



**Universidade Estadual de Campinas**  
**Instituto de Física “Gleb Wataghin”**

## **Relatório de Iniciação Científica**

**Caracterização da cobertura extracelular de substância polimérica  
(EPS) da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* por meio de  
Microscopia de Força Atômica (AFM)**

**Relatório Parcial de Atividades - F 690 – Iniciação Científica II**  
Campinas, 06 de outubro de 2008.

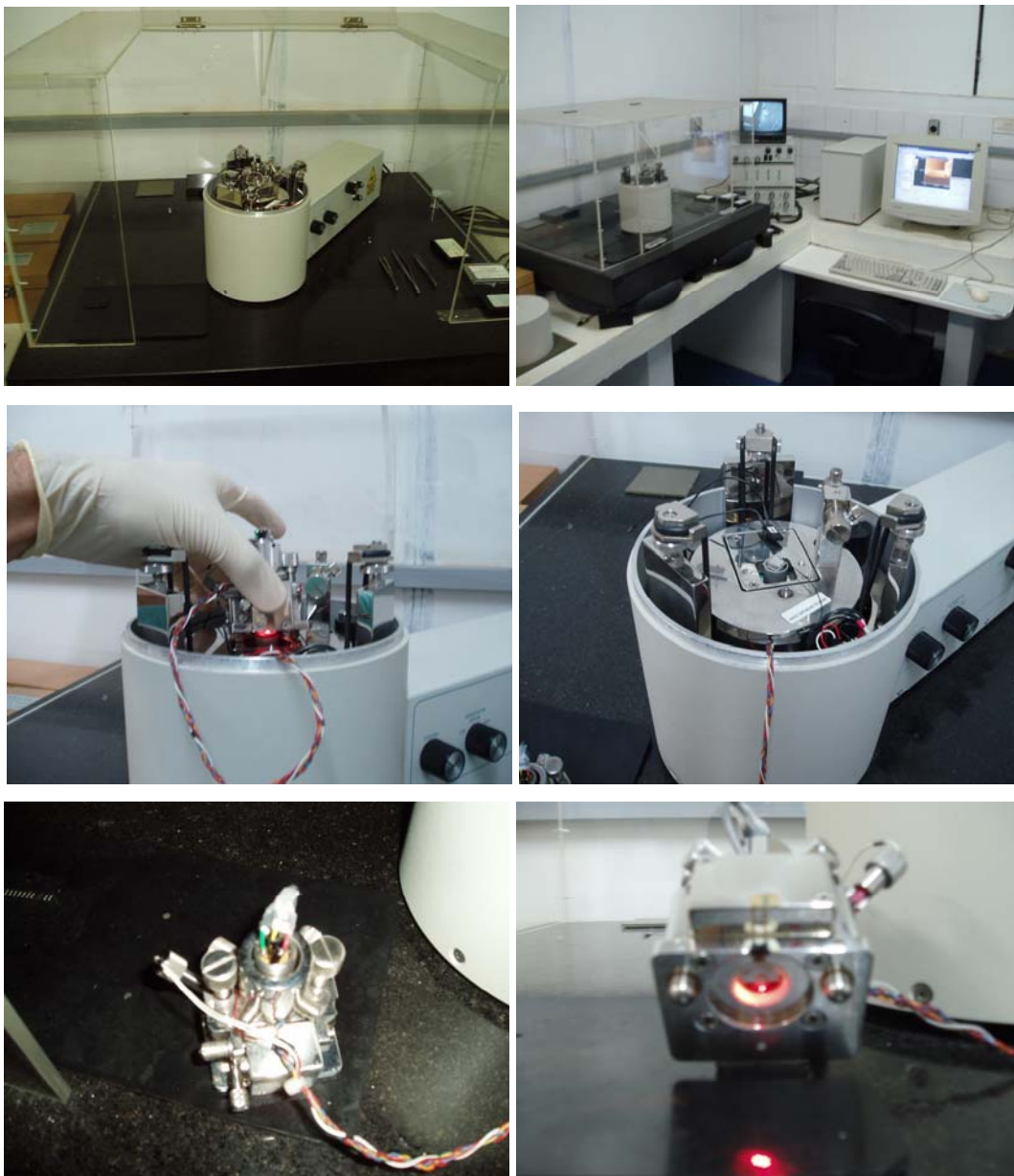
**Marcos Vinícius Puydinger dos Santos**

**Orientador : Omar Teschke**  
**Estabelecimento : Laboratório de Nanoestruturas e Interfaces**  
**DFA / IFGW / UNICAMP**

# 1- Resumo das Atividades

## 1.1 – Microscopia de Força Atômica

No decorrer dos primeiros meses ao início da vigência da Bolsa foram realizadas as atividades segundo o cronograma proposto, com a preparação das amostras de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Porém com a finalidade de adiantar os trabalhos de análise começamos concomitantemente com a familiarização, calibração e estudo de técnicas de composição de imagens do Microscópio de Força Atômica (AFM). A figura 1 a seguir apresenta uma série de imagens do aparato, situado no Laboratório de Nanoestruturas e Interfaces/DFA/UNICAMP.



