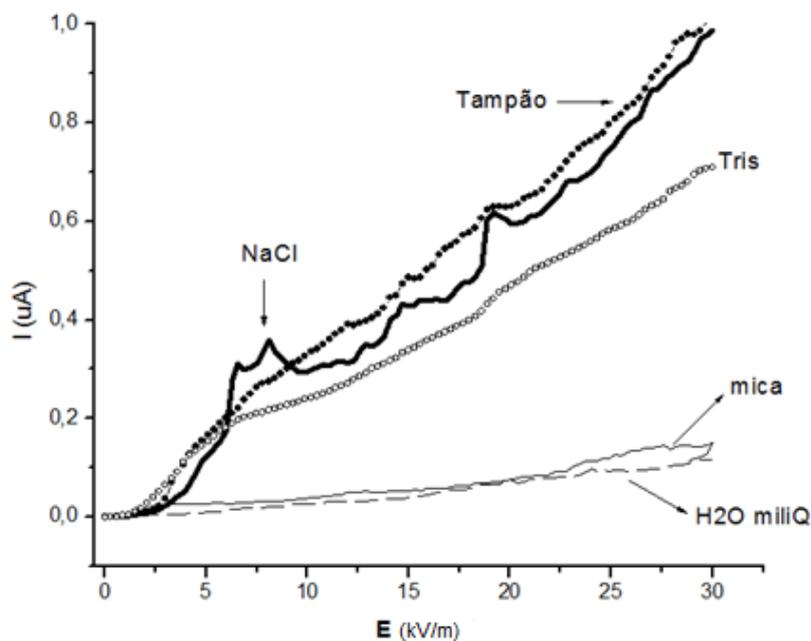


Figura 7.9: Gráfico de corrente em função do campo elétrico das soluções controles depositadas paralelo ao anodo e uma tensão de 0 a 300 V aplicada, com taxa de variação de 3 V/s. Linha contínua: substrato mica de 10 mm de comprimento, linha tracejada: água miliQ, linha em negrito: solução de 50 mM NaCl, linha com bolinhas brancas: solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e a linha com bolinhas pretas: solução tampão.

As curvas I-E para a mica recém clivada e da água miliQ depositada ao lado do anodo são semelhantes e a corrente máxima corresponde a tensão máxima aplicada (Fig. 7.9, linha contínua e tracejada, respectivamente). As curvas da solução Tris-HCl pH 8 (Fig. 7.9, bolinha branca) e da solução tampão (Fig. 7.9, bolinha preta) apresentam o mesmo padrão, em que a corrente cresce continuamente com o aumento do campo elétrico externo. Os valores de corrente máxima alcançados na solução tampão são 0,3 μ A maiores do que aqueles para a da solução Tris-HCl. A corrente da solução de NaCl também aumenta com a tensão aplicada, porém apresenta picos de corrente nos campos de 7, 8 e 19 kV/m.

7.3.2. Soluções de proteína GlnB-Hs

As imagens de topografia dos filmes formados pelas soluções de proteína sobre mica recém clivada e expostas a variação de tensão de 0 a 300 V em 100s são mostradas abaixo (Figura 7.10). As imagens superiores (A, B e C) são regiões ao lado do anodo e a imagens inferiores (D, E e F) são áreas varridas ao lado do catodo.

Os filmes das soluções de proteína nativa com diferentes concentrações são distintos entre si. Enquanto as soluções de GlnB-Hs nativas com 10 nM formou estruturas supramoleculares de 48 (± 12) nm de diâmetro (Fig. 7.10-A), a com 100 nM formou um filme heterogêneo e descontínuo na área próxima ao anodo (Fig. 7.10-B), revestindo por completo a superfície da mica. Do lado do catodo os agregados da solução menos concentrada, são 10x maiores e em menor quantidade (Fig. 7.10-D) e o filme da solução mais concentrada não reveste toda a superfície do substrato (Fig. 7.10-E).

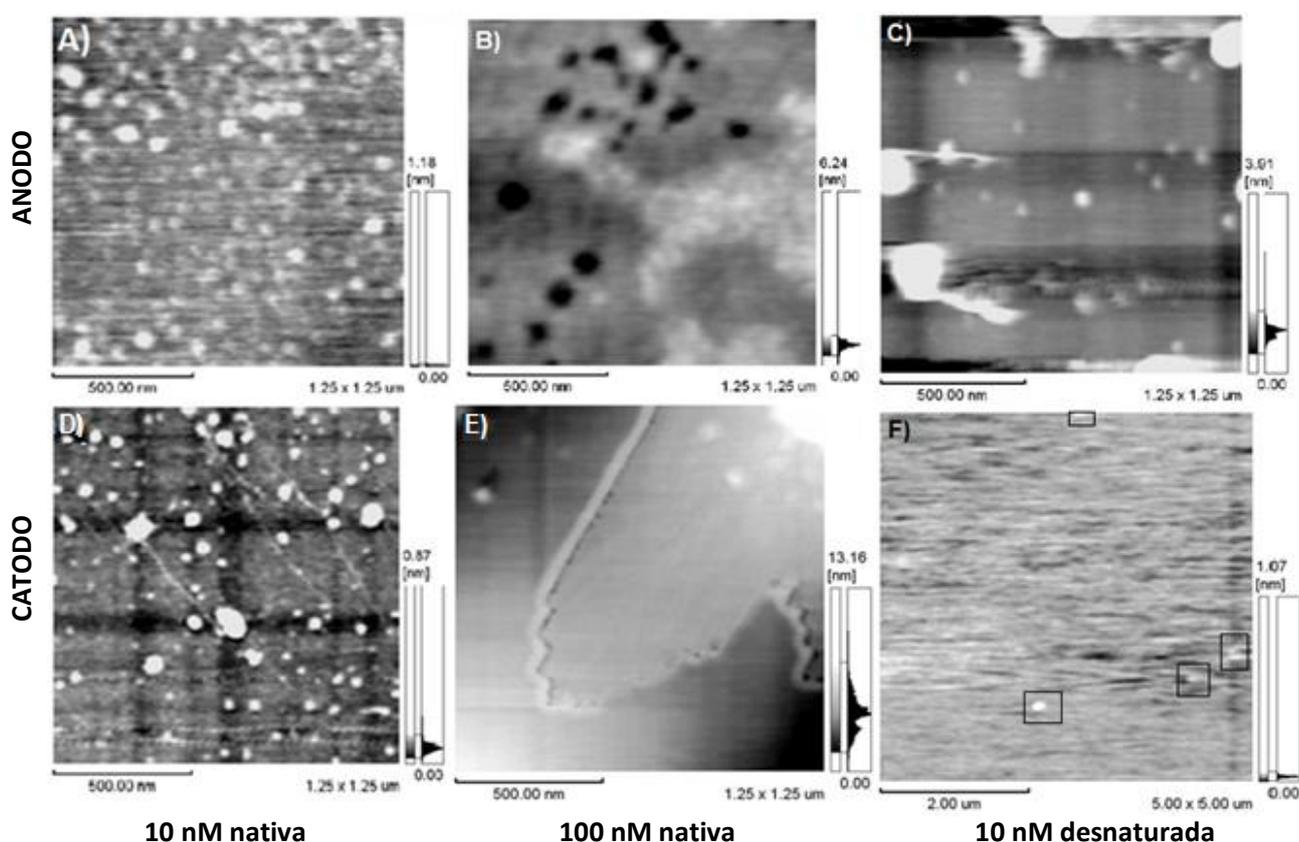


Figura 7.10: Topografia dos filmes da solução de proteína 10 nM nativa (A e E), 100 nM nativa (B e D) e 10 nM desnaturada (C e F) expostas a um campo de 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s sobre mica. Áreas próximas ao anodo (lado no qual a solução foi depositada) A) a C) e áreas próximas ao catodo D) a F).

A amostra da solução com proteína desnaturada é instável e de difícil análise por MFA, como observado pela deformação dos agregados maiores da figura 7.10-C e ruídos na figura 7.10-F. Nesta amostra não foram observadas estruturas em fio, características de proteína desnaturada. Na Figura 7.10-F em destaque estão alguns agregados observados na área próxima ao catodo.

As correntes elétricas para as soluções de proteína mantêm-se constante até atingir um valor crítico de campo elétrico (tabela 7.1), então crescem rapidamente com o aumento da tensão aplicada até um patamar (Figura 7.11). Depois, as correntes das soluções de proteína continuam crescendo até o maior campo aplicado.

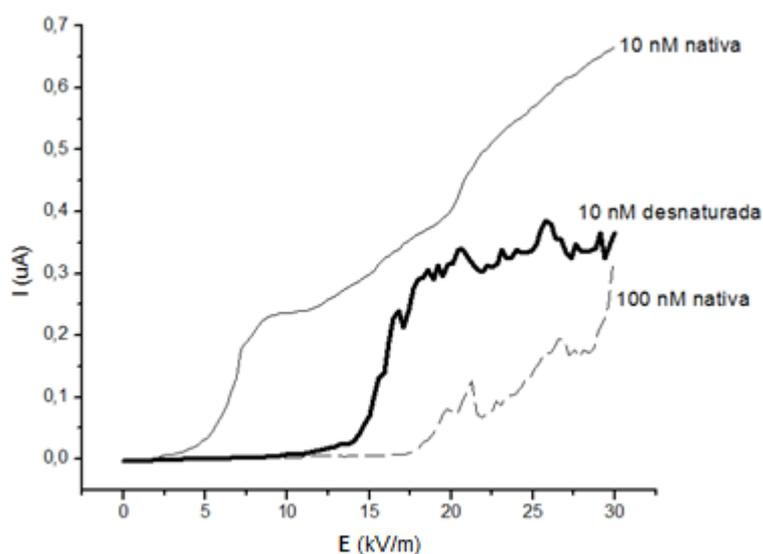


Figura 7.11: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado às soluções de proteína depositadas ao lado do anodo sobre mica e expostas a uma tensão de 0 a 300 V com taxa de variação de 3 V/s. Linha contínua: solução de GlnB-Hs 10 nM nativa, linha tracejada: solução de GlnB-Hs 100 nM nativa e linha em negrito: solução de GlnB-Hs 10 nM desnaturada.

Tabela 7.1: Análise das curvas das soluções de proteína sobre mica com taxa de variação de 3 V/s (referente a Fig. 7.11).

Solução de GlnB-Hs (nM)	Valor Crítico (kV/m)	Δt (s)	ΔI (μA)	ΔE (KV/m)	I_{max} (μA)	E_{max} (KV/m)
10	2	33	0,26	10	0,67	30
100	17	14	0,12	4	0,32	30
10 desnaturada	12	27	0,3	9	0,38	26

Na tabela 7.1 o valor crítico é o potencial antes da corrente começa a crescer, Δt , ΔI e ΔE são as variações do aumento da corrente e I_{max} é o maior valor de corrente atingido e o E_{max} corresponde ao valor de E na I máxima.

7.4. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 30 V/s.

As soluções foram depositadas sobre a superfície da mica recém clivada de comprimento de 10 mm adjacente ao anodo. Uma tensão de 0 a 300 V foi aplicada, com taxa de variação de 30 V/s. Desta forma, o campo elétrico máximo aplicado é de 30 kV/m em 10s.

7.4.1. Soluções controles

As imagens topográficas da solução de NaCl mostram agregados de 62 (± 6) nm de diâmetros revestindo toda a superfície do substrato ao lado do anodo (Fig. 7.12-A), enquanto que na imagem de 25 μm^2 da área próxima ao catodo os agregados de 119 (± 19) nm de diâmetro são em menor quantidade e mais distribuídos na superfície varrida (Fig. 7.12-D).

A amostra da solução de Tris-HCl pH 8 é instável e de difícil análise por MFA. Nestas imagens são observados agregados de 50 a 100 nm em ambos os extremos do substrato (Fig. 7.12-B e 7.12-E). A solução tampão formou filmes heterogêneos revestindo toda a superfície da mica investigada (Fig. 7.12-C e 7.12-F). Os agregados de forma esférica têm 101 (± 16) nm de diâmetro estão dispostos aleatoriamente no filme. Na figura 7.12-C, agregados em forma de charuto com tamanhos de 50 a 300 nm de comprimento são observados.

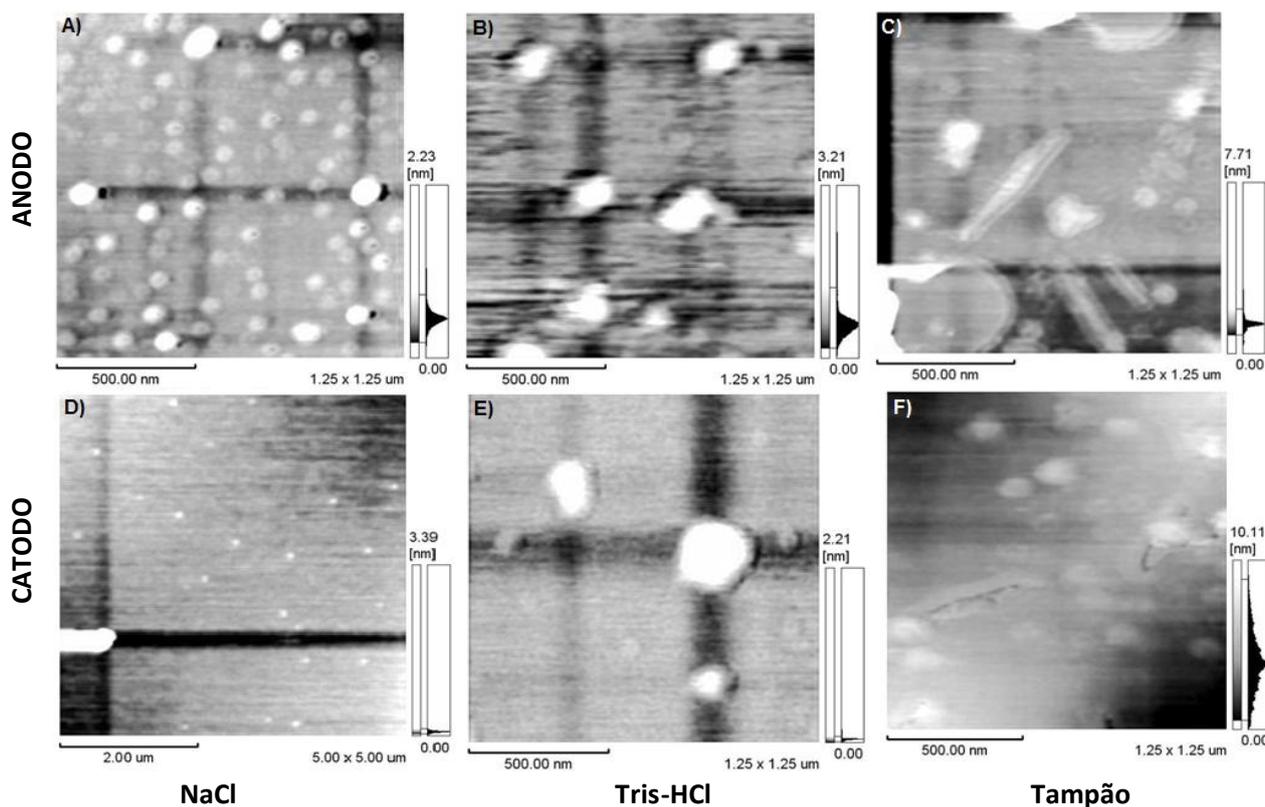


Figura 7.12: Efeito da tensão de até 300 V com passo de 30 V/s aplicados sobre as soluções controles na mica muscovita. Lado do anodo A)-C) e ao lado do catodo D)-F) das soluções: 50 mM NaCl (A e D), 50 mM Tris-HCl pH 8 (B e E) e da solução tampão (C e F).

