

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

**Juliana Tamires da Silva**

A Eficiência da Microscopia de Força Atômica no desenvolvimento de biossensores

Maceió, AL

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

**Juliana Tamires da Silva**

A Eficiência da Microscopia de Força Atômica no Desenvolvimento de Biossensores

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Graduação em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Alagoas  
(UFAL) como requisito parcial para obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Teixeira de Souza  
Coorientadora: Prof. Dra. Elaine C. O. Silva

Maceió, AL

2023

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 661

- S586e Silva, Juliana Tamires da.  
A eficiência da microscopia de força atômica no desenvolvimento de biossensores / Juliana Tamires da Silva. – 2023.  
34 f. : il.
- Orientador: Samuel Teixeira de Souza.  
Coorientadora: Elaine C. O. Silva.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) –  
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.  
Maceió, 2023.
- Bibliografia: f. 31-34.
1. Microscopia de força atômica. 2. biossensores. 3. Funcionalização.  
4. Ligação antígeno-anticorpo. I. Título.

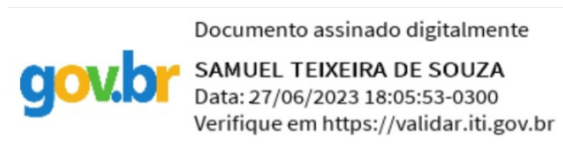
CDU: 62-8:57.083.3

**JULIANA TAMIRES DA SILVA**

**A Eficiência da Microscopia de Força Atômica no Desenvolvimento de Biossensores**

TCC apresentado ao corpo docente da Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Apresentado em 14/06/2023.

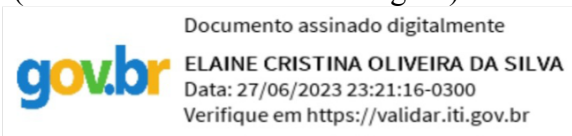
**Banca Examinadora:**



---

Orientador: Prof. Dr. Samuel Teixeira de Souza

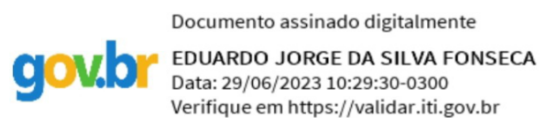
(Universidade Federal de Alagoas)



---

Coorientadora: Prof. Dra. Elaine C. O. Silva

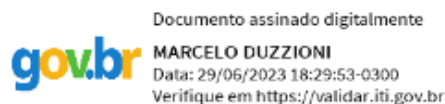
(Universidade Federal de Alagoas)



---

Examinador Interno: Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

(Universidade Federal de Alagoas)



---

Examinador Interno: Prof. Dr. Marcelo Duzzioni

(Universidade Federal de Alagoas)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter escutado e respondido todas as minhas orações, mesmo antes que eu entrasse na graduação, e ainda mais por ter estado comigo durante os últimos anos.

Agradeço também a minha família, por ter me ensinado desde muito cedo que a melhor forma de se viver é através do trabalho e lutando pelos nossos sonhos, ao meu querido pai por me ensinar o significado de ser gentil com o próximo, a minha amada mãe por me mostrar o valor do esforço e dedicação e a melhor irmã caçula que eu poderia ter, por me ensinar a ser forte e lutar para ser um pouco melhor todos os dias.

Sou muito agradecida também aos meus professores, todos eles, mas em especial aqueles que marcaram minha passagem pela UFAL.

Aos professores Eduardo Jorge e Samuel Teixeira pela oportunidade, paciência e todo o aprendizado que me passaram, a professora Fernanda Selingardi, por ter sido minha primeira orientadora e por ter dito que eu tinha mente de bióloga, me dando assim a coragem para traçar um novo caminho, sendo ela também a minha primeira inspiração feminina dentro da academia, mas não a única, obrigada Elaine Cristina, por todo aprendizado dentro do laboratório de Óptica e Nanoscopia do IF, por todas as nossas conversas e sincera preocupação.

Aos muitos amigos que conheci durante todos os períodos, aqueles que ainda fazem parte da minha vida, e aqueles que por algum motivo tiveram apenas uma breve passagem por ela.

A Débora Avelino por ter agraciado com uma das mais frutíferas e sincera amizade, com quem tenho sempre o prazer de dar muitas risadas.

Ao querido Helivelton por ter me ajudado a passar por momentos difíceis com leveza.

Ao meu mais recente querido amigo Matias por sua alegria e paciência constante.

Agradeço também, ao meu improvável e muito querido companheiro, Artur, por ter sido um incentivo nos últimos meses, por me ensinar muito sobre disciplina e pelas aulas muito bem aceitas de história.

Agradeço imensamente as políticas públicas de assistência estudantil, que garantiram minha entrada e permanência na universidade assim como aos grupos de apoio e fomento à pesquisa em nosso país.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a mim mesma, por não ter desistido e por ter tido coragem de pedir ajuda quando minhas forças pareciam ter se esgotado.

*“Você pode ser o que quiser nessa vida, contanto que trabalhe para isso.*

***Filme Mãos Talentosas”***

## RESUMO

Os métodos de diagnósticos hoje perfazem parte essencial no tratamento de doenças e cura dos pacientes. Para que sejam realizados, faz-se necessário o uso de técnicas sofisticadas. O surgimento dos biossensores como equipamentos capazes de realizar tal função tem revolucionado não somente a forma como os procedimentos médicos vêm sendo realizados ao longo dos anos, mas também exerce um caráter primordial na qualidade de vida de indivíduos que necessitam de um diagnóstico rápido e preciso. Os biossensores podem receber diferentes classificações, dependendo de seu transdutor ou elemento biológico; a partir desses pontos pode-se definir seu principal objetivo. Pode-se encontrar hoje biossensores eletroquímicos, magnéticos, piezoelétricos, térmicos, de ressonância e ópticos. Mesmo com tamanha variação de ferramentas, a demanda por maior precisão e sensibilidade continua a impulsionar o contínuo desenvolvimento de outras técnicas. O presente trabalho utilizou-se da microscopia de força atômica para o desenvolvimento de um biossensor (nano imunossensor), capaz de medir interações antígeno-anticorpo, utilizando como alvos a Albumina sérica bovina (BSA) e o Anti-BSA, imobilizados através da técnica de funcionalização de superfícies denominada Silanização e posteriormente realizando medidas de curvas de força com o equipamento AFM. Os testes demonstraram que existem diferenças significativas na interação da ponta do sensor não funcionalizado em contato com o substrato também não funcionalizado e da força de adesão em superfícies funcionalizadas. Não somente a força apresentou valores diferentes, como a forma da curva demonstrou *steps* da interação entre antígeno e anticorpo. Os dados coletados foram comparados à literatura existente e demonstraram que houve uma interação efetiva entre antígeno-anticorpo.

**Palavras-chaves:** Microscopia de Força Atômica, Funcionalização, Ligação antígeno anticorpo



## **ABSTRACT**

Today, diagnostic methods are an essential part of disease treatment and patient healing. In order to carry them out, the use of sophisticated techniques is necessary. The emergence of biosensors as equipment capable of performing such a function has revolutionised not only the way medical procedures have been carried out over the years, but also plays a key role in the quality of life of individuals who need a quick and accurate diagnosis. Biosensors can receive different classifications, depending on their transducer or biological element; from these points their main objective can be defined. One can find today electrochemical, magnetic, piezoelectric, thermal, resonance and optical biosensors. Even with such a variation of tools, the demand for greater accuracy and sensitivity continues to drive the ongoing development of other techniques. The present work used atomic force microscopy to develop a biosensor (nano immunosensor), capable of measuring antigen-antibody interactions, using as targets the Bovine Serum Albumin (BSA) and Anti-BSA, immobilized by means of the surface functionalization technique called Silanization and subsequently performing force curve measurements with the AFM equipment. The tests showed that there are significant differences in the interaction of the non-functionalised sensor tip in contact with the also non-functionalised substrate and of the adhesion force on functionalised surfaces. Not only the strength presented different values, but the shape of the curve showed steps of the interaction between antigen and antibody. The data collected were compared to the existing literature and demonstrated that there was an effective antigen-antibody interaction.

**Keywords:** Atomic Force Microscopy, Functionalization, antibody-antigen binding

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. BIOSSENSORES.....</b>	<b>12</b>
2.1 Dos componentes biológicos utilizados no desenvolvimento do biossensor.....	13
<b>3. PROTEÍNAS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Albumina Sérica.....	14
3.2 Anticorpos.....	16
<b>4. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....</b>	<b>17</b>
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
6.1 Sonda e substrato.....	21
6.2 Silanização.....	22
6.3 Fixação antígeno e anticorpo.....	23
6.4 Curvas de Força.....	23
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce de doenças confere a nossa espécie e a outras uma melhor oportunidade de tratamento, proteção, qualidade e preservação da vida.

