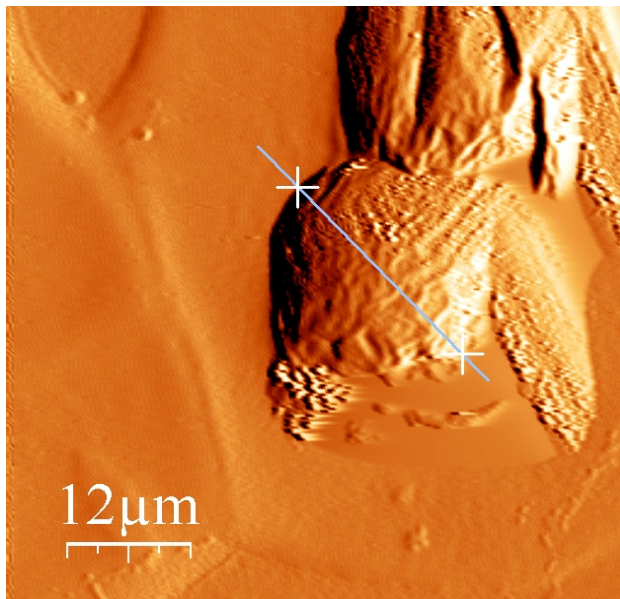


Obtenção de Imagens de Algas por Microscopia de Força Atômica

Rubens Bernardes-Filho¹
 Cristina Souza Freire-Nordi²
 Charles Taciro³
 Nivaldo Antonio Parizoto⁴

Imagem: Rubens Bernardes-Filho



Nos anos 80 teve início o desenvolvimento de um grupo de técnicas microscópicas que recebeu a denominação de microscopias de varredura de sonda (MVS ou "scanning probe microscopy SPM"), dentre estas novas técnicas a microscopia de força atômica, técnica que vem se desenvolvendo desde 1986 (Binnig et al, 1986), tem se mostrado útil no estudo das mais diferentes superfícies, sendo usada largamente no estudo de superfície de materiais de origem biológica. Isto se deve, principalmente, a possibilidade de se realizar medidas no ar ou em meio líquido, possibilitando o trabalho em meio fisiológico. O uso de diferentes técnicas de microscopia de força atômica tem propiciado avanços importantes no estudo de superfícies, principalmente pela possibilidade de se realizar medidas sem necessidade de recobrir as amostras com metal ou uso de vácuo, necessário para medidas de microscopia eletrônica.

Compreender o princípio de funcionamento do microscópio de força atômica é fundamental para entender as sua gama de aplicações. Ele trabalha de forma semelhante a uma agulha de toca disco antigo, onde, no lugar da agulha (probe), se encontra o cantilever, que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de poucos microns. Para percorrer a amostra de forma a se obter uma imagem, é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza

cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz), com precisão de angstroms (Å). Durante esta varredura, é utilizado um sistema de alinhamento com feixe de laser que incidindo sobre o cantilever e refletindo em um sensor de quatro quadrantes, que fornece informação de posição para o sistema de realimentação e controle, que corrige a posição do cantilever de forma a manter o contato com a amostra, durante a varredura e permitir a obtenção da imagem (Figura 1).

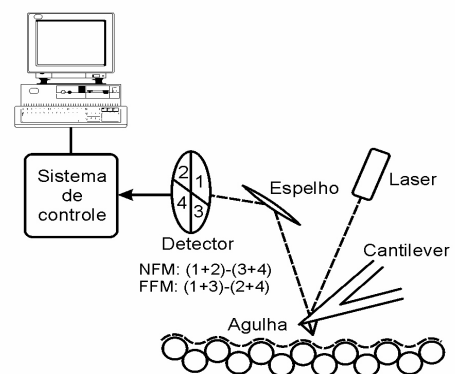


Figura 1 Diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica.

¹ Embrapa Instrumentação Agropecuária - R. XV de novembro, 1452 - Cx Postal 741, CEP 13560-970- São Carlos - SP - Brazil.

² Instituto de Física de São Carlos - USP - Departamento de Física e Informática - 400 Cx. Postal 369 - CEP: 13560-970 - São Carlos - SP - Brazil.

^{3,4} Departamento de Fisioterapia da UFSCar - Rod. Washington Luiz, Km 235 - CEP: 13565-905 São Carlos - São Paulo - Brasil.