**Figura 1:** A partir do topo, à esquerda, temos: Visão panorâmica do Microscópio de Força Atômica sobre um apoio de amortecimento pneumático, evitando grandes vibrações mecânicas. /Aparato completo para

captura de imagens. /Microscópio de Força Atômica com cabeça de varredura em funcionamento (laser de He-Ne ligado). /Vista superior do microscópio de força atômica sem a cabeça de varredura. No centro do disco metálico está o Piezo elétrico – ou scanner de varredura. /Detalhe superior da cabeça contendo diversos mecanismos de ajuste do laser para varredura./ Detalhe inferior da cabeça, com laser He-Ne ligado. No orifício dessa cabeça encontra-se o Cantilever (alavanca de varredura do AFM) - contendo 4 Tips (sonda ou agulha de varredura) para varredura – no qual incide o laser e registra variações de altura da amostra.

### 1.1.1 - Calibração

Para a calibração do scanner (piezo elétrico) do AFM recorreremos à amostra-padrão do AFM, cujo manual está detalhado na figura 2. Esta amostra consiste numa placa de silício fabricada por litografia, quadrada de 1 cm de aresta, dividida igualmente em 4 setores; cada um deles apresenta quadrados dispostos simetricamente com dimensões idênticas entre quadrados adjacentes de 2 $\mu$ m - para o setor de menor dimensão -, 3 $\mu$ m, 8 $\mu$ m nos setores de tamanho intermediário e 14 $\mu$ m - para o setor de maior dimensão. Via software TopoMetrix SPMLab<sup>®</sup> <sup>1</sup> obtemos uma imagem em um dos quadrantes e, tomando uma distância arbitrária entre dois pontos como referência, tornamos proporcionais o número de pixels e o tamanho real desse segmento.

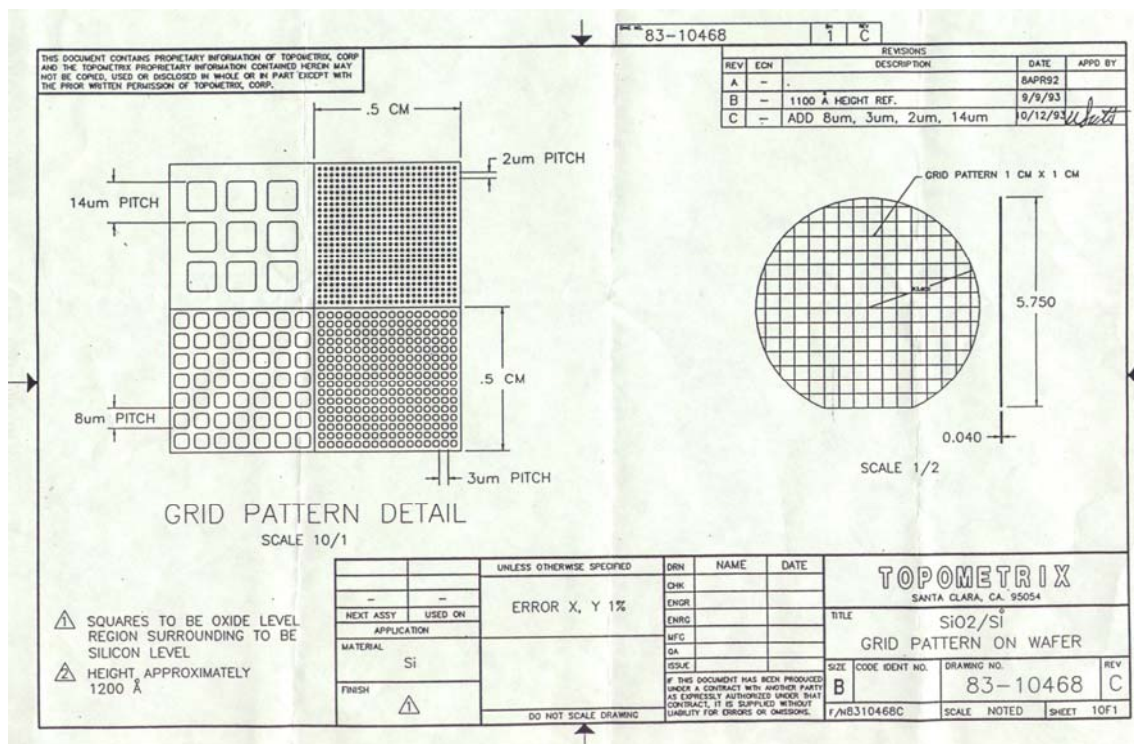


Figura 2: Manual da amostra-padrão para calibração do AFM.

<sup>1</sup> Apresentado no item 4.1.3 do projeto original.