A capacidade do ser humano em desenvolver ferramentas que possam não apenas estudar estruturas biológicas mas também medir suas interações, ainda que em fases iniciais, proporcionou uma grande vantagem diante de situações que antes eram consideradas desvantajosas à saúde pública. Muitas das patologias possuem um início silencioso e quando não o são por vezes possuem difícil diagnóstico que é o ponto mais importante para se definir qual a melhor abordagem no tratamento de tais doenças.

O desenvolvimento dos biossensores é um marco importante no diagnóstico e tratamento de diferentes patologias. De forma mais geral trata-se de dispositivos eletrônicos que possuem a capacidade de medir interações bioquímicas geradas durante o metabolismo biológico e traduzi-las.

Atualmente a utilização de biossensores pode ser vista nas mais diversas áreas, da indústria alimentícia à ecologia; contudo sua principal e mais antiga participação é na área da saúde onde nasceu de fato o primeiro equipamento com este fim. Clark e Lyons desenvolveram em 1962 o primeiro biossensor, até hoje uma das mais utilizadas ferramentas para acompanhar os níveis de glicose no sangue principalmente de pacientes portadores de diabetes (MASCAGNI, 2017).

Em 1986, foi desenvolvida uma das técnicas mais recentes e proeminentes de microscopia. Até o momento as técnicas de microscopia existentes possuíam como principal objetivo a visualização de estruturas, fossem elas biológicas ou não. Então o surgimento da microscopia de força atômica (AFM) expandiu de modo considerável a forma como as informações eram obtidas e até qual ponto elas poderiam ser extraídas de uma simples amostra. O AFM é uma técnica de varredura e análise de superfícies por uma sonda dotada de uma pequeno cantilever com uma pequena ponta em sua extremidade. Durante a interação da ponta e do substrato contendo o material a ser estudado, são coletadas importantes informações acerca das interações físico-químicas que estejam ocorrendo na amostra. Além disso, existe a possibilidade, se necessário, de se obter uma imagem topográfica da superfície

amostral, verificar sua rugosidade e até mesmo seu modo elástico (BINNING; QUATE, 1986).

A grande vantagem na utilização do AFM no estudo de componentes biológicos é a capacidade em se fazer as análises sem que seja necessário tratamentos, em especial a coloração do material analisado. Quando falamos em materiais biológicos, estamos nos referindo a estruturas extremamente delicadas e de fácil degradação. Por este motivo, a utilização da técnica de microscopia de força atômica fornece uma alternativa de estudo dessas amostras preservando ao máximo sua integridade estrutural (MORAES, 2019).

A pandemia da SARS-CoV-2 que teve início nos últimos meses de 2019 e nos primeiros meses de 2020, evidenciou a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e abriu um leque amplo de possibilidades quanto à utilização de novos equipamentos para tal. Este é o caso da microscopia de força atômica, que contou com um considerável aumento nos últimos anos, nas áreas de estudos contendo materiais de natureza biológica.

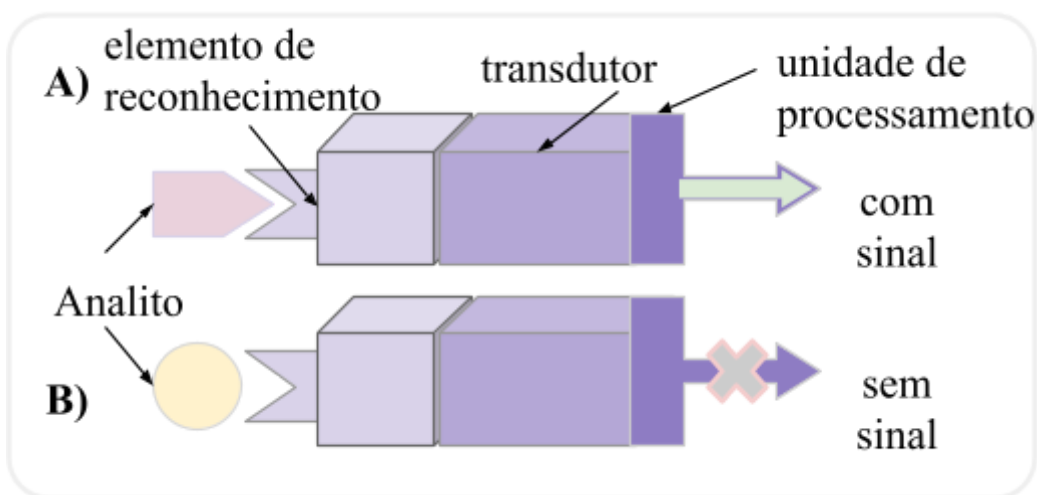
O mercado dos biossensores tornou-se extremamente atraente pela sua capacidade em gerar técnicas de baixo custo, com uma grande capacidade de reprodução e mantendo a confiabilidade dos resultados obtidos em um curto espaço de tempo, quando comparadas a outras técnicas de diagnóstico mais tradicionais (ANDRADE, 2017).

Além disso, o desenvolvimento científico e tecnológico fruto das pesquisas e estudos desenvolvidos nas mais diversas áreas estão requerendo que novas ferramentas sejam incorporadas e possam fornecer auxílio a tais avanços. O conhecimento de como o organismo funciona, a dinâmica das patologias em um hospedeiro e até mesmo a interação entre fármacos e as células, requerem que os dispositivos utilizados sejam capazes de atender a demandas tão complexas e em escalas extremamente pequenas. Demandas essas que podem ser supridas com o auxílio da microscopia de força atômica.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi empregar a técnica de microscopia de força atômica no desenvolvimento de um biossensor utilizando componentes do sistema imune, a fim de verificar a eficiência da técnica e do método empregado para tal, com a finalidade de produzir uma ferramenta de diagnóstico eficiente na análise de interação antígeno-anticorpo, demonstrando que o processo de modificação das estruturas denominado funcionalização é eficiente para o propósito do trabalho.

## 2. BIOSSENSORES

Os biossensores são ferramentas analíticas que possuem a capacidade de ler e interpretar interações físico-químicas. O funcionamento de um biossensor se inicia quando um analito entra em contato com o elemento de reconhecimento; a interação destes dois componentes dará início a uma reação, que será convertida em sinal elétrico por uma unidade conhecida como transdutor. Na sequência, a unidade de processamento receberá o sinal gerado e realizará a interpretação dos dados obtidos tornando possível um resultado(SALOMÃO, 2018). Os biossensores são compostos basicamente por 3 componentes, que podem ser observados na figura a seguir.



**Figura 1:** Demonstração dos componentes básicos que constituem um biossensor. Na figura, A) O analito corresponde a estrutura do elemento de reconhecimento, gerando uma interação e por consequência um sinal que será traduzido e enviado à unidade de processamento. O mesmo não ocorre na figura B) Onde não existe compatibilidade entre o receptor do elemento de reconhecimento e o analito, não sendo possível a geração de um sinal efetivo. Fonte: autora, 2023.

Atualmente no mercado existe uma grande variedade de dispositivos de biossensoriamento. Embora o princípio de funcionamento seja o mesmo do exemplo anterior, a forma como esse dispositivo será construído irá depender exclusivamente de seu objetivo principal, e para tal é necessária uma compreensão da amostra que será analisada (OLIVEIRA, 2014).

Os biossensores para fins biológicos podem ser classificados em duas categorias de sensoriamento; são elas, sistema de medição indireta e sistema de medição direta. Na categoria de medição indireta é necessário a definição de um alvo para que uma interação com o analito possa gerar um sinal; as proteínas são muito utilizadas como alvos na construção de biossensores. Na categoria de medição direta, a amostra é disposta sobre a superfície do transdutor e essa ação por si já gera uma reação físico-química que será traduzida em um sinal. Ambas as condições possuem seu grau de vantagem: enquanto na primeira existe uma maior sensibilidade, a segunda possui um grau maior de estabilidade. A escolha por qualquer uma das duas opções dependerá das características da amostra e da reação que se espera observar (SALOMÃO, 2018).

## **2.1 Dos componentes biológicos utilizados no desenvolvimento do biossensor**

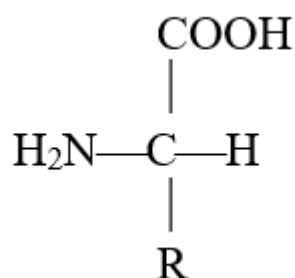
### **2.1.1 Analito e Elemento de reconhecimento**

Os analitos, ou simplesmente amostras biológicas, podem ser de origem animal ou vegetal (quando nos restringimos apenas ao estudo de componentes estritamente biológicos). Estes podem ser: enzimas, péptidos, células, aminoácidos, etc. Normalmente o analito pode ser obtido a partir da purificação do soro de pacientes, da cultura ou coleta de material tecidual ou até mesmo de fluídos como saliva, sangue, suor e urina.