As curvas da corrente medida na mica limpa e com água miliQ depositada coincidem (Fig. 7.13, linha contínua e tracejada) e atingem máximos de $0,19 \mu\text{A}$. A corrente da solução de NaCl mantém-se constante até o valor crítico de 89 V, então a corrente aumenta rapidamente para $0,2 \mu\text{A}$ e continua aumentando com a tensão aplicada até o valor máximo de $0,6 \mu\text{A}$ (Fig. 7.13, linha em negrito).

As curvas I-E da solução tampão e da solução de Tris-HCl pH 8 (Fig. 7.13, bolinha preta e branca, respectivamente) têm padrões semelhantes, em que inicialmente a corrente aumenta suavemente e depois de 14 kV/m a taxa de crescimento é maior. A diferença entre as correntes máximas atingida no valor de tensão máximo é de $0,3 \mu\text{A}$.

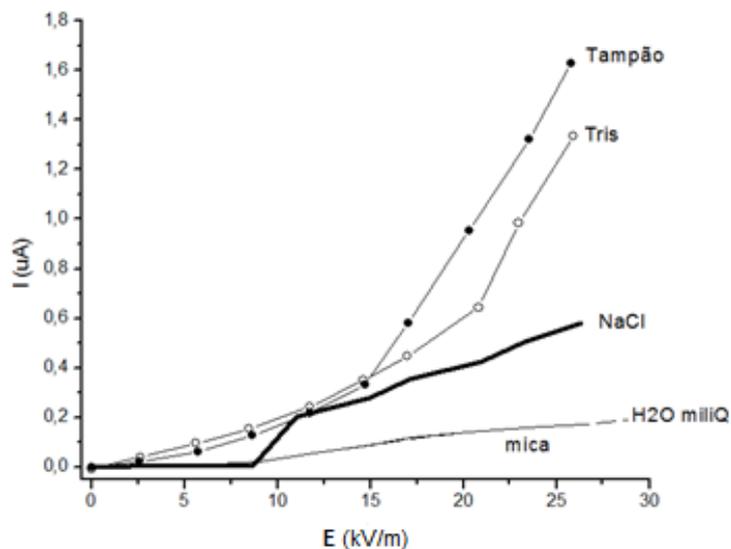


Figura 7.13: Gráfico de corrente em função do campo elétrico das soluções controles depositadas paralelo ao anodo e uma tensão de 0 a 300 V aplicada, com taxa de variação de 30 V/s. Linha contínua: substrato mica de 10 mm de comprimento, linha tracejada: água miliQ, linha em negrito: solução de 50 mM NaCl, linha com bolinhas brancas: solução de 50 mM Tris-HCl pH 8 e linha com bolinhas pretas: solução tampão.

7.4.2. Soluções de proteína GlnB-Hs

As figuras 7.14-A a 7.14-D mostram os filmes formados pelas soluções de proteína nativa de 10 nM e 100 nM, respectivamente, depositadas ao lado do anodo na mica e expostas a um campo elétrico de máximo de 30 kV/m com uma taxa de variação de 30 V/s.

As estruturas supramoleculares que revestem toda a superfície do substrato na área em que a solução com 10 nM de GlnB-Hs foi depositada são de 44 (± 9) nm de diâmetro e estão em um ângulo de aproximadamente 53° em relação à direção do campo elétrico (Fig. 7.14-A). Já na extremidade oposta, figura 7.14-C, aparecem agregados isolados maiores que 80 nm sobre a mica. O filme formado pela solução com 100 nM de GlnB-Hs é heterogêneo e descontínuo em ambas extremidades do substrato (Fig. 7.14-B e 7.14-D).

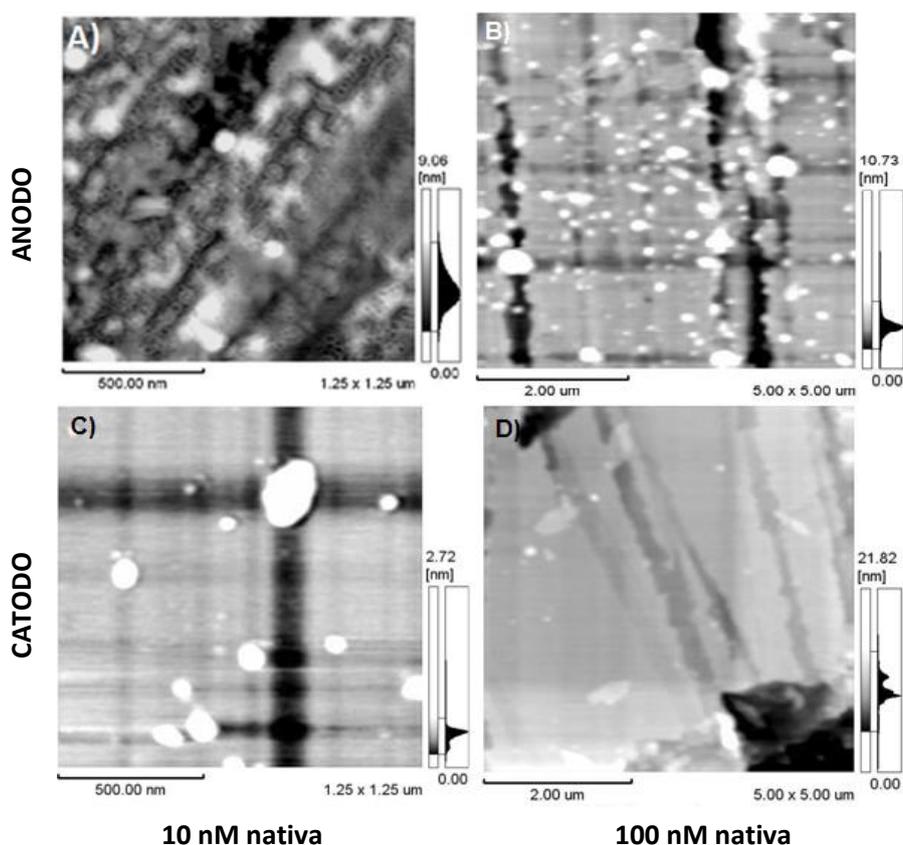


Figura 7.14: Topografia dos filmes de solução de proteína GlnB-Hs nativa 10 nM (A e C) e 100 nM (B e D) sob efeito de um campo elétrico de 30 kV/m sobre a mica. Regiões próximas ao anodo A)-B) e ao catodo C)-D).

As proteínas desnaturadas aparecem em arranjos supramoleculares em forma de fios orientados em relação ao campo aplicada nas áreas próximas a ambos os eletrodos (Fig. 7.15-A e 7.15-B). Os fios da figura 7.15-A têm uma largura de $40 (\pm 12)$ nm e de comprimento são maiores que $5 \mu\text{m}$. Na extremidade ao lado do catodo, os fios de aproximadamente 5 nm estão dispersos em um filme e são melhor visualizados na imagem de fase, Fig. 7.15-C.

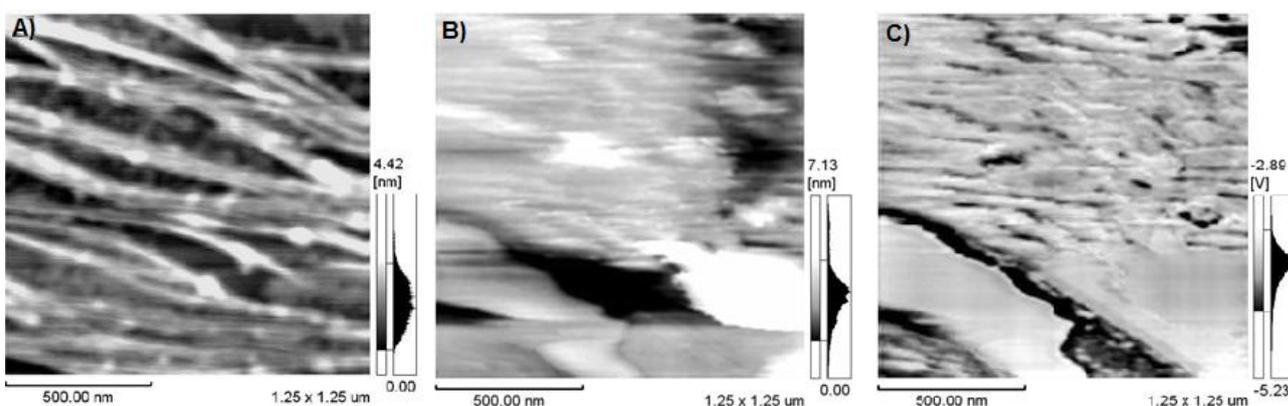


Figura 7.15: Filme da solução de proteína GlnB-Hs 10 nM desnaturada sob efeito de um campo elétrico de 30 kV/m sobre a mica. Área próxima ao anodo A) Topografia e área próxima ao catodo B) topografia e C) fase.

As curvas das soluções de proteína nativa mantêm-se constante até 18 kV/m (Fig. 7.16, linha contínua e tracejada), então a corrente cresce rapidamente até o valor máximo de 0,67 μA para a de 10 nM e de 0,29 μA para a solução mais concentrada. O valor crítico para a solução de proteína desnaturada é de 110 V, então a corrente cresce rapidamente com o aumento da tensão aplicada até atingir o máximo de 2,8 μA na tensão máxima de 300 V (Fig. 7.16, linha em negrito).

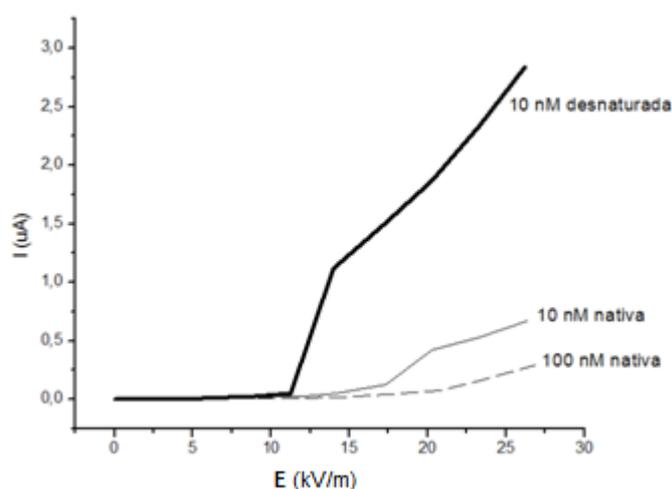


Figura 7.16: Gráfico de corrente em função do campo elétrico aplicado as soluções de proteína depositadas ao lado do anodo sobre mica e expostas a uma tensão de 0 a 300 V com taxa de variação de 30 V/s. Linha contínua: solução de GlnB-Hs 10 nM nativa, linha tracejada: solução de GlnB-Hs 100 nM nativa e linha em negrito: solução de GlnB-Hs 10 nM desnaturada.

7.5. Detecção da proteína GlnB-Ab sobre a superfície da mica

As imagens de MFA e as curvas de corrente em função do campo elétrico mostram que ocorre um transporte de massa da área na qual a solução foi depositada para a outra extremidade do substrato de mica. Entretanto, as medidas anteriores não permitem diferenciar se os arranjos formados próximo ao eletrodo positivo são devido à presença de proteína e/ou ao transporte dos componentes da solução tampão.

O protocolo de imunodeteção foi adaptado para esta tese para verificar se a proteína GlnB-Hs sobre mica migra na presença do campo elétrico externo (Capítulo 4, seção 4.2.4.).

7.5.1. Controles: Superfície da mica e solução tampão

As amostras controle incluem a superfície da mica limpa e os sistemas formados pelo substrato de mica com 4 mm e 10 mm entre os eletrodos e as soluções de proteína e solução tampão depositadas paralelamente ao eletrodo negativo, mas sem aplicação de campo.

A figura 7.17 mostra o radiograma da superfície recém clivada da mica (Fig. 7.17-A) e os substratos com a solução tampão (Fig. 7.17-B e 7.17-C). Nenhum sinal (coloração cinza) de proteína GlnB-Hs foi observado nestas amostras, como esperado. Nas imagens referentes ao substrato com tampão linhas guia foram adicionadas nas imagens para delimitar a área dos eletrodos.



Figura 7.17: Radiograma dos controles. A) Superfície recém clivada da mica, solução tampão depositada paralelamente ao eletrodo negativo (sinalizado na imagem) sobre a mica com B) 10 mm e C) 4 mm de comprimento entre os eletrodos.

Os radiogramas controles da solução de proteína mostram que após 5 dias de incubação a proteína reveste toda a superfície entre os eletrodos (Fig. 7.18-A a 7.18-E), exceto para a GlnB-Hs 10 nM desnaturada na mica de 10 mm de comprimento (Fig. 7.18-F), em que uma maior concentração de proteína é observada ao lado do eletrodo negativo (em preto).

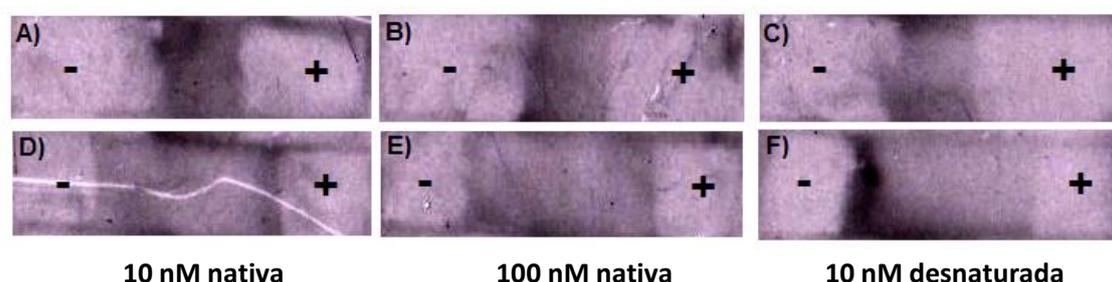


Figura 7.18: Radiograma das soluções de proteína depositadas paralelas ao eletrodo negativo sem aplicação de campo sobre mica de 4 mm (A a C) e 10 mm (D a F) de comprimento entre os eletrodos. Concentrações de GlnB-Hs de nativa 10 nM (A e D), nativa 100 nM (B e E) e desnaturada 10 nM (C e F).

7.5.2. Campo elétrico de 75 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.

A figura 7.19 mostra o substrato de mica de 4 mm de comprimento entre os eletrodos com as soluções de proteína sob o efeito de campo elétrico com taxa de variação de 3 V/s. As soluções foram depositadas ao lado do eletrodo negativo (lado esquerdo) e imediatamente aplicado o campo elétrico. As proteínas nativas nas diferentes concentrações e as desnaturadas recobriram toda a superfície de maneira homogênea.



Figura 7.19: Radiograma das soluções de proteína sob efeito de campo elétrico sobre mica com 4 mm de distância entre eletrodos. Solução de GlnB-Hs de A) 10 nM nativa, B) 100 nM nativa e C) 10 nM desnaturada.

7.5.3. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s.

As soluções de proteína foram depositadas ao lado do eletrodo negativo (lado esquerdo) e imediatamente aplicado o campo elétrico. As soluções contendo 10 nM e 100 nM de GlnB-Hs nativa apresentam um sinal mais intenso do lado direito, figuras 7.20-A e 7.20-B, respectivamente, indicando um maior transporte de proteína. Na figura 7.20-C, referente a GlnB-Hs 10 nM desnaturada, há sinal em toda a superfície da mica entretanto, há um sinal mais intenso do no canto superior do lado esquerdo (lado do eletrodo negativo), indicando que o transporte não foi totalmente efetivo.