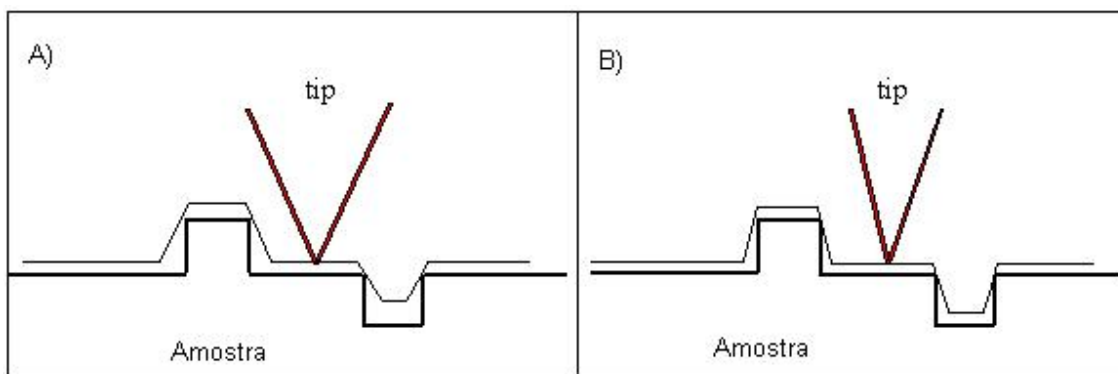
Se o tamanho obtido difere do tamanho real da amostra-padrão por um fator<sup>2</sup> de  $10^{-1}$  então um ajuste de tensão do scanner se faz necessário nas direções x e/ou y do plano da amostra, de forma que o desvio entre o tamanho real pela figura 1 e o tamanho medido por AFM de certa distância esteja dentro do limite de 10% ou  $10^{-1}$ . O ajuste da tensão aplicada no elemento piezo é feito por uma simples regra de proporcionalidade entre tensão atual e os tamanhos teórico (pela figura 1) e medido da distância arbitrária. Veja a equação 1.

$$V_{nova} = V_{velha} \left[ \frac{\text{tamanho obtido}}{\text{tamanho esperado}} \right] \quad (1)$$

É importante ressaltar que para um scanner muito descalibrado a calibração dar-se-á de modo gradativo, com ajustes mais grosseiros de tensão e, gradativamente, fazendo-se um ajuste fino.

### 1.1.2 – Distorções de imagens de AFM e limitações de resolução

A técnica mais adequada para investigar a estrutura de superfícies metálicas e semicondutoras é a Microscopia de Tunelamento (ou Transmissão Eletrônica) (TEM), por ser uma técnica altamente precisa de varredura. Podemos comparar amostras medidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) e por TEM para estimar as distorções de imagens obtidas por AFM, devidas à dimensão finita do raio do Tip (sonda ou agulha de varredura). Esse tipo de conhecimento permite o entendimento dos mecanismos de formação de imagens por AFM e de artefatos em imagens causados pela relação de dimensões entre o Tip e a amostra. A figura 2 mostra simplificada a relação entre a dimensão do Tip e a área varrida na localidade adjacente a um relevo acidentado da amostra.



<sup>2</sup> A grandeza deste fator é tomada empiricamente, resultando numa boa resolução para a grande maioria das medidas, sendo as dimensões de amostras típicas muito maiores, o que compensa os erros.

**Figura 3:** Relação entre dimensão do Tip e área varrida nas imediações de regiões acidentadas da amostra.

Na figura 3, comparando A) e B), temos a noção de que quanto menor for a dimensão do Tip em relação à amostra, mais detalhada será a imagem apresentada ao final da varredura e, portanto, maior a resolução.

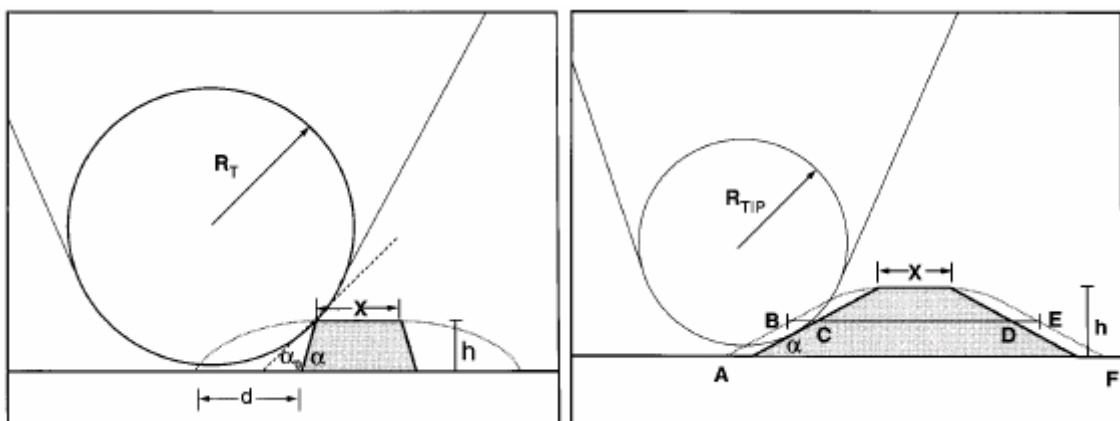
A distorção de imagens por AFM é ilustrada pela sensibilidade da ponta do Tip – cujo raio é definido como  $R_T$  – para várias estruturas (veja figura 4). Duas situações são tratadas<sup>3</sup>:  $\alpha < \alpha_0$  e

$$\alpha \geq \alpha_0 \text{ com } \alpha_0 = 2 \cdot \tan^{-1} \left[ \frac{k}{1-k} \right]^{1/2}, \quad k = \frac{h}{2 \cdot R_T}, \text{ onde } h \text{ é a altura da estrutura varrida, } R_T \text{ é}$$

o raio do Tip,  $\alpha$  é o ângulo de adesão dessa estrutura ao substrato (mica ou silício) e  $\alpha_0$  é o ângulo crítico que depende dos parâmetros do Tip e da amostra.

