



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

RUANA CARDOSO LIMA

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E NANOMECÂNICA
DO VÍRUS *SARS-CoV-2*

SÃO LUÍS

2022

RUANA CARDOSO LIMA

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E NANOMECÂNICA
DO VÍRUS SARS-CoV-2**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Física.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Magalhães Rebelo Alencar (UFMA)

Coorientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira (IEN/UEZO)

São Luís

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

CARDOSO-LIMA, Ruana.
ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E NANOMECÂNICA DO
VÍRUS SARS-CoV-2 / Ruana Cardoso Lima. – 2022.
75 f.

Orientadora: Luciana Magalhães Rebelo Alencar;
Dissertação - Mestrado em Física - Universidade Federal do Ma-
ranhão.

1. SARS-CoV-2. 2. Microscopia de Força Atômica. 3. Biofísica.
4. Virologia Física 5. Nanomecânica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ruana Cardoso Lima

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E NANOMECÂNICA DO
VÍRUS SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Física.

Aprovado em: 21 / 02 / 2022

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Magalhães Rebelo Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira (Coorientador)
Instituto de Energia Nuclear - IEN
Universidade Estadual da Zona Oeste - UEZO

Prof. Dr. Alan Silva de Menezes
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

São Luís

2022

DEDICATÓRIA

Trabalho dedicado à memória das mais de 600.000 vidas perdidas para a COVID-19 no Brasil e às outras mais de 5 milhões ao redor do mundo.

*Nothing in life is to be feared,
it is only to be understood.
Now is the time to understand more,
so that we may fear less.*

Marie Curie

AGRADECIMENTO

Agradeço o apoio e incentivo dos meus pais e família. Sem o suporte da minha mãe, dona Ruth, jamais teria conseguido. Aos meus irmãos por me verem com os olhos de quem admira. À minha vó, dona Ivanilde, por absolutamente tudo que sou. Vocês são minha motivação para buscar ir sempre além.

Agradeço à minha orientadora Luciana por todo suporte, ensinamento, gargalhada, puxão de orelha, inspiração, conselho, ombro-amigo. Pelas tantas e longas noites escrevendo artigo e tentando entender resultados tão desafiadores. Pra mim é uma honra ser tua aluna. Obrigada por acreditar e confiar em mim e principalmente no meu trabalho desde sempre.

Agradeço ao meu co-orientador Ralph que acreditou na grandeza deste trabalho mais até do que eu mesma. Obrigada pela oportunidade de aprender tanto contigo.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Biofísica e Nanossistemas pelos dias de luta e de alegria partilhados, pelo incentivo e pela ajuda. Aos meus parceiros de caminhada, Joel e Charles, que foram essenciais no suporte, companheirismo e troca nesses tempos tão desafiadores.

Agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória, tornando-a mais leve. Matheus, sem palavras para sua importância na minha vida durante esse período. Obrigada por não me deixar pirar, por entender minha paixão pela carreira e os sacrifícios que vem com ela, por me incentivar e torcer por mim em todos os momentos. Aos meus amigos Juliana, Alexia, Tereza, Ricardo e Thiago por serem alívio e fôlego quando eu mais precisava. Raquel, Dafne e Sarah por não desistirem de mim apesar da ausência. Jerdson, Jherfson, Josias e Rodolpho, amigos que o LEVI me deu e que permanecem como parte importante na minha caminhada dentro e fora da UFMA.

Agradeço à CAPES pelo financiamento da minha pesquisa. Ao Departamento de Física da Universidade Federal do Maranhão, ao Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, ao Laboratório de Nanorradiofarmácia da Universidade Estadual da Zona Oeste do Rio de Janeiro, ao Instituto de Engenharia Nuclear e à Fundação Oswaldo Cruz pela colaboração interinstitucional que possibilitou a realização deste estudo.

Por fim, agradeço à mim por ainda acreditar que é possível ser mais e fazer melhor.

RESUMO

A eclosão da síndrome respiratória aguda grave causada pelo coronavírus-2 (SARS-CoV-2) começou no final de 2019 e se espalhou pelo mundo, infectando milhões de pessoas, com mais de 5 milhões de mortes no planeta. Para combater o vírus, é necessário entender como funcionam as suas principais estruturas, principalmente as responsáveis pela patogenicidade da infecção viral. Entender, do ponto de vista físico, a estrutura e as propriedades do SARS-CoV-2 é extremamente importante para encontrar pontos vulneráveis que possam elucidar os mecanismos de direcionamento de medicamentos, por exemplo. A determinação da ultraestrutura e das propriedades nanomecânicas do SARS-CoV-2 pode classificar suas propriedades mecânicas e lançar luz sobre novas rotas de tratamento. Este trabalho tem a Microscopia de Força Atômica como a principal ferramenta para a investigação da ultraestrutura e propriedades nanomecânicas do vírião inativado de SARS-CoV-2. As partículas virais de SARS-CoV-2 foram analisadas, com foco especial em sua ultraestrutura, conformação de adsorção e comportamento nanomecânico. Os resultados revelaram aspectos da organização e distribuição espacial das proteínas na superfície das partículas virais. Também foi demonstrado o comportamento complacente e maleável da membrana e sua capacidade de recuperação de lesões mecânicas. Foram medidas pelo menos três camadas que compõem a membrana e sua espessura. Este estudo fornece uma visão singular sobre a ultraestrutura das partículas SARS-CoV-2 em nanoescala, trazendo novas perspectivas que podem ser empregadas no mapeamento da superfície viral.

Palavras-chave: SARS-Cov-2. Biofísica. Nanomecânica. Virologia Física. Microscopia de Força Atômica.

ABSTRACT

The ongoing outbreak of the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) started in later 2019 and spread across the world, infecting millions of people with over 5 million deaths worldwide. To fight back the virus is necessary to understand how its main structures function, especially those responsible for the virus infectivity pathogenicity. Understanding from the physical point of view the structure and properties of SARS-CoV-2 is extremely important to find vulnerable points that can elucidate the mechanisms of drug targeting, for example. Determining the ultrastructure and nanomechanical properties of SARS-CoV-2 can clarify its mechanical properties and shed light on new treatment routes. This study has Atomic Force Microscopy as the main tool for the investigation of the ultrastructure and nanomechanical properties of the SARS-CoV-2 inactivated virion. Here, using the most advanced Atomic Force Microscopy techniques, SARS-CoV-2 viral particles were analyzed, with an especial focus on their ultrastructure, adsorption conformation and nanomechanical behavior. The results uncovered aspects of the organization and the spatial distribution of the proteins on the surface of the viral particles. It was also shown the compliant behavior of the membrane and ability to recover from mechanical injuries. At least three layers composing the membrane and their thickness were measured. This study provides new insight into the ultrastructure of SARS-CoV-2 particles at the nanoscale offering new prospects that could be employed for mapping viral surface.

Keywords: SARS-Cov-2. Biophysics. Nanomechanics. Physical Virology. Atomic Force Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------|---|----|
| 2.1 | Comparação de tamanhos entre alguns tipos de vírus de DNA ou RNA. | 6 |
| 2.2 | Figura esquemática de dois tipos básicos de virions, mostrando seus capsídeo com e sem envelope. | 7 |
| 2.3 | Exemplo de comparação entre as diferentes formas de vírus envelopados: Herpesvirus e o Influenza. | 8 |
| 2.4 | Demonstração da automontagem de capsídeo, com diferentes números de triangulações. | 9 |
| 2.5 | Tipos de coronavírus que infectam humanos. | 12 |
| 2.6 | Esquema ilustrativo das componentes estruturais dos coronavirus. | 13 |
| 2.7 | Simulação da estrutura do SARS-CoV-2: a) Medidas de Cryo-ET a partir das quais foram desenvolvidos b) modelos computacionais para resolução estrutural da partícula viral. As tomografias revelaram detalhes da organização interna como os arranjos c) tetraédrico e d) hexamérico dos vRNP. | 16 |
| 2.8 | Esquema de funcionamento do Microscópio de Força Atômica. | 18 |
| 2.9 | Curva teórica do potencial de Lennard-Jones. A região em vermelho corresponde ao domínio de forças atrativas. A região em amarelo corresponde ao domínio de forças repulsivas. A região em laranja corresponde à interface entre elas. Os modos de operação do AFM atuam em cada região deste potencial, de acordo com a legenda. | 20 |
| 2.10 | Ilustração esquemática mostrando as forças presentes durante a geração de imagens de AFM no ar. A presença de um menisco aumenta as forças de atração entre a ponta e a amostra. | 23 |
| 2.11 | Típica curva de força produzida por um Microscópio de Força Atômica. Para cada parte da curva de aproximação e de retração está representado o movimento da sonda. | 30 |
| 2.12 | Decomposição da curva de força em relação às informações obtidas a partir de cada porção da curva. A região em amarelo evidencia a dissipação de energia. | 37 |

| | | |
|------|---|----|
| 2.13 | Diagramas de tensão <i>versus</i> deformação a uma taxa de deformação constante seguida de retração de carga aplicada. O gráfico em a) mostra o comportamento de um material viscoelástico linear. O gráfico em b) mostra o comportamento de um material elástico-plástico ideal. | 39 |
| 2.14 | Mapas de vírus obtidos por AFM. (a) Adenovírus humano (b) Mimivírus. (c) Vírus Herpes simplex. (d) Vírus de leucemia murina Moloney. (e) MVM. (f) Bacteriófago T7. | 42 |
| 2.15 | Imagens de AFM de um capsídeo viral antes e depois da nanoindentação. A) e B) Imagens de topografia tridimensionais de uma partícula HSV1 antes (A) e após (B) a indentação, respectivamente. C) O perfil de altura, obtido ao longo das setas brancas em A e B. D) e E) A numeração dos capsômeros antes e depois da indentação mostrando a remoção de capsômeros centrais (indicados em vermelho). | 43 |
| 2.16 | Partículas de vírus cujas propriedades mecânicas foram estudadas até o momento. Todas as partículas são reproduzidas (aproximadamente) na mesma escala, indicada pela barra no canto superior esquerdo. Vistas lateral e superior do TMV, formas nativa e dilatada de CCMV ^[1] e formas prohead-I e head II de HK97 são representadas. Para HBV e HSV-1, as propriedades mecânicas foram analisadas para capsídeos sem seus envelopes. | 44 |
| 3.1 | Microscópio de Força Atômica Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA) localizado no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas da UFMA. | 48 |
| 3.2 | Célula líquida: componente utilizado para a realização de medidas em meio líquido. a) Tensão superficial do menisco através do <i>O-ring</i> . b) Menisco formado no poço da célula líquida. c) Célula líquida montada no AFM. d) Zoom no <i>O-ring</i> com o cantilever montado. d) Célula líquida antes de receber o fluido. | 49 |
| 3.3 | Ilustração dos platôs que caracterizam a ruptura da partícula viral, enfatizados pelas faixas coloridas, na curva de Força <i>versus</i> Separação. | 50 |
| 4.1 | Mapa topográfico de AFM revelando a estrutura viral e o formato da partícula de SARS-CoV-2: A) Uma visão ampliada de várias partículas virais dispersas no substrato com diâmetro variando entre 90-185 nm. B) Zoom da superfície de uma única partícula viral mostrando os detalhes dos arranjos de proteínas na superfície. | 51 |

- 4.2 Seção transversal do perfil de uma única partícula, enfatizando as unidades de proteína na superfície com medidas de diâmetro compatíveis com a proteína Spike. O mapa no detalhe mostra a direção em que a seção transversal foi medida. As setas verdes destacam a seção transversal sobre as proteínas. 52
- 4.3 Mapa topográfico com escala de cor artificial que enfatiza um trímero na superfície viral, o formato característico da estrutura da proteína spike. 53
- 4.4 A) Imagem topográfica do SARS-Cov-2 e B) seu respectivo mapa de adesão. O mapa de adesão mostra diferentes contrastes nas regiões central e externa. Na região externa, é possível observar algumas estruturas não mostradas no mapa topográfico que podem ser sugeridas como a coroa de spikes. O centro possui regiões com interação atrativa consideravelmente menor que são compatíveis com a morfometria dos spikes, sendo estes os que não interagem com o substrato, apenas com a sonda. 54
- 4.5 A) Mapa de adesão de uma única partícula viral revelando detalhes das diferentes forças de adesão. A imagem inserida mostra uma correlação entre a estrutura de forma triangular sugerida e a proteína Spike. B) Combinação do mapa topográfico tridimensional e do mapa de forças adesivas. 54
- 4.6 Informações sobre a estrutura interna: A-C) Diferentes padrões de adsorção da partícula viral SARS-CoV-2 em vidro. As linhas pontilhadas pretas destacam as estruturas semelhantes aos Spikes presentes em todas as imagens de altura. D) Sugestão de montagem hexamérica das estruturas internas da partícula viral após adsorção e E-F) uma montagem piramidal tetraédrica com diferentes rotações piramidais. 55
- 4.7 Curva de força de referência no substrato de vidro e sequência de curvas sobre a partícula viral. Os círculos amarelos no 10º ciclo enfatizam as etapas características dos eventos de ruptura. A imagem inserida ^[2] sugere uma visualização da seção transversal das camadas indentadas. 57
- 4.8 O gráfico de força *versus* separação mostra um ciclo tardio de aproximação (curva azul) e retração (curva vermelha) da sonda AFM na superfície da partícula viral. Os círculos amarelos enfatizam os eventos de desprendimento de penetração na estrutura viral. A região listrada de vermelho corresponde à dissipação de energia mostrando o caráter viscoelástico da partícula viral. 58

| | | |
|------|--|----|
| 4.9 | Curvas de força de referência no vidro e na superfície da partícula viral. | 58 |
| 4.10 | Estrutura da membrana sugerindo ausência ou reposicionamento de proteínas (círculos tracejados) na superfície da partícula viral. A seta amarela indica o local onde ocorreu o reposicionamento ou a perda de uma unidade de proteína. | 59 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 1 |
| 2 | Revisão Bibliográfica | 5 |
| 2.1 | Virologia Física | 5 |
| 2.1.1 | Propriedades Físicas dos Vírus | 10 |
| 2.2 | Coronavírus | 11 |
| 2.2.1 | SARS-CoV-2 | 14 |
| 2.3 | Conceitos Básicos de Microscopia de Força Atômica | 17 |
| 2.3.1 | Forças de Interação Sonda-Amostra | 18 |
| 2.3.2 | Força de dupla camada em fluidos | 27 |
| 2.3.3 | Modos de operação do AFM | 28 |
| 2.3.4 | Espectroscopia de Força | 29 |
| 2.3.5 | Fundamentos de Reologia | 32 |
| 2.3.6 | Viscoelasticidade e a matéria biológica | 38 |
| 2.4 | Microscopia de Força Atômica em Vírus | 41 |
| 3 | Métodos Experimentais | 47 |
| 3.1 | Aquisição das amostras | 47 |
| 3.2 | Preparação da amostras de SARS-CoV-2 | 47 |
| 3.2.1 | Isolamento e inativação do vírus | 47 |
| 3.2.2 | Estoque de vírus | 48 |
| 3.3 | Medidas de Microscopia de Força Atômica | 48 |
| 4 | Resultados e Discussão | 51 |
| 4.1 | Estrutura e formato das partículas virais de SARS-CoV-2 | 51 |
| 4.2 | Experimentos de Nanoindentação | 56 |
| 5 | Conclusões e Perspectivas | 61 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |
| A | APÊNDICE | 77 |

1. Introdução

Ao final de dezembro de 2019, um novo coronavírus (2019-nCoV; SARS-CoV-2) afetou muitas províncias da China e vários países do mundo. Com o crescimento do número de infecções em todos os continentes, a *coronavirus disease* (COVID-19) foi considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A COVID-19 é uma infecção viral altamente transmissível e patogênica causada pelo coronavírus (SARS-CoV-2), que resulta em uma síndrome respiratória aguda grave [3]. O número de casos é globalmente crescente, mas não há ainda tratamento definitivo para a pneumonia provocada pela COVID-19. Nas últimas duas décadas, surtos de coronavírus (SARS-CoV; MERS) e emergências intermitentes de saúde pública em todo o mundo nos lembram que os coronavírus ainda são uma grave ameaça à saúde global [4].

CoVs são vírus envelopados com um genoma de RNA positivo, pertencentes à família *Coronaviridae* da ordem *Nidovirales*, que são divididos em quatro gêneros (α , β , γ e δ) [5]. O SARS-CoV-2 pertence ao gênero β . As CoVs contêm, pelo menos, quatro proteínas estruturais: Spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). A proteína S é responsável pela ligação e entrada do vírus nas células alvo, que iniciam o processo de infecção [6,7].

Para a Física, os vírus se encaixam na categoria de “*soft matter*” ou material macio, uma ramificação da Física da Matéria Condensada [8]. Nos últimos anos, a evolução da nanotecnologia e a identificação de que características únicas dos vírus possam ser consideradas como objetos de estado sólido, estão levando a uma visão renovada dos vírus a partir do ponto de vista da Física [9,10]. Propriedades mecânicas, tais como: elasticidade, fragilidade ou fadiga do material, constituem características físicas importantes da matéria no estado sólido. Um recente termo, Virologia Física, vem sendo utilizado para abranger a mecânica de vírus e outros estudos de vírus orientados para a Física [9,11]. Essa nova análise está ligada às abordagens de virologia estrutural baseadas em técnicas físicas ou físico-químicas, tais como: Cristalografia de Raios X, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Criomicroscopia (Crio-EM), Criotomografia, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (ERMN), Espectrometria de Massa, Espec-

troscopia de Fluorescência e a Microscopia de Força Atômica (AFM) ^[12].

O desenvolvimento da técnica de AFM e outras técnicas de investigação e manipulação em nível molecular, têm facilitado a exploração de propriedades na escala nanométrica ^[13]. Como consequência, vários grupos de pesquisa começaram a investigar as propriedades mecânicas de células, moléculas e vírus isolados usando AFM e/ou outras abordagens baseadas na Física ^[14–17]. A técnica de AFM é um método para obtenção de imagens e propriedades físicas diversas de vários tipos de superfícies, com alta resolução, incluindo células vivas ^[18].

Além de imagens (mapas topográficos), o AFM fornece caracterização das propriedades físicas de uma amostra. É possível calcular o módulo elástico de partículas virais individuais para determinar a resistência do capsídeo, medindo a força de ruptura ^[15, 19, 20]. Essas propriedades melhoram nossa compreensão de como os vírus podem sobreviver em diversos ambientes, uma vez que o capsídeo protege o material genético viral, além de permitir a liberação do conteúdo de DNA/RNA ao ser rompido, resultando no processo de infecção ^[16, 18]. Do ponto de vista biológico, a grande vantagem da técnica AFM é a capacidade de obtenção de imagens de estruturas biológicas em condições fisiológicas ^[21]. Informações topográficas e investigações de estruturas intracelulares utilizando esta técnica são relatadas em trabalhos como de Nowakowski e colaboradores ^[22], nos quais se observam o citoesqueleto de eritrócitos, além da topografia da célula.

Um profundo conhecimento das propriedades mecânicas dos vírus pode ter consequências importantes para o uso de partículas virais em bionanotecnologia ^[23–25]. Na escala microscópica ou nanoscópica, muitos fenômenos biologicamente relevantes envolvem forças dentro ou entre células ou biomoléculas. Os vírus também estão sujeitos a forças internas e externas e, como entidades em evolução, podem adaptar seletivamente seu comportamento mecânico para resistir ou mesmo usar essas forças ^[26]. A pandemia do coronavírus tem sido extremamente letal, dizimando milhares de vidas ao redor do mundo. Apesar de algumas vacinas já terem sido desenvolvidas, o tratamento para quem se contamina com o vírus SARS-CoV-2 ainda não foi definido. Além disso, o SARS-CoV-2 é um novo tipo de coronavírus sobre o qual não existem muitas respostas. A principal motivação deste trabalho se encontra na elucidação de questões referentes a características marcantes do vírus, a resolução de propriedades físicas, não apenas deste vírus, mas dos vírus em geral, e na expectativa de que a reunião dessas informações seja, de alguma forma, uma valiosa contribuição para a futura erradicação da COVID-19 e outras patologias decorrentes de infecção viral.

Este trabalho possui a Microscopia de Força Atômica como ferramenta principal para a investigação de propriedades mecânicas do vírus SARS-CoV-2, buscando informações sobre a sua ultraestrutura e dados quantitativos de forças de adesão e de resistência do capsídeo viral, correlacionando-os entre si e com resultados da literatura sobre virologia física e bionanotecnologia.

Nesse contexto, a presente pesquisa visa compreender, do ponto de vista físico, a estrutura e propriedades do SARS-CoV-2, a fim de encontrar pontos vulneráveis que podem servir como alvo para potenciais fármacos. Esses parâmetros físicos são intensamente estudados pela Física da Matéria Condensada e Ciência dos Materiais e, quando se trata de sistemas biológicos, pela Biofísica. O primeiro passo deve ser compreender o funcionamento do SARS-CoV-2, medir suas propriedades e, a partir daí então, estudar as interações com os candidatos ao tratamento.

Este trabalho de mestrado estrutura-se, primeiramente, com esta introdução ¹. No capítulo seguinte, faz-se uma Revisão Bibliográfica ², na qual se descrevem conceitos de virologia física, com foco especial no vírus SARS-Cov-2, princípios da ferramenta principal deste trabalho, o AFM, além de uma revisão sobre o emprego do AFM na investigação de vírus. O capítulo seguinte descreve os materiais e métodos empregados para investigação dos vírus ³. Em seguida, apresentam-se os resultados e discussões deste trabalho ⁴ e, por fim, as conclusões e perspectivas para esta pesquisa ⁵, além das referências bibliográficas.

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, apresentam-se os conceitos teóricos sobre o sistema em estudo e as técnicas empregadas para desenvolvimento da pesquisa.

2.1 Virologia Física

O estudo da matéria viva deve ser visto como uma parte substancial da definição da Física moderna. Os vírus estão relacionados a todas as formas de vida e se nota que eles têm uma grande diversidade na organização do genoma e nas estratégias de replicação [27]. Devido ao tamanho da escala e à intensidade das interações que compõem a montagem do vírus, o manejo das forças físicas que impulsionam o crescimento e a forma do vírus é particularmente desafiador. Especialmente na escala em que vive a maioria dos vírus, existe um acúmulo de energia característica associada a várias interações (eletrostáticas, térmicas, mecânicas, etc.) [28]. Em nanoescala, as interações mecânicas, eletrostáticas e térmicas e de ligações químicas possuem magnitudes compatíveis a esta escala [29].

A palavra “vírus” vem do latim “*virus*”, significando “líquido venenoso” [30]. Vírus são nanopartículas moleculares que assumem o controle de uma célula hospedeira forçando-a a produzir inúmeras cópias de si. Estima-se que haja cerca de 1×10^{31} em nosso planeta; felizmente, a maioria deles são bacteriófagos¹. Até 2012, o número de espécies de vírus capazes de infectar humanos era 219 [31]; no entanto, provavelmente, houve um aumento nesse número nos últimos anos, acarretando em casos de endemias, como a de 2012, com o MERS-CoV [32] e, mais recentemente, a pandemia em 2019, com o SARS-CoV-2 [33].

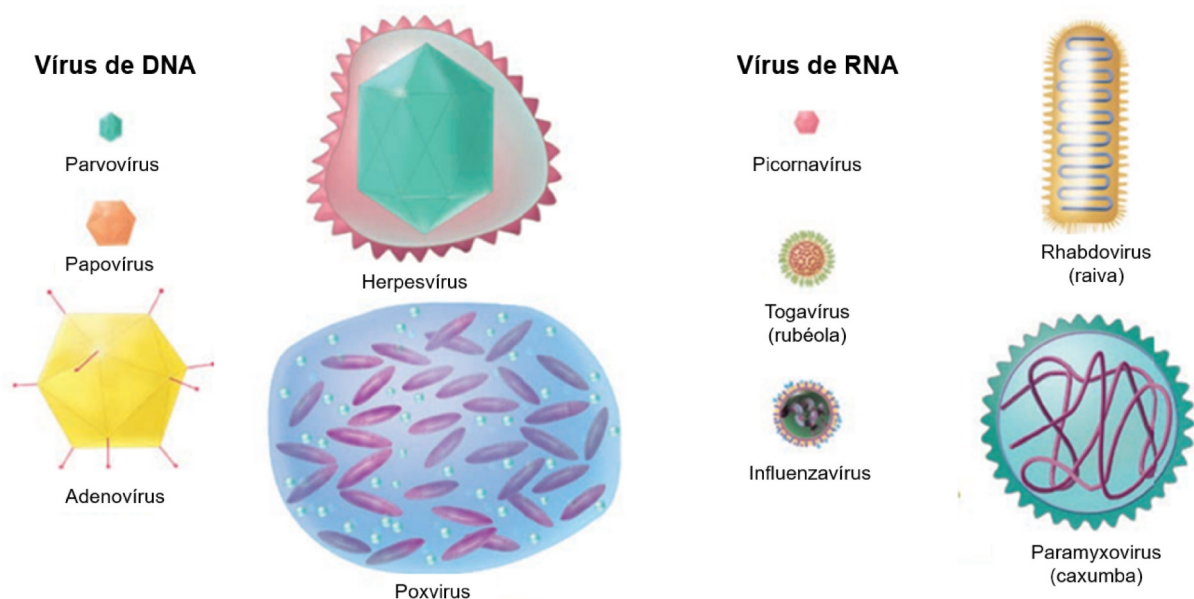
Os vírus podem ser considerados como conjuntos dinâmicos de nucleoproteínas, capazes de se multiplicarem dentro das células e de se propagarem entre células e organismos. As partículas virais infecciosas (virions), montadas em uma célula hospedeira, são partículas dinâ-

¹Vírus que infectam bactérias.

micas, geralmente metaestáveis: são resistentes o suficiente para proteger o genoma viral fora da célula, mas também estão prontas para sofrerem mudanças estruturais e realizarem as ações mecanoquímicas necessárias para infectar outras células ^[34].

Quando um vírus infecta uma célula, ele se apossa da sua maquinaria, usando-a para produzir outros vírus ^[35]. Fora da célula hospedeira, os vírus são chamados de virions e a sua composição química varia de vírus para vírus, de forma a ser uma importante peça na sua classificação ^[36]. Um virion normalmente contém um genoma composto de um ou vários segmentos de DNA ou RNA de fita simples ou dupla. Um revestimento de proteínas virais estruturais, denominado capsídeo, envolve esse genoma. Em alguns vírus, o capsídeo é circundado por um envelope derivado da membrana da célula hospedeira ^[35,36]. Os virions podem variar em tamanho, com diâmetro desde 20 nm até cerca de 0,5 μm ^[37], e em forma, desde vírus filamentosos, com suas proteínas do capsídeo dispostas em uma matriz helicoidal ao redor do genoma, até os vírus esféricos, com morfologia icosaédrica ^[36] (Figura 2.1).

Figura 2.1: Comparação de tamanhos entre alguns tipos de vírus de DNA ou RNA.

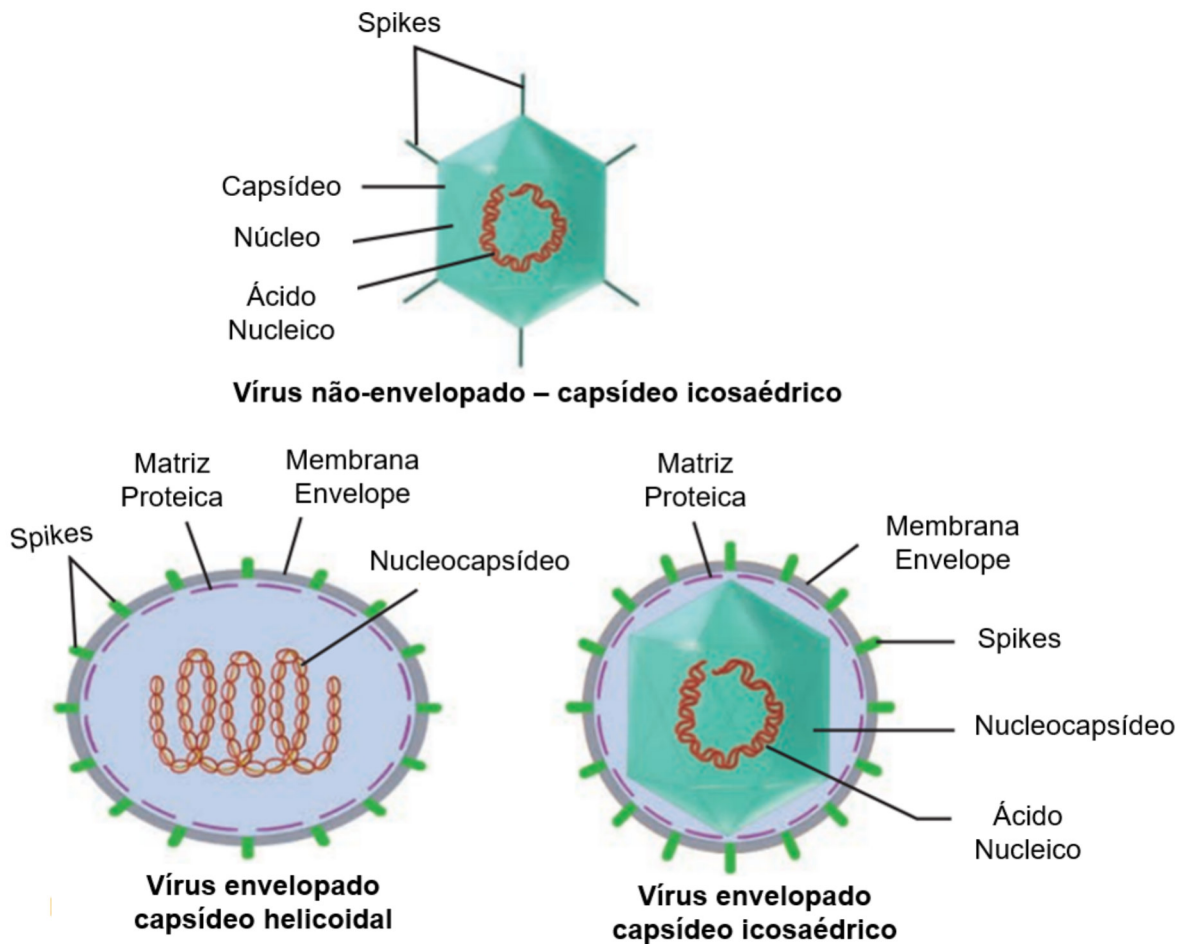


Fonte: Adaptado de Ryan et al. (2018) ^[36]

As forças que atuam em um objeto são determinantes para a configuração de sua forma, como pontuado por D'Arcy Thompson ^[38]. Estruturalmente, os vírus apresentam diferenças notáveis em suas formas, tamanhos, composições moleculares e organizações. Considerando apenas sua composição molecular, os vírus são geralmente classificados em dois grandes grupos: envelopados e não-envelopados, dependendo da ausência ou presença de uma camada lipídica

extra (Figura 2.2) ^[39], respectivamente. Os não-envelopados, mais simples, são compostos apenas de uma casca de proteína, o capsídeo, feito de múltiplas cópias de uma ou mais proteínas, que contém o material genético. Em vírus não-envelopados mais complexos, o capsídeo pode conter não apenas o genoma viral, mas também outras proteínas e macromoléculas. Nos envelopados, o capsídeo e/ou outras estruturas internas são tipicamente rodeados por uma bicamada lipídica, o envelope, na qual algumas proteínas estão embutidas. Alguns vírus envelopados têm uma estrutura complexa de múltiplas camadas, compostas de lipídios, proteínas e/ou nucleoproteínas [34].

Figura 2.2: Figura esquemática de dois tipos básicos de virions, mostrando seus capsídeo com e sem envelope.

