

**CIRCULAR TÉCNICA**

ISSN 1517-4778  
agosto, 1999

Número 10/99



**A POTENCIALIDADE DA MICROSCOPIA DE VARELURA  
POR SONDA NA PESQUISA AGROPECUÁRIA**

**Embrapa**

## **A POTENCIALIDADE DA MICROSCOPIA DE VARREDURA POR SONDA NA PESQUISA AGROPECUÁRIA**

Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr<sup>1</sup>

Luiz Alberto Colnago<sup>2</sup>

Luiz Henrique Capparelli Mattoso<sup>3</sup>

Carlos Manoel Pedro Vaz<sup>4</sup>

Paulo Estevão Cruvinel<sup>1</sup>

### **INTRODUÇÃO**

Os microscópios têm sido peça fundamental na abertura de novas fronteiras em ciência. O microscópio ótico revolucionou a biologia permitindo aos cientistas obter imagens de células vivas, e com o advento da microscopia eletrônica aprofundou-se o entendimento das estruturas da célula e de materiais orgânicos. A invenção e o desenvolvimento da microscopia de varredura por sonda (MVS) possibilitaram a obtenção de imagens da matéria na escala atômica, abrindo perspectivas recentes sobre várias frentes de pesquisa, que vão desde os semicondutores às biomoléculas.

Microscopia de varredura por sonda (MVS) é o nome genérico de uma família de microscópios que utiliza uma sonda como forma de detecção de algumas grandezas físicas para estudar propriedades de superfícies, sendo microscopia de varredura por tunelamento (MVT) através da corrente de tunelamento (Binnig et al., 1982) e os microscópios de varredura por força (MVF). O MVF pode ser usado para medir muitos tipos de forças, incluindo as forças atrativas de van der Waals (Binnig et al., 1986; McClelland et al., 1987; Martin et al., 1987), forças eletrostáticas (Stern et al., 1988; Butt, 1991; Belaidi et al., 1997), forças de menisco (Mate et al., 1989; Binggeli & Mate,

---

<sup>1</sup> Engenheiro Eletrônico, PhD, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Cx. P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP.

<sup>2</sup> Químico, PhD Embrapa Instrumentação Agropecuária.

<sup>3</sup> Engenheiro de Materiais, PhD, Embrapa Instrumentação Agropecuária.

<sup>4</sup> Físico, PhD, Embrapa Instrumentação Agropecuária.

1995) e outras forças associadas com forças friccionais, interfaciais de líquido/sólido ou líquido/gás (Mate et al., 1987; Bhushan, 1995) ou forças de contato repulsivas (Albrecht & Quate, 1987; Goodman e Garcia, 1991). Cada uma dessas técnicas possui características próprias para obtenção de imagens.

Assim como o MVT, o MFA é capaz de gerar imagens com resolução espacial extremamente alta e nas 3 dimensões, como pode ser visto na figura 1. Entretanto, o MFA pode ser usado para estudar as superfícies de amostras, tanto a eletricamente condutora como a não-condutora, não tendo, dessa forma, a limitação do MVT, a qual é obter imagens em superfícies condutoras ou semicondutoras.

A figura 1 permite comparar a resolução de diversos tipos de microscópios com o MVT, o primeiro da linha dos microscópios de varredura por sonda (MVS), demonstrando que este é atualmente o microscópio com maior resolução lateral e vertical (Weisendanger, 1994).

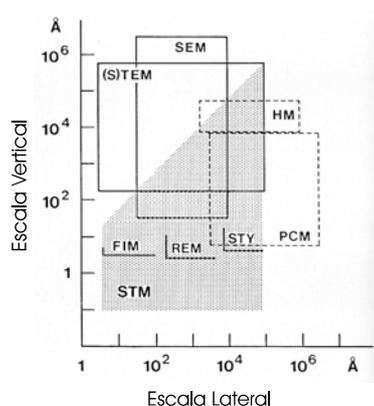


Figura 1. Comparação da resolução de diferentes microscópios. MVT (STM): área sombreada. HM: microscópio ótico de alta resolução. PCM: microscópio de contraste de fase. (S)TEM: microscópio de transmissão eletrônica (de varredura). SEM: microscópio de varredura eletrônica. REM: microscópio de reflexão eletrônica e FIM: microscópio de feixes iônicos (Weisendanger, 1994).

## INTRODUÇÃO À MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

O microscópio de força atômica (MFA) pode ser considerado como um híbrido entre os equipamentos para medida da força em superfícies (SFA) (Israelachvili, 1992) e um perfilômetro de superfície (Teague et al., 1982). O MFA pode operar no regime de trabalho conhecido como modo contato, similar ao perfilômetro, mas com força de carga muito menor. Enquanto o perfilômetro mede forças em torno de  $10^{-4}$  N, o MFA, no modo contato, possui uma faixa de medida que se estende de  $10^{-6}$  N a  $10^{-10}$  N e no modo não-contato - modo este similar ao SFA - chega a medir forças da ordem de  $10^{-13}$  N (Weisendanger, 1994; Frommer, 1996). O modo repulsivo propicia imagens de maior resolução. O MFA pode obter imagem com uma resolução lateral de 0,2nm e uma resolução vertical menor que 0,01nm. Além disso, o MFA atua em uma ampla faixa de magnificação, que ultrapassa a  $10^4$ , isto é, partindo-se de uma imagem atômica até o perfil de uma estrutura microscópica (Albrecht, 1989).

Um dos pontos importantes da técnica de microscopia de força atômica é que ela pode gerar imagens em diferentes condições, como: amostra imersa em líquidos (Marti et al., 1987; Weisenhorn et al., 1990; Thomson et al., 1996), a vácuo (Meyer & Amer, 1988; Howald et al., 1993), em baixas temperaturas (Kirk et al., 1988; Albrecht et al., 1992) e principalmente nas condições ambientais. A vantagem inerente de se trabalhar em diferentes condições é a de realizar estudos das propriedades de diversos materiais nas condições ideais para os mesmos, por exemplo: operando em líquidos, pode-se observar a dinâmica de reações químicas e de processos biológicos no espaço real e no tempo com resolução molecular (Drake et al., 1989; Shao & Yang, 1995).

### Modos de Obtenção de Imagem

Vários tipos de forças contribuem para a deflexão de uma haste em um MFA. A figura 2 ilustra de forma simplificada as

forças envolvidas, de acordo com a distância que separa a agulha da amostra. A curva da força pela distância é uma forma de se analisar essa interação. Na figura 3 pode-se observar essa relação, a qual permite avaliar o regime e o modo de trabalho do sistema.

