

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA DE VÍRUS E PROTEÍNAS

Trabalho submetido por
Rui Adalberto Sousa Tomás
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

fevereiro de 2023

Resumo

A Microscopia de Força Atômica (MFA) é uma técnica de visualização e mapeamento tridimensional de estruturas ao nível atômico, com uma enorme capacidade de resolução e precisão, que revolucionou a microscopia. Criado em 1986, o microscópio de força atômica demonstrou grande relevância e proveito na área da nanotecnologia e em muitos outros ramos da ciência. Usufruindo da capacidade de analisar organismos e partículas biológicas *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, torna-se numa ferramenta indispensável na captura de interações não visíveis ao olho humano entre estruturas biológicas, como os vírus e as proteínas. Os bacteriófagos (ou fagos) Pfl e M13, são vírus que infetam bactérias e que revelam enorme interesse na área da nanotecnologia, devido às suas características ímpares. As fibras de actina, tendo em conta a sua estrutura singular e funções que desempenha, é também alvo de imensos estudos na área da biologia celular. O microscópio de força atômica é essencial para realizar estes estudos e sem ele não seria possível apreciar e estudar todas as valências das estruturas referidas. É, sem dúvida, um instrumento chave para a monitorização de todos os processos que envolvem estas estruturas microscópicas.

Palavras-chave: Microscopia de força atômica, vírus, Pfl, M13, proteínas, fibras de actina.

Abstract

Atomic Force Microscopy (AFM) is a three-dimensional visualization and mapping technique of structures at the atomic level, with an enormous ability for resolution and precision, which has revolutionized microscopy. Created in 1986, the atomic force microscope has demonstrated great relevance and benefits in the field of nanotechnology and in many other branches of science. Resorting the ability to analyze organisms and biological particles in vitro, in situ and in vivo, it becomes an imperative tool in capturing interactions not visible to the human eye between biological structures such as viruses and proteins. The bacteriophages (or phages) Pfl and M13 are viruses that infect bacteria and that reveal enormous interest in the field of nanotechnology, due to its unique characteristics. Actin fibers, given their structure and functions, are also subject of measureless studies on the cell biology field. The atomic force microscope is essential to carry out these studies and without it it would not be possible to appreciate and analyze all the properties of the referred structures. It is, without a doubt, a key instrument for the monitoring of all processes involving these microscopic structures.

Keywords: Atomic force microscopy, viruses, Pfl, M13, proteins, actin fibers.

Índice

1. Introdução	9
1.1. Evolução do MFA e outros aparelhos	11
1.2. Microscópio de Força Atómica: instrumentação e funcionamento	13
1.3. Aplicações da Microscopia de Força Atómica	18
1.4. Limitações da Microscopia de Força Atómica.....	18
2. Visualização de vírus e proteínas no Microscópio de Força Atómica	23
2.1 Vírus	25
2.1.1 Biologia estrutural dos vírus	27
2.1.2 Bacteriófagos	30
2.1.3 Bacteriófago Pfl	34
2.1.4 Bacteriófago M13	37
2.2 Proteínas	46
2.2.1 Biologia estrutural das proteínas.....	47
2.2.2 Fibras de actina	49
3. Conclusão	55
4. Bibliografia.....	57

Índice de Figuras

Figura 1. – Primeiro MFA construído por Binning e a primeira imagem obtida.....	10
Figura 2. – Alavanca ótica desenhada para um dos primeiros <i>profilers</i> , no século XX	11
Figura 3. – Diagrama esquemático do <i>topografiner</i> de Young e uma das primeiras imagens capturadas.....	12
Figura 4. – Esquema simplificado de um microscópio de corrente de efeito túnel.....	13
Figura 5. – Ponta da sonda do MFA.....	14
Figura 6. – Os modos básicos do MFA: modo de contacto (à esquerda) e o modo de contacto intermitente (à direita).....	16
Figura 7. – Força interatômica vs distância e comparação modo de contacto/modo de não-contacto.....	17
Figura 8.- Alguns artefactos captados no MFA	22
Figura 9. – Escala tamanho/tempo dos sistemas biológicos.....	24
Figura 10. – Imagens do Pd-TMV produzido com 0,4 mM de $\text{Na}_2\text{Pd}_2\text{Cl}_4$	26
Figura 11. – Classificação de Baltimore para vírus.....	27
Figura 12. – Famílias e géneros dos vírus que infetam os vertebrados e as plantas, de acordo com o seu tipo de material genético	29
Figura 13. – Famílias de bacteriófagos com cauda, da ordem <i>Caudavirale</i>	30
Figura 14. – Ciclos de reprodução dos bacteriófagos	32
Figura 15. – Representação do bacteriófago Pfl	35
Figura 16. – Morfologia do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> em agar com adição de bacteriófagos Pfl	35
Figura 17. – Imagem no MFA de fagos Pfl e citocromo C	36

Figura 18. – Formação de agrupamentos de Pfl gelificados	37
Figura 19. – Representação do bacteriófago M13.....	38
Figura 20. – Representação da composição proteica do bacteriófago M13	39
Figura 21. – Imagens da interação do M13 com a <i>E. coli</i> em meio seco	40
Figura 22. – Interação de M13 com <i>E. coli</i> no MFA e no MFA de Alta Resolução.....	41
Figura 23. – Imagem no MFA do complexo M13/grafeno estabilizado	43
Figura 24. – Esquema da produção da microbateria de M13/Co ₃ O ₄	44
Figura 25. – Eléttodos da microbateria de M13/Co ₃ O ₄ numa prensa de PDMS.....	45
Figura 26. – Representações de algumas proteínas	46
Figura 27. – Esquema resumido da estrutura e funções das proteínas	47
Figura 28. – Esquematização da hierarquia estrutural das proteínas.....	49
Figura 29. – Imagem no microscópio eletrónico e respetivo modelo da F-actina	50
Figura 30. – Imagens de fibras de actina no MFA em modo de contacto.....	51
Figura 31. – Topografia de baixa resolução dos cones de crescimento neural de <i>Aplysia</i> no MFA-MC e no MFA-MD.....	52
Figura 32. – Foto-imobilização de F-actina e imagem no MFA	54

Índice de Tabelas

Tabela 1. – Classificação de Baltimore. 28

Tabela 2. – Classificação dos bacteriófagos 32

Lista de Abreviaturas

MFA – Microscópio de Força Atômica/Microscopia de Força Atômica

ADN – Ácido desoxirribonucleico

IBM – *International Business Machines Corporation*

STM – *Scanning Tunneling Microscopes*

SPM – *Scanning Probe Microscopes*

SNOM – *Scanning Near-Field Microscope*

UHV – *Ultra High Vacuum*

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

MFA-AV – Microscópio de Força Atômica de Alta Velocidade

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TMV – *Tobacco mosaic virus*

ARN – Ácido ribonucleico

dsDNA – *Double-stranded deoxyribonucleic acid*

ssDNA – *Single-stranded deoxyribonucleic acid*

dsRAN – *Double-stranded ribonucleic acid*

ssRNA – *Single-stranded ribonucleic acid*

Pf1 – Bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa*

M13 – Bacteriófago de *Escherichia coli*

LPS – Lipopolissacarídeos

PLL – Poli-L-lisina

EDTA – *Ethylene diamine tetracetate* ou ácido etilenodiamino tetra-acético

MFA-AR – Microscópio de Força Atômica de Alta Resolução

LPEI – Polietilenamina linear

PAA – Ácido poliacrílico

MFA-MC – Microscópio de Força Atômica Modo de Contacto

MFA-MD – Microscópio de Força Atômica Modo Dinâmico

LED – Light-emitting diode

1. Introdução

As técnicas de microscopia são extremamente importantes em vários ramos da ciência, como a biologia, química, medicina, entre outros. A busca pelo aperfeiçoamento da visualização microscópica e da caracterização a altas resoluções de materiais, quer orgânicos ou inorgânicos, resultou numa enorme evolução tecnológica nesta área. (Hartmann, 1997)

Criado em 1986 por Binnig, Quate e Gerber, o microscópio de força atômica (MFA), (*Atomic Force Microscope* - AFM), considera-se um marco grandioso na nanotecnologia. A microscopia de força atômica revelou-se uma técnica inovadora que permite a observação e medição de estruturas com alta resolução e precisão, ao nível atômico. (Binnig & Quate, 1986)

O MFA revela imagens na ordem dos 5 nm, mostrando apenas dezenas de átomos individuais ou imagens a uma escala de 100 μm , onde podem figurar formas de dezenas de células vivas. Também pode ser realizada de forma a monitorizar reações biológicas e acompanhá-las em tempo real. A microscopia de força atômica apresenta uma grande vantagem na medida em que quase qualquer tipo de amostra pode ser trabalhado, quer sejam materiais duros, como, por exemplo, a superfície de um material cerâmico ou dispersões de nanopartículas metálicas. Ou até materiais mais delicados, tais como polímeros altamente flexíveis, células humanas ou moléculas individuais de ADN (ácido desoxirribonucleico).

Além de funcionar como microscópio, como ferramenta de imagem, o MFA tem vários modos de “espectroscopia”, que mede outras propriedades da amostra em escala nanométrica. É, portanto, um aparelho que confere bastante confiança aos laboratórios estatais, académicos e industriais no fornecimento de imagens de alta resolução e que permite estudar e analisar um espectro alargado de amostras.

Ao contrário dos microscópios óticos ou de eletrões, que formam imagens através da focagem de luz ou eletrões numa superfície, o MFA “sente” fisicamente a superfície da amostra com uma sonda pontiaguda, mapeando a altura da amostra. A abordagem a este método em muito se assemelha com a técnica utilizada pelos gira-discos, aparelho que remonta ao século XIX. (Glatzel et al., 2012)

Deste modo, enquanto os microscópios de imagem medem projeções bidimensionais da superfície da amostra, o MFA mede projeções tridimensionais, registrando a altura da superfície da amostra.

Os dados obtidos pelo MFA são tratados de forma bastante simples, criando imagens que podem ser observadas de vários ângulos, através de um *software* de análise, permitindo uma célere medição de parâmetros como a altura, comprimento, largura e volume de todos os elementos da amostra. Esta técnica, como a generalidade das técnicas científicas, resulta num avanço de processos utilizados até à data da sua criação, o que representou uma revolução na área da microscopia. (Eaton & West, 2010)

Para a compreensão deste tipo específico de microscopia, é necessário enumerar quatro pontos-base que a diferenciam das restantes técnicas, sendo eles: a presença de uma sonda mecânica extremamente aguçada; a capacidade de prospecção de uma determinada superfície; um sistema eletrónico que exerce a manutenção das distâncias entre a superfície da amostra e a ponta da sonda, de forma a não danificar a mesma; e, por fim, recorrendo a dispositivos piezoelétricos (*piezo x, y e z*), a capacidade reproduzir imagens com resoluções nanométricas. (Young, Ward, & Scire, 1986)

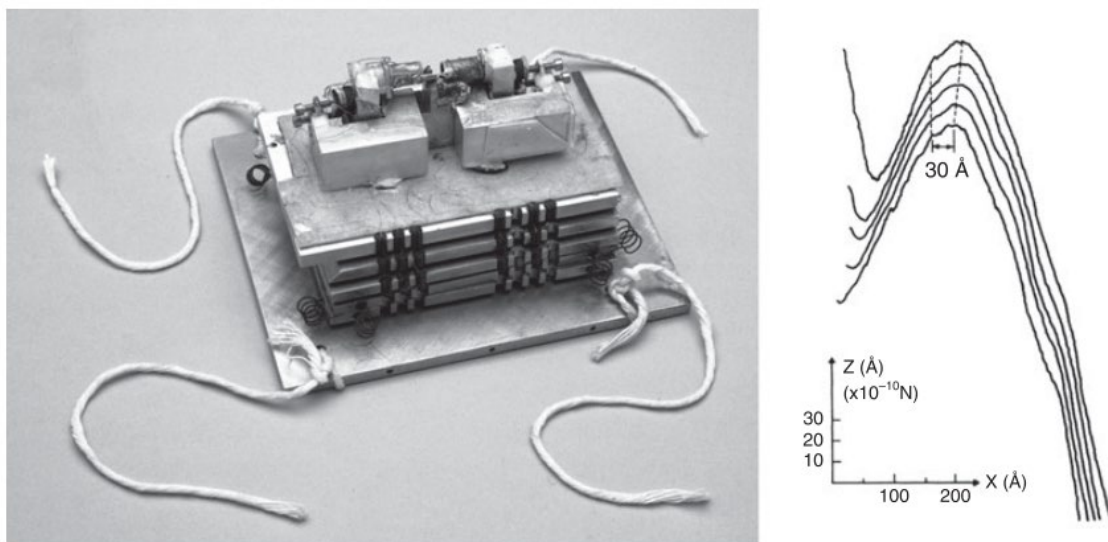


Figura 1. – Primeiro MFA construído por Binning e a primeira imagem obtida. (Retirado de Eaton & West, 2010)

1.1. Evolução do MFA e outros aparelhos

Tendo em conta de que o MFA funciona através do varrimento com uma sonda numa área de forma a mapeá-la topograficamente, este não foi o primeiro aparelho a reproduzir imagens microscópicas através deste processo.

O *profiler* em estilete, que foi desenvolvido por Shmalz em 1929, utilizava também uma espécie de sonda fina e pontiaguda, que, através de uma técnica de alavanca, reproduzia uma imagem da superfície da amostra, com uma ampliação até 1000 vezes. O único problema associado a esta tecnologia é que haveria a hipótese de a sonda dobrar após a colisão com algumas estruturas na amostra.

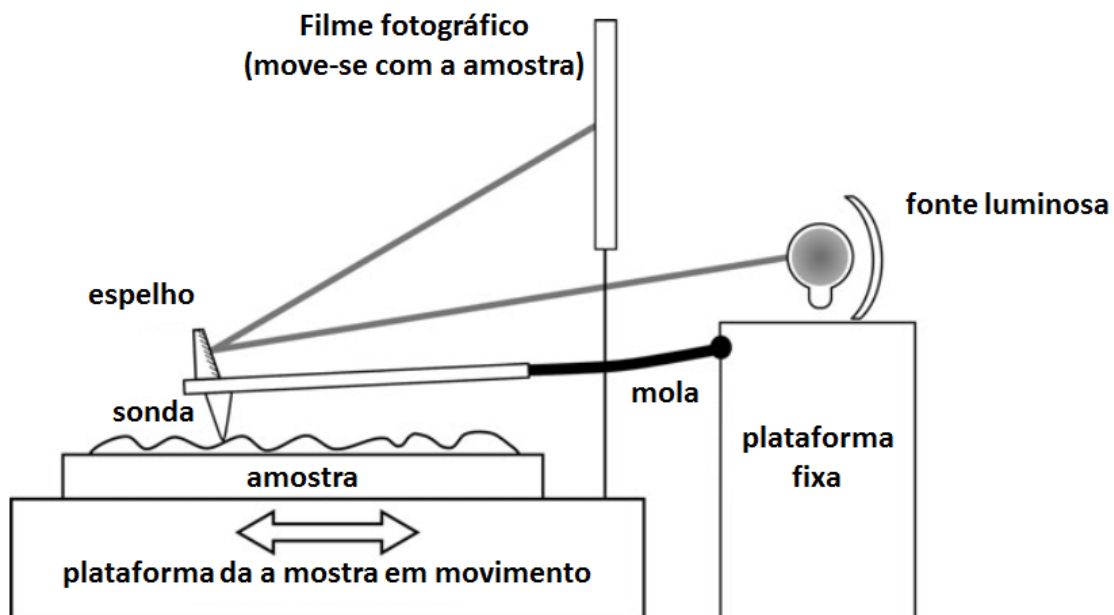


Figura 2. – Alavanca ótica desenhada para um dos primeiros *profilers*, no século XX. (Adaptado de Eaton & West, 2010)

Tendo em conta esta questão, Becker sugeriu que o varrimento da sonda poderia ser feito com um movimento oscilatório vertical, acima da superfície da amostra. Como é proporcionado um movimento oscilatório na sonda, haveria alguma probabilidade de as imagens obtidas se aparentarem um pouco “tremidas”. (Eaton & West, 2010)

De forma a resolver este problema, em 1971 foi desenvolvido por Young uma sonda que não exercesse contacto com a amostra. A distância entre a sonda e a superfície da amostra seria mantida através de um sistema de controlo voltaico exercido no *piezo z*, emitindo um feixe de eletrões e garantindo assim movimento vertical.