Observe na figura 4 B), com  $\alpha < \alpha_0$ , que a largura da base da estrutura varrida possui dimensão comparável à do Tip e é muito maior que a altura  $h$ . Neste caso a área de contato do Tip com a amostra é grande e, portanto, a região observável durante a varredura é grande, de forma que temos dados fiéis em relação à amostra real.

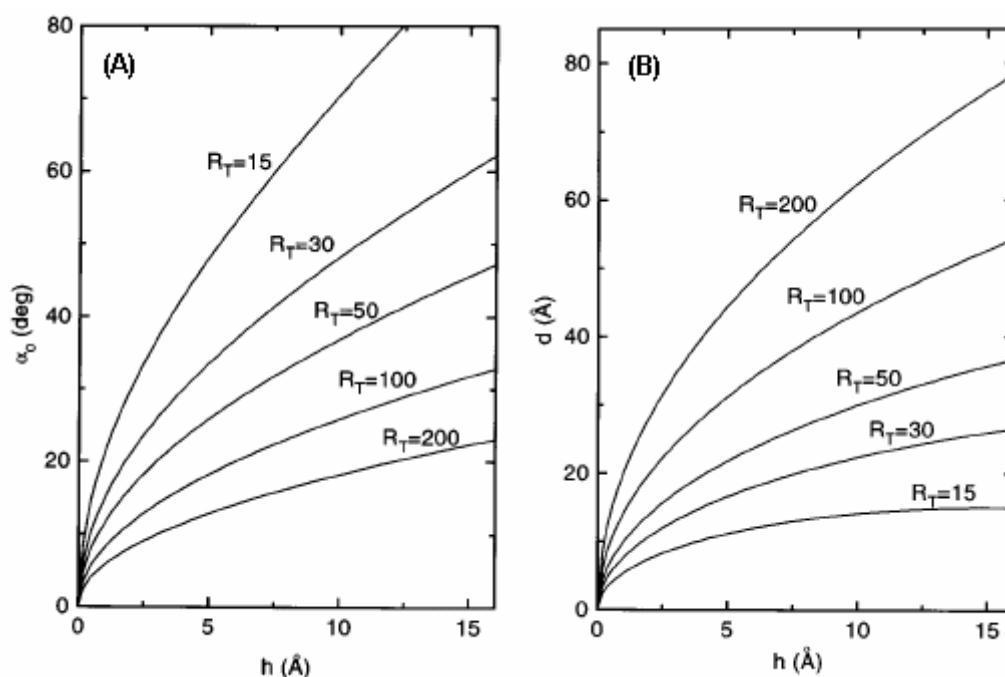
Na figura 4 A), com  $\alpha \geq \alpha_0$ , temos um caso em que, pelo fato de o ângulo de inclinação das laterais da amostra ser maior que o ângulo crítico  $\alpha_0$ , a região varrida em suas laterais apresenta uma parcela “não observável”  $d$  ao Tip (veja na figura 4 A)), pois a força de repulsão entre ele e a amostra não permite maior aproximação. Isso faz com que os dados coletados eletricamente não sejam completamente fiéis à amostra real e essa fidelidade será tanto pior quanto maior for o ângulo crítico  $\alpha_0$  e maior a altura da estrutura em relação a sua largura.



**Figura 4:** Comparativo da distorção da imagem coletada em função da dimensão do Tip com relação à estrutura. (A) Ângulo de ascensão da estrutura *maior* que ângulo crítico  $\alpha_0$ , i.e, ascensão brusca. Região  $d$  não observável. (B) Ângulo de ascensão *menor* que ângulo crítico  $\alpha_0$ , i.e, ascensão suave.

<sup>3</sup> Sasaki, R.M.; Douglas, R.A., <sup>a)</sup> Kleinke, M.U. e Teschke, O. – J. Vac. Sci. Technol. B 14(4), Jul/Aug 1996

A figura 5 abaixo representa curvas obtidas por modelos estatísticos (que não vem ao caso detalhar devido à grande complexidade e esforço desnecessário para os intuítos deste trabalho) relacionando a região não observada  $d$  como função da altura  $h$  da estrutura para determinados valores do Raio do Tip  $R_T$  (em ângstroms) (figura 5B) e o ângulo crítico  $\alpha_0$  como função da altura  $h$  para valores do raio do Tip  $R_T$  (figura 5A).



**Figura 5:** (A) Ângulo crítico  $\alpha_0$  como função da altura da estrutura para diversos valores do raio do Tip. (B) Região não observável durante a varredura como função da estrutura varrida, para diversos valores do raio do Tip.