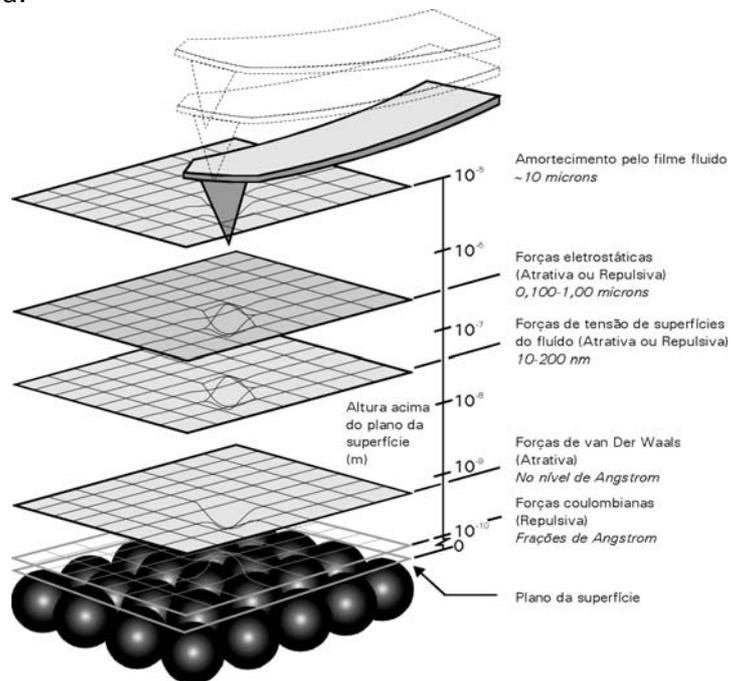


Figura 2. Relação de forças que atuam entre a agulha e amostra, de acordo com as distâncias que as separam.

Para dois corpos eletricamente neutros e não-magnéticos separados por uma ou várias dezenas de nanômetros, pode se dizer que as forças de van der Waals (VDW) usualmente dominam a interação entre eles (Weisendanger, 1994). Essas forças são atrativas. Diminuindo a distância de separação entre os dois corpos para a casa de fração de Angstroms, as forças que irão dominar serão as forças repulsivas. Isso se deve à componente de força coulombiana.

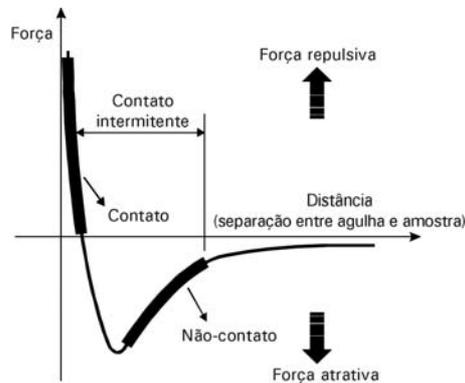


Figura 3. Curva de força pela distância de separação entre a agulha e a amostra.

### *Modo Contato*

O modo contato foi a primeira técnica utilizada para obtenção de imagem com MFA utilizando a detecção do tunelamento eletrônico (Binning et al, 1986). Nesse caso, as forças que interagem entre a agulha e a amostra - modo repulsivo - causam a deflexão quasiestática, seguindo a lei de Hooke, equação 1, e essa deflexão é diretamente medida com o sistema de tunelamento eletrônico e/ou o sistema pela deflexão do feixe de laser.

$$F = K \times Z \quad (1)$$

onde  $F$  é a força em Newtons (N),  $K$  é a constante de mola ( $\text{Nm}^{-1}$ ) e  $Z$  é o valor da deflexão da haste.

A agulha, que faz o suave "contato físico" com a amostra, está colocada na extremidade da haste, a qual possui um baixo valor de constante de mola - no caso, um valor menor do que a constante de mola efetiva ( $K_{\text{ef}}$ ) que segura os átomos da amostra juntos. O valor aproximado da constante de mola efetiva ( $K_{\text{ef}}$ ) da interação interatômica em sólidos (Rugar & Hansma, 1990) pode ser calculado utilizando a seguinte relação:

$$K_{ef(at)} = \omega^2 \times m_{at} = 10N \times m^{-1} \quad (2)$$

Para esse cálculo supõe-se que a frequência vibracional atômica seja tipicamente  $\omega_{at} \approx 10^{13}$  Hz e a massa do átomo, aproximadamente  $m_{at} \approx 10^{-25}$  Kg. Dessa forma, uma haste com uma constante de mola K menor do que  $K_{ef(at)}$  pode ser facilmente fabricada. Por exemplo, uma folha de alumínio com 4mm de comprimento, 1mm de largura e  $10\mu\text{m}$  de espessura tem uma constante de mola em torno de  $1 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ , de acordo com a relação

$$K = \left(\frac{E}{4}\right) * \left(\frac{(w * t^3)}{l^3}\right) \quad (3)$$

onde E é o módulo de Young ( $\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$ ) l, w e t são comprimento (m), largura (m) e espessura (m) da haste, respectivamente. Uma força tão pequena quanto  $10^{-10}$  N irá causar a deflexão neste tipo de haste, como algo em torno de 1 Angstrom, o qual pode ser detectado com o aparelho.

Quando se diz um suave “contato físico”, tem-se que a definição está relacionada à questão do termo contato na escala atômica. O microscópio de força atômica, com sua potencialidade, reabriu a discussão para este tema, não somente do ponto de vista da mecânica clássica como também para a da mecânica quântica.

Observando a figura 3 pode-se notar que no lado direito da mesma os átomos estão separados por uma longa distância. Na seqüência os mesmos estão sendo trazidos para uma maior proximidade. Primeiramente, eles se atraem fracamente um em relação ao outro e essa atração aumenta até que os átomos fiquem tão próximos que suas nuvens eletrônicas passam a se repelir uma em relação a outra, eletrostaticamente. A repulsão eletrostática progressivamente vai sobrepondo as forças atrativas, pelo fato de que a separação interatômica continua a cair.

Adicionalmente à força repulsiva de van der Waals, duas outras forças estão geralmente presentes durante a operação no

modo contato com MFA, que são a força capilar, exercida por uma fina camada de água várias vezes presente em condições ambientes e a força exercida pela haste por si só. A força capilar surge quando uma película de água se forma ao redor da agulha, aplicando uma força atrativa (em torno de  $10^{-8}$ N) que segura a agulha em contato com a superfície. A magnitude da força capilar depende da separação agulha-amostra. Já a força exercida pela haste pode ser descrita como a força da mola quando comprimida (Weisendanger, 1994).

#### *Modo Não-Contato*

A técnica de não-contato explora outros níveis de interação de força, como mostrado na figura 3. O método se baseia na separação entre a agulha e a amostra, em torno de 10nm-100nm. Nessa situação somente forças de longo alcance interagem; no caso, forças de VDW, eletrostática e força de dipolo magnético. O método para a medida da interação de força, no modo não-contato com MFA, é usualmente diferente do modo contato. Ao invés de medir a deflexão quasiestática da haste, a mesma é colocada para vibrar próximo da sua frequência de ressonância pelo uso de um elemento piezelétrico (Binning et al., 1986), e assim mudanças no valor da frequência de ressonância serão devidos às alterações da força de interação agulha-superfície. O uso da propriedade de resposta em frequência da haste faz com que a relação sinal/ruído melhore. A força total entre a agulha e a amostra, no regime de modo não-contato, geralmente está em torno de  $10^{-12}$ N.