Aplicando voltagem, a distância sonda-amostra é mantida e utilizando os *piezos x* e *y*, formam-se imagens, sendo que estes últimos movem a superfície horizontalmente, nos restantes ângulos. Young batizou este aparelho de *topografiner*. (Young et al., 1986)

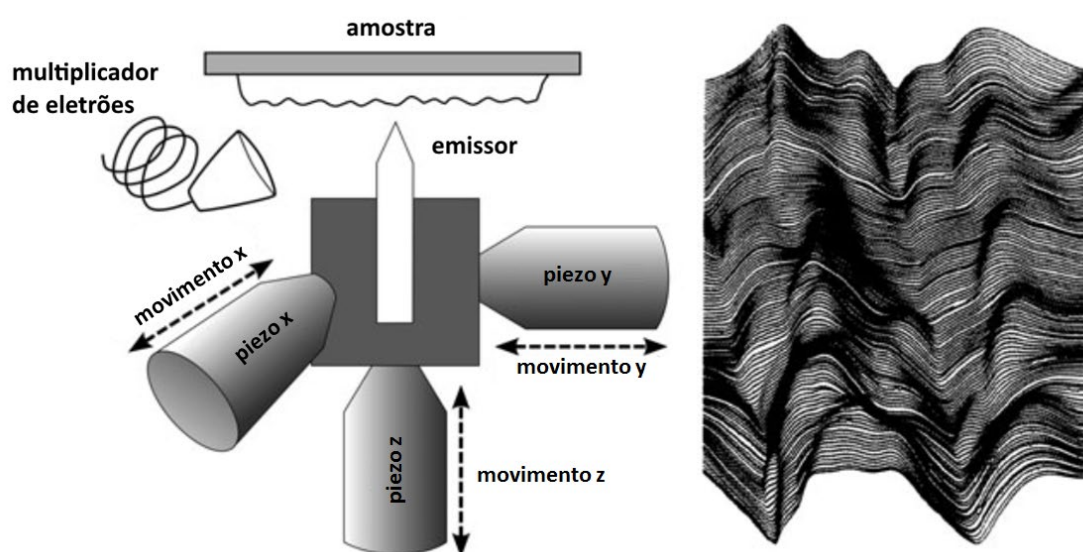


Figura 3. – Diagrama esquemático do *topografiner* de Young e uma das primeiras imagens capturadas. (Adaptado de Eaton & West, 2010)

A resolução neste aparelho também se apresentou limitada, devido à vibração dos instrumentos. Seria necessário isolar esta vibração de forma a conseguir imagens com uma resolução mais exata. Esse feito foi conseguido em 1981, por Binning e Rohrer, em Zurique, no IBM (Vahabi, Nazemi Salman, & Javanmard, 2013). Os avanços neste aparelho, em relação ao seu antecessor, baseiam-se na capacidade de emitir os eletrões numa corrente em efeito túnel na ordem dos pico- aos nano-amperes no espaço sonda-amostra (vácuo), tornando assim possível a resolução atômica. (Custance, Perez, & Morita, 2009)

Foi assim então criado o microscópio de corrente de efeito túnel (*Scanning Tunnelling Microscope* – STM), dispositivo que revolucionou o mundo da microscopia, reproduzindo imagens com uma elevadíssima resolução, conduzindo ao desenvolvimento de uma família de microscópios de sonda varredora (*Scanning Probe Microscopes* – SPM), da qual faz parte o MFA, que a par do SNOM (*Scanning Near-Field Optical Microscope*), são os seus sucessores mais importantes. (Sanchez, Suzuki, Yokokawa, Takeyasu, & Wyman, 2011)

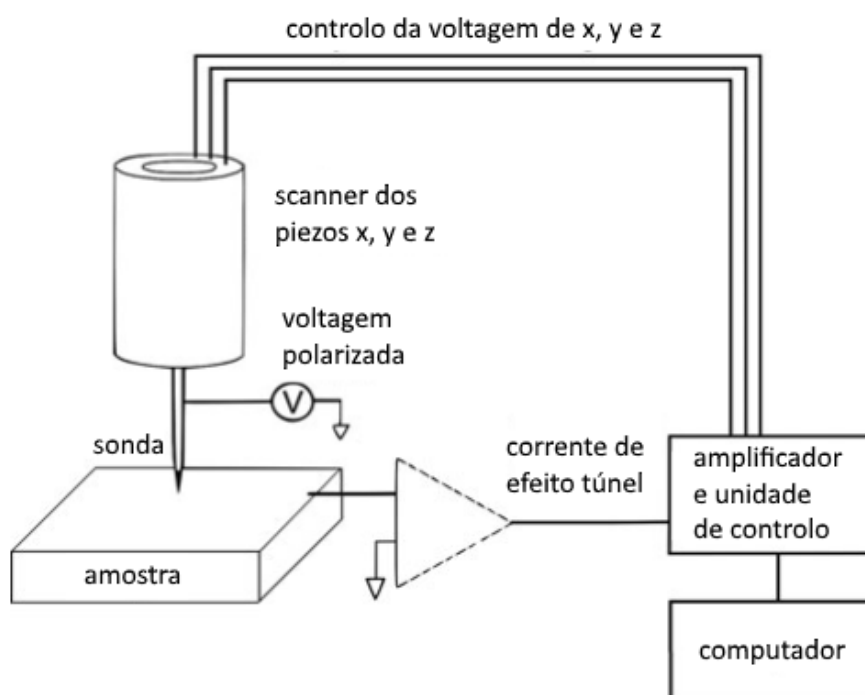


Figura 4. – Esquema simplificado de um microscópio de corrente de efeito túnel. (Adaptado de Eaton & West, 2010)

1.2. Microscópio de Força Atômica: instrumentação e funcionamento

O microscópio de força atômica, a uma escala nanométrica, facultava imagens tridimensionais, calculando as forças envolvidas no espaço entre a sonda e superfície da amostra, apresentando distâncias entre os 0,2 e os 10 nm. A sonda está posicionada na extremidade do cantiléver, uma espécie de viga que funciona como mola. As sondas

normalmente são constituídas por silício (Si) ou nitrato de silício (Si₃N₄).

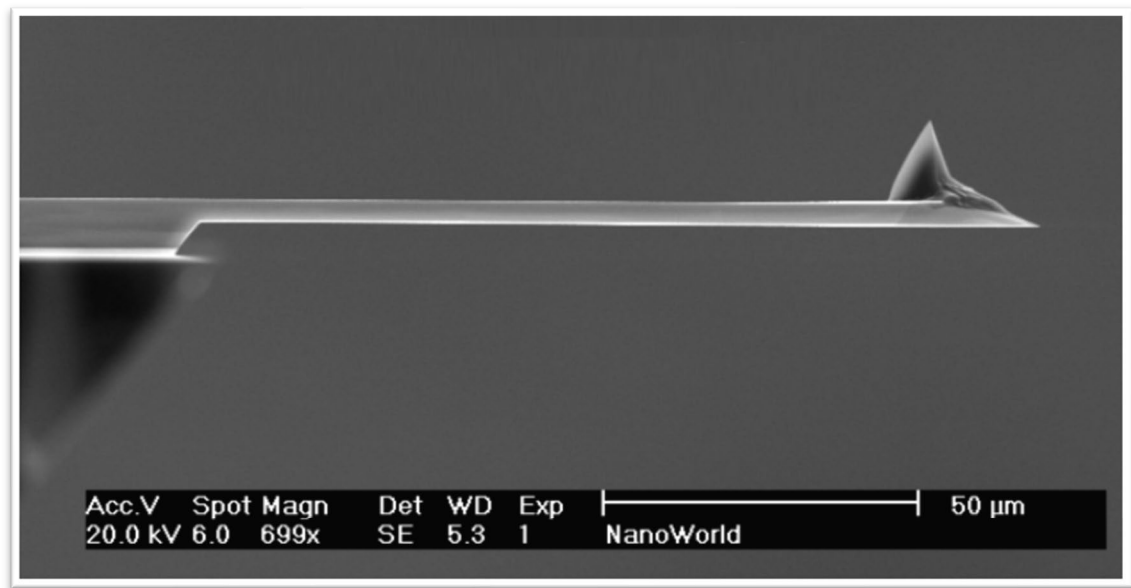


Figura 5. – Ponta da sonda do MFA. (Retirado de Schmitz, 2005)

Ao tocar na superfície, a ponta da sonda registra os valores da força exercida no espaço sonda-amostra. Essa força é descrita através da Lei de Hooke:

$$F = kx$$

F = força (N)
 k = constante elástica da mola (N/m)
 x = deflexão do cantiléver (m)

As forças envolvidas nestas interações são as forças de Van der Waals. Embora outras forças também estejam presentes, como as eletrostáticas e magnéticas, estas só se verificam e só se tornam significativas a distâncias maiores da superfície da amostra. (Bullen, 2006)

Também são descritas forças de capilaridade, fricção e deformação. (Owais, 2020)

O princípio básico em que o MFA está assente é no contacto entre a ponta da sonda e a superfície da amostra a ser estudada. Esta ponta extremamente aguçada rastreia a superfície em questão e produz uma imagem com todos os movimentos e detalhes ao nível nanométrico, detalhes esses reconhecidos por um fotodetector, onde reflete um laser que acompanha a deflexão da sonda. Ou seja, os movimentos verticais (eixo do *piezo* z) e horizontais (eixo dos *piezos* x e y) da sonda são informatizados e transformados numa espécie de carta topográfica tridimensional da superfície da amostra estudada. Os *piezos*, ou *scanners* piezoelétricos, são constituídos por um material cristalino piezoelétrico (cerâmico) que distorce quando lhe é aplicado forças eletromagnéticas. Estes dispositivos controlam os eixos x, y e z, de forma a mapear tridimensionalmente a superfície da amostra. (Dufrêne, 2004)

Em relação à superfície onde a amostra é depositada, a mica é o material mais comumente utilizado, pois possui uma clivagem de base quase perfeita, que a torna atómicamente lisa. Ter uma superfície plana e inerte são características essenciais para obter imagens mais precisas.

A correção das imagens antes da sua análise também é um método indispensável de executar. Em variadas ocasiões, é necessário “suavizar” as imagens antes de uma análise mais profunda, através de pequenos ajustes de curvas polinomiais para normalizar a altura da superfície. (LeBlanc, 2018)

Existem dois modos básicos principais do MFA topográfico, o modo de contacto e o modo de contacto intermitente. (Giocondo et al., 2012)

No modo de contacto verificam-se forças de Van der Waals repulsivas. Quando estão presentes forças repulsivas, a sonda deflete, visto que a constante elástica da sonda (k) é inferior à da superfície. Assim, a sonda consegue mapear a superfície com uma deflexão constante nos eixos x e y, movendo apenas o eixo z para atribuir altura à amostra, resultando imagens obtidas de forma mais rápida e com maior resolução. Como se trata de uma análise direta da amostra, existe a probabilidade de danificar a própria, solucionando-se este problema executando o varrimento em meio líquido. Este modo é mais utilizado em amostras duras, como metais, polímeros ou estruturas biológicas, como, por exemplo, canais iónicos das membranas celulares. (Oncins & Díaz-Marcos, 2012)

É o modo mais simples de obter a topografia da amostra. O sinal advém da posição do *piezo z*, que mantém uma deflexão constante do cantiléver na superfície da amostra. (Owais, 2020)

No modo de contacto intermitente (*tapping*), o eixo *z* exerce uma oscilação contínua na sonda, resultando em toques intermitentes na superfície da amostra. A oscilação, ou frequência de ressonância, varia entre os 20 e os 100 nm e permite o mapeamento da amostra pela sonda quando esta se encontra na posição mais inferior do seu movimento oscilatório. O contacto intermitente é suficiente para criar imagens com ótima resolução e, como não é tão agressivo para as estruturas da amostra, este modo é utilizado em todo o tipo de amostras, principalmente materiais biológicos. Embora possa ser empregue quer em meios secos quer em meios líquidos, em meios líquidos é necessária uma redução na velocidade de leitura, de modo a favorecer a resolução das imagens reproduzidas. (Haugstad, 2012)

Existe, no entanto, maior probabilidade de danificar a ponta da sonda ao longo da captura da topografia da amostra, devido aos toques intermitentes na amostra, o que, por conseguinte, pode causar perda de resolução nos momentos finais do registo da imagem. (Owais, 2020)



Figura 6. – Os modos básicos do MFA: modo de contacto (à esquerda) e o modo de contacto intermitente (à direita). (Adaptado de Oncins & Díaz-Marcos, 2012)

Além dos modos descritos, existe o modo de não-contacto. Neste modo não existe um contacto com a superfície da amostra. A sonda oscila, tal como no modo intermitente, mas acima do líquido adsorvido durante o varrimento. Como não entra em contacto com a amostra, exerce uma força muito menor sobre esta, resultando daí uma vantagem na sua utilização, assim como aumenta o tempo de vida da sonda. Em contrapartida, produz imagens com menos resolução, tendo em conta a oscilação da sonda e a contaminação por parte do líquido sobrenadante obtido pela adsorção na superfície da amostra. Neste caso é necessário recorrer a condições de vácuo ultraelevado, ou UHV (Ultra High Vacuum). (Oncins & Díaz-Marcos, 2012)

Como não existe toque físico da ponta da sonda na superfície da amostra, obtêm-se imagens mais precisas. Também garantimos um maior tempo de vida das pontas das sondas, que são bastante dispendiosas. (Owais, 2020)

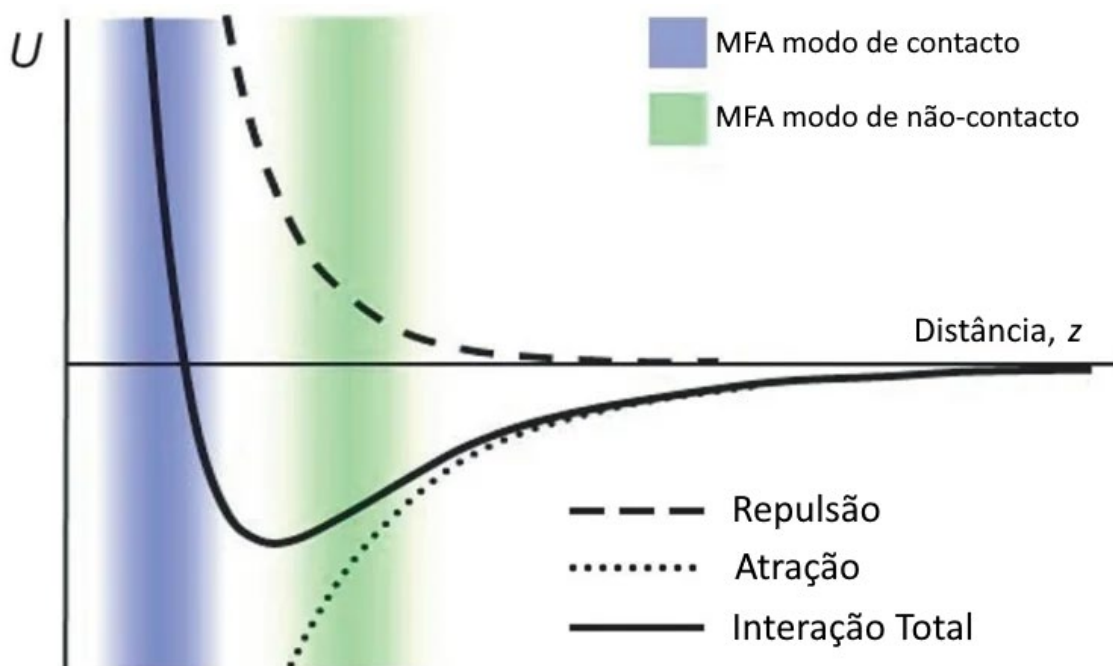


Figura 7. – Força interatômica vs distância e comparação modo de contacto/modo de não-contacto. (Adaptado de AZoNano, 2023 - [https://d1otjdv2bf0507.cloudfront.net/image-handler/ts/20181115090657/ri/750/src/images/Article_Images/ImageForArticle_5071\(2\).jpg](https://d1otjdv2bf0507.cloudfront.net/image-handler/ts/20181115090657/ri/750/src/images/Article_Images/ImageForArticle_5071(2).jpg))

1.3. Aplicações da Microscopia de Força Atómica

A competência presente nesta tecnologia, que lhe permite visualizar uma enorme variedade de estruturas, somando o facto de ser executada de forma simples, justifica a utilização por parte de muitos ramos da ciência, como a biologia, a biofísica, a medicina, nanotecnologia, assim com na indústria e na engenharia. (Hartmann, 1997)

Alguns dispositivos desta família são capazes de “ler” topograficamente algumas características morfológicas das amostras analisadas, como a elasticidade, carga elétrica ou magnetismo. A combinação do MFA com um microscópio de varrimento por eletrões (Scanning Electron Microscopy – SEM) melhorou a visualização e posicionamento do cantiléver, ultrapassando a barreira do microscópio ótico, que normalmente é utilizado para executar esta operação. (Uruma et al., 2019)

Tendo em conta que este trabalho se destina à compreensão e enumeração das implicações da Microscopia de Força Atómica nos vírus e nas proteínas, é imperativo focar algumas das aplicações da Microscopia de Força Atómica no ramo da biologia. A particularidade desta técnica prende-se na capacidade de analisar diretamente estruturas biológicas no seu meio natural, em soluções tampão *in vitro*, *in situ* e mesmo *in vivo*. (Vahabi et al., 2013)

1.4. Limitações da Microscopia de Força Atómica

Embora esta técnica de microscopia seja sobejamente utilizada no campo da biologia, apresenta certas limitações. Uma delas prende-se com a dificuldade em atingir a resolução ao nível atómico, devido ao facto de a ponta da sonda não ser idealmente aguçada, o que pode não reproduzir uma imagem fidedigna. Existe a possibilidade de contornar essa situação com a produção de pontas mais aguçadas, fabricadas a partir de nanotubos de carbono. (Frewin, 2012)

Outro entrave consiste no contacto da ponta da sonda com superfícies macias da amostra, como, por exemplo, membranas de células eucarióticas vivas, que acabam deformadas, inviabilizando a observação de moléculas em tais estruturas menos rígidas. (Ando, Uchihashi, & Koder, 2013)

As limitações associadas à ponta da sonda interferem devido às fortes interações verificadas entre o dispositivo e superfícies gelificadas, ou com a presença de apêndices, como é o caso das bactérias. Uma solução para esta questão baseia-se no desenvolvimento de um controlo ativo na ressonância no modo de contacto intermitente, enfraquecendo as interações e obtendo-se, assim, melhores resultados na resolução.

Outra limitação é a impossibilidade da visualização tridimensional de estruturas intracelulares que, até à data, a tecnologia ainda não conseguiu solucionar. Será necessário o desenvolvimento de novas técnicas e novos dispositivos, substituindo o cantiléver atual por um dispositivo que seja capaz de fazer a leitura destas estruturas com a resolução pretendida. (LeBlanc, 2018)

O fator tempo também carece de alguma reflexão, visto que o varrimento destas estruturas pode variar entre 30 segundos, para cristais proteicos bidimensionais, até vários minutos, como, por exemplo, células inteiras. (Dufrêne, 2004)

Tendo em conta que grande parte dos processos biológicos ocorrem a grande velocidade para o olho e a perceção dos humanos, surgiu a possibilidade de evoluir. Em 2008 foi criado o microscópio de força atómica de alta velocidade, MFA-AV (*High-Speed Atomic Force Microscope* – HS-AFM), por Ando *et al.*, que passou a ser utilizado para contornar as limitações que haviam sido encontradas até à altura.

Através deste novo método microscópico, foi possível visualizar pela primeira vez, por exemplo, os movimentos das moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico), de proteínas e foi também foi possível, pela primeira vez, captar e acompanhar os mecanismos envolvidos nas reações enzimáticas. O MFA-AV é capaz de produzir imagens com resoluções em escala temporal de milissegundos, sendo assim possível observar estas reações numa espécie de vídeo. (Ando, 2013)

A contaminação das amostras, meio ou campo de observação pode ser apresentado como limitação desta técnica. É crucial executar uma preparação adequada das amostras para a sua visualização no MFA. Apesar de existir um manuseamento cuidadoso de todas as amostras, a formação de resíduos ou contaminação do campo de observação é uma limitação desta tecnologia, pois pode levar à deposição de partículas durante a reprodução de imagens.

Na reprodução de imagens de proteínas, é necessário descartar algumas frações destas estruturas, de forma a não contaminar o campo de observação. O MFA deteta imediatamente estas estruturas, a análise pode ficar comprometida. No caso de amostras de ADN, é menos provável que contenham impurezas. Mas mesmo em amostras que sugiram um elevado grau de pureza em medições de massa, podem revelar outros resultados assim que são observadas no MFA.

Outros fatores que podem afetar o desempenho do MFA são o “ruído” do meio, desvios dos *piezo* e os impactos que a ponta da sonda causa na qualidade da imagem, pois sendo a imagem registada uma extensão da ação da sonda, a resolução da imagem torna-se bastante dependente da sua *performance*. O desgaste e a contaminação da ponta da sonda devem ser tidos em causa. (LeBlanc, 2018)

Uma grande limitação do MFA é a formação de artefactos. Estes artefactos podem ter variadas origens, como: o processamento das imagens, a voltagem aplicada nos *piezos* dos eixos x, y e z, a deterioração da ponta da sonda, os parâmetros de *feedback*, a superfície da amostra, a vibração, o ruído e os gradientes de temperatura.

A voltagem, ou tensão elétrica, aplicada nos *piezos*, faz com que estas estruturas se tornem curvas, portanto, não-lineares. Estas alterações fazem com a sonda não “viaje” em linha reta, resultando em imagens inclinadas ou curvadas, diferentes da realidade. Para tal, é necessário realizar alguns ajustes e calibrações antes, durante e depois da leitura, de forma a corrigir os erros provocados por estas alterações de voltagem.

Pode também obter-se imagens com ruído, denotando a presença de oscilações de alta frequência ou padrões repetidos. Estas oscilações são provocadas por ruído sonoro, presente no interior ou exterior do laboratório, vibrações físicas, clivagem insuficiente da superfície onde é depositada a amostra, peças danificadas, cargas eletroestáticas, que aumentam a deflexão da ponta da sonda. Para solucionar estas limitações, pode adotar-se correções pontuais como o isolamento sonoro do MFA, instalação de superfícies flutuantes, para absorver as vibrações físicas, clivagens mais eficientes ou introdução de materiais mais lisos, lavagens das superfícies com soluções salinas, para evitar a formação de cargas eletroestáticas, entre outros.

A deterioração da ponta da sonda é também uma limitação, quer a nível da obtenção de imagens nítidas, como também do tempo de vida das mesmas e do seu custo elevado. É

necessário conservar o estado da ponta da sonda, de modo a conseguir melhores imagens. A danificação pode adquirir-se através do varrimento de superfícies duras, aproximações demasiado rápidas da sonda à superfície das amostras, leituras a velocidades elevadas, o que aumenta a interação ponta da sonda/superfície da amostra, a utilização em excesso da mesma ponta e a leitura em superfícies contaminadas de impurezas e partículas residuais.

Interferências e situações de histerese, fenómenos de conservação das propriedades dos materiais utilizados na análise, que causam certos padrões nas imagens finais.

Estes problemas podem ser solucionados através de calibrações, limpeza das estruturas, troca de peças, introdução de sensores e algoritmos, que embora complexos, podem corrigir os erros que vão surgindo ao longo das leituras. (Sinha, K., Xu, X. et al., 2014)

Na Figura 8, apresentam-se alguns dos artefactos descritos anteriormente. Nas imagens do grupo (a) indicam a presença de histerese, no grupo (b) figuram partículas que advêm da deterioração da ponta da sonda e no grupo de imagens (c) apresentam-se artefactos causados por ruído elétrico. No grupo (d), devido às interferências causadas pela reflexão do laser em amostras com propriedades refletoras, obtêm-se os padrões representados. No grupo (e) verifica-se a presença de partículas que contaminam as imagens, criando um padrão “riscado” e, por fim, no grupo (f), verifica-se a formação de espaços “em branco”, devido à falta de calibração e de posicionamento da amostra no centro do campo de leitura.

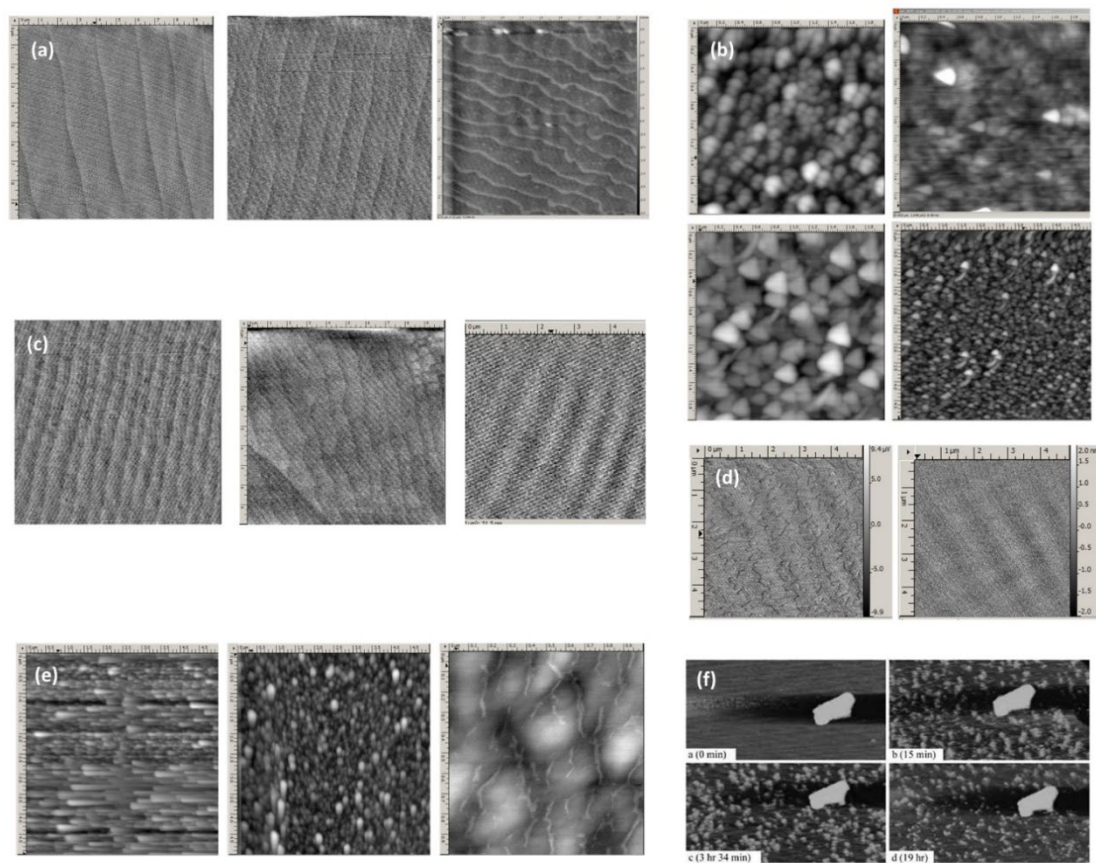


Figura 8.- Alguns artefactos captados no MFA. (Adaptado de Sinha, K., Xu, X. et al., 2014)

2. Visualização de vírus e proteínas no Microscópio de Força Atómica

Como já foi abordado anteriormente, o MFA foi desenvolvido para estudar estruturas microscópicas e inacessíveis ao olho humano. No seu estado inicial, teria sido inventado para visualizar átomos em superfícies sólidas, possibilitando estudar o seu movimento e respectivas interações.

No que diz respeito às ciências biológicas, este aparelho é utilizado para captar imagens a altas resoluções, no seu estado natural, sem recurso a corantes. Promove a observação das interações entre estruturas moleculares, como o movimento de ácidos nucleicos, proteínas e vírus, a elasticidade de superfícies biológicas, pressão osmótica de células vivas, entre outros. No entanto, como também já foi referido, foi necessário elevar a fasquia no que diz respeito ao MFA, tendo em conta as suas limitações e, principalmente, o facto de ser necessário captar as interações anteriormente enumeradas em tempo real.

Esse obstáculo foi ultrapassado com o MFA-AV, que consegue captar imagens na ordem dos 100 milissegundos, tornando assim a visualização das funcionalidades das moléculas com um detalhe espantoso. (Ando et al., 2013)

É sabido que os sistemas biológicos se apresentam numa vasta amplitude, no que ao tamanho e tempo dizem respeito. Desde o pequeno átomo, que mede na ordem dos Ångströms (10^{-10}m) até o ser humano, por exemplo, que pode ser medido através dos métodos mais convencionais (10^0m). Em relação ao tempo, podemos realçar a evolução das espécies, que demora milhões de anos, até à mais rápida vibração conhecida das ligações atómicas, na ordem dos femtosegundos (10^{-14}). (Larsson, 2012)

Através dos aparelhos apresentados, é possível quebrar estas escalas e conseguir observar todas estas estruturas e assim aprender mais sobre elas, de forma a contribuir para a evolução do conhecimento humano. É certamente um avanço estrondoso no conhecimento destes sistemas biológicos.

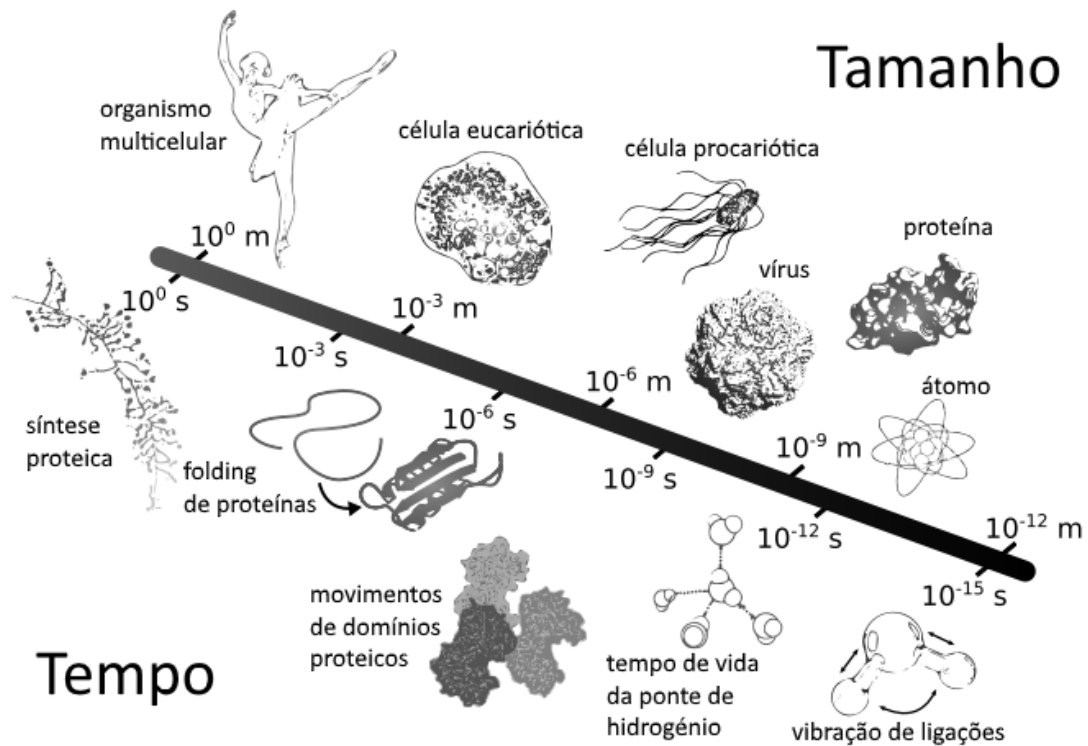


Figura 9. – Escala tamanho/tempo dos sistemas biológicos. (Adaptado de Larsson, 2012)

Uma forma de observar estas estruturas microscópicas é recorrendo à nanobiociência, que se entende como um meio de realizar diagnósticos de estratégias de tratamento para solucionar problemas nos sistemas biológicos nanoscópicos. Esta é uma tecnologia associada às ciências biomédicas e baseia-se na inclusão de nanopartículas em processos de interação com vírus e proteínas.

Estas partículas apresentam propriedades magnéticas, óticas e, como possuem tamanho semelhante ao dos vírus e proteínas, atingem um grau de aplicabilidade mais dilatado, adquirindo a capacidade de interagir com os mesmos alvos, tais como outras proteínas, ácidos nucleicos e até se tornam aptos para entrar em células. (Eaton & West, 2010)

2.1. Vírus

Os vírus são estruturas que se encontram no limbo no que ao conceito de vida diz respeito, visto que alguns deles não apresentam certos requisitos para serem considerados seres vivos. Existem em variadíssimas formas, estruturas muito bem definidas e são partículas que sobrevivem em condições extremas, capazes de se replicar e infetar quase todos os hospedeiros. Infetam humanos, plantas, insetos, bactérias e até outros vírus. Graças à variedade de hospedeiros, os vírus revelam diferentes atributos e estratégias de replicação.

Aquando da sua infeção, estão aptos para criar cópias de si mesmos. Em termos de quantidade, são os seres biológicos mais fartos do planeta e são os causadores de inúmeras patologias, tais como a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana), gripes, hepatites, entre outras, sendo igualmente responsáveis por variadas doenças do meio agropecuário. Também contribuem para estudos bioquímicos, resultando em preciosas ferramentas para esta e outras áreas das ciências biológicas. (Larsson, 2012)

Embora se encontrem entre nós numa infinidade de tempo e, já sendo conhecidos há mais de dez mil anos, apenas foram descobertos no século XIX, por Martinus Beijerinck. (Perez, 2010) Possuem uma estrutura bastante simples e eficiente, verificada nos anos 30 do século XX, com a introdução do microscópico eletrónico. Este momento revolucionou a virologia, com a captação da imagem do vírus do mosaico do tabaco (TMV, *tobacco mosaic virus*), através da sua cristalização em 1935, por Wendell Stanley. O estudo deste vírus originou a primeira classificação de vírus, baseada na sua simplicidade estrutural. (Aznar, 2013)

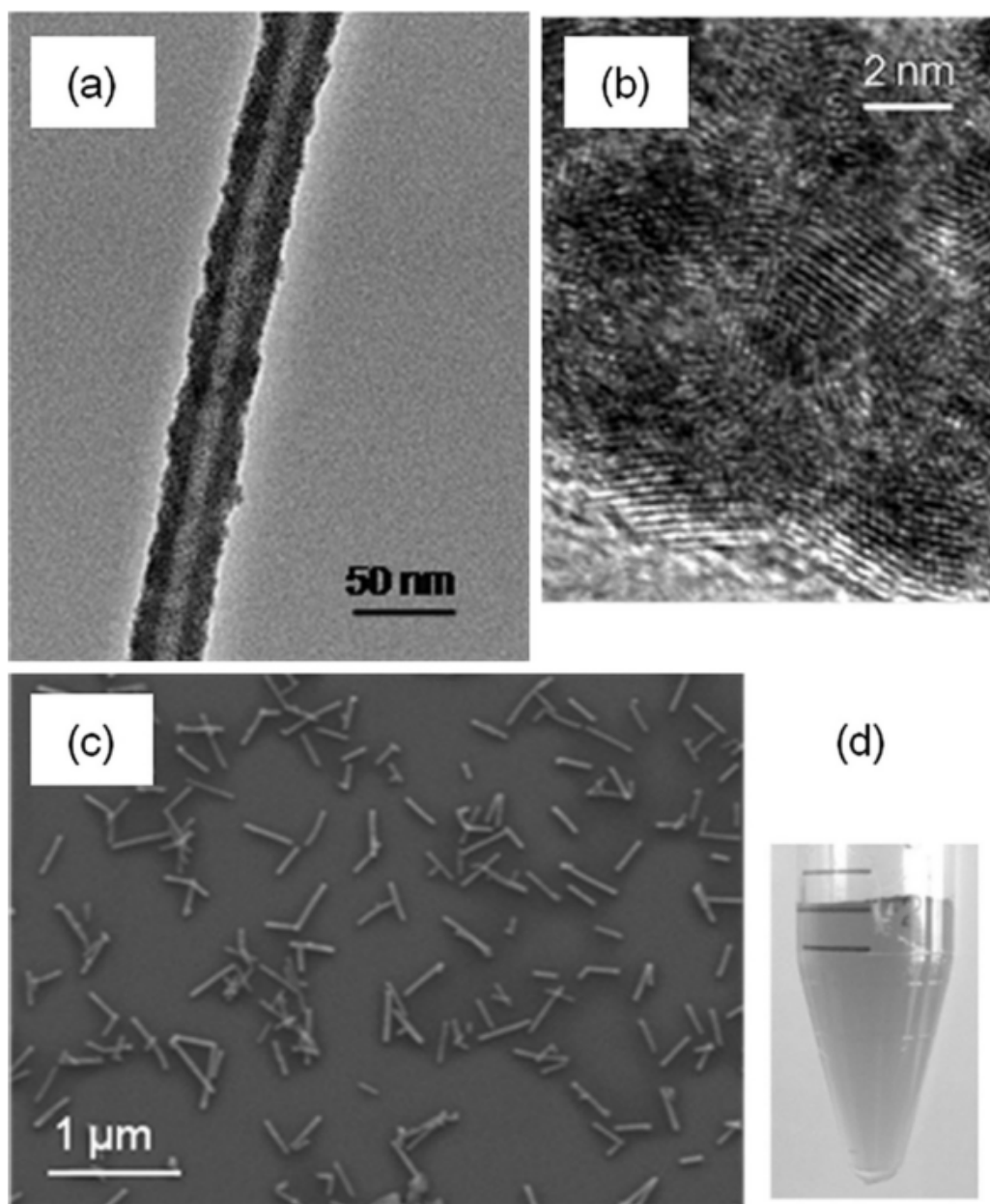


Figura 10. – Imagens do Pd-TMV produzido com 0,4 mM de $\text{Na}_2\text{Pd}_2\text{Cl}_4$. (Retirado de Zhou et al., 2012)

2.1.1. Biologia estrutural dos vírus

Todos os vírus, constituindo-se como parasitas intracelulares obrigatórios, possuem um genoma, podendo usufruir de apenas de uma molécula de ADN, ARN (ácido ribonucleico) ou várias. Estas moléculas podem estar rodeadas por uma cápside (camada proteica protetora), camadas lipídicas, proteicas ou constituídas por hidratos de carbono. Existem os vírus “nus” ou sem envelope, que apenas detêm a cápside e os vírus com envelope, que possuem uma camada lipídica, originária da célula do hospedeiro, que lhes é atribuída quando se libertam da mesma. (Kurtb, 2012)