Figura 7.20: Radiograma das soluções de proteína sob efeito de campo elétrico sobre mica com 10 mm de distância entre eletrodos e com taxa de variação de 3 V/s. Solução de GlnB-Hs de A) 10 nM nativa, B) 100 nM nativa e C) 10 nM desnaturada.

7.5.4. Campo elétrico de 30 kV/m com taxa de variação de 30 V/s.

As soluções de proteína foram depositadas ao lado do eletrodo negativo (lado esquerdo) e imediatamente aplicado o campo elétrico. A figura 7.21-A, 7.21-B e 7.21-C da proteína nativa com 10 nM e 100 nM e 10 nM desnaturada, respectivamente, mostram uma intensidade de sinal não homogêneo no espaço entre os eletrodos, indicando que ocorreu transporte de proteína para a outra extremidade, porém de forma não homogênea. O radiograma da GlnB-Hs desnaturada, figura 15C, apresenta um sinal mais intenso na região superior central.



Figura 7.21: Radiograma das soluções de proteína sob efeito de campo elétrico sobre mica com 10 mm de distância entre eletrodos e com taxa de variação de 30 V/s. Solução de GlnB-Hs de A) 10 nM nativa, B) 100 nM nativa e C) 10 nM desnaturada.

8. Discussão: Efeito do campo elétrico na organização dos filmes formados sobre a mica

Os sistemas analisados aqui são formados pela solução de proteína GlnB-Hs e pelos componentes da solução sobre mica. As extremidades do suporte sólido foram ligadas a uma diferença de potencial que varia até um máximo de 300 V em taxas de 30 V/s e 3 V/s . As soluções foram depositadas paralelas ao polo negativo (anodo).

8.1. Efeito do campo elétrico sobre o substrato e água miliQ depositada sobre mica

A mica é um cristal mineral formado por vários planos de clivagem atômicamente lisos por várias centenas de μm^2 e que pode ser facilmente clivada com uma simples fita adesiva, produzindo uma superfície lisa, limpa e hidrofílica ao nível molecular [11] e de resistividade de superfície $10^{11} \Omega\cdot\text{m}$ [112].

As folhas tetrahédricas de $(\text{Si},\text{Al})_2\text{O}_5$ da mica são ligadas ionicamente por uma camada central de $\text{Al}_2(\text{OH})_2$ (Figura 8.1). A rede carregada negativamente dos oxigênios basais entre estas duas camadas é balanceada por uma camada de K^+ coordenados hexagonalmente. Esta camada é perturbada após vários procedimentos de clivagem, expondo o plano basal coberto de íons [11].

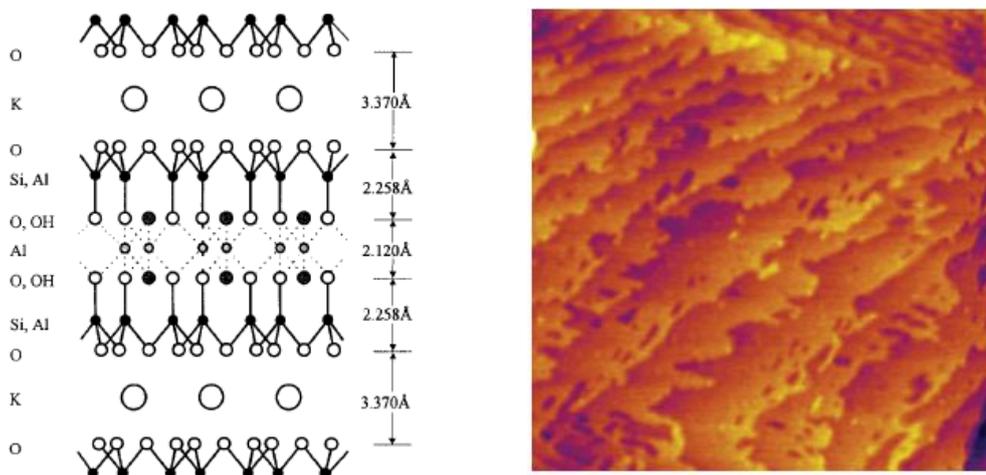


Figura 8.1: Desenho esquemático de uma estrutura ideal de mica muscovita. Folhas tetrahédricas duplas de $(\text{Si}, \text{Al})_2\text{O}_5$ são ligadas eletrostaticamente por íons de potássio. A distância perpendicular entre as folhas é de 10Å . [Adaptado de 80]. Topografia da mica muscovita (001) depois de ser atacada com ácido fluorídrico por 3 horas. Análise realizada em modo dinâmico e imagem de 512×512 pixel. Cantilever de $10 \mu\text{m}$, frequência de ressonância de 4,6 MHz e velocidade de varredura de 40 Hz [113].

Ao contrário do substrato lamínula siliconizada, a mica possui uma alta energia de superfície o que implica que quando um líquido é colocado na sua superfície, este se espalha ao invés de se manter-se em forma de gota (Figura 8.2). A molhabilidade depende das energias interfaciais relativas do líquido e da superfície do sólido [48, 114].

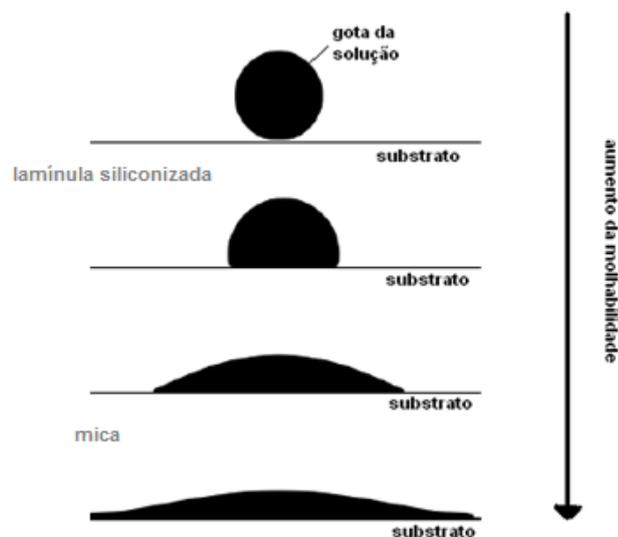


Figura 8.2: Representação da molhabilidade da gota. A molhabilidade de uma superfície sólida é o resultado das interações moleculares existentes entre o fluido e o substrato sólido, se revelando como a relação entre forças de coesão e adesão. À medida que as forças de adesão aumentam em relação às forças de coesão, mais afinidade a superfície sólida terá com a fase líquida.

A técnica direta de clivagem determina o trabalho necessário para separar um cristal macroscópico de mica ao longo do plano da estrutura em camada. A superfície da mica recém clivada é rapidamente coberta com uma camada de contaminação que reduz sua energia de superfície em condições ambientes [111]. A energia de superfície necessária para separar duas folhas de mica diminui com o aumento da umidade [111].

A figura 7.2 mostra a água de contaminação sobre a mica em equilíbrio com o ambiente. As amostras em que água miliQ foi depositada sobre a mica e exposta ao campo elétrico foram mantidas no dessecador até análise. O volume de água evaporou e o que se observa nas imagens de MFA é água de contaminação [29]. Ferreira 2008 [29] mostra a influência da umidade relativa do ar sobre a formação de filmes protéicos e a modificação da topografia do filme sobre mica em 24h. A água do ambiente condensa e forma ilhas que coalescem quando analisadas por MFA, devido a interação com a ponta de prova.

O recobrimento da superfície por vapor de água pode ser monitorado através das curvas de corrente por campo elétrico. As medidas de corrente do substrato são similares as obtidas quando o

volume de água miliQ foi depositada ao lado do anodo e exposta às mesmas condições de campo elétrico e taxa de variação (Figuras 7.4, 7.9 e 7.13).

Todas as medidas de corrente do substrato e a controle do volume de água foram realizadas sob umidade ambiente acima de 60 %.

A quantidade de moléculas de água contida no volume de H₂O miliQ depositado ($\sim 3,34 \times 10^{19}$ moléc/ μ l) é suficiente para formar uma monocamada sobre a superfície da mica entre os eletrodos. A água de contaminação do ambiente absorvida sobre a mica permite a passagem de corrente elétrica de mesma magnitude (Fig. 7.4, 7.9 e 7.13), indicando que o tempo entre a clivagem da mica e a aplicação do campo elétrico foi suficiente para que, nas condições ambientes, uma monocamada de água fosse formada.

Na presença de solução com pH neutro os íons presentes na superfície da mica podem dissociar da superfície, resultando em uma superfície carregada negativamente. A extensão desta dissociação e substituição parcial dos K⁺ dependerá da concentração de eletrólitos [11], permitindo uma fácil adsorção das superfícies das proteínas positivamente carregadas [17].

8.2. Gráficos de I-E das soluções controles e soluções de proteína GlnB-Hs depositadas sobre mica

Quando expostos a um campo elétrico externo os diversos componentes da solução e da frente líquida, migram para a extremidade de carga oposta e/ou polarizam. Por meio das interações eletrostáticas e das forças de corpo agindo no fluido, este começa a escoar sobre o substrato, figura 8.3. Se o tempo e o campo elétrico forem suficientes a solução revestirá toda a superfície e alcançará o polo positivo.

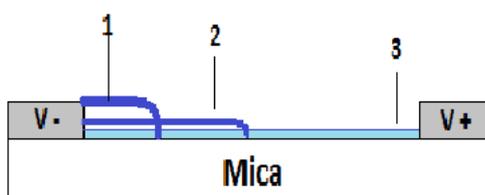


Figura 8.3: Desenho esquemático do sistema analisado. A solução de proteína é depositada sobre a mica, ao lado do anodo (1). Imediatamente após uma tensão de até 300 V é aplicada com taxas de variação do campo elétrico diferentes. Através de forças agindo sobre os íons e moléculas da solução a interface líquido-ar começa a escoar (2). No final de um tempo t a solução reveste toda a superfície da mica entre os eletrodos (3).

Os eventos que podem estar ocorrendo nestes sistemas são: a migração dos íons livres existentes originalmente na solução e íons resultantes de dissociação e ionização de compostos (correntes iônicas), a polarização das macromoléculas, arraste e difusão dos componentes da solução e evaporação do solvente (água).

Medidas de corrente em função do campo elétrico foram feitas procurando estabelecer parâmetros que controlam o transporte de carga e massa atuantes na formação dos filmes de proteína obtidos na superfície da mica sob a influência do campo elétrico aplicado.

A resistividade da superfície da mica é da ordem de $10^{11} \Omega.m$, como a solução apresenta menos resistência ao fluxo de partículas, a corrente escoou pelo material que recobre a superfície sólida. Assim, as correntes medidas são de superfície, como já discutido no Capítulo 6, seção 6.1.

A análise das curvas de corrente seguirá a mesma hipótese feita para a discussão dos resultados sobre a lamínula siliconizada (Capítulo 6), de que a corrente é dada pelo escoamento orientado das espécies na solução (Fig. 8.4). A curva é dividida em 3 regiões: 1) a parte capacitiva do sistema (corrente de deslocamento), no qual ocorre um acúmulo das cargas elétricas no anodo e catodo; 2) a parte referente a corrente de transporte, atribuído predominantemente a migração de cargas já livres ou liberadas na solução e 3) a corrente após o ponto de saturação, depende da disponibilidade e distribuição de portadores na solução ou injetados pelos eletrodos.



Figura 8.4: Gráfico da generalização do comportamento observado para as curvas de corrente em função do campo elétrico aplicado.

Quando as soluções dielétricas são postas entre os eletrodos a capacitância do sistema aumenta por um fator K , característico da solução, devido à diminuição do campo elétrico provocada pelo dielétrico [50]. Isto porque as moléculas do líquido provocam um campo em direção oposta à do campo original quando os momentos de dipolo das moléculas ficam alinhados com o campo externo, polarizando-as, aumentando-se assim a carga elétrica livre acumulada nos eletrodos.

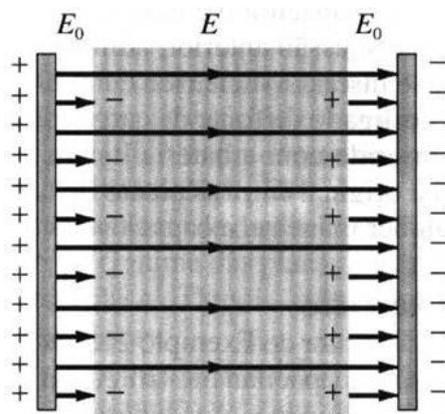


Figura 8.5: Sistema físico análogo a solução de proteína (dielétrico) entre os eletrodos. Campo elétrico entre as placas de um capacitor com dielétrico (cinza). A carga superficial no dielétrico enfraquece o campo original entre as placas [Adaptado de 50].

A corrente da parte capacitiva, obtidas para os baixos valores de campo elétrico, para os sistemas analisados sobre a mica pode ser obtida pela derivada da carga $Q(t)$ que é dada por

$$Q(t) = C \cdot V(t) = \frac{K \cdot \epsilon_0 \cdot A}{x(t)(1-K) + KL} \cdot V(t) = \text{picoAmpère} \quad (8.1)$$

em que K é a constante dielétrica do meio, ϵ_0 é a permissividade do vácuo, A a área do capacitor, $x(t) = x_0 + at$ para o deslocamento da frente líquida, L é o comprimento total do substrato entre os eletrodos e $V(t)$ é a tensão dependente do tempo.

Atribuindo valores às variáveis na eq. (8.1), em que K da água utilizado foi 80, K_{NaCl} foi de 60, K_{Tris} igual a 1,76 [102] e uma aproximação para o $K_{\text{tampão}}$ de 56, ϵ_0 8.85 pF/m, A de 1,72 mm². Para o cálculo de $x(t)$ supôs-se que a frente líquida desloca-se linearmente com x_0 igual a 10⁻⁶ m e a sendo a razão entre o comprimento do substrato e o tempo que a corrente levou para estabilizar (dados experimentais).

Os $dQ(t)/dt$ foram calculados no programa ORIGIN 6.0 (OriginLab) e os valores de corrente obtidos, novamente, foram da ordem de picoAmpère, indicando que a contribuição da corrente de deslocamento devido ao acúmulo de cargas nos eletrodos é desprezível.

Devido à característica hidrofílica da mica, a interação com as moléculas de água é mais favorável, permitindo que as espécies das soluções fiquem livres no volume. A imobilização de cargas negativas (como a proteína GlnB-Hs) é dificultada pela natureza fraca da ligação, insuficiente para evitar a mobilidade das moléculas [80]. A adsorção das cargas negativas pode ser favorecida pela presença de cátions divalentes na solução que atuarão como intermediadores na interação entre as duas superfícies [17].

A interação dos componentes da solução com a superfície da mica afeta os valores críticos de campo elétricos e o valor do ponto de saturação, que fica determinado pela disponibilidade de portadores na solução, a mobilidade das espécies, a quantidade de soluto na superfície e distribuição dos portadores na mica.

A influência do número e mobilidade dos portadores de carga na solução nas correntes elétricas já foi discutida anteriormente (Capítulo 6, seção 6.2). A corrente de transporte da eq. (6.3), $I = qnu$, mostra que a concentração e a propriedade iônica das proteínas influenciam nos valores de corrente medidos.

A migração dos íons da solução depende das camadas de água para migrarem [97]. Quanto maior o volume de água na superfície, maior a mobilidade dos íons no fluido [97]. Como as soluções são depositadas ao lado do anodo, a distribuição inicial dos portadores e das moléculas de soluto sobre a mica é heterogênea. Conforme o campo elétrico aumenta, as forças de corpo atuantes na solução fazem com que o soluto espalhe pela superfície, permitindo um maior transporte de cargas.