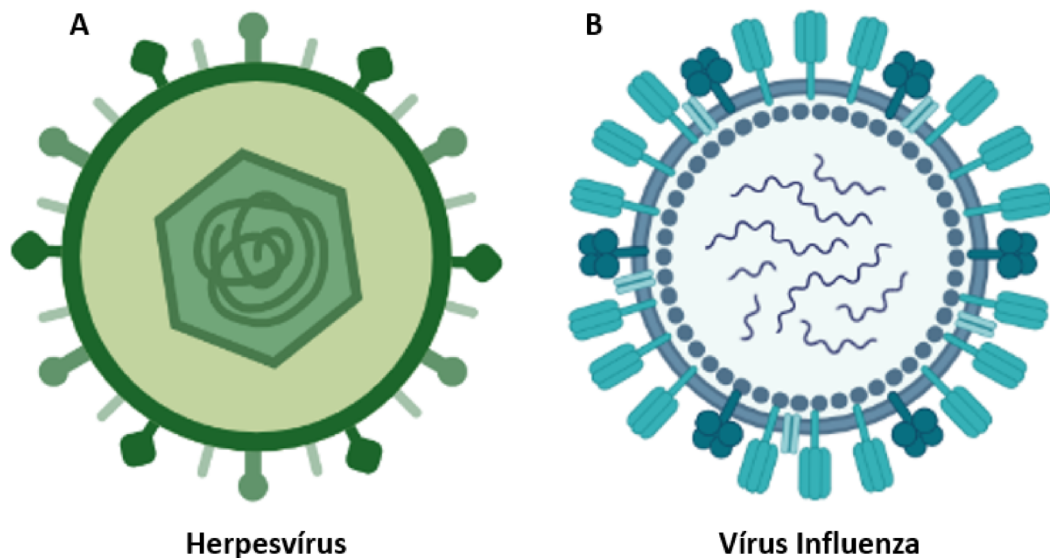


Fonte: Adaptado de Ryan et al. (2018) ^[36]

Em vírus não envelopados, com um capsídeo helicoidal ou icosaédrico, a arquitetura básica desse capsídeo determina a arquitetura do vírus. Nos envelopados, a situação é mais complexa. Muitos vírus com envelope contendo capsídeos icosaédricos ou outros tipos de complexos de proteína compactos (núcleo) tendem a adotar uma forma relativamente flexível, frequentemente esferoidal, que pode diferir em tamanho entre as partículas individuais. Por exem-

plo, nos herpesvírus^[40], um grande capsídeo icosaédrico contendo o genoma viral é envolto por uma camada externa de proteínas, rodeado, por sua vez, por um envelope lipídico. O vírus resultante é consideravelmente maior do que o capsídeo e tem forma esferoidal. No Influenza, vários complexos de nucleocapsídios aproximadamente helicoidais são diretamente envolvidos por uma camada de proteína e um envelope lipídico, fazendo desse vírus uma estrutura polimórfica. Existem muitas outras variações na arquitetura viral, algumas delas muito complexas. Em alguns casos, dois capsídeos concêntricos são encontrados; em outros, os envelopes lipídicos internos estão presentes^[34,41]. A Figura 2.3 ilustra as diferenças estruturais entre os vírus envelopados da herpes e influenza.

Figura 2.3: Exemplo de comparação entre as diferentes formas de vírus envelopados: Herpesvirus e o Influenza.



Feito no site BioRender^[42].

Na determinação da estrutura, a simetria do capsídeo é um fator importante que contribui grandemente para sua estabilidade e equilíbrio entre o genoma empacotado e o envelope. Os vírus isométricos são esféricos, mas geometricamente icosaedros, em comparação com os complexos, que são isométricos e helicoidais. Os vírus envelopados icosaédricos ou helicoidais são muito comuns em animais, mas raros em plantas e bactérias^[41].

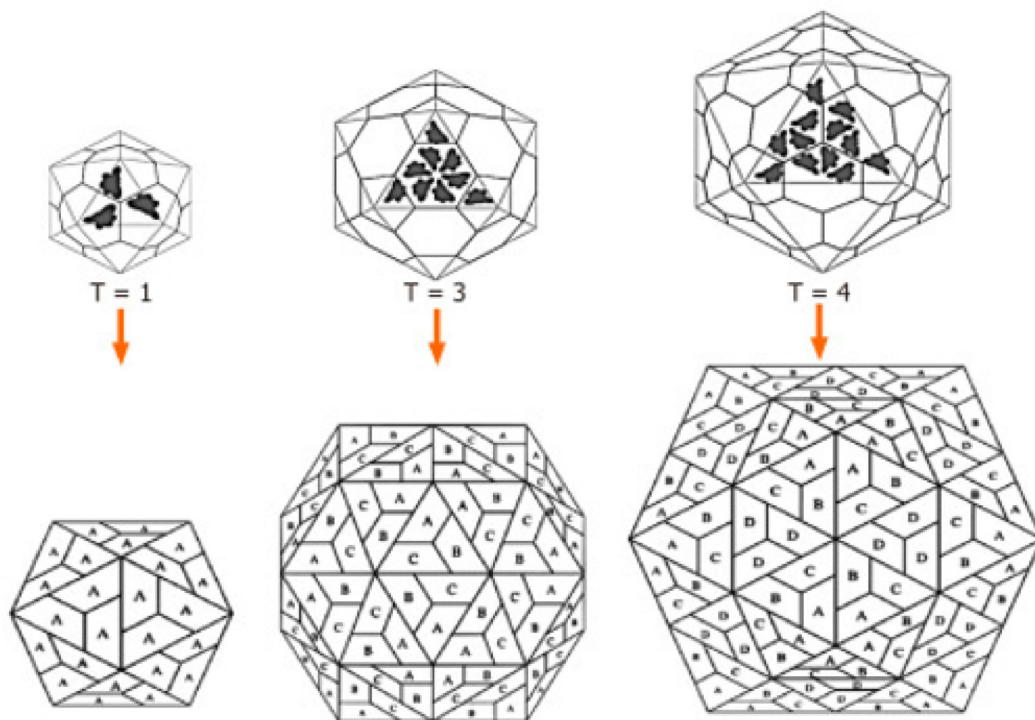
Os capsídeos helicoidais são extremamente simples, podendo, em princípio, serem tão grandes quanto necessário, afim de encapsular um genoma de ácido nucleico. Dessa forma, não haveria limitação teórica sobre a quantidade de informação genética armazenada. No entanto, as restrições físicas e biológicas limitam o comprimento dos capsídeos helicoidais, que são muito

menos frequentes na natureza do que os icosaédricos ^[39].

Em contraste aos capsídeos helicoidais, os icosaédricos são compostos de 60 componentes, estruturalmente idênticos, que cumprem as restrições geométricas intrínsecas. Uma vez que as subunidades da proteína do capsídeo são assimétricas, o número máximo de interações entre as subunidades pode ser estabelecido apenas quando elas são organizadas simetricamente. Portanto, um capsídeo estável deve estar em perfeita simetria e com a menor energia livre possível. Esse fato limita o tamanho do genoma do ácido nucleico e, assim, a quantidade de informação genética que pode ser incluída ^[34].

Os capsídeos icosaédricos são definidos pelo número de triangulação ($T = 1, 3, 4, 13,$ etc.) (Figura 2.4) ^[43], ou seja, os triângulos equiláteros idênticos formados por subunidades. O entendimento da forma e estrutura de vírus é importante para o uso de partículas virais “auto-montáveis” (*virus like particles self-assembled*), estáveis e não-infecciosas, para que possam ser exploradas como candidatos a vacinas e veículos de distribuição de fármacos ^[12,39,44].

Figura 2.4: Demonstração da automontagem de capsídeo, com diferentes números de triangulações.



Fonte: Retirado de Parvez (2020) ^[39]

2.1.1 Propriedades Físicas dos Vírus

Os vírus são estruturas nanométricas com uma fenomenologia física muito rica, cujo estudo inclui: interações de longo e curto alcance em nanoescala; cinética e termodinâmica de automontagem de um sistema quase bidimensional e propriedades geométricas e topológicas de capsídeos ^[41]. Os vírus são tipos de complexos de replicação molecular de proteína ácido-nucleica, sem metabolismo próprio, com funções básicas dependentes do hospedeiro ^[45]. Podem evoluir de forma a desenvolver funções continuamente aprimoradas, que permanecem superiores às de nanomateriais sintéticos, como controle estequiométrico e reconfigurabilidade. Essas características são ideais para muitas tecnologias futuras, como coleta de energia sustentável ^[46], armazenamento de informações ^[47] e nanomedicina ^[48].

As partículas virais constituem excelentes modelos para a compreensão e manipulação de automontagem, sendo importantes para o entendimento da relação entre a estrutura e a função em macromoléculas e máquinas biológicas. Um conhecimento profundo da estrutura, dinâmica e propriedades físicas dos vírus é essencial afim de compreender seu ciclo de vida².

As partículas de vírus, seus componentes e os processos em que participam fornecem novos alvos para o desenvolvimento de agentes antivirais. Entender os determinantes estruturais da estabilidade, dinâmica e função do vírus pode facilitar a sua manipulação no desenvolvimento vacinas, vetores de terapia genética e nanopartículas em técnicas de entrega de drogas (*drug delivery*) ou outros usos biomédicos ^[34]. Além disso, a magnitude das pressões osmóticas internas resultantes do empacotamento de material genético levanta a questão de como um capsídeo, que é espontaneamente montado por interações fracas, poderia suportar tais tensões. Na maioria dos casos, a resposta é a maturação, ou seja, uma série de processos irreversíveis responsáveis por, entre outras coisas, mudanças significativas nas propriedades mecânicas da casca do vírus ^[41,49].

Outro importante ponto é o fenômeno de pré-estresse, que é fundamental dentro da virologia mecânica. O conceito de pré-estresse define tensões que estão presentes nos capsídeos dos vírus, mesmo em seu estado de equilíbrio, devido à sua construção ^[50]. A pré-tensão é uma característica comum em estruturas biológicas, que pode governar a estrutura mecânica, incluindo sua estabilidade e integridade. No entanto, uma vez que a maioria dos materiais biológicos são viscoelásticos, ou seja, têm uma relação tensão-estresse dependente do tempo, há a questão de até onde vai a validade de uma descrição puramente elástica de vírus e envelopes virais. Além

²Existe um grande debate filosófico e semântico sobre se os vírus são organismos vivos ou não. Neste caso, ciclo de vida se refere ao ciclo infeccioso.

disso, devido à natureza discreta e ao pequeno tamanho, em um cenário biológico, as flutuações estocásticas³ podem ser o mecanismo dominante pelo qual os vírus avançam ao longo de seus estágios ao longo de seu ciclo de vida. Essas questões, ainda sem definição, semeiam o campo para novas abordagens de pesquisa em vírus, especialmente em Física [41].

Nas próximas seções, nos aprofundaremos sobre nosso objeto de estudo: o coronavírus, em especial, o SARS-Cov-2.

2.2 Coronavírus

O coronavírus é conhecido por causar doenças em humanos, outros mamíferos e pássaros [54]. Em humanos, eles são responsáveis por doenças respiratórias e entéricas⁴, podendo evoluir para um quadro grave de insuficiência respiratória e até à morte. Os coronavírus geralmente infectam seus hospedeiros de maneira específica para cada espécie e as infecções podem ser agudas ou persistentes. A característica mais distinta dessa família viral é o tamanho do genoma: os coronavírus têm os maiores genomas entre todos os vírus de RNA. Esta capacidade expansiva de codificação parece fornecer e necessitar de uma grande variedade de estratégias de expressão genômica, a maioria das quais não é completamente compreendida [55]. A Figura 2.5 ilustra os diferentes tipos de coronavírus que infectam humanos.

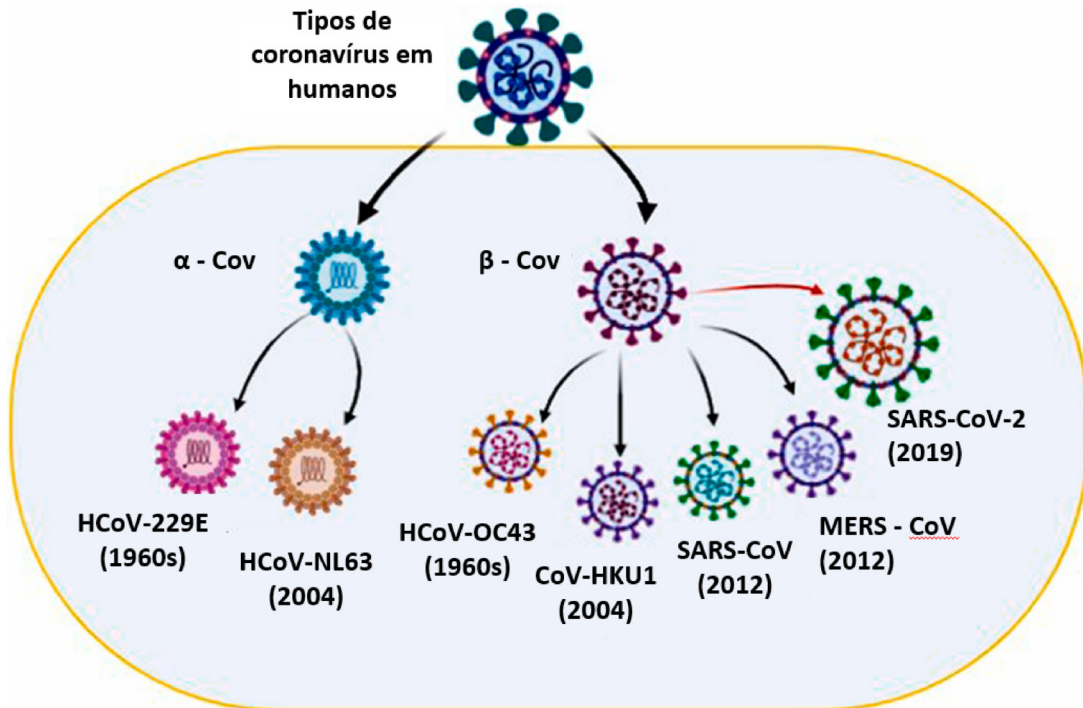
Os coronavírus não obedecem necessariamente barreiras de espécies, como exemplificado pela recente disseminação de três vírus zoonóticos em humanos: coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-1)^[57] em 2003, coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV)^[32] em 2012 e, em 2019, o SARS-CoV-2^[58], responsável pela doença Covid-19, causando uma infecção de caráter pandêmico. Todos tem provável origem em morcegos antes de infectar humanos com consequências letais. Como um grupo, os coronavírus não se limitam a órgãos específicos; os tecidos-alvo incluem o sistema nervoso, o sistema imunológico, os rins e o trato reprodutivo, além de muitas partes dos sistemas respiratório e entérico [59].

Coronavírus são atualmente classificados geneticamente em 4 gêneros (α , β , γ e δ). SARS e MERS-CoVs são classificados atualmente no subgênero *Sarbecovirus* e *Merbecovirus*,

³Um processo estocástico é aquele em que há um sistema para o qual são feitas observações, em momentos específicos; e o valor observado para cada momento é uma variável aleatória. Flutuações estocásticas são flutuações em quantidades derivadas de muitos processos estocásticos idênticos e estão presentes em uma grande gama de processos biológicos^[51–53].

⁴Doenças relacionadas ao sistema gastrointestinal.

Figura 2.5: Tipos de coronavírus que infectam humanos.

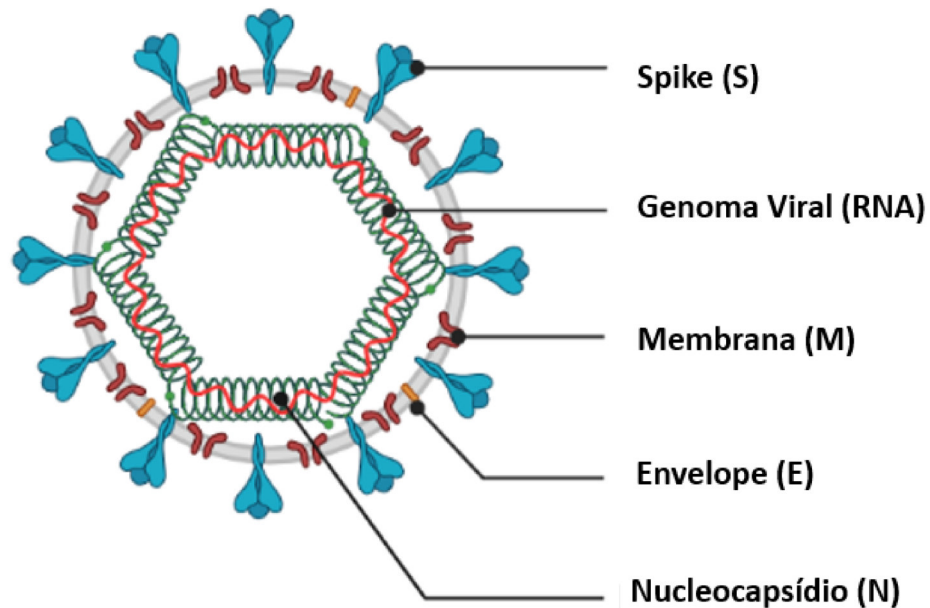


Fonte: Adaptado de Bakhshandeh et al. (2021) [56]

respectivamente, no gênero *Betacoronavirus* dentro da família *Coronaviridae*, da ordem *Nidovirales*. Os coronavírus são vírus de RNA de fita simples de sentido positivo e seu tamanho é de cerca de 100-140 nm de diâmetro com uma coroa de pontas em forma de pétalas, que se destaca na superfície e é composta pela glicoproteína (S). A proteína S está em uma forma trimérica na superfície viral e tem um subdomínio terminal (S1) que contém os dispositivos responsáveis pela ligação ao receptor. O envelope também contém uma glicoproteína M transmembrana e, em quantidades muito menores, uma proteína do envelope (E). A proteína M é uma proteína de membrana e tem um papel fundamental na montagem do coronavírus. A proteína do nucleocapsídeo (N) interage com o RNA genômico viral para formar o nucleocapsídeo (Figura 2.6) [7,60,61].

Em 2002, surgiu na província de Guangdong, China, a SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) causada pelo SARS-CoV-1, que se espalhou por 29 países em 5 continentes, levando a milhares de casos e centenas de mortes [62]. Essa foi a primeira vez em que a humanidade foi ameaçada pelos HCovs (coronavírus humanos). O SARS-CoV-1 pertence aos β-coronavírus da família *Coronaviridae* e está envolvido na transmissão zoonótica e na disseminação entre humanos [63,64]. Os coronavírus frequentemente sofrem mutações e recombinações genéticas,

Figura 2.6: Esquema ilustrativo das componentes estruturais dos coronavírus.



Fonte: Adaptado de Britton. (2019) [59]

o que resulta em uma maior diversidade, evolução adaptativa e capacidade de causar doenças. Estudos anteriores demonstraram que o SARS-CoV-1 sofreu mutação ao longo da epidemia de 2002-2004 para melhor se ligar ao receptor celular ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*) e se replicar em células humanas, aumentando a sua virulência [65,66]. Evidências mostram que a possível origem do SARS-CoV-1 foi baseada na recombinação de diferentes coronavírus semelhantes à SARS em morcegos [67]. A origem filogenética do SARS-CoV-1 foi elucidada e comparada a outros coronavírus, revelando que o SARS-CoV-1 é um vírus recombinante [68].

Outra doença respiratória grave causada por um novo betacoronavírus surgiu em 2012: a síndrome respiratória do Oriente Médio (*Middle Eastern Respiratory Syndrome - MERS*), causada pelo coronavírus MERS-CoV [69]. A maioria dos casos foi documentada no Oriente Médio, mas o vírus, assim como o SARS-CoV-1, foi introduzido em outros países por meio de viagens aéreas. Acredita-se que ele tenha se originado de morcegos e transferido para dromedários, sendo este o hospedeiro intermediário. Os dromedários fazem parte da cultura e dos recursos econômicos da Arábia Saudita e a transmissão do MERS-CoV para humanos se deu pelo consumo do leite desse animal [70]. A proteína S do MERS-CoV liga-se ao receptor celular dipeptidil-peptidase-4 (DPP4/CD26), se diferenciando do SARS-CoV que se liga ao receptor ACE2 [68].

2.2.1 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é o mais recente coronavírus a ser descoberto em humanos. Ele é um betacoronavírus (assim como o SARS-CoV-1 e o MERS-CoV). A análise molecular desse novo coronavírus indicou que ele possui um genoma de RNA de fita simples positiva e possui diâmetro de 60-140 nm. Seu genoma é quase 80% equivalente ao SARS-CoV-1, e quase 96% de seus genes são compartilhados com o coronavírus de morcego (Bat-CoV) ^[71]. O genoma do SARS-CoV-2 possui quatro proteínas estruturais, que incluem espícula ou spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N) (Figura 2.6). Desde a entrada nas células hospedeiras até a formação de partículas virais, vários processos virais são dependentes dessas proteínas.

Os spikes, ou glicoproteína S, são proteínas transmembrana que residem na superfície externa do vírus. Elas determinam a patogenicidade do vírus por sua contribuição para a entrada viral através de sua ligação com os receptores ACE2, o que promove a fixação da partícula do vírus à membrana plasmática da célula hospedeira. A proteína S do SARS-CoV-2 forma trímeros salientes compostos por duas subunidades funcionais, responsáveis pela ligação ao receptor (subunidade S1) e uma subunidade responsável pela fusão à membrana (subunidade S2). Esse mecanismo que suprime as respostas de anticorpos neutralizantes promove a propagação do vírus entre diferentes tipos de células ^[72]. A proteína S sofre um rearranjo estrutural substancial para fundir a membrana viral com a membrana da célula hospedeira ^[73]. Este processo é desencadeado quando a subunidade S1 se liga a um receptor da célula hospedeira. A ligação do receptor desestabiliza o trímero de pré-fusão, resultando na liberação da subunidade S1 e na transição da subunidade S2 para uma conformação pós-fusão estável ^[74].

A membrana ou proteína M determina a forma do envelope do vírus. Ela pode funcionar como uma pequena proteína transmembrana através da ligação com todas as outras proteínas estruturais. A proteína M também contribui para o empacotamento do genoma viral durante a formação do virion ^[75]. A proteína M é uma glicoproteína transmembrana, sendo a proteína estrutural mais abundante nos coronavírus na membrana do virion, possuindo um papel importante na sua montagem. A proteína M está localizada entre as proteínas S, no envelope do vírus, junto com pequenas quantidades de proteína E. Desta forma, a proteína M é a principal condutora do processo de germinação do vírus ^[76]. Durante a montagem do virion, a proteína M interage consigo, com a proteína N do nucleocapsídeo, com a proteína E e com a proteína S ^[77-79]. A proteína M está presente como um dímero no virion e imagens de alta resolução sugerem que ela se apresenta com duas conformações, longa e compacta, que juntas induzem a curvatura da

membrana, bem como a ligação ao nucleocapsídeo ^[80,81].

A proteína E é a proteína estrutural com menos informações na literatura entre as quatro, porém se sabe que ela desempenha um papel crucial na localização do retículo endoplasmático-complexo de Golgi ^[82]. Enquanto a proteína S já foi consideravelmente investigada ^[83], poucas informações foram coletadas a respeito das outras proteínas de superfície; e o papel da proteína E e seu envolvimento com os efeitos adversos do hospedeiro foram erroneamente subestimados. A maioria das informações sobre a estrutura da proteína E e sobre suas funções derivam de estudos experimentais do SARS-CoV-1. Durante o ciclo de replicação, E é abundantemente expressa dentro da célula infectada, mas apenas uma pequena porção é incorporada ao envelope do virion ^[84]. A maioria da proteína está localizada no tráfego intracelular, onde participa da montagem e replicação do vírus ^[85]. CoVs recombinantes, sem a proteína E, exibem maturação viral prejudicada, demonstrando a importância de E na produção e maturação do vírus ^[86].

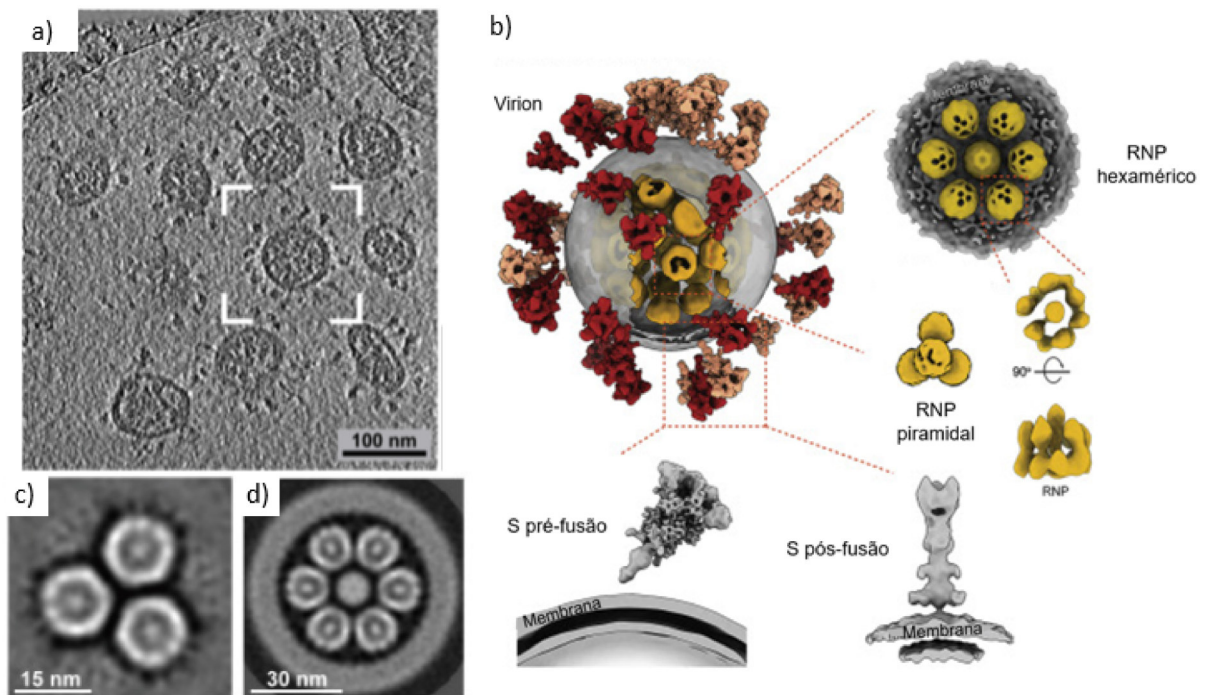
O nucleocapsídeo ou proteína N é o componente do SARS-CoV-2 que está diretamente ligado ao genoma de RNA do vírus. Essa proteína participa de vários processos relacionados ao genoma viral, incluindo o ciclo de replicação dos vírus, a sinalização do genoma viral e a resposta das células hospedeiras às infecções virais ^[71]. As proteínas do nucleocapsídeo (N) desempenham um papel importante no empacotamento do RNA viral ^[81]. A proteína N do SARS-CoV-2 é semelhante às dos demais CoVs, compartilhando 90% da identidade de sequência com a do SARS-CoV-1. Ela intermedeia a montagem viral interagindo com o genoma e a proteína M, que são úteis no aumento da transcrição e replicação do RNA viral ^[87]. Assim, as proteínas N são consideradas como potenciais alvos de fármacos. A Figura 2.7 mostra uma modelagem desenvolvida por Yao e colaboradores ^[88], elaborada a partir de medidas de Cryo-ET⁵, sugerindo a montagem da partícula viral de SARS-Cov-2 bem como a estruturação de seu nucleocapsídeo, a qual os autores denominam como “*ovos no ninho*”.

A proteína N desempenha dois papéis principais no ciclo de vida do coronavírus: (i) unir-se com o RNA no complexo de proteína-RNA viral (*viral RNA-protein* - vRNP), mediando o empacotamento de vRNP em vírions por meio de interações ainda não muito bem compreendidas entre as proteínas N e M ^[79,90,91], e (ii) facilitar a síntese e transcrição do RNA viral ^[92-94].

Isoladamente, as proteínas N do betacoronavírus se auto-associam em dímeros, tetrâme-

⁵Em uma medida de *cryo-electron tomography* (cryo-ET) uma amostra biológica - célula, tecido ou organismo - é congelada rapidamente, fatiada em pequenas espessuras e, em seguida, fotografada usando um microscópio eletrônico. O processo de congelamento preserva a amostra em um estado hidratado, próximo ao nativo. Várias imagens de cada fatia são capturadas à medida que a amostra gira ao longo de um eixo. As imagens são então alinhadas e mescladas usando técnicas computacionais para reconstruir em uma imagem tridimensional, ou tomograma ^[89].

Figura 2.7: Simulação da estrutura do SARS-CoV-2: a) Medidas de Cryo-ET a partir das quais foram desenvolvidos b) modelos computacionais para resolução estrutural da partícula viral. As tomografias revelaram detalhes da organização interna como os arranjos c) tetraédrico e d) hexamérico dos vRNP.



Fonte: Adaptado de Yao et al. (2020) [88]

ros e oligômeros maiores a fim de formar a base para a montagem do complexo vRNP [95–97]. A análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão de vários betacoronavírus sugeriu que, no vírion, a proteína N é mediadora da montagem de um complexo vRNP semelhante a um filamento helicoidal [98]. Imagens de Cryo-ET de vírions do SARS-CoV-2 revelaram uma estrutura vRNP mais globular, com cada vírion contendo entre 35 e 40 complexos vRNP individuais que adotam uma estrutura semelhante a uma concha de ≈ 15 nm de diâmetro [88,99]. Dentro do vírion, os vRNPs próximos à membrana mostram uma orientação característica em relação a ela, sugerindo que eles interagem especificamente com a proteína M [88]. Os vRNPs individuais também podem formar pilhas lineares semelhantes a filamentos helicoidais [88,99]. Unindo essas novas observações com os conceitos anteriores, sugere-se que os vRNPs de betacoronavírus provavelmente adotam uma arquitetura helicoidal que se conserva, apesar de variar a forma do empacotamento.

Nas próximas seções, serão abordados os princípios físicos da técnica utilizada neste trabalho para investigação das propriedades estruturais e mecânicas do SARS-CoV-2: a Microscopia de Força Atômica.

2.3 Conceitos Básicos de Microscopia de Força Atômica

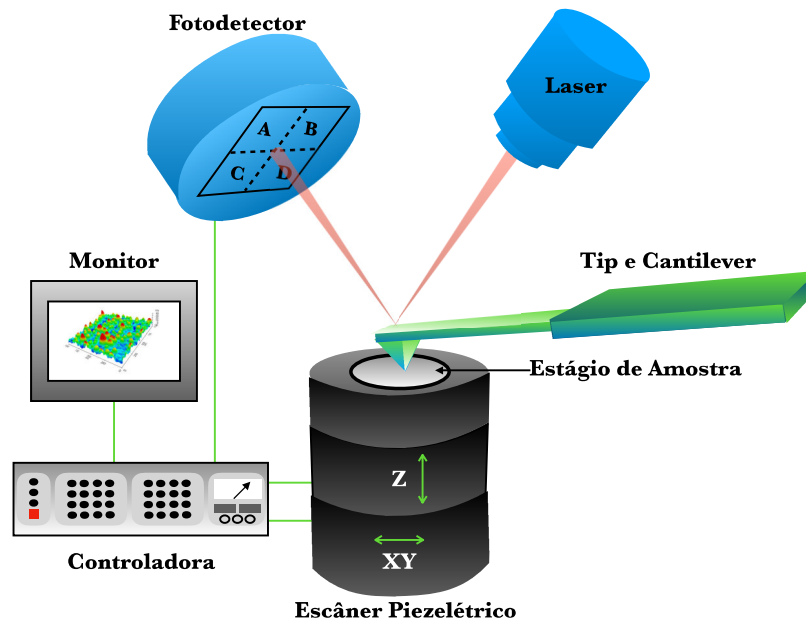
A Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM) é uma técnica do gênero da Microscopia de Varredura por Sonda (*Scanning Probe Microscopy* - SPM). O SPM obtém imagens de superfícies usando uma sonda que analisa a amostra. As técnicas de varredura por sonda surgiram a partir da técnica de Microscopia de Varredura por Tunelamento (*Scanning Tunneling Microscopy* - STM), que varre amostras a nível atômico e é baseada no conceito de tunelamento quântico ^[100]. Quando a ponta condutora se aproxima da superfície da amostra a ser analisada, uma diferença de potencial aplicada entre a amostra e a ponta permite que elétrons tunelem. A corrente de tunelamento resultante é uma função da posição da ponta, do potencial aplicado e da densidade local dos estados da amostra. A informação sobre a amostra é obtida através do monitoramento dessa corrente enquanto a ponta varre a superfície. Essa informação é então transformada em imagem por um software. Seu desenvolvimento rendeu o Prêmio Nobel de Física a Gerd Binnig e Henrich Rohrer em 1986 ^[101].

O AFM consiste em quatro partes principais: uma sonda sensora (um cantiléver com uma ponta em sua extremidade livre) normalmente feita de silício ou nitreto de silício; um piezoescâner, que faz o posicionamento relativo entre a sonda e a amostra; um laser de diodo e um fotodetector, que monitora o deslocamento do laser a partir das deflexões da sonda em relação à superfície (Figura 2.8). Conforme a superfície é varrida, as interações entre a sonda do AFM e as estruturas da superfície causam deflexões no cantiléver. Essas deflexões são medidas, posicionando-se na extremidade livre do dorso do cantiléver o laser, que é refletido em direção ao fotodetector. O sinal medido pelo fotodetector é então enviado para o software que controla as operações do AFM e convertido em mapas topográficos tridimensionais ou de propriedades físicas da amostra ^[102,103].

O princípio de funcionamento do AFM é baseado na detecção de forças entre a sonda e a superfície da amostra em estudo. Essas forças dependem da natureza desse par, da distância entre eles, da geometria da ponta e de qualquer contaminação que houver sobre a superfície da amostra. Durante o processo de varredura, os átomos localizados na extremidade da ponta interagem com os átomos da superfície da amostra ^[104,105].

Além de produzir imagens topográficas, o AFM também é capaz de investigar propriedades mecânicas, tais como: adesão, elasticidade, interações de forças magnéticas e eletrostáticas. As forças de adesão microscópicas (melhor detalhada nas próximas seções) têm influência em diversos eventos físicos, químicos e biológicos, desde a replicação de DNA até a

Figura 2.8: Esquema de funcionamento do Microscópio de Força Atômica.



Fonte: Imagem cedida pela Profª Luciana Alencar.

ação de fármacos no corpo humano ^[106].

AFM é uma técnica de microscopia de alta resolução, chegando à escala atômica em amostras duras e escala molecular em amostras macias, como é o caso de células e tecidos ^[103]. Possui aplicações em várias áreas de pesquisa, incluindo Física, Biofísica, Bioquímica, Química, Ciência dos Materiais, Nanotecnologia, Medicina, Biologia entre outras, sendo possível obter resultados que compreendem a caracterização de polímeros, nanoestruturas e outros materiais, bem como imagens da estrutura de moléculas biológicas, componentes celulares, células e tecidos, trabalhos com nanolitografia e manipulação atômica do tipo célula única (*single-cell*) e também estudos de estrutura do DNA ^[107].

Na próxima seção, serão explorados conceitos a respeito de algumas forças que atuam durante a interação entre a sonda e a amostra.

2.3.1 Forças de Interação Sonda-Amostra

Existem quatro forças distintas na natureza. Duas delas são as interações fortes e fracas que atuam entre nêutrons, prótons, elétrons e outras partículas elementares. Essas duas forças têm um alcance de ação muito curto, da ordem de angstroms. As outras duas forças são as interações eletromagnéticas e gravitacionais, que possuem uma ação mais ampla, de distâncias subatômicas (forças eletromagnéticas) até distâncias de escala astronômica (forças gravitacio-

nais) ^[108].

As interações atômicas são regidas por forças eletromagnéticas. À medida que os átomos se aproximam entre si, as forças de interação, que são a princípio atrativas, aumentam sua intensidade de forma rápida. Essas forças atrativas são chamadas forças de Van der Waals. No entanto, quando as distâncias são suficientemente pequenas, as forças interatômicas se tornam fortemente repulsivas ^[109]. As forças de interação entre a ponta e a amostra, em função da distância entre elas, estão associadas a um potencial do tipo Lennard-Jones, que correspondem às interações entre duas moléculas ou dois átomos. O potencial de Lennard-Jones pode ser definido pela Equação 2.1:

$$U(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (2.1)$$

onde ϵ corresponde à profundidade do poço de potencial (conectado com a força de interação) e σ é a distância interatômica onde o potencial é zero ^[110]. Na Figura 2.9, temos a curva que representa a energia potencial descrita pelo potencial de Lennard-Jones.

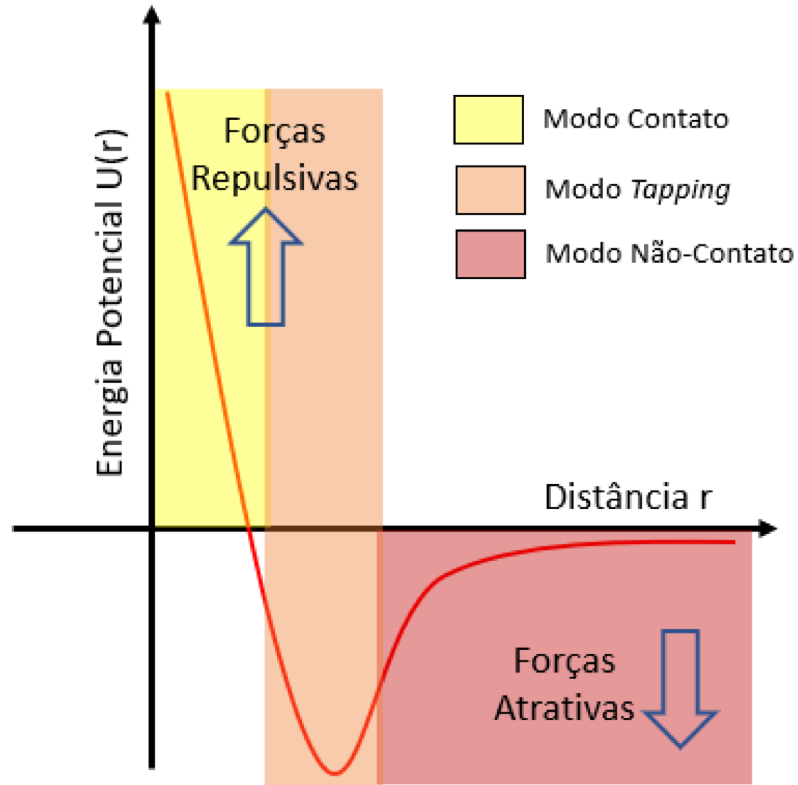
Ao discutirmos sobre o funcionamento de um AFM, é prioritário que as forças que atuam entre sistemas microscópicos em distâncias muito pequenas sejam conhecidas. Essas regem o princípio de funcionamento do AFM. Em seguida, falaremos de algumas dessas forças de forma individual.

Forças de Van der Waals

A natureza das forças Van der Waals é elétrica, surgindo devido à polarização das moléculas que ocorrem através de campos elétricos de cargas vizinhas ou dipolos permanentes. Estas forças são, na verdade, uma combinação de três forças: i) de orientação; ii) de indução e iii) de dispersão ^[105, 107].

As forças de orientação foram descritas matematicamente em 1921 pelo físico Willem Hendrik Keesom ^[111]. Essa força é o resultado da interação entre dois dipolos permanentes e depende da orientação relativa dos dipolos. Analisando a interação entre diversos dipolos, mensuramos a atração e repulsão entre eles. Se todas as orientações fossem realizadas com igual frequência, a média da polarização seria nula. Keesom baseou-se na estatística de Boltzman, a qual afirma que o sistema busca organizar as orientações dos dipolos utilizando a menor energia possível, de maneira que, quanto menor a energia para orientar os dipolos, menor a temperatura do sistema ^[112]. Keesom determinou a energia potencial média U_K de todas as posições de

Figura 2.9: Curva teórica do potencial de Lennard-Jones. A região em vermelho corresponde ao domínio de forças atrativas. A região em amarelo corresponde ao domínio de forças repulsivas. A região em laranja corresponde à interface entre elas. Os modos de operação do AFM atuam em cada região deste potencial, de acordo com a legenda.



Fonte: Próprio autor.

interação dipolo-dipolo da seguinte maneira:

$$U_K = -\frac{C_K}{r^6} = -\frac{2}{3} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6} \frac{1}{k_B T}, \quad (2.2)$$

onde r é a distância entre as moléculas e C_K é uma constante definida pelos parâmetros: μ_1 e μ_2 , que são os momentos de dipolos das moléculas, k_B , que é a constante de Boltzmann e T , que é a temperatura.

Para pequenas distâncias e/ou baixas temperaturas ($k_B T \leq \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}$), a equação 2.2 não é válida. Nessas condições, as moléculas se orientariam de forma paralela, ao longo da linha que as une, resultando em uma energia potencial da forma:

$$U_K = -2 \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}. \quad (2.3)$$

As equações 2.2 e 2.3 representam uma força atrativa, conhecida como *Efeito de Orien-*

tação ^[107,112].

As forças de indução são provenientes da interação entre uma molécula polar e uma molécula apolar. Também conhecidas como Forças de Debye, em homenagem ao físico e químico Peter Debye, devido aos seus estudos e descrição matemática do fenômeno ^[113]. Ao observar a equação 2.2, Debye verificou que essas forças não deveriam ser únicas, uma vez que, para altas temperaturas, a interação de atração entre as moléculas seria nula. De acordo com os experimentos de Van der Waals, entretanto, a interação atrativa não se anula em altas temperaturas ^[112].

O campo elétrico da molécula polar distorce a distribuição de cargas da nuvem eletrônica da molécula apolar, induzindo a formação de um dipolo e resultando em uma atração entre eles. Esse fenômeno pode ser descrito introduzindo uma constante α , chamada de polarização, na energia potencial média U_D . Considerando um campo elétrico externo de força F , a molécula de polarização α possui um momento de dipolo induzido M , definido como $M = \alpha F$. A sua energia média U_D será dada por:

$$U_D = -\frac{1}{2}MF = -\frac{1}{2}\alpha F^2. \quad (2.4)$$

Quando as duas moléculas estiverem próximas uma da outra (molécula 1 e molécula 2), será gerada uma força do tipo:

$$F = \frac{\mu_1}{r^3} \sqrt{1 + 3 \cos^2 \theta_1}, \quad (2.5)$$

onde μ_1 é o momento de dipolo da molécula 1 e θ é o ângulo formado entre o eixo do dipolo e a orientação da força do campo elétrico. Esse campo polariza a molécula 2, dando origem à uma energia potencial de Debye U_D , dada por:

$$U_D = -\frac{\alpha_2 \mu_1^2}{2 r^6} (1 + 3 \cos^2 \theta_1), \quad (2.6)$$

que será sempre atrativa, inclusive para temperaturas infinitamente altas. Tomando a média de todos os ângulos $\cos^2 \theta = \frac{1}{3}$, temos que:

$$U_D = -\alpha_2 \frac{\mu_1^2}{r^6}. \quad (2.7)$$

A ação da molécula 2 sobre a molécula 1 gera uma quantidade correspondente. Portanto, a

interação total das duas moléculas é obtida como:

$$U_D = -\frac{C_D}{r^6} = -\frac{\alpha_2\mu_1^2 + \alpha_1\mu_2^2}{r^6}, \quad (2.8)$$

Caso essas moléculas sejam do mesmo tipo, isto é, $\mu_1 = \mu_2 = \mu$ e $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha$, temos então que:

$$U_D = -\frac{C_D}{r^6} = -\frac{\alpha\mu^2}{r^6}, \quad (2.9)$$

onde C_D é uma constante definida por $\alpha\mu^2$. Essa equação representa o efeito de indução.

As forças de dispersão foram descobertas pelo físico teórico alemão Fritz London, durante seus estudos sobre atração entre átomos de gases nobres ^[112]; por esse motivo, também são chamadas de Forças de London. A força de dispersão é de natureza quântica e atua em todas as moléculas, independente de serem polares ou apolares ^[107].

Podemos considerar o elétron como um oscilador, em que sua posição em torno do núcleo do átomo não é fixa. Desta forma, existe uma probabilidade dos elétrons estarem distribuídos de forma assimétrica na nuvem eletrônica, criando zonas com densidades de cargas mais acentuadas que em outras. Esse fato dá origem a dipolos induzidos instantâneos. O campo gerado interage com as moléculas vizinhas, induzindo momentos de dipolos instantâneos, cujas interações são sempre atrativas ^[105, 107, 112, 114]. O potencial que corresponde à essas forças é dado por:

$$U_L = -\frac{3h\alpha_1\alpha_2}{2r^6} \frac{\nu_1\nu_2}{\nu_1 + \nu_2}, \quad (2.10)$$

onde $h\nu_1$ e $h\nu_2$ são os primeiros potenciais de ionização de cada molécula e h é a constante de Planck. As forças de dispersão são bastante relevantes pois atuam em todos os materiais, uma vez que todos os átomos possuem flutuações de elétrons ^[114].

Finalmente, podemos definir o potencial de Van der Walls, que é dado então como a soma das três contribuições (i, ii e iii):

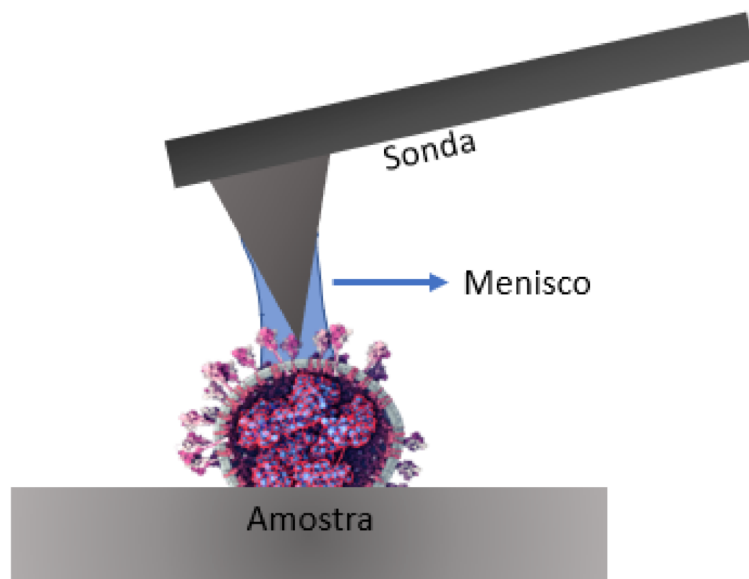
$$U_{vdw} = -\left(\frac{C_K}{r^6} + \frac{C_D}{r^6} + \frac{C_L}{r^6}\right). \quad (2.11)$$

Os dois primeiros termos da equação 2.11 contêm as energias Keesom e Debye. Esses termos atuam apenas entre moléculas polares e são chamados de contribuição polar. O terceiro termo é chamado de contribuição de dispersão, atuando entre todas as moléculas ^[107].

Força de Capilaridade

Em condições ambientes, sempre haverá uma camada de contaminação cobrindo a superfície da amostra. Essa camada, que depende da umidade do ambiente, é composta por contaminantes do ar e/ou restos gerados na preparação da amostra. Durante o processo de varredura, quando a sonda se move em direção à superfície da amostra, em uma certa altura, a sonda é puxada fortemente para dentro da camada, por atração de capilaridade. Nessa situação, as forças atrativas são muito mais fortes do que quando não há a camada contaminante. Esse efeito é observado também durante o processo de retração da ponta; a atração de capilaridade retém fortemente a ponta na superfície da amostra ^[115]. Quando a ponta está em contato com a superfície da amostra, a força de capilaridade forma meniscos entre a ponta e amostra, conforme a Figura 2.10.

Figura 2.10: Ilustração esquemática mostrando as forças presentes durante a geração de imagens de AFM no ar. A presença de um menisco aumenta as forças de atração entre a ponta e a amostra.



Fonte: Próprio autor.

A força de menisco ou força capilar é causada pela diferença de pressão entre o líquido e a fase de vapor circundante ^[107,116]. Existe também uma influência da tensão superficial do líquido ^[107]. A equação 2.12 descreve a força de capilaridade entre um indentador cônico e uma superfície plana:

$$F_c = -\pi b^2 \Delta p + 2\pi b \Delta \gamma \cos(\alpha - \theta), \quad (2.12)$$

onde Δp é a diferença de pressão entre a parte interna e externa do menisco, $\Delta \gamma$ é a tensão superficial do líquido. α é o meio-ângulo de abertura da sonda cônica, b é o raio do menisco e θ é o ângulo de contato^[117]. Uma forma de evitar a formação de forças de capilaridade e meniscos é a realização de medidas em meio líquido.

Forças de Adesão

A definição de adesão em seu contexto científico é dada pela ASTM D907 como “o estado no qual duas superfícies são postas em contato por forças de valência ou forças de ligação interna, ou as duas”. A adesão fundamental se refere a forças entre átomos na interface entre duas superfícies; esta adesão também é conhecida como adesão real (*true adhesion*)^[118].

As forças que agem entre duas superfícies que compõem a adesão podem ser atribuídas ao fato de que, nestas regiões, átomos e moléculas possuem reatividade diferentes daquela apresentada em estado sólido. Nesse caso, a célula unitária do material experimenta um campo de força uniforme, devido à interação com as células unitárias vizinhas. Contudo, se a superfície é criada através de uma divisão do sólido, as forças que atuam nas células unitárias não são mais uniformes. Devido a interações perdidas, as células unitárias estão numa condição energética desfavorável. Ou seja, a energia livre total do sistema aumenta. Este aumento é denominado de “energia livre de superfície”.

Quando duas superfícies estão em contato, os termos “energia de interface” ou “tensão de interface” são utilizados. Estes termos são equivalentes para líquidos. Para sólidos, o conceito de tensão superficial não é claro e a “energia de interface” e a “tensão de interface” não são necessariamente iguais. Algumas características dos sólidos, como a reduzida mobilidade de átomos e moléculas e a morfologia irregular da superfície, originam tensões de superfície heterogêneas. Portanto, é mais usual, nestes casos, utilizar o termo “energia de superfície”^[119].

Para correlacionar as forças de adesão em medidas de AFM, é necessário explanar sobre a mecânica de contato, que descreve o contato entre uma ponta nanométrica de AFM que indenta a superfície da uma amostra, de maneira controlada.

Uma vez que o cantiléver funciona como uma mola, a força aplicada por ele obedece à lei de Hooke:

$$F = k.d, \quad (2.13)$$

onde k é a constante elástica do cantiléver e d é a sua deflexão.

A lei de Hooke é aplicada de forma satisfatória para amostras que apresentam comportamento linear, ou seja, superfícies rígidas. No entanto, para amostras que apresentam perfil viscoelástico, seu comportamento não é descrito adequadamente por esta equação. Superfícies “macias”(como as observadas na maioria dos materiais biológicos) se deformam de maneira não linear durante a indentação. Assim, este tipo de sistema passa a ser melhor descrito por uma relação do tipo ^[120]:

$$F \propto \delta^n, \quad (2.14)$$

onde F é em força externa, δ é a deformação do sistema e n é um expoente relacionado à geometria do indentador. A constante de proporcionalidade descreve, além de fatores geométricos, as propriedades elásticas do material. Trata-se, portanto, de um problema de contato mecânico entre duas superfícies.

O primeiro trabalho a abordar o problema do contato entre duas superfícies foi o de Heinrich Hertz ^[121], pesquisador pioneiro do campo da mecânica de contato. Uma relação por ele determinada foi o contato entre uma superfície plana e uma esfera, pressionadas entre si, com uma carga normal P . Esse contato ocorria dentro de uma área circular, com raio de contato a , de acordo com a seguinte equação:

$$a = \left(\frac{PR}{K} \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (2.15)$$

onde R é o raio da esfera e K é uma constante que relaciona os módulos de Young da esfera e da superfície (E_1 , E_2), considerando a razão de Poisson da esfera e da superfície (ν_1 , ν_2), respectivamente. O parâmetro K é descrito por:

$$K = \frac{4}{3} \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right). \quad (2.16)$$

Na literatura, o modelo de Hertz tem sido amplamente utilizado no estudo das propriedades mecânicas de superfícies macias, como, por exemplo, as células humanas ^[106], tendo, como base, ensaios de força com o AFM. Essa teoria descreve a área de contatos macroscópicos

suaves, sendo aplicada somente em materiais elásticos, lineares, homogêneos, isotrópicos e que não apresentam forças de superfície atrativas (adesão). A teoria de Hertz também presume que o raio de contato é muito menor que o raio da esfera, de modo que a esfera pode ser aproximada como um parabolóide ^[122].

Os pesquisadores Johnson, Kendall e Roberts propuseram, em 1971, uma nova teoria, denominada JKR ^[123], que explicava a adesão entre dois corpos elásticos. O modelo JKR considera experimentos cujas áreas de contato são maiores do que as previstas pela teoria de Hertz. A equação 2.17 descreve o raio de contato entre uma esfera e uma superfície, considerando a ação da força de adesão entre elas:

$$a = \left(\frac{R}{K} (P + 3\gamma\pi R + \sqrt{6\gamma\pi RP + (3\gamma\pi R)^2}) \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (2.17)$$

onde γ é o trabalho das forças de adesão, realizado ao separar completamente o indentador da superfície. Essa teoria inclui a tensão de tração na área de contato, com carga normal mínima e com uma área de contato diferente de zero. Essa carga mínima pode ser chamada de força de *pull-off* ou força de adesão, dada por:

$$F_{ad}^{(JKR)} = -\frac{3}{2}\pi\gamma R. \quad (2.18)$$

Derjaguin, Muller e Toporov ^[124] elaboraram um modelo, chamado de DMT, que considerava a contribuição das forças adesivas no contato entre corpos elásticos. Para este modelo, considera-se que o perfil de contato permanece o mesmo considerado na teoria de Hertz. No entanto, há uma carga total maior devido à força de adesão. Esse fato equivale à interações atrativas na separação entre a esfera e a superfície. Para este modelo, o raio de contato a é dado por:

$$a = \left(\frac{R}{K} (P + 2\pi\gamma R) \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (2.19)$$

Desta forma, a força de adesão é descrita por:

$$F_{ad}^{(DMT)} = -2\pi\gamma R. \quad (2.20)$$

Quando as forças de superfície são de curto alcance em comparação com as deformações elásticas resultantes, o modelo JKR descreve a área de contato com precisão. Para o limite oposto

(isto é, materiais rígidos, pequenos raios esféricos e forças de adesão fracas e de longo alcance), o modelo DMT é mais adequado ^[125].

No processo de retração da ponta para longe da superfície da amostra, a ponta permanece em contato com a superfície até que a força do cantiléver supere a interação entre o par ponta-amostra. A força sentida pelo cantiléver é medida através da sua deflexão e a força de *pull-off force*, ou adesão, é definida como a força máxima de atração durante a retração da ponta saindo do contato com a superfície. De forma geral, as forças de adesão F_{ad} são uma combinação de forças eletrostáticas F_{el} , de van der Waals F_{vdW} , de capilaridade F_{cap} e forças devido a ligações químicas F_{quim} ^[107], de acordo com a equação:

$$F_{ad} = F_{el} + F_{vdW} + F_{cap} + F_{quim}. \quad (2.21)$$

2.3.2 Força de dupla camada em fluidos

A maioria das superfícies imersas em uma solução eletrolítica apresenta uma carga superficial. Com essas cargas superficiais, surge um gradiente de concentração no eletrólito chamado de camada dupla elétrica (EDL). Quando as superfícies se aproximam, ocorre uma interação devido à sobreposição de seus EDLs correspondentes. A interação EDL desempenha um papel crucial em muitos processos biológicos devido ao seu caráter de longo alcance. Exemplos desses processos são a adesão celular ^[126] e estabilidade da estrutura da proteína ^[127].

No cenário do AFM, quando a ponta e a amostra se aproximam elas estão sujeitas a sofrerem efeitos da força de dupla camada elétrica (EDL). A abordagem mais comum para calcular essa força é resolver a equação de Poisson-Boltzmann para o potencial eletrostático. Esta é uma equação diferencial não linear de segunda ordem que não pode ser resolvida analiticamente. No entanto, diferentes métodos de aproximações podem ser aplicados para obter expressões fáceis de manusear. Uma dessas aproximações é baseada na seguinte expressão para a energia de interação EDL por unidade de área de dois meios-espacos paralelos e planos ^[128]:

$$W_{EDL}(D) = \frac{2\sigma_1\sigma_2\lambda_D}{\varepsilon\varepsilon_0} e^{-\frac{D}{\lambda_D}}, \quad (2.22)$$

em que ε é a constante dielétrica do meio, ε_0 permissividade do vácuo, σ_1 e σ_2 são as densidades superficiais de carga de ambas as superfícies, D é a separação e λ_D , conhecido como comprimento de Debye, é o comprimento de decaimento da interação, definido como:

$$\lambda_D = \left(\frac{\varepsilon\varepsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.23)$$

em que $K_B T$ é o fator Boltzmann, c_i e z_i são os valores de concentração e valência do i -ésimo tipo de íon presente na solução, e é a carga do elétron. A energia de interação por unidade de área de dois meios-espacos paralelos planos, W , que é dado pela equação 2.22, pode ser relacionado à força entre duas superficies curvas, F , pela aproximação de Derjaguin ^[128], como:

$$F(D) = \left[\frac{2\pi R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right] W(D), \quad (2.24)$$

em que R_1 e R_2 são os raios de curvatura das respectivas superficies. Se um desses raios for muito maior que o outro, a equação se reduz a:

$$F(D) = 2\pi R W(D). \quad (2.25)$$

Na maioria dos experimentos de AFM, a amostra é considerada plana e homogênea quando comparada com a ponta, que é considerada uma esfera de raio R_t . Portanto, a força EDL entre uma ponta de AFM e uma superfície plana separada por uma distância D , e com densidades de carga superficial σ_t e σ_s , respectivamente, pode ser expresso como:

$$F_{EDL}(D) = \frac{4\pi R_t \sigma_t \sigma_s \lambda_D}{\varepsilon\varepsilon_0} e^{-\frac{D}{\lambda_D}}. \quad (2.26)$$

2.3.3 Modos de operação do AFM

Como as interações entre a sonda de AFM e a superfície da amostra podem ter natureza repulsiva ou atrativa, o AFM pode operar em diferentes modos, cada um atuando em uma região do seu potencial de interação (Figura 2.9). Os modos de operação (ou varredura) mais comuns no AFM são: modo contato, modo não-contato, contato intermitente (*tapping mode*) e espectroscopia de força.

No modo de contato, uma força é aplicada pelo AFM na amostra e, portanto, a interação entre a sonda AFM e a amostra é repulsiva. Conforme o sonda traça a superfície da amostra, a força de contato faz com que o cantiléver se deflexione ao perceber mudanças na topografia da amostra. O modo contato é indicado para amostras mais rígidas pois a varredura é feita sempre com a ponta em contato físico com a superfície da amostra e, dependendo do tipo de amostra a ser analisada, a força aplicada deve ser cuidadosamente controlada ^[129].

No modo não-contato, o cantiléver é oscilado a uma certa distância acima da superfície da amostra. Aumentando a separação entre a sonda e a amostra, as forças que contribuirão para a deflexão do cantiléver e a geração de mapas são as forças de interação de longo alcance, como forças eletrostáticas e forças de dipolo magnético [115].

No modo de contato intermitente (*tapping mode*), o cantiléver oscila em uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, enquanto varre a amostra. A sonda é aproximada até que começa a realizar contato intermitente com a amostra (realizando pequenas batidas), eliminando as forças de arraste laterais da sonda com a amostra, permitindo a varredura em amostras macias e com pouca adesão ao substrato. A amplitude de oscilação da sonda durante a varredura é suficiente para que o cantiléver tenha força restauradora que impede que a sonda fique presa na camada de contaminação (forças de menisco ou eletrostáticas) presente na superfície da amostra, especialmente em medidas feitas em ar [129].

A fim de discorrer sobre o modo de operação de espectroscopia de força, precisamos detalhar o processo de obtenção das curvas de força *versus* deflexão do AFM, crucial para aquisição de informações que vão além da topografia, especialmente as propriedades mecânicas em nanoescala. Na próxima seção, detalharemos os conceitos de espectroscopia de força.

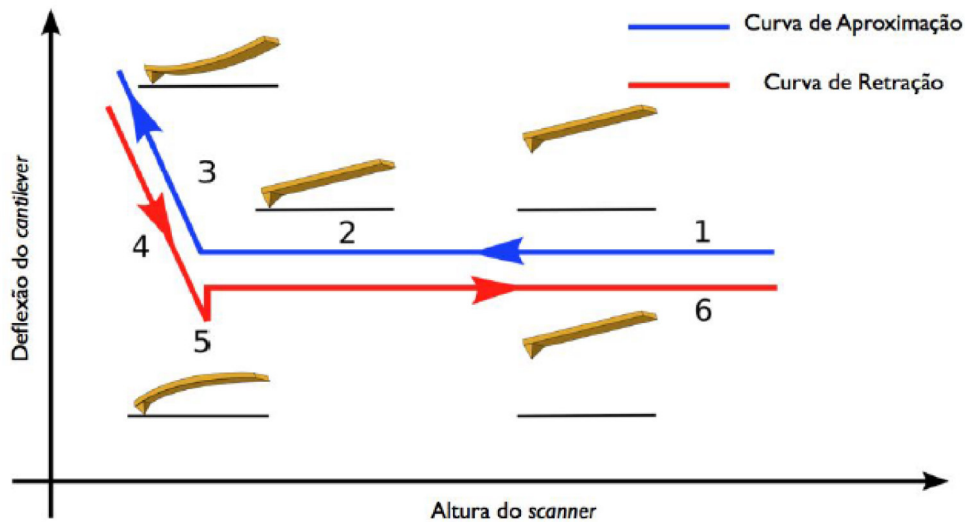
2.3.4 Espectroscopia de Força

Diversas informações podem ser obtidas a partir da relação entre a distância sonda-amostra e as forças medidas nessas distâncias. A análise do gráfico no plano força *versus* distância é chamado de espectroscopia de força.

A curva de força-distância $F(D)$ obtida através de uma medida de AFM nos mostra o comportamento da interação ponta-amostra. A Figura 2.11 representa a força de interação ponta-amostra com diferentes modos de operação AFM.

Curva força-distância idealizada que descreve um ciclo de retração e aproximação da ponta do AFM em relação à superfície. Este ciclo é continuamente repetido durante a varredura. A Figura 2.11 ilustra as curvas de aproximação e retração e o comportamento do cantiléver em cada porção da curva. A ponta do AFM está se aproximando da superfície da amostra (1) A ponta AFM aproxima-se da superfície. (2) O contato inicial é mediado por forças atrativas, que puxam a ponta em direção à superfície (*jump to contact* - salto para o contato). (3) A ponta exerce uma força constante na superfície que leva a uma indentação da amostra e deflexão cantiléver. (4) A ponta tenta retrair-se e se soltar da superfície. (5) Várias forças adesivas entre a amostra

Figura 2.11: Típica curva de força produzida por um Microscópio de Força Atômica. Para cada parte da curva de aproximação e de retração está representado o movimento da sonda.



Fonte: Reproduzido de Alencar (2010). [106].

e a ponta do AFM, no entanto, dificultam a retração da ponta. Essas forças adesivas podem ser medidas diretamente da curva força-distância. (6) A ponta perde o contato com a superfície da amostra ao superar as forças adesivas.

Em distâncias curtas, o cantiléver detecta principalmente forças interatômicas: forças de Born⁶ repulsivas e de curto alcance (aprox. 0,1 nm) e as forças de van der Waals atrativas de longo alcance (até 10 nm). Em distâncias muito pequenas entre a ponta e amostra, uma força repulsiva aparece entre os átomos da ponta e os da amostra. Esta força ocorre entre quaisquer dois átomos ou moléculas que se aproximam de tal maneira que seus orbitais de elétrons começam a se sobrepor. Este é um resultado do chamado Princípio de Exclusão de Pauli [131, 132]. Quando essa força repulsiva é predominante em uma configuração de AFM, a ponta e a amostra são consideradas em “contato” (regime de modo de contato). O potencial total é obtido assumindo-se um potencial atrativo, $\frac{A}{r^6}$, e um potencial repulsivo, $\frac{B}{r^{12}}$.

As curvas de força fornecem informações valiosas sobre as propriedades do material local, tais como elasticidade, dureza e carga superficial, além da adesão. O resultado de uma medida de força é uma medida da corrente de fotodiodo I_{PSD} versus a posição de altura do piezoelétrico Z . Para obter uma curva de força versus distância, o I_{PSD} e o Z têm que ser convertidos

⁶As forças de Born são forças que atuam sobre átomos em uma rede iônica. Isto é, como os íons têm tamanho finito, as interações elétron-elétron e núcleo-núcleo ocorrem e dão origem a forças de repulsão e potencial eletrostático, ambas chamadas forças de Born [130].

em força e distância ^[133]. Portanto, dois parâmetros precisam ser conhecidos: a sensibilidade (*sensitivity*) e a distância zero. Na Microscopia de Força Atômica, ambos os parâmetros devem ser inferidos da própria curva de força e não através de um método independente. Praticamente, a parte linear do modo contato é considerada como distância zero e sua inclinação é a *sensitivity* ^[107].

Para obtenção desse gráfico, a ponta é aproximada ao longo do eixo vertical (eixo Z) e a deflexão de cantiléver é medida. A força, a partir da interação entre a ponta e a amostra, é dada pela lei de Hooke de acordo com a equação 2.13. A constante de mola do cantiléver é dependente de suas propriedades físicas, de acordo com:

$$k = \frac{Et^3w}{4l^3}, \quad (2.27)$$

onde E é o módulo de Young (referente à elasticidade) e t , w e l a espessura, largura e comprimento, respectivamente, do cantiléver. No entanto, deve-se ter em mente que esta equação dará apenas um valor aproximado para a constante de mola de um cantiléver retangular, devido à formação das extremidades e imperfeições no processo de fabricação ^[134].

A distância controlada durante a medida não é a distância real entre a amostra e a ponta (D), mas a distância Z entre a superfície da amostra e a posição de repouso do cantiléver. Estas duas distâncias diferem por causa da deflexão do cantiléver d_c e por causa da deformação da amostra d_a . Essas quatro quantidades estão relacionadas da seguinte forma:

$$D = Z - (d_c + d_a). \quad (2.28)$$

A única distância que se pode controlar, ao fazer a medida, é o deslocamento do piezoelétrico (Z), já que os valores de deflexão do cantiléver e as deformações da amostra não são conhecidos de antemão. A curva de força obtida através do AFM não reproduz apenas interações ponta-amostra, mas sim o resultado de duas contribuições: a interação ponta-amostra supramencionada e a força elástica do cantiléver, obtida pela equação 2.13. ^[135].

Para o caso de uma ponta perfeitamente elástica com uma extremidade esférica e uma amostra planar feita do mesmo material, isto é, descrito pelo modelo de Hertz ^[121], a força é dada por:

$$F = \delta^{\frac{3}{2}} 2E \frac{\sqrt{R}}{3} (1 - \nu^2). \quad (2.29)$$

Aqui, δ é a indentação, E o módulo de Young, R o raio da ponta e ν é a razão de Poisson.