Os vírus são classificados pela sua morfologia (icosaédricos, helicoidais, com invólucro, complexos), características fenotípicas, modos de replicação, propriedades imunológicas, métodos de transmissão, pelo tipo de hospedeiro e tipo de genoma. Visto não serem capazes de produzir novas partículas virais *per se*, os vírus necessitam de infectar o hospedeiro para tal acontecer, ou seja, produzir as suas próprias partículas. A replicação depende do tipo de ácido nucleico encapsulado no núcleo do vírus (ADN ou ARN), que poderá ser de cadeia simples ou dupla. Em relação ao tipo de genoma, foi proposto por David Baltimore, em 1971, uma classificação que dividiria os vírus em sete classes, divisão essa que se assentava no tipo de genoma, no modo de replicação e no modelo de transcrição. (Baltimore, 1971)

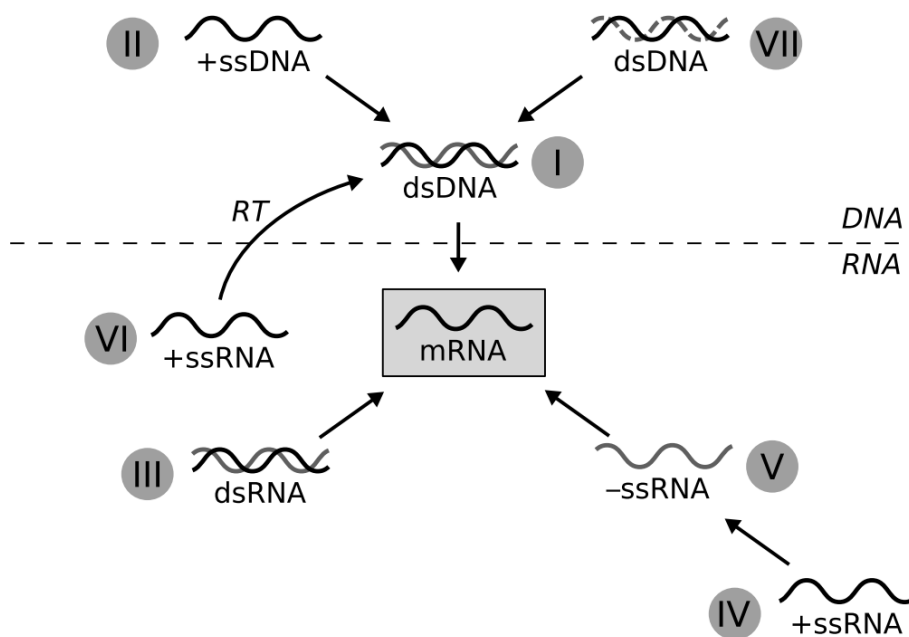


Figura 11. – Classificação de Baltimore para vírus. (Retirado de Larsson, 2012)

Podemos então definir as classes dos vírus da seguinte forma:

Tabela 1. – Classificação de Baltimore.

Classe	Tipos de genoma, replicação e transcrição
I	dsDNA - ADN, cadeia dupla
II	+ssDNA - ADN, cadeia simples, sentido positivo (5'→3')
III	dsRNA - ARN, cadeia dupla
IV	+ssRNA - ARN, cadeia simples, sentido positivo (5'→3')
V	-ssRNA - ARN, cadeia simples, sentido negativo (3'→5')
VI	+ssRNA - ARN, cadeia simples, sentido positivo (5'→3')
VII	dsDNA - ADN, cadeia dupla

Os vírus experienciam duas fases no seu ciclo de vida, fora e dentro e das células hospedeiras. Fora destas, conseguem resistir a condições extremas, mas não se conseguem reproduzir, visto não possuírem os mecanismos e instrumentos necessários para tal, denominando-se de viriões. Assim sendo, carecem de infectar as células hospedeiras vivas, de forma a conseguirem replicar o seu genoma e produzir proteínas indispensáveis neste e noutros processos. (Kurtb, 2012)

Grosso modo, as células necessitam de expressar a sua informação genética (genoma) através de ARN mensageiros (mRNA) que, por mecanismos moleculares, são traduzidos para o citoplasma da mesma.

Os vírus utilizam exatamente o mesmo mecanismo, produzindo proteínas que alteram a fisiologia da célula hospedeira. O genoma pode ser então considerado um dos componentes principais do vírus.

Já o segundo é a cápside, camada proteica formada por inúmeras cópias de proteínas, denominadas capsómeros, normalmente constituídos por 5 ou 6 subunidades, os protómeros, que se auto-agregam sem necessitar de qualquer tipo de energia exterior.

Esta estrutura tem um papel importantíssimo na sobrevivência e eficiência dos vírus, visto que protege o seu genoma do meio envolvente e possibilita a sua transferência para o hospedeiro de forma segura.

A simetria e a forma da cápside são fatores revelantes para a sua classificação. Como exemplo de vírus com estas estruturas simples temos os vírus icosaédricos com envelope e os helicoidais sem envelope. Pelo facto de não possuírem envelope também se lhes pode atribuir o nome de vírus “nus”.

Além dos acima descritos, alguns vírus contemplam outros componentes. Os vírus com envelope possuem uma membrana externa que contém espigões de glicoproteínas que lhes conferem forma de aderirem à superfície da célula hospedeira. (Aznar, 2013)

Estes e outros fatores contribuem para a morfologia diversificada observada nos vírus (Figura 10).

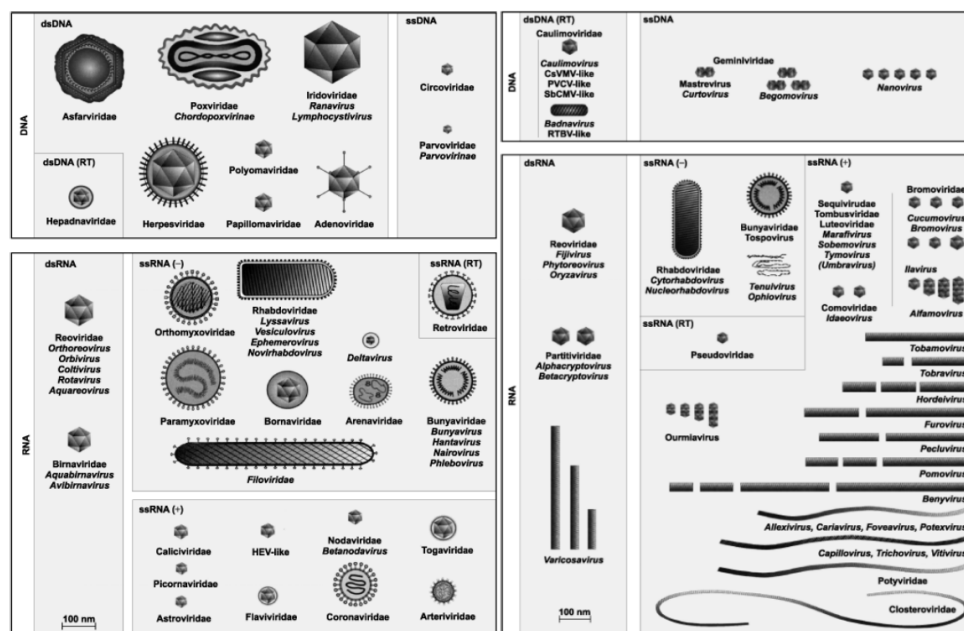


Figura 12. – Famílias e géneros dos vírus que infetam os vertebrados e as plantas, de acordo com o seu tipo de material genético. (Retirado de King, Adams, Carsten, & Lefkowitz, 2012)

2.1.2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos ou fagos, vírus com estrutura complexa, possuem uma cauda, constituída por fibras proteicas, que aderem à célula hospedeira, e uma bainha contráctil, que injeta o genoma na mesma. Estes vírus são caracterizados por infetar e servir-se dos recursos das bactérias, sendo muito comuns no meio ambiente.

Visto que as bactérias são indispensáveis para a sobrevivência dos fagos e estando assim diretamente relacionados com estas, os bacteriófagos representam a forma de “vida” mais abundante do planeta, contabilizando uma estimativa de 10^{32} . (Wommack & Colwell, 2000)

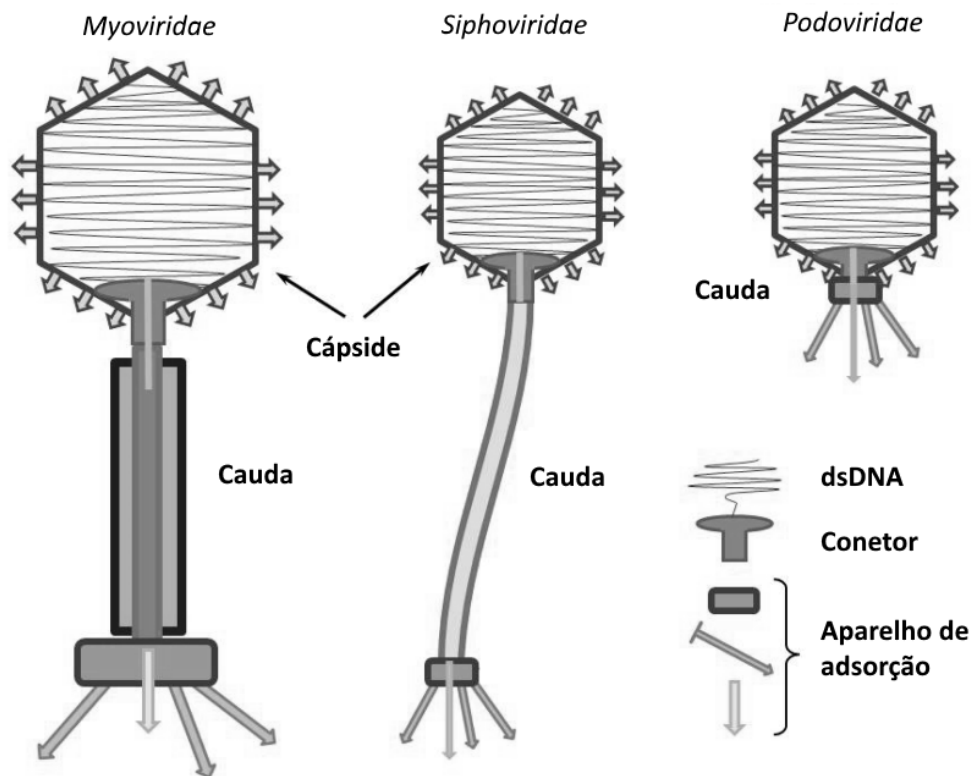


Figura 13. – Famílias de bacteriófagos com cauda, da ordem *Caudavirales*. (Adaptado de Kurtb, 2012)

Estas estruturas foram descobertas por Felix d'Herelle em 1917, no Pasteur Institute, em França, através da observação de culturas de *Shigella*, bactéria causadora da disenteria, que eram erradicadas com a adição de um filtrado de água de esgoto, sem presença de bactérias.

Os fagos ocorrem em toda a biosfera e são encontrados maioritariamente nos oceanos e no solo. Também nos esgotos e matéria fecal, ao que d'Herelle concluiu que existiria algum agente antagonista do patogénio causador da disenteria na solução adicionada, ao qual apelidou de bacteriófago. (Summers, 2012)

Podemos qualificar os fagos de acordo com o tipo de infeção que provocam. Existem, portanto, dois ciclos de infeção: lítico e lisogénico ou temperado.

Na forma lítica, a libertação de ADN estimula trocas proteicas com a bactéria hospedeira, produzindo entre 50 e 200 novos bacteriófagos, esgotando assim os recursos da bactéria, enfraquecendo-a e forçando-a a explodir. Ocorre assim a morte celular, resultado da lise da célula bacteriana, libertando os recém-formados fagos para o espaço extracelular.

Já na forma de infeção lisogénica ou temperada, o ADN do fago é integrado no genoma da bactéria hospedeira. Este genoma híbrido será replicado e as novas células bacterianas herdarão o ADN viral, podendo ocorrer em variadas gerações sem consequências, se bem que alguéns genes dos bacteriófagos poderão reverter o ciclo lítico, que levará a nova libertação de fagos (Figura 12). (Kurtb, 2012)

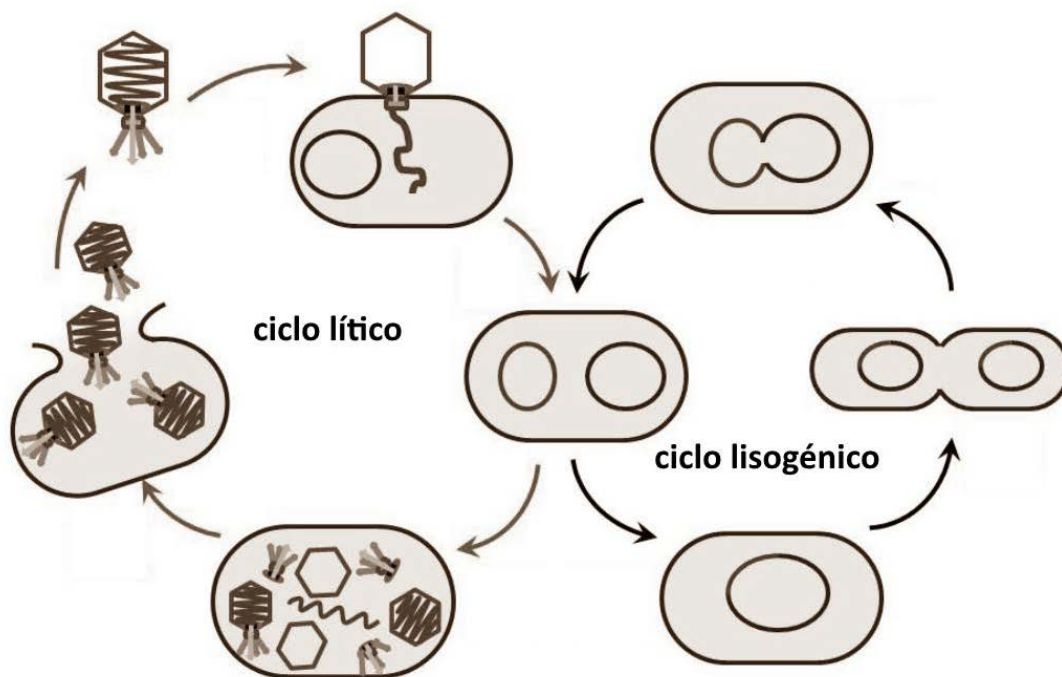
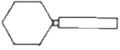
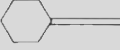


Figura 14. – Ciclos de reprodução dos bacteriófagos. (Adaptado de Kurtb, 2012)

Considerado o grupo de vírus mais extenso, os bacteriófagos são catalogados através de uma ordem e dez famílias, sendo que os fagos da ordem *Caudovirales* possuem cauda e contêm dsDNA e as restantes famílias são constituídas por fagos cúbicos, filamentosos e pleomórficos, contendo ds ou ss ADN ou ARN. Estas últimas separam-se por inúmeros fatores morfológicos e estruturais que diferem entre si. São famílias pequenas e alguns até possuem apenas um membro.

Verifica-se então que a classificação dos vírus assenta em vários fatores, já enumerados em diversas instâncias e, no que aos bacteriófagos diz respeito, surgiu a necessidade de criar uma classificação específica, de forma a agrupá-los de acordo com as suas características e mecanismos singulares. Assim, após várias propostas, Ackermann sugeriu um esboço (Tabela 2), onde arranja as famílias de fagos existentes na natureza. (Ruska, 2011)

Tabela 2. – Classificação dos bacteriófagos, por Ackermann (Retirado e adaptado de Ruska, 2011)

Forma	Ordem ou Família	Ácido nucleico, particularidades, tamanho
	<i>Caudovirales</i>	dsDNA, sem envelope
	<i>Myoviridae</i>	Cauda contrátil
	<i>Siphoviridae</i>	Cauda longa, não contrátil
	<i>Podoviridae</i>	Cauda curta
	<i>Microviridae</i>	ssDNA circular, 12 capsómeros nodosos, 27 nm
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA circular, cápside complexa, lípidos, 63 nm
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA linear, vesícula lipídica interior, pseudo-cauda, 60 nm
	<i>Leviviridae</i>	ssRNA linear, similar ao poliovírus, 23 nm
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA linear, segmentado, envelope lipídico, 70-80 nm
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA circular, filamentado ou em forma de cajado, 85-1950x7 nm
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA circular, envelope lipídico, sem cápside, 80 nm

Analisando a tabela supraindicada, atentamos no facto de existir uma família, *Inoviridae*, com uma forma francamente singular em relação às restantes. Não só a sua forma é díspar, como também detém uma característica intrínseca ao seu mecanismo e interação com as

células bacterianas hospedeiras. Estes fagos têm uma ligação sobejamente peculiar com as bactérias hospedeiras, reproduzindo-se sem as matarem e até interferindo na sua dinâmica e na relação com o meio envolvente.

A generalidade dos viriões conhecidos são originários dos fagos de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Escherichia coli*. (Rakonjac, Bennett, Spagnuolo et al 2011)

O foco será apontado a dois viriões (partículas infecciosas), especificamente o Pfl (fago de *P. aeruginosa*) e o M13 (fago de *E. coli*), à forma como se desenvolvem e posterior visualização no MFA.