Novamente, a solução 50 mM NaCl pode ser considerada ôhmica, pois no intervalo de campo elétrico aplicado e do tempo decorrido a corrente varia linearmente com o campo. As curvas de corrente da solução salina sobre mica sob os diferentes campos elétricos e taxas de variação (Fig. 7.4, 7.9 e 7.13) o mesmo comportamento é observado, a corrente aumenta com o aumento do campo elétrico. Conforme a frente líquida avança, aumentando o volume de água na superfície, a mobilidade das espécies aumenta.

Os valores críticos de campo elétrico para as demais soluções analisadas sobre a mica dependem do número e da carga dos portadores, do campo aplicado e da taxa de variação.

Comparando as curvas de corrente das soluções tampão e Tris-HCl pH 8 depositadas sobre a lamínula siliconizada e mica expostas a 75 kV/m (Figura 5.8 e 7.3, respectivamente), os valores críticos são menores para os sistemas sobre a mica, indicando a influência do substrato sobre o escoamento das partículas. Devido à preferência da adsorção da água na superfície hidrofílica da mica, a concentração de íons e Tris livres na camada de difusão é maior e começam a escoar para campos elétricos ≤ 12 kV/m.

A maior concentração de portadores livres nas soluções tampão e Tris-HCl é evidenciada pelos valores máximos de corrente obtidos sobre a mica (Fig. 7.3). Após o ponto de saturação, as correntes decaem com o aumento do campo elétrico, indicando a indisponibilidade de cargas na solução e que a injeção de portadores através dos eletrodos é insuficiente para manter a corrente constante com o aumento do campo elétrico.

Para o campo máximo de 30 kV/m com taxas de variação de 3 V/s e 30 V/s as correntes das soluções controle não atingem o ponto de saturação (Fig. 7.9 e 7.13, respectivamente). A corrente cresce com o campo aplicado e as curvas estão de acordo com as informações obtidas em campos

aplicados até 75 kV/m (Fig. 7.4), nas quais as correntes de transporte são registradas para campos até 31 kV/m para o Tris-HCl e 42 kV/m para a solução tampão até atingirem o ponto de saturação. Assim, pode ser concluído que o transporte dos componentes do tampão para concentrações de 50 mM ocorre para campos de 30 kV/m.

Analisando o comportamento das curvas obtidas para a solução tampão na mica (Fig. 7.4, 7.9 e 7.13), como na lamínula siliconizada (Fig. 5.8), conclui-se que são as espécies de Tris-HCl que regem o fluxo dos componentes livres nas soluções. As correntes para a solução salina sempre aumentam com o campo elétrico, independente do substrato, campo aplicado e taxa de variação, enquanto que, as correntes para a solução de Tris-HCl apresentam o valor crítico de campo elétrico e ponto de saturação que variam de acordo com o substrato e as condições de variação de E . O mesmo padrão é obtido nas curvas para a solução tampão.

Para as soluções com proteína GlnB-Hs sobre mica expostas ao campo elétrico, sabe-se que as biomoléculas aderem fracamente à superfície hidrofílica da mica [5, 30], permitindo ficarem livres no soluto e interagindo com os íons livres. A concentração e a estrutura da GlnB-Hs influenciam nos valores de corrente e comportamento da curva.

As soluções de proteínas nativas de concentração 100 mM apresentaram uma razão de aumento da corrente menor do que a observada para a solução de proteínas 10 nM quando expostas a campos elétricos máximos de 75 kV/m (Fig. 7.7). Estes dados indicam que o comportamento da corrente é influenciado pela mobilidade das proteínas e as suas interações com os íons na solução. Quanto maior a concentração de proteínas na solução, maior o número líquido de portadores, entretanto menor o número de íons livres na solução devido à imobilização destes pela proteína. Assim, soluções de proteína mais concentradas apresentam menor corrente de transporte iônico. Após o ponto de saturação ser atingido as correntes decaem numa taxa menor quando comparadas a solução tampão, devido a dissociação dos íons presos as proteínas.

Quando as proteínas GlnB-Hs nativas de 10 nM e 100 nM foram expostas ao campo elétrico 30 kV/m com taxa de 3 V/s (Fig. 7.11), após o valor crítico de corrente ser atingido, a corrente volta a crescer com o aumento do campo elétrico. O ponto de saturação não é observado, pois os campos elétricos necessários são maiores que 32 kV/m, como mostrado na figura 7.7. Assim, como esperado, é preciso maiores valores de campo elétrico com soluções de proteína para o escoamento das espécies na solução até o ponto de saturação.

Considerando que os monômeros da proteína GlnB-Hs possuem 112 aminoácidos [14] e que no estado desnaturado a proteína está totalmente desenovelada, o comprimento da GlnB-Hs desnaturada foi estimado em 600 nm. Além disso, as proteínas desnaturadas estão com as cadeias laterais expostas, o que permitiria uma maior imobilização de íons. Desta maneira, da eq. (6.3) da corrente de transporte, os valores de corrente obtidos são menores (Figuras 7.7 e 7.11) e requerem

campos elétricos maiores para liberação dos íons acoplados com as regiões polares da proteína e necessários para a corrente elétrica de transporte crescer.

As amostras expostas ao campo máximo de 30 kV/m com taxa de variação de 30 V/s (Figura 7.13 e 7.16) correspondem ao sistema mais distante do equilíbrio (condição estacionária), pois não há tempo suficiente para as espécies se acomodarem nas possíveis configurações e posição. As correntes para as soluções controle aumentaram rapidamente com o campo aplicado e não atingiram o ponto de saturação (Fig. 7.13). As soluções de proteína desnaturada 10 nM e nativa 100 nM necessitam de 12 kV/m e 17 kV/m, respectivamente, para migração dos portadores (Fig. 7.16). Estes resultados indicam que a taxa de variação do campo elétrico aplicado (V/s) influencia na dissociação dos íons da proteína desnaturada e, conseqüentemente, nos valores de correntes medidos.

Qualquer tentativa de modelagem ou cálculo detalhado das características dos sistemas seria especulativa. A semelhança do que ocorreu no vidro, a análise das curvas de corrente obtidas para as soluções sobre a mica foi dificultada pela quantidade de proteína em relação aos componentes da solução. A baixa energia de superfície da mica, a não uniformidade de migração da frente líquida e a camada de água do ambiente adsorvida também são fatores que dificultam a análise.

A primeira dificuldade na interpretação dos dados de corrente é determinar quando a frente líquida atinge o polo positivo. A frente líquida é irregular e sua migração depende de características locais da superfície, incluindo impurezas, água de contaminação pré-adsorvida e cargas locais presente na superfície da mica. A frente pode ser observada opticamente e é ilustrada na Figura 8.6. O escoamento da solução sobre a mica ocorre imediatamente após a sua deposição em função da molhabilidade da superfície. Os volumes depositados e a distância entre os eletrodos foram definidos de modo que a tensão fosse aplicada antes do escoamento da frente líquida atingir o eletrodo oposto.

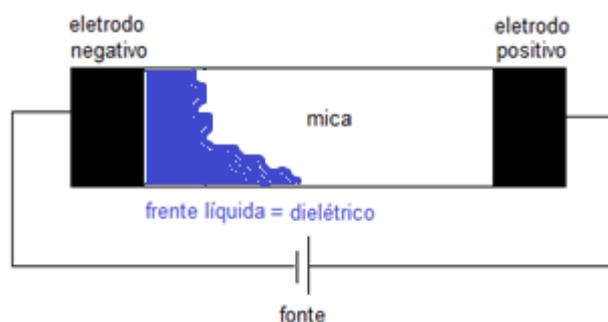


Figura 8.6: Desenho esquemático da solução depositada paralelo ao polo negativo sobre a mica com a fonte desligada. A frente não uniforme e a molhabilidade da solução foram observados opticamente.

Como o volume de solução depositado é pequeno e o índice de refração da mica (1,552 a 1,578) [115] e da água (pura a 20 °C é 1,333) [50] são próximos, determinar opticamente o tempo de migração da frente líquida sem adição de qualquer tipo de corante não é trivial. Além disso, a adição de corantes pode alterar o escoamento do fluido.

Outro ponto a ser lembrado é que o preparo das amostras e as medidas são realizados sob condições ambientes, com variação de umidade relativa entre 45 a 80 %. A mica clivada em umidade relativa acima de 60 % é rapidamente revestida por uma monocamada de água do ambiente [111]. Esta variação na quantidade de água adsorvida pode afetar os valores de corrente medidos, como observado na figura 6.3 na discussão dos resultados sobre a lamínula siliconizada (Capítulo 6, seção 6.1).

Além disso, quando a solução é depositada sobre a superfície deve-se levar em consideração a difusão dos componentes de solução nesta camada de água pré-existente nos mecanismos de adsorção da proteína.

8.3. Imagens de microscopia de força atômica das soluções controles e soluções de proteína GlnB-Hs sobre mica

As imagens de MFA dos filmes formados pela deposição das soluções controles e das soluções de proteína ao lado do anodo sobre mica mostram que 1) ocorre o transporte de massa para a outra extremidade da superfície do substrato e 2) que as estruturas supramoleculares dos filmes podem orientar-se devido o vetor campo elétrico, formando filmes com alto grau organizacional.

A distribuição heterogênea dos agregados formados pelos componentes das soluções pode ser entendida em termos da não uniformidade do campo elétrico local, resultando em diferentes taxas de transporte local para cada espécie presente na solução.

As imagens de MFA das soluções controles sob campo de 30 kV/m com taxa de 3 e 30 V/s (Fig. 7.8 e 7.12), corroboram curvas de corrente por campo elétrico (Fig. 7.13), de que o Tris-HCl é o principal componente da corrente de transporte sob campo elétricos de máximo de 30 kV/m. As imagens de MFA da solução de NaCl apresentaram agregados de menores dimensões e quantidade ao lado do polo positivo (Fig. 7.8-D, 7.12-D), enquanto que as imagens topográficas para a solução de Tris-HCl (Fig. 7.8-E, 7.12-E) e a solução tampão apresentam um padrão mais regular para ambas as áreas próximas aos eletrodos (Fig. 7.8-C, 7.8-F e 7.12-C, 7.12-F).

As imagens da topografia dos filmes formados pelas soluções de GlnB-Hs 10 nM nativa e desnaturada expostas ao campo máximo de 75 kV/m próximas ao polo positivo, Figura 7.5-D e 7.6-C, respectivamente, mostram uma orientação preferencial das estruturas supramoleculares devido ao campo aplicado, além do transporte de massa sobre a superfície do substrato.

As figuras 7.14 e 7.15 mostram as soluções de proteína sob campo elétrico máximo de 30 kV/m com taxa de variação de 30 V/s. As proteínas nativas (Figura 7.14) formam filmes com alto grau de organização em função do campo aplicado, enquanto que as proteínas GlnB-Hs desnaturadas alinharam-se paralelamente as linhas de campo (Fig. 7.15).

O transporte e a orientação das estruturas supramoleculares na solução de proteína, novamente, são explicados pelo campo elétrico não uniforme efetivo local. A orientação e deslocamento da proteína resultam dos efeitos de polarização em um campo elétrico não uniforme (Fig. 8.7). Se o vetor campo elétrico local muda de direção, o vetor do momento de dipolo induzido deve realinhar-se com o vetor do campo elétrico, causando a rotação da partícula e a existência de gradientes de campo desloca as proteínas na direção destes.

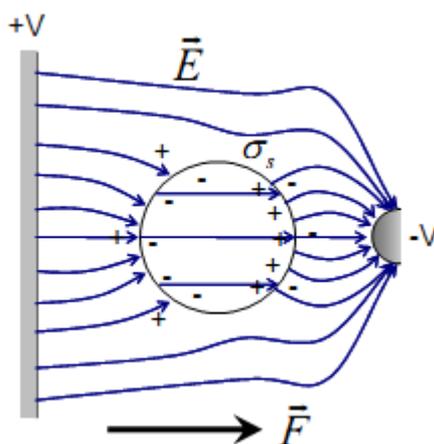


Figura 8.7: Movimentação da proteína causada pelo momento de dipolo induzido em um campo elétrico não uniforme [Adaptado de 116].

A imagem de MFA na região próxima ao anodo da solução de Tris-HCl exposta a um campo elétrico máximo de 75 kV/m (Fig. 7.3-B) mostra que os componentes da solução organizam-se de maneira a formar um ângulo de aproximadamente 57° em relação ao vetor do campo aplicado. Especulações quando aos arranjos formados podem ser devido à anisotropia da distribuição de carga ou/e de pré-disposição a ordenação do solvente na interface sólido-líquido.

As moléculas de água e de Tris-HCl possuem momento de dipolo permanente. Quando os dois dipolos são colocados em contato irão orientar-se de maneira que suas extremidades de cargas opostas fiquem adjacentes. Dois arranjos são possíveis: os dipolos podem ficar lado a lado,

apontando em direções opostas ou podem ligar-se “cabeça-cauda”. A configuração será aquela que necessitará menor energia para manter-se em equilíbrio.

Em solução com pH 8 as moléculas de Tris podem interagir entre si e com as moléculas de água (Fig. 8.8). As moléculas de água possuem alto momento de dipolo e as ligações de hidrogênio resultantes no estado líquido têm o ângulo de ligação em torno de $105,5$ a 106° , enquanto que o nitrogênio presente no Tris é tetravalente e o ângulo de ligação é de 106° .

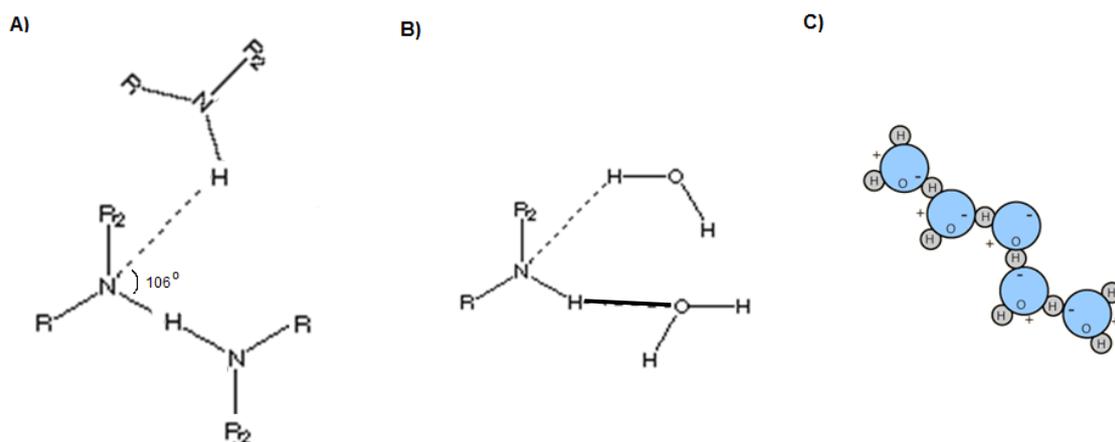


Figura 8.8: Interação das moléculas presentes na solução com 50 mM Tris-HCl pH 8. Interação A) Tris-Tris, B) Tris-H₂O e C) moléculas de água.

Na solução de Tris-HCl as várias moléculas e íons interagem simultaneamente entre si, de maneira que cada molécula de água, Tris e íons H⁺ e Cl⁻ induz nas moléculas configurações de dipolos periódicos coordenados, os quais estão em afinidade com o dipolo permanente original correspondente. Assim, cada molécula é a sede de muitos conjuntos sobrepostos de forma incoerente de dipolos induzidos periódicos causados pelas diferentes interações entre as moléculas. Então, pode-se imaginar que a interação simultânea de muitas moléculas pode simplesmente ser construída como uma somatória da superposição de forças eletrostáticas.