O elemento de reconhecimento, também conhecido como bioreceptor, é um receptor biológico ou químico que terá o primeiro contato com a amostra, este funcionando como uma fechadura, enquanto o analito será a chave; se forem compatíveis desencadearão um sinal em resposta à interação. O elemento de reconhecimento é previamente definido, uma vez que o objetivo do dispositivo é observar uma reação específica. Existe um variado conjunto de componentes biológicos que podem desempenhar o papel de bioreceptores desde anticorpos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias (OLIVEIRA, 2014).

### 3. PROTEÍNAS

As proteínas são macromoléculas constituídas de aminoácidos, onde cada aminoácido possui em sua composição um grupo carboxila (-COOH), um grupo amina (-NH<sub>2</sub>), um hidrogênio (H) e um radical (R), estando todos estes ligados a um átomo de carbono (C) quiral, ou seja, um carbono que realiza quatro diferentes tipos de ligação. Os radicais, presentes em cada aminoácidos constituem parte importante da molécula pois é através deles que a forma e conseqüentemente a função da proteína será definida.



*Estrutura geral de uma proteína* – Fonte: Félix H. Dias Gonzales, 2022.

Para mais, as proteínas desempenham importantes funções dentro do organismo, sendo elas, de estrutura, transporte, sustentação, defesa, enzimática, hormonal e energética.

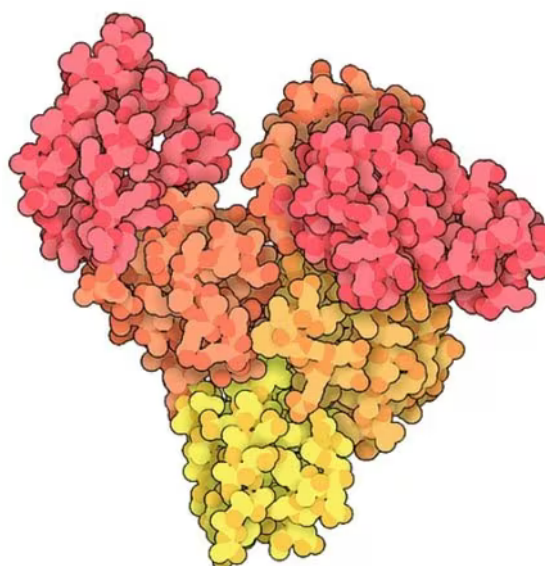
Essas macromoléculas podem receber diferentes classificações a depender de sua forma, que podem ser primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. As estruturas primárias são proteínas lineares formadas por um tipo de fio proteico, diferente da estrutura secundária onde a proteína se dobra em uma espécie de hélice e quando isso ocorre são denominadas  $\alpha$ -hélices, e quando apresentam forma sanfonadas são chamadas  $\beta$ -hélice. Outra classificação é a terciária que compreende o enrolamento de uma única cadeia polipeptídica. Por fim, a estrutura quaternária diz respeito a proteínas de grande porte que se enovelam entre si devido a presença de mais de uma cadeia polipeptídica (ALBERTS, et al. 2017).

#### 3.1 Albumina Sérica

A expressão de proteínas no organismo pode servir como base para o diagnóstico de diferentes patologias, causadas tanto por desregulação do organismo interno ou ainda por doenças em curso, assim como por infecções virais ou parasitárias (SILVA, et al. 2008).

Grande parte da síntese proteica do corpo ocorre no fígado, e cerca de 12% a 20% dessa capacidade de síntese é dedicada à produção da albumina. A albumina é um polipeptídeo simples constituído por uma única cadeia contendo 584 aminoácidos. Trata-se de uma proteína plasmática muito abundante e importante na manutenção das propriedades osmóticas/oncóticas do organismo, isso porque através dela é que se mantém a água na circulação, impedindo que ela infiltre os tecidos. Outras funções deste polipeptídeo incluem transporte de substância através da corrente sanguínea que vão desde moléculas lipossolúveis, hormônios, a fármacos e drogas(SANTOS, et al, 2004).

**Imagem 1** – Esquema de como é constituída a albumina sérica bovina.



**Fonte:** Sigmaaldrich.

Problemas na síntese de Albumina são responsáveis por um número considerado de patologias. A alta taxa de excreção de albumina na urina pode estar relacionada a síndromes nefróticas. Por outro lado, a baixa taxa de produção da proteína pelo fígado pode representar a presença de cirrose hepática. Transtornos intestinais ocasionados pela presença de diarreias e baixa absorção de aminoácidos na digestão causam diminuição nas taxas da proteína. A descrição das propriedades fisiológicas desta proteína foi feita pela primeira vez em 1837, a partir deste momento diversos estudos foram feitos para melhor compreendê-la (SANTOS, et al, 2004).



É possível encontrar a albumina em abundância no corpo humano, entretanto ela também se encontra presente em ovos e no leite. E é através do soro do leite bovino que se obtém a albumina sérica bovina (BSA), muito utilizado atualmente em pesquisas científicas por possuir grande aplicação na biotecnologia (ALVES, 2016).

### **3.2 Anticorpos**

Os anticorpos (Acs) constituem uma classe especializada de proteínas responsáveis pela resposta imunológica do organismo. Essa resposta ocorre na presença de um agente antigênico, podendo este ser tanto uma substância química (toxinas), micróbios ou qualquer corpo estranho que consiga penetrar as defesas físicas do organismo(ALBERTS, et al. 2017).

Algumas vezes esse mecanismo pode ser gerado por uma resposta inadequada do sistema de defesa contra o próprio organismo. Denominamos as patologias ocasionadas em decorrência dessa falha de autoimunes(ALBERTS, et al. 2017).

Os Acs são produzidos através da secreção da imunoglobulina B, presente na membrana do linfócito B. Estruturalmente os anticorpos possuem um formato de Y, compostos por um total de quatro subunidades, sendo duas cadeias longas e duas cadeias curtas. Cada anticorpo é único devido às regiões dos seus sítios de ligações, que são as áreas de contato da molécula com o antígeno específico(ALBERTS, et al. 2017).

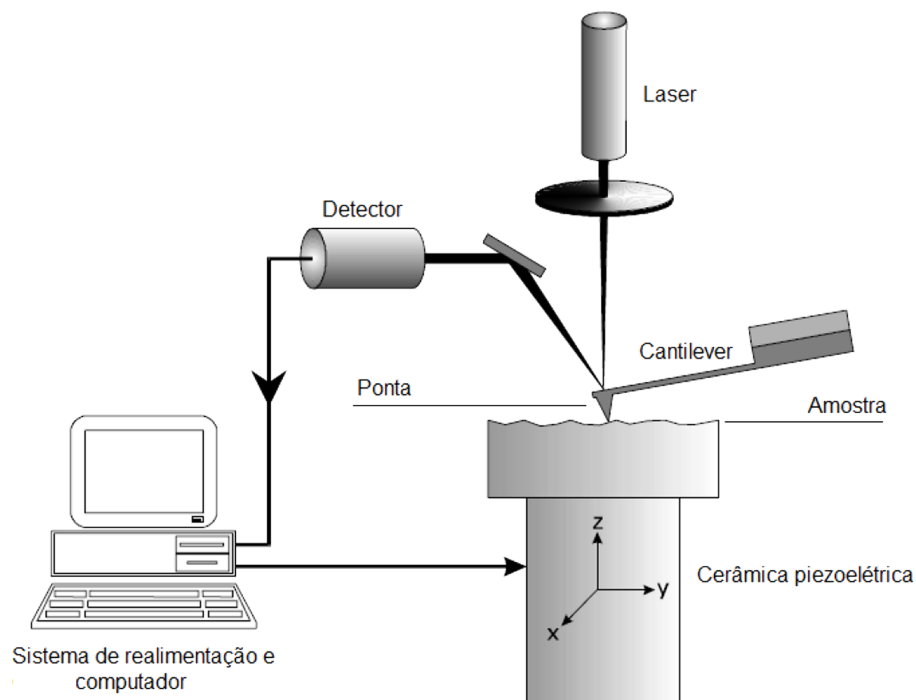
O estudo do sistema imune nos confere a habilidade não apenas de entender de que forma o organismo reage a uma ameaça e qual o grau desta defesa, mas possibilita criar fármacos e meios que possam ser eficientes no combate de diferentes doenças. Ademais, o conhecimento da presença de anticorpos possibilita o diagnóstico de patologias em curso ou que se fizeram presentes(ALBERTS, et al. 2017).

A escolha do BSA e Anti-BSA para este trabalho se deu pela ampla capacidade de exploração desta proteína e por até o presente momento não foram achados na literatura trabalhos que visem especificamente o desenvolvimento de um biossensor a base de AFM para medir interações de albumina sérica através de relação antígeno anticorpo (ALBERTS, et al. 2017).

#### 4. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

O AFM, equipamento desenvolvido por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer no início dos anos 80 e vencedor do prêmio Nobel em 1986, é um instrumento capaz de fornecer um grande número de informações sobre a amostra: desde imagens topográficas, informações mecânicas de superfícies e diversos outros dados sobre a amostra em análise, até a possibilidade de realizar o reconhecimento específico de interações moleculares (Binnig 1982; Binnig 1986). O nanobiossensor proposto em nosso estudo é baseado no AFM (Steffens 2012).

O AFM é composto basicamente de uma sonda (ponteira), cerâmicas piezelétricas (scanners) para posicionar a amostra e realizar varreduras, circuitos elétricos de realimentação para controlar a posição vertical da sonda e um computador para mover os scanners de varredura, armazenar dados e convertê-los em imagens com software específico. No AFM, a amostra é varrida por uma ponta montada na extremidade de um cantilever. Os átomos da ponta interagem com aqueles da superfície, produzindo deflexão na mola devido às alterações causadas pelas forças de atração ou repulsão.

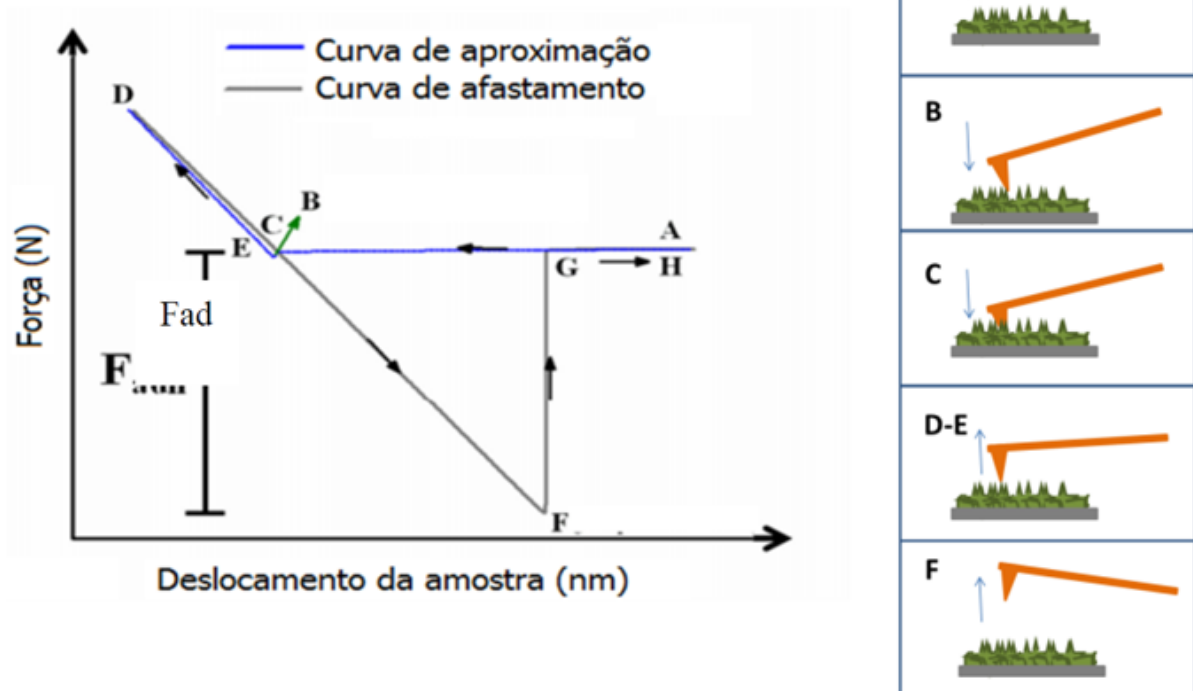


**Figura 2** – Diagrama esquemático do sistema de Microscopia de Força Atômica. Fonte: Stone 2012).

Os componentes essenciais de um AFM, e da maioria dos microscópios de varredura por sonda, são uma cerâmica piezoelétrica (scanner), um cantilever com a ponta, detector, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever, sistema de realimentação (feedback) e um computador, que armazena e processa as diferentes deflexões da sonda, transformando-as em imagens topográficas da superfície (2D ou 3D), como mostra a figura 2. (Stone 2012)

O AFM também é aplicável ao estudo de interações moleculares com resolução na ordem de  $10^{-12}$  N sugerindo a possibilidade de medida de interações individuais usando a técnica de curva de força ou espectroscopia de força atômica. (Johnson 2008) Quando se determina a curva de força em função da distância em um local determinado da superfície da amostra, denomina-se espectroscopia de força local. A curva de força depende de vários parâmetros, como o material que constitui a ponta da agulha de prova e sua funcionalização, o tipo de superfície em estudo, as moléculas adsorvidas na superfície do material e o ambiente que envolve a superfície e a ponta. Mizes et al. (Mizes 1991) foram os primeiros a medir diretamente a variação espacial da adesão. Desde então, duas linhas principais têm caracterizado a pesquisa de curvas de força: (1) o estudo de diferentes interações em vários meios e (2) a “cartografia” de tais interações, traçado em curvas de força, a fim de distinguir materiais com diferentes propriedades físico-químicas (uma espécie de “espectroscopia” de superfície).

A Figura 3 mostra uma curva de força típica, identificando suas regiões: A-B: a ponta e a amostra ainda não estão em contato, mas a ponta está se aproximando da superfície; B: a ponta do cantilever entra no contato com a amostra; C-D: a ponta é pressionada contra a superfície da amostra até a região D e o cantilever se curva para cima; C-D: o cantilever sofre uma deflexão devido às forças de atração (adesão); D-E: a força da sonda contra a amostra diminui; E-F: no ponto F tem-se a ruptura de contato entre a ponta o substrato. No ponto G, o cantilever volta à sua posição inicial. A distância vertical F-G corresponde ao valor da força de adesão entre a ponta e a amostra (pontual) e; G-H: a ponta e a amostra já não estão mais em contato.(LEITE 2005; SANTOLIN 2009)



*Figura 3 – Posição da ponta de AFM em relação à amostra durante a obtenção de uma curva de força.* Fonte: LEITE 2005; SANTOLIN 2009.

A detecção de forças interfaciais com resolução nanométrica é importante para entender, em nível molecular, fenômenos como fricção, lubrificação, adesão e fratura em interfaces, forças estruturais, estabilidade coloidal e sensoriamento. A resolução em força no AFM pode ser menor do que a magnitude da ligação química mais fraca (SMITH 1995), o que torna possível investigar interações moleculares individuais. Entretanto, grupos químicos específicos adsorvidos na ponta do AFM e interagindo com outras superfícies são ainda pouco definidos ou estudados e devem ser explorados.

O conceito de modificação química de sondas (SMITH 2003) torna o AFM sensível a interações moleculares de interesse. (MIZES, 1991) Empregam-se, nesse caso, pontas funcionalizadas no estudo de forças específicas por meio de curva de força. Tais técnicas já são usadas para: (a) detectar forças entre diferentes grupos moleculares, (b) medir energia de superfície em escala nanométrica (LEITE, 2005).

A funcionalização das pontas proporciona seletividade e sensibilidade para realizar as interações moleculares de interesse, bem como a possibilidade de mapear quimicamente a

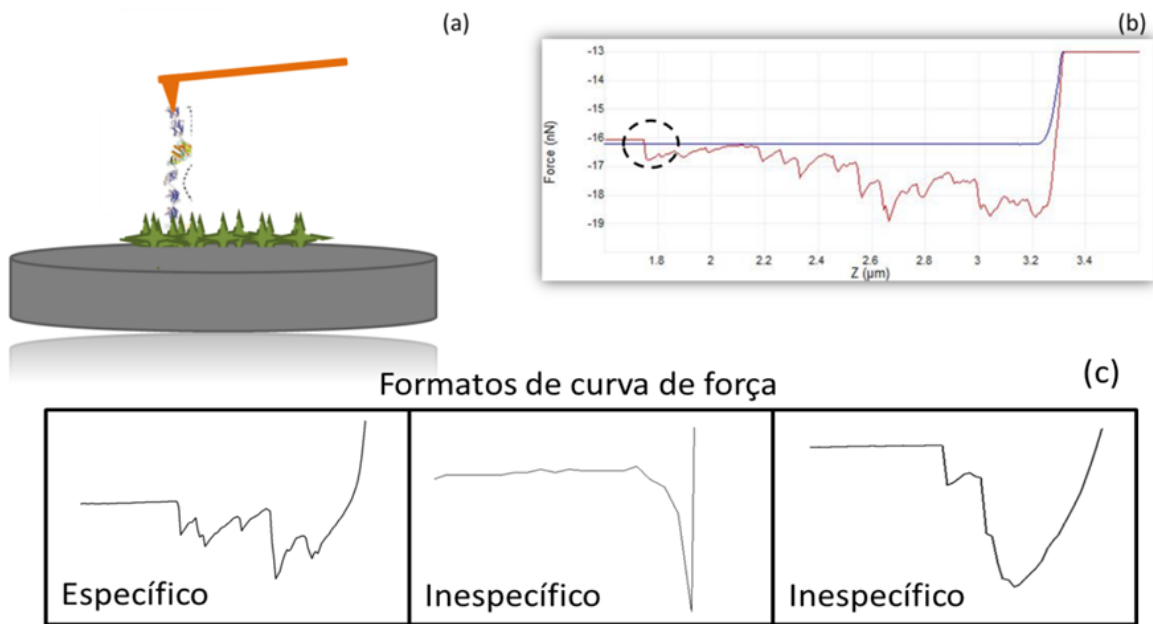
superfície na nanoescala (BLANCHETTE, 2008; EBNER, 2008) Existem diversas técnicas de funcionalização e imobilização de biomoléculas na ponta de AFM e no substrato (mica); tal processo deve proporcionar a interação correta entre a molécula na ponta e a amostra (SOTO 2005, JANISSEN, 2009; ETCHEGARAY, 2010), deixando os sítios ativos da amostra propícios para a interação com a molécula disponível na ponta de AFM, para ocorrer a interação.

Diversas estratégias estão sendo criadas para imobilizar as moléculas na ponta do AFM e em outros substratos de modo a favorecer uma interação correta entre eles (arquitetura/design de moléculas), para reduzir eventos múltiplos e diferenciar os eventos de reconhecimento específicos e inespecíficos (Figura 4) dentro do sistema de estudo. No contexto dos nanosensores, sabe-se que os dispositivos utilizados com AFM (cantilevers e pontas) são baseados na tecnologia do silício ( $\text{SiO}_2$ , Si,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) e que estes não têm, por si só, atributos sensitivos. Para habilitar esses materiais a serem sensores seletivos e sensíveis, comumente suas superfícies são funcionalizadas com organossilanos que possuem grupos funcionais terminais ativos para fornecer uma interface adequada entre o transdutor de silício e as moléculas a serem arquitetadas em sua superfície. Para aumentar a capacidade de reconhecimento específico, uma das etapas adicionais da funcionalização é a adição de um elemento que seja flexível, que possa atuar como um espaçador (linker), como por exemplo, o glutaraldeído, alcanotióis e o polietileno glicol (PEG), sendo este último o mais utilizado. As funções desses espaçadores em um sistema de sensoriamento na nanoescala são: fornecer mobilidade e liberdade de orientação estrutural para as moléculas, auxiliar a distinguir os reconhecimentos específicos dos não específicos, prevenir deformidades estruturais e desnaturação de moléculas biológicas e colaborar para a orientação uniforme das moléculas na superfície, além de atuarem como uma ponte entre as superfícies inorgânicas e as biomoléculas. As imobilizações desses grupamentos químicos em superfícies, como as das pontas de AFM, são semelhantes a um jogo de peças de montar, onde o encaixe dos blocos (moléculas) pode ocorrer via reticulação ou adsorção física, onde o ambiente e a superfícies são controlados para imobilizar moléculas através das forças naturais presentes; ou então podem ocorrer através da formação de ligações covalentes, que é a metodologia mais utilizada, onde a modificação da superfície é alcançada através de reações químicas.

Outros fatores fundamentais para a construção do sensor em ponta de AFM são a geometria, raio, e a obtenção da constante de mola ( $k$ ) da ponta. Além disso, é possível

realizar as interações moleculares em diferentes condições ambientais: em ar ou em uma célula fluida, dessa forma obtendo as medidas em micro ambientes controlados, uma grande vantagem para a realização de medidas biológicas (SOTO, 2005; FRIDKIS-HARELI, 2001).

Sendo assim, ao se estudar interações entre o complexo analito-anticorpo são obtidas curvas de forças em diversas regiões da amostra, onde tem-se a força de adesão. Dessa forma, quando o anticorpo é utilizado para detecção de um analito específico em amostra e um padrão de forças for encontrado, isto quer dizer que o analito em questão foi reconhecido (Soto 2005; Deda 2013; Silva 2014).



**Figura 4** - (a) ponta de AFM se separando da amostra, (b) obtenção de curva de força, mostrando uma curva típica para interação analito-anticorpo, destacando a força de adesão e (c) comparação entre formatos específico e inespecíficos de curva de força. Fonte: Soto 2005; Deda 2013; Silva 2014

## 5. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no laboratório do Grupo de Óptica e Nanoscopia - GON (IF-UFAL) e no LAIF (ICBS-UFAL). O processo se iniciou com a funcionalização das superfícies escolhidas para o estudo, e posteriormente foram realizadas as curvas de forças para verificar a presença de interações Ag-Ac.

Foram realizados um total de 3 processos de funcionalização de superfícies em um período de 24 meses. Cada um dos processos apresentou a necessidade de adaptações à medida com que as leituras foram realizadas.

A primeira parte do processo consistiu em verificar a eficiência do sensor e das sondas mediante as condições as quais seriam submetidas, uma vez que o objetivo do trabalho era verificar forças em escalas muito pequenas e interações que resultam em curvas de forças com formatos diferentes dos observados quando comparados à leituras realizadas em outros materiais.

### 5.1 Sonda e substrato

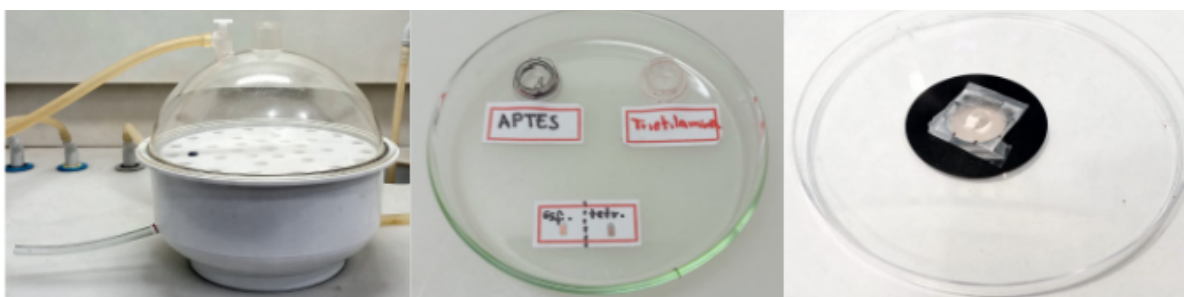
A escolha das sondas teve como base o trabalho de (ROTANDARO, 2022) sobre as influências dos tipos de sondas e substratos nas curvas de forças e adesão por AFM. No referido trabalho fica descrito a eficiência das pontas de formato tetraédrico em leituras que exijam a verificação de interações específicas e onde essas forças são extremamente pequenas em uma escala de pN. As pontas escolhidas foram as de conformação tetraédrica e composta por Silício, conforme descrito na literatura. Utilizamos sondas HYDRA com as seguintes especificações: 6R-100NG-10, material: Silício,  $f = 66$  kHz e constante elástica  $k = 0.284$  N/m.

O substrato adotado foi a Mica, que possui grande usabilidade em estudo com materiais biológicos, uma vez que sua composição, estrutura mais plana e caráter hidrofílico propiciam um ambiente de maior afinidade com moléculas biológicas, em especial moléculas proteicas (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

## 5.2 Silanização

Os substratos escolhidos foram submetidos a esterilização por um equipamento de UV, por cerca de 25 minutos. Nas lamínulas de mica, um processo anterior denominado esfoliação foi realizado a fim de garantir uma superfície mais plana; neste uma pequena fita de micropore é utilizada para retirar as camadas mais superficiais da mica.

Depois de serem retiradas da câmara de UV, as sondas e as micas foram levadas a uma câmara de reação que foi previamente adaptada a fim de atender as necessidades do experimento que exigia a construção das monocamadas automontadas, processo necessário para fixar as moléculas proteicas.