Este método é conhecido como método de detecção-*ac* e é sensível ao gradiente de força. A presença de um gradiente de força resultará em mudança da constante de mola efetiva da haste ( $K_{eff}$ ), de acordo com:

$$K_{eff} = K - F' \quad (4)$$

onde  $K$  é a constante de mola da haste na ausência da força proveniente da interação superfície-agulha e  $F'$  a derivada da força em relação ao eixo  $z$  ( $F' = \delta F_z / \delta z$ ).

Na temperatura ambiente, o mínimo detectável para gradiente de força é tipicamente da ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-5} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ . Como exemplo, para uma separação agulha-superfície de  $s = 10 \text{ nm}$  um gradiente de força de  $F' = 10^{-4} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$  corresponderia a uma força de  $5 \times 10^{-13} \text{ N}$ . Usando uma haste com  $K = 1 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ , essa força causaria uma deflexão estática de somente  $5 \times 10^{-3}$  angströms, o qual seria difícil detectar com a maioria dos sensores de deflexão. Dessa forma, o método de detecção-*ac* oferece significativa vantagem, quando comparado ao método de detecção-*dc* para medidas de deflexão da haste usado para o estudo das forças de longo alcance.

### *Contato Intermitente*

O princípio de funcionamento do modo contato intermitente ("quasi non-contact" ou "tapping mode") é similar ao sistema de trabalho do não-contato, isto é, a haste vibra, por intermédio de um piezoelétrico, próximo a sua frequência de ressonância. A haste, juntamente com a agulha, é colocada bem próximo à amostra, até que o deslocamento contínuo e controlado do "scanner" piezo faça com que a agulha toque levemente a amostra. A amplitude de vibração da haste varia entre 20nm e 100nm, mas somente por um breve período do tempo total de vibração a agulha "bate" na amostra. Essa técnica vem sendo aplicada com bons resultados em alguns tipos de amostras consideradas macias, como por exemplo materiais biológicos e polímeros, porque, ao contrário do modo contato, que devido à força lateral pode danificar a amostra, o modo contato intermitente elimina essa influência. Quando comparado ao modo não-contato, a mesma se torna mais efetiva por realizar imagens de grandes áreas que podem incluir maiores variações na topografia da amostra.

## Introdução ao Microscópio de Varredura por Força (MVF)

Microscópio por Varredura de Força (MVF) é o nome genérico de uma família de microscópios que utilizam um “probe” ou sonda como forma de detecção de distintos tipos de força visando estudar propriedades de superfícies. Dentre as várias técnicas de MVF tem-se: a-) força atômica (MFA), b-) força lateral (MFL), c-) força magnética (MFM) e d-) força elétrica (MFE). Cada uma dessas técnicas possui características próprias para obtenção de imagens.

### *Sistema básico para Microscópios de Varredura por Força-MVF*

Os microscópios que detectam os diferentes tipos de força têm em comum a utilização do mesmo princípio sensor, isto é, um sistema óptico que mede o deslocamento de uma haste com uma agulha na ponta com resolução da ordem de  $10^{-11}$ m.

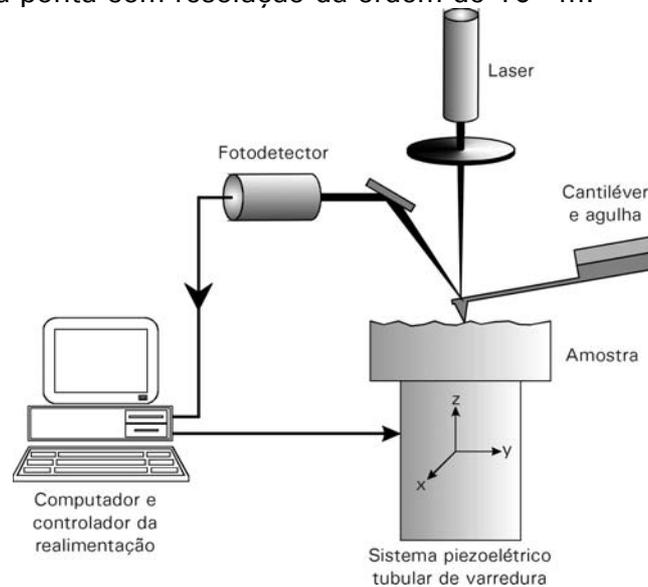


Figura 4. Ilustração do princípio de funcionamento do MVF. Forças atuando entre a agulha e a superfície da amostra causam mínimas deflexões da haste flexível, as quais são detectadas através de fotodetector óptico com a deflexão do feixe de laser.

O princípio básico de funcionamento do MAF pode ser visto no diagrama de blocos da figura 4. Uma agulha bem-fina acoplada a uma haste varre a amostra por intermédio de um transdutor piezolétrico. Esse transdutor é normalmente uma cerâmica de PZT, construída no formato de tubo ou tripé, cujo deslocamento nas posições  $x$ ,  $y$  e  $z$  se dá através da variação da tensão aplicada na mesma. O circuito de realimentação tem como função manter esse deslocamento linear, principalmente na posição  $z$ , para manter a força (modo contato) e/ou altura (modo não-contato) constantes. O sistema óptico, com feixe de laser (comprimento de onda de 650 nm e potência de 5 mW) e fotodetector, é usado para determinar quanto a haste é defletida devido à mudança de topografia da amostra durante a varredura (Meyer & Amer, 1988). Com os valores de deslocamento conhecidos para as posições nos eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$  obtêm-se as imagens de MAV.

Nas figuras 5(a) e (b) têm-se as fotos do microscópio de varredura por sonda instalado na Embrapa Instrumentação Agropecuária, da linha Discoverer modelo TMX 2010, fabricado pela Topometrix.



Figura 5. a) Fotografia tirada no laboratório de microscopia de alta resolução mostrando o microscópio de varredura por sonda. b) Detalhe da cabeça do MAV onde ficam instalados o conjunto haste-agulha e o sistema de laser e detecção.

*Microscopia de Força Lateral-MFL*

Este tipo de técnica mede a deflexão lateral da haste quando a mesma está em contato com a amostra. A técnica permite explorar variações na amostra devido aos diferentes coeficientes de fricção e mudança na interface dos materiais. Para análise quantitativa das imagens as características físicas da haste que devem ser conhecidas são: a constante de mola da curvatura nos eixos x e y e torção. A figura 6 mostra uma haste triangular movimentando de acordo com a força lateral exercida sobre a mesma e o sistema de detecção com 4 fotodiodos.