Observe que, fixada uma altura  $h$  da estrutura, pela figura 5 temos que: a região  $d$  não observável durante a varredura será tanto menor, i.é., melhor a resolução da imagem, quanto menor for o raio do Tip  $R_T$ . O caso ideal é quando  $R_T$  diminui até tornar-se idealmente infinitesimal, fazendo com que  $d \rightarrow 0$ . Também, para quaisquer valores do raio do Tip  $R_T$ , o fator altura da estrutura varrida é o que torna o ângulo crítico  $\alpha_0$  maior ou menor. Por exemplo, fixado um raio do Tip de  $100\text{Å}$  o ângulo crítico será tanto maior quanto maior for  $h$  (mais abrupta é a inclinação das bordas adjacentes da estrutura).

Amostras originais de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram fornecidas pelo Dr. Oswaldo Garcia Jr. (Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brazil). Posteriormente amostras de *A. ferrooxidans* foram preparadas pela Dra. Maria Estela Silva-Stenico (Centro de Energia



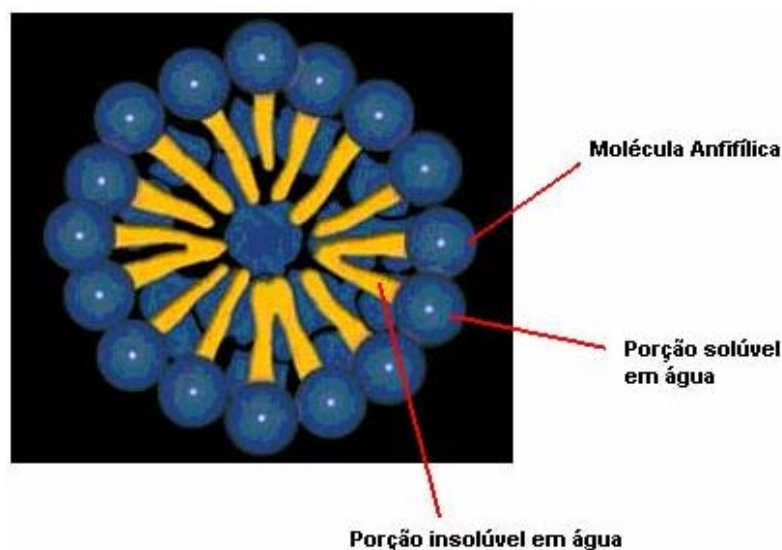
Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, SP, Brasil) que mudou o procedimento de crescimento, o que resultou em um novo padrão de depósitos que não mais apresentou a simetria que estávamos investigando. Conseqüentemente, decidimos trocar o objetivo da observação de *A. ferrooxidans* por nanogotas de surfactante, que apresentam a forma geométrica semelhante à qual investigamos originalmente nas bactérias.

## 1.2 – Análise de Surfactante

Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão *surface active agent*, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Em outras palavras, um surfactante é um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e de interface de um líquido.

É uma espécie de detergente secretado dentro dos alvéolos pela membrana alveolar. Também conhecida como agente tensoativo, essa substância reduz a tensão superficial do líquido presente nos alvéolos. É constituído basicamente por lipoproteínas que diminuem a força de coesão entre moléculas de água localizadas na membrana alveolar; suas células secretoras são globosas e denominadas Pneumócitos II. No corpo humano o surfactante encontra-se nos alvéolos pulmonares e sua produção começa a partir da trigésima semana de gestação. É essencial que esteja sendo produzido em quantidade suficiente ao nascimento do feto, pois do contrário ocorrerá o colapamento dos alvéolos do recém-nascido, provocando insuficiência respiratório ou até a morte.

Uma propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas (figura 6) que, geralmente, formam-se a baixas concentrações em água ( $\sim 10^{-5}$  M).

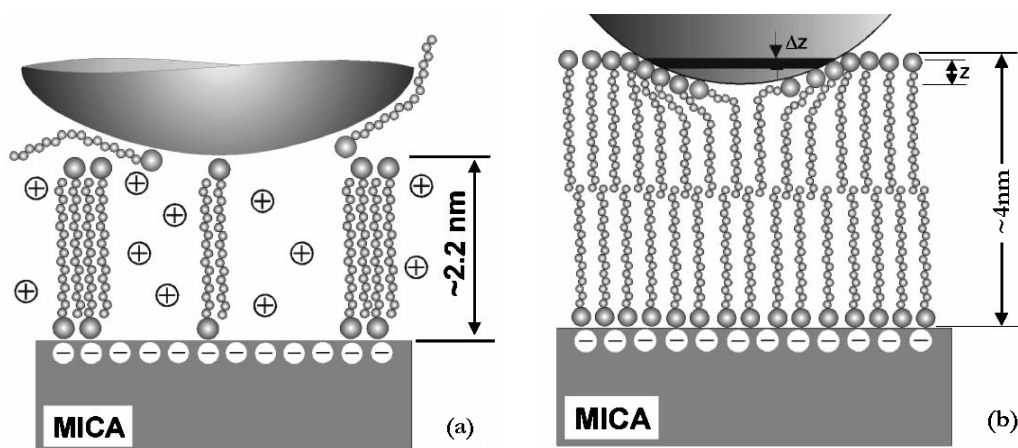


**Figura 6:** Estrutura de uma micela, contendo as porções solúvel e insolúvel em água.

Micelas são estruturas globulares formadas por um agregado de moléculas surfactantes, ou seja, compostos que possuem características polares e apolares simultaneamente, dispersos em um líquido constituindo uma das fases de um colóide. A produção de micelas em solução aquosa ocorre a partir de uma certa concentração limite de surfactante. Abaixo disso apenas há um filme de moléculas de surfactante cobrindo a superfície do líquido.