Na presença do campo aplicado a distribuição das cargas nas moléculas sofre alterações, podendo variar a magnitude do momento de dipolo (referente à polarizabilidade da molécula devido ao ângulo de interação entre as moléculas) [7, 117]. É importante lembrar que a energia kT ambiente é suficiente para despolarizar as moléculas, desta maneira as orientações somente permaneceram se o acoplamento com a superfície for suficiente para fixar a dada orientação.

As moléculas de água quando em contato com um sólido procuram minimizar as suas energias através da reorientação para formar o máximo de ligações de hidrogênio possível enquanto que, ao mesmo tempo, procuram equilibrar sua densidade e interações dipolares [117]. O resultado é uma estrutura ordenada adjacente a superfície [118, 119, 120].

Xu et al. 2010 [120] analisaram com MFA a organização de uma monocamada de água adsorvida sobre mica a temperatura ambiente, sendo que o cristal foi estabilizado com grafeno. Foi achado que a direção das ligações está relacionada com a direção cristalográfica da mica. Na base desta observação, os autores sugerem que a molecularidade do filme fino de água tem uma sólida, estrutura do tipo gelo, em relação epitaxial com a superfície [120].

A consequência deste arranjo é que a próxima camada de moléculas de água reorienta em resposta e um efeito cascata é observado até a perda da organização em direção ao volume da solução [118, 120].

Usando simulação de dinâmica molecular, Odelius et al. 1997 [121] acharam que no revestimento por uma monocamada, a água forma uma rede bidimensional de ligações de hidrogênio em relação epitaxial com a rede da mica. Esta previsão foi confirmada por Miranda et al. 1998 [122] usando espectroscopia vibracional de geração de soma de frequência (*sum frequency generation vibrational spectroscopy* – SFG). A ausência de ligações de hidrogênio livres na superfície da monocamada de água sobre a mica implica que há um momento de dipolo líquido com a carga positiva apontando para a superfície.

Na presença de outras moléculas e íons coadsorvidos no substrato, a água competirá pelos sítios favoráveis a adsorção. As estruturas formadas pelos componentes da solução podem misturar-se com água, alterar a orientação da molécula pré-adsorvida na superfície e, possivelmente, reagir com a água induzindo dissociação [117].

A coadsorção da molécula de água com átomos de Na sobre a superfície de Ru (0 0 1) foi estudada por espectroscopia de infravermelho por Nakamura e Ito 2002 [123]. Monômeros de água foram observados na superfície sob diferentes de concentrações de Na. Os átomos de hidrogênio são redirecionados em direção à superfície com o aumento de Na (Fig. 8.9).

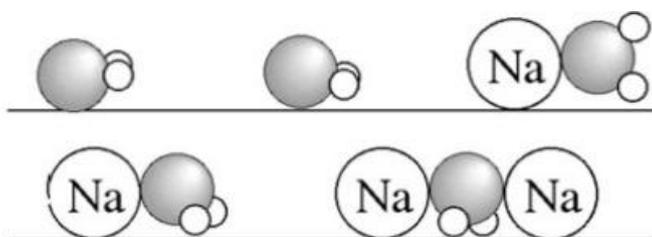


Figura 8.9: Modelo esquemático da molécula de água coadsorvida com átomo de Na sobre Ru (0 0 1) [Adaptado de 123]. A molécula de água reorienta-se com o aumento de Na presente na superfície.

8.4. Detecção da proteína GlnB-Ab sobre a superfície da mica

As imagens de MFA e as curvas de corrente por campo elétrico não são conclusivas quanto a migração da GlnB-Hs exposta ao campo elétrico, devido a influência dos componentes da solução tampão nas medidas. Ferreira et al. 2009 [5] mostraram a auto organização do Tris-HCl pH 8 e da solução de NaCl em agregados esféricos similares a uma proteína globular, o que pode conduzir a uma falsa interpretação da organização de proteínas em superfícies sólidas por imagens de MFA.

Técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (*Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR) e microscopia por catodoluminescência foram utilizadas com o intuito de verificar a migração da proteína sobre a superfície da mica. Entretanto, estas técnicas mostraram-se ineficientes para diferenciar a proteína GlnB-Hs do Tris-HCl nas concentrações utilizadas.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier é utilizada para caracterizar a estrutura secundária da proteína [124, 125]. A técnica de FTIR/ATR fornece informações da conformação da proteína adsorvida na interface sólida através da mudança do pico no espectro [125].

Proteínas com predominância de α -hélice na estrutura exibem absorções da amida I e amida II no espectro nos intervalos de 1652 a 1657 cm^{-1} e 1545 a 1551 cm^{-1} , respectivamente, em solução aquosa; enquanto que proteínas com abundância de estruturas folhas β exibem absorção similar nas faixas de 1628 a 1635 cm^{-1} e 1521 a 1525 cm^{-1} [124]. A amida I possui contribuições das ligações vibracionais de C=O do grupo amida e uma menor contribuição das vibrações da ligação de C-N, enquanto que a absorção da amida II aparece para a flexão do N-H e as vibrações de C-N [124].

Os filmes de proteína GlnB-Hs sobre mica (equipamento Vertex 7.0 e *software* OPUS) apresentavam uma quantidade muito pequena de proteína para ser detectada por FTIR/ATR e a quantidade de Tris-HCl sendo 1000 X maior também sobrepunha-se aos picos nas faixas de amida I e II (Figura 8.10).

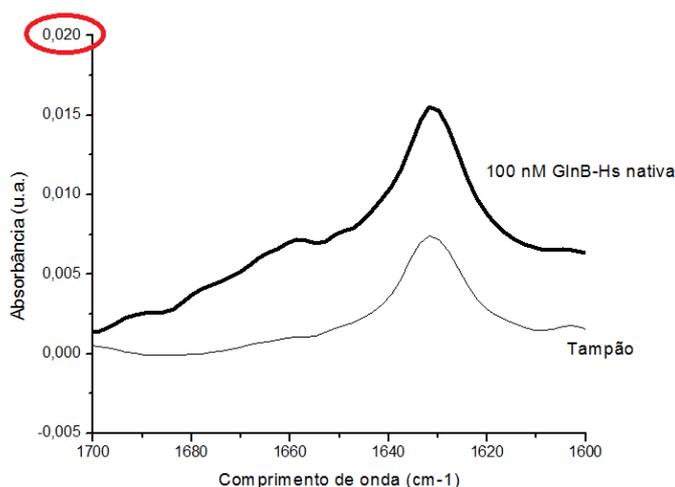


Figura 8.10: Espectro de FTIR/ATR para filmes formados por 100 nM GlnB-Hs nativa (linha em preto) e a solução tampão. As duas além de apresentarem pico na região característica da proteína também tem um sinal muito pequeno (destacado em vermelho).

Catoluminescência (CL) é um fenômeno de emissão de fótons de comprimentos de onda característicos de um material que é submetido a um bombardeamento eletrônico de alta energia (~ 50 keV) [126, 127]. Quando um detector de CL é acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) é possível coletar imagens e informações sobre aspectos estruturais ou elementos específicos do material analisado.

A emissão de CL de espécies fluorescentes submetidas à excitação no MEV é utilizada para localização de estruturas específicas em superfícies, sendo possível uma identificação qualitativa da concentração de macromoléculas e componentes [127].

As proteínas ricas em tirosina, fenilalanina e triptofano apresentam fluorescência quando excitados com comprimentos de onda acima de 280 nm.

Tabela 8.1: Comprimento de onda de excitação e emissão para os aminoácidos tirosina e fenilalanina presentes na proteína GlnB-Hs.

Aminoácido	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
Tirosina	275	300
Fenilalanina	260	280
Triptofano	295	303

As amostras formadas pelas soluções controles e de proteínas GlnB-Hs, sem adição de qualquer tipo de fluoróforo, expostas ao campo elétrico sobre mica foram revestidas com carbono e analisadas no MEV-CL (Jeol JSM 6360-LV com o catodo luminescência Gatn Mono CL4 Plus). Imagens de catodoluminescência do filme formado por 10 nM GlnB-Hs nativa (Figura 8.11-B) foram obtidas. Entretanto, o espectro de catodoluminescência da solução de Tris-HCl, novamente, mostrou que o sinal do Tris-HCl sobrepõem-se ao da proteína, impossibilitando a diferenciação entre estes dois componentes da solução.

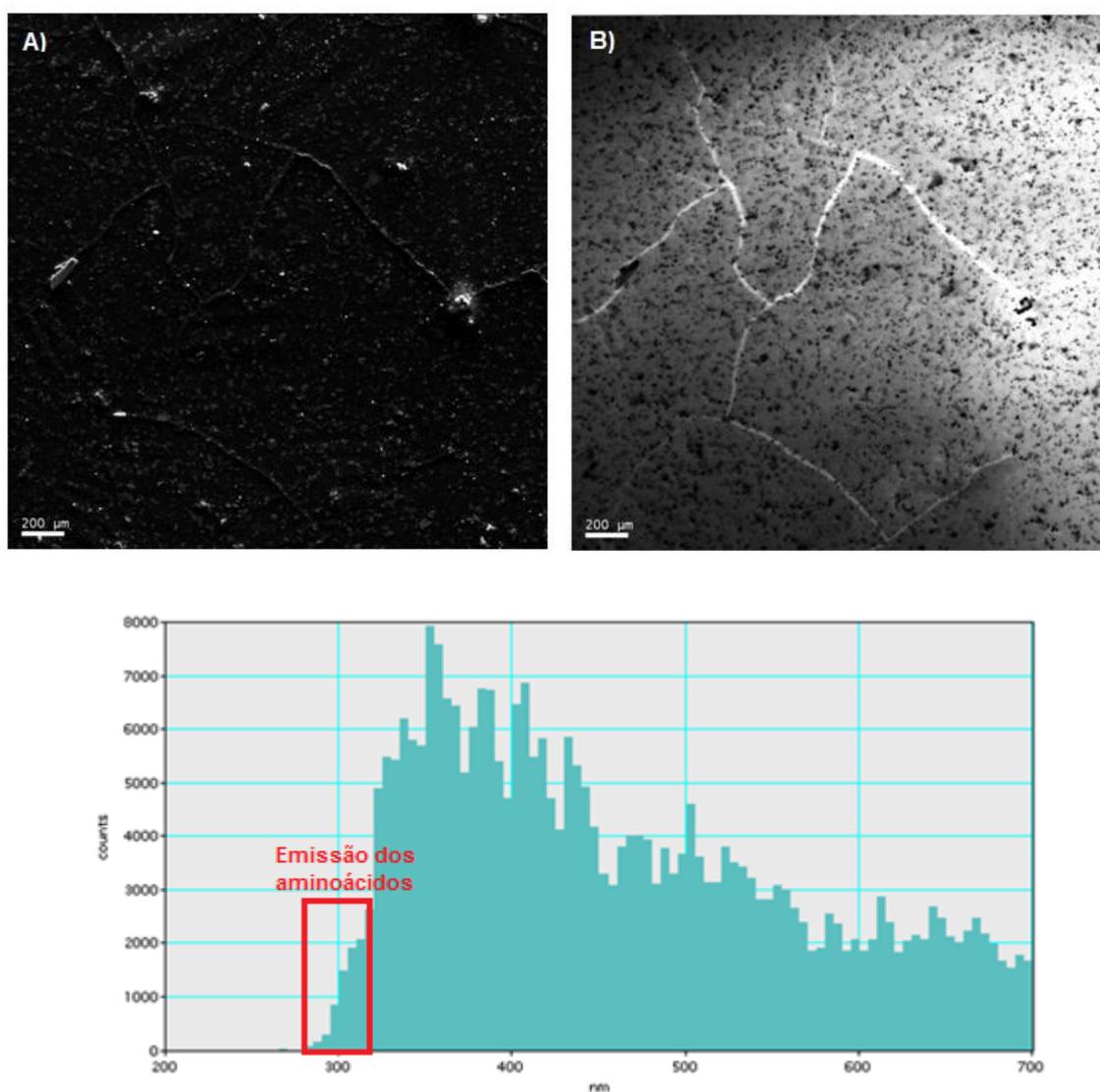


Figura 8.11: Análise por MEV-CL. A) Imagem de MEV, B) imagem por catodoluminescência do filme formado pela deposição de 10 nM GlnB-Hs nativa paralela ao anodo. Espectro obtido do filme formado pela solução controle Tris-CL pH 8. Observa-se no espectro que a faixa de emissão para os aminoácidos da proteína GlnB-Hs apresenta sinal para o Tris.

A distribuição da proteína GlnB-Hs sobre a mica após a aplicação do campo elétrico foi verificada por imunodeteção. Nesta técnica, um anticorpo específico (anti-GlnB-Ab) interage com a proteína GlnB-Hs e posteriormente um anticorpo marcado interage com o anti-GlnB-Ab [86]. A imunodeteção é realizada com proteínas imobilizadas sobre membranas em geral de nitrocelulose.

Como o interesse era verificar se a proteína migrou sobre a mica na presença do campo elétrico, o protocolo foi modificado. A etapa da transferência das proteínas para a membrana foi eliminada, para evitar qualquer tipo de perda ou mobilidade da proteína sobre a superfície e os tempos de incubação com as soluções bloqueadoras, soluções de lavagem e as soluções com anticorpos foram reduzidos para evitar a remoção da GlnB-Hs da superfície da mica.

Os radiogramas dos controles das soluções de proteína, figura 7.18, mostram a alta energia de superfície da superfície da mica com relação às soluções de GlnB-Hs. As soluções de GlnB-Hs foram depositadas ao lado do polo negativo (lado esquerdo do radiograma) e incubadas por 5 dias a temperatura e umidade ambientes. A superfície deve estar tão seca quanto possível para que o excesso de soluto não escorra e influencie na interpretação dos dados. O sinal da proteína (escala de cinza) foi observado em toda a área entre os eletrodos (Figura 7.18).

A superfície das micas com 4 mm de comprimento foram revestidas completamente pelas soluções no período de incubação (Figura 7.18-A, 7.18-B e 7.18-C). As proteínas nativas depositadas sobre a mica de 10 mm também revestiram toda a superfície da mica (Fig. 7.8-D e 7.18-E).

O radiograma da GlnB-Hs desnaturada mostra um sinal mais forte no qual a solução foi depositada (Fig. 7.18-F). A proteína desnaturada não se espalha pela superfície devido a sua baixa mobilidade (característica relacionada com o tamanho, carga e velocidade terminal da partícula exposta a campo elétrico) ser menor em relação à nativa, fazendo com que a concentração de proteína seja maior na região ao lado do anodo.

Ao analisar os radiogramas controles a velocidade característica do fluido fica indefinida. O tempo que a frente líquida levou para cobrir todo o espaço entre os eletrodos pode ser de alguns minutos (no caso das amostras de 4 mm) ou até dias. Sendo assim, o número de Reynolds para estas amostras também é indefinido.

A adsorção da proteína e dos componentes da solução sobre a mica ocorre por difusão e forças eletrostáticas [128]. A proteína GlnB-Hs depositada por *drop deposition* sobre mica forma agregados supramoleculares em forma de anéis de aproximadamente 130 nm [5]. Os auto-arranjos formados sobre a mica são dependentes do método de deposição, tempo de incubação e das características da solução [5].

Os radiogramas das soluções de proteínas expostas ao E mostram que a proteína migra quando exposta a um campo elétrico. A GlnB-Hs nativa e desnaturada sob campo elétrico de 75

kV/m ocupam todo o espaço entre os eletrodos, como mostra o sinal da quimioluminescência (preto) (Figura 7.19-A, 7.19-B e 7.19-C).

Os radiogramas das soluções de proteínas nativas exposta a 30 kV/m com taxa de variação de 3 V/s mostram que o campo foi suficiente para transportar as proteínas para a outra extremidade do substrato (Figuras 7.20-A e 7.20-B), em que se observa uma maior concentração de sinal ao lado do catodo. Enquanto que, para as expostas a uma taxa de variação de 30 V/s a migração ficou mais homogênea (Figura 7.21-A e 7.21-B). Indicando que o transporte de proteína é dependente da taxa de aumento do campo, estando de acordo com a necessidade de gradientes de campo para a força eletrostática deslocar a proteína.

Nas amostras com proteínas desnaturadas foram observadas áreas de concentração do sinal no canto superior próximo ao catodo e na região central para a taxa de 3 V/s (Fig. 7.20-C) e de 30 V/s (Fig. 7.21-C), respectivamente. O campo aplicado nos tempos de 10 s e 100 s não foi suficiente para transportar as proteínas de forma homogênea pela superfície.

O número de Reynolds (Re) foi calculado para estimar a contribuição das forças viscosas no escoamento das soluções. Considerando que a frente líquida não é uniforme, que se esparrama sobre a superfície da mica e que o tempo que o líquido leva para alcançar o catodo é desconhecido, algumas suposições foram feitas para o cálculo da velocidade característica; 1) o líquido depositado ocupa 1 mm de largura, 2) a frente migra uniforme com o campo aplicado, 3) o tempo para que o líquido percorra o comprimento entre os eletrodos é o dado por $\Delta t = t_{\text{pico}} - t_0$, em que t_{pico} é o tempo equivalente ao primeiro pico das curvas de corrente X campo elétrico e t_0 é o campo elétrico 0 kV/m.

Calculando o número de Reynolds para a água miliQ sobre as micas temos que

Tabela 8.2: Número de Reynolds para a água miliQ depositada sobre mica exposta ao campo elétrico em diferentes taxas de variação.

Mica – Campo elétrico aplicado (kV/m)	Taxa de variação (V/s)	Velocidade Característica (mm/s)	Número de Reynolds
75	3	0,054	0,16
30	3	0,111	0,99
30	30	1,125	10,1

em que o comprimento característico foi estipulado igual a 3 mm, e a densidade e viscosidade da água são 1000 kg/m^3 e $1,003 \text{ mPa.s}$, respectivamente.

Devido às características conhecidas do substrato, da solução (aqui considerada como água por causa da baixa concentração de soluto) e observações experimentais o escoamento do soluto pode ser considerado laminar. Ou seja, as forças de viscosidade são predominantes.

Entretanto, a dúvida de se o escoamento da proteína é dado por difusão (referente ao livre caminho médio) ou pelas forças elétricas na presença de campo são respondidas pelos próprios radiogramas e pelas estruturas orientadas observadas nas imagens de MFA.

Resumindo, as diversas técnicas utilizadas complementam-se para averiguar o efeito do campo elétrico sobre as estruturas supramoleculares dos filmes formados pelas soluções de proteína GlnB-Hs sobre mica.

As curvas de corrente mostram a influência da presença em alta concentração de Tris-HCl sobre o transporte de massa das soluções, que 30 kV/m é suficiente para o transporte dos componentes da solução tampão, porém um campo elétrico maior é necessário quando proteína é adicionada.

As imagens de MFA mostraram o grau de orientação das partículas com a aplicação do campo elétrico e qualitativamente se ocorreu o transporte de massa. A distribuição das proteínas sobre a área do substrato de mica foi analisada pela imunodeteção.

9. Conclusões

Este trabalho mostrou relevantes aspectos da influência de um campo elétrico externo na orientação de proteínas GlnB-Hs sobre superfícies dielétricas hidrofílicas e hidrofóbicas, considerando características da solução, concentração de proteínas e intensidade do campo aplicado.

Proteína GlnB-Hs nativa em diferentes concentrações e desnaturada foi depositada sobre mica e lamínula siliconizada. Um campo elétrico máximo de 75 kV/m foi aplicado com diferentes taxas de variação. Curvas de corrente em função do campo elétrico, imagens de microscopia de força atômica e imunodeteção foram utilizadas para analisar o transporte das espécies da solução e suas possíveis orientações em relação às linhas de campo.

Curvas de corrente por campo elétrico foram monitoradas com o intuito de estabelecer parâmetros que controlem o transporte de carga e massa no sistema solução de proteína/substrato sólido. Entretanto, esta análise mostrou-se complexa. O mecanismo inicial de adsorção das partículas da solução, influência do campo elétrico na interação entre os componentes da solução tampão com as proteínas e com a superfície sólida do substrato dão uma idéia da complexidade do sistema analisado.

Os gráficos de corrente em função do campo elétrico para a lamínula siliconizada e mica, medidos sob variação de umidade relativa do ar e tendo um volume de água miliQ depositado, mostraram que a corrente medida é corrente de superfície. Imagens topográficas de MFA dos suportes sólidos corroboram a informação de que o substrato não sofre alterações com o campo elétrico.

Os resultados das curvas de corrente em função campo elétrico para as soluções são consistentes com predominância do transporte iônico, sendo dependente da mobilidade e do número de portadores livres na solução.

A interação dos íons livres na solução com as proteínas, com o Tris-HCl e com os diferentes substratos influencia a quantidade de íons livres inicialmente na solução e, conseqüentemente, o valor de corrente obtido. Assim, a mobilidade das espécies é dependente do substrato e da quantidade de soluto.

Os valores críticos de campo elétricos necessários para começar a escoar as espécies são maiores para as soluções depositadas sobre a lamínula siliconizada, pois a superfície de caráter hidrofóbico interage mais fortemente com os componentes da solução em relação à interação com a superfície hidrofílica da mica.

Campos elétricos de 30 ($\pm 0,3$) kV/m são suficientes para atingir a corrente elétrica de saturação na solução tampão com concentração de 50 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 8 sobre a mica. Quando proteínas são adicionadas à solução um campo elétrico mínimo de 32 ($\pm 0,3$) kV/m é necessário para saturação da corrente elétrica sobre a mica.

O campo elétrico para a corrente de saturação, relativa à migração dos íons da solução tampão sobre a lamínula siliconizada é de 50 ($\pm 0,5$) kV/m, entretanto quando as proteínas estão presentes na solução o campo necessário é aproximadamente 20 ($\pm 0,2$) kV/m.

Considerando que I-E para as soluções de NaCl corresponde a um comportamento linear, que a presença de Tris-HCl leva a necessidade de campo elétrico mínimo para o transporte de carga e que a adição de proteína não modifica o aspecto das curvas de I-E, conclui-se que as curvas de corrente elétricas são dominadas pelo Tris-HCl em ambos os substratos.

As imagens topográficas também mostram que as soluções formam filmes com alto grau de organização direcional sobre a mica e lamínula siliconizada. Sobre a lamínula siliconizada somente as soluções contendo proteína mostraram evidências de orientação com o campo elétrico aplicado. Enquanto que, na superfície da mica a formação de filmes com orientação preferencial foram obtidos na presença e ausência de GlnB-Hs.

As imagens de MFA mostram o transporte de massa das soluções de proteína GlnB-Hs sobre o substrato mica. A concentração e forma das estruturas supramoleculares formadas ao lado do anodo (lado em que a solução foi depositada) variam em relação às formadas ao lado do catodo.

A microscopia e o monitoramento da corrente não possibilitam distinguir se os arranjos são formados por proteínas e/ou componentes da solução tampão, exceto pela orientação linear ao longo do campo elétrico observado somente quando existe proteína na solução.

A detecção da GlnB-Hs pela reatividade específica com anticorpo anti-GlnB-Ab confirmou a migração da biomolécula sobre a superfície da mica. A homogeneidade na distribuição das proteínas depende do campo aplicado e da taxa de variação deste. Para campos máximos de 30 kV/m e taxa de 3 V/s os gradientes de campos formados não são suficientes para distribuir as proteínas na superfície.

Os resultados do monitoramento de corrente por campo elétrico e a caracterização por MFA dos filmes protéicos expostos a um campo elétrico externo, são uma contribuição para o conhecimento sobre a adsorção em interfaces biomoléculas/suporte sólidos.

9.1. Trabalhos futuros

- Medidas de corrente e tensão utilizando a técnica de monitoramento de corrente e com o uso de campos alternados. Estas técnicas permitem medidas de mobilidade, viscosidade e potencial zeta com maior precisão por limitar as variáveis envolvidas através do controle da concentração dos componentes e pH da solução.
- Desenvolvimento de modelos matemáticos (cinéticos e termodinâmicos) com os dados experimentais obtidos dos experimentos com GlnB-Hs [29].
- Experimentos utilizando espalhamento de luz na microfluídica. O uso da técnica *Phase Alternate Light Scattering* (PALS) uma técnica que modula o campo elétrico em baixa frequência e integra o desvio de fase, permitindo medir mobilidades das proteínas de sistemas com baixa constante dielétrica, alta força iônica e precisas próximas ao ponto isoelétrico.
- Utilização dos filmes protéicos organizados sob efeito do campo elétrico como semente bidimensional para favorecer a cristalização de proteínas da família PII. Os filmes serão utilizados como base para experimentos de cristalização, em que a proteína será depositada no método de *hang-drop* para cristalizar [73].
- Experimentos de interação proteína-biomoléculas via microscopia de força atômica. As forças de interação entre a proteína GlnB-Hs aderida de maneira ordenada ao substrato e outra biomolécula aderida à ponta do *cantilever* do MFA seriam monitoradas pelas curvas de força (nN) em função da distância (μm).
- Uso da tecnologia de microfluídica na construção de canais e no posicionamento de eletrodos, controlando-se com melhor acurácia a geometria dos dispositivos.

10. 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] FERREIRA, C. F. G.; BENELLI, E. M.; KLEIN, J.; SCHREINER, W.; CAMARGO, P. C. **Effect of protein solution components in the adsorption of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein on mica.** *Colloids and Surfaces* **2009**, 73 (2): 289-293.
- [6] BRUSATORI M. Dissertação: **Protein Adsorption Kinetics Under an Applied Electric Field: An Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy Study.** *Wayne State University* **2001**.
- [7] LEUNISSEN M. Tese: **Manipulating colloids with charges and electric fields.** *Utrecht University* **2007**.
- [8] KIRBY B. J. **Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices.** *Cambridge University Press* **2010**.
- [9] MASLIYAH J., BHATTACHARJEE S. **Electrokinetic and Colloid Transport Phenomena.** *John Wiley & Sons, Inc.* **2006**.
- [10] FRAAIJE J., KLEIJN J., VANDERGRAAF M. **Orientation of Adsorbed Cytochrome c as a Function of the Electrical Potential of the Interface Studied by Total Internal Reflection Fluorescence.** *Biophysical Journal* **1990**, 57: 965-976.
- [11] ASANOV A., WILSON W., OLDHAM P. **Regeneration Biosensor Platform: A Total Internal Reflection Fluorescence Cell with Electrochemical Control.** *Anal. Chem.* **1998**, 70: 1115-1163.
- [12] NINFA, A. J.; ATKINSON, M.R. **PII Signal Transduction Prot** 121
8(4): 172-179.
- [13] 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.

- [14] 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.
- [15] ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, W P. **Fundamentos da Biologia Celular.** *Artmed* **2005**.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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
- [20] LUBAMBO A., Tese: **Arranjos Auto-Organizados da Proteína GlnB de *Herbaspirillum seropedicae* em Silício.** *Universidade Federal do Paraná* **2005**.
- [21] ALMUTAIRI Z. Tese: **Electroosmotic Flow Characterization and Enhancement in PDMS Microchannels.** *University of Waterloo* **2008**.
- [22] KIRBY B., HASSELBRINK Jr. E. **Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations.** *Electrophoresis* **2004**, 25: 187–202.
- [23] 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.
- [24] LIKLEMA J. e-book: **Fundamentals of Interface and Colloid Science.** *Academic Press* **2005**.
- [25] SCHOCH R., HAN J., RENAUD P. **Transport phenomena in nanofluidics.** *Rev. Mod. Phys.* **2008**, 80 (3); 839-883.
- [26] POHL H. **The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields.** *J. Appl. Phys.* **1951**, 22: 869-871.
- [27] FEILNER T, KREUTZBERGER J, NIEMANN B, KRAMER A, POSSLING A, SEITZ H, KERSTEN B. **Proteomic Studies Using Microarrays.** *Current Proteomics* **2004**, 1: 283-295.

- [28] CRETICH M, DAMIN F, PIRRI G, CHIARI M. **Protein and Peptide Arrays: Recent Trends and New Directions.** *Biomolecular Engineering* **2006**, 23: 77–88.
- [29] FERREIRA, C. F. G. Tese: **Adsorção da Proteína GlnB-Hs de *Herbaspirillum seropedicae* Sobre a Superfície da Mica Analisada por MFA.** *Universidade Federal do Paraná* **2008**.
- [30] RABE M., VERDES D., SEEGER S. **Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces.** *Adv. Coll. And Interf. Sci.* **2011**, 162: 87-106.
- [31] NAKANISHI K., SAKIYAMA T., IMAMURA K. **On the Adsorption of proteins on solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon.** *J. of Biosc. And Bioeng.* **2001**, 91 (3): 233-244.
- [32] WAGNER P. **Immobilization Strategies for Biological Scanning Probe Microscopy.** *FEBS Letters* **1998**, 430: 112-115.
- [33] ISRAELACHVILI J. **Intermolecular & Surface Forces.** *Academic Press* **1991**.
- [34] WERTZ C., SANTORE M. **Adsorption and Reorientation Kinetics of Lysozyme on Hydrophobic Surfaces.** *Langmuir* **2002**, 18:1190-1199.
- [35] CUYPERS P., WILLEMS G., HEMKER H., HERMENS W. **Adsorption Kinetics of Protein Mixtures. A Tentative Explanation of the Vroman Effect.** *Ann. NY Acad. Sci.* **1987**, 516:244-252.
- [36] SCHAAF P., TALBOT J. **Surface Exclusion Effects in Adsorption Processes.** *J. Chem. Phys.* **1989**, **91**: 4401-4410.
- [37] SCHAAF P., TALBOT J. **Kinetics of Random Sequential Adsorption.** *Phys. Rev. Lett.* **1989**, **62**: 175–178.
- [38] MCGUIRE J., WAHLGREN M., ARNEBRANT T. **Structural Stability Effects on the Adsorption and Dodecyltrimethylammonium Bromide Mediated Elutability of Bacteriophage T4 Lysozyme at Silica Surfaces.** *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 170: 182-192.
- [39] SZÖLÖSI G., DERÉNYI I., VÖRÖS J. **Reversible Mesoscopic Model of Protein Adsorption: From Equilibrium to Dynamics.** *J. Phys. Stat. Mech. Appl.* **2004**, 343: 359-375.
- [40] WAHLGREN M., ELOFSSON U. **Simple Models for Adsorption Kinetics and Their Correlation to the Adsorption of β -Lactoglobulin A and B.** *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 188: 121-129.
- [41] RABE M., VERDES D., RANKL M., ARTUS G., SEEGER S. **A Comprehensive Study of Concepts and Phenomena of the Nonspecific Adsorption of Beta-Lactoglobulin.** *Chemphyschem.* **2007**, 8(6): 862-72.