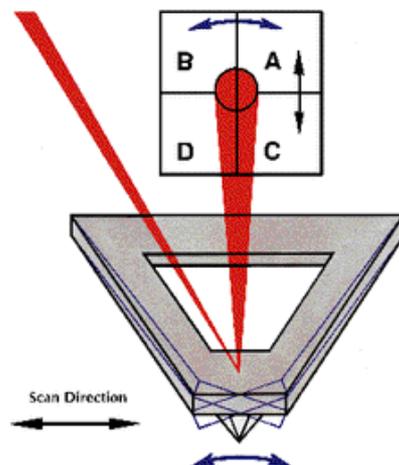


Figura 6. O deslocamento da agulha de acordo com a força lateral exercida sobre a mesma e o sistema de fotodetecção desse deslocamento (permissão da Digital Instruments).

Com a utilização dos microscópios de varredura por força, juntamente com a microscopia de força lateral, uma nova área foi criada para a pesquisa da física de superfície: a micro e a nanotribologia, disciplina que relaciona o estudo dos fenômenos de adesão, fricção, lubrificação e desgaste em escala nanométrica (Bhushan, 1995).

*Microscópio de Força Magnética–MFM*

O MFM utiliza o princípio do modo não-contato, detectando mudanças na frequência de ressonância induzidas pela dependência do campo magnético. A agulha utilizada em MFM é coberta com um filme fino ferromagnético. Dessa forma, o MFM obtém imagem da variação espacial de força magnética sobre a superfície da amostra (figura 7).

A dependência da distância entre a agulha e a amostra em MFM é significativa, isto é, se a agulha estiver muito próximo da amostra, a imagem será predominantemente topográfica. Com o aumento da separação agulha-amostra o efeito do campo magnético sobre a agulha é então detectado, sendo observados os domínios magnéticos na imagem.

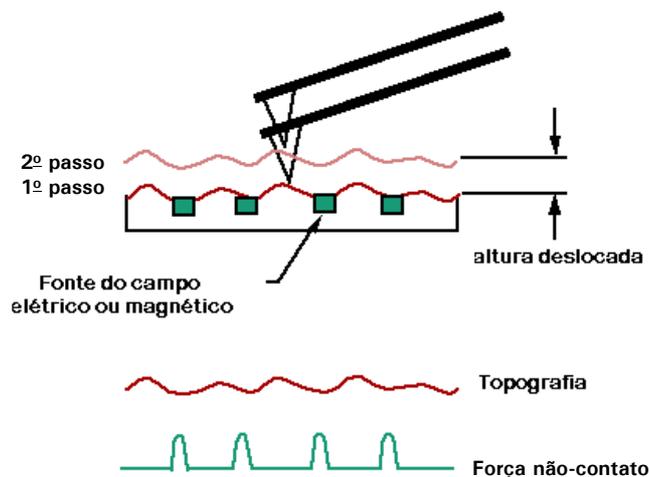


Figura 7. Ilustração do modo de obtenção de imagem com MFM utilizando o deslocamento da agulha em relação à amostra

Para obtenção de imagens com MFM tem-se que a frequência de ressonância da haste deve ficar em torno de 100KHz e o fator de qualidade (Q) da haste deve ser da ordem de 100 ou mais.

*Microscopia por Modulação de Força-MMF*

Esta técnica permite a caracterização das propriedades mecânicas da amostra. Da mesma forma que as outras técnicas, como MFL e MFM, a MMF consegue imagens simultâneas, tanto da topografia quanto da propriedade mecânica da amostra.

O princípio de funcionamento é o mesmo do modo contato e o circuito de realimentação, que controla a posição do piezo no eixo z, mantém constante a deflexão da haste. A diferença está no sinal periódico que é aplicado na haste ou na amostra. A figura 8 ilustra a relação da variação da amplitude da haste e a propriedade elástica da amostra.

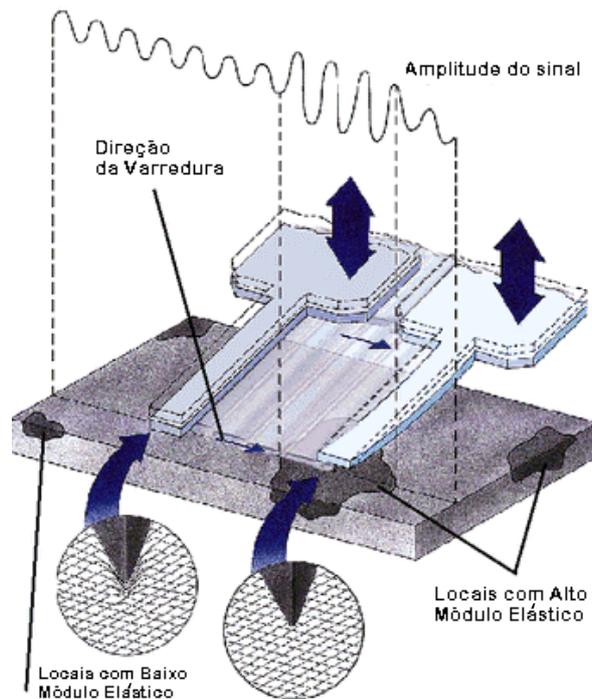


Figura 8. Ilustração gráfica do princípio de obtenção de imagem do Microscópio por Modulação de Força (permissão da Digital Instruments).

A imagem obtida é um mapa das propriedades elásticas da amostra, devido à variação da amplitude de modulação da haste. Normalmente, a frequência de ressonância da haste está em torno de 15KHz, valor maior que o da frequência de realimentação no eixo z do piezo. Essa característica permite obter a imagem topográfica e da propriedade elástica da amostra simultaneamente, sem a interferência dos sinais advindos da deflexão e/ou da amplitude da haste.

#### *Microscópio por Detecção de Fase-MDF*

A interpretação de um sinal proveniente do deslocamento da fase de um sistema vibrando, no caso a haste, possibilita extrair novas informações da amostra que está sendo estudada. Esta informação pode ser utilizada para mapear variações nas propriedades de superfície, tal como elasticidade, adesão e fricção. O mesmo princípio de contato intermitente é usado. A mudança ocorre na instrumentação para obtenção do sinal, em que a fase detectada se refere ao monitoramento do deslocamento da fase entre o sinal que é aplicado à haste para oscilar e o sinal de saída da haste oscilando. A figura 9 ilustra o procedimento para a microscopia de detecção de fase.

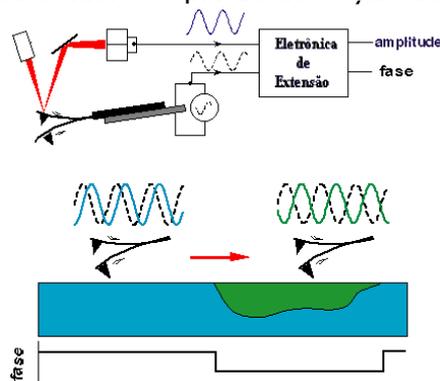


Figura 9. Ilustração da instrumentação utilizada e o processo de detecção para a microscopia por detecção de fase (permissão da Digital Instruments).