Fonte: Juliana Silva

**Imagem 3:** Câmara de silanização, contendo uma entrada para infusão do gás nitrogênio e uma saída que posteriormente é vedada. Ao lado é possível verificar uma lamínula de mica e duas sondas sobre etiquetas identificadas, e os compostos APTES e Trietilamina em tampas de eppendorf.

Fonte: autora,2023.

Foram colocadas juntamente na câmara de reação duas tampas de *eppendorf* contendo as soluções de 3-aminopropiltrióxosilano (APTES). Este material é descrito em trabalhos envolvendo a construção de monocamadas que receberam grupos amino como um agente acoplador, isso porque além de se ligar efetivamente a superfície da mica, o APTES conserva as atividades biológicas do material. Também foi utilizada a Trietilamina, que possui como principal função equilibrar o pH do ambiente e das superfícies modificadas, garantindo que mesmo após o processo ele permaneça neutro ou levemente básico. A câmara recebeu um fluxo de gás nitrogênio ( $N_2$ ) por cerca de 15 minutos até que todo o gás Oxigênio ( $O_2$ ) fosse retirado e, posteriormente a isso, o ambiente foi vedado, permanecendo assim por 45 minutos, tempo em que ocorre o processo de silanização através da vaporização das substâncias ali contidas.



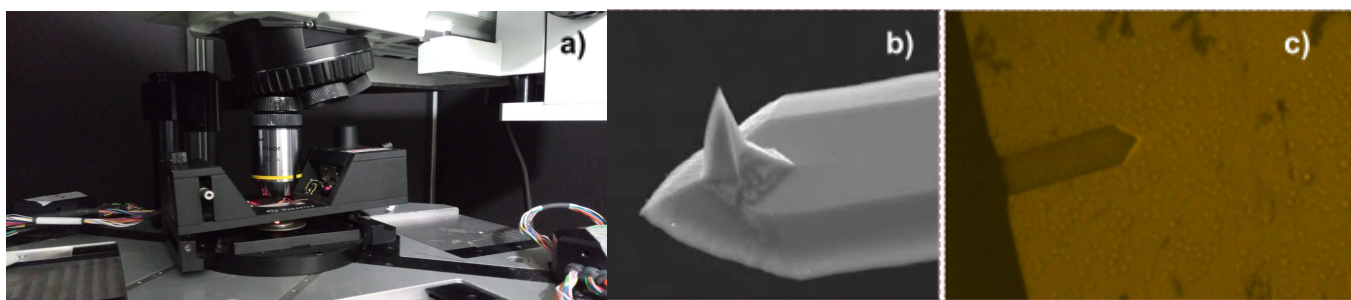
### 5.3 Fixação antígeno e anticorpo

**Mica** – Para fixação do antígeno no substrato de Mica, foi realizado a pipetagem de 30 $\mu$ L da solução de anticorpo, Anti-BSA - *antibody produced in rabbit* (Sigma-Aldrich®Merck KGaA), que foi encaminhada para refrigeração por um período de 2 horas. Na sequência, as micas passaram por um processo de lavagem em 3 beckers contendo água Milli-Q® (Sigma-Aldrich), estando prontas para a realização das medidas.

**Sonda** – Terminado o processo de silanização, as sondas foram colocadas dentro de tampas de *ependorf* contendo solução de Polietilenoglicol (PEG) de acordo com o trabalho de (MORAES,2019) o PEG funciona como um tipo de degrau onde o antígeno irá se fixar e ter um maior alcance ao substrato durante a varredura da sonda; em seguida elas foram levadas para refrigeração por cerca de 2 horas. Terminado o tempo, as pontas foram lavadas em 3 beckers contendo água Milli-Q®. Na sequência foram utilizadas novas tampas de ependorf, agora contendo a solução da proteína BSA, *Bovine Serum Albumin* (Sigma-Aldrich®Merck KGaA). Após a imersão as pontas retornaram para refrigeração por mais 2 horas; decorrido este tempo, já se encontravam prontas para a realização das medidas.

### 5.4 Curvas de Força

O sistema utilizado para a realização das leituras de força foi o MultiView 1000 (Nanonics Ltd., Israel). Os dados obtidos foram interpretados pelo Software NWS11 (Nanonics Ltd., Israel) que possibilita o acompanhar a varredura da amostra enquanto o processo ainda está ocorrendo, além de fornecer importantes parâmetros sobre as medidas. O tratamento dos dados foi realizado através do Software OriginLab.



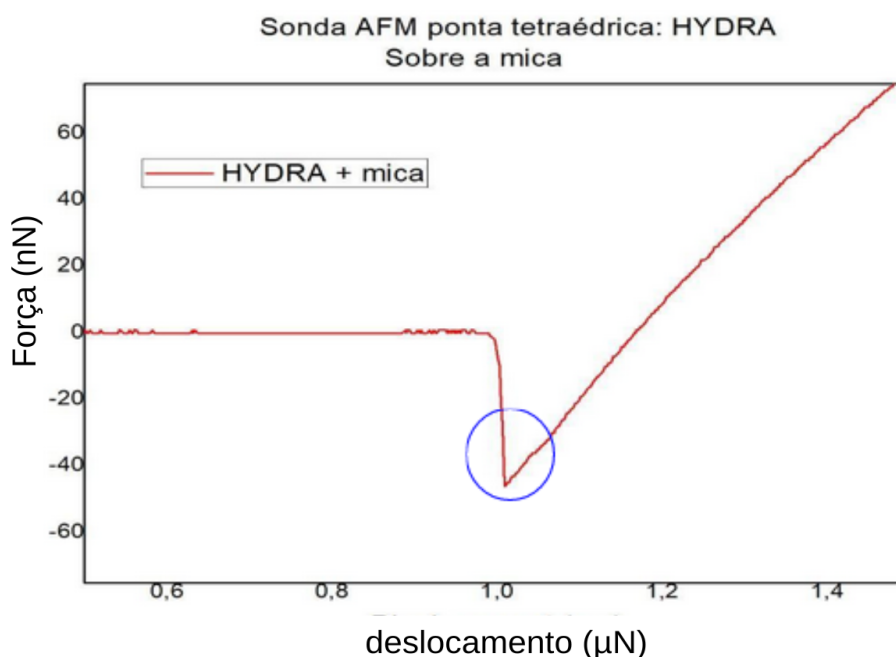
**Imagem 4:** Na sequência de imagens acima apresentada é possível ver **a)** O Sensor AFM, **b)** Sonda utilizada no sensor(Fonte: IF USP) e **c)** A sonda durante uma varredura. Fonte: autora, 2023.

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizada a funcionalização das superfícies do biossensor, o objetivo passou a ser demonstrar através da técnica de microscopia de força atômica (AFM), que o processo de fato modificou as estruturas, possibilitando a leitura de interações antígeno anticorpo, e portanto, viabilizou a construção do biossensor.

Esse fato pode ser verificado através da interpretação das curvas de forças obtidas antes e depois das estruturas silanizadas. É importante compreender que a “digital” de uma curva de força é o seu formato, como mencionado no capítulo 4, subitem 4.1.

As curvas de interações não específicas, apresentam um formato bem definido contendo apenas uma indentação na curva de retração. Pode-se verificar essa característica na curva de força apresentada a seguir, que foi realizada antes do procedimento de modificação das estruturas.