A concentração mínima na qual moléculas de surfactante começam a se agregar e, portanto, inicia-se a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), sendo esta uma importante característica de um surfactante. Esta propriedade torna os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases.

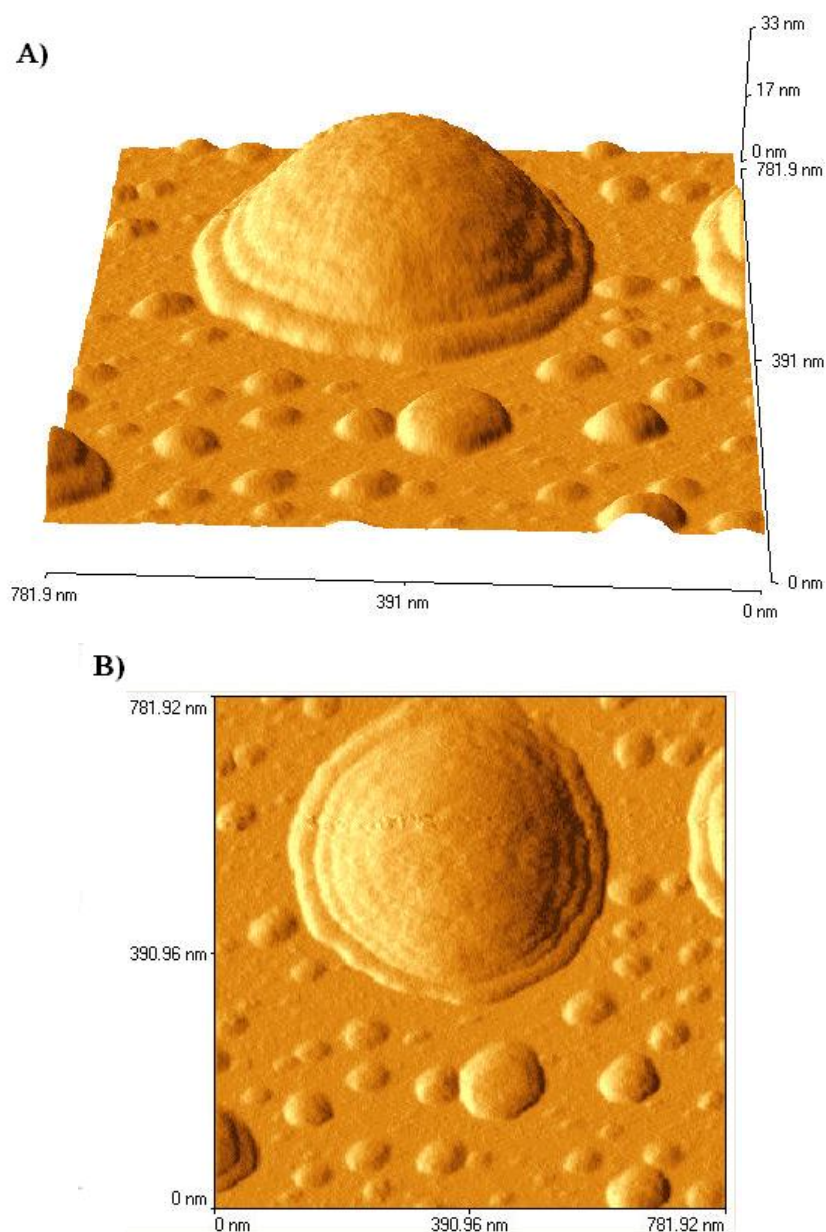
Durante a secagem de surfactante, pode ocorrer a deposição de uma monocamada (figura 7A) ou uma bicamada (figura 7B).



**Figura 7:** A) Monocamada de CTAB. B) Bicamada de CTAB.

Deixamos ocorrer a secagem natural, à temperatura ambiente, de uma solução aquosa de molaridade  $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$  do surfactante CTAB (*Brometo de Cetil Trimetil Amônio*) sobre Mica (substrato hidrofílico) e, por meio da técnica de *Microscopia de Força Atômica*, varremos a amostra, obtendo as imagens da figura 8.



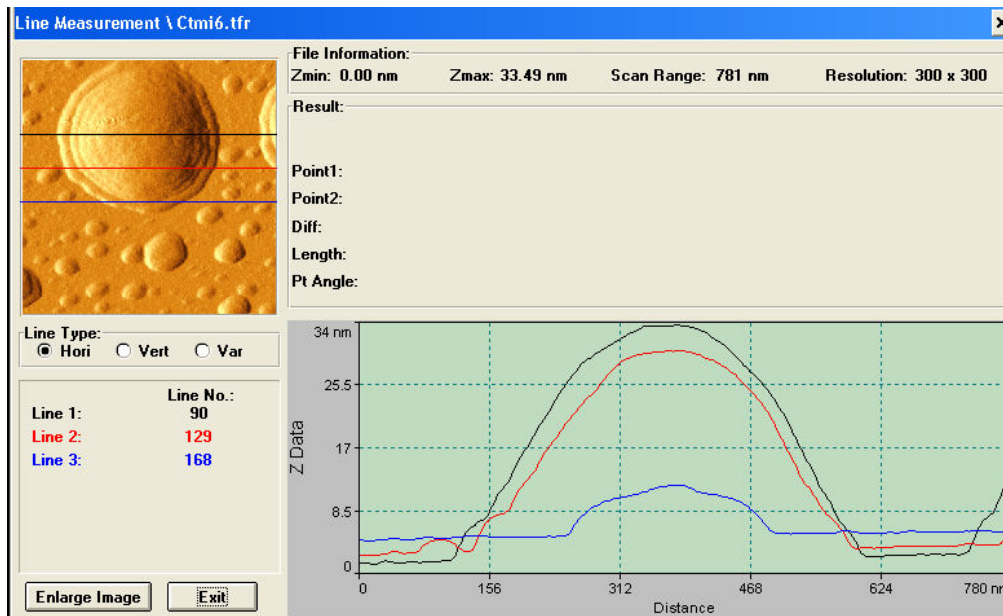


**Figura 8:** CTAB após secagem de solução aquosa, observado por AFM. A) Vista frontal. B) Vista superior.

Por meio das imagens da figura 8, podemos notar claramente que após a secagem do CTAB surgem degraus desde a base até o topo. Esses degraus são o resultado do processo de secagem em solução aquosa, agregando moléculas e fazendo com que cada degrau seja formado por uma camada do tamanho da molécula de CTAB (monocamada) e com o dobro do tamanho da molécula (bicamada). A figura 9 mostra, por meio do software TopoMetrix SPMLab<sup>®</sup> - utilizado na varredura pela técnica de AFM - os aspectos topográficos do surfactante em três regiões distintas, do meio à borda da estrutura.

Nas monocamadas, os degraus são do tamanho da molécula de surfactante, enquanto que nas bicamadas os degraus possuem o dobro do tamanho dessa molécula, uma vez que neste caso duas

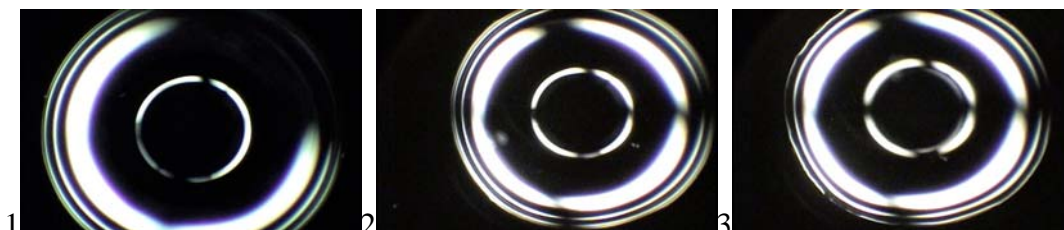
moléculas são agregadas. Pela literatura<sup>4</sup>, a monocamada apresenta espessura de aproximadamente 20Å, enquanto que a bicamada apresenta espessura de aproximadamente 40Å. Para nossos dados medidos no laboratório de Nanoestruturas e Interfaces/IFGW/UNICAMP, o surfactante observado na figura 9 (note a base das curvas) apresenta bicamadas formando degraus de tamanho aproximadamente 40Å, como esperado.



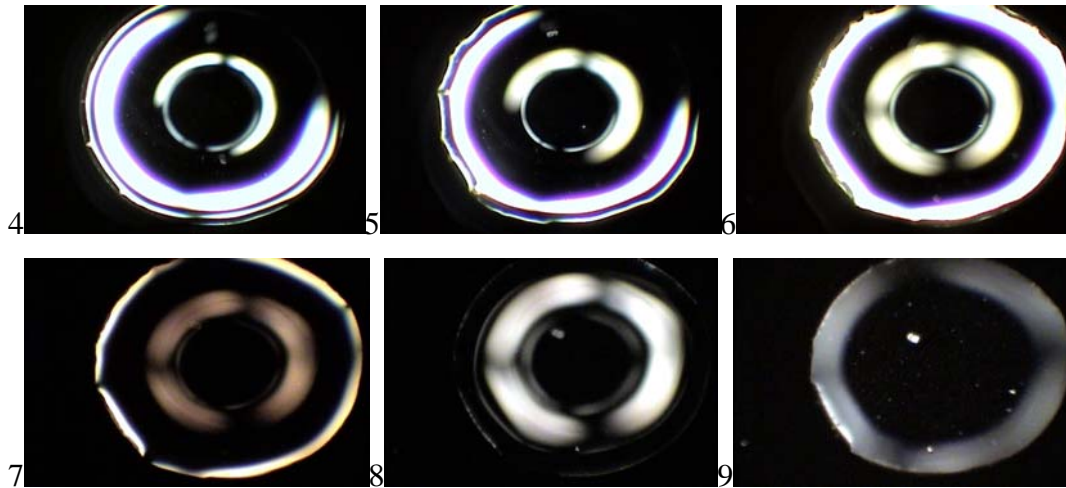
**Figura 9:** Aspectos topográficos do surfactante após a secagem da solução aquosa, vista por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM) para planos distintos, do meio à borda da estrutura.