Ao iniciar o contato, a distância zero equivale a uma distância interatômica, isto é, o ponto de contato entre a sonda e a amostra. Isso, no entanto, não descreve adequadamente a situação. Por essa razão, é mais apropriado usar a indentação em vez da distância, quando estabelecido o contato.

As forças, no contato inicial, são complexas e não totalmente compreendidas, mas incluem forças de van der Waals (vdW) atrativas e capilares. Se a amostra for movida ainda mais perto da ponta, a força aumenta ao longo da linha diagonal. Se a amostra for movida para baixo, retirando a ponta da amostra, haverá histerese na curva devido a forças de atração entre a ponta e a amostra. A força diminui ao longo da linha diagonal abaixo da linha de *zero force*. Eventualmente, chega-se a um ponto em que a força é mínima e a ponta se desprende. A força, no ponto de descolamento, é conhecida como a força de *pull off* [136]. A maioria das imagens de AFM é realizada no regime repulsivo, com uma força repulsiva entre 10 e 100 nN, e é conhecida como imagem em modo de contato [131,132].

As superfícies medidas em ar contêm uma pequena quantidade de água da umidade do ar, entre outros contaminantes orgânicos. Assim, um menisco se forma entre a ponta e a amostra. Este menisco resulta em uma força de adesão ou capilar atrativa relativamente forte da ordem de 100 nN [136], além da força de vdW atrativa tipicamente da ordem de 10 nN e forças de contato entre ponta e amostra repulsivas de 10-100 nN [131].

2.3.5 Fundamentos de Reologia

A Reologia é uma ciência que lida com a deformação e o fluxo da matéria e com as propriedades mecânicas de materiais. As propriedades reológicas são expressas através de modelos e os valores das constantes incluídas no modelo são características do material. Esses modelos representam as principais peculiaridades do comportamento desses materiais. Esse comportamento é uma relação entre forças e mudanças de forma. Os modelos fornecem uma formulação matemática de tal dependência e conta como principal método da reologia, sendo úteis na descrição qualitativa ou quantitativa dos resultados experimentais do comportamento mecânico de diferentes materiais. O modelo é criado, não para refletir todas as características, mas sim as mais importantes de um objeto. Os conceitos de líquidos e sólidos são modelos e sua representação formal (matemática) é originada das obras clássicas de Isaac Newton e Robert Hooke [137,138].

Em 1678, Robert Hooke desenvolveu sua teoria da elasticidade. Ele propôs que “o poder de qualquer mola possui a mesma proporção da sua tensão”; ou seja, dobrando-se a tensão, o mesmo ocorre à extensão. Isso forma a premissa básica por trás da teoria da elasticidade clássica. No outro extremo do espectro, Isaac Newton deu atenção aos líquidos e, em sua obra “*Principia*”, publicado em 1687, aparece a seguinte hipótese associada com o fluxo de cisalhamento simples: “A resistência que surge da falta de deslizamento das partes do líquido, sendo as outras coisas iguais, é proporcional à velocidade com que as partes do líquido são separadas umas das outras”^[138]. Essa falta de deslizamento é o que hoje chamamos de *viscosidade*. É sinônimo de fricção interna e é uma medida de resistência ao fluxo. A força por unidade de área necessária para produzir o movimento é proporcional ao gradiente de velocidade (ou taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$); ou seja, se duplicarmos a força, o gradiente de velocidade dobra. A força dividida pela área pode ser normalizada como tensão^[138], tal que:

$$\sigma = \frac{F}{A}. \quad (2.30)$$

A constante de proporcionalidade η é chamada de coeficiente de viscosidade, de forma que a relação é dada por:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}. \quad (2.31)$$

A deformação é definida como a razão entre a variação do tamanho/comprimento do objeto (ΔL) e o seu comprimento original L , tal que:

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L}. \quad (2.32)$$

Dessa forma, é possível dizer que a tensão é proporcional à deformação. A constante de proporcionalidade da relação tensão-deformação no regime elástico de deformação é chamada de *módulo de Young* E ^[139,140], tal que:

$$\sigma = E\epsilon. \quad (2.33)$$

Experimentalmente, para pequenos valores de tensão, observa-se que a tensão e a deformação são proporcionais. Por isso define-se o módulo de Young como está escrito na eq. 2.33.

De acordo com a Reologia, materiais sofrem deformações quando uma força de tração, compressão ou cisalhamento é aplicada. A força de tração alonga, a de compressão compacta

e a de cisalhamento torce. Após a remoção da força aplicada, uma amostra elástica retorna à sua forma original e, se isso não acontece, a amostra é parcialmente ou totalmente plástica. Em muitos casos, as amostras mostram uma *deformação elástica*, enquanto a força aplicada é pequena e, à medida que a força se torna maior, a contribuição da deformação plástica aumenta gradualmente ^[141].

Durante uma deformação elástica, as ligações covalentes e não covalentes que seguram os átomos no corpo da amostra não são quebradas, mas deslocadas de sua posição de equilíbrio, isto é, deformadas devido à aplicação de uma força externa. No entanto, quando há a remoção da força, todas as ligações deformadas retornam às suas posições de equilíbrio, recuperando a forma original do objeto ^[142, 143]. Se as ligações que mantêm a amostra em uma forma fixa são fracas ou se a força aplicada é grande, ou seja, sob um grande regime de deformação, algumas das ligações covalentes ou não covalentes são quebradas e, por isso, não retornam às posições de equilíbrio originais. Como resultado, a forma do material é permanentemente alterada. Tal deformação é denominada *deformação plástica*. A menos que todas as ligações sejam quebradas, a forma da amostra é parcialmente restaurada. A tensão do regime de deformação elástica é pequena para materiais como aço ou silício, mas grande para borracha ou plástico ^[141].

Técnicas baseadas em AFM são particularmente adequadas para estudos reológicos de materiais predominantemente elásticos ^[144, 145]. No caso mais simples, a deflexão de cantiléver pode ser usada para descrever a conformidade da superfície de uma maneira simples e qualitativa. Por exemplo, para um material rígido, essencialmente indeformável, a deflexão do cantiléver será equivalente ao deslocamento para baixo da cerâmica piezoelétrica, enquanto que, para materiais mais macios, a sonda comprimirá e recuará a amostra de tal forma que a deflexão do cantiléver será menor ^[134]. Interações sonda-superfície assumindo interações elásticas ideais são frequentemente usadas para determinar o módulo de Young do material através de variações do modelo Hertz já mencionado. A Microscopia de Força Atômica é usada com frequência em estudos onde as deformações elásticas são satisfatoriamente descritas por modelos idealizados ^[134, 146].

O cálculo do módulo de Young da amostra é realizado da seguinte forma: em uma primeira etapa, a curva de distância de força obtida na amostra mole é subtraída de outra que foi registrada em um substrato rígido. A curva resultante é chamada de curva de indentação, que basicamente indica a força necessária para empurrar a ponta até uma certa profundidade na amostra. A forma desta curva depende não apenas das propriedades elásticas da amostra, mas também

da geometria da ponta do AFM ^[147]. Para se obter o valor numérico do módulo de Young da amostra, é preciso ajustar a curva de deflexão recém-obtida com uma função que leva em conta também a geometria da ponta do AFM. As duas funções mais utilizadas são as de Hertz ^[121] e Sneddon ^[148]. O modelo de Hertz descreve a deformação elástica de duas esferas, enquanto o modelo de Sneddon explica outras geometrias, como pontas cônicas ou paraboloidais, contra uma amostra plana. A equação que determina a força F requerida para indentar a ponta a uma dada profundidade (δ) para geometria cônica é dada pela equação:

$$F(\delta) = \frac{2\tan(\alpha)}{\pi} E' \delta^2, \quad (2.34)$$

e para paraboloidal é

$$F(\delta) = \frac{4\sqrt{R}}{3} E' \delta^{1.5}, \quad (2.35)$$

em que α é o ângulo de abertura da ponta e R seu raio de curvatura. E' corresponde ao módulo de Young reduzido que está relacionado ao módulo de Young da amostra E por:

$$\frac{1}{E'} = \frac{1 - \nu^2}{E}, \quad (2.36)$$

quando é possível supor que o valor numérico de E da amostra é muito menor que o E da ponta do AFM ^[149].

A constante de Poisson ν é a razão entre a deformação axial e a deformação transversal em um material elástico submetido a um estresse uniaxial ^[149]. Na mecânica de corpos deformáveis, a tendência de um material se expandir ou encolher em uma direção perpendicular à direção de uma força aplicada é conhecida como *efeito de Poisson* ^[150]. É um fato bem conhecido hoje que seu valor teórico⁷ para um material isotrópico é entre -1 e 0.5 ^[153, 154].

A rigidez da amostra está relacionada ao seu módulo de Young de acordo com a equação:

$$k_a = \frac{3}{2} a E_{total} \quad (2.37)$$

com

$$E_{total} = \frac{3}{4} \left(\frac{(1 - \nu_a^2)}{E_a} + \frac{(1 - \nu_p^2)}{E_p} \right), \quad (2.38)$$

⁷Materiais com razão de Poisson negativa demonstram um comportamento contra-intuitivo e expandem lateralmente quando esticados em uma direção ou vice-versa. Um sólido com coeficiente de Poisson próximo a -1 seria o oposto da borracha e seria altamente resistente a deformações de cisalhamento, porém fácil de deformar-se volumetricamente ^[151, 152]. Esses materiais são chamados de materiais auxéticos.

onde ν_p , E_p , ν_a e E_a são o coeficiente de Poisson e o módulo de Young de ponta e amostra, respectivamente, E_{total} , o módulo de Young total, e a é o raio da superfície de contato entre a sonda e a amostra. Em muitos casos, a ponta é muito mais rígida do que a amostra. Se desprezarmos a deformação da ponta (Equação 2.37), teremos:

$$k_a = 2a \left(\frac{E_a}{1 - \nu_a^2} \right). \quad (2.39)$$

Várias teorias descrevem a deformação elástica da amostra. Diferenças nas relações entre a carga aplicada F e o raio de contato a ou a deformação d são devidas ao papel desempenhado pela adesão no sistema considerado. A tabela abaixo resume as relações entre o raio de contato, a deformação da amostra e a força de adesão de uma ponta esférica sobre uma superfície plana de acordo com as três teorias mais utilizadas. Essas teorias foram desenvolvidas por Hertz^[121], Johnson-Kendall-Roberts (JKR)^[155] e Derjaguin–Muëller–Toporov (DMT)^[156].

Tabela 2.1: Relação entre o raio de contato a , a deformação da amostra δ e a força de adesão F_{ad} para uma ponta esférica sobre uma superfície plana de acordo com as teorias de Hertz, JKR e DMT

| | Hertz | DMT | JKR |
|----------|---|--|--|
| a | $\sqrt[3]{\frac{RF}{E_{tot}}}$ | $\sqrt[3]{\frac{R}{E_{tot}}(F + 2\pi RW)}$ | $\sqrt[3]{\frac{R}{E_{tot}} \left(F + 3\pi RW + \sqrt{6\pi RWF + (3\pi RW)^2} \right)}$ |
| δ | $\frac{a^2}{R} = \left(\frac{F^2}{RE_{tot}^2} \right)^{1/3}$ | $\frac{a^2}{R} = \frac{(F + 2\pi RW)^{2/3}}{\sqrt[3]{RE_{tot}^2}}$ | $\frac{a^2}{R} = \frac{2}{3} \sqrt{\frac{6\pi Wa}{E_{tot}}}$ |
| F_{ad} | 0 | $2\pi RW$ | $\frac{3\pi RW}{2}$ |

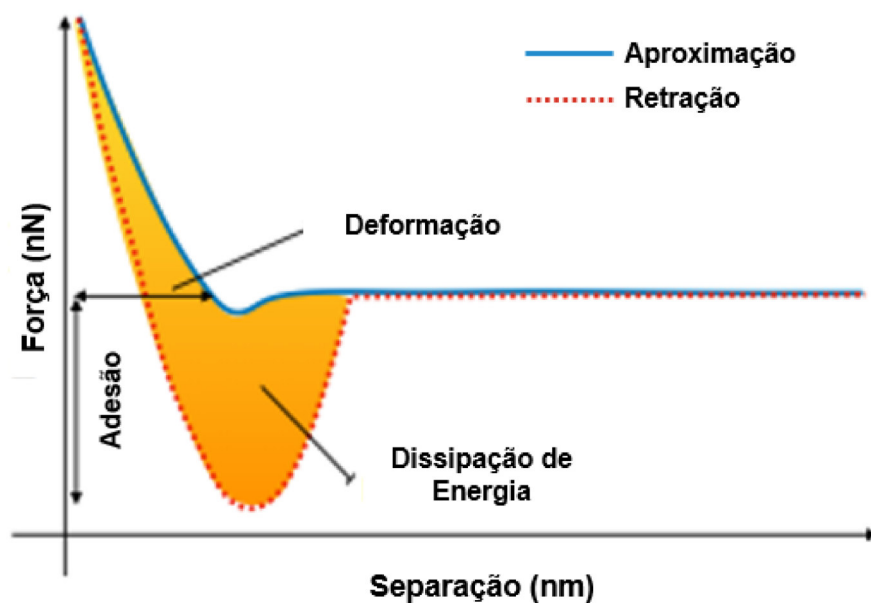
Fonte: Reproduzido de Butt (2005).^[107]

No modelo de Hertz, a adesão da amostra é desconsiderada, enquanto as outras duas teorias levam em conta a parte externa (DMT) ou interna (JKR) da área de contato. Portanto, a teoria de Hertz só pode ser aplicada quando a força de adesão é muito menor que a carga máxima. Nas outras duas teorias, o trabalho de adesão W pode ser calculado a partir do *jump to contact*, se o raio da ponta R for conhecido. Então, é possível calcular como função do módulo de Young total E_{total} e finalmente obter E_{total} como uma função de δ , medida a partir da linha de contato. A teoria de JKR pode ser aplicada no caso de grandes pontas e amostras moles com uma grande adesão; a teoria de DMT, no caso de pequenas pontas e amostras rígidas com uma pequena adesão. Ambas as teorias são apenas aproximações^[107, 135].

Assim como o módulo de Young fornece informações sobre a natureza elástica do material, a dissipação de energia fornece informações sobre a característica viscosa. A análise de

curvas força-distância, como na Figura 2.12, pode fornecer uma estimativa da energia dissipada no momento da indentação, calculando a área entre as curvas de aproximação e retração, chamada de ciclo de histerese, que é característico de processos não-conservativos. A área entre as curvas de aproximação e retração representa a quantidade de energia fornecida pelo cantiléver à amostra. Ao ser desfeito o movimento de indentação, quando a superfície da amostra retorna à posição inicial, prévia ao contato, essa energia é dissipada. ^[157].

Figura 2.12: Decomposição da curva de força em relação às informações obtidas a partir de cada porção da curva. A região em amarelo evidencia a dissipação de energia.



Fonte: Próprio autor.

A dissipação de energia é dada como o trabalho realizado pela sonda no ciclo de interação ponta-amostra. O cálculo leva em consideração o vetor de força de interação \vec{F} e o vetor deslocamento $d\vec{z}$, integrado no tempo do ciclo de interação, de acordo com a equação abaixo:

$$W = \int \vec{F} \cdot d\vec{z} = \int_T^0 \vec{F} \cdot \vec{v} dt, \quad (2.40)$$

onde W é a energia dissipada em cada ciclo e \vec{v} é a velocidade com que a ponta se aproxima ou se distancia da amostra. Como a direção de \vec{v} muda na metade de cada ciclo, essa integral se torna nula, caso as curvas de aproximação e retração coincidam. Portanto, essa energia é dada como a área entre as curvas de aproximação e retração (região preenchida de amarelo na Figura 2.12). No caso de amostras com deformação puramente elástica, não há histerese na região repulsiva entre as curvas (forças positivas). Nessa situação, as contribuições para a dissipação

de energia são predominantemente devido ao trabalho das forças adesivas. A dissipação é dada em unidades de elétron-volts (eV), sendo a energia mecânica dissipada durante um ciclo de interação ponta-amostra.

2.3.6 Viscoelasticidade e a matéria biológica

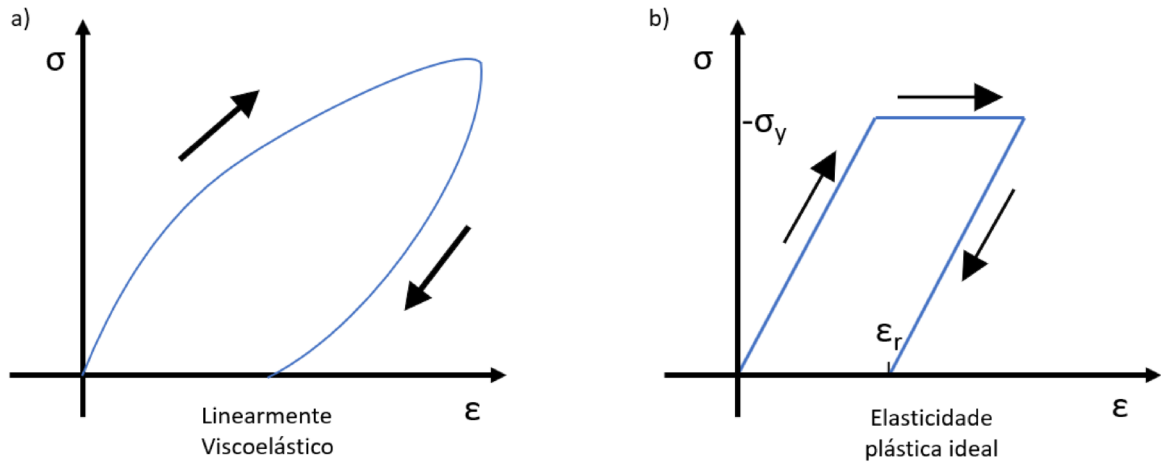
Em contraste com os materiais elásticos, um fluido viscoso sob tensão de cisalhamento obedece à expressão da viscosidade na equação 2.30. Na realidade, todos os materiais podem ser representados por uma variação da lei de Hooke de várias maneiras, por exemplo, exibindo características tanto viscosas quanto elásticas. Materiais viscoelásticos são aqueles para os quais a relação entre tensão e deformação depende do tempo ^[158].

A rigidez e a resistência dos materiais são frequentemente representadas por uma curva de tensão *versus* deformação, que é obtida aplicando uma taxa constante de deformação sobre o material (Figura 2.13). Se o material é linearmente elástico, a curva é uma linha reta com uma inclinação proporcional ao módulo de Young E . Para uma tensão suficientemente grande (a tensão de escoamento σ_y), tal material exhibe escoamento conforme mostrado na Figura 2.13b). Um material viscoelástico linear, por outro lado, dá origem a um gráfico de tensão-deformação curvado (Figura 2.13a)). O material viscoelástico é sensível ao tempo. Consequentemente, a curva à esquerda se torna mais íngreme se a taxa de deformação aumenta ^[158,159]. O material plástico/elástico não é sensível ao tempo, mas tem uma tensão limite. Sempre há uma deformação residual após a remoção da carga se a tensão limite for excedida ^[158,160].

Lakes ^[158] define alguns fenômenos em materiais viscoelásticos da seguinte forma:

1. Deslizamento (creep): quando a tensão é mantida constante e a deformação aumenta com o tempo;
2. Relaxamento: quando a tensão é mantida constante e a deformação diminui com o tempo;
3. Rigidez efetiva dependente da taxa de aplicação da carga;
4. Histerese (atraso de fase) referente a uma carga aplicada ciclicamente, levando a uma dissipação da energia mecânica;
5. Atenuação das ondas acústicas;
6. A recuperação de um objeto após um impacto é inferior a 100%;

Figura 2.13: Diagramas de tensão *versus* deformação a uma taxa de deformação constante seguida de retração de carga aplicada. O gráfico em a) mostra o comportamento de um material viscoelástico linear. O gráfico em b) mostra o comportamento de um material elástico-plástico ideal.



Adaptado de R. Lakes (2009) ^[158]

7. Durante o rolamento, ocorre resistência ao atrito.

Uma quantidade importante na determinação do comportamento geral de um material viscoelástico é o número de Deborah, D_e , que é um parâmetro adimensional definido como o valor normalizado do tempo de relaxamento (t) em relação ao tempo de duração τ de um determinado experimento ou evento de aplicação de carga ^[159], de acordo com a seguinte equação:

$$D_e = \frac{t}{\tau}. \quad (2.41)$$

O número de Deborah deve ser elevado para um comportamento do tipo sólido e baixo para o comportamento do tipo líquido. Quando o número de Deborah está próximo de 1, a resposta é viscoelástica. Se o experimento for realizado por um longo tempo, o material se comportará como um líquido (resposta viscosa), enquanto se o experimento for rápido terá um comportamento do tipo sólido (resposta elástica) ^[160]. Assim, para $D_e \ll 1$, o comportamento do material é "vítreo" ou rígido, e, para $D_e \gg 1$, o comportamento é "borrachudo" ou fluido.

Furmanski ^[159] enfatiza que o fator principal para fazer essa distinção é a escala de tempo relativa do relaxamento e do evento de aplicação da carga. Para alguns materiais, o relaxamento é extremamente rápido (como na água) e, apenas eventos de aplicação da carga muito rápidos, podem provocar uma resposta do tipo sólido. Para muitos sólidos, a transição é lenta (como no gelo ou rocha) e o material pode se comportar como um fluido apenas em escalas de tempo

muito longas (escalas geológicas). Os materiais que experimentam um relaxamento ao longo das escalas de tempo compatíveis para biomateriais, são considerados viscoelásticos, e o valor de D_e e a resposta qualitativa do material dependerão de como a carga será aplicada bem como das características desse material ^[159].

Todos os materiais exibem alguma resposta viscoelástica. Em metais comuns, como aço ou alumínio, assim como no quartzo, à temperatura ambiente e com pequenas deformações, o comportamento não se desvia muito do comportamento dos materiais linearmente elásticos. Polímeros sintéticos, madeira e tecido biológico, bem como metais, em alta temperatura exibem grandes efeitos viscoelásticos. Em algumas aplicações, mesmo uma pequena resposta viscoelástica pode ser significativa. Para ser completa, uma análise mecânica envolvendo esses materiais deve incorporar seu comportamento viscoelástico ^[158,161].

A matéria biológica se comporta tanto como um sólido elástico quanto como um fluido viscoso e, portanto, são consideradas viscoelásticas. Esses materiais não podem ser ajustados usando modelos clássicos de elasticidade ou viscosidade ^[162]. A caracterização mecânica desses sistemas (em particular as propriedades dependentes do tempo) desempenha um papel fundamental na compreensão da dinâmica da matéria viva, por exemplo, as respostas das células a vários estímulos externos e vias de sinalização celular ^[163,164]. O monitoramento da variação nas propriedades mecânicas das células também é importante na descoberta e avaliação da eficiência de novos medicamentos ^[165,166].

O AFM tem sido empregado para medir propriedades mecânicas de uma ampla variedade de matérias biológicas, desde bactérias, fungos, células cancerosas ^[167], células-tronco ^[168], osteoblastos, fibroblastos ^[169], leucócitos, eritrócitos até observação de células em diferentes estágios do ciclo celular e da sua interação com medicamentos ^[170–172]. Um amplo espectro de experimentos é possível explorando e manipulando a interação entre a ponta e a amostra de forma quantitativa. A elasticidade é mais frequentemente medida com pontas cônicas AFM. As pontas esféricas dão origem a medidas de elasticidade com valores maiores do que as pontas cônicas, provavelmente por conta do aumento da área de superfície de contato. Nos últimos anos, alguns métodos, incluindo a Microscopia de Força Atômica, assim como aspiração por micropipeta ^[173], pinças óticas ^[174], tensor óptico ^[175] etc. foram propostos para medir as propriedades mecânicas de células vivas. Entre estes métodos, a nanoindentação ou indentação baseada em AFM é uma ferramenta interessante para medir as propriedades mecânicas de células individuais e outros tipos de sistemas biológicos, incluindo propriedades elásticas e viscoelásticas ^[176–178].

Em testes de indentação baseados em AFM, a medição da profundidade e força de indentação depende do deslocamento da ponta e da deflexão do cantiléver. Em comparação com outros métodos, o AFM é mais vantajoso com base em sua capacidade de obter mapas da superfície da amostra em alta resolução enquanto mede a indentação da amostra. A combinação de imagem e espectroscopia de força fornece informações sobre como a estrutura da superfície celular afeta a elasticidade e a viscoelasticidade. No entanto, as medições dependem do formato da ponta, que não pode ser determinado durante a varredura da amostra; ou seja, a escolha prévia da sonda a ser utilizada é de grande importância para o resultado final da medida. As medidas em AFM estão se desenvolvendo rapidamente e novos projetos instrumentais e modificação dos modelos teóricos associados poderão garantir uma forma mais eficaz de medir a elasticidade e viscoelasticidade para uma ampla variedade de amostras biológicas ^[162, 166, 179].

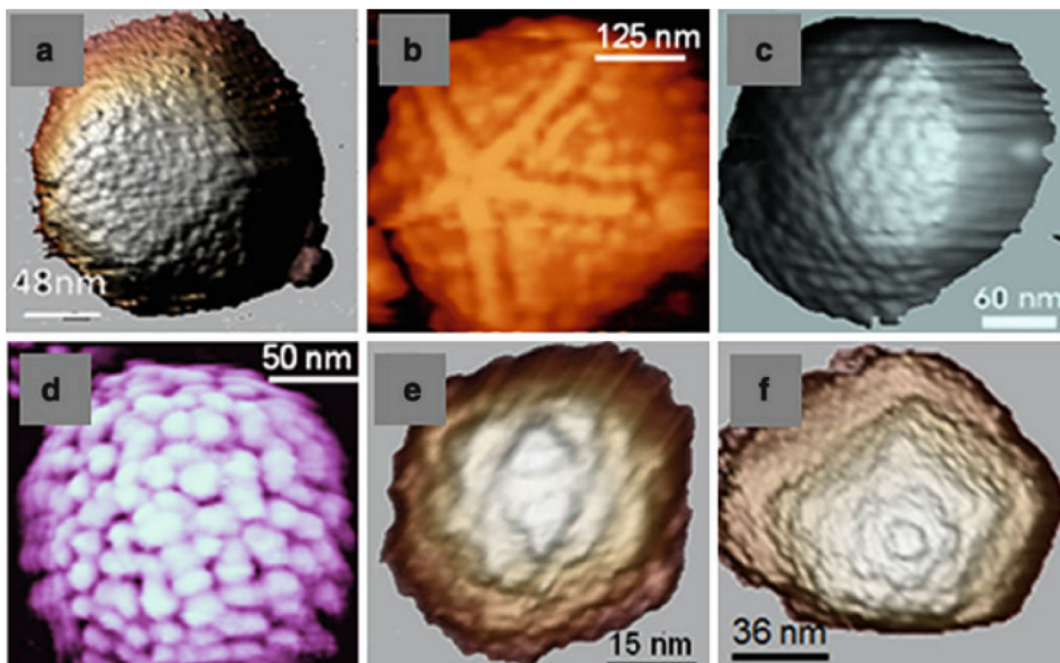
2.4 Microscopia de Força Atômica em Vírus

A Microscopia de Força Atômica tem se provado uma abordagem valiosa para delinear as arquiteturas e os recursos estruturais detalhados de uma ampla variedade de vírus. Desde pequenos vírus de planta de apenas 17 nm ao mimivírus de 750 nm de diâmetro, com morfologias diversas, como tais como HIV, partículas icosaédricas, vaccínia e bacteriófagos (Figura 2.14).

Por ser uma técnica de superfície, o AFM fornece imagens e informações distintas da Microscopia Eletrônica de Varredura e, em alguns casos, com resolução ainda maior. Medidas de AFM podem ser realizadas em amostras fixadas ou não e em ar ou em fluidos, incluindo meios de cultura, podendo ser aplicada a vírus individuais isolados, bem como a células infectadas ^[181]. O AFM permite obter mapas dos vírus seguindo em tempo real as mudanças estruturais de partículas individuais de vírus em resposta a diferentes condições e agentes externos, desde que as mudanças não sejam mais rápidas do que o tempo de aquisição da medida. Isso pode permitir a análise, por exemplo, das etapas de montagem ou desmontagem do vírus ^[182].

Além disso, o AFM pode ser usado para observar como as partículas de vírus podem ser rompidas em indentações acima da resistência à ruptura ^[183, 184]; e a fadiga mecânica abaixo da ruptura pode ser usada para monitorar em tempo real os estágios intermediários da desmontagem do adenovírus ^[185]. Outras propriedades mecânicas, como rigidez das partículas e módulo de Young também podem ser investigadas. Um método dominante usado para estudar a mecânica do vírus envolve a indentação de vírions ou capsídeos “empurrando” em pontos definidos na

Figura 2.14: Mapas de vírus obtidos por AFM. (a) Adenovírus humano (b) Mimivírus. (c) Vírus Herpes simplex. (d) Vírus de leucemia murina Moloney. (e) MVM. (f) Bacteriófago T7.



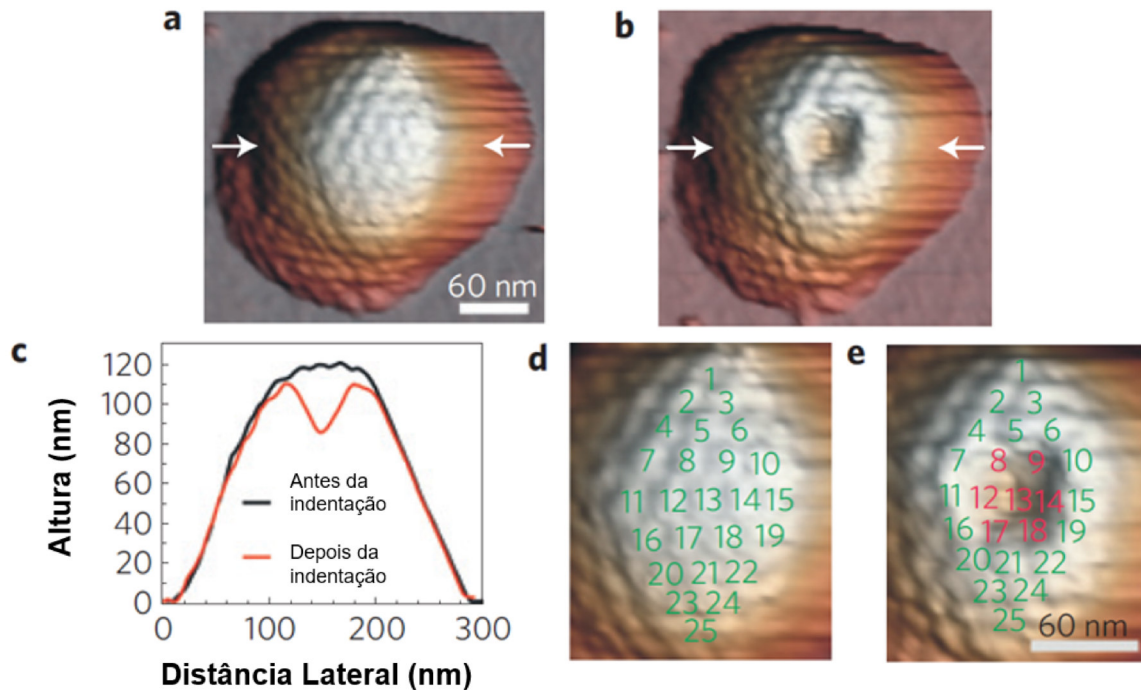
Fonte: Reproduzido de P.J. de Pablo. (2013) ^[180]

superfície da partícula com a ponta do AFM.

Roos e colaboradores ^[12] realizaram ensaio de indentação em partículas virais de HSV-1. Na Figura 2.15, é possível observar o efeito da indentação na casca do capsídeo viral. Um buraco é produzido pela “falha” da casca viral. Observa-se que os capsômeros individuais são discerníveis e, ao comparar a imagem antes e depois da indentação, é possível identificar os que foram perturbados ou completamente removidos. Na Figura 2.15A e Figura 2.15B a topografia de uma partícula de HSV1 imersa em líquido é mostrada, antes (Figura 2.15A) e após (Figura 2.15B) a indentação. Na Figura 2.15C, é mostrado o perfil de altura, obtido ao longo das setas brancas na Figura 2.15A e na Figura 2.15B. Na Figura 2.15D e Figura 2.15E, exibe-se a numeração dos capsômeros antes e depois da indentação, revelando a remoção dos capsômeros centrais (em vermelho) como resultado de falha do capsídeo.

O AFM também pode ser usado para determinar os valores das forças físicas envolvidas no reconhecimento molecular entre partículas de vírus e diferentes ligantes, por exemplo, receptores celulares ou anticorpos ^[186], até em condições fisiologicamente relevantes, com receptores embutidos na membrana de uma célula ou lipossoma. A abordagem geral nesses estudos envolve anexar uma partícula de vírus ou ligante de vírus à ponta de AFM e o seu correspondente de interação a um substrato sólido e “puxar” até que a interação entre eles seja interrompida.

Figura 2.15: Imagens de AFM de um capsídeo viral antes e depois da nanoindentação. A) e B) Imagens de topografia tridimensionais de uma partícula HSV1 antes (A) e após (B) a indentação, respectivamente. C) O perfil de altura, obtido ao longo das setas brancas em A e B. D) e E) A numeração dos capsômeros antes e depois da indentação mostrando a remoção de capsômeros centrais (indicados em vermelho).