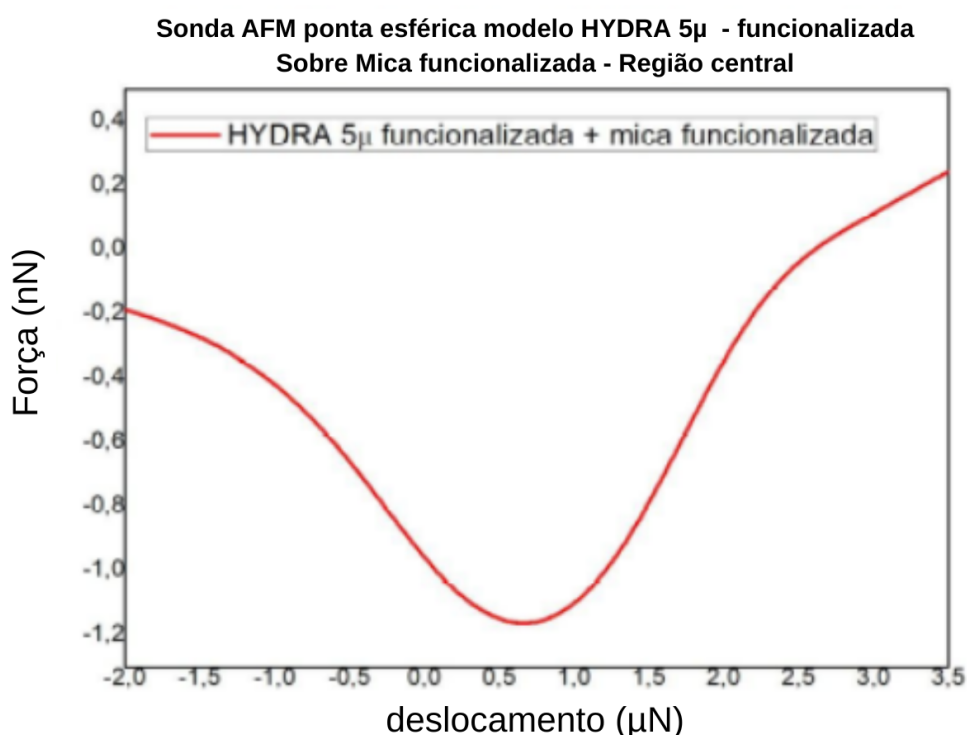


**Imagem 5:** Curva de força realizada com o sistema MV1000, utilizando uma ponta de formato tetraédrica sobre uma superfície de mica, ambos não funcionalizados. Esta curva corresponde a médias do total de curvas de forças realizadas. Fonte: autora,2023.

Na imagem podemos verificar a curva de força gerada entre a interação de uma ponta e de um substrato qualquer; neste caso foi utilizada uma pequena lâmina de Mica clivada e as

medidas foram realizadas apenas para fins de calibração do sistema. Note que a força necessária para desprender a ponta da superfície da mica está entre -40 a -50 nN, isso porque as únicas forças ali envolvidas são as ligações fracas de ponte de hidrogênio e afinidade entre ambos os materiais, que não gera uma força grande o suficiente para ser tida como específica.

Após a primeira funcionalização, as medidas das curvas de força foram realizadas em ar; o objetivo principal era compreender como os substratos funcionalizados se comportavam e que forma teria a curva de força fora do ambiente aquoso. O formato da curva de força obtida pode ser verificado na imagem a seguir.

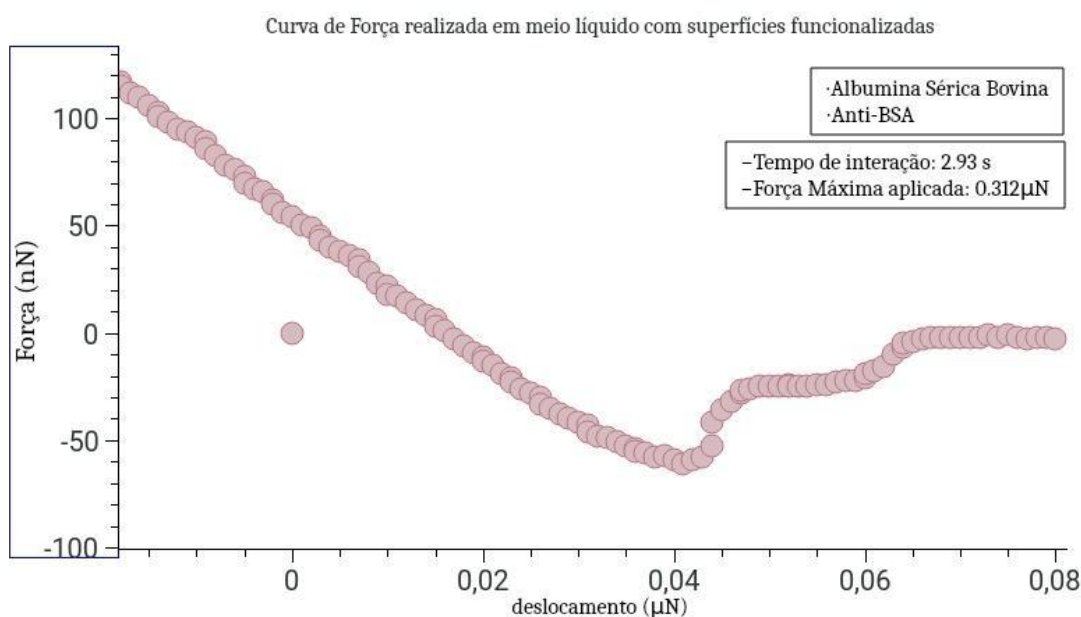


**Imagem 6:** Curva de força realizada com o sistema MV1000, utilizando substratos funcionalizados, contudo as medidas foram realizadas em ar. Fonte: autora, 2023

As curvas de força obtidas durante essa primeira parte do trabalho pós funcionalização serviram para demonstrar que as estruturas utilizadas, tanto a ponta de Si quanto a lamínula de mica, haviam sido modificadas pelo processo de funcionalização.

Muito embora não seja possível verificar os *steps* relacionados ao desenovelar de proteínas, podemos verificar que a ponta necessitou de uma quantidade maior de força para se desgrudar do ponto de adesão. As interações medidas apresentaram valores entre, -1.1nN a -1.2 nN.

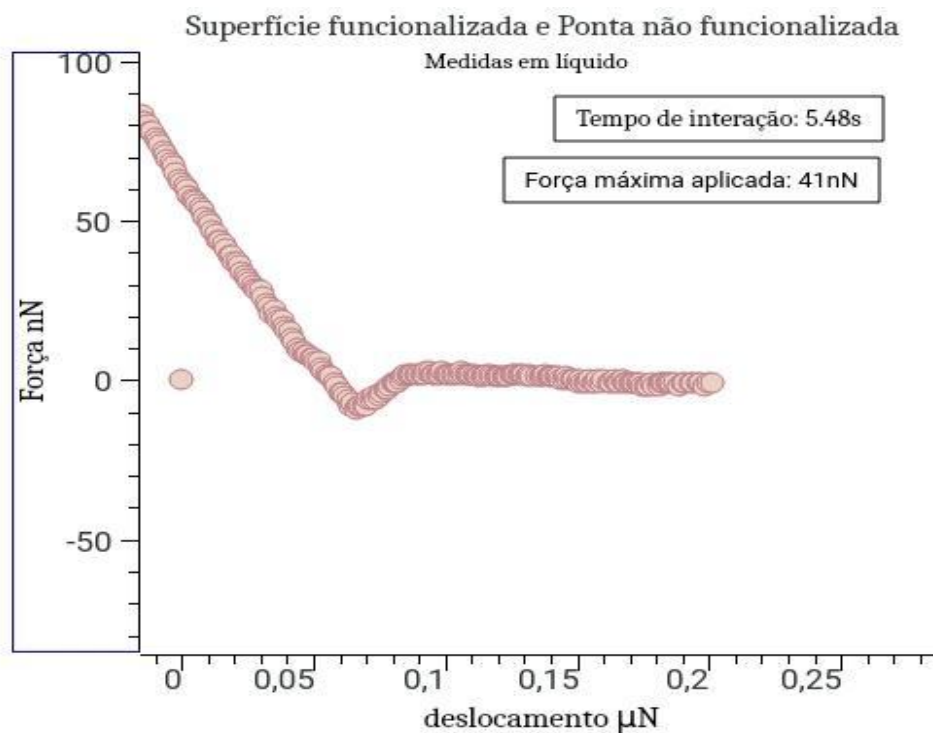
O mesmo não foi observado durante as medidas realizadas em meio aquoso. A imagem a seguir, mostra a curva de força realizada com a sonda e a mica funcionalizadas e imersas em água MilliQ. A temperatura da água também demonstrou ser um fator importante para uma melhor efetividade na obtenção dos dados pelo sensor, uma vez que estamos simulando a interação de componentes que dentro do organismo estão aclimatados a uma temperatura mais elevada que a do ambiente externo.



**Imagem 7:** Curva de força realizada com o sistema MV1000, utilizando substratos funcionalizados e meio líquido. Fonte: autora, 2023.

É possível verificar através da curva de força apresentada que duas características que correspondem a efetiva interação específica entre o antígeno e o anticorpo são supridas, que seria o formato da curva apresentando *steps*, ou ainda como menciona (ETCHEGARAY; BUENO; TESCHKE, 2010), esse perfil de retração da curva também pode ser denominado de dente de serra, e ocorre devido a presença de dois fenômenos chamados de desnaturação e renaturação da proteína, durante o processo de alongamento das moléculas em decorrência da interação com a ponta, que se aproxima e se afasta. Por fim, a intensidade da curva em questão é determinada pelas forças exercidas durante estes processos.

Em uma terceira parte do trabalho, foram realizadas medidas com apenas uma das estruturas funcionalizadas, com o objetivo de verificar a interferência no formato da curva a ser obtida. A imagem a seguir demonstra as características da curva de força resultante da interação entre a superfície de mica funcionalizada e a ponta não funcionalizada.