## APLICAÇÕES

### Estudo de Biopolímeros com MFA

A estrutura de biopolímeros (principalmente proteínas e ácidos nucleicos) e seus complexos supramoleculares (vírus, complexos proteínas/ácidos nucleicos envolvidos em transcrição, tradução etc.) contém a informação que os pesquisadores de biotecnologia, eletrônica molecular e nanotecnologia necessitam para realizar trabalhos com alta eficiência na escala atômica/molecular.

Dentre os biopolímeros, as proteínas têm sido os mais estudados do ponto de vista estrutural, pois têm estrutura tridimensional altamente definida e singular, o que leva à necessidade da determinação da estrutura de cada proteína individualmente.

As técnicas que podem associar rapidez e resolução estão associadas às técnicas microscópicas de alta resolução, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa técnica já vem sendo usada nos estudos de algumas proteínas, principalmente as de grande massa molecular e estrutura quaternária. A principal dificuldade da técnica MEV está na necessidade de recobrimento da amostra com material condutor (Herrmann et al., 1997a; Cantor & Schimmel, 1980; Campbell & Dwek, 1984).

Com isso, o MVT, e posteriormente o microscópio de força atômica (MFA), estão sendo usados no estudo de proteínas. A principal vantagem do MFA sobre o MVT é que pode ser usado tanto em amostras condutoras quanto isolantes, como as proteínas.

Alguns resultados de MFA foram obtidos com Lisozima e Glutamina sintetase. A lisozima está sendo estudada na Embrapa Instrumentação Agropecuária, na produção de filmes ultrafinos para aplicações em biosensores e filtros biologicamente ativos.

### *Filmes Finos de Lisozima sobre Substrato Sólido*

Na figura 10 tem-se a imagem de um filme de proteína depositada pela técnica automontagem (AM) em mica com tempo de imersão de 30 segundos. Usou-se o tempo de imersão de 30 segundos e a concentração da solução de lisozima preparada de  $1 \times 10^{-5}$  M, objetivando analisar as primeiras etapas do processo de formação do filme.

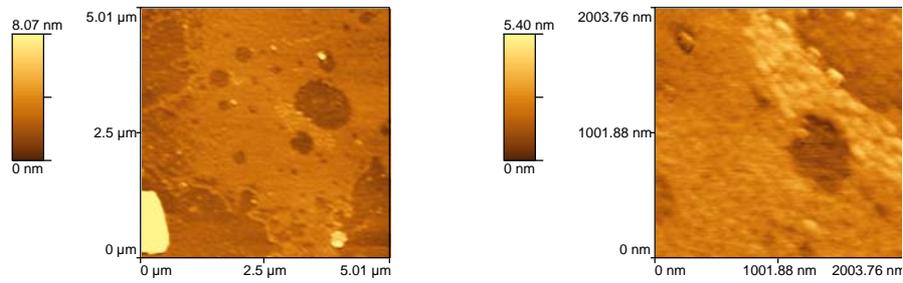


Figura 10. Imagens de MFA do filme lisozima (AM), no modo contato, com tempo de imersão de 30s em solução com pH 6,4 e  $10^{-5}$ M de concentração. Os valores de PID e taxa de varredura da imagem são  $P = 1,51$ ;  $I = 0,46$  e 2.5Hz.

Uma das características marcantes observadas na imagem de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  da figura 10 é a formação de uma camada de proteínas adensada e regiões de dimensões variadas, sem proteína. Isso pode ser o indicativo de um processo de fixação da lisozima que teve um ponto de partida (semente), o que favoreceu o crescimento do filme ao seu redor. Outra característica dessa imagem foi a formação de algumas regiões circulares, sem proteínas. Como a mica tem uma superfície altamente homogênea isso não seria o esperado (Herrmann, 1999(2); Herrmann et al., 1999(1)).

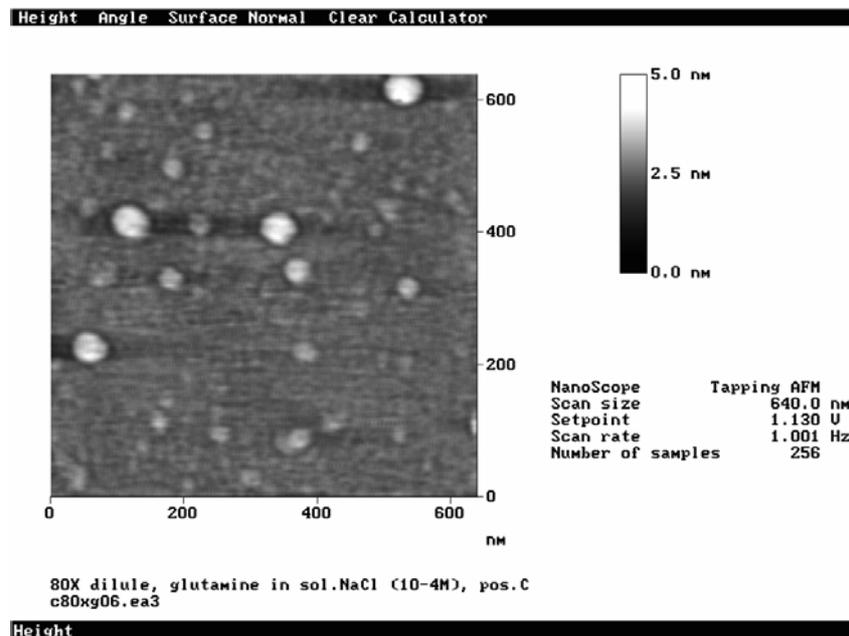
## Glutamina Sintetase

O interesse no estudo da Glutamina se deve ao fato de que a mesma desempenha um importante papel na fixação de nitrogênio e fotorrespiração. Foram obtidas imagem no ar e em solução tampão. O MFA é o único microscópio que permite fazer imagens de biomoléculas em solução, usando para isso uma célula especial para fluidos.

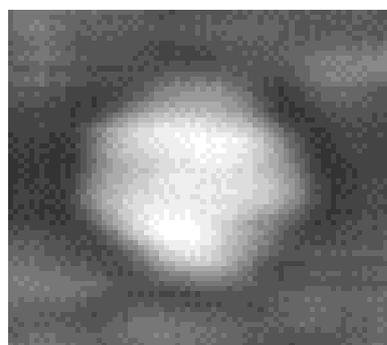
Uma das vantagens da técnica de MFA está relacionada à metodologia de preparação de amostras para análise de biomoléculas, que é bem mais simples, se comparada aos métodos de obtenção de cristal para estudo de estrutura de proteínas com difração de raios X. Outra característica é que a análise da amostra pode ser feita uma a uma, devido ao processo de adsorção, bem como a obtenção de imagens na solução buffer. Já na difração de raios X, tem-se o valor médio das posições dos átomos da amostra no espaço, devido à conformação da estrutura cristalina.

No nível de resolução obtida é possível conhecer a conformação da estrutura supramolecular da proteína.

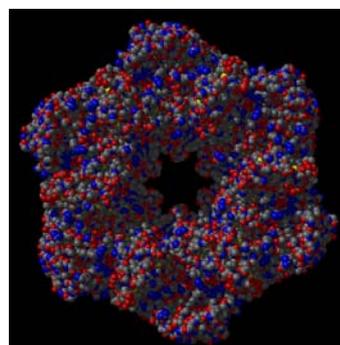
A figura 11(a) mostra a imagem da glutamina obtida com MFA. A resolução da imagem é de 640nm X 640nm e pode-se observar também outras proteínas na imagem. O substrato usado foi a mica. A figura 11(b) é um aumento de uma das biomoléculas, com dimensão da imagem de 90nm X 90nm. As dimensões da mesma com o método cristalográfico são 145 angströms X 145 angströms X 45 angströms. Na figura 11(c) tem-se a imagem da mesma proteína, obtida com difração de raio X. Nesse quadro comparativo, pode-se observar a estrutura hexagonal da proteína em ambos os métodos de análise (MFA e difração de raio X), (Herrmann et al., 1997b).



(a)



(b)



(c)

Figura 11. Imagens da proteína glutamina sintetase, mostrando na parte (a) a topografia em 640nm X 640nm obtida com MFA, com resolução da imagem de 2,5nm; (b) zoom com uma única biomolécula (90nm X 90nm) da mesma imagem e (c) estrutura da proteína determinada através de difração de raio X (cristalografia).

## Vírus M13

Utilizando o modo de *contato intermitente* (tapping mode™) foram obtidas conseguimos imagens do bacteriófago M13. O virion contém 2800 cópias das pequenas proteínas que o cobrem, produto do gene 8, formando um escudo cilíndrico ao redor do DNA. As proteínas de cobertura têm importante papel nas aplicações da biotecnologia, as quais incluem expressão de diferentes peptídeos, além de também servirem na produção de bibliotecas de epítopos e antígenos (podendo ser usados para fabricação de vacinas) (Osiro, 1998).

As imagens foram obtidas com amostras depositadas em lâmina de vidro, conseguindo-se imagem com o detalhe da cabeça do fago. Na figura 12 pode ser vista a imagem topográfica do M13. A identificação de uma cabeça como estrutura é apresentada pelos seus dados topográficos.

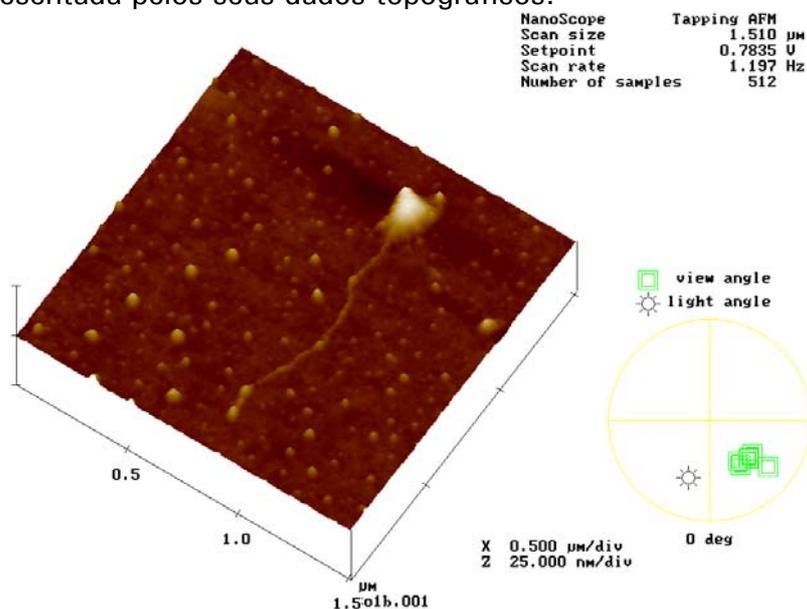


Figura 12. Imagem do bacteriófago M13, em 3-D obtida pela técnica de contato intermitente. No detalhe observa-se a cabeça do fago. A escala da imagem é 1,5 $\mu\text{m}$  X 1,5 $\mu\text{m}$ .

## Polímeros Naturais (Sisal)

Técnicas da microscopia de varredura por força estão ajudando, através da obtenção de imagens com alta resolução, a elucidar a estrutura das fibrilas e microfibrilas em diferentes modos de tratamento químico (Mattoso et al., 1999).

A técnica por detecção de fase foi utilizada para obter imagem de fibras de sisal. A imagem do lado esquerdo da figura 13 permite observar as características topográficas da amostra e na do lado direito é possível visualizar a imagem com detecção de fase. As duas imagens estão na mesma posição da amostra; somente as formas de detecção, proveniente da interação entre a agulha e o objeto são diferentes. A informação da imagem por detecção de fase está relacionada às propriedades nanotribológicas da superfície da amostra.

Com o uso da técnica tapping, caracterizou-se a topografia das microfibrilas do sisal, em imagem de 600nm X 600nm.

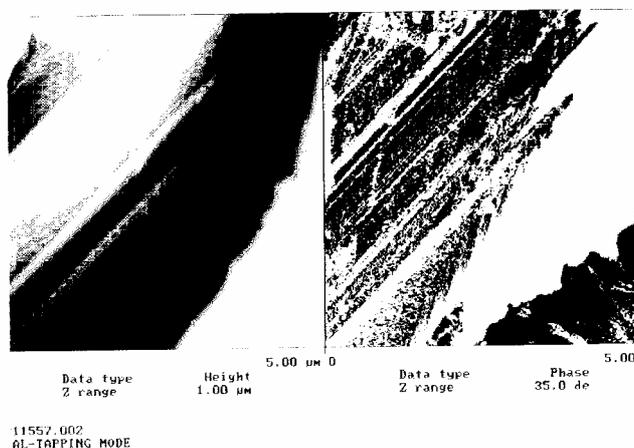


Figura 13. Imagem do Sisal obtida pelo método de contato intermitente. Na imagem à esquerda tem-se a informação da topografia da amostra e na do lado direito (através da detecção de fase, por intermédio de um amplificador lock-in), as características tribológicas da amostra.

Por microscopia de força atômica pode-se observar, pelas imagens da figura 14, que a fibra não-tratada de sisal (fibra técnica) consiste em um pacote de fibrilas orientadas longitudinalmente em direção à formação da fibra.

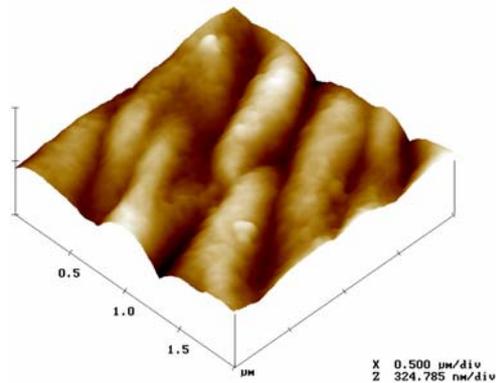


Figure 14. Sisal não-tratado.