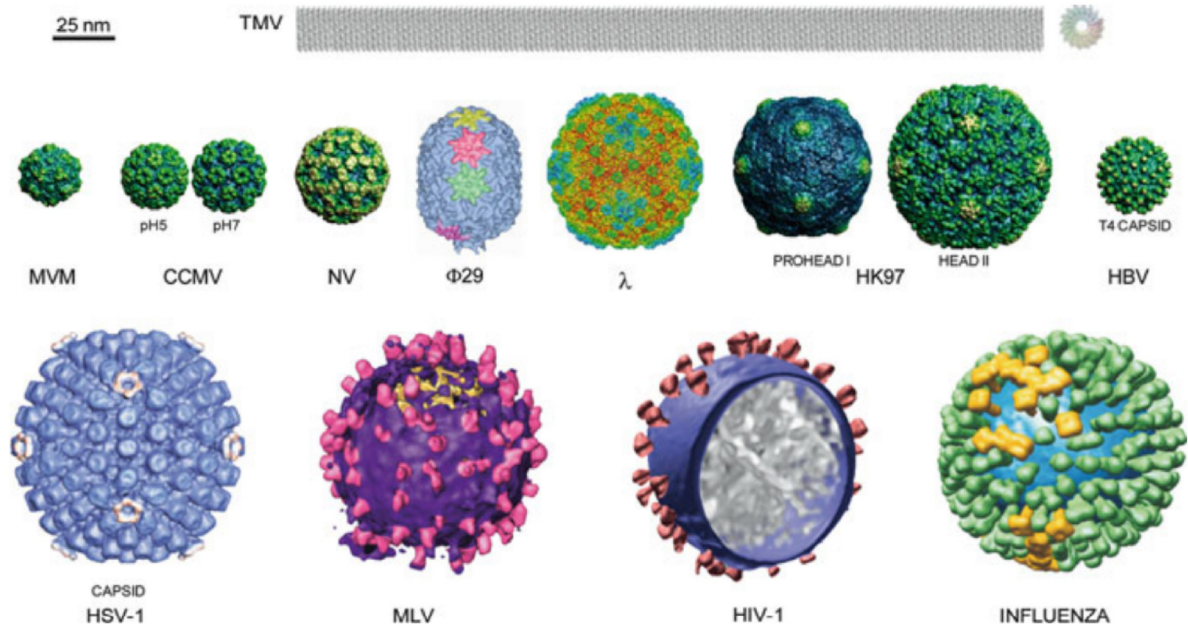


Fonte: Reproduzido de W. Roos (2010) [12]

Além disso, foi observado o pré-estresse do capsídeo de alguns bacteriófagos, como foi mostrado a partir de experimentos de nanoindentação com AFM feito por Baclayon e colaboradores [187].

Em relação à rigidez mecânica, os capsídeos não-envelopados diferem amplamente em sua capacidade de suportar altas cargas mecânicas (forças) sem serem fisicamente perturbados ou mesmo irreversivelmente deformados. Em geral, a falha mecânica (ruptura) de um capsídeo do vírus parece ocorrer quando ele se deforma de forma abrupta [19, 184]. Alguns capsídeos foram fraturados ou rompidos quando a ponta do AFM foi usada para aplicar forças que causaram deformações não muito profundas na casca de proteína, geralmente não acima de 10-15% do diâmetro do capsídeo. Em contraste, outros capsídeos resistiram a forças que provocaram deformações muito grandes da partícula [16, 189]. Alguns destes últimos resistiram, até mesmo, a um colapso total sob carga: uma vez que a força foi removida e as partículas puderam relaxar, elas geralmente recuperaram suas dimensões originais, sem nenhum dano estrutural sendo detectado. Assim, alguns invólucros de proteínas virais podem ser considerados relativamente

Figura 2.16: Partículas de vírus cujas propriedades mecânicas foram estudadas até o momento. Todas as partículas são reproduzidas (aproximadamente) na mesma escala, indicada pela barra no canto superior esquerdo. Vistas lateral e superior do TMV, formas nativa e dilatada de CCMV [1] e formas prohead-I e head II de HK97 são representadas. Para HBV e HSV-1, as propriedades mecânicas foram analisadas para capsídeos sem seus envelopes.



Fonte: Reproduzido de P.J. de Pablo e M.G. Mateu. (2013) [188]

frágeis, enquanto outros são consideravelmente mais resistentes a cargas mecânicas [188].

Alguns vírions envelopados também tiveram suas propriedades mecânicas investigadas e diferenças notáveis foram encontradas. O Influenza é extremamente elástico, mecanicamente se comportando quase como seu envelope lipídico muito macio [190,191]. Em contraste, os vírions imaturos de dois retrovírus, leucemia murina (MLV) [192] e da imunodeficiência humana (HIV-1) [193], são mecanicamente muito rígidos, produzindo módulos de Young estimados comparáveis aos dos capsídeos icosaédricos. No vírion da influenza, a camada de proteína da matriz M1 imediatamente abaixo do envelope pode ser altamente flexível e não se opõe a qualquer resistência significativa à deformação. Em contraste, o capsídeo muito espesso abaixo do envelope dos retrovírus seria parcialmente responsável pelas altas constantes de mola determinadas para os virions MLV e HIV-1 imaturos. Além disso, a rigidez ainda maior do HIV-1 imaturo, em comparação com MLV, pode ser devido à presença de interações que possivelmente não ocorrem no MLV imaturo. No caso do HIV-1, a maturação contribuiu para o amolecimento mecânico extremo observado [192,193].

Esses três vírus envelopados mencionados (MLV, HIV-1 e Influenza) são mecanicamente muito flexíveis e foi levantada a hipótese de que a fusão efetiva com a membrana celular, para

permitir a entrada do vírus, pode exigir um vírion mecanicamente macio e flexível o suficiente para um contato extenso entre o vírus e a célula. As mudanças estruturais efetuadas durante a maturação do vírus teriam, como uma consequência, o amolecimento mecânico do vírion, que seria necessário para a entrada do vírus no interior celular. Se esta hipótese for verificada, mudanças nas características mecânicas do vírus com envelope podem afetar um controle mecânico da entrada desse vírus nas células hospedeiras ^[16,188].

As partículas virais são submetidas a forças físicas que podem deformar ou as romper tanto fora quanto dentro das células. Essas forças incluem forças de cisalhamento durante sua movimentação em fluidos viscosos ou sendo expelidas através de poros ou outras aberturas; efeitos osmóticos; pressurização devido ao empacotamento do material genético; pressão hidrostática; forças capilares na dessecação etc. Os vírus com uma forma tubular muito alongada, como o do mosaico do tabaco (TMV), podem ser particularmente sensíveis ao estresse mecânico ^[194], mas qualquer vírus, por ser feito de material "macio", corre risco de perturbação mecânica em algum ponto ou outro de sua existência. Além disso, algumas partículas de vírus devem mudar de forma (passar por rearranjos conformacionais) para cumprir sua função biológica; assim, sua capacidade de deformar ou resistir à deformação pode estar conectada com sua dinâmica conformacional biologicamente relevante ^[188]. De toda forma, toda matéria deve obedecer às leis gerais da física e a matéria biológica não é uma exceção. Os vírus não apenas aprenderam a lidar com elas, mas também conseguiram usá-las para sua própria sobrevivência ^[195].

O campo da mecânica dos vírus está contribuindo para a física de materiais, investigando alguns parâmetros físicos da matéria biológica "macia/mole" (*soft matter*) e dos nano-objetos biológicos ^[188]. Finalmente, observa-se, pela quantidade emergente de trabalhos nessa direção, que o AFM abriu a possibilidade de investigar propriedades físicas anteriormente inexploradas de partículas virais, o que pode fornecer novos conhecimentos sobre as relações entre a estrutura, propriedades físicas e funções do vírus. Dessa forma, o AFM oferece a possibilidade de investigar a rigidez mecânica dos vírions e capsídeos e de romper seletivamente os elementos individuais que compõem as partículas de vírus. Esses experimentos podem contribuir para entender a montagem e desmontagem de vírus, estabilidade e dinâmica dessas partículas ^[16,34,180].

3. Métodos Experimentais

Esse é um estudo experimental de cooperação multidisciplinar entre o Departamento de Física da Universidade Federal do Maranhão (DEFIS-UFMA), o Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, Laboratório de Nanorradiofarmácia da Universidade Estadual da Zona Oeste do Rio de Janeiro, Instituto de Engenharia Nuclear e Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

3.1 Aquisição das amostras

As amostras do vírus SARS-CoV-2 inativados foram fornecidas pelo Laboratório NB3 da FIOCRUZ. Amostras de esfregaço nasofaríngeo (NP) foram coletadas de pacientes sintomáticos que adquiriram COVID-19. Esses pacientes foram atendidos no mesmo hospital e foram os dois primeiros casos confirmados de COVID-19 na cidade de São Paulo. As amostras foram coletadas entre os dias 2-4 pós-início dos sintomas, colocadas em 1-2 mL de meio salino e usadas para diagnóstico molecular e isolamento do vírus. A cepa resultante foi denominada: SARS-CoV-2 (EPI_ISL_413016) ^[186].

3.2 Preparação da amostras de SARS-CoV-2

3.2.1 Isolamento e inativação do vírus

As células Vero E6 (ATCC, no 1586) foram cultivadas em meio de Eagle mínimo (MEM; Gibco) suplementado com FBS a 10% (Gibco) e plaqueadas a 100.000 células/poço em uma placa de 48 poços a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . O rendimento do vírus em sobrenadantes de cultura foi quantificado por RT-qPCR usando primers específicos e sonda contra o gene Rdrp de acordo com RT-qPCR 2019-nCoV (protocolo do Instituto Pasteur). ^[196]

A inativação foi feita seguindo a mesma metodologia adotada pela American Type Culture Collection (ATCC) [197]. Nesse sentido, o vírus ficou inativo por aquecimento a 65°C por 30 minutos e, portanto, não consegue se replicar.

3.2.2 Estoque de vírus

Partículas viáveis (título $1,0 \times 10^6$ PFUs em $500 \mu\text{L}$) e inativadas do SARS-CoV-2 isolado (EPI_ISL_413016) foram preparadas e usadas neste estudo.

3.3 Medidas de Microscopia de Força Atômica

Para medidas de Microscopia de Força Atômica (AFM), $10 \mu\text{L}$ de solução do meio de cultura com suspensões de partículas virais foram depositados em lâminas de microscópio (13 mm de diâmetro) previamente tratadas com poli-lisina 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As lâminas foram analisadas no microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA, EUA) (Figura 3.1).

Figura 3.1: Microscópio de Força Atômica Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA) localizado no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas da UFMA.

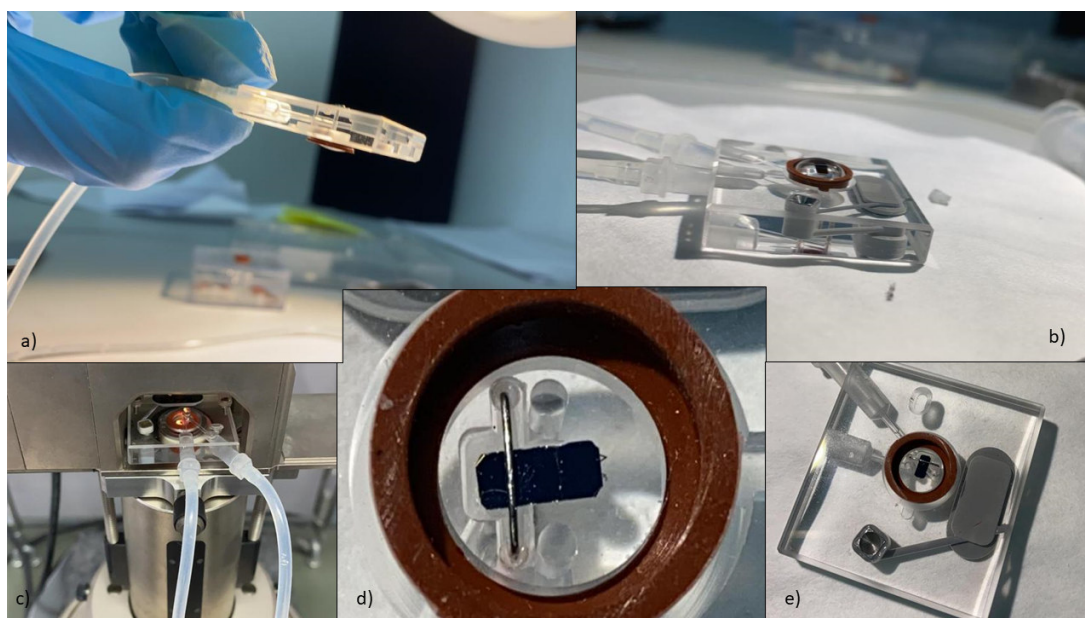


Foram usadas sondas de nitreto de silício, com constante de mola nominal de $0,06 \text{ N/m}$; no entanto, as constantes de mola reais de cada cantiléver utilizado nesta pesquisa foram ca-

libradas pelo método do ruído térmico. As amostras foram analisadas no modo Peak Force Quantitative Nanomechanics (QNM), que permitiu a aquisição, além dos mapas topográficos, de informações nanomecânicas das amostras estudadas. A análise estrutural foi realizada no ar (temperatura de 23°C e 44% de umidade), com resolução dos mapas 256 pixels e frequência de varredura de 0,5 Hz.

Para a análise de indentação, as medidas foram feitas no modo rampa (*ramp mode*) do QNM, em meio fluido, com solução do meio de cultura. Para medidas em meio fluido utiliza-se um componente extra do AFM chamado célula líquida, que substitui o “*tip holder*” tradicional. A substituição deste componente se dá pois a célula líquida possui um poço, que é preenchido com o fluido a ser utilizado na medida, neste caso, a solução do meio de cultura. O fluido depositado no poço forma um menisco que é mantido no lugar através de um borracha circular, chamada de “*O-ring*”, que fornece o suporte necessário para que haja uma pequena tensão superficial no poço, a ponto de formar o menisco e este permanecer estável sobre a amostra enquanto o cantilever se aproxima e varre a amostra, estabelecendo assim o ambiente líquido para a realização da medida.

Figura 3.2: Célula líquida: componente utilizado para a realização de medidas em meio líquido. a) Tensão superficial do menisco através do *O-ring*. b) Menisco formado no poço da célula líquida. c) Célula líquida montada no AFM. d) Zoom no *O-ring* com o cantilever montado. e) Célula líquida antes de receber o fluido.



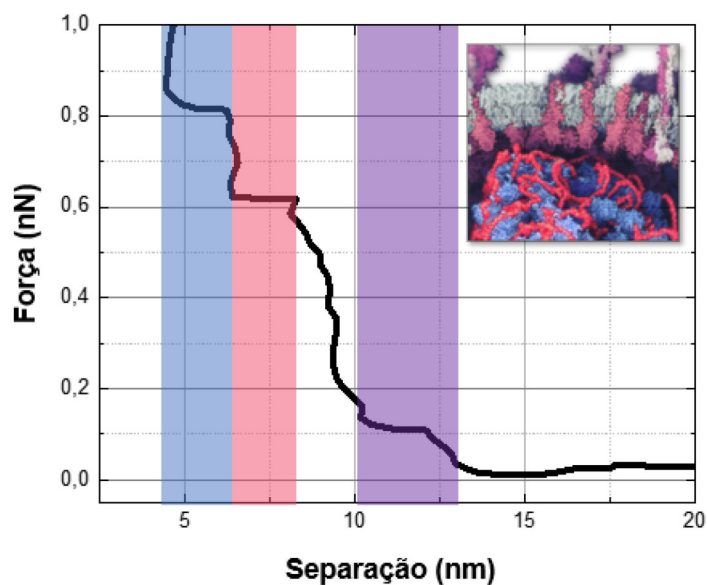
O modo de rampa permite a aquisição de curvas de força individuais sobre as partículas virais, com controle de força de indentação máxima e velocidade de aquisição das curvas de força. No caso da análise de partículas virais, devido ao tamanho reduzido da superfície da amostra, esse modo é mais vantajoso pois permite a análise dos danos locais e reorganização

da estrutura viral, quando submetida a sucessivas indentações, em uma mesma região. A força máxima aplicada neste trabalho foi de 1nN, com velocidade de aquisição das curvas de 50 nm/s. As curvas do AFM foram analisadas com o software NanoScope Analysis 2.0 e os mapas foram gerados com o auxílio do software Mountains SPIP8® (Digital Surf).

Os parâmetros estruturais das partículas virais foram calculados usando o software Gwyddion 2.57, aplicando a detecção de grãos de contorno às imagens topográficas (área de varredura de 5 μm^2), usando uma máscara sobre as regiões correspondentes às partículas. A partir dessas regiões, foram calculadas informações estatísticas sobre a altura e o diâmetro de 415 partículas. Para o diâmetro e espaçamento das medidas das unidades de proteínas de membrana, cinco partículas virais diferentes (uma área de varredura de 150 nm^2) foram analisadas usando a ferramenta de seção transversal. Experimentos de indentação de partículas virais foram realizados em 7 vírions diferentes, e cada um passou por 70 a 120 ciclos de indentação. Os mapas de adesão foram analisados em 13 partículas virais (área de varredura de 250 nm^2).

A partir das curvas de força, regiões de ruptura da partícula viral foram observadas na porção de contato da curva de aproximação (Figura 3.3), representadas pelos platôs (regiões de força constante). A espessura das camadas indentadas foram medidas a partir da largura desses platôs, obtidas pela escala de separação das curvas.

Figura 3.3: Ilustração dos platôs que caracterizam a ruptura da partícula viral, enfatizados pelas faixas coloridas, na curva de Força *versus* Separação.

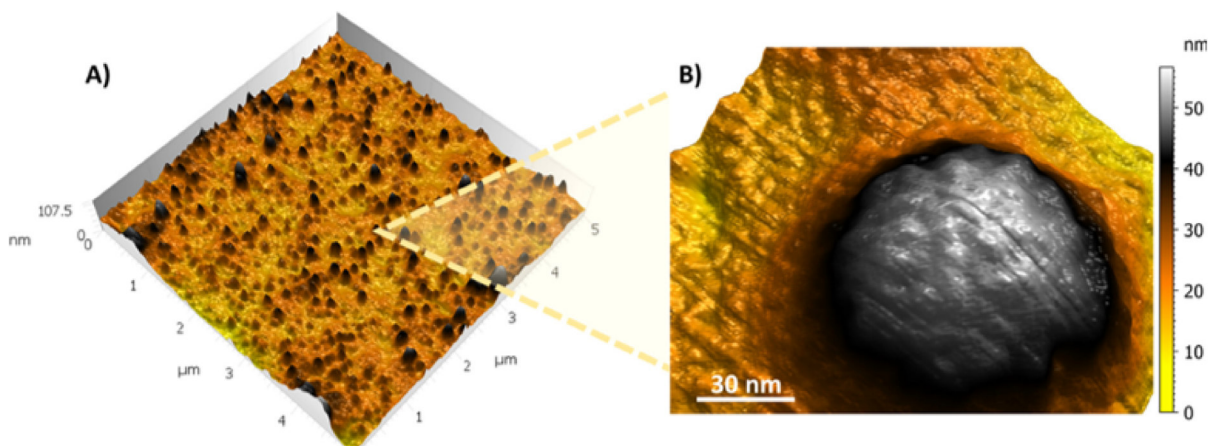


4. Resultados e Discussão

4.1 Estrutura e formato das partículas virais de SARS-CoV-2

Nos mapas topográficos (Figura 4.1), é possível observar a estrutura externa como a camada mais alta da partícula viral. Medimos que a partícula do vírus tem um diâmetro médio de 92 nm com um desvio padrão (SD) de ± 15.7 nm (Figura 4.1A). Esse dado é corroborado por Laue e et al.^[198] e Bar-On et al.^[199], que afirmaram que o tamanho da partícula viral pode ser em torno de 100 nm sem considerar as proteínas spike. Na vista superior da partícula viral, é possível observar na Figura 4.1B uma estrutura complexa com unidades tendo um diâmetro de 10.9 nm ± 1.9 nm SD. Esses achados corroboram o modelo proposto por Klein e colaboradores^[99] para o diâmetro da proteína Spike.

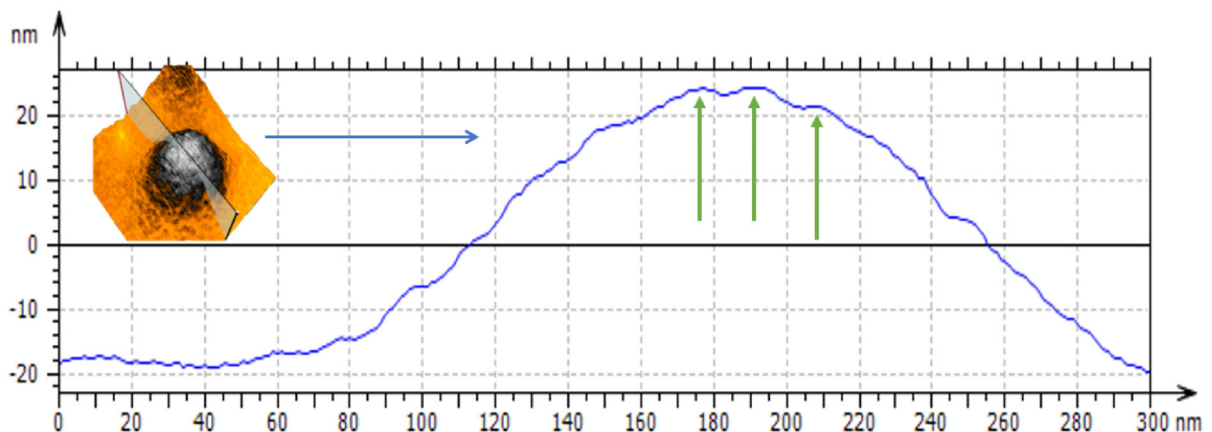
Figura 4.1: Mapa topográfico de AFM revelando a estrutura viral e o formato da partícula de SARS-CoV-2: A) Uma visão ampliada de várias partículas virais dispersas no substrato com diâmetro variando entre 90-185 nm. B) Zoom da superfície de uma única partícula viral mostrando os detalhes dos arranjos de proteínas na superfície.



O espaçamento de centro a centro de cada uma dessas unidades foi medido na faixa de 11.8 nm ± 2.5 nm SD. A seção transversal na Figura 4.2 destaca o perfil de altura de partícula, com uma altura média de 21.4 nm ± 4.4 nm SD após a deposição em um substrato de vidro. As

setas verdes apontam para algumas das unidades de proteína que foram medidas, com um mapa inserido mostrando a direção em que a partícula foi seccionada. As proteínas S têm tendência a reordenar sua organização na superfície do vírion ^[200]; nesse sentido, as imagens de AFM apresentam uma vantagem: a capacidade de analisar toda a superfície, sugerindo uma densidade maior de proteínas S.

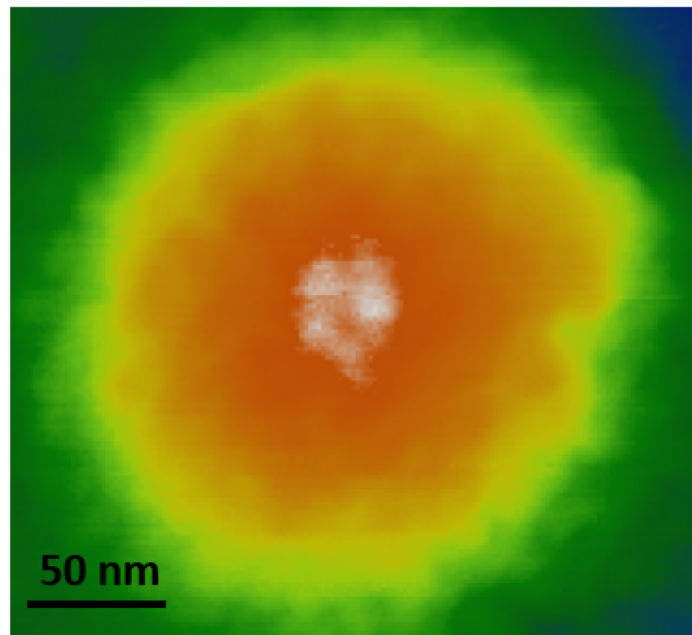
Figura 4.2: Seção transversal do perfil de uma única partícula, enfatizando as unidades de proteína na superfície com medidas de diâmetro compatíveis com a proteína Spike. O mapa no detalhe mostra a direção em que a seção transversal foi medida. As setas verdes destacam a seção transversal sobre as proteínas.



A proteína S do SARS-CoV-2 forma trímeros salientes compostos por duas subunidades responsáveis pela ligação ao receptor (subunidade S1) e uma subunidade responsável pela fusão à membrana (subunidade S2) ^[72]. A fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira tem início quando a subunidade S1 se liga a um receptor da célula hospedeira. A ligação do receptor desestabiliza o trímero de pré-fusão, resultando na liberação da subunidade S1 e na transição da subunidade S2 para uma conformação pós-fusão estável ^[74]. A pós-fusão é um processo essencial feito pela subunidade S2 da proteína S. Durante a infecção por SARS-CoV-2 e após o reconhecimento do receptor ACE2 pela subunidade S1, a proteína S muda para o modo pós-fusão e S2 conduz a fusão entre a membrana viral e celular levando à entrada do vírus na célula ^[68]. No mapa topográfico de AFM mostrado na Figura 4.3, é possível observar um arranjo que sugere esse tipo de estrutura. Na região mais clara do mapa (em cor branca), observa-se três estruturas globulares, de aproximadamente 8 nm de diâmetro individualmente, que se organizam da forma de triângulo, sugerindo uma unidade de proteína S.

Na Figura 4.4 são apresentados os mapas de forças de adesão resultantes da interação entre a sonda de AFM e o substrato contendo as partículas virais. É importante notar que as forças de adesão são uma combinação das forças eletrostática, van der Waals, capilar e de escape

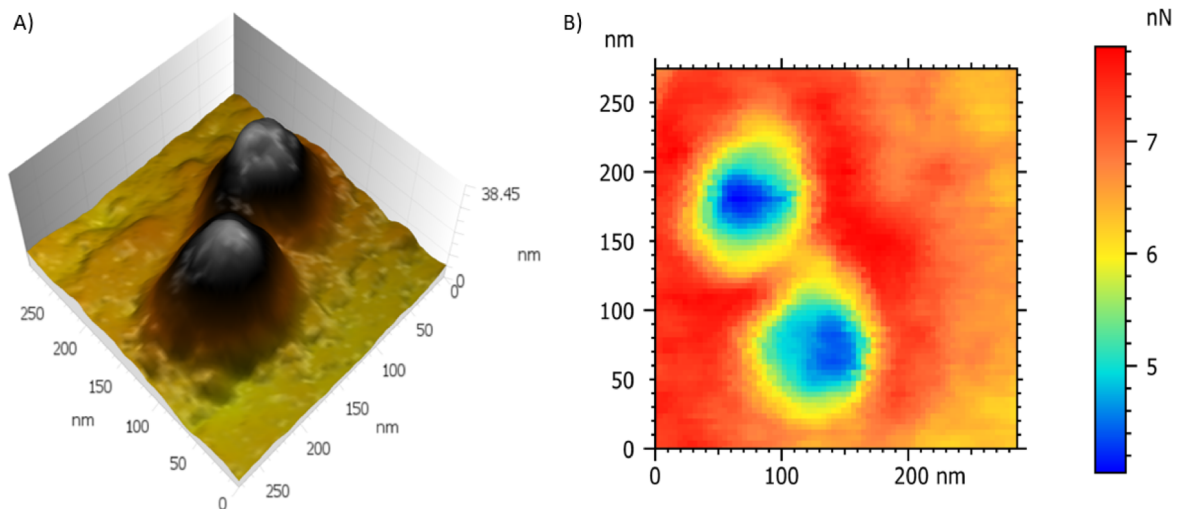
Figura 4.3: Mapa topográfico com escala de cor artificial que enfatiza um trímero na superfície viral, o formato característico da estrutura da proteína spike.



promovidas pelas ligações químicas ^[107], como já mencionado anteriormente neste trabalho. O mapa de adesão bidimensional mostrado na Figura 4.4B corresponde às partículas virais apresentadas no mapa topográfico da Figura 4.4A. É possível identificar claramente a partícula viral sendo muito distinta do substrato. A região circundante das partículas virais tem escala de adesão diferente do centro, com espessura medida de ≈ 20 nm, compatível com a distância da base da ponta da coroa na membrana e sua porção superior, conforme relatado na literatura ^[198]. Além disso, é possível observar uma interação entre as coronas das partículas. A região sugerida como corona aparece com uma escala diferente ao redor da partícula porque as pontas periféricas estão interagindo com o substrato e as pontas no topo do vírus não interagem com o substrato, apenas com a sonda, resultando em uma distribuição diferente na sobreposição de forças.

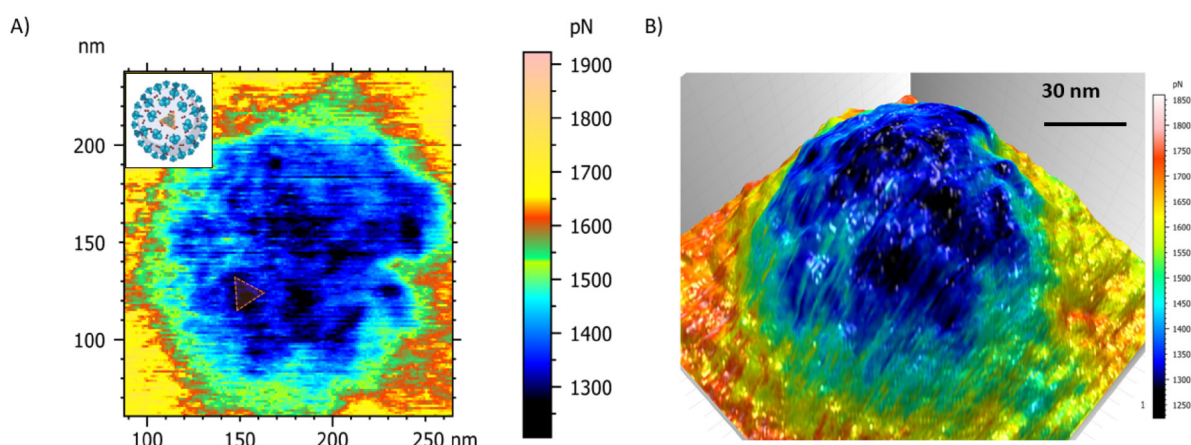
Uma análise mais aprofundada no modo de adesão (Figura 4.5A), com foco no centro da partícula viral, mostrou estruturas de forma triangular, compatível com o diâmetro das proteínas Spikes. A distribuição das proteínas Spike na superfície da partícula viral é mostrada na Figura 4.5B. Diferentes contrastes de forças de adesão no topo da partícula viral podem estar relacionados à largura da ação pós-fusão da subunidade S2 ao feixe ^[88]. A pós-fusão é um processo essencial realizado pela subunidade S2 da proteína Spike. Durante a infecção por SARS-CoV-2 e após o reconhecimento do receptor ACE2 ^[201] pela subunidade S1, a proteína Spike muda para o modo pós-fusão e S2 conduz a fusão entre a membrana viral e celular que levou à entrada do

Figura 4.4: A) Imagem topográfica do SARS-Cov-2 e B) seu respectivo mapa de adesão. O mapa de adesão mostra diferentes contrastes nas regiões central e externa. Na região externa, é possível observar algumas estruturas não mostradas no mapa topográfico que podem ser sugeridas como a coroa de spikes. O centro possui regiões com interação atrativa consideravelmente menor que são compatíveis com a morfometria dos spikes, sendo estes os que não interagem com o substrato, apenas com a sonda.



vírus na célula ^[68]. Nessa direção, esses achados sugerem que as proteínas Spike são estruturas que podem interagir com uma grande variedade de mecanismos moleculares e celulares, o que corrobora o perfil de alta virulência do SARS-CoV-2 afirmado por Kumar et al. ^[202].