**Imagem 8:** Curva de força realizada em líquido, onde o substrato de mica foi funcionalizado e a sonda não passou pelo processo de funcionalização. Fonte: autora, 2023.

Na imagem, é possível observar o ponto de adesão da curva de força e seu desprendimento do substrato, sem a ocorrência do efeito de múltiplas indentações. De acordo com (MOREAU, 2011), a ausência do desenovelamento da proteína é impedida de ocorrer uma vez que seus sítios de ligação antígeno-anticorpo não foram ativados.

## 8. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo central desenvolver um biossensor tendo como base a microscopia de força atômica, utilizando-se de componentes imunológicos para a construção de tal bio equipamento, e da manipulação da microscopia de força química na modificação efetiva das estruturas utilizadas.

As curvas de forças realizadas antes do processo de funcionalização demonstraram em conjunto com a literatura atual a consistência no padrão de curvas realizadas em materiais não funcionalizados, bem como através da utilização da técnica de AFM, foi possível verificar a relação antígeno-anticorpo de estruturas já funcionalizadas.

As curvas de força obtidas das interações específicas além de nos apresentar a possibilidade de detecção de tais interações com o equipamento MV1000, possibilitou a visualização em uma escala ínfimamente pequena do desenrolar de uma proteína, a qual possui como uma de suas principais características o enovelamento.

O sucesso no desenvolvimento da técnica abre espaço para a possibilidade de futuros trabalhos utilizando proteínas diversas, sobretudo aquelas associadas ao diagnóstico de imunopatologias.

Ademais, seria válido destacar o crescente desenvolvimento na área de microscopia de força química, ou seja, das técnicas de modificações de estruturas para fixação de amostras biológicas com o mínimo de modificações em suas estruturas originais, a fim de que sejam estudadas na íntegra.

Estes avanços tornam ainda mais vasta as possibilidades de trabalhos envolvendo o progresso dos biossensores tendo a microscopia de força atômica como principal ferramenta.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. - Porto Alegre : Artmed 2017.
- ANDRADE, R.O. Biossensores na medicina. *Rev Pesquisa Fapesp*. São Paulo. Ed. 258. p.68-71, Agosto 2017. Disponível em: <[https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2017/08/068-071\\_biossensores\\_258\\_novo.pdf](https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2017/08/068-071_biossensores_258_novo.pdf)>. Acesso em: 03 fev 2023.
- ALVES, M.R.R. Separação Da Proteína Albumina De Soro Bovino Utilizando Hidroxiapatita E Carvão Ativo De Babaçu (*Orbignya martiana*). 2016. Tese (doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia Rede BIONORTE) - Universidade Federal do Tocantins. Tocantins, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11612/209>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2023.
- BINNIG G, ROHRER H, GERBER C, WEIBEL E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 1982;(49):57.
- BINNIG G, QUATE CF, GERBER C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.* 1986;56(9):930-933
- BLANCHETTE CD, LOUI A, RATTO TV. Tip Functionalization: Applications to Chemical Force Spectroscopy. In: Noy A. *Handbook of Molecular Force Spectroscopy*. Boston: Springer; 2008. 185–203.
- DEDA DK, PEREIRA BBS, BUENO CC, SILVA AN DA, RIBEIRO GA, AMARANTE AM, et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. *Mater Res.* 2013;(16):683–7.
- EBNER A, WILDLING L, ZHU R, RANKL C, HASELGRÜBLER T, HINTERDORFER P, et al. Functionalization of probe tips and supports for single-molecule recognition force microscopy. *Top Curr Chem.* 2008;(285):29–76.
- ETCHEGARAY A, BUENO C DE C, TESCHKE O. Identification of microcistin LR at the molecular level using atomic force microscopy. *Quím Nova.* 2010; (33):1843–8.
- FERREIRA, A.A.P., YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 137-142, 2006. disponível em: 10.1590/S0100-40422006000100024. Acesso em: março de 2023.

FRIDKIS-HARELI M, STERN JNH, FUGGER L, STROMINGER JL. Synthetic peptides that inhibit binding of the myelin basic protein 85-99 epitope to multiple sclerosis-associated HLA-DR2 molecules and MBP-specific T-cell responses. 2001 Aug;62(8):753-63.

JANISSEN R, OBERBARNSCHEIDT L, OESTERHELT F. Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009;(71):200–7.

JOHNSON, M. et al. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Res, v. 36, n. suppl 2, p. W5-W9, July 2008.

LEITE, F. L.; HERRMANN, P. S. P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena: a review. Journal of Adhesion Science and Technology, v. 19, n. 3–5, p. 365–405, 2005.

MASCAGNI, D. B. Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido. 2017. Tese (doutorado em Ciências e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/151168>>. Acesso em: 03 fev. 2023

MIZES, H. A. et al. Submicron probe of polymer adhesion with atomic force microscopy: Dependence on topography and material inhomogeneities. Applied Physics Letters, v. 59, n. 22, p. 2901–2903, 1991.

MORAES, A. S. A highly specific and sensitive nanoimmunosensor for the diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. ci Rep. 2019 Nov 6;9(1):16136. Disponível em: 10.1038/s41598-019-52506-w. Acesso em: 10/12/2021

MOREAU, A.L.D. Microscopia de Força ATômica em Materiais biológicos: Biossensores e Nanoferramentas. 2011. Tese (Doutorado). Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2011. Disponível em: 10.47749/T/UNICAMP.2011.784742. Acesso em: 08 de março de 2023.

OLIVEIRA, A.E.F. Biossensores e a Indústria Alimentar. 2014. Revisão de literatura. Instituto de Química, Universidade Federal de São João del-Rei. Disponível em: <[https://ufsj.edu.br/portal-repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Ana\\_Elisa\\_F\\_Oliveira-20142.pdf](https://ufsj.edu.br/portal-repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Ana_Elisa_F_Oliveira-20142.pdf)>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2023.



OLIVEIRA, R.M.B. Desenvolvimento de superfícies nanoestruturadas capacitivas e eletroquimicamente ativas para aplicações em diagnóstico clínico. 2018. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018. Disponível em: <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/155900/oliveira\\_rmb\\_me\\_araiq\\_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/155900/oliveira_rmb_me_araiq_int.pdf?sequence=3&isAllowed=y)>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2023.

OLIVEIRA, J.N.S.R. Influências do tipo de sonda, substrato e meio circundante nas curvas de força de adesão por AFM. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/jspui/handle/123456789/11136>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2023.

SALOMÃO, E.A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. *Research, Society and Development*, v. 7, n. 3, p. 01-11, 2018. Disponível em: 10.17648/rsd-v7i3.282. Acesso em: 10 de janeiro de 2023.

SANTOS, N.S.J., et al. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Revista de Nutrição, UNIFESP*. v.17(3) p. 339-349, jul/set, 2004. Disponível em: 10.1590/S1415-52732004000300007. Acesso em: 20 de fevereiro de 2023.

SANTOLIN, M.A. Nanolitografia do silício utilizando o microscópio de força atômica. 2009. 97 p. Dissertação (Magister Scientiae) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SILVA ACN, DEDA DK, BUENO CC, MORAES AS, DA ROZ AL, YAMAJI FM, et al. Nanobiosensors Exploiting Specific Interactions Between an Enzyme and Herbicides in Atomic Force Spectroscopy. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;(14):6678–84.

SILVA, et al. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais* 2008; 18(2) : p.116-122. Disponível em: <https://rmmg.org/artigo/detalhes/520>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2023.

SMITH, D. P. E. Limits of force microscopy. *Review of Scientific Instruments*, v. 66,p. 3191–3195, 1995. doi:10.1063/1.1145550.

SMITH, D.A. et al. Chemical force microscopy: applications in surface characterisation of natural hydroxyapatite. *Analytica Chimica Acta*, v. 479, p. 39–57, 2003. doi:10.1016/S0003-2670(02)01374-0.

SOTO GARCIA P, MOREAU ALD, MAGALHÃES IERICH JC, ARAUJO VIG AC, HIGA AM, OLIVEIRA GS, et al. A Nanobiosensor Based on 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Enzyme for Mesotrione Detection. *IEEE Sens J*. 2015;(15):2106–13.

STEFFENS C, LEITE FL, BUENO CC, MANZOLI A, HERRMANN PSDP. Atomic force microscopy as a tool applied to nano/biosensors. *Sensors*. 2012;12(6):8278-300.

STONE, J. et al. Using VMD. Urbana e Champaign. 2012. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/vmd/vmd-tutorial.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2023