O efeito da reação de benzilação (30 minutos de reação) sobre a morfologia da superfície da fibra de sisal é mostrado na figura 15, onde se observa uma estrutura fibrilar. Essa mesma imagem discrimina o envelhecimento, que se constitui de uma interconexão de arranjos com uma formação globular, com a mesma forma das fibrilas e a mesma magnitude da fibra de sisal não-tratada.

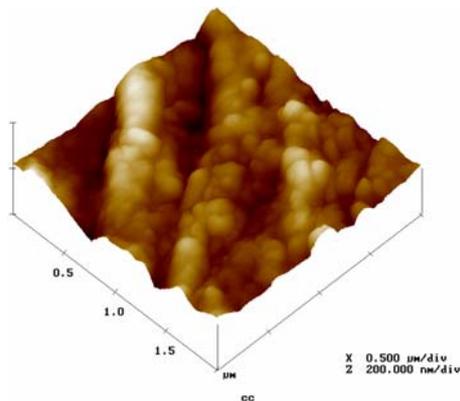


Figure 15. Sisal tratado através de Benzilação.

## Imagens de Partículas do Solo

Os minerais do solo são importantes por dominarem a área de superfície reativa em muitos solos e em ambientes de água subterrânea, devido à relação da área de superfície pelo volume, que é alta, e pelo fato de que os mesmos são encontrados em abundância. Como exemplo da potencialidade do MFA, tem-se que, pelo fato de fornecer dados morfológicos 3-D, a técnica possibilita analisar a micromorfologia, a microtopografia e a área da superfície geométrica (Vaz et al., 1998). Esses fatores ajudam a conhecer as características físicas e as reatividades químicas dos minerais do solo, dessa forma podendo controlá-las através de procedimentos físico-químicos específicos. A figura 16 é uma imagem de cristal de caolinita sobre a mica muscovita.

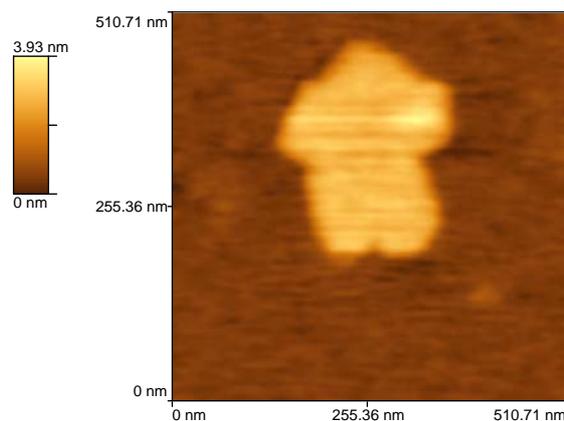
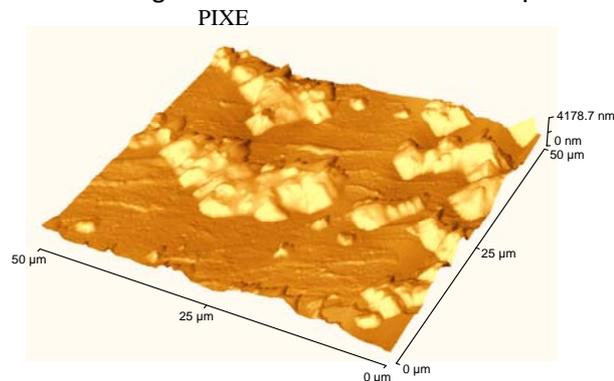


Figura 16. Imagem de Caolinita sobre o substrato mica. Área da imagem 510,71nm x 510,71nm. Característica marcante é a altura, em torno de 4,00nm.

A microscopia de força atômica foi também utilizada como ferramenta para avaliação do método de preparação de amostras para a técnica "Proton Induced X-Ray Emission"-PIXE. Ela vem sendo utilizada para estudos de elementos-traço de solos

(Cruvinel et al., 1999). Na figura 17 tem-se uma imagem de MFA, de amostra para PIXE, com área de  $2500\mu\text{m}^2$ . Pode-se observar, que as partículas do solo são adsorvidas aleatoriamente sobre o mesmo. Com as técnicas de análise do MFA pode-se obter o valor da rugosidade média e o desvio padrão da área.



Area Ra = 468.188nm  
Area RMS = 608.670nm

Figura 17. Imagem de partículas de solo sobre um substrato para análise com PIXE. Área da imagem  $2500\mu\text{m}^2$ . A característica marcante é a dispersão das partículas. Pode-se observar os valores da rugosidade média (Area Ra) e o desvio padrão da área (Area RMS).

#### Outras Aplicações Potenciais

Quando comparado às outras técnicas (microscopia eletrônica, difração de raio X e espectroscopia de RMN), o MFA permite explorar outras grandezas da amostra, como topografia, rugosidade e dados tribológicos.

O MFA vem sendo utilizado em diversas frentes de pesquisa na Embrapa Instrumentação Agropecuária, em vários projetos. Imagens estão sendo obtidas para a investigação de matéria orgânica; obtenção de parâmetros nanotribológicos de

partículas elementares do solo; estudo de proteína do milho, glúten e colágeno, morfológico da bactéria *Xylela fastidiosa* e de polímeros condutores, bem como em estudos espectroscópicos através da obtenção de curva de força em diferentes condições ambientais. Novas potencialidades de aplicação da técnica na agropecuária estão sendo desenvolvidas com as microscopias de Força Magnética e Potencial de Superfície. Pelo fato de serem métodos bem-recentes de análise, principalmente na agropecuária, distintos padrões vêm sendo analisados, com diferentes tipos de amostras, para que se possa obter uma padronização que possibilite novas informações, tanto qualitativa quanto quantitativa das amostras investigadas.

## CONCLUSÕES

Foi possível mostrar, com alguns exemplos, o enorme potencial que o uso da técnica de microscopia de varredura por sonda possui para investigações de amostras de interesse da agropecuária, com imagens de alta resolução. Sendo uma técnica bastante recente no cenário da pesquisa nacional e internacional, observam-se, pelos resultados apresentados, quais são as áreas potenciais em que o microscópio pode ser aplicado para o estudo de superfícies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, T.R. **Advances in atomic force microscopy and scanning tunneling microscopy.** Palo Alto. Stanford University. 1989. 206p. Tese de Doutorado.
- ALBRECHT, T.R.; QUATE, C.F. Atomic resolution imaging of a nonconductor by atomic force microscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 62, n. 1, p.2599, 1987.
- ALBRECHT, T.R.; GRUTER, P.; RUGAR, D.; SMITH, D.P.E. Low-temperature force microscope with all-fiber interferometer. **Ultramicroscopy**, v.42, p.1638-1646, 1992.