Observe que esta figura mostra claramente o fenômeno de composição de degraus conforme secagem do CTAB.

Com o intuito de observar a formação desses degraus e investigar o fenômeno, obtivemos imagens do processo de secagem do CTAB em substrato hidrofóbico (Silício). As imagens foram feitas inicialmente por um microscópio Óptico comum com ampliação de 5X, usando uma ocular S-PI 10X/20 e uma câmera CCD durante um tempo de aproximadamente 10 minutos, como na figura 10. Cada figura possui dimensão real de 1,5mm de largura por 1,0mm de altura.



<sup>4</sup> Teschke, O.; Ceotto, G.; de Souza, E.F. Applied Physics Letters – Volume 78, Number 20 – 14 May 2001.



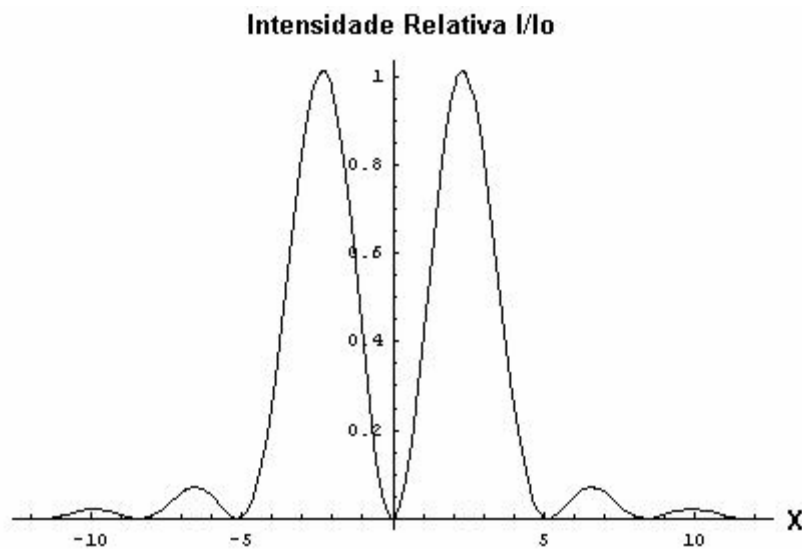
**Figura 10:** Seqüência da secagem de solução aquosa de CTAB obtida por um microscópio óptico com ampliação 5X.

Nesta figura podemos observar franjas claras e escuras, similares às franjas de interferência de luz quando refletida por uma película fina. Pela avaliação do integral de difração de Fraunhofer, tomando um plano perpendicular ao substrato, que passa pelo centro da gota de CTAB da figura 10, a intensidade da luz dos pontos claros pode ser modelada como um múltiplo da função de Bessel de *segunda* ordem. A intensidade luminosa cai com a distância do centro segundo a equação (2).

$$I = I_0 \cdot \left( \frac{k \cdot J_2(x)}{x} \right)^2 \quad (2)$$

Com  $k$  sendo uma constante de normalização,  $k = 2,5\sqrt{5}$ .

Onde  $I_0$  é a intensidade luminosa máxima,  $J_2$  é a função de Bessel de segunda ordem e  $x$  é a distância do centro de maior luminosidade. Veja o comportamento da equação de Fraunhofer na figura 11 abaixo:



**Figura 11:** Modelo proposto para o fenômeno de franjas claras e escuras, segundo a teoria de difração de Fraunhofer.

Concluimos que como o surfactante em solução aquosa, quando iluminado e observado por microscopia óptica, apresenta franjas claras e escuras e, portanto, padrões de interferência com intensidade de luminosidade como na figura 11, tentamos investigar o perfil dessa estrutura para descobrir se durante a secagem do CTAB ocorrem os degraus relatados na figura 8. De imediato já excluimos a possibilidade de esses degraus serem os responsáveis pelas franjas de interferência observadas, pois sabemos que a espessura dos degraus de CTAB está entre 2nm (monocamada) e 4nm (bicamada) e sendo que, pela óptica clássica, o padrão de interferência exige que a distância mínima sobre a qual a luz incide - provocando assim interferência (construtiva ou destrutiva) - seja a metade do comprimento de onda da luz (aproximamos bem  $\lambda \approx 500nm$  para a luz branca) incidente (primeiro harmônico) – i.é.,  $\Delta l_{MÍNIMO} \frac{\lambda}{2} \approx 250nm$ .

Abaixo, a figura 12 com um perfil de uma gota de surfactante contendo no detalhe os padrões de franjas claras e escuras.



**Figura 12:** Vista frontal de uma porção da gota de CTAB. No detalhe, padrão de franjas claras e escuras.

Nossa meta está em estudar e caracterizar os padrões ópticos do surfactante CTAB, quantificando-os. Tentaremos investigar as leis físicas envolvidas nos padrões observados até agora.

## **2- Perspectivas do Projeto**

Investigamos padrões formados por superfícies onde uma das dimensões tem aproximadamente alguns nanômetros.