2.1.3. Bacteriófago Pfl

A *P. aeruginosa* é uma bactéria causadora de infeções nosocomiais e responsável por uma imensa mortalidade e morbilidade associada à fibrose quística, reação da infeção crónica por esta bactéria nas vias intrapulmonares, nas infeções do sistema respiratório. (Anderson, 2012)

Os bacteriófagos Pfl são os mais transcritos aquando da progressão da formação de biofilmes da *P. aeruginosa*, apresentando cerca de 2 µm de comprimento e até 7 nm de diâmetro e a sua formação ocorre em condições anaeróbias e ambientes aquosos. Estes são também os mais virulentos e os promotores da formação de biofilmes, sendo esta a sua característica, do ponto de vista clínico, mais expressiva. (Bucki et al., 2015)

Compreendem também a maior distância axial entre dois nucleótidos (6 Å), possuem uma característica estrutura em forma de bastonete e não possuem componentes lipídicos nem hidratos de carbono. (Liu & Day, 1994)

São considerados vírus filamentosos polieletrólíticos, cuja cadeia de ADN de cadeia simples é estabilizada pela presença de proteínas que exibem resíduos carregados positivamente no seu interior, neutralizando a carga aniónica do seu genoma. Já no

exterior, exibem resíduos carregados negativamente que originam uma superfície aniônica. (Huisman et al., 2011)

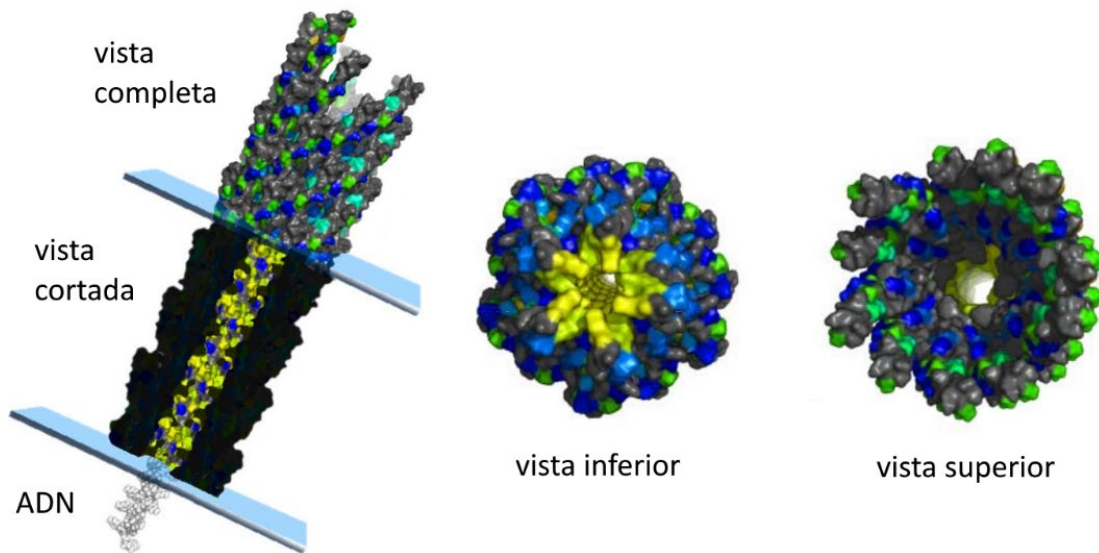


Figura 15. – Representação do bacteriófago Pf1. (Adaptado de Lorieau, Day, & Mcdermott, 2008)

Os Pf1 interagem com a bactéria hospedeira e com polímeros bacterianos, formando biofilmes. Aquando da sua formação numa matriz cristalina líquida, o biofilme aumenta a sua adesão e efeito de dessecação. A proliferação e concentração de fagos Pf1 tornam a *P. aeruginosa* mais resistente aos antibióticos. (Secor et al., 2015)



Figura 16. – Morfologia do biofilme de *P. aeruginosa* em agar com adição de bacteriófagos Pf1. (Retirado de Bucki et al., 2015)

É possível verificar a visualização do fago Pfl através do MFA no modo de contacto intermitente, preparado com e sem Mg^{2+} em 6mM de acetato de amónio com um pH de 6,8, numa superfície de mica acabada de clivar.

Utilizou-se o citocromo C, proteína facilmente encontrada na natureza, associada à cadeia transportadora de eletrões na membrana interior da mitocôndria, carregado positivamente para interagir com o fago. Obtiveram-se imagens de formas geométricas bem definidas, pela possível presença de dois citocromos ladeados de dois fagos Pfl. (Nunes, 2011)

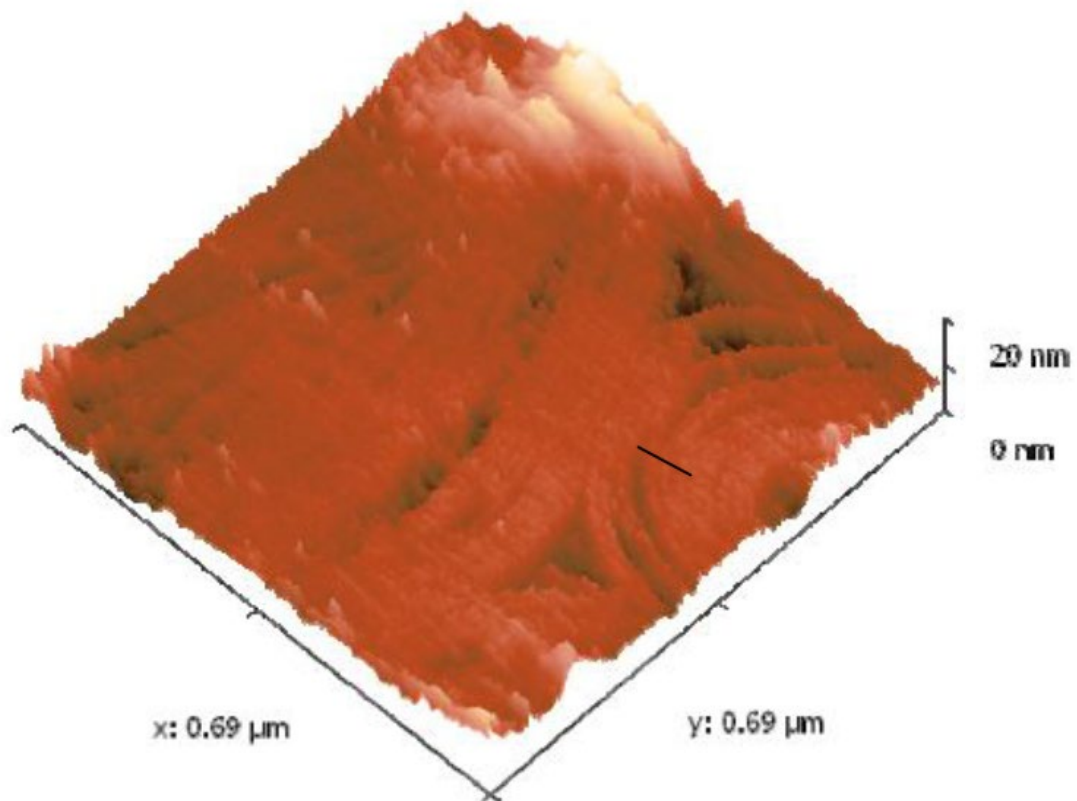


Figura 17. – Imagem no MFA de fagos Pfl e citocromo C. (Retirado de Nunes, 2011)

O Pfl apresenta-se como um polieletrólito semi-flexível e é utilizado para estudar transições para o estado de cristais líquidos (estado híbrido) e também na condensação de

contra-íões em agrupamentos. Contra-íões são íões com carga oposta às dos outros íões presentes na mesma solução. Em solução com contra-íões multivalentes, os polieletrólitos assumem a estrutura de uma rede. Quando a concentração de polieletrólitos é sobejamente superior à dos contra-íões em solução, gelificam.

Em 2011, verificou-se que os Pfl formam géis viscoelásticos com concentrações relativamente inferiores à exigida para o agrupamento filamentoso, devido ao comprimento bastante superior em relação a outros filamentos e por ostentarem uma estrutura semi-flexível.

Na Figura 16 verificamos uma imagem no MFA de Pfl dispersos (a), depois uma imagem por microscopia luminosa de contraste de fase (b), numa escala dez vezes superior, onde não se observam Pfl e, após a adição de contra-íões Mg^{2+} , numa solução de 50 mM de $MgCl_2$, observou-se a formação de agrupamentos de Pfl, na mesma escala da imagem (c). (Huisman et al., 2011)

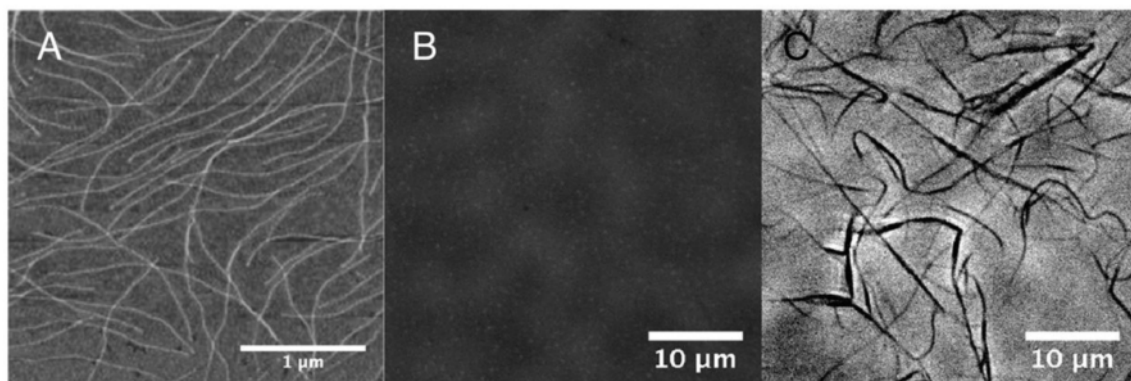


Figura 18. – Formação de agrupamentos de Pfl gelificados. (Retirado de Huisman et al., 2011)

2.1.4. Bacteriófago M13

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* e contém maioritariamente bacilos Gram-negativos que colonizam a flora humana, principalmente o trato intestinal. É responsável por infeções intestinais, meningites e infeções do trato urinário. Quando não desenvolvem mecanismos virulentos, são geralmente comensais no nosso organismo. (Weintraub, 2007)

Esta espécie é infectada por bacteriófagos filamentosos da classe Ff: f1, fd e M13. Esta classe mostrou especial interesse devido à sua característica auto-agregante, principalmente o bacteriófago M13, que é grandemente utilizado em variados estudos e apresenta inúmeras aplicações. (Khalil et al., 2007)

O bacteriófago M13 tem uma estrutura cilíndrica semi-flexível, apresenta 1 μm de comprimento e 8 nm de largura, é composto por cerca de 2700 proteínas que encapsulam de forma helicoidal o seu ADN. É negativamente carregado e auto-repulsivo. (Yoo et al., 2008)

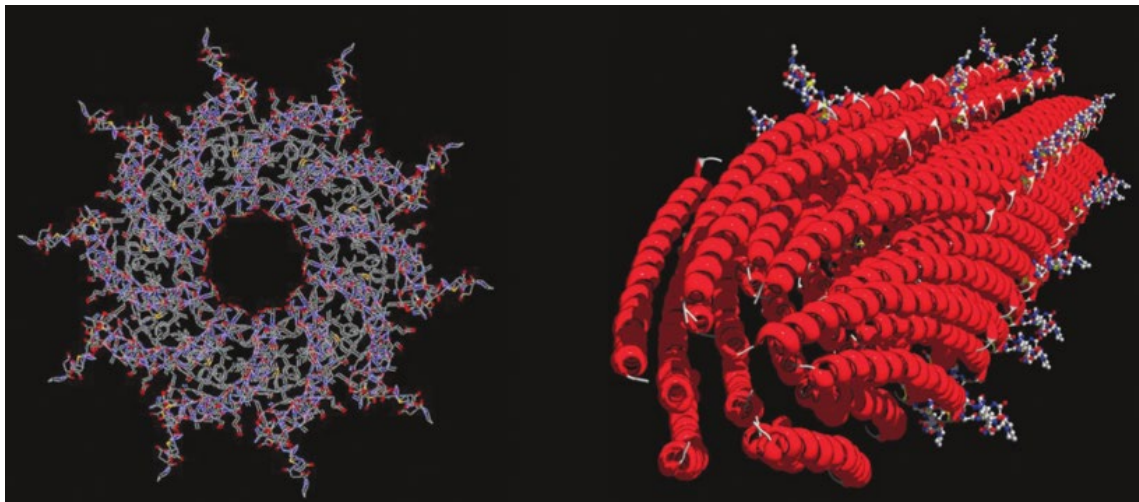


Figura 19. – Representação do bacteriófago M13. (Retirado de Finnigan et al., 2004)

O seu genoma codifica cinco proteínas: pVIII, a maior proteína presente na cápside, que encapsula o corpo do fago, com aproximadamente 2700 cópias, como já foi referido anteriormente; pIII e pVI, presentes numa das extremidades, ambas com cinco cópias cada; e pVII e pIX, também com cinco cópias cada, que figuram na extremidade oposta. (Hess et al., 2012)

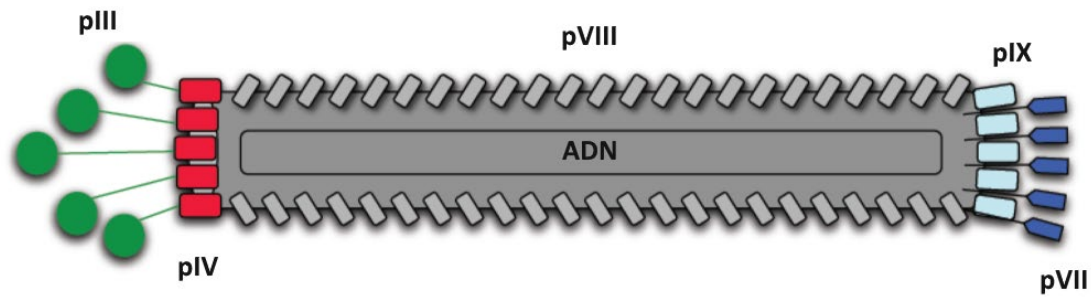


Figura 20. – Representação da composição proteica do bacteriófago M13. (Retirado de Hess et al., 2012)

Um estudo realizado em 2009 revelou que a infecção por parte destes bacteriófagos altera a rigidez da superfície da *E. coli*, mais propriamente as espécies masculinas desta bactéria, que expressam os *pili* ou fimbrias.

Estas alterações foram captadas através do MFA, em meio seco e líquido, onde as bactérias foram lavadas em água desionizada e depositadas em mica acabada de clivar. Concluiu-se que as *E. coli* infetadas por M13 libertam para o exterior da membrana celular lipopolissacarídeos (LPS), que funcionam como uma barreira nas bactérias Gram-negativas, localizadas na parte exterior da membrana celular das mesmas.

Assim que estas estruturas são lesadas e libertadas, a célula torna-se mais frágil e cresce a um ritmo mais lento, em comparação com as bactérias não infetadas.

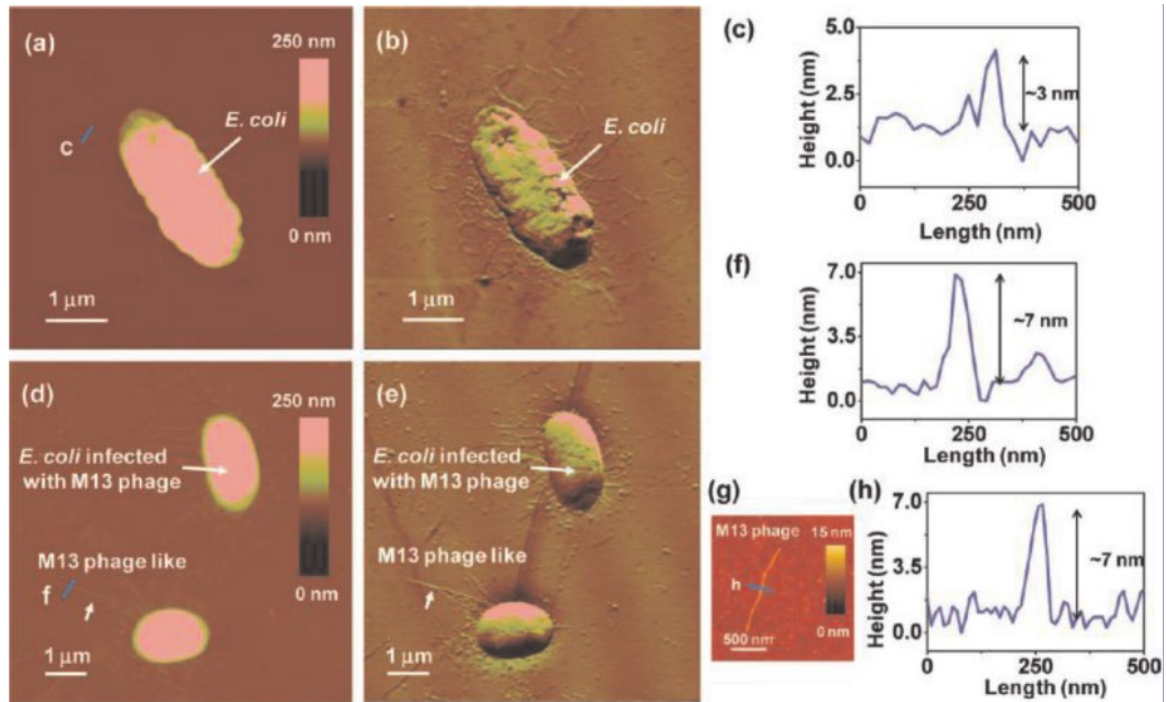


Figura 21. – Imagens da interação do M13 com a *E. coli* em meio seco. (Retirado de Chen, Wu, Hsu, Peng, & Chang, 2009)

Analisando a figura acima, as imagens (a) e (b) e o gráfico (c) correspondem à bactéria não infectada. As imagens (d) e (e) e o gráfico (f) correspondem à bactéria infectada por M13. A imagem (g) corresponde ao fago M13 e o gráfico (h) representa a altura do fago.

Este fenômeno, a alteração a superfície da membrana da *E. coli* após infecção por M13, também pode ser verificado na Figura 20, onde, em meio aquoso, foi adicionado poli-L-lisina (PLL) à superfície de mica, para conferir aderência às células bacterianas.

Obtiveram-se imagens de *E. coli* não infectada, *E. coli* infectada por M13 e *E. coli* tratada com EDTA (*ethylenediamine tetraacetate* ou ácido etilenodiamino tetra-acético), que também levam à liberação de LPS. (Chen et al., 2009)

Examinando a Figura 20, a imagem (a) corresponde às bactérias não infectadas, a imagem (b) mostra as bactérias infectadas com M13 e a imagem (c) representa as bactérias tratadas com EDTA. As imagens (d), (e) e (f) são as respectivas visualizações no MFA de Alta Resolução (MFA-AR).