- BINGGELI, M.; MATE, C.M. Influence of water vapor on nanotribology studied by friction force microscopy. **J. Vac. Sci. Technol. B.** v. 13, n.3, p.1312-1315, 1995.
- BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, Ch.; WEIBEL, E. Surfaces studies by scanning tunneling microscopy. **Phys. Rev. Lett.** v. 49, p.57, 1982.
- BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C. Atomic force microscopy. **Phys. Rev. Lett.** v.56, p.930-933, 1986.
- BELAIDI, S.; GIRARD, P.; LEVEQUE, G. Electrostatic forces acting on the tip in atomic force microscopy: modelization and comparison with analytic expressions. **J. Appl. Phys.**, v. 81, n.3, p. 1023-1030, 1997.
- BHUSHAN, B. **Handbook of micro/nanotribology.** Boca Raton: CRC, 1995.
- BUTT, H. J. Electrostatic interaction in atomic force microscopy. **Biophys. J.** v.60, p.777-785, 1991.
- CAMPBELL, I.D.; DWEK, R.A. **Biological spectroscopy.** Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1984.
- CANTOR, C.R.; SCHIMMEL, P.R. **Biophysical chemistry.** Part II: techniques for the study of biological structure and function. New York: Freeman, 1980.
- CRUVINEL, P. E.; FLOCCHINI, R.G.; ARTAXO, P. ; CRESTANA, S.; HERRMANN, P.S.P. Elemental analysis of agricultural soil samples by particle induced X-ray emission (PIXE) technique. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B,** Amsterdam, v.150, p.478-483, 1999.
- DRAKE, B.; PRATER, C.B.; WEISENHORN, A.L.; GOULD, S.A.C.; ALBRECHT, C.F.; QUATE, C.F.; CANNEL, D.S.; HANSMA, H.G.; HANSMA, P.K. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. **Science,** v.243, p.1586-1589, 1989.
- FROMMER, J. Scanning probe microscopy of organics, an update. **Thin Solid Films.** v.273, p.112-115, 1996.
- GOODMAN, F.O.; GARCIA, N. Roles of the attractive and repulsives forces in atomic force microscopy. **Phys. Rev. B.** v.43, n.6, p.4728-4731, 1991.

- HERRMANN, P.S.P.; SILVA, M.A.P. da; BERNARDES FILHO, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, p.51-61, out./dez. 1997.
- HERRMANN, P. S.P. ; FROMMER, J.; COLNAGO, L.A. **Análise da estrutura da glutamina sintetase por microscopia de força atômica**: primeiros resultados. São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA, 1997. 4p. (EMBRAPA-CNPDIA. Pesquisa em Andamento).
- HERRMANN, P.S.P. **Estudo de filmes finos automontados de proteínas por UV e microscopia de força atômica**. São Carlos: USP-IQSC, 1999 (1). 142p. Tese Doutorado.
- HERRMANN, P.S.P.; COLNAGO, L.A.; MATTOSO, L.H.C.; OLIVEIRA, O.N. de. Cinética de adsorção de filme automontado de lisozima: análise por UV e microscopia de força atômica. In: ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 22., maio 1999, São Lourenço, MG. **Resumos...** [São Paulo]: Sociedade Brasileira de Física, 1999 (2). p.29-30.
- HOWALD, L.; MEYER, E.; LÜTHI, R.; HAEFKE, H.; OVERNEY, R.; RUDIN, H.; GÜNTHERODT, H.J. Multifunctional probe microscope for facile operation in ultrahigh vacuum. **Appl. Phys. Lett.** v.63, p.117-119, 1993.
- ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and surface forces**. San Diego: Academic Press, 1992. 450p.
- KIRK, M.D.; ALBRECHT, T.R.; QUATE, C.F. Low-temperature atomic force microscopy. **Rev. Sci. Instr.** v. 59, p.833-835, 1988.
- McCLELLAND, G.M.; ERLANDSSON, R.; CHINAG, S. Atomic force microscopy: general principles and a new implementation. New York: **Plenum**, 1987. .v.6, p.307.
- MARTIN, Y.; WILLIAMS, C.C.; WICKRAMANSHINGHE, H.K. Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100 | scale. **J. Appl. Phys.**, v.61, p.4723-4729, 1987.

- MARTI, O.; DRAKE, B.; HANSMA, P.K. Atomic force microscopy of liquid-covered surface: atomic resolution images. **Appl. Phys. Lett.**, v.51, p.484-486, 1987.
- MATE, C.M.; LORENZ, M.R.; NOVOTNY, V.J. Atomic force microscopy of polymeric liquid-films. **J. Chem. Phys.**, v.90, n.12, p.7550-7555, 1989.
- MATTOSO, L.H.C.; FERREIRA, F.C.; HERRMANN, P.S.P.; MARTIN, A.R.; PEREIRA-DA-SILVA, M.A.; CURVELO, A.A.S. Analysis of the modification by benzylation on sisal fibers using AFM. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SCANNING PROBE MICROSCOPY OF POLYMERS, 1., Aug. 1999, Santa Barbara, CA, Estados Unidos. **Abstract book and program...** Santa Barbara: University of California, 1999. Não-paginado. Ref.P24.
- MEYER, G.; AMER, N.M. Novel optical approach to atomic force microscopy. **Appl. Phys. Lett.**, v.53, p.1045-1047, 1988.
- OSIRO, D. **Análise de vírus e bactérias por microscopia de força atômica.** São Carlos: USP-IQSC, 1998. 97p. Tese Mestrado.
- RUGAR, D.; HANSMA, P. Atomic force microscopy. **Physics Today**, p.23-30, Oct. 1990.
- SHAO, Z.; YANG, J.Q. Progress in high resolution atomic force microscopy in biology. **Out. Rev. Biophys.**, v.28, p.195-251, 1995.
- STERN, J.E.; TERRIS, B.D.; MAMIN, H.J.; RUGAR, D. Deposition and imaging of localized charge on insulator surfaces using a force microscope. **Appl. Phys. Lett.**, v.53, p.2717, 1988.
- TEAGUE, E.C.; SCIRE, F.E.; BAKER, S.M.; JENSEN, S.W. 3-dimensional stylus profilometry. **Wear**, v.83, p.1-12, 1982.
- THOMSON, N.H.; FRITZ, M.; RADMACHER, M.; CLEVELAND, J.P.; SCHMIDT, C.F.; HANSMA, P. K. Protein tracking and detection of protein motion using atomic force microscopy. **Biophys. J.**, v.70, p.2421-2431, 1996.

- VAZ, C.M.P. ; HERRMANN, P. S.P.; CRESTANA, S. Soil particle thickness and size distribution measured through atomic force microscopy. In: 1998 ANNUAL MEETING, Oct. 1998, Baltimore, Maryland, Estados Unidos. **Abstracts...** Baltimore: ASA/CSSA/SSSA, 1998. p.180.
- WEISENDANGER, R. **Scanning probe microscopy and spectroscopy, methods and applications.** Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 637p.
- WEISENHORN, A.L.; DRAKE, B.; PRATER, C.B.; GOULD, S.A.C.; HANSMA, P. K.; OHNESORGE, F.; EGGER, M.; HEYN, S.P.; GAUB, H.E. Immobilized proteins in buffer imaged at molecular resolution by atomic force microscopy. **Biophys. J.**, v.58, n.5, p.1251-1258, 1990.