- [42] MINTON A. **Effects of Excluded Surface Area and Adsorbate Clustering on Surface Adsorption of Proteins. II. Kinetic Models.** *Biophys J.* **2001**, 80: 1641-1648.
- [43] RABE M., VERDES D., ZIMMERMANN J., SEEGER S. **Surface Organization and Cooperativity During Nonspecific Protein Adsorption Events.** *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112(44): 13971-13980.
- [44] ANDRADE J., HLADY V., WEI A. **Adsorption of Complex Proteins at Interfaces.** *Pure & Appl. Chem.* **1992**, 64(11): 1777-1781.
- [45] KRISDHASIMA V., VINARAPHONG P., MCGUIRRE, J. **Adsorption Kinetics and Elutability of α -Lactalbumin, β -Casein, β -Lactoglobulin and Bovine Serum Albumin at Hydrophobic and Hydrophilic Interfaces.** *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, 161: 325–334.
- [46] BUIJS J., HLADY V. **Adsorption Kinetics, Conformation, and Mobility of the Growth Hormone and Lysozyme on Solid Surfaces, Studied with TIRF.** *J. Coll. Interf. Sci.* **1997**, 190 (1): 171-181.
- [47] LUBAMBO A., BENELLI E., KLEIN J., SCHREINER W., CAMARGO P. **X-Ray Study of *Herbaspirillum Seropedicae* GlnB Protein Adsorbed on Silicon.** *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, 44: 503-509.
- [48] ROACH P., FARRAR D., PERRY C. **Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes.** *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127: 8168-8173.
- [49] FIXMAN M. **Charged Macromolecules in External Fields. I. The Sphere.** *J. Chem. Phys.* **1980**, 72(9): 5177-5186.
- [50] TIPLER P., MOSCA G. **VOL. 2 – Eletricidade e Magnetismo LTC Editora 2000.**
- [51] CHANG S. Dissertação: **New Electrokinetics Techniques for Material Manipulation on the Microscale.** *North Caroline State University 2008.*
- [52] DELGADO A., GONZÁLEZ-CABALLERO F., HUNTER R., KOOPAL L., LYKLEMA J. **Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report).** *Pure Appl. Chem.* **2005**, 77 (10): 1753–1805.
- [53] MALVERN INSTRUMENTS. **Zeta Potential. An Introduction in 30 Minutes.** *Zetasizer Nano series technical note 2011.*
- [54] BRUUS H. **Theoretical Microfluidics, Oxford University Press, First Edition, N.Y. 2008.**
- [55] LI D. **Electrokinetics in Microfluidics. Vol. 2. Elsevier Ltda 2004.**
- [56] SQUIRES T., QUAKE S. **Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale.** *Rev.Mod. Phys.* **2005**, 77(3): 977-1026.
- [57] SAHA A., MITRA S. **Modeling and Simulation of Microscale Flows.** *Intech 2008*, 283-316.

- [58] BJØNTEGAARD T. Tese: **High Order Methods for Incompressible Fluid Flow: Application to Moving Boundary Problems.** *Norwegian University of Science and Technology* **2008**.
- [59] RAY B., REDDY P., BANDYOPADHYAY D., JOO S., SHARMA A., QIAN S., BISWAS G. **Instabilities in Free-Surface Electroosmotic Flows.** *Theor. Comp. Fluid Dyn.* **2011**, 26: 311-318.
- [60] ALMUTAIRI Z., GLAWDEL T., REN C., JOHNSON D. **A Y-Channel Design for Improving Zeta Potencial and Surface Conductivity Measurements Using the Current Monitoring Method.** *Microfluidics Nanofluidics* **2009**, 6: 241-251.
- [61] REN L., ESCOBEDO-CANSECO C., LI D. **A New Method of Evaluating the Average Electro-osmotic Velocity in Microchannels.** *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 250: 238-242.
- [62] JONES T. **Basic Theory of Dielectrophoresis and Electrorotation.** *EEE Eng. In Med. And Biol. Magazine* **2003**.
- [63] ALHANATI L. **Eletricidade ELE.** Disponível em < http://alfaconnection.net/pag_avsf/ele1102.htm > Acesso em: 22/02/2012.
- [64] MÜLLER T., FIEDLER S., SCHNELLE T., LUDWIG K. JUNG H., GÜNTER F. **High Frequency Electric Field for Trapping of Viruses.** *Biotechnol. Tech.* **1996**, 10: 221–226.
- [65] WONG K., WANG H., DEVAL H., HO M. **Electrokinetics in micro devices for biotechnology applications.** *IEEE/ASME Trans. Mechatron.* **2004**, 9: 366–376.
- [66] KANG K. Dissertação: **Microfluidics of Complex Fluids.** *Ohio State University* **2003**.
- [67] MALMSTEN M. **Formation of Adsorbed Protein Layers.** *J. of Col. And Inter. Sci.* **1998**, 207: 186-199.
- [68] HYNINEN A., DIJKSTRA M. **Phase Behavior of dipolar Hard and Soft Spheres.** *Phys. Rev.E.* **2005**, 72(5):60-70.
- [69] LI N. Tese: **Colloidal Ordering Under External Electric Fields.** *Memorial University of Newfoundland* **2008**.
- [70] MÄKELÄ K. Dissertação: **Characterization and performance of electrorheological fluids based on pine oils.** *Technical Research Centre of Finland* **1999**.
- [71] TIAN Y., LI C., ZHANG M., MENG Y., WEN S. **Transient Response of an Electrorheological Fluid under Square-Wave Electric Field Excitation.** *J. of Colloid and Interface Sci.* **2005**, 288: 290–297.
- [72] WEINER B., TSCHARTUTER W., FAIRHURST D. **Zeta Potencial: A New Approach.** *Paper presented at the Canadian Mineral Analysts Meeting* **1993**.

- [73] PECHKOVA E, NICOLINI C. **Protein Nanocrystallographie: A New Approach to Structural Proteomics.** *Trends in Bio* **2004**, 22: 117-122.
- [74] SAZAKI G, MIYASHITA S, DURBIN S, KOMATSU H, NAKADA T. **Direct AFM Observations of Impurity Effects on a Lysozyme Crystal.** *Journal of Crystal Growth* **1999**, 196: 503-510.
- [75] MALKIN A, KUZNETSOV Y, MCPHERSON A. **In situ Atomic Force Microscopy Studies of Surface Morphology, Growth Kinetics, Defect Structure and Dissolution in Macromolecular Crystallization.** *Journal of Crystal Growth* **1999**, 196: 471-488.
- [76] ASTIER J., BOKERN D., LAPENA L., VEESLER S. **α -Amylase Crystal Growth Investigated by in situ Atomic Force Microscopy.** *Journal of Crystal Growth* **2001**, 226: 294-302.
- [77] 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.
- [78] NEVES B, VILELA J, ANDRADE M. **Microscopia de Varredura por Sonda Mecânica: Uma Introdução.** *Cerâmica* **1998**, 44 (290).
- [79] ZANETTE S. Apostila: **"Funcionamento de um Microscópio de Força Atômica"** site do CBPF 1997. Disponível em:< www.cbpf.br/~nanos/Apostila/index.html >. Acesso em: 04 set 2006.
- [80] 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.
- [81] SANTOS N, CASTANHO M. **An Overview of the Biophysical Applications of Atomic Force Microscopy.** *Biophysical Chemistry* **2004**, 107: 133–149.
- [82] KITTEL C. **Physique de l'état solide.** *Dunod, Paris* **1983**.
- [83] FILHO, G. Dissertação: **Medidas do Perfil da Permissividade Elétrica em Interfaces Sólido-Líquido Usando Microscopia de Força Atômica.** *Universidade Estadual de Campinas, Campinas* **2001**.
- [84] LI HQ. **The Common MFA Modes.** Disponível em:< <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm729/MFA/details.htm> >. Acesso em: 04 set 2006.
- [85] 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.
- [86] GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE. **Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents.** *Product Booklet.* **2011**.

- [87] VASILIKI B. Dissertação: **Silicone-Protein Interactions**. *McMaster University* **1999**.
- [88] XIA H., TAKASAKI M., HIRAI T. **Actuation Mechanism of Plasticized PVC by Electric Field**. *Sensors and Actuators A: Physical* **2010**, 157: 307-312.
- [89] MARK J. **Polymer Data Handbook**. *Oxford Univ. Press, New York* **1999**.
- [90] KLYKKEN P., SERVINSKI M., THOMAS X. **Silicone Film-Forming Technologies for Health Care Applications**. *Down Corning Corporation* **2009**.
- [91] BELLISENT-FUNEL M., SRIDI-DORBEZ R., BOSIO L. **X Ray and Neutron Scattering Studies of the Structure of Water at a Hydrophobic Surface**. *J. Chem. Phys.* **1996**, 104 (24): 10023-10029.
- [92] TORIGOU A. Tese: **How Water Meets a Hydrophobic Surface: Reluctantly and with Fluctuations**. *University of Illinois at Urbana-Champaign* **2006**.
- [93] SCHNEIDER L. Dissertação: **Desenvolvimento de um Chip Microfluídico para Diagnósticos em Saúde Pública: Prova de Conceito**. *Universidade Federal do Paraná*. **2010**.
- [94] STEITZ R., GUTBERLET T., HAUSS T., KLÖSGEN B., KRASTEV R., SCHEMMEL S., SIMONSEN A., FINDENEGG G. **Nanobubbles and Their Precursor Layer at the Interface of Water Against a Hydrophobic Substrate**. *Langmuir* **2003**, 19: 2409-2418.
- [95] WATSON J., BARON M. **The behaviour of water in poly(dimethylsiloxane)**. *Journal of Membrane Science* **1996**, 110: 47-57.
- [96] SEAVER A. **Surface Resistivity of Uncoated Insulators**. *Journal of Electrostatics* **2005**, 63: 203–222.
- [97] AWAKUNI Y., CALDERWOOD J. **Water vapour adsorption and surface conductivity in solids**. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1972**, 5: 1038-1045.
- [98] PANDRAUD J. **Editorial da MILIPORE: Measuring the Conductivity of Ultrapure Water**. *Water Line* **1998**, 1 (3).
- [99] UC WEB. **Percolation and Tunniling**. Disponível em <
<http://www.phys.canterbury.ac.nz/research/nano/Percolation%20and%20Tunneling.shtml>> Acesso em: 08/05/2012.
- [100] FROSTRBURG A. **Water Properties Calculator**. Disponível em <
<http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/javascript/water-properties.html>> Acesso em: 12/05/2012.

- [101] SAWA G., CALDERWOOD J. **Dependence of surface conduction current in Oxidized Polyethylene on Electric Field at Various Humidities.** *J. Phys. C: Solid St. Phys.* **1971**, 4: 2313-2318.
- [102] CHAH S., ZARE R. **Surface Plasmon Resonance Study of Vesicle Rupture by Virus-Mimetic Attack.** *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **2008**, 10: 3203–3208.
- [103] PUBCHEM COMPOUND. **Tromethamine – Compound Summary.** Disponível em < http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6503&loc=ec_rcs > Acesso em: 17/06/2012.
- [104] O Grafite Natural Cristalino. Disponível em < http://www.ciaci.com/ciacicom/grafite_natural_cristalino.htm > Acesso em: 01/06/2012.
- [105] ZANETTE S. **Funcionamento de um Microscópio de Força Atômica. Apostila online.** Disponível em < <http://www.cbpf.br/~nanos/Apostila/12.html> > Acesso em: 01/06/2012.
- [106] HLUSHKOU D., PERDUE R., DHOPESHWARKAR R., CROOKS R., TALLAREK U. **Electric field gradient focusing in microchannels with embedded bipolar electrode.** *Lab Chip* **2009**, 9: 1903–1913.
- [107] SAID E. Dissertação: **Electrolyte-Based Organic Electronic Devices.** *Linköping University* **2007**.
- [108] SCHELLY Z., LUNDY-DOUGLASO K., EYRINGI H. **Electric double layer dynamics by high-field electroluminescence inaqueous solution (Destriau effect).** *Proc. Nati. Acad. Sci.* **1978**, 75 (6): 2549-2552.
- [109] BURDICK G., BERMAN N., BEAUDOIN S. **Describing Hydrodynamic Particle Removal from Surfaces Using the Particle Reynolds Number.** *J. of Nanoparticle Res.* **2001**, 3: 455–467.
- [110] VALLADARES R., GOLDSTEIN P., STERN C., CALLES A. **Simulation of the motion of a Sphere Through a Viscous Fluid.** *Rev. Mex. De Fís.* **2003**, 49 (2): 166–174.
- [111] 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.
- [112] NAIDU M. **High Voltage Engineering.** *McGraw-Hill Education Ed.* **2009**.
- [113]: NANOWERK. **AFM Meets Raman. Pushing the Envelop in atomic Force Microscopy.** Disponível em < <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=13498.php> > Acesso em: 09/05/2012.
- [114] SETHUARAMAN A., HAN M., KANER R., BELFORT G. **Effect of Surface Wettability on the Adhesion of Proteins.** *Langmuir* **2004**, 20: 7779-7788.
- [115] GEOLOGICAL SURVEY (U.S.). **Geology of Quartz Creek Pegmatite District Gunnison, County Colorado.** *Geological Survey Professional Paper* **1949**.

- [116] KUA C., LAM Y., YANG C., YOUCEF-TOUMI. **Review of Bioparticle Manipulation Using Dielectrophoresis. *IMTS 2005*.**
- [117] VERDAGUER A., SACHA G., BLUHM H., SALMERON M. **Molecular Structure of Water at Interfaces: Wetting at the Nanometer Scale. *Chem. Rev.* 2006, 106: 1478-1510.**
- [118] JENA K., HORE D. **Water structure at solid surfaces and its implications for biomolecule adsorption. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2010, 12: 14383–14404.**
- [119] DOLCI D., ALOISI G., LANZI L., CARLÀ M. **A Study of the Ionic Conduction of Mica Surface by Admittance Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 2007, 127: 074701-7.**
- [120] XU K., CAO P., HEATH J. **Graphene Visualizes the First Water Adlayers on Mica at Ambient Conditions. *Science* 2010, 329: 1188-1191.**
- [121] ODELIUS M., BERNASCONI M., PARRINELLO M. **Two Dimensional Ice Adsorbed on Mica Surface. *Phys. Rev. Lett.* 1997, 78 (14): 2855-2858 .**
- [122] MIRANDA P., XU L., SHEN Y., SALMERON M. **Icelike Water Monolayer Adsorbed on Mica at Room Temperature. *Phys. Rev. Lett.* 1998, 81(26): 5876-5879.**
- [123] NAKAMURA M., ITO M. **Infrared Spectroscopic Study of Water Coadsorbed with Na on the Ru (111) Surface. *Surf. Sci.* 2002, 502-503: 144-148.**
- [124] JACKSON M., MANTSCH H. **The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Crit. Rev. in Bioc. And Mol. Bio.* 1995, 30 (2): 95-120.**
- [125] CHITTUR K. **FTIR/ATR for Protein Adsorption to Biomaterial Surfaces. *Biomaterials* 1998, 19: 357-369.**
- [126] GAMBICHLER T., MOUSSA G., ALTMAYER P. **A Pilot study of Fluorescence Diagnosis of Basal Cell-Carcinoma Using a Digital Flash Light-Based Imaging System. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine* 2008, 24: 67-71.**
- [127] NIITSUMAI J., OIKAWAI H., KIMURA E., USHIKI T., SEKIGUGUI T. **Cathodoluminescence Investigation of organic Materials. *J. of Electron Micros.* 2005, 54 (4): 325-330.**
- [128] MULHERAN P., KUBIAK K. **Protein Adsorption Mechanisms on Solid Surfaces: Lysozyme-on-Mica. *Molecular Simulation* 2009, 35 (07): 561-566.**

Apêndice 1.