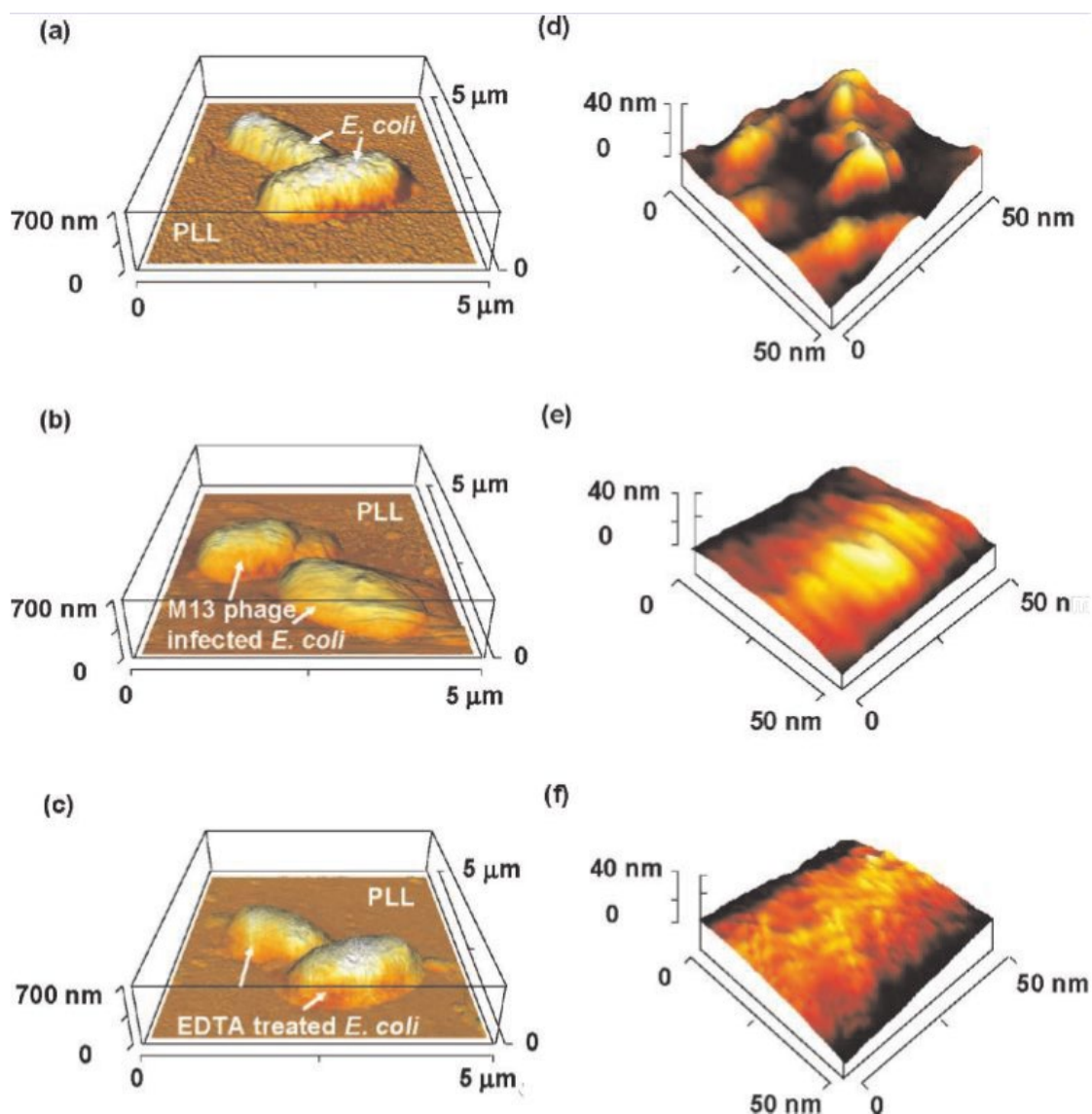


Figura 22. – Interação de M13 com *E. coli* no MFA e no MFA de Alta Resolução. (Retirado de Chen et al., 2009)

Em variadas aplicações, este bacteriófago é utilizado como estrutura para criar dispositivos, ao nível nanométrico, como baterias, dispositivos que utilizam energia solar, transístores - aparelhos que gerem, modulam, ampliam e detetam oscilações energéticas - e díodos - retificadores de corrente. Este facto deve-se à possibilidade de configuração das proteínas da sua cápside para vincular e ligar os mais variados materiais. (Belcher, Guimaraes, et al., 2014)

O M13 também é aplicado como estabilizador, potenciador e condutor de energia em estruturas híbridas de armazenamento de energia. Através da criação de um complexo

entre o M13 e uma matriz de grafeno, forma cristalina do carbono, obtêm-se redes hexagonais bastantes flexíveis e ótimas condutoras de energia. As folhas de grafeno de folha única têm sido utilizadas em nanotecnologia, graças às suas propriedades elétricas, quânticas, óticas e mecânicas. Este complexo comprovou que o M13 é uma excelente ferramenta biológica para aumentar o rendimento de baterias e dispositivos eletrônicos.

Um estudo realizado em 2009 demonstrou que o complexo M13/grafeno funciona como estrutura condutora de energia com elevado rendimento. Alterando geneticamente o ADN do vírus, conseguem expressar-se sequências peptídicas para ampliar a interação com materiais de interesse.

Nesse sentido, selecionou-se a proteína VIII do M13 para amplificar a interação entre o grafeno e o vírus, de modo que todas as partículas modeladas no vírus comunicassem fisicamente com o grafeno.

Para testar a estabilidade do complexo em estudo, adicionou-se nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), material de conveniência para as baterias de íons de lítio, a pH 3. A estabilidade deste complexo foi mantida até 24 horas após a adição de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$.

A observação dos complexos estabilizados é possível através do MFA, comprovando mais uma aplicação deste bacteriófago. (Oh, D., Dang, X., et al., 2009)

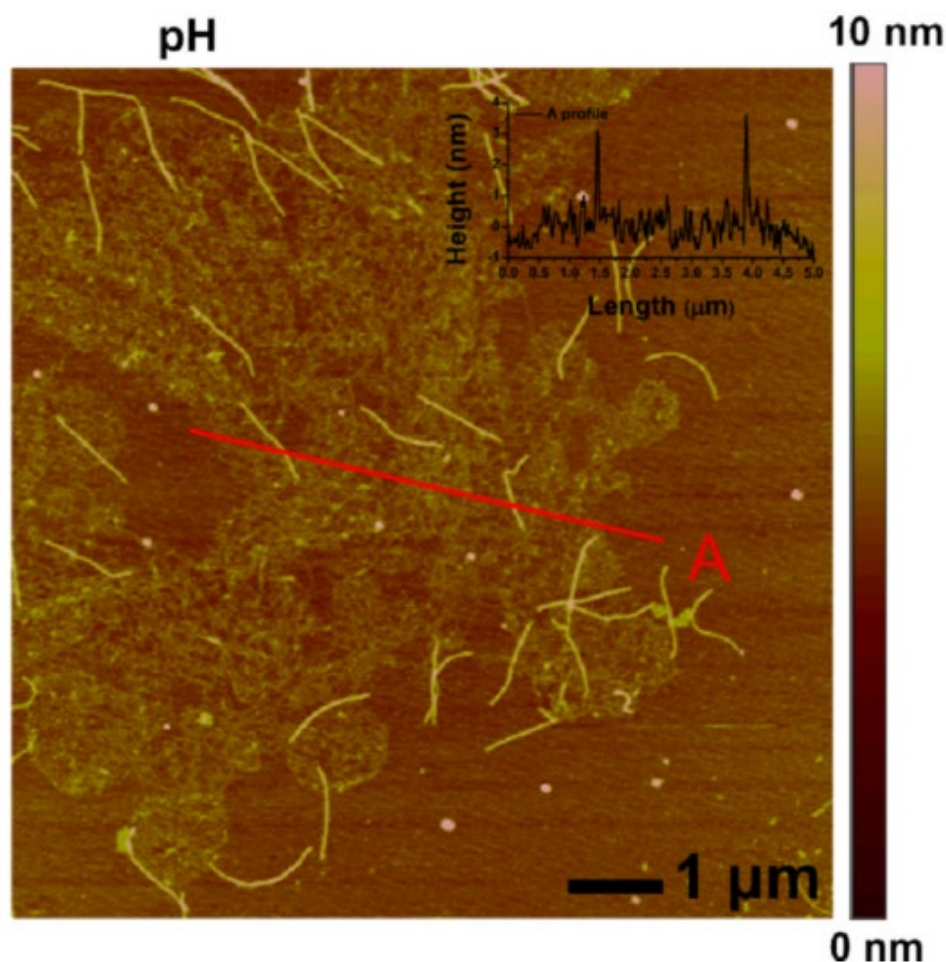


Figura 23. – Imagem no MFA do complexo M13/grafeno estabilizado. (Retirado de Oh, D., Dang, X., et al., 2009)

Depois das conclusões retiradas e do sucesso do estudo executado, pensou-se em inovar e sugerir o desenvolvimento e caracterização de uma microbateria, através de uma técnica em camadas de material biológico e não biológico, sobrepostas e prensadas num único eletrodo. Em 2008, com a adição de nucleótidos ao genoma de M13, permitiu-se a expressão de grupos funcionais nas proteínas da cápside do fago com afinidade para íons de cobalto. Esta técnica possibilitou o desenvolvimento de filamentos de óxido de cobalto (Co_3O_4), que se revelaram como excelentes baterias, em relação aos usuais eletrodos de carbono empregados nas baterias de íons de lítio.

Para tal, foi desenhada uma microbateria que sobrepõe uma camada de filamentos de M13/ Co_3O_4 , posicionadas em camadas de polieletrólitos prensadas numa microbanda de platina (Pt).

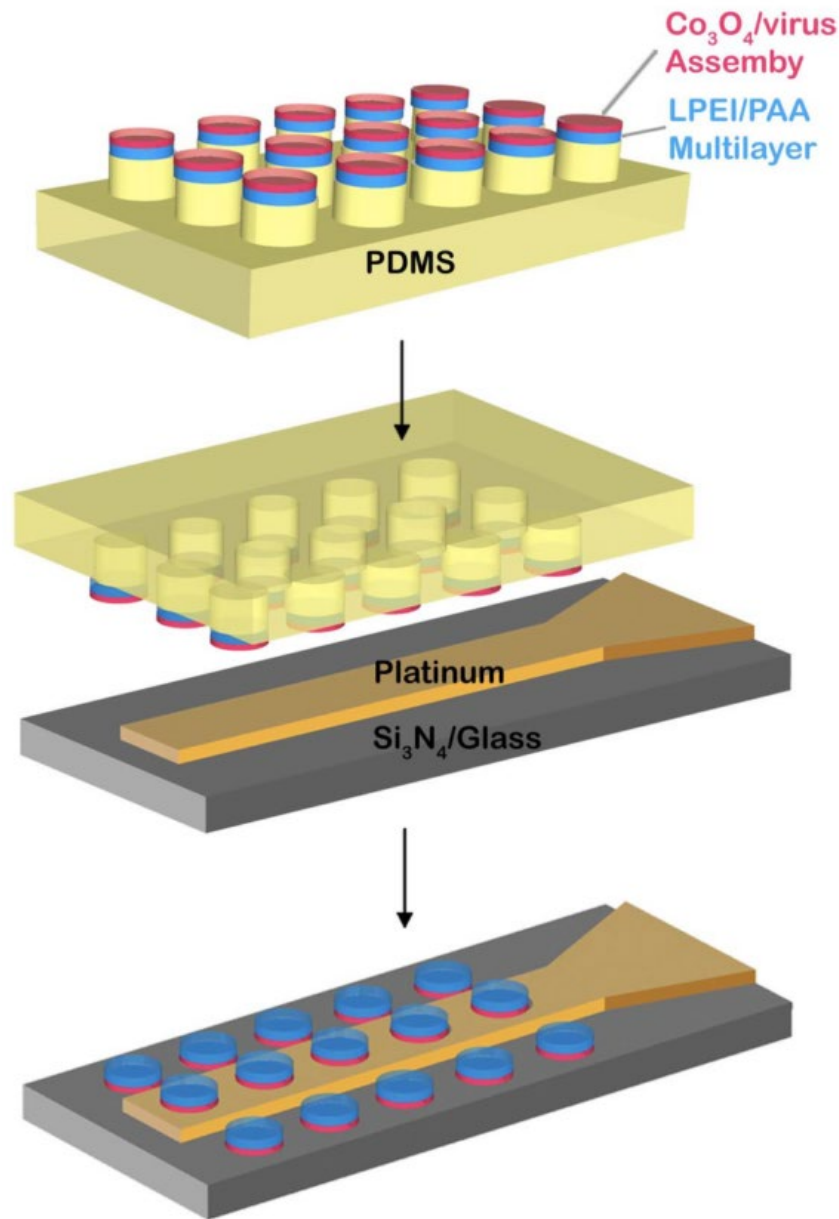


Figura 24. – Esquema da produção da microbateria de M13/Co₃O₄. (Retirado de Nam et al., 2008)

Desenvolveu-se uma camada de dimetil polissiloxano (PDMS) tratado termicamente, num padrão fotorresistente. De seguida, depositou-se polietilenamina linear (LPEI) como bloco catiónico e ácido poliacrílico (PAA), bloco aniónico, como polímero recarregado. Foi então adicionado uma solução de M13 geneticamente modificado, que teria sido amplificado numa cultura de *E. coli*, na solução de óxido de cobalto, formando os filamentos. Esta estrutura foi prensada numa superfície de nitreto de silício (Si₃N₄),

material cerâmico altamente resistente a nível térmico e mecânico, juntamente com uma microbanda de platina, tratada com gás ionizado de plasma, para favorecer o transporte de elétrons. Por fim, enxaguou-se com água.

Observou-se através do MFA imagens dos elétrodos antes da transferência da corrente elétrica (A), imagens do M13 antes do crescimento dos filamentos de óxido de cobalto (B) e, por fim, imagens do crescimento dos filamentos de óxido de cobalto.

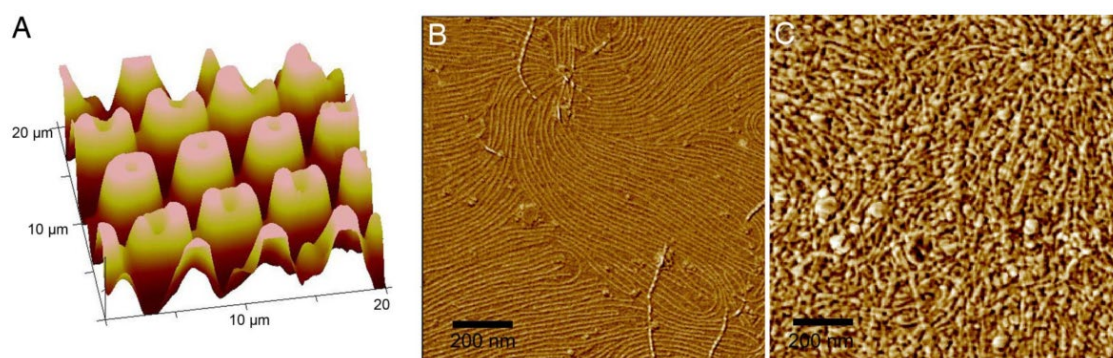


Figura 25. – Elétrodos da microbateria de M13/Co₃O₄ numa prensa de PDMS. (Retirado de Nam et al., 2008)

Neste estudo explica-se que a sobreposição em camadas de polímeros, vírus e material não biológico pode dar origem a microbaterias com maior armazenamento e rendimento, numa estrutura bastante mais pequena que as baterias atualmente utilizadas, abrindo assim a porta para o desenvolvimento de novas baterias, com materiais mais rígidos ou flexíveis, obtendo-se dispositivos mais fiáveis e estáveis. É, sem dúvida, um marco importante na projeção de novos dispositivos eletrónicos, utilizando material orgânico e também um marco relevante na nanotecnologia. (Nam et al., 2008)

2.2. Proteínas

As proteínas são biomoléculas essenciais para a vida e são os compostos orgânicos mais fartos, não existindo nenhum mecanismo biológico que prescindia destas estruturas. Desempenhando variadíssimas tarefas, atuam como hormonas, anticorpos, enzimas, recetores celulares, transportadores proteicos, entre outros.

Executam funções de transporte, regulação, estrutura, movimento, catálise e sinalização. Por cumprirem tantos cargos e serem tão abundantes, representam cerca de 50% do peso seco dos tecidos, nos animais superiores.

São compostas por carbono, oxigénio, hidrogénio, enxofre e azoto, sendo este último o mais abundante, apresentado aproximadamente 16% da massa total da molécula.

Ao conjunto de proteínas de um organismo dá-se o nome de proteoma, sendo que o proteoma do humano compreende 32000 proteínas diferentes. (Nelson, D., and Cox, 2015)

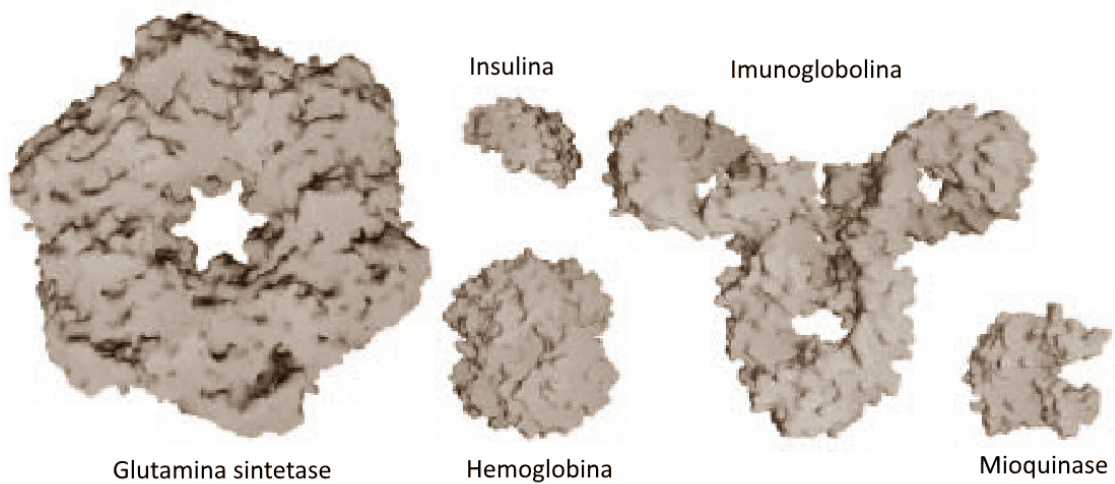


Figura 26. – Representações de algumas proteínas. (Adaptado de Lodish, H., Berk, A., et al, 2003)

2.2.1. Biologia estrutural das proteínas

As proteínas são macromoléculas constituídas pela polimerização de apenas 20 aminoácidos em cadeias lineares, que depois formam estruturas singulares, estabilizadas por ligações não-covalentes.

Podem ser classificadas em dois grandes grupos: proteínas globulares e fibrosas. Como os nomes indicam, as proteínas globulares formam complexos esféricos ou elipsoides, executam variadas funções e são hidrossolúveis, enquanto as proteínas fibrosas, ao ordenarem-se paralelamente, formam fibras ou lâminas, são pouco solúveis em água e formam estruturas de sustentação. (Nelson, D., and Cox, 2015)

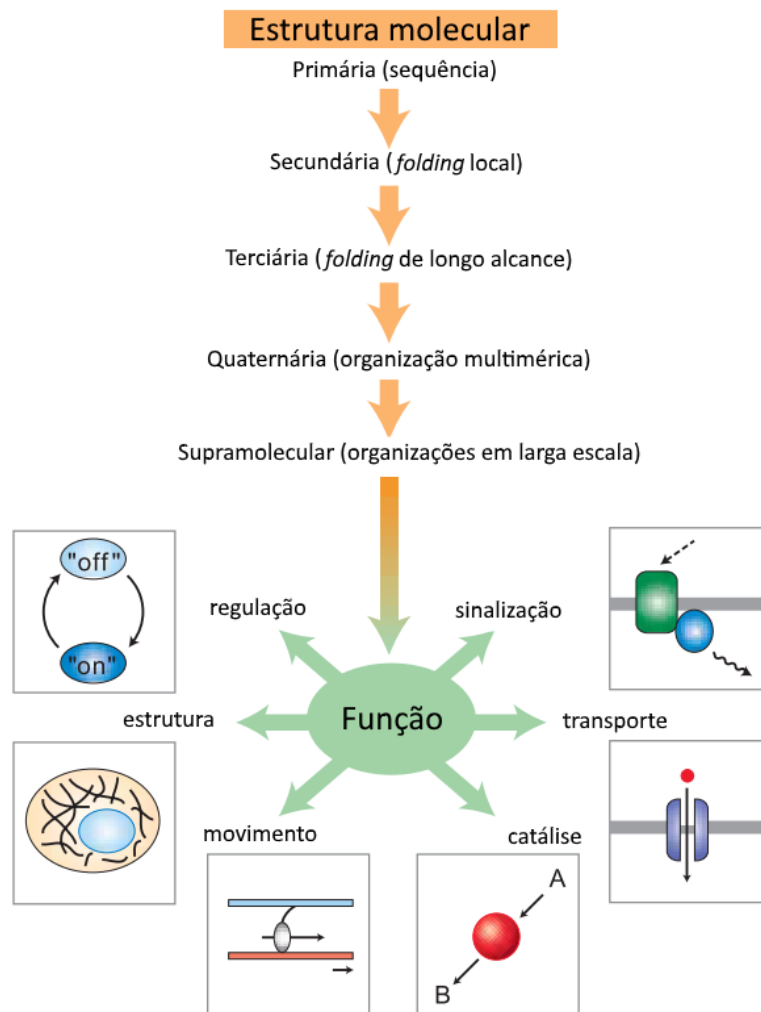


Figura 27. – Esquema resumido da estrutura e funções das proteínas. (Adaptado de Lodish, H., Berk, A., et al., 2003)

Sendo bastante complexa, a estrutura das proteínas é dividida em quatro tipos de estrutura: primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária compreende o número e identidade dos aminoácidos que constituem a molécula e sequenciamento e disposição dos mesmos na cadeia. Esta associação apenas consente a conjugação de estruturas simples e não a sua ramificação em estruturas mais complexas.

A estrutura secundária vai ganhando forma ao passo que o comprimento das cadeias peptídicas vai progredindo e, tendo em conta as circunstâncias físico-químicas do meio envolvente, esta vai acertando-se regularmente e repetitivamente no espaço, mediada por ligações de pontes de hidrogénio.

Assim podem formar-se dois tipos de subestruturas: as hélices- α (alfa), que devido aos múltiplos centros polares, a sua estrutura vai enrolar-se e tomar a forma de uma hélice, estabilizada através da criação de ligações intramoleculares, graças às pontes de hidrogénio, e as folhas- β (beta), que, através da formação de alinhamentos paralelos, atingem a estabilidade, também mediadas pelas ligações intramoleculares compostas pelas pontes de hidrogénio.

A estrutura terciária, onde figura a generalidade das proteínas globulares, surge da junção das hélices- α e das folhas- β , formando uma estrutura tridimensional no seu todo, graças às forças de Van der Waals, forças de atração e repulsão, pontes de dissulfureto, que residem entre os resíduos de aminoácidos e, mais uma vez, às pontes de hidrogénio.

Por fim, as estruturas quaternárias compreendem-se como composições oligoméricas, ou seja, apresentam-se como estruturas com um número finito de monómeros, moléculas isoladas, mas entrelaçadas em estrutura terciária. Aludem à disposição espacial de duas ou mais cadeia peptídicas e às ligações que estabelecem entre si, isto é, atrações eletrostáticas, pontes de dissulfureto e pontes de hidrogénio entre cisteínas (um dos 20 aminoácidos codificados pelo genoma) de cadeias diferentes. (Lodish, H., Berk, A., et al., 2003)

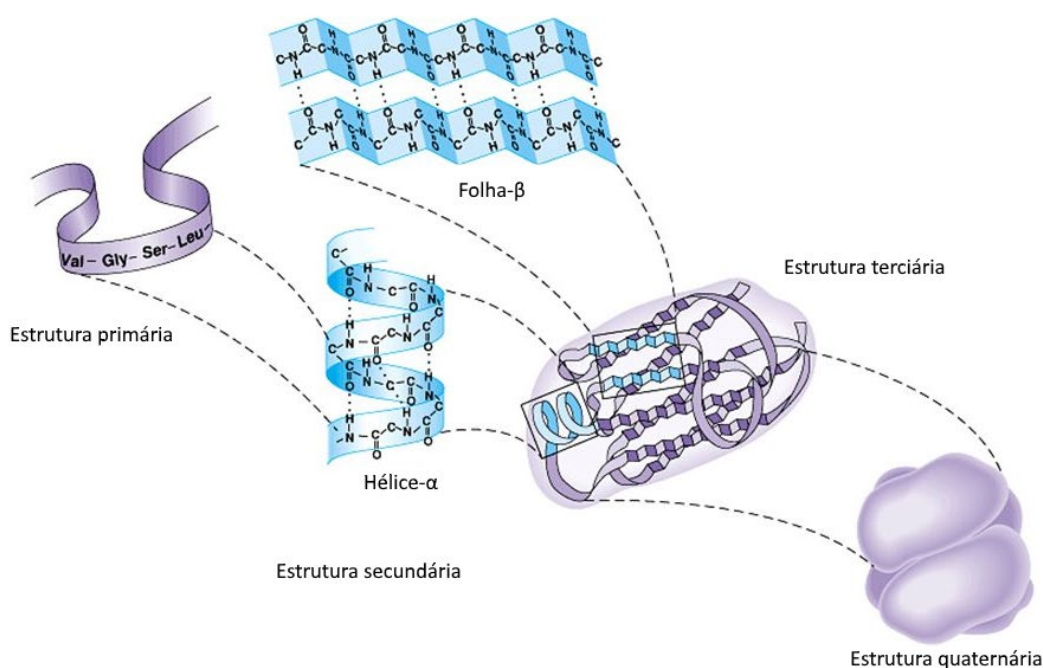


Figura 28. – Esquematização da hierarquia estrutural das proteínas. (Adaptado de http://images.slideplayer.com/18/6109416/slides/slide_23.jpg)

A microscopia de força atômica tem a capacidade de estudar as propriedades biomoleculares das proteínas. Particularmente, a determinação das suas características estequiométricas, ou seja, a sua proporção e relação com outras estruturas moleculares, propriedades físico-químicas, propriedades funcionais e atividade enzimática. (Pleshakova, T. et al. 2018)

2.2.2. Fibras de actina

O citosol, ou matriz citoplasmática, entende-se como o espaço líquido interior que preenche as células eucariotas e é composto por três tipos de filamentos: os filamentos, ou fibras de actina, que são estruturas assemelhadas a um conjunto de dois cordões entrelaçados, com um diâmetro que ronda os 8-9 nm; os microtúbulos, com um diâmetro perto dos 24 nm, semelhantes a uma espécie de tubos ocos; e os filamentos intermédios, com um diâmetro de 10 nm, que apresentam uma forma encordoada. Apresentam, no geral, funções de suporte estrutural e motilidade, formando o citoesqueleto da célula eucariota. (Lodish, H., Berk, A., et al., 2003)

A actina e a miosina, as maiores proteínas constituintes do músculo, geram a força contrátil, característica do mesmo e, em conjunto, contabilizam 80% da sua composição total. A fibra de actina (F-actina) é composta por monómeros G-actina, que se polimerizam aos pares, conferindo o aspeto de dois filamentos que giram entre si. (Nelson, D., and Cox, 2015)

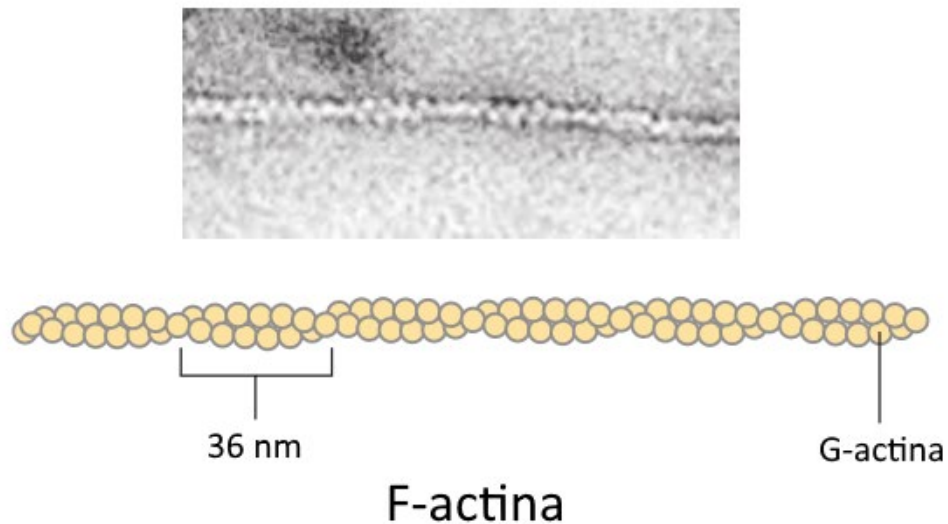


Figura 29. – Imagem no microscópio eletrónico e respetivo modelo da F-actina. (Adaptado de Nelson, D., and Cox, 2015)

Sendo que o MFA serve como apoio para estudar a morfologia das células, em 2015 realizou-se uma análise dos componentes do citoesqueleto celular. Utilizou-se uma amostra de culturas primárias de células epiteliais do prepúcio humano num MFA em modo de contacto.

Utilizou-se o detergente não iónico Triton X-100, que é capaz de extrair os componentes celulares que permitem a visualização do citoesqueleto da célula. Esta técnica permite realizar a observação sem corar, destruir ou deteriorar a mesma. O citoesqueleto foi observado em meio líquido e seco.

A Figura 25 exhibe quatro imagens, onde as primeiras três, (a), (b) e (c) mostram fibras de actina que circundam o núcleo (área $77 \times 77 \mu\text{m}^2$) e (d) que indica uma fibra de actina ao pormenor (área $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}^2$). (Berdyeva, Woodworth, & Sokolov, 2005)

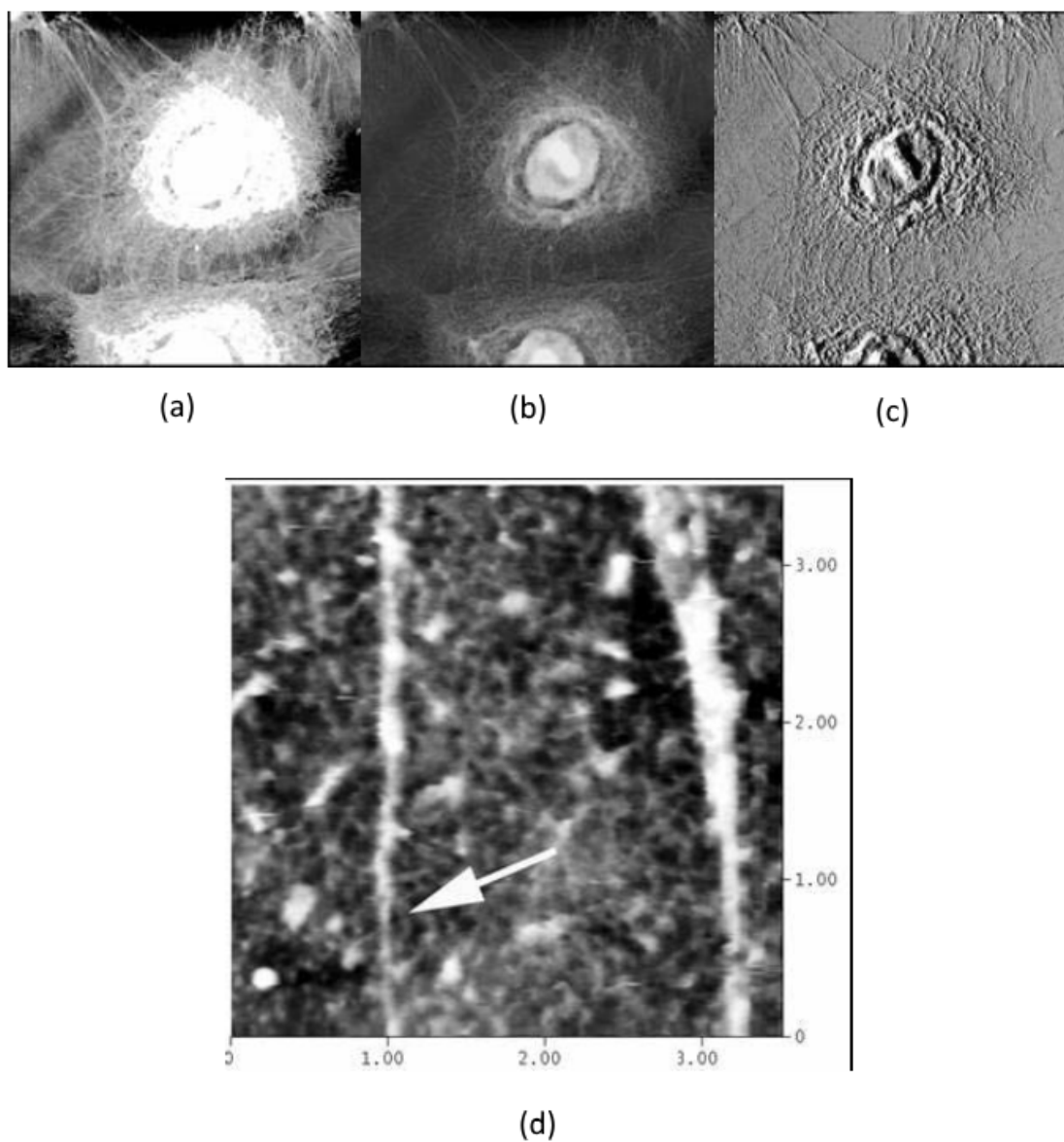


Figura 30. – Imagens de fibras de actina no MFA em modo de contacto. (Retirado de Berdyeva et al., 2005)

Através do MFA foi possível visualizar pela primeira vez os cones de crescimento neuronal, estruturas extremamente móveis localizadas na zona terminal dos axónios na formação do sistema nervoso, ricas em fibras de actina.

Cultivando células neurais de *Aplysia* (lesma do mar) conseguiram obter-se imagens dos cones de crescimento neural, visualizando-se várias estruturas altamente ricas em fibras

de actina, como os lamelipódios, malhas de actina aleatoriamente orientadas, filopódios, feixes agrupados de actina, que correspondem às terminações livres dos lamelipódios. O conjunto destes componentes forma o domínio P.

Existe também o domínio C, local onde convergem os microtúbulos e se ramificam os lamelipódios e os filopódios, e a zona T, composta por arcos de transversais de actina, zona esta que circunda o domínio C.

As imagens do MFA foram realizadas no modo de contacto, MFA-MC (*Contact Mode Atomic Force Microscope* - CM-AFM) e no modo dinâmico, MFA-MD (*Dynamic Mode Atomic Force Microscope* - DM-AFM).

Na Figura 29 verificamos a visualização no MFA-MC (A, B e C) e no MFA-MD (D, E e F). As linhas coloridas seccionam a altura das estruturas das imagens obtidas em A e D, que são representadas respetivamente nos gráficos B e E. C e F exibem as reconstruções tridimensionais das amostras conseguidas pelo MFA. (Xiong, Lee, et al., 2009)

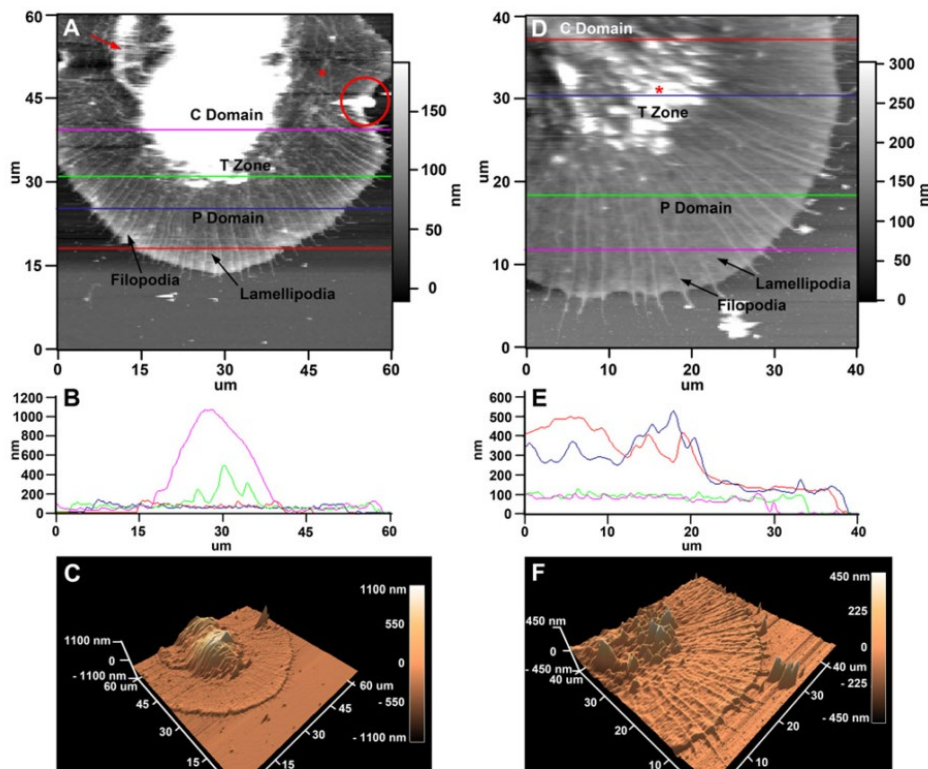


Figura 31. – Topografia de baixa resolução dos cones de crescimento neural de *Aplysia* no MFA-MC e no MFA-MD. (Retirado de Xiong, Lee, et al., 2009)

É igualmente exequível a observação no MFA de fibras de actina através de um procedimento alicerçado na foto-imobilização, com o objetivo de deslindar o comportamento dos feixes de F-actina em função da concentração do catião divalente Mg^{2+} , expondo manifestações de uma estrutura entrançada dos feixes analisados, num alinhamento hexagonal distorcido.

Neste estudo realizado em 2007, fez-se a extração das fibras de F-actina do tecido músculo-esquelético de ratinhos. Após a preparação das soluções contendo F-actina e Mg^{2+} , estas foram misturadas e colocadas numa superfície de vidro embebida com um polímero fotossensível contendo um grupo difenildiazeno (azo-polímero), obtido através de radicais livres. O azo-polímero foi submetido a secagem por LED azul. Depois de um processo de enxaguamento, a amostra foi examinada por MFA.

Atentando à Figura 30 observamos um esquema da técnica de preparação das amostras, uma imagem de F-actina e o respetivo gráfico, cujas variações cíclicas representam monómeros de G-actina. (Ikawa et al., 2007)

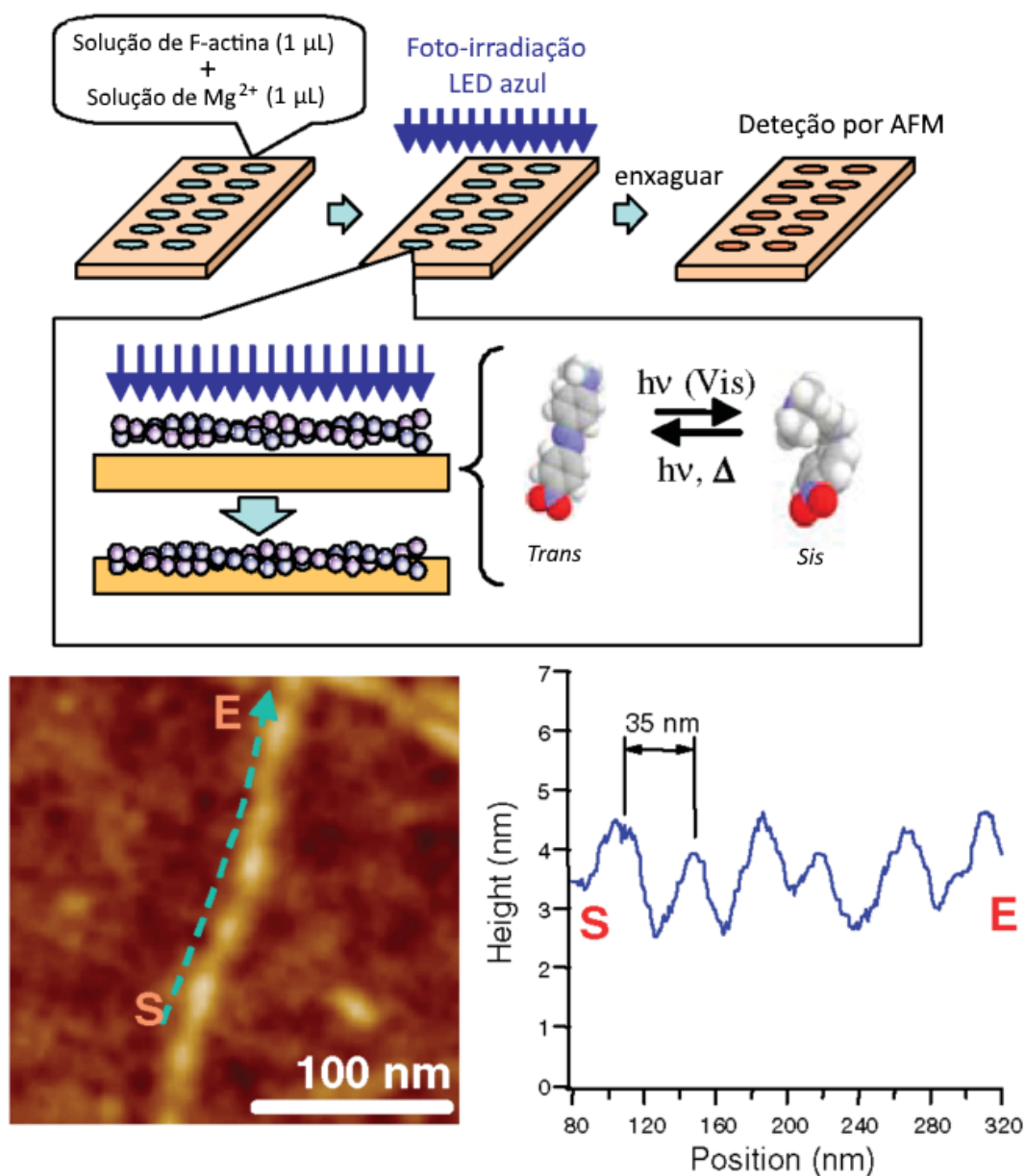


Figura 32. – Foto-imobilização de F-actina e imagem no MFA. (Adaptado de Ikawa et al., 2007)

3. Conclusão

O microscópio de força atômica é, sem dúvida, um dispositivo fascinante que veio revolucionar a microscopia em geral. Com o seu engenho e modo de operação singulares, faculty imagens tridimensionais com alta precisão e resolução.

Embora apresente algumas limitações, como a falta de exatidão da resolução na captação de imagens ao nível atômico, a problemática da interação ponta da sonda/superfície da amostra, que pode ficar danificada ao mapear a amostra, ou mesmo danificar a amostra em si, as contaminações dos meios e das próprias amostras, a tecnologia vai avançando no sentido de as corrigir e até de introduzir novas propriedades e vantagens. A criação de algoritmos é algo interessante para apostar, de modo a ultrapassar alguns dos erros que surgem na captura da topografia das imagens. Embora seja um processo complexo, pode resultar numa esperança, na senda da obtenção de melhores imagens, com mais resolução, definição e nitidez.

Melhorando a capacidade de varrimento e contacto da sonda, oscilações que causam imagens “tremidas”, episódios de ressonância, interações aparelho/amostra e questões relacionadas com a reflexão e resolução, será, ainda mais, um aparelho de eleição na visualização de partículas à escala atômica.

A captura de processos biológicos, como a dinâmica de conformação de proteínas, observação de processos enzimáticos e a interação de vírus nos respetivos hospedeiros, apresenta imensas aplicações em variadíssimos ramos e é já capaz de acompanhar reações e processos biomoleculares invisíveis a olho nu, a alta resolução espacial e temporal, que ocorrem em escala nanométrica e na ordem dos microssegundos, em tempo real.

As estruturas virais e proteicas referidas durante o trabalho apresentam aplicações que estão a transformar o mundo como o conhecemos e os dispositivos que estamos afeitos a utilizar, marcando a chegada da era da nanotecnologia e da possibilidade de aliar matéria orgânica a matéria não orgânica, permitindo o desenvolvimento de dispositivos mais pequenos e rentáveis, que poderão modificar, de forma tremenda, as tecnologias às quais estamos acostumados.

Estas são indicações que nos permitem validar que é uma ferramenta essencial para a monitorização, visualização e caracterização de tudo o que mais é pequeno que aquilo

que nosso olho pode vislumbrar. Certamente trata-se de uma técnica que permitirá estudar sistemas biológicos complexos e tornar-se-á indispensável para as ciências da vida.

4. Bibliografia

- Anderson, G. G. (2012). *Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation in the CF Lung and Its Implications for Therapy. Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research*, <http://www.intechopen.com/books/cystic-fibrosis-re>.
- Ando, T. (2013). High-speed atomic force microscopy. *Microscopy (Oxford, England)*, 62(1), 81–93. <http://doi.org/10.1093/jmicro/dfs093>
- Ando, T., Uchihashi, T., & Kodera, N. (2013). High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annual Review of Biophysics*, 42, 393–414. <http://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130324>
- Aznar, M. (2013). Coarse-Grained Modeling of the Assembly and Mechanical Properties of Viruses.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235–241.
- Belcher, A. M., Guimaraes, C. P., Spooner, E., Ploegh, H. L., & Hess, G. T. (2014). Orthogonal labeling of M13 minor capsid proteins with DNA to self-assemble end-to-end multi-phage structures, 2(9), 490–496. <http://doi.org/10.1021/sb400019s>. Orthogonal
- Berdyeva, T., Woodworth, C. D., & Sokolov, I. (2005). Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope. *Ultramicroscopy*, 102, 189–198. <http://doi.org/10.1016/j.ultramic.2004.09.008>
- Binnig, G., & Quate, C. F. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930–933. <http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Bucki, R., Niemirowicz, K., Wnorowska, U., Marzena, W., Byfield, F. J., Cruz, K., ... Janmey, P. A. (2015). Polyelectrolyte-mediated increase of biofilm mass formation, 1–10. <http://doi.org/10.1186/s12866-015-0457-x>
- Bullen, R. A. W. and H. A. (2006). Basic Theory - Atomic Force Microscopy (AFM). *Energy*, 67(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386001-9.00002-7>

- Chen, Y., Wu, C., Hsu, J., Peng, H., & Chang, H. (2009). Surface Rigidity Change of *Escherichia coli* after Filamentous Bacteriophage Infection, 25(24), 4607–4614. <http://doi.org/10.1021/la8036346>
- Custance, O., Perez, R., & Morita, S. (2009). Atomic force microscopy as a tool for atom manipulation. *Nature Nanotechnology*, 4(12), 803–810. <http://doi.org/10.1038/nnano.2009.347>
- Dufrêne, Y. F. (2004). Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(June), 451–460. <http://doi.org/10.1038/nrmicro905>
- Eaton, P., & West, P. (2010). Atomic Force Microscopy. *Oxford University Press*, 257. <http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199570454.001.0001>
- Finnigan, T. D., Luther, D. S., Lukas, R., Ocean-, J. P., Mao, C., Solis, D. J., ... Belcher, A. M. (2004). Virus-Based Toolkit for the Directed Synthesis of Magnetic and Semiconducting Nanowires, 303(January), 213–217.
- Frewin, C. L. (2012). *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein*. <http://doi.org/10.5772/2092>
- Giocondo et al., M. (2012). Atomic Force Spectroscopies : A Toolbox for Probing the Biological Matter. *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein*, 3–29.
- Glatzel, T., Hölscher, H., Schimmel, T., Baykara, M. Z., Schwarz, U. D., & Garcia, R. (2012). Advanced atomic force microscopy techniques. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 3, 893–894. <http://doi.org/10.3762/bjnano.3.99>
- Hartmann, U. . (1997). An Elementary Introduction to Atomic Force Microscopy and Related Methods. *Microscopy*. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/17/14/015>
- Haugstad, G. (2012). Overview of Atomic Force Microscopy. *Small*, 1–18.
- Hess, G. T., Cragolini, J. J., Popp, M. W., Allen, M. a., Dougan, S. K., Spooner, E., ... Guimaraes, C. P. (2012). M13 bacteriophage display framework that allows sortase-mediated modification of surface-accessible phage proteins. *Bioconjugate Chemistry*, 23, 1478–1487. <http://doi.org/10.1021/bc300130z>

- Huisman, E., Wen, Q., Wang, Y., Cruz, K., Kitenbergs, G., Eglis, K., ... Janmey, P. A. (2011). Gelation of semiflexible polyelectrolytes by multivalent counterions. *Soft Matter*, 7(16), 7257–7261. <http://doi.org/10.1039/C1SM05553D.Gelation>
- Ikawa, T., Hoshino, F., Watanabe, O., Li, Y., Pincus, P., & Safinya, C. (2007). Molecular Scale Imaging of F-Actin Assemblies Immobilized on a Photopolymer Surface. *Physical Review Letters*, 98(1), 18101. <http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.018101>
- Khalil, A. S., Ferrer, J. M., Brau, R. R., Kottmann, S. T., Noren, C. J., Lang, M. J., & Belcher, A. M. (2007). Single M13 bacteriophage tethering and stretching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 4892–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0605727104>
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carsten, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Inc.* <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Kurtb, I. (2012). *Bacteriophages*. <http://doi.org/10.5772/1065>
- Larsson, D. (2012). *Exploring the molecular dynamics of proteins and viruses*.
- LeBlanc, S. et al. (2018). Using Atomic Force Microscopy to Characterize the Conformational Properties of Proteins and Protein–DNA Complexes That Carry Out DNA Repair. *HHS Pub lic Access*.
- Liu, D. J., & Day, L. A. (1994). *Pfl virus structure: helical coat protein and DNA with paraxial phosphates*. *Science*, 265(5172), 671–674. <http://doi.org/10.1126/science.8036516>
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Ktieger, M., Scott, M., Zipursky, L., Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology* (5th Editio).
- Lorieau, J. L., Day, L. A., & Mcdermott, A. E. (2008). Conformational dynamics of an intact virus : Order parameters for the coat protein of Pfl bacteriophage, 105(30), 1–6.

- Nam, K. T., Wartena, R., Yoo, P. J., Liao, F. W., Lee, Y. J., Chiang, Y.-M., ... Belcher, A. M. (2008). Stamped microbattery electrodes based on self-assembled M13 viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17227–31. <http://doi.org/10.1073/pnas.0711620105>
- Nelson, D., and Cox, M. (2015). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Editio). <http://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>
- Nunes, P. (2011). *Dynamic and Interaction of Cytochrome c with Pfl Virus*, 1–57.
- Oh, D., Dang, X., Yi, H., Allen, M., Xu, K., Lee, Y., Belcher, A. (2009). *Graphene sheets stabilized on genetically engineered M13 viral templates as conducting frameworks for hybrid energy storage materials*. *Omega*, 58. <http://doi.org/10.2190/OM.58.2.b>.Six-Year
- Oncins, G., & Díaz-Marcos, J. (2012). Atomic Force Microscopy: probing the Nanoworld. *Handbook of Instrumental Techniques from CCIUTUB*. Retrieved from <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/32162/1/MT07> - Atomic Force Microscopy_ed2.pdf
- Owais, A. (2020). *Driving Forces for Wetting and Adsorption on Functional Surfaces*. Faculty of Science, School of Chemistry, University of Sydney.
- Perez, J. W. (2010). The design and characterization of DNA-based viral diagnosis.
- Pleshakova, T., Bukharina, N., Archakov, A., Ivanov, Y. (2018). *Atomic Force Microscopy for Protein Detection and Their Physicochemical Characterization*. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D., & Russel, M. (2011). Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current Issues in Molecular Biology*, 13, 51–76. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000777>
- Ruska, H. (2011). Bacterio p h a g e tax o n o m y. *Microbiology Australia*, 6. Retrieved from <http://microbiology.publish.csiro.au/paper/MA11090>
- Sanchez, H., Suzuki, Y., Yokokawa, M., Takeyasu, K., & Wyman, C. (2011). Protein–

- DNA interactions in high speed AFM: single molecule diffusion analysis of human RAD54. *Integrative Biology*, 3, 1127. <http://doi.org/10.1039/c1ib00039j>
- Schmitz, R. (2005). AFM Atomic Force Microscopy Rasterkraftmikroskopie, 1–24.
- Secor, P. R., Sweere, J. M., Michaels, L. A., Malkovskiy, A. V., Lazzareschi, D., Katznelson, E., ... Bollyky, P. L. (2015). Filamentous bacteriophage promote biofilm assembly and function. *Cell Host and Microbe*, 18(5), 549–559.
- Sinha, K. X. (2014). Artifacts in AFM. Department of Physics and Astronomy, University of Nebraska-Lincoln, USA.
- <http://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.013>
- Sinha, K. X. (2014). Artifacts in AFM. Department of Physics and Astronomy, University of Nebraska-Lincoln, USA.
- Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), 130–133. <http://doi.org/10.4161/bact.20757>
- Uruma, T., Tsunemitsu, C., Terao, K., et al. (2019). Development of atomic force microscopy combined with scanning electron microscopy for investigating electronic devices. Obtido de AIP Publishing: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.5125163>
- Vahabi, S., Nazemi Salman, B., & Javanmard, A. (2013). Atomic force microscopy application in biological research: A review study. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(2), 76–83.
- Weintraub, A. (2007). Enteroaggregative Escherichia coli: Epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology*, 56(1), 4–8. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46930-0>
- Wommack, K. E., & Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 69–114. <http://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000>
- Xiong, Y., Lee, A. C., Suter, D. M., & Lee, G. U. (2009). Topography and nanomechanics of live neuronal growth cones analyzed by atomic force microscopy. *Biophysical*

Journal, 96(12), 5060–72. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.032>

Yoo, P. J., Zacharia, N. S., Doh, J., Nam, K. T., Belcher, A. M., & Hammond, P. T. (2008). Controlling surface mobility in interdiffusing polyelectrolyte multilayers, 2(3), 561–571. <http://doi.org/10.1021/nn700404y>

Young, R., Ward, J., & Scire, F. (1986). Measuring Surface Microtopography. *Young*, 214–218.

Zhou, J. C., Soto, C. M., Chen, M.-S., Bruckman, M. a, Moore, M. H., Barry, E., ... Confer, T. S. (2012). Biotemplating rod-like viruses for the synthesis of copper nanorods and nanowires. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), 18. <http://doi.org/10.1186/1477-3155-10-18>