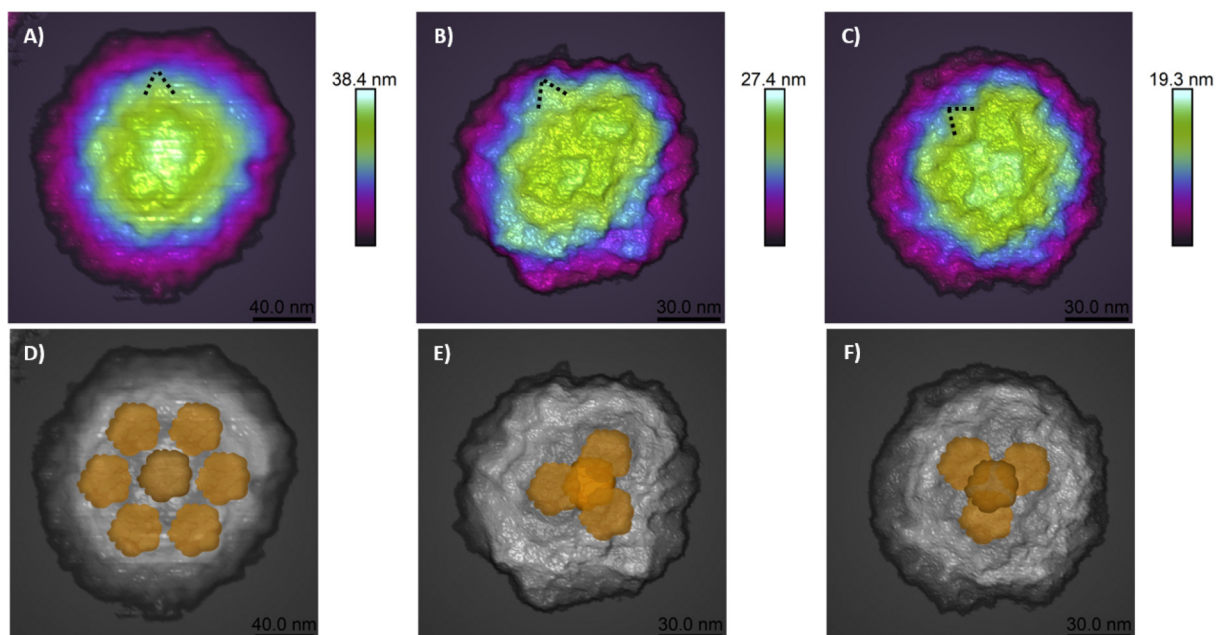
Figura 4.5: A) Mapa de adesão de uma única partícula viral revelando detalhes das diferentes forças de adesão. A imagem inserida mostra uma correlação entre a estrutura de forma triangular sugerida e a proteína Spike. B) Combinação do mapa topográfico tridimensional e do mapa de forças adesivas.



O mapas na Figura 4.6 mostram diferentes conformações de adsorção da partícula do SARS-CoV-2 no substrato de vidro (como foi observado antes para outras partículas virais); isto é, Moreno-Cerrada et al. ^[203] apresentaram uma investigação semelhante para partículas se-

melhantes a vírus e Carrasco et al.^[204] para um vírus icosaédrico não-envelopado, mas essa é a primeira vez que tal análise foi realizada em um vírus envelopado, como é o caso do SARS-CoV-2. Entre muitos métodos para determinar a concentração de vírus no ambiente, os estudos de adsorção de vírus também são cruciais para esse entendimento^[205]. A transmissão viral é ainda mais complicada pelas diferenças na sobrevivência dos vírus nas superfícies e pela desanexação das partículas virais após o contato^[206]. Conforme mencionado na revisão feita por Aboubakr et al.^[207], o SARS-CoV-2 manteve sua infectividade por até 4 dias em superfícies de plástico, mas apenas 4h horas em superfícies de cobre, indicando que a permanência de infectividade das partículas virais tem substratos preferidos. Portanto, um estudo de adsorção comparando diferentes substratos e o cálculo da energia de adsorção pode ser uma investigação posterior útil.

Figura 4.6: Informações sobre a estrutura interna: A-C) Diferentes padrões de adsorção da partícula viral SARS-CoV-2 em vidro. As linhas pontilhadas pretas destacam as estruturas semelhantes aos Spikes presentes em todas as imagens de altura. D) Sugestão de montagem hexamérica das estruturas internas da partícula viral após adsorção e E-F) uma montagem piramidal tetraédrica com diferentes rotações piramidais.



Os dados apresentados na Figura 4.6 mostram a diferença nos padrões de adsorção observados para a partícula viral do SARS-CoV-2 em um substrato de vidro tratado com poli-L-lisina (no ar). Nas Figuras 4.6 A-C, é possível reconhecer o perfil da proteína Spike destacado pela linha tracejada representada por formas triangulares, típicas da estrutura Spike. Devido à interação da carga da membrana da partícula viral com o substrato (vidro), é possível observar as estruturas das partículas internas. Por exemplo, nas Figuras 4.6A-C, é possível observar um padrão semelhante a um padrão globular e seus diferentes conjuntos de adsorção no substrato de

vidro. Esse resultado corrobora os achados de Lu et al. para a organização do nucleocapsídeo [3]. Nas Figuras 4.6D-F, são sugeridas diferentes montagens internas nas diferentes simetrias de adsorção das partículas, com montagem hexamérica (Figura 4.6D) e tetraédrica (Figuras 4.6E e F) e, nessa última, com diferentes rotações piramidais, de acordo com o modelo proposto por Yao e colaboradores [88].

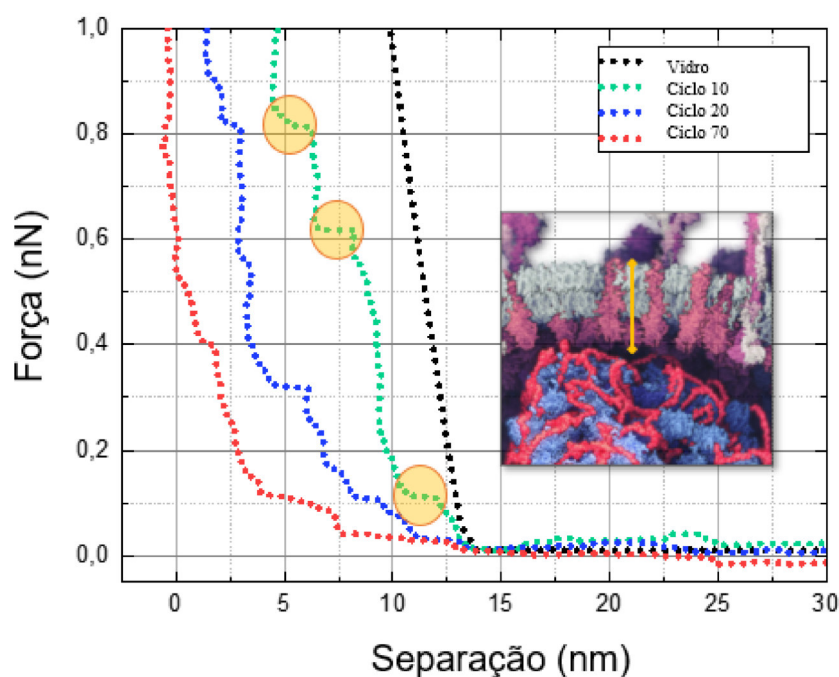
4.2 Experimentos de Nanoindentação

Análises nanomecânicas são comuns na avaliação das propriedades mecânicas de diversos biomateriais [6,169]. Muitos experimentos de indentação foram realizados a fim de observar a resistência das partículas virais [15,20]. Embora estudos de indentação anteriores das partículas virais SARS-CoV-2 estivessem principalmente interessados em romper totalmente a partícula viral [208], este estudo foi direcionado em medir a resistência de cada camada da membrana da partícula viral. Assim, foram realizados vários ciclos de indentação com força de até 1 nN com uma velocidade de indentação de 50 nm/s. A razão para a escolha desses parâmetros é que os materiais viscoelásticos sob estresse de carga aplicada em baixas frequências, têm um comportamento mais complacente/maleável, opondo-se à resposta mais sólida em frequências mais altas [170].

Nesse sentido, experimentos de indentação de partículas virais foram realizados em sete vírions diferentes, e cada um passou por 70 a 120 ciclos de indentação. Os resultados de indentação mostrados na Figura 4.7 representam o comportamento das partículas virais em diferentes estágios de indentação em comparação com a curva de força realizada em um substrato de lâmina de vidro (linha pontilhada preta). A separação entre as curvas aumenta gradativamente de acordo com o avanço dos ciclos realizados, indicando a penetração da sonda na partícula viral. Cada degrau observado nas curvas de força (regiões com valores de força constantes - círculos amarelos na Figura 4.7 A), está relacionado à ruptura [12] de uma camada estrutural.

No 10º ciclo, é possível observar um primeiro platô relacionado a uma força constante de ≈ 100 pN, a segunda etapa em torno de 600 pN e a terceira etapa com uma força de platô de ruptura em torno de 800 pN, indicando a ruptura de três camadas (ou estruturas de membrana individuais) que requerem forças da ordem de 100 pN, 600 pN e 800 pN, respectivamente, para serem perturbadas a uma velocidade de indentação de 50 nm/s. É possível ver que uma camada com largura total de ≈ 6 nm foi rompida. Esses dados confirmam os estudos anteriores que

Figura 4.7: Curva de força de referência no substrato de vidro e sequência de curvas sobre a partícula viral. Os círculos amarelos no 10º ciclo enfatizam as etapas características dos eventos de ruptura. A imagem inserida ^[2] sugere uma visualização da seção transversal das camadas indentadas.

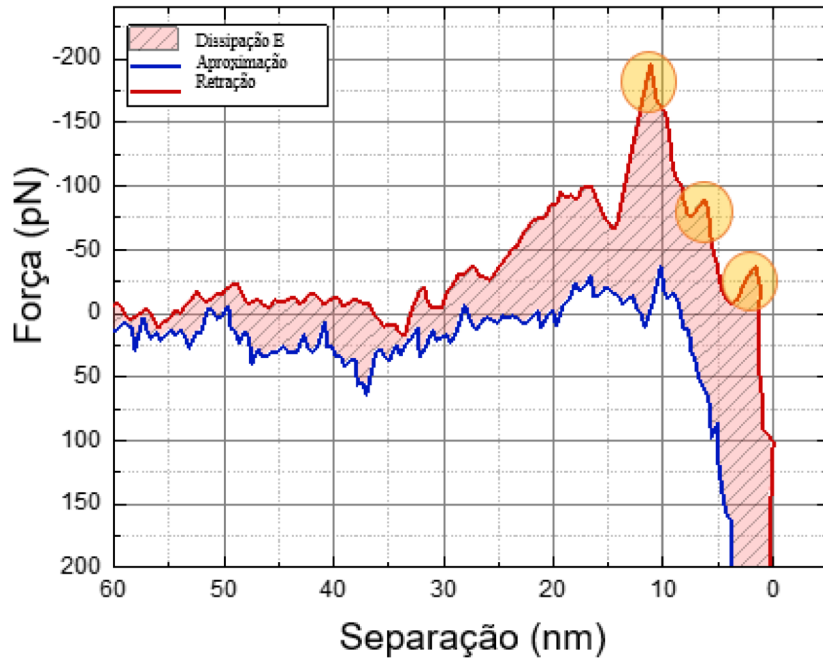


mostram que o SARS-CoV-2 pode ter uma membrana com largura de 6 a 8 nm ^[99].

No 20º ciclo, é possível observar vários eventos de ruptura (degraus) entre 100 pN e 900 pN de força de ruptura. Esses múltiplos eventos, com platôs de menor tamanho, sugerem que haja uma tentativa da partícula viral de remontar as proteínas da membrana; porém, a remontagem não é totalmente eficaz devido ao estresse contínuo na camada, mesmo em baixas velocidades. Finalmente, no 70º ciclo, há o primeira platô comum em ≈ 100 pN e dois platores menores em uma escala de força de ≈ 400 pN e ≈ 500 pN, respectivamente. Correspondentemente, há um deslocamento maior em relação à curva de vidro, indicando que a estrutura interna viral, o nucleocapsídeo, é continuamente deformado pela indentação da sonda de AFM e, por isso, o rompimento das camadas requer forças menores do que as do ciclos anteriores.

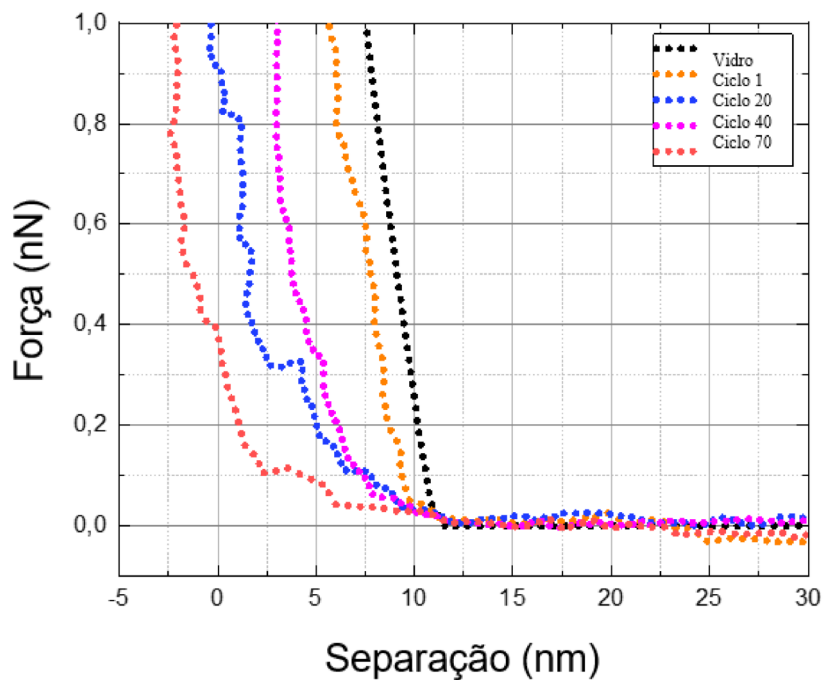
Na curva de retração apresentada na Figura 4.8, três eventos principais de desprendimento de penetração ^[209] se destacam da estrutura da membrana SARS-Cov-2, evidenciada pelos círculos amarelos, confirmando a presença de três estruturas principais sugeridas no resultado apresentado na Figura 4.7. A histerese observada entre os ciclos de aproximação e retração corresponde à dissipação de energia da sonda de AFM sobre a superfície da partícula viral, demonstrando seu caráter viscoelástico, principalmente em baixas velocidades de indentação. O primeiro platô comum a todos os ciclos mostrados no gráfico da Figura 4.7 revela algo interes-

Figura 4.8: O gráfico de força *versus* separação mostra um ciclo tardio de aproximação (curva azul) e retração (curva vermelha) da sonda AFM na superfície da partícula viral. Os círculos amarelos enfatizam os eventos de desprendimento de penetração na estrutura viral. A região listrada de vermelho corresponde à dissipação de energia mostrando o caráter viscoelástico da partícula viral.



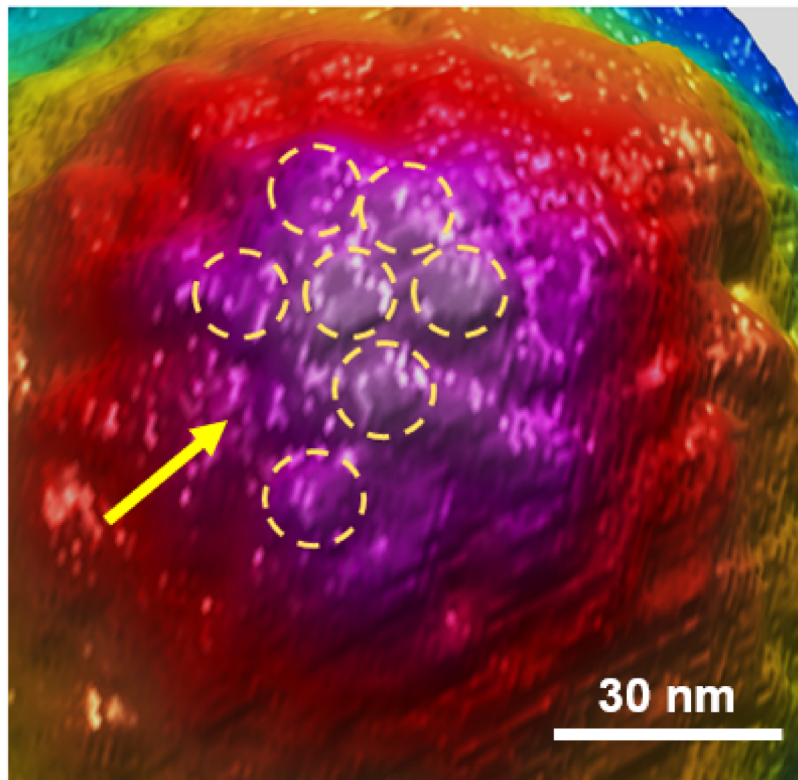
sante: há sempre uma tendência de remontar a membrana viral; e uma camada cada vez mais espessa é rompida com menores quantidades de força de carregamento à medida que os ciclos avançam.

Figura 4.9: Curvas de força de referência no vidro e na superfície da partícula viral.



Embora a análise de indentação tenha confirmado a ruptura das camadas de partículas, uma análise mais aprofundada no AFM mostrou que um dano local nas camadas da membrana pode ser corrigido por uma remontagem da própria membrana. Na Figura 4.9, o 40° ciclo (curva magenta) mostra uma tendência de diminuição do recuo, quando comparado aos ciclos anteriores (20° ciclo, curva azul). Esse efeito pode ser explicado pela reorganização das proteínas da membrana, mostrando que a ruptura total dessa organização só é possível com o uso de forças de carga maiores (Figura 4.10).

Figura 4.10: Estrutura da membrana sugerindo ausência ou reposicionamento de proteínas (círculos tracejados) na superfície da partícula viral. A seta amarela indica o local onde ocorreu o reposicionamento ou a perda de uma unidade de proteína.



Não obstante, o efeito de remontagem das partículas virais também pode ser explicado pelo comportamento viscoelástico da membrana ou pelo deslocamento e subsequente mobilidade das unidades de proteína. A mobilidade da proteína foi explicada por Alenghat e Golan^[210], que mostraram que a mobilidade da proteína da membrana pode variar desde o movimento browniano aleatório simples até o movimento axial e orbital para dentro da própria membrana. Finalmente, como mostrado na Figura 4.10, é possível observar uma conformação de proteínas em um arranjo do tipo hexâmico, mas com uma unidade aparentemente ausente; isso pode estar relacionado à mobilidade da proteína de membrana.

5. Conclusões e Perspectivas

Neste estudo, a ultraestrutura e as propriedades nanomecânicas das partículas virais de SARS-Cov-2 foram avaliadas utilizando a Microscopia de Força Atômica. Os mapas topográficos e de adesão de alta resolução revelaram as estruturas da superfície da membrana da partícula viral e a distribuição de proteínas de superfície, corroborando com modelos teóricos propostos na literatura para este vírus. Outro achado relevante foi a observação de estruturas de partículas internas com padrão globular e seus diferentes conjuntos de adsorção em substrato de vidro. Um estudo de adsorção comparando diferentes substratos e o cálculo da energia de adsorção pode ser uma futura investigação relevante. Os testes de fadiga da membrana, utilizando indentações sucessivas na mesma região da superfície do vírus com velocidades de aquisição de curvas de 50 nm/s, permitiram observar eventos de ruptura da membrana, camada por camada, sugerindo três camadas principais, sendo que cada uma delas teve sua espessura medida individualmente, somando uma espessura total de ≈ 6 nm. Além disso, foi possível observar a reorganização das proteínas da membrana, com curvas de força dos ciclos tardios mostrando uma redução na quantidade de indentação na membrana da partícula. Os eventos penetrativos também foram confirmados pelas curvas de retração em ciclos de indentação avançados, apresentando picos característicos de liberação penetrativa, com forças de ligação atingindo até 200 pN. Como característica dos materiais viscoelásticos, em baixas taxas de indentação, a partícula viral apresentou histerese bastante evidente entre as curvas de aproximação e retração, caracterizando a dissipação de energia da sonda durante a indentação.

Os resultados aqui apresentados agregam novos dados na caracterização das propriedades físicas e estruturais do SARS-Cov-2, reforçando os modelos apresentados na literatura. Os próximos passos para este trabalho envolvem a caracterização de peptídeos candidatos ao tratamento da Covid-19 e da sua interação com a partícula viral de SARS-CoV-2. Além disso, existe o planejamento para a continuidade desses estudos em partículas virais das mutações de SARS-CoV-2, comparando as diferenças mecânicas relevantes para sua infectividade em cada uma das

mutações. Outra perspectiva é expandir esses ensaios para outros tipo de vírus, tais como os arbovírus causadores da Dengue, Zika e Chikungunya, ainda não analisados sob a perspectiva abordada nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] LIEPOLD, L. O. et al. Structural transitions in cowpea chlorotic mottle virus (CCMV). *Physical Biology*, IOP Publishing, v. 2, n. 4, p. S166–S172, nov 2005.
- [2] NGUYEN, N. et al. *SARS-CoV-2 Computational model with atomic resolution*. 2021. Disponível em: <<https://nanographics.at/projects/sars-cov-2/>>.
- [3] LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. ISSN 01406736.
- [4] KANG, S. et al. Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Elsevier, p. 105950, mar 2020. ISSN 0924-8579.
- [5] JEONG-MIN, K. et al. Identification of coronavirus isolated from a patient in korea with covid-19. *Osong Public Health Res Perspect*, v. 11, n. 1, p. 3–7, 2020.
- [6] WU, C. et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Elsevier, feb 2020. ISSN 2211-3835.
- [7] NIE, J. et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 680–686, jan 2020. ISSN 2222-1751.
- [8] POON, W. C. K. et al. Soft matter science and the covid-19 pandemic. *Soft Matter*, The Royal Society of Chemistry, v. 16, p. 8310–8324, 2020.
- [9] TWAROCK, R. *Emerging topics in physical virology*. [S.l.]: World Scientific, 2010.
- [10] KNOBLER, C. M.; GELBART, W. M. Physical Chemistry of DNA Viruses. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 60, n. 1, p. 367–383, may 2009. ISSN 0066-426X.
- [11] GREBER, U. F. *Physical Virology: Virus Structure and Mechanics*. 1st ed.. ed. [S.l.]: Springer International Publishing, 2019. (Advances in Experimental Medicine and Biology 1140). ISBN 978-3-030-14740-2;978-3-030-14741-9.
- [12] ROOS, W. H.; BRUINSMA, R.; WUITE, G. J. L. Physical virology. *Nature Physics*, v. 6, n. 10, p. 733–743, oct 2010. ISSN 1745-2473.
- [13] BUZÓN, P.; MAITY, S.; ROOS, W. H. Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 12, n. 4, p. e1613, 2020.

- [14] Llorente García, I.; MARSH, M. A biophysical perspective on receptor-mediated virus entry with a focus on HIV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Elsevier, v. 1862, n. 6, p. 183158, jun 2020. ISSN 0005-2736.
- [15] PABLO, P. J. de. The application of atomic force microscopy for viruses and protein shells: Imaging and spectroscopy. In: . [S.l.: s.n.], 2019. p. 161–187.
- [16] MATEU, M. G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: A virological perspective. *Virus Research*, Elsevier B.V., v. 168, n. 1-2, p. 1–22, 2012. ISSN 01681702.
- [17] CHANG, Y.-R. et al. Automated afm force curve analysis for determining elastic modulus of biomaterials and biological samples. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 37, p. 209–218, 2014. ISSN 1751-6161.
- [18] KUZNETSOVA, T. G. et al. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, v. 38, p. 824–833, 2007.
- [19] ROOS, W. H. et al. *Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms*. [S.l.]: Springer, 2007. 1484–1497 p.
- [20] HERNANDO-PÉREZ, M. et al. The interplay between mechanics and stability of viral cages. *Nanoscale*, v. 6, n. 5, p. 2702–2709, 2014. ISSN 20403364.
- [21] MORRIS A. R. KIRBY, A. P. G. V. J. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. 2a. ed. [S.l.]: Imperial College Press, 2009. ISBN 978-1-84816-467-3.
- [22] NOWAKOWSKI, R.; LUCKHAM, P. Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy. *Surface and Interface Analysis*, v. 33, p. 118 – 121, 02 2002.
- [23] DOUGLAS, T.; YOUNG, M. Viruses: making friends with old foes. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 312, n. 5775, p. 873–875, 2006.
- [24] MASTROBATTISTA, E. et al. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nature reviews Drug discovery*, Nature Publishing Group, v. 5, n. 2, p. 115–121, 2006.
- [25] DEDEO, M. T.; FINLEY, D. T.; FRANCIS, M. B. Viral capsids as self-assembling templates for new materials. In: *Progress in molecular biology and translational science*. [S.l.]: Elsevier, 2011. v. 103, p. 353–392.
- [26] ROOS, W. H.; WUITE, G. J. Nanoindentation studies reveal material properties of viruses. *Advanced Materials*, Wiley Online Library, v. 21, n. 10-11, p. 1187–1192, 2009.
- [27] PAEZ-ESPINO, D. et al. Uncovering Earth's virome. *Nature*, v. 536, n. 7617, p. 425–430, aug 2016. ISSN 0028-0836.
- [28] FRENCH, R. H. et al. Long range interactions in nanoscale science. *Rev. Mod. Phys.*, American Physical Society, v. 82, p. 1887–1944, Jun 2010.
- [29] PHILLIPS, R.; QUAKE, S. R. The Biological Frontier of Physics. *Phys. Today*, v. 59, n. 5, p. 38–43, may 2006. ISSN 0031-9228.
- [30] FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781760607 0781760607.

- [31] BREITBART, M.; ROHWER, F. *Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?* [S.l.]: Elsevier Current Trends, 2005. 278–284 p.
- [32] AL-TAWFIQ, J. A.; ZUMLA, A.; MEMISH, Z. A. *Coronaviruses: Severe acute respiratory syndrome coronavirus and Middle East respiratory syndrome coronavirus in travelers*. [S.l.]: Lippincott Williams and Wilkins, 2014. 411–417 p.
- [33] ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.*, v. 382, n. 8, p. 727–733, feb 2020. ISSN 0028-4793.
- [34] MATEU, M. G. The Structural Basis of Virus Function. In: . [S.l.: s.n.], 2013. p. 3–51.
- [35] LODISH, H. et al. In molecular cell biology. *New York, NY: W H Freeman & Co*, v. 4, 01 1995.
- [36] RYAN, K. J. et al. *MEDICAL MICROBIOLOGY*. [S.l.: s.n.], 2018. ISBN 9781259859816.
- [37] KING, A. M. et al. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. [S.l.]: Elsevier, 2011. v. 9.
- [38] THOMPSON, D. *On Growth and Form*. [S.l.]: Dover Publications, 1992. (Dover Books on Biology Series, v. 1). ISBN 9780486671352.
- [39] PARVEZ, M. K. Geometric architecture of viruses. *World Journal of Virology*, v. 9, n. 2, p. 5–18, aug 2020. ISSN 2220-3249.
- [40] AKSYUK, A. A. et al. Subassemblies and asymmetry in assembly of herpes simplex virus procapsid. *mBio*, v. 6, n. 5, p. e01525–15, 2015.
- [41] ZANDI, R. et al. On virus growth and form. *Phys. Rep.*, Elsevier B.V., v. 847, p. 1–102, 2020. ISSN 03701573.
- [42] BIORENDER. 2021. Disponível em: <<https://app.biorender.com/>>. Acesso em: 25 Fev. 2021.
- [43] CASPAR, D. L. D.; KLUG, A. Physical Principles in the Construction of Regular Viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 27, p. 1–24, jan 1962. ISSN 0091-7451.
- [44] CASTÓN, J. R.; CARRASCOSA, J. L. The Basic Architecture of Viruses. In: . [S.l.: s.n.], 2013. p. 53–75.
- [45] RACANIELLO, V. R. et al. *Principles of Virology*. [S.l.]: American Society of Microbiology, 2015. v. 4. 57–71 p. ISBN 9781555819514.
- [46] LEE, Y. J. et al. Fabricating Genetically Engineered High-Power Lithium Ion Batteries Using Multiple Virus Genes. *Science*, apr 2009. ISSN 0036-8075.
- [47] CHURCH, G. M.; GAO, Y.; KOSURI, S. Next-Generation Digital Information Storage in DNA. *Science*, v. 337, n. 6102, p. 1628 LP – 1628, sep 2012.
- [48] SCHWARZ, B.; DOUGLAS, T. Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 7, n. 5, p. 722–735, sep 2015. ISSN 19395116.

- [49] VEESLER, D.; JOHNSON, J. E. Virus Maturation.
- [50] AGGARWAL, A. Determination of prestress and elastic properties of virus capsids. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 97, p. 032414, Mar 2018. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.97.032414>>.
- [51] CORRE, G. et al. Stochastic fluctuations and distributed control of gene expression impact cellular memory. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 9, p. 1–22, 12 2014.
- [52] WEINBERGER, L. S. et al. Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: Hiv-1 tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell*, v. 122, n. 2, p. 169–182, 2005. ISSN 0092-8674.
- [53] GABBIANI, F.; COX, S. J. *Mathematics for Neuroscientists*. [s.n.], 2010. ISBN 9780123748829. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/book/9780128018958/mathematics-for-neuroscientists>>.
- [54] LAI, M.; HOLMES, K. *Fields Virology, edited by DM Knipe & PM Howley*. [S.l.]: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [55] MASTERS, P. S. *The Molecular Biology of Coronaviruses*. [S.l.]: Elsevier, 2006. 193–292 p.
- [56] BAKHSHANDEH, B. et al. Mutations in sars-cov-2; consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus. *Microbial Pathogenesis*, Elsevier BV, v. 154, p. 104831, may 2021. ISSN 08824010.
- [57] KSIAZEK, T. G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England journal of medicine*, Mass Medical Soc, v. 348, n. 20, p. 1953–1966, 2003.
- [58] WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in china. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 265–269, mar 2020. ISSN 0028-0836.
- [59] BRITTON, P. Coronaviruses: General features (coronaviridae). In: *Encyclopedia of Virology*. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 193–197.
- [60] CHAN, J. F. W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting wuhan. *Emerging Microbes and Infections*, Taylor and Francis Ltd., v. 9, n. 1, p. 221–236, jan 2020. ISSN 22221751.
- [61] PEIRIS, M.; POON, L. L. Severe acute respiratory syndrome (sars) and middle east respiratory syndrome (mers) (coronaviridae). In: *Encyclopedia of Virology*. [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 814–824.
- [62] CAO, C. et al. Analysis of spatiotemporal characteristics of pandemic sars spread in mainland china. *BioMed research international*, Hindawi, v. 2016, 2016.
- [63] CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.

- [64] NAQVI, A. A. T. et al. Insights into sars-cov-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, Elsevier, p. 165878, 2020.
- [65] KAM, Y. W. et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate Fc γ RII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine*, v. 25, n. 4, p. 729–740, 2007. ISSN 0264410X.
- [66] CHEN, J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-ncov—a quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes and infection*, Elsevier, v. 22, n. 2, p. 69–71, 2020.
- [67] HU, B. et al. Discovery of a rich gene pool of bat sars-related coronaviruses provides new insights into the origin of sars coronavirus. *PLoS pathogens*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 13, n. 11, p. e1006698, 2017.
- [68] SOUZA, P. F. et al. The human pandemic coronaviruses on the show: The spike glycoprotein as the main actor in the coronaviruses play. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 179, p. 1–19, may 2021. ISSN 01418130.
- [69] ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in saudi arabia. *New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 2012.
- [70] NEUROLOGICAL Complications of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: A Report of Two Cases and Review of the Literature. *Case Rep. Neurol. Med.*, Hindawi Limited, p. 1–6, 2016. ISSN 2090-6668.
- [71] CHANG, T.-J. et al. Genomic analysis and comparative multiple sequences of sars-cov2. *Journal of the Chinese Medical Association*, LWW, v. 83, n. 6, p. 537–543, 2020.
- [72] ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, Elsevier Ltd, v. 14, n. 4, p. 407–412, jul 2020. ISSN 18780334.
- [73] LI, F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, v. 3, n. 1, p. 237–261, 2016.
- [74] WRAPP, D. et al. Cryo-em structure of the 2019-ncov spike in the prefusion conformation. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020. ISSN 0036-8075.
- [75] YIN, C. Genotyping coronavirus sars-cov-2: methods and implications. *Genomics*, Elsevier, v. 112, n. 5, p. 3588–3596, 2020.
- [76] CORSE, E.; MACHAMER, C. E. Infectious bronchitis virus e protein is targeted to the golgi complex and directs release of virus-like particles. *Journal of Virology*, v. 74, n. 9, p. 4319–4326, 2000.
- [77] BOSCARINO, J. A. et al. Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly. *Journal of Virology*, v. 82, n. 6, p. 2989–2999, 2008.
- [78] ARNDT, A. L.; LARSON, B. J.; HOGUE, B. G. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *Journal of Virology*, v. 84, n. 21, p. 11418–11428, 2010.