Resumo das amostras preparadas e resultados de corrente em função do campo elétrico e imagens de MFA

Substrato	L (mm)	Solução	Concentração (nM)	Taxa de variação de E (V/mm.s)	Microscopia de Força atômica					Curva (I-E)		
					Orientação	Migração	Tamanho das estruturas (nm)		Figura	Imáx (μA)	E (KV/m)	Figura
							Polo Negativo	Polo Positivo				
mica	10	GlnB-Hs	10	30	sim (53°)	sim	44.6(±9.4)	92(±37)	7.14-A e C	0,67	30	7.16
mica	10	GlnB-Hs	100	30	não	sim	filme heterogêneo	filme descontínuo	7.14-B e D	0,29	30	7.16
mica	10	GlnB-Hs desnaturada	10	30	sim (fios paralelos)	sim	40(±12)	filme heterogêneo	7.15	2,84	30	7.16
mica	10	H2O miliQ	–	30	não	sim	filme descontínuo	filme descontínuo	7.2	1,91	30	7.13
mica	10	NaCl	5,00E+06	30	não	sim	62.2(±6.4)	119(±19)	7.12-A e D	0,58	30	7.13
mica	10	Tris	5,00E+06	30	não	sim	154.5(±26.6)	54(±4)	7.12-B e E	0,01	30	7.13
mica	10	Tampão	5,00E+06 / 5,00E+06	30	não		71(±18)	filme heterogêneo	7.12-C e F	1,63	30	7.13
mica	10	GlnB-Hs	10	3	não	sim	48(±12)	59(±15)	7.10-A e D	0,67	30	7.11
mica	10	GlnB-Hs	100	3	não	sim	filme heterogêneo	filme descontínuo	7.10-B e E	0,32	30	7.11
mica	10	GlnB-Hs desnaturada	10	3	não	sim	53(±9)	162	7.10-C e F	0,38	26	7.11
mica	10	H2O miliQ	–	3	não	sim	filme descontínuo	90(±26)	7.2	0,12	30	7.9
mica	10	NaCl	5,00E+06	3	não	sim	36.5(±7.3)	45.1(±10.3)	7.8-A e D	0,99	30	7.9
mica	10	Tris	5,00E+06	3	não	sim	filme descontínuo	filme descontínuo	7.8-B e E	0,71	30	7.9
mica	10	Tampão	5,00E+06 / 5,00E+06	3	não	sim	filme descontínuo	filme heterogêneo	7.8-C e F	1,02	30	7.9
mica	4	GlnB-Hs	10	3	sim	sim	filme heterogêneo	52(±8)	7.5-A e C	3	51	7.7
mica	4	GlnB-Hs	100	3	não	sim	filme descontínuo	filme descontínuo	7.5-B e D	2,5	29	7.7

mica	4	GlnB-Hs desnaturada	10	3	sim (53°)	sim	filme heterogêneo	filme heterogêneo	7.6	2,7	40	7.7
mica	4	H2O miliQ	–	3	não	sim	filme descontínuo	filme descontínuo	7.2	0,35	75	7.4
mica	4	NaCl	5,00E+06	3	não	sim	filme descontínuo	filme heterogêneo	7.3-A e D	0,74	75	7.4
mica	4	Tris	5,00E+06	3	sim (57°)	sim	filme heterogêneo	48(±8)	7.3-B e E	1,42	54	7.4
mica	4	Tampão	5,00E+06 / 5,00E+06	3	não	sim	44(±9)	filme heterogêneo	7.3-C e F	1,33	50	7.4
lamínula siliconizada	4	GlnB-Hs	10	3	sim	ND	50(±10)		5.9-A	0,29	75	5.10
lamínula siliconizada	4	GlnB-Hs	100	3	não	ND	filme descontínuo		5.9-B	0,19	32	5.10
lamínula siliconizada	4	GlnB-Hs desnaturada	10	3	sim (fios paralelos)	ND	166(±33)		5.9-C	0,2	31	5.10
lamínula siliconizada	4	H2O miliQ	–	3	não	ND	filme descontínuo		5.2-D	0,33	75	5.4
lamínula siliconizada	4	NaCl	5,00E+06	3	não	ND	127(±31)		5.7-A	0,33	75	5.8
lamínula siliconizada	4	Tris	5,00E+06	3	não	ND	155(±36)		5.7-B	0,24	46	5.8
lamínula siliconizada	4	Tampão	5,00E+06 / 5,00E+06	3	não	ND	filme heterogêneo		5.7-C	0,29	51	5.8

Apêndice 2.

Medida de corrente em função do campo elétrico

Cálculo da voltagem da amostra em função dos resistores ligados em série.

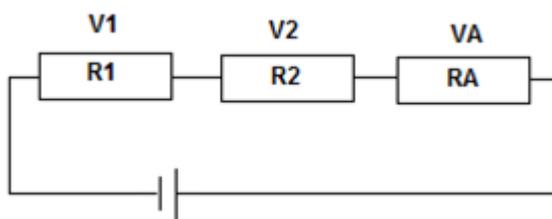


Fig. Ap. 2.1: Desenho esquemático do arranjo experimental para aplicação de tensão nas soluções.

O valor da resistência equivalente do circuito R_T é a soma dos valores de todas as resistências ligadas em série [50]

$$R_T = R_1 + R_2 + R_A \quad (\text{Ap. 2.1})$$

em que R_1 é o resistor de 43,7 k Ω , R_2 é o resistor de 8,37 k Ω e R_A é a resistência da amostra (maior que $10^7 \Omega$).

Segundo Kirchoff, em um circuito fechado a queda de tensão no circuito é igual a tensão de alimentação da entrada [50]

$$V_T = V_1 + V_2 + V_A \quad (\text{Ap. 2.2})$$

em que V_1 é a tensão medida em R_1 , V_2 é a tensão em R_2 e V_A é a tensão desconhecida da amostra. Rearranjando a eq. (Ap. 2.2) tem-se que a tensão na amostra é $V_A = (V_T - V_2) - V_1$.

Lembrando que $R = V/I$ e em um circuito em série a mesma corrente I passa através de todos os componentes, não variando o seu valor (lei de Ohm) [50]. Assim,

$$I = \frac{V_1}{R_1} = \frac{V_2}{R_2} \quad (\text{Ap. 2.3})$$

Manipulando a eq. (Ap. 2.3) a tensão no resistor 2 é $V_2 = (R_2/R_1)V_1$.

Então,

$$V_A = V_T - \frac{R_2}{R_1} \cdot V_1 - V_1 \quad (\text{Ap. 3.4})$$

$$V_A = V_T - \left(\frac{R_2}{R_1} + 1 \right) V_1 \quad (\text{Ap. 2.5})$$

Apêndice 3.

Filmes formados sem campo elétrico aplicado

Os filmes de proteína GlnB-Hs nativa e desnaturada formados por *drop deposition* e sem aplicação de campo sobre mica e lamínula siliconizada são mostradas na figura Ap. 3.1. Um volume de 2 μl de solução de proteína nativa de 10 nM e 100 nM (50 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 8) e desnaturada 10 nM (50 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 8) foram depositadas nos substratos e incubadas por 24h à 21 °C sem controle de umidade.

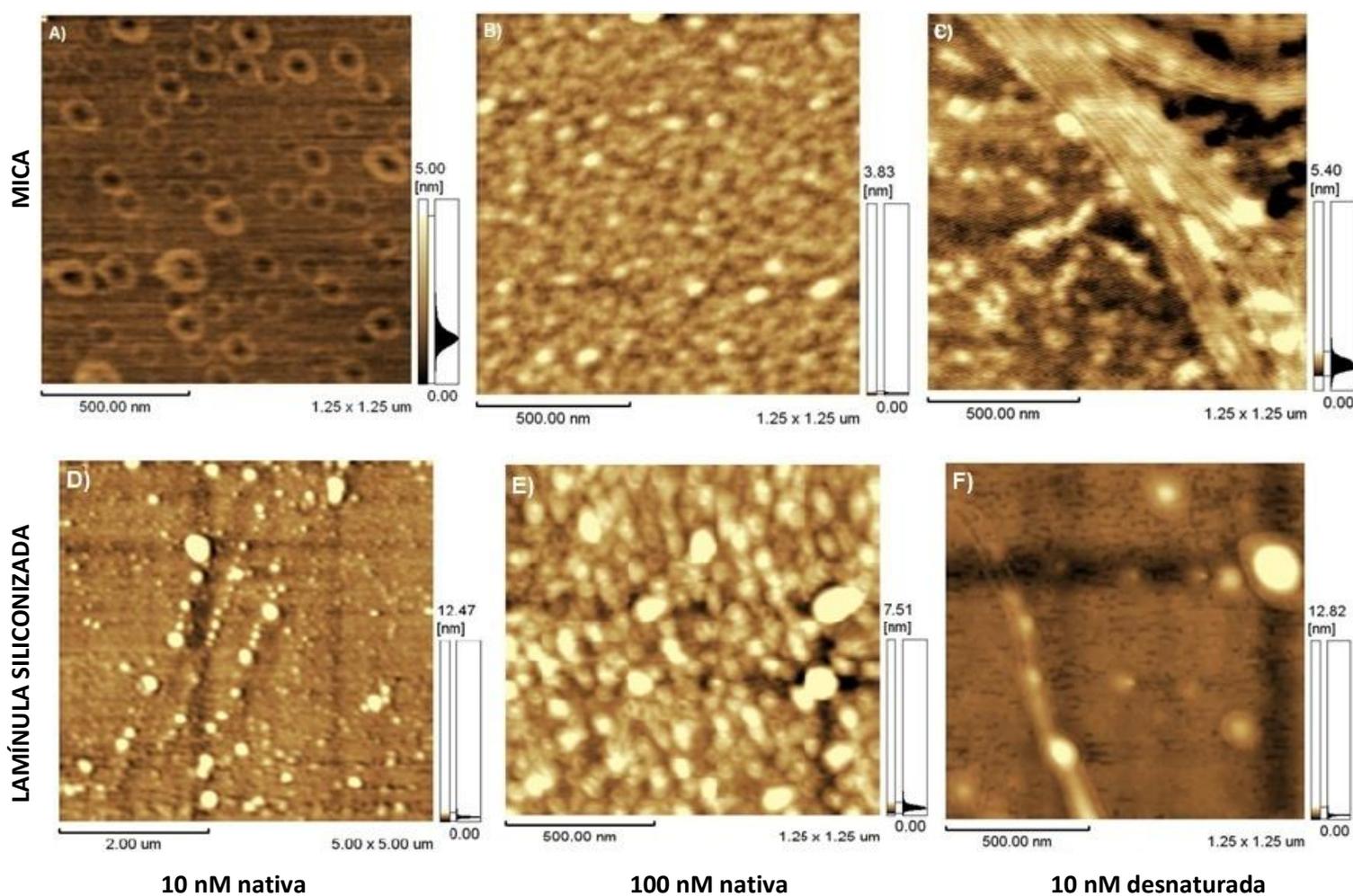


Fig. Ap. 3.1: Topografia dos filmes de proteína GlnB-Hs 10 nM nativa (A e C), 100 nM (B e E) e desnaturadas (C e F) formados sobre mica (A a C) e lamínula siliconizada (D a F).

As imagens de MFA dos filmes protéicos sem a presença de campo elétrico apresentam uma distribuição heterogênea das estruturas supramoleculares das soluções ocupando toda a área analisada.

Na figura Ap. 3.1-A do filme formado pela solução de GlnB-Hs 10 nM nativa sobre mica nota-se estruturas em forma de anéis com diâmetro de 125 (± 19) nm que revestem completamente a superfície. Para a solução com maior concentração de proteína o filme contínuo obtido sobre a mica (Fig. Ap. 3.1-B) apresenta estruturas esféricas de 30 (± 5) nm.

A imagem da amostra de solução de proteína GlnB-Hs desnaturada sobre mica (Fig. Ap. 3.1-C) mostra as estruturas em fios característica da estrutura primária. As proteínas agregam em fios de comprimento maiores que 5 μm e de espessura de 10 (± 3) nm.

Sobre a lamínula siliconizada a proteína GlnB-Hs nativa em concentrações de 10 nM e 100 nM formam filmes que recobrem a superfície (Fig. Ap. 3.1-D e Ap. 3.1-E). Os menores aglomerados de forma esférica têm diâmetros de 50 (± 15) nm.

O filme formado pela solução de GlnB-Hs desnaturada sobre a lamínula siliconizada (Fig. Ap. 3.1-F) é heterogêneo e apresenta apenas uma estrutura em fio de aproximadamente 34 nm característica da proteína desenovelada.

Os filmes formados pela deposição por *drop deposition* de 2 μl de água miliQ e solução de 50 mM de Tris-HCl pH 8 sobre mica sem aplicação de campo são descontínuos e heterogêneos (Fig. Ap. 3.2).

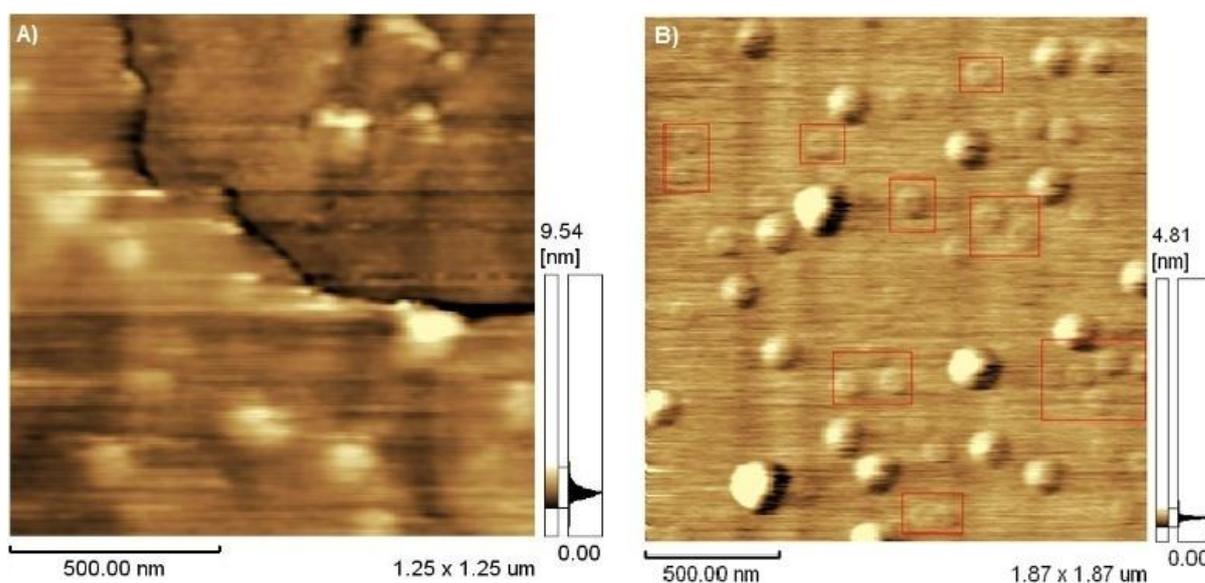


Fig. Ap. 3.2: Topografia dos filmes formados pela deposição de A) água miliQ e B) solução de 50 mM de Tris-HCl pH 8 sobre mica.

A formação de um filme descontínuo proveniente da água remanescente do volume depositado em equilíbrio com a camada de contaminação do ambiente foi observado (Fig. Ap. 3.2-A). Na imagem de Tris-HCl observamos dois padrões de auto-organização: 1) aglomerados esféricos maiores com diâmetro de $129 (\pm 25)$ nm e 2) aglomerados menores de $104 (\pm 15)$ nm de diâmetro com uma depressão central (Fig. Ap. 3.2-B). Os aglomerados com depressão central podem consistir a unidade básica do filme que se combina para formar os aglomerados maiores.