A imagem obtida por AFM é resultante da convolução da topografia real da amostra com a forma da agulha do cantilever. Esta tem forma piramidal com alturas que variam de 3 a 9 micra e com raio de ponta variando de 10 a 90 nanômetros. O fato da agulha ser piramidal é uma das principais fontes de artefatos de imagem no uso desta técnica.

Na microscopia de varredura de sonda existem várias modos de se obter imagens. Modos estes que variam em função de vários fatores: características da amostra, tipo de cantilever utilizado, tipo de varredura. Neste trabalho foram utilizados os modos contato e contato intermitente para obtenção das imagens. No modo contato a agulha percorre a amostra sendo repelida pela repulsão coulômbica entre os átomos da amostra e os que compõem a agulha. No modo contato intermitente a agulha vibra sobre a amostra e é atraída por força de van der Waals, nesta situação a agulha fica mais afastada da amostra durante a varredura.

A microalga *S. Panduriforme*, utilizada como objeto de estudo, possui uma cápsula externa formada por polissacarídeos extracelulares (EPS) e que representam a maior parte da matéria orgânica liberada por ela em água doce. Esses polissacarídeos liberados, também podem ser utilizados por grande número de grupos taxonômicos de algas (*Cyanophyceae* ou *Cyanobacteria*, *Chlorophyceae*, *Zygnematophyceae*, *Bacillariophyceae*) na formação de cápsulas ou bainhas (CPS). Estudos preliminares usando microscopia eletrônica mostraram que ela possui uma delicada estrutura fibrilar e que a cápsula é parte integrante da célula, uma vez que após a sua retirada, a célula a recompõe. Porém estudos envolvendo suas propriedades e estrutura ainda são incipientes.

Várias funções têm sido atribuídas a essas estruturas, mas ainda há poucas informações a esse respeito. Acredita-se que presença de cápsulas/bainhas mucilaginosas serviria para conferir uma proteção contra o "grazing" causado zooplâncton ou contra o dessecação. Outras funções sugeridas são: aprisionamento de nutrientes escassos no ambiente, provendo com isso, um microambiente enriquecido para essas algas; auxiliar na reprodução sexuada, mantendo os parceiros juntos e próximos além de complexar metais tóxicos (LOMBARDI et al., 1998 e 2002).

Para realizar as medidas de microscopia de força atômica foi necessário desenvolver um substrato de fixação que sustente a alga tanto no ar como em meio líquido. Para este fim foi preparada uma solução com 0.5g de Agar-Agar, 10mg de sulfato de amônia e 10 mg de cloreto de cromo dissolvidos em 100ml de água ultrapurificada ($18.2 \text{ M } /\text{cm}$) obtida por filtragem em sistema Mili-Q. Placas de mica recém clivadas foram imersas nesta solução e deixadas secar por 12 horas ("overnight") em ambiente limpo (dessecador).

Após o período de secagem da lâmina de mica tratada, foi depositada uma gota de meio de cultura contendo a alga *S. panduriforme*. Após a secagem amostra esta foi lavada em meio de cultura, previamente filtrado, para retirada do excesso de algas e de resíduos do meio de cultura.

As imagens de microscopia foram obtidas em um microscópio de força atômica Bioprobe fabricado pela Park equipments. O cantilever de modo contato utilizado foi o modelo TMX-1520 da Topomotrix/Veeco. As imagens foram obtidas com frequência de varredura de 0,5Hz.

Nas figuras 2 e 3 são apresentadas duas imagens da amostra: a primeira uma obtida com microscopia óptica e a segunda com microscopia de força atômica (MFA). Ambas são relativas à mesma região como pode ser notado pela imagem parcial do cantilever na figura 2 (triângulo escuro na porção superior da imagem). A imagem da figura 3 foi obtida após um período de secagem de duas horas. Analisando a imagem foi obtida a medida de $0,13 \text{ } \mu\text{m}$ para a espessura da cápsula (parcialmente desidratada). Consideramos que ela está parcialmente desidratada pois, após a realização das medidas, foi adicionado o meio de cultura e esta retornou à sua forma original. Os dados de MFA indicam que a cápsula uma vez desidratada apresenta superfície com baixa rugosidade em torno da alga e aumentando significativamente sobre esta. A figura 4 também evidencia este fato.