- [79] KUO, L.; MASTERS, P. S. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *Journal of Virology*, v. 76, n. 10, p. 4987–4999, 2002.
- [80] NEUMAN, B. W. et al. A structural analysis of m protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*, v. 174, n. 1, p. 11–22, 2011. ISSN 1047-8477.
- [81] NEUMAN, B.; BUCHMEIER, M. Chapter one - supramolecular architecture of the coronavirus particle. In: ZIEBUHR, J. (Ed.). *Coronaviruses*. [S.l.]: Academic Press, 2016, (Advances in Virus Research, v. 96). p. 1–27.
- [82] ENHANCED binding of SARS-CoV-2 Envelope protein to tight junction-associated PALS1 could play a key role in COVID-19 pathogenesis.
- [83] WATANABE, Y. et al. Site-specific glycan analysis of the sars-cov-2 spike. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 369, n. 6501, p. 330–333, 2020. ISSN 0036-8075.
- [84] VENKATAGOPALAN, P. et al. Coronavirus envelope (e) protein remains at the site of assembly. *Virology*, v. 478, p. 75–85, 2015. ISSN 0042-6822.
- [85] NIETO-TORRES, J. L. et al. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology*, v. 415, n. 2, p. 69–82, 2011. ISSN 0042-6822.
- [86] DEDIEGO, M. L. et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the e gene is attenuated in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, v. 81, n. 4, p. 1701–1713, 2007.
- [87] CONG, Y. et al. Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *Journal of Virology*, v. 94, n. 4, p. e01925–19, 2020.
- [88] YAO, H. et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell*, v. 183, n. 3, p. 730–738.e13, oct 2020. ISSN 00928674.
- [89] DOERR, A. Cryo-electron tomography. *Nature Methods*, Nature Publishing Group, v. 14, n. 1, p. 34–34, 2017.
- [90] ZLOTNICK, A. Theoretical aspects of virus capsid assembly. *Journal of Molecular Recognition*, v. 18, n. 6, p. 479–490, 2005.
- [91] HURST, K. R. et al. A major determinant for membrane protein interaction localizes to the carboxy-terminal domain of the mouse coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, v. 79, n. 21, p. 13285–13297, 2005.
- [92] MCBRIDE, R.; ZYL, M. V.; FIELDING, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, v. 6, n. 8, p. 2991–3018, 2014. ISSN 1999-4915.
- [93] ZúñIGA, S. et al. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *Journal of Virology*, v. 84, n. 4, p. 2169–2175, 2010.
- [94] VERHEIJE, M. H. et al. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *Journal of Virology*, v. 84, n. 21, p. 11575–11579, 2010.

- [95] CHEN, C.-Y. et al. Structure of the sars coronavirus nucleocapsid protein rna-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral rna. *Journal of Molecular Biology*, v. 368, n. 4, p. 1075–1086, 2007. ISSN 0022-2836.
- [96] CHANG, C.-k. et al. Transient oligomerization of the sars-cov n protein – implication for virus ribonucleoprotein packaging. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 8, p. 1–9, 05 2013.
- [97] YE, Q. et al. Architecture and self-assembly of the sars-cov-2 nucleocapsid protein. *Protein Science*, v. 29, n. 9, p. 1890–1901, 2020.
- [98] BÁRCENA, M. et al. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Academy of Sciences, v. 106, n. 2, p. 582–587, 2009. ISSN 0027-8424.
- [99] KLEIN, S. et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 5885, dec 2020. ISSN 2041-1723.
- [100] BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy. *Surface science*, Elsevier, v. 126, n. 1-3, p. 236–244, 1983.
- [101] NobelPrize.org. *The Nobel Prize*. 2021. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1986/press-release/>>. Acesso em: 25 Fev. 2021.
- [102] BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, v. 56, n. 9, p. 930–933, 1986. ISSN 00319007.
- [103] CHANG, K.-C. et al. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, No longer published by Elsevier, v. 24, n. 4, p. 162–169, dec 2012. ISSN 1016-3190.
- [104] GALEMBECK, F. et al. Microscopia de sondas : uma caixa de ferramentas da nanotecnologia. 1980.
- [105] PINTO, E. P. et al. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. 2013.
- [106] ALENCAR, L. M. R. *Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica*. Tese (Tese (Doutorado em Física)) — Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- [107] BUTT, H. J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.*, v. 59, n. 1-6, p. 1–152, 2005. ISSN 01675729.
- [108] ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. 3rd. ed. [S.l.]: Academic Press, 2011. ISBN 978-0-12-391927-4.
- [109] NUSSENZVEIG, H. M. *Curso de Física Básica - Vol I*. 4ª. ed. São Paulo: Blucher, 2002. ISBN 85-212-0298-9.
- [110] KLAPETEK, P. *Dimensional Measurements*. [S.l.: s.n.], 2012. 81–125 p. ISBN 9781455730582.

- [111] KEESOM, W. Van der waals attractive force. *Physikalische Zeitschrift*, v. 22, p. 129–141, 1921.
- [112] LONDON, F. The general theory of molecular forces. *Transactions of the Faraday Society*, The Royal Society of Chemistry, v. 33, p. 8b–26, 1937.
- [113] DEBYE, P. Die van der waalsschen kohasion-skrafte. *Phys. Zs.*, v. 21, p. 178–187, 1920.
- [114] LEITE, F. d. L. *Caracterização de forças de adesão em materiais utilizando a microscopia de força atômica*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2002.
- [115] ZANETTE, S. Funcionamento de um microscópio de força atômica. *Notas do curso ministrado no CBPF*, 1997.
- [116] HUBER, G. et al. Evidence for capillarity contributions to gecko adhesion from single spatula nanomechanical measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 102, n. 45, p. 16293–16296, 2005.
- [117] CHEN, S.; SOH, A. The capillary force in micro- and nano-indentation with different indenter shapes. *International Journal of Solids and Structures*, v. 45, n. 10, p. 3122–3137, 2008. ISSN 0020-7683.
- [118] COSTA, E. *Estudo das propriedades mecânicas de ligantes asfálticos por Microscopia de Força Atômica*. Tese (Tese (Doutorado em Física)) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- [119] Myers, D. *Some general concepts about interfaces*. *Interfaces and colloids (Part 1)*. 2002. Disponível em: <<http://www.cheresources.com/interfaces2.shtml>> Acesso em: Junho de 2009.
- [120] RADMACHER, M. Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy. *Methods in Cell Biology*. *Cell Mechanics.*, v. 83, p. 347–342, 2007.
- [121] HERTZ, H. On contact between elastic bodies. *J. Reine Angew. Math*, v. 92, p. 156–171, 1882.
- [122] JOHNSON, K. L.; JOHNSON, K. L. *Contact mechanics*. [S.l.]: Cambridge university press, 1987.
- [123] JOHNSON, K. K. kendall and ad roberts. *Proc. Roy. Soc., London A*, v. 324, 1971.
- [124] DERJAGUIN, B. V.; MULLER, V. M.; TOPOROV, Y. P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, Elsevier, v. 53, n. 2, p. 314–326, 1975.
- [125] LIMA, R. C. *Marcadores de superfície para células de leucemias mieloblásticas: uma proposta através da microscopia de força atômica*. Tese (Monografia (Graduação em Física)) — Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.
- [126] HERMANSSON, M. The dlvo theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 14, p. 105–119, 1999.

- [127] NÁRAY-SZABÓ, G. Electrostatic effects in proteins. *Periodicum Biologorum*, v. 101, n. 4, p. 325–331, 1999. ISSN 00315362.
- [128] SOTRES, J.; BARÓ, A. M. AFM imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single DNA molecules. *Biophysical Journal*, v. 98, n. 9, p. 1995–2004, 2010. ISSN 15420086.
- [129] ALENCAR, L. M. R. *Estudo morfológico e das propriedades elásticas de plaquetas humanas por microscopia de força atômica*. Tese (Dissertação (Mestrado em Física)) — Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- [130] HOUSECROFT, C.; SHARPE, A. *Inorganic Chemistry*. Pearson, 2018. ISBN 9781292134147. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=8VyjtAEACAAJ>>.
- [131] MAURICE, P. A. Applications of atomic-force microscopy in environmental colloid and surface chemistry. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 107, p. 57–75, 1996.
- [132] OHNESORGE, F.; BINNIG, G. True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 260, n. 5113, p. 1451–1456, 1993.
- [133] SENDEN, T. J. Force microscopy and surface interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, Elsevier, v. 6, n. 2, p. 95–101, may 2001. ISSN 1359-0294.
- [134] BOWEN, W.; HILAL, N. *Atomic Force Microscopy in Process Engineering. Introduction to AFM for Improved Processes and Products*. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, 2009. ISBN 978-1-85617-517-3.
- [135] CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.*, 1999. ISSN 01675729.
- [136] WEISENHORN, A. et al. Measuring adhesion, attraction, and repulsion between surfaces in liquids with an atomic-force microscope. *Physical Review B*, APS, v. 45, n. 19, p. 11226, 1992.
- [137] MALKIN, A. I.; ISAYEV, A. I. *Rheology: Concepts, Methods, and Applications*. 3rd. ed. Toronto: ChemTec, 2017. 500 p. ISBN 9781927885222.
- [138] BARNES, H.; HUTTON, J.; F.R.S. Walters, K. *AN INTRODUCTION TO RHEOLOGY*. Amsterdam: Elsevier B.V, 1989. v. 1. 200 p. ISBN 0444871403.
- [139] LANDAU, L. D.; LIFSHITZ, E. M. *Course of Theoretical Physics - Theory of Elasticity*. 3rd. ed. Moscow: Pergamon Press Oxford, 1986. v. 7. 195 p. ISBN 075062633X.
- [140] ATANACKOVIC, T. M.; GURAN, A. *Theory of Elasticity for Scientists and Engineers*. Boston, MA: Birkhäuser Boston, 2000. ISBN 978-1-4612-7097-3.
- [141] IKAI, A. *The World of Nano-Biomechanics*. [S.l.]: Elsevier, 2017. 340 p. ISBN 9780444636867.
- [142] GERE, J. M.; TIMOSHENKO, S. P. Analysis of stress and strain. In: *Mechanics of materials*. [S.l.]: Springer, 1991. p. 378–460.

- [143] TIMOSHENKO, S.; GOODIER, J. *Theory of Elasticity*. [S.l.]: McGraw-Hill, New York, 1970.
- [144] BURNHAM, N. A.; COLTON, R. J. Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, AVS, v. 7, n. 4, p. 2906–2913, 1989.
- [145] DU, B. et al. Study of elastic modulus and yield strength of polymer thin films using atomic force microscopy. *Langmuir*, ACS Publications, v. 17, n. 11, p. 3286–3291, 2001.
- [146] DOMKE, J.; RADMACHER, M. Measuring the elastic properties of thin polymer films with the atomic force microscope. *Langmuir*, ACS Publications, v. 14, n. 12, p. 3320–3325, 1998.
- [147] VINCKIER, A.; SEMENZA, G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS letters*, Wiley Online Library, v. 430, n. 1-2, p. 12–16, 1998.
- [148] SNEDDON, I. N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, v. 3, n. 1, p. 47–57, 1965. ISSN 00207225.
- [149] KASAS, S.; STUPAR, P.; DIETLER, G. Afm contribution to unveil pro- and eukaryotic cell mechanical properties. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 73, p. 177 – 187, 2018. ISSN 1084-9521. Application of Atomic Force Microscopy in cell biology.
- [150] POISSON, S.-D. *Mémoire sur l'équilibre et mouvement des corps élastiques*. [S.l.]: L'Académie des sciences, 1828.
- [151] LAKES, R. Deformation mechanisms in negative poisson's ratio materials: structural aspects. *Journal of materials science*, Springer, v. 26, n. 9, p. 2287–2292, 1991.
- [152] LAKES, R.; WITT, R. Making and characterizing negative poisson's ratio materials. *International Journal of Mechanical Engineering Education*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 30, n. 1, p. 50–58, 2002.
- [153] LOVE, A. E. H. *A treatise on the mathematical theory of elasticity*. [S.l.]: Cambridge university press, 1927.
- [154] GERCEK, H. Poisson's ratio values for rocks. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*, v. 44, n. 1, p. 1 – 13, 2007. ISSN 1365-1609.
- [155] JOHNSON, K. L.; KENDALL, K.; ROBERTS, A. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the royal society of London. A. mathematical and physical sciences*, The Royal Society London, v. 324, n. 1558, p. 301–313, 1971.
- [156] MULLER, V.; DERJAGUIN, B.; TOPOROV, Y. P. On two methods of calculation of the force of sticking of an elastic sphere to a rigid plane. *Colloids and Surfaces*, Elsevier, v. 7, n. 3, p. 251–259, 1983.
- [157] LOPES, G. A. D. C.; FILHO, H. D. D. F. Energia dissipada em modo tapping pelo microscópio de força atômica. *Acta Scientiarum - Technology*, Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringa, v. 37, n. 4, p. 403–409, oct 2015. ISSN 18078664.

- [158] LAKES, R.; LAKES, R. S. *Viscoelastic materials*. [S.l.]: Cambridge university press, 2009.
- [159] FURMANSKI, J. et al. Viscoelasticity. In: *Mech. Biomater*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2011. p. 208–240.
- [160] MORENO, R. Rheology. In: *Encycl. Mater. Sci. Technol*. [S.l.]: Elsevier, 2001. p. 8192–8196.
- [161] FUNG, Y.-c. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2013.
- [162] BHAT, S. et al. Viscoelasticity in biological systems: a special focus on microbes. *Viscoelasticity—From Theory to Biological Applications.: InTech*, p. 123–156, 2012.
- [163] HOFFMAN, B. D.; GRASHOFF, C.; SCHWARTZ, M. A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 475, n. 7356, p. 316–323, 2011.
- [164] VINING, K. H.; MOONEY, D. J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology*, Nature Publishing Group, v. 18, n. 12, p. 728–742, 2017.
- [165] SWAMINATHAN, V. et al. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer research*, AACR, v. 71, n. 15, p. 5075–5080, 2011.
- [166] SHENG, J. Y. et al. AFM-based indentation method for measuring the relaxation property of living cells. *J. Biomech.*, Elsevier Ltd, v. 122, p. 110444, jun 2021. ISSN 18732380.
- [167] REBELO, L. M. et al. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, v. 24, n. 5, p. 055102, feb 2013. ISSN 0957-4484.
- [168] AKKIRAJU, H. et al. Quantifying BMP2 Dynamics during Stem Cell Differentiation using, Real Time Imaging, Combined Confocal AFM and Systems Biology Approaches. *Biophys. J.*, Elsevier BV, v. 102, n. 3, p. 66a, jan 2012. ISSN 00063495.
- [169] REBÊLO, L. M. et al. Microrheology of cells with magnetic force modulation atomic force microscopy. *Soft Matter*, v. 10, n. 13, p. 2141–2149, 2014. ISSN 1744683X.
- [170] REBELO, L. M. et al. Correlating cell morphology and viscoelasticity to investigate diseases with atomic force microscopy. *Microscopy: advances in scientific research and education*, p. 141–152, 2014.
- [171] SURESH, S. et al. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta biomaterialia*, Elsevier, v. 1, n. 1, p. 15–30, 2005.
- [172] CARLO, D. D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *Journal of laboratory automation*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 17, n. 1, p. 32–42, 2012.
- [173] HOCHMUTH, R. M. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of biomechanics*, Elsevier, v. 33, n. 1, p. 15–22, 2000.

- [174] DAO, M.; LIM, C. T.; SURESH, S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, Elsevier, v. 51, n. 11-12, p. 2259–2280, 2003.
- [175] GUCK, J. et al. The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 81, n. 2, p. 767–784, 2001.
- [176] BU, Y. et al. Measuring viscoelastic properties of living cells. *Acta Mechanica Solida Sinica*, Springer, v. 32, n. 5, p. 599–610, 2019.
- [177] DING, Y.; XU, G. K.; WANG, G. F. On the determination of elastic moduli of cells by AFM based indentation. *Sci. Rep.*, v. 7, 2017. ISSN 20452322.
- [178] HECHT, F. M. et al. Imaging viscoelastic properties of live cells by afm: power-law rheology on the nanoscale. *Soft matter*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 23, p. 4584–4591, 2015.
- [179] EFREMOV, Y. M.; OKAJIMA, T.; RAMAN, A. Measuring viscoelasticity of soft biological samples using atomic force microscopy. *Soft matter*, Royal Society of Chemistry, v. 16, n. 1, p. 64–81, 2020.
- [180] PABLO, P. J. de. Atomic force microscopy of viruses. In: _____. *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 247–271. ISBN 978-94-007-6552-8.
- [181] MCPHERSON, A. Atomic-Force Microscopy (AFM) Investigation of Viruses. In: *Encycl. Virol.* [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 218–232.
- [182] KUZNETSOV, Y. G.; MCPHERSON, A. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells. *Microbiology and molecular biology reviews*, Am Soc Microbiol, v. 75, n. 2, p. 268–285, 2011.
- [183] IVANOVSKA, I. L. et al. Discrete fracture patterns of virus shells reveal mechanical building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 108, n. 31, p. 12611–12616, 2011.
- [184] ROOS, W. H. et al. Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 106, n. 24, p. 9673–9678, 2009. ISSN 00278424.
- [185] ORTEGA-ESTEBAN, A. et al. Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2013.
- [186] YANG, X. et al. Genetic cluster analysis of SARS-CoV-2 and the identification of those responsible for the major outbreaks in various countries. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 1287–1299, jan 2020. ISSN 2222-1751.
- [187] BACLAYON, M. et al. Prestress strengthens the shell of norwalk virus nanoparticles. *Nano Letters*, v. 11, n. 11, p. 4865–4869, 2011. PMID: 21967663.
- [188] PABLO, P. J. de; MATEU, M. G. Mechanical properties of viruses. In: _____. *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 519–551. ISBN 978-94-007-6552-8.

- [189] ROOS, W. et al. Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and molecular life sciences*, Springer, v. 64, n. 12, p. 1484, 2007.
- [190] EGHIAIAN, F. et al. The influenza virus mechanical properties are dominated by its lipid envelope. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 96, n. 3, p. 15a, 2009.
- [191] LI, S. et al. Bending and puncturing the influenza lipid envelope. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 100, n. 3, p. 637–645, 2011.
- [192] KOL, N. et al. Mechanical properties of murine leukemia virus particles: effect of maturation. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 91, n. 2, p. 767–774, 2006.
- [193] KOL, N. et al. A stiffness switch in human immunodeficiency virus. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 92, n. 5, p. 1777–1783, 2007.
- [194] ZHAO, Y.; GE, Z.; FANG, J. Elastic modulus of viral nanotubes. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 78, p. 031914, Sep 2008.
- [195] LUQUE, A.; REGUERA, D. Theoretical studies on assembly, physical stability and dynamics of viruses. In: _____. *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 553–595. ISBN 978-94-007-6552-8.
- [196] Centers for Disease Control and Prevention. *2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use*. [S.l.], 2019. 1–80 p. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/134922/download>>.
- [197] American Type Culture Collection. *Heat-inactivated SARS-CoV-2*. 2021. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/vr-1986hk#detailed-product-information>>.
- [198] LAUE, M. et al. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 3515, dec 2021. ISSN 2045-2322.
- [199] BAR-ON, Y. M. et al. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife*, v. 9, apr 2020. ISSN 2050-084X.
- [200] KE, Z. et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, v. 588, n. 7838, p. 498–502, dec 2020. ISSN 0028-0836.
- [201] LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, v. 581, n. 7807, p. 215–220, may 2020. ISSN 0028-0836.
- [202] KUMAR, A. et al. SARS-CoV-2-specific virulence factors in COVID-19. *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 3, p. 1343–1350, mar 2021. ISSN 0146-6615.
- [203] MORENO-CERRADA, D. et al. Loading the dice: The orientation of virus-like particles adsorbed on titanate assisted organosilanized surfaces. *Biointerphases*, v. 14, n. 1, p. 011001, jan 2019. ISSN 1934-8630.
- [204] CARRASCO, C. et al. DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 37, p. 13706–13711, sep 2006. ISSN 0027-8424.

- [205] BOONE, S. A.; GERBA, C. P. Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1687–1696, mar 2007. ISSN 0099-2240.
- [206] SATTAR, S. Survival of microorganisms on animate and inanimate surfaces and their disinfection. In: *Disinfection, sterilization and antisepsis: principles and practices in healthcare facilities*. Washington, D.C.: [s.n.], 2001. p. 195–205.
- [207] ABOUBAKR, H. A.; SHARAFELDIN, T. A.; GOYAL, S. M. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 68, n. 2, p. 296–312, mar 2021. ISSN 1865-1674.
- [208] KISS, B. et al. Topography, Spike Dynamics, and Nanomechanics of Individual Native SARS-CoV-2 Virions. *Nano Letters*, v. 21, n. 6, p. 2675–2680, mar 2021. ISSN 1530-6984.
- [209] OGHARANDUKUN, E. et al. Velcro-like mannose and slime-like sialic acid interactions guide self-adhesion and aggregation of virus N-glycan shields. *bioRxiv*, p. 2020.05.01.072769, jan 2020.
- [210] ALENGHAT, F. J.; GOLAN, D. E. Membrane Protein Dynamics and Functional Implications in Mammalian Cells. In: . [S.l.: s.n.], 2013. p. 89–120.

A. APÊNDICE



SARS-CoV-2 Unrevealed: Ultrastructural and Nanomechanical Analysis

Ruana Cardoso-Lima, Pedro Filho Noronha Souza, Maria Izabel Florindo Guedes, Ralph Santos-Oliveira, and Luciana M. Rebelo Alencar*

Cite This: *Langmuir* 2021, 37, 10762–10769

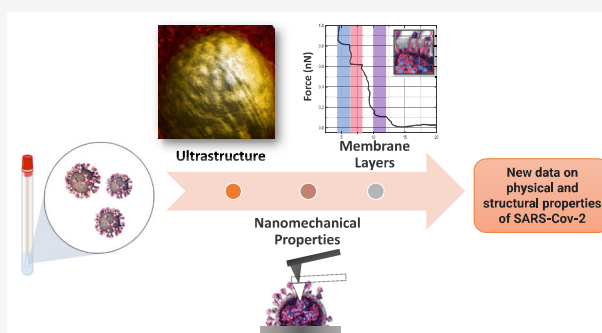
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: The ongoing outbreak of the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) started in late 2019 and spread across the world, infecting millions of people, with over 3.3 million deaths worldwide. To fight back the virus, it is necessary to understand how the main structures work, especially those responsible for the virus infectivity pathogenicity. Here, using the most advanced atomic force microscopy techniques, SARS-CoV-2 viral particles were analyzed, with a special focus on their ultrastructure, adsorption conformation, and nanomechanical behavior. The results uncovered the aspects of the organization and the spatial distribution of the proteins on the surface of the viral particles. It also showed the compliant behavior of the membrane and ability to recover from mechanical injuries. At least three layers composing the membrane and their thickness were measured, protecting the virus from external stress. This study provides new insight into the ultrastructure of SARS-CoV-2 particles at the nanoscale, offering new prospects that could be employed for mapping viral surfaces. The understanding of the viruses' capacity to survive mechanical disruptions at any level and their ability to recover from such injuries can shed a light on the structure–function relationship and help us to find targets for drug action, especially for this virus that, to this day, has no course of treatment approved.



1. INTRODUCTION

Coronaviruses (CoVs) are enveloped viruses with a non-segmented single-stranded positive RNA (27–32 kb) genome belonging to the *Coronaviridae* family of the order *Nidovirales*. Their genome has 10 open read frames (ORFs).¹ Some of these ORFs are responsible for producing the structural proteins (sp): Spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N).² The nucleocapsid protein (N) interacts with the RNA producing a ribonucleoprotein (RNP) particle protecting the viral genome.³ Recently, many studies on the structural aspects of the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) have been done to understand the molecular and structural dynamics of the virus infection mechanisms.^{4–6} Structural crystallographic analysis provided essential information about the structural flexibility of S protein and its role in infection.⁷ Although many studies have evaluated the virus proteins, focusing on chemical composition, very few studies have been done on the virus particle conformation and nanomechanical properties.^{8–10}

Nanomechanical studies provide essential insights into the unique mechanical properties of viruses. The viral capsid functions go beyond the protection of the genome being considered important to the viral life cycle, interaction with

vectors, and pathogenicity. Thus, the understanding of its meta-stability, conformational plasticity, ultrastructural morphology, and mechanical properties (e.g., resiliency, brittleness/hardness, material fatigue, and resistance to osmotic stress) is essential to understand the virus behavior and allowing the development of drugs and vaccines based on this structural, mechanical, and physicochemical model.^{11–13} Studies on physical virology have driven new approaches to developing antiviral strategies, viral-based drug delivery systems, and the design of proteins and peptides with therapeutic applications toward viruses.^{14–16} For instance, Yang and Lu¹⁵ have discussed that the knowledge produced by physical virology studies was employed to design new molecules-based drugs toward the Hepatitis B virus (HBV), which are now in clinical trials. Here, the knowledge produced about the SARS-CoV-2 nanomechanical properties could be

Received: June 3, 2021
Revised: July 29, 2021
Published: August 5, 2021



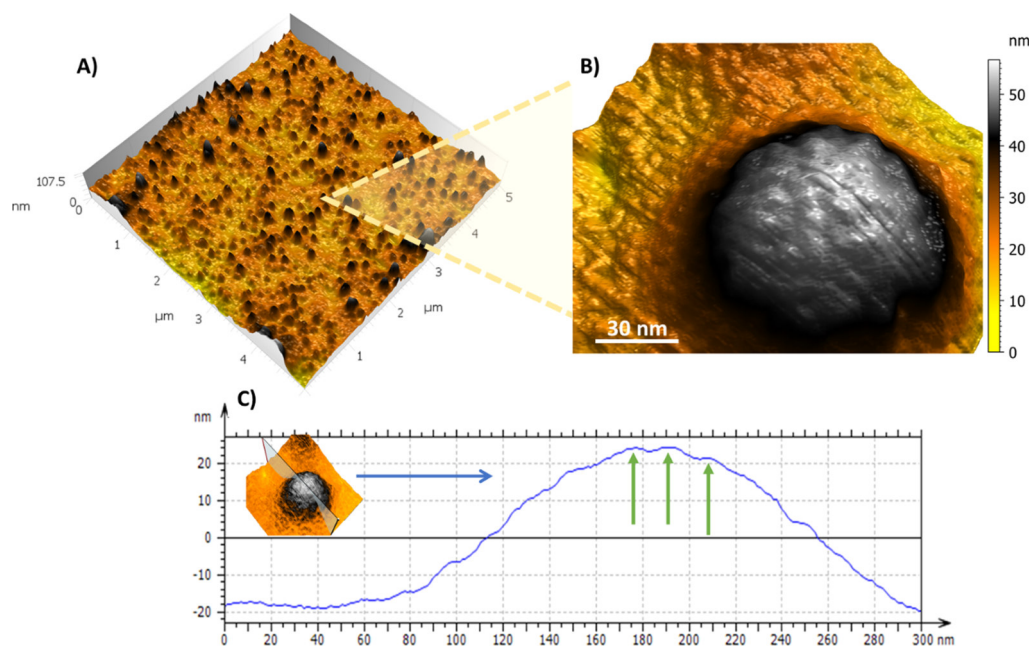


Figure 1. AFM topographic map revealing the viral structure and shape of SARS-CoV-2 viral particles: (A) Zoomed-out view of several viral particles dispersed on the substrate with diameter varying between 90 and 185 nm. (B) Single viral particle surface zoom showing the protein arrangement details on the surface. (C) Profile cross section of a single particle, emphasizing the protein units on the surface with diameter measurements compatible with the spike protein. The inset map shows the direction where the cross section was measured. Green arrows highlight the cross section over proteins.

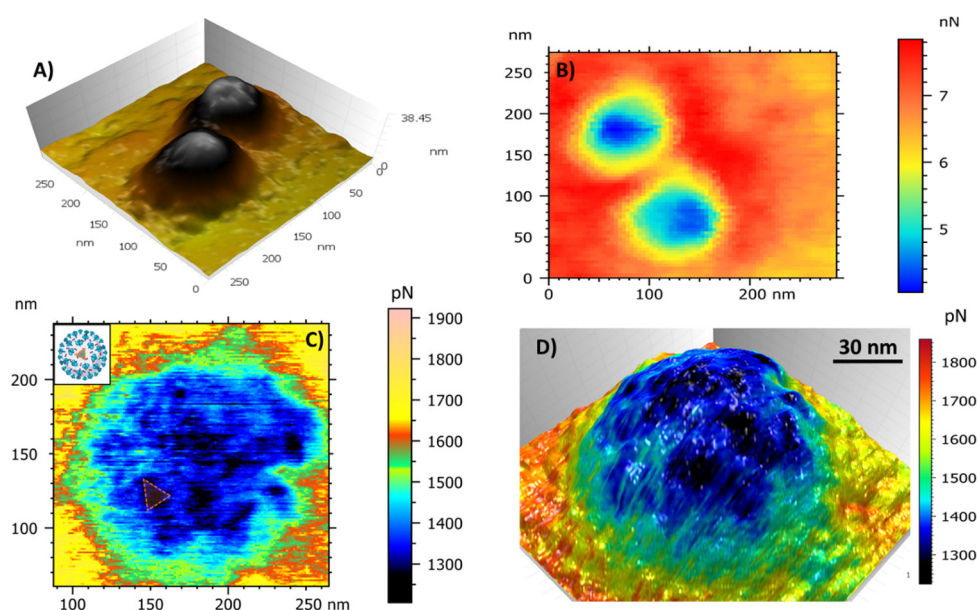


Figure 2. Adhesion maps: (A) topographic image of the SARS-Cov-2 and (B) its respective adhesion map. (C) Adhesion map of a single viral particle revealing details of the different adhesion forces. The inset image shows a correlation of the suggested triangular shape structure and the spike protein. (D) Combination of the three-dimensional topographic map and the adhesion map.

useful to design a new specific drug toward the SARS-CoV-2 to affect the aspects of physical properties of the virus.

In this study, the structure of the SARS-CoV-2 was investigated by AFM (atomic force microscopy), a powerful tool, which may be employed to reveal structural details with high reliability, bringing new insights into the ultrastructure, architecture, and nanomechanical properties of the SARS-CoV-2.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Structure and Shape of SARS-CoV-2 Viral Particles. In the topographic maps (Figure 1), it is possible to observe the outer structure as the uppermost layer from the virus particle. We measured that the virus particle has a size of 92 nm with a standard deviation (SD) of 15.7 nm (Figure 1A). These data are corroborated by Laue et al.¹⁷ and Bar-On et

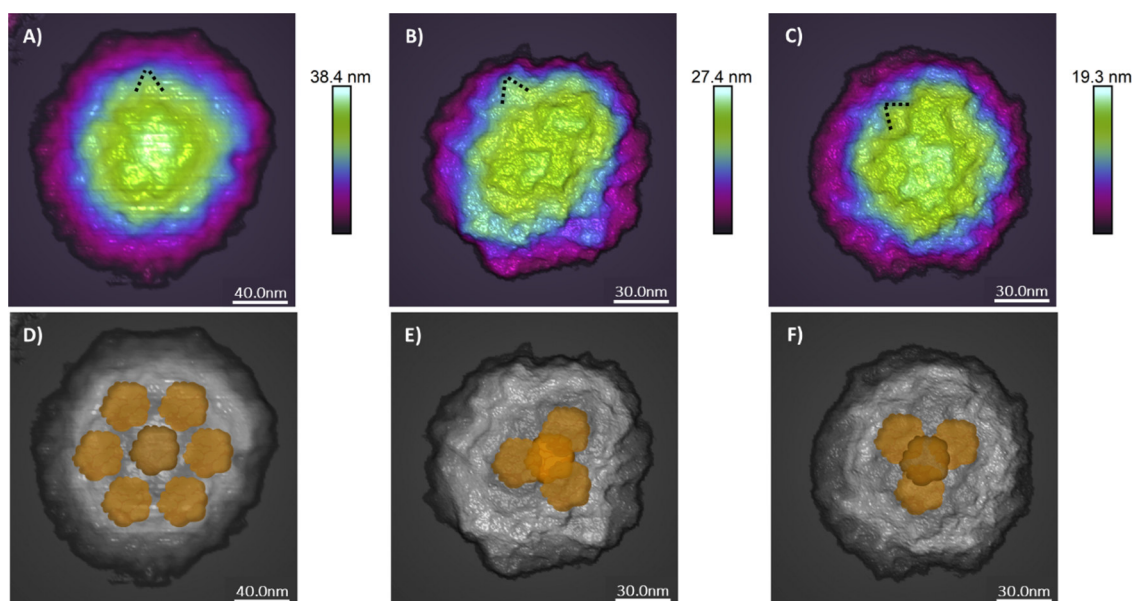


Figure 3. Information about internal structure: (A–C) Different adsorption patterns of SARS-CoV-2 viral particles on a glass. The black dotted lines highlight the spike-like structures present in all height images. (D) It suggests a hexameric assembly of the viral particle internal structures after adsorption and (E and F) a tetrahedral pyramidal assembly with different pyramidal rotations.²⁴

al.,¹⁸ which stated that the viral particle size can be around 100 nm without considering the spike proteins.

On the top view of the viral particle, it is possible to observe in Figure 1B a complex structure with units having a measured diameter of $10.9 \text{ nm} \pm 1.9 \text{ nm SD}$. These findings corroborate the model proposed by Klein and collaborators¹⁹ for the diameter of the spike protein. The spacing from center to center of each of these units was measured to be $11.8 \text{ nm} \pm 2.5 \text{ nm SD}$. The cross section in Figure 1C highlights the particle height profile, with a height of $21.4 \text{ nm} \pm 4.4 \text{ nm SD}$ after deposition in a glass substrate. The green arrows point to some of the protein units that have been measured, with an inset map showing the direction in which the particle was sectioned. S proteins tend to reorder their organization on the virion surface,²⁰ in this sense, AFM images have an advantage: the ability to analyze the whole surface, suggesting a higher density of S proteins.

Neuman et al.²¹ have reported protein distribution across the SARS-CoV-1 membrane using Cryo-EM images and Fourier transform. Their findings suggest that the spikes interspacing is $\sim 15 \text{ nm}$ and they reported other densities spaced 5 to 8 nm apart, connecting the RNP (ribonucleoprotein complex: composed by the N protein and the genome) to the membrane region, but could not confidently affirm if these densities were related to M or N proteins. For the SARS-CoV-2, Kiss et al.²² and Lyonais et al.²³ reported a “bald” viral particle showing a smooth surface, without clear smaller structures. Oppositely, our data show that the viral particle membrane is crowded with smaller structures, suggesting the structural description of the proteins on the membrane surface.

In Figure 2, it is shown the adhesion force maps resulting from the interaction between the AFM probe and the substrate containing the viral particles.

The bidimensional adhesion map shown in Figure 2B corresponds to the viral particles shown on the topographic map in Figure 2A. It is possible to identify the viral particle as being very distinguished from the substrate. The surrounding

region of the viral particles has a scale of adhesion different from the center, with a measured thickness of $\sim 20 \text{ nm}$, compatible with the distance from the spike corona base on the membrane and its top portion, as reported in the literature.¹⁷

In addition to this, it is possible to observe an interaction between the coronas of the particles. The region suggested as corona appears with a different scale around the particle because the peripheral spikes are interacting with the substrate and the spikes at the top of the virus do not interact with the substrate, only with the probe, resulting in a different distribution of adhesive forces.

Further analysis on the adhesion mode (Figure 2C) focusing on the center of the viral particle showed triangular shape structures, compatible with the spike proteins diameter. The distribution of the spike proteins on the surface of the viral particle is shown in Figure 2D. Different contrasts of adhesion forces on the top of the viral particle may be related to the width of the postfusion action of the S2 subunit to bundle.²⁴ Postfusion is an essential process performed by the S2 subunit from the spike protein. During the SARS-CoV-2 infection and after the recognition of the ACE2 receptor²⁵ by the S1 subunit, the spike protein changes to postfusion mode, and S2 drives the fusion between viral and cellular membranes that led to virus entry in the cell.¹ In this direction, our findings suggest that the spike proteins are structures that can interact with a great range of molecular and cellular mechanisms, which corroborates the high virulence profile of the SARS-CoV-2 as stated by Kumar et al.²⁶

It is important to address that the adhesion maps do not have the same physical nature as height maps. During peak force quantitative measurements, on AFM, the maps are obtained from the force curves composed from cycles of approximation and retraction of the tip relative to the sample. The topographic maps are derived from the approach curves while the adhesion maps are related to the retraction portion, and they both reveal different information about the sample structure.

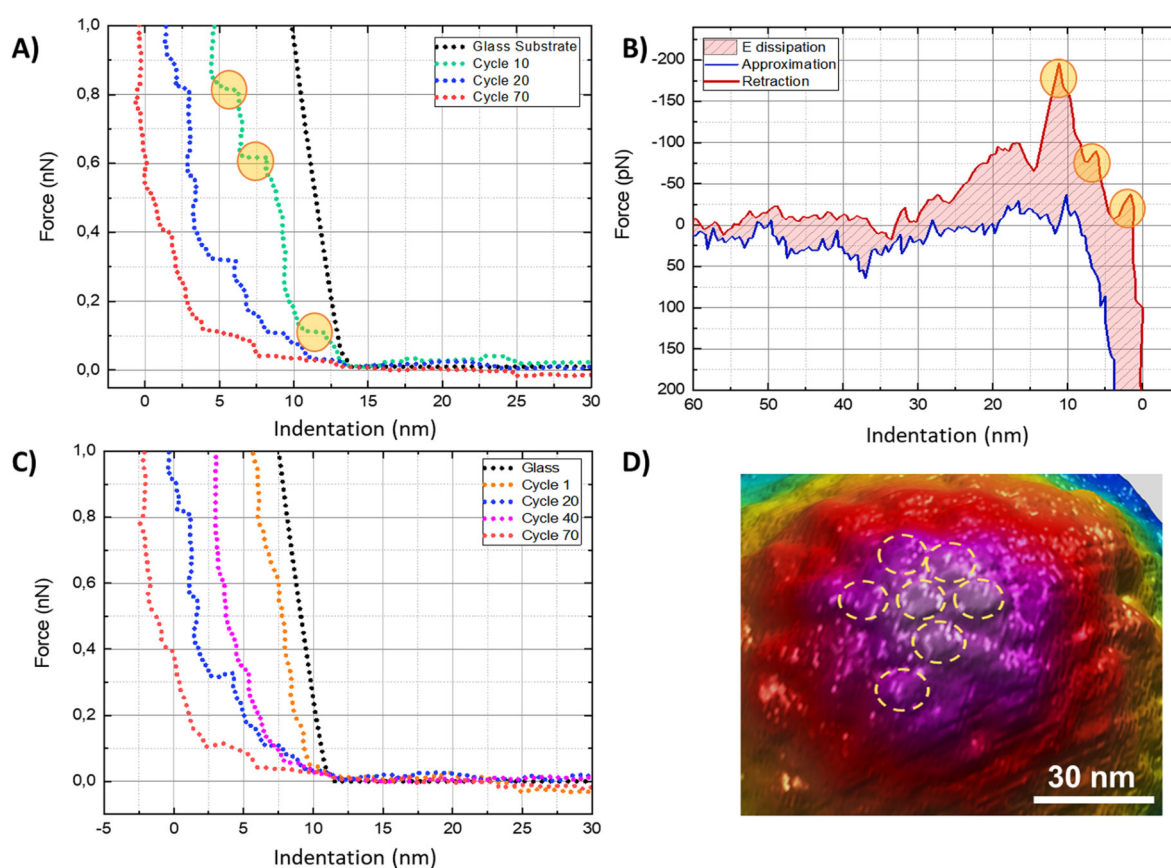


Figure 4. Indentation curves: (A) reference force curve on the glass and the viral particle. Yellow circles in the 10th cycle emphasize the characteristic steps of rupture events. (B) Force versus separation graph shows one late cycle of approach (blue curve) and retraction (red curve) of the AFM probe on the viral particle surface. The yellow circles emphasize the release events of the penetration in the viral structure. The red-streaked region corresponds to energy dissipation showing the viscoelastic character of the viral particle. (C) Reference force curves on the glass and the viral particle. (D) Membrane structure suggesting the absence or repositioning of proteins (dashed circles) on the surface of the viral particle.

In force spectroscopy measurements via AFM, the adhesion forces are a combination of electrostatic, van der Waals, capillary, and forces promoted by chemical bond breakage.²⁷ In particular, in cases of nonfunctionalized probes (such as in this research), the adhesion forces are taken as nonspecific interactions and it is not possible to separate the contribution of each one of these forces. However, as the probes used here to analyze all samples are made of the same material and have the same specifications (geometry, tip radius, etc.), just as the experiments for all samples were performed under the same conditions (temperature and humidity of the air); thus, differences in the contrast of adhesion forces are mainly related to van der Waals and electrostatic interactions, representing different components of the particle surface.

Considering the influence of electrostatic forces, Butt²⁷ and collaborators pointed out that, especially in measurements in air, contributions of electrostatic forces are expected, especially in nonconductive samples and in low air humidity, when charge dissipation is ineffective. Thus, changes arising from electrostatic forces result in a greater or lesser accumulation of charge on the surface, which is associated with the composition and/or the structure of the membrane. Liu²⁸ and coworkers did show through surface plasmon resonance (SPR) the validation of the role of electrostatic force in the interaction between SARS-CoV-2 pseudoviruses and surfaces, providing

evidence that negatively charged surfaces can inhibit the adsorption of SARS-CoV-2 pseudoviruses and suggesting new routes into the design of anticontamination personal protection equipment (PPE) and other technologies based on the viral surface charges. These results corroborate the ones presented here, in which the structures with higher adhesion force values are related to the substrate functionalized with poly-L-lysine, which has a positive charge, whereas the regions on the map with lower adhesion force values correspond to the triangular structures, associated with the spike protein.

The data presented in Figure 3 show the difference in adsorption patterns observed for the SARS-CoV-2 viral particle in a glass substrate (in air).

In Figure 3A–C, it is also possible to recognize the spike protein profile highlighted by the dashed line represented by triangular shapes, typical of the spike structure. Due to the charge interaction of the viral particle membrane with the substrate²⁹ (glass), it is possible to observe internal particle structures. For instance, in Figure 3A–C, it is possible to observe a globular-like pattern and their different adsorption assemblies on the glass substrate. This result corroborates the findings of Lu and collaborators for the organization of the nucleocapsid.³⁰ Figure 3D–F suggests a different internal assembly in different particles adsorption, with hexameric (Figure 3D) and tetrahedral assembly (Figure 3E,F) and in the

latter, with different pyramidal rotations, according to the model proposed by Yao and co-workers.²⁴

2.2. Indentation Analysis. In this study, we focused on measuring the resistance of each layer of the viral particle membrane. Thus, we performed several indentation cycles with up to 1 nN force with an indentation velocity of 50 nm/s. The reason for the chosen parameters is that viscoelastic materials under loading stress at low frequencies have a more soft behavior, opposing the more solid-like response at higher frequencies.³¹

In this direction, we performed 70–100 cycles of force curves at the same region of the viral particles. The indentation results shown in Figure 4A represent the behavior of the viral particles upon different stages of indentation compared to the force curve performed on a glass slide substrate (a black dotted line). The separation between the curves gradually increases accordingly with the advance of the cycles performed, indicating the indentation of the probe on the viral particle. Each step observed in force curves (regions with constant force values—yellow circles in Figure 4A) is related to the rupture³² of a structural layer. In the 10th cycle, it is possible to observe a first step related to a constant force of ~100 pN, a second step around 600 pN, and the third step with a rupture plateau force around 800 pN, indicating the rupture of three layers (or individual membrane structures) that require forces of the order of 100, 600, and 800 pN, respectively, to be disrupted at an indentation speed of 50 nm/s. It is possible to see that a total layer width of ~6 nm has been ruptured. These data confirmed the previous studies showing that SARS-CoV-2 may have a membrane with a width from 6 to 8 nm.¹⁹

On the 20th cycle, it is possible to observe several rupture events (steps) between 100 and 900 pN of the rupture force interval. These multiple events, with smaller thickness plateaus, suggest that there is an attempt by the viral particle to reassemble the membrane proteins; however, the reassembly is not completely effective due to the continuous stress on the layer, even at low speeds.

Finally, on the 70th cycle, there is the common first step on ~100 pN and two smaller plateaus on a force scale of ~400 and ~500 pN, respectively. Correspondingly, there is a bigger displacement compared to the glass curve, indicating that the viral internal structure, the nucleocapsid, is continuously deformed by the indentation of the AFM probe, and because of that the disrupting of the layers requires smaller forces than the ones on the earlier cycles.

In the retraction curve shown in Figure 4B, three main penetration release events³³ stand out from the SARS-Cov-2 membrane structure, evidenced by the yellow circles, confirming the presence of three main structures suggested in the result as shown in Figure 4A. The hysteresis observed between the approach and retraction cycles corresponds to the energy dissipation of the AFM probe over the surface of the viral particle, demonstrating its viscoelastic character, especially at low speeds of indentation. The first plateau common to all cycles shown in the graph in Figure 4A reveals something interesting: there is always a tendency to reassemble the viral membrane and an increasingly thicker layer is disrupted with smaller amounts of loading forces as the cycles advance.

Although the indentation analysis confirmed the rupture of the particle layers, further analysis on the AFM showed that local damage on the membrane layers can be fixed by reassembly of the membrane itself. In Figure 4C, the 40th cycle (magenta curve) shows a tendency to decrease indentation,

when compared with previous cycles (20th cycle, blue curve). This effect may be explained by the reorganization of the membrane proteins, showing that a complete rupture of this organization is only possible using higher loading forces.

Nonetheless, the viral particle reassembly effect could also be explained by the viscoelastic behavior of the membrane or the displacement and subsequent mobility of protein units. The protein mobility was explained by Alenghat and Golan,³⁴ which have shown that membrane protein mobility may vary from simple random Brownian motion to both axial and orbital movement into the membrane itself. Finally, as shown in Figure 4D, it is possible to observe a conformation of proteins in a hexamer-like arrangement but with an apparently missing unit, and this could be related to the membrane protein mobility.

The nanomechanical analysis performed in this study corroborated the findings made by Yao et al.²⁴ and Astuti and Ysrafil,³⁵ for the SARS-CoV-2 structure. The analysis showed that three layers may compose the virus structure, with them being mechanically resistant, suggesting that proteins and other membrane components may act as different layers that protect the virus from external stress and act as the infective structure. This protective behavior is important to better understand the fragility of the virus to the host immune system on the environmental conditions. These data are quite desirable to promote the evaluation of new products, especially for disinfection purposes. The nanoindentation analysis also corroborated the suggestion made by Lyonais et al.,²³ confirming the deformable feature of the SARS-CoV-2. Finally, the most innovative result is that the SARS-CoV-2 virus may self-assemble after mechanical stress. These data are crucial to better understand the resistance of the virus and propose new drugs and techniques to fight back the disease.

Nanomechanical analyses are common to assess the mechanical properties of diverse biomaterials.^{36,37} AFM has proven to be a valuable approach to describe the detailed structural architectures and features of a wide variety of viruses.^{38–41} Regarding mechanical stiffness, nonenveloped capsids differ widely in their ability to withstand high mechanical loads without being physically disturbed or even irreversibly deformed.²⁰ For example, it has been shown that procapsids of phage Φ 29⁴² and MVM (minute virus of mice) particles⁴³ can bear deformations, but that repeated deformations eventually lead to shell failure. The Φ 29 pro heads were able to withstand the loading force of 2.8 nN for ~30 cycles before the shell breakage but the MVM collapsed after only seven deformation repetitions, with a maximum force of 0.9 nN. The CCMV (Cowpea chlorotic mottle virus)⁴⁴ capsid had a plastic response to multiple indentations, at pH = 5, with the capsids showing persistent deformation and slow partial restoration of the original height. In contrast, at pH = 6, the capsid withstood the deformations and showed no signs of fracture. Thus, the fatigue of nonenveloped viruses is quite specific to the particular species of virus and may differ even for the same species at different environmental conditions, demonstrating that, even though they are structurally uniform in terms of capsids, they still present a wide range of materials properties.^{32,45}

For enveloped viruses, as is the case of SARS-CoV-2, notable differences were found in the investigation of their mechanical properties. Influenza viral particles are very deformable, mechanically behaving like its soft lipid envelope.⁴⁶ In contrast, the immature virions of two retroviruses, murine leukemia-

(MLV)⁴⁷ and human immunodeficiency (HIV-1),⁴⁸ are mechanically very rigid, with Young's modulus comparable to those of icosahedral capsids. The results of the mechanical properties for these three enveloped viruses (MLV, HIV-1, and Influenza) suggested that an effective fusion with the cell membranes may require a soft and flexible virion structure that allows extensive contact between the virus and the cell. In this direction, monitoring and changing the mechanical properties of the enveloped virus may promote a mechanical control of the virus entry into host cells.⁴⁵

3. CONCLUSIONS

In this study, the ultrastructure and nanomechanical properties of SARS-Cov-2 viral particles were evaluated by AFM. The high-resolution topographic revealed the structures of the membrane surface of the viral particle and its distribution, corroborating with theoretical models proposed in the literature for this virus. In addition, the adhesion force maps showing the interaction between the AFM tip and the viral particle surface revealed structures with size and shape compatible with spike proteins. For these structures, adhesion forces presented different values from the other membrane components, demonstrating a more negative nature of these structures. Another relevant finding was the observation of internal particle structures with a globular-like pattern and their different adsorption assemblies on a glass substrate. An adsorption study comparing between different substrates and calculation of the adsorption energy might be a useful further investigation. The membrane fatigue tests using successive indentations on the same region of the virus surface with curve acquisition speeds of 50 nm/s allowed us to see membrane rupture events, layer by layer, suggesting three main layers, with each one of them having their thickness measured individually and adding up to a total thickness of ~ 6 nm. In addition, it was possible to observe the reorganization of membrane proteins, with force curves of late cycles showing a reduction in the amount of indentation on the particle membrane. The penetrative events were also confirmed by the retraction curves in advanced indentation cycles, showing peaks characteristic of penetrative release, with binding forces reaching up to 200 pN. As a characteristic of viscoelastic materials, at low indentation rates, the viral particle presented a quite evident hysteresis between the approach and retraction curves, characterizing the energy dissipation of the probe during indentation. The results presented here add new data in the characterization of the physical and structural properties of the SARS-Cov-2, reinforcing models presented in the literature.

4. METHODS

4.1. Origin of Virus. Nasopharyngeal (NP) swab samples were collected from symptomatic patients who had acquired COVID-19. These patients were treated in the same hospital and were the two first confirmed cases of COVID-19 in São Paulo city. The specimens were collected on days 2–4 postsymptom onset, placed in 1–2 mL of saline medium, and used for molecular diagnosis and virus isolation. The resulted strain was denominated: SARS-CoV-2 isolate (EPI_ISL_413016).⁴⁹

4.2. Virus Isolation. Vero E6 cells (ATCC, no 1586) were cultured in Minimum Eagle's medium (MEM; Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco) and plated at 100,000 cells/well in a 48-well plate at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere. The virus yield in culture supernatants was quantified by RT-qPCR (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction) using specific primers and a probe

against the Rdrp gene according to RT-qPCR 2019-nCoV (Institute Pasteur protocol).³⁰

4.3. Inactivation. The inactivation followed the ATCC protocol, as described: The heat-inactivated preparation of 2019-nCoV/USA-WA1/2020 (ATCC VR-1986HK) was inactivated by heating it to 65 °C for 30 min, becoming, therefore, unable to replicate. The heat-treated material is tested for virus inactivation by culturing in Vero E6 cells (ATCC CRL-1586) for two passages of 14 days each to confirm that there is no evidence of viral replication.⁵¹ This protocol is corroborated by Betejat et al.⁵² It is important to notice that the inactivation process, used to manipulate the virus in the AFM, could affect the integrity of the surface of the sample. According to Loveday et al., the inactivation process used in the SARS-CoV-2 virus may affect the structural and genomic integrity of the virus.

4.4. Virus Stocks. Viable (titre 1.0×10^6 PFUs in 500 μ L) and inactivated from isolate SARS-CoV-2 (EPI_ISL_413016) were prepared and used in this study.

4.5. AFM Structure Analysis and Nanomechanical Experiments. For AFM measurements, 10 μ L of MEM solution with viral particle suspensions were deposited on microscope slides (13 mm diameter), previously treated with poly-L-lysine⁵³ 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA). The slides were analyzed on Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) and the probes used were SNL (Bruker) with 0.06 N/m nominal spring probes with 0.06 N/m nominal spring constant in the peak force quantitative nanomechanics (QNM) mode. The structural parameters of the viral particles were calculated using the Gwyddion 2.57 software,⁵⁴ applying the boundary grain detection to the topographic images (5 μ m² scan area), masking the regions corresponding to the particles. From these regions, statistical information on the height and diameter of 415 particles was calculated. For the diameter and spacing of membrane proteins units' measurements, five different viral particles (a scan area of 150 nm²) were analyzed using the cross-section tool. Viral particle indentation experiments were performed on seven different virions, and each one has undergone 70 to 120 indentation cycles. Adhesion maps were analyzed on 13 viral particles (250 nm² scan area).

For the indentation analysis, the measurements were done on the QNM Ramp Mode in fluid following the same protocol described by Kiss et al.²² Briefly, we also performed the measurements on the liquid mode, but in our case, the fluid used was culture medium solution (MEM). We used a force setpoint of 1 nN and a tip velocity of 50 nm/s, which, to our best knowledge, is lower than any other AFM study performed on the SARS-CoV-2. AFM data were analyzed and the maps were obtained with the aid of Mountains SPIP8 software (Digital Surf-France).

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Luciana M. Rebelo Alencar – Department of Physics, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão 65080-805, Brazil; orcid.org/0000-0001-8210-2016; Email: luciana.alencar@ufma.br

Authors

Ruana Cardoso-Lima – Department of Physics, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão 65080-805, Brazil

Pedro Filho Noronha Souza – Department of Biochemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará 60455900, Brazil; orcid.org/0000-0003-2524-4434

Maria Izabel Florindo Guedes – Department of Biotechnology, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará 60741, Brazil

Ralph Santos-Oliveira – Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Radiopharmacy, Zona Oeste State University, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 23070200, Brazil; Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear

Engineering Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
21941906, Brazil; orcid.org/0000-0002-0905-481X

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.langmuir.1c01488>

Author Contributions

The conception and design of the study were performed by R.C.-L. and L.M.R.A. The acquisition of data about activity in vitro and in vivo was performed by R.S.-O., P.F.N.S., and M.I.F.G. The microscopic analysis and interpretation were performed by R.C.-L. and L.M.R.A. The drafting of the article and the critical review were done by all the authors giving final approval to the version for submission.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES, UFMA, and FIOCRUZ for the support rendered during this research development. The data were processed using the Mountains software courtesy of Digital Surf, France.

REFERENCES

- (1) Souza, P. F. N.; Mesquita, F. P.; Amaral, J. L.; Landim, P. G. C.; Lima, K. R. P.; Costa, M. B.; Farias, I. R.; Lima, L. B.; Montenegro, R. C. The human pandemic coronaviruses on the show: The spike glycoprotein as the main actor in the coronaviruses play. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *179*, 1–19.
- (2) Wu, C.; Liu, Y.; Yang, Y.; Zhang, P.; Zhong, W.; Wang, Y.; Wang, Q.; Xu, Y.; Li, M.; Li, X.; Zheng, M.; Chen, L.; Li, H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 766–788.
- (3) Wang, M.-Y.; Zhao, R.; Gao, L. J.; Gao, X. F.; Wang, D. P.; Cao, J. M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 1–17.
- (4) Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T. S.; Herrler, G.; Wu, N. H.; Nitsche, A.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e8.
- (5) Hurlburt, N. K.; Seydoux, E.; Wan, Y. H.; Edara, V. V.; Stuart, A. B.; Feng, J.; Suthar, M. S.; McGuire, A. T.; Stamatatos, L.; Pancera, M. Structural basis for potent neutralization of SARS-CoV-2 and role of antibody affinity maturation. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5413.
- (6) Shin, D.; Mukherjee, R.; Grewe, D.; Bojkova, D.; Baek, K.; Bhattacharya, A.; Schulz, L.; Wiedera, M.; Mehdipour, A. R.; Tascher, G.; Geurink, P. P.; Wilhelm, A.; van der Heden van Noort, G. J.; Ovaia, H.; Müller, S.; Knobeloch, K. P.; Rajalingam, K.; Schulman, B. A.; Cinatl, J.; Hummer, G.; Ciesek, S.; Dikic, I. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature* **2020**, *587*, 657–662.
- (7) Turoňová, B.; Sikora, M.; Schürmann, C.; Hagen, W. J. H.; Welsch, S.; Blanc, F. E. C.; von Bülow, S.; Gecht, M.; Bagola, K.; Hörner, C.; van Zandbergen, G.; Landry, J.; de Azevedo, N. T. D.; Mosalaganti, S.; Schwarz, A.; Covino, R.; Mühlebach, M. D.; Hummer, G.; Krijnse Locker, J.; Beck, M. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science* **2020**, *370*, 203–208.
- (8) Cascella, M.; Rajnik, M.; Cuomo, A.; Dulebohn, S. C.; Di Napoli, R. *Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)*; StatPearls 19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> (2021).
- (9) Naqvi, A. A. T.; Fatima, K.; Mohammad, T.; Fatima, U.; Singh, I. K.; Singh, A.; Atif, S. M.; Hariprasad, G.; Hasan, G. M.; Hassan, M. I. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*, No. 165878.
- (10) Surya, W.; Li, Y.; Torres, J. Structural model of the SARS coronavirus E channel in LMPG micelles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2018**, *1860*, 1309–1317.
- (11) Wen, A. M.; Rambhia, P. H.; French, R. H.; Steinmetz, N. F. Design rules for nanomedical engineering: From physical virology to the applications of virus-based materials in medicine. *J. Biol. Phys.* **2013**, *39*, 301–325.
- (12) Singh, P.; Gonzalez, M. J.; Manchester, M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 23–41.
- (13) Zhi, X.; Zheng, C.; Xiong, J.; Li, J.; Zhao, C.; Shi, L.; Zhang, Z. Nanofilamentous Virus-Based Dynamic Hydrogels with Tunable Internal Structures, Injectability, Self-Healing, and Sugar Responsiveness at Physiological pH. *Langmuir* **2018**, *34*, 12914–12923.
- (14) Vahey, M. D.; Fletcher, D. A. Erratum: Low-Fidelity Assembly of Influenza A Virus Promotes Escape from Host Cells (*Cell* (2019) 176(1–2) (281–294.e19), (S0092867418314557) (10.1016/j.cell.2018.10.056)). *Cell* **2019**, *176*, 678.
- (15) Yang, L.; Lu, M. Small Molecule Inhibitors of Hepatitis B Virus Nucleocapsid Assembly: A New Approach to Treat Chronic HBV Infection. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 802–813.
- (16) Butterfield, G. L.; Lajoie, M. J.; Gustafson, H. H.; Sellers, D. L.; Nattermann, U.; Ellis, D.; Bale, J. B.; Ke, S.; Lenz, G. H.; Yehdego, A.; Ravichandran, R.; Pun, S. H.; King, N. P.; Baker, D. Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. *Nature* **2017**, *552*, 415–420.
- (17) Laue, M.; Kauter, A.; Hoffmann, T.; Möller, L.; Michel, J.; Nitsche, A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3515.
- (18) Bar-On, Y. M.; Flamholz, A.; Phillips, R.; Milo, R. Sars-cov-2 (Covid-19) by the numbers. *Elife* **2020**, *9*, No. e57309.
- (19) Klein, S.; Cortese, M.; Winter, S. L.; Wachsmuth-Melm, M.; Neufeldt, C. J.; Cerikan, B.; Stanifer, M. L.; Boulant, S.; Bartenschlager, R.; Chlanda, P. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5885.
- (20) Ke, Z.; Oton, J.; Qu, K.; Cortese, M.; Zila, V.; McKeane, L.; Nakane, T.; Zivanov, J.; Neufeldt, C. J.; Cerikan, B.; Lu, J. M.; Peukes, J.; Xiong, X.; Kräusslich, H. G.; Scheres, S. H. W.; Bartenschlager, R.; Briggs, J. A. G. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* **2020**, *588*, 498–502.
- (21) Neuman, B. W.; Adair, B. D.; Yoshioka, C.; Quispe, J. D.; Orca, G.; Kuhn, P.; Milligan, R. A.; Yeager, M.; Buchmeier, M. J. Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7918–7928.
- (22) Kiss, B.; Kis, Z.; Pályi, B.; Kellermayer, M. S. Z. Topography, Spike Dynamics, and Nanomechanics of Individual Native SARS-CoV-2 Virions. *Nano Lett.* **2021**, *21*, 2675–2680.
- (23) Lyonnais, S.; Hénaut, M.; Neyret, A.; Merida, P.; Cazevielle, C.; Gros, N.; Chable-Bessia, C.; Muriaux, D. Atomic force microscopy analysis of native infectious and inactivated SARS-CoV-2 virions. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11885.
- (24) Yao, H.; Song, Y.; Chen, Y.; Wu, N.; Xu, J.; Sun, C.; Zhang, J.; Weng, T.; Zhang, Z.; Wu, Z.; Cheng, L.; Shi, D.; Lu, X.; Lei, J.; Crispin, M.; Shi, Y.; Li, L.; Li, S. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell* **2020**, *183*, 730–738.e13.
- (25) Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; Wang, X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220.
- (26) Kumar, A.; Prasoon, P.; Kumari, C.; Pareek, V.; Faiq, M. A.; Narayan, R. K.; Kulandhasamy, M.; Kant, K. SARS-CoV-2-specific virulence factors in COVID-19. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 1343–1350.

- (27) Butt, H. J.; Cappella, B.; Kappl, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.* **2005**, *59*, 1–152.
- (28) Liu, Y. N.; Lv, Z. T.; Yang, S. Y.; Liu, X. W. Optical Tracking of the Interfacial Dynamics of Single SARS-CoV-2 Pseudoviruses. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 4115–4122.
- (29) Suci, P. A.; Klem, M. T.; Douglas, T.; Young, M. Influence of electrostatic interactions on the surface adsorption of a viral protein cage. *Langmuir* **2005**, *21*, 8686–8693.
- (30) Lu, S.; Ye, Q.; Singh, D.; Cao, Y.; Diedrich, J. K.; Yates, J. R., III; Villa, E.; Cleveland, D. W.; Corbett, K. D. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 502.
- (31) Rebêlo, L. M.; de Sousa, J. S.; Filho, J. M.; Schäpe, J.; Doschke, H.; Radmacher, M. Microrheology of cells with magnetic force modulation atomic force microscopy. *Soft Matter* **2014**, *10*, 2141–2149.
- (32) Roos, W. H.; Bruinsma, R.; Wuite, G. J. L. Physical virology. *Nat. Phys.* **2010**, *6*, 733–743.
- (33) Ogharandukun, E.; Tewolde, W.; Damtae, E.; Wang, S.; Ivanov, A.; Kumari, N.; Nekhai, S.; Chandran, P. L. Velcro-like mannose and slime-like sialic acid interactions guide self-adhesion and aggregation of virus N-glycan shields. *bioRxiv* **2020**, DOI: 10.1101/2020.05.01.072769.
- (34) Alenghat, F. J.; Golan, D. E. Membrane Protein Dynamics and Functional Implications in Mammalian. *Cell* **2013**, *72*, 89–120.
- (35) Astuti, I.; Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2020**, *14*, 407–412.
- (36) Wu, G.; Gotthardt, M.; Gollasch, M. Assessment of nanoindentation in stiffness measurement of soft biomaterials: kidney, liver, spleen and uterus. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18784.
- (37) Rebelo, L. M.; De Sousa, J. S.; Santiago, T. M.; Filho, J. M. Correlating cell morphology and viscoelasticity to investigate diseases with atomic force microscopy. *Microsc. Adv. Sci. Res. Educ.* **2014**, 141–152.
- (38) Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A. J.; Lucas, R. W.; Plomp, M.; McPherson, A. Imaging of viruses by atomic force microscopy. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 2025–2034.
- (39) Moloney, M.; McDonnell, L.; O’Shea, H. Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, and egress from, cultured cells. *Ultramicroscopy* **2004**, *100*, 163–169.
- (40) Malkin, A. J.; Plomp, M.; McPherson, A. Unraveling the architecture of viruses by high-resolution atomic force microscopy. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *292*, 85–108.
- (41) Gladnikoff, M.; Shimoni, E.; Gov, N. S.; Rousso, I. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 2419–2428.
- (42) Ivanovska, I. L.; de Pablo, P. J.; Ibarra, B.; Sgalari, G.; MacKintosh, F. C.; Carrascosa, J. L.; Schmidt, C. F.; Wuite, G. J. L. Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 7600–7605.
- (43) Carrasco, C.; Carreira, A.; Schaap, I. A. T.; Serena, P. A.; Gomez-Herrero, J.; Mateu, M. G.; de Pablo, P. J. DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13706–13711.
- (44) Michel, J. P.; Ivanovska, I. L.; Gibbons, M. M.; Klug, W. S.; Knobler, C. M.; Wuite, G. J. L.; Schmidt, C. F. Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 6184–6189.
- (45) Mateu, M. G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: A virological perspective. *Virus Res.* **2012**, *168*, 1–22.
- (46) Li, S.; Eghiaian, F.; Sieben, C.; Herrmann, A.; Schaap, I. A. T. Bending and puncturing the influenza lipid envelope. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 637–645.
- (47) Kol, N.; Gladnikoff, M.; Barlam, D.; Shneck, R. Z.; Rein, A.; Rousso, I. Mechanical properties of murine leukemia virus particles: Effect of maturation. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 767–774.
- (48) Kol, N.; Shi, Y.; Tsvitov, M.; Barlam, D.; Shneck, R. Z.; Kay, M. S.; Rousso, I. A stiffness switch in human immunodeficiency virus. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1777–1783.
- (49) Yang, X.; Dong, N.; Chan, E. W.-C.; Chen, S. Genetic cluster analysis of SARS-CoV-2 and the identification of those responsible for the major outbreaks in various countries. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 1287–1299.
- (50) Centers for Disease Control and Prevention. *2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use.* (2019).
- (51) Heat-inactivated SARS-CoV-2 | ATCC.
- (52) Batéjat, C.; Grassin, Q.; Manuguerra, J.-C.; Leclercq, I. Heat inactivation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Biosaf. Biosecurity* **2021**, *3*, 1–3.
- (53) Faivre-Moskalenko, C.; Bernaud, J.; Thomas, A.; Tartour, K.; Beck, Y.; Iazykov, M.; Danial, J.; Lourdin, M.; Muriaux, D.; Castelnuovo, M. RNA Control of HIV-1 Particle Size Polydispersity. *PLoS One* **2014**, *9*, No. e83874.
- (54) Nečas, D.; Klapetek, P. Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Cent. Eur. J. Phys.* **2012**, *10*, 181–188.