A figura 4 apresenta a medida do diâmetro da alga em torno de $23 \text{ } \mu\text{m}$. Não foi possível realizar medidas da largura da cápsula devido a limitações de varredura do microscópio de força atômica utilizado. A presença do Agar-Agar na preparação do substrato de fixação da amostra permitiu que esta não se desidratasse totalmente durante o período utilizado para obtenção das imagens. Dessa forma pode-se afirmar que a mica tratada com solução de Agar-Agar mais sais possibilitou boa fixação das algas ao substrato permitindo a obtenção de imagens de algas.



Figura 2 Imagem microscópica da alga *S. Panduriforme*. A região mais escura é o corpo da alga e a parte transparente a cápsula. O triângulo que aparece invertido na parte superior da imagem é parte do cantilever

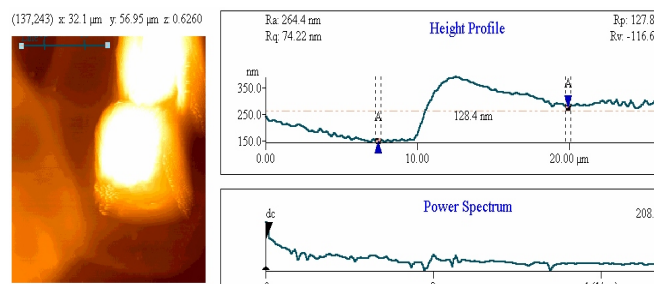


Figure 3 Medida da altura cápsula em estado parcialmente desidratado.

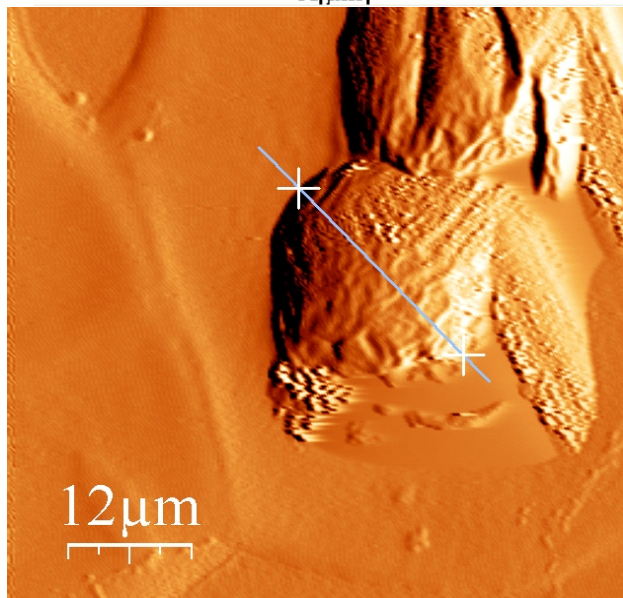
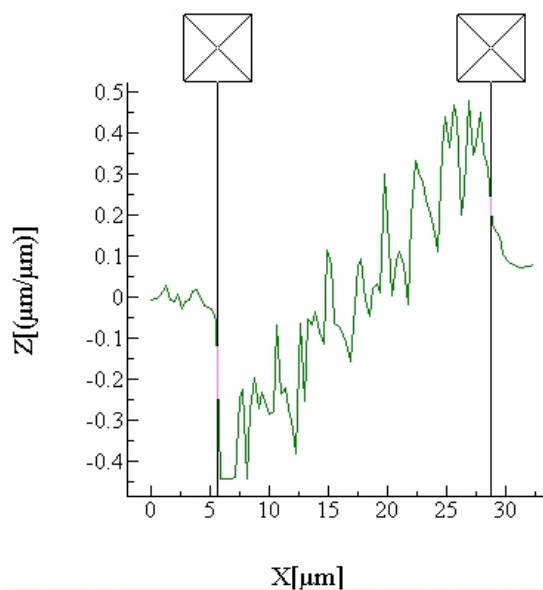


Figura 4 Medida da largura da alga *S. Panduriforme* (23 micra).

Referências Bibliográficas

BINNING, G.; QUANTE, C.F.; GERBER, C. Atomic Force Microscopy. *Phys. Rev. Letts.*, New York, v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.

LOMBARDI A.T.; VIEIRA A.A.H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae). *Phycologia*, Oxford, v. 37, n. 1, p. 34-39, 1998.

LOMBARDI A.T.; VIEIRA A.A.H.; SARTORI L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). *J. Phycol.*, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 332-337, 2002.

Comunicado Técnico, 63

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: 16 3374 2477

Fax: 16 3372 5958

E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição

1a. impressão 2004: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Secretária Executiva: Valéria de Fátima Cardoso
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Rubens Bernardes Filho
Revisão de texto: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane