

TESE DE DOUTORADO

Instituto de Física “Gleb Wataghin”

Universidade Estadual de Campinas

**MEDIDAS DO PERFIL DA PERMISSIVIDADE
ELÉTRICA EM INTERFACES SÓLIDO-LÍQUIDO,
USANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

Gino Ceotto Filho

Orientador: Prof. Dr. Omar Teschke

Banca Examinadora

Prof. Omar Teschke - IFGW/UNICAMP;

Profa. Renata Antoun Simão - COPPE/UFRJ;

Prof. Sukarno Olavo Ferreira - DF/UFV;

Profa. Annette Gorenstein - IFGW/UNICAMP;

Prof. David Mendes Soares - IFGW/UNICAMP;

Prof. Luis Alberto Avaca (suplente) - IQ/USP/SC;

Prof. Maurício Urban Kleinke (suplente) - IFGW/UNICAMP.

Campinas, SP

18 de Setembro de 2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

C333m	<p>Ceotto Filho, Gino Medidas do perfil da permissividade elétrica em interfaces sólido-líquido, usando microscopia de força atômica / Gino Ceotto Filho. -- Campinas, SP : [s.n.], 2001.</p> <p>Orientador: Omar Teschke. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”.</p> <p>1. Microscopia de força atômica. 2. Interfaces (Ciências físicas). I. Teschke, Omar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física “Gleb Wataghin”. III. Título.</p>
--------------	---

AGRADECIMENTOS

- A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de treinamento, e à CAPES/PICD, pela concessão de bolsa que o viabilizou.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro FAPESP 98/14769-2.
- Aos colegas do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, pela confiança e pelo apoio, assumindo meus encargos durante os três anos de ausência.
- Ao Professor *Omar Teschke*, pela orientação segura, pela lucidez com que conduziu todas as etapas do trabalho e, principalmente, pelo apoio e presença constantes.
- À Professora *Elizabeth F. de Souza* que, ao acompanhar este trabalho, contribuiu para seu progresso com tantas sugestões oportunas.
- Ao amigo *Luiz Bonugli*, técnico do Laboratório de Nanoestruturas, por sua participação decisiva no desenvolvimento deste trabalho, pelo companheirismo, pela boa vontade e, mais que tudo, por ter-se tornado um amigo especial e sempre presente.
- Ao amigo *José Roberto de Castro*, também técnico do Laboratório, pelo apoio irrestrito e pela disposição constante em ajudar.
- Aos Professores *Maurício Urban Kleinke* e *David Mendes Soares*, pela solidariedade, discussões e sugestões.
- A todos os membros da banca, por nos honrarem com sua participação.
- Aos particulares amigos, Professor *Daison Olzani Silva* e Professor *Ross Alan Douglas*, personagens decisivos no desenrolar dessa história.

- Aos queridos Orlando, Patrícia e Fernandinha — contar com sua estima e apoio foi sempre emocionante.
- A muitos e muito especiais amigos de todas as horas, de Campinas e de Viçosa — impossível mencionar todos — porque seu suporte tem sido fundamental e sua amizade, preciosa.
- Aos meus pais, grandes amigos e encorajadores – obrigado pelo cuidado de toda a vida.
- Aos meus muito queridos *Ette*, *Line* e *Beto*, filhos do coração, por existirem na minha vida e porque sua presença me impulsiona e sustenta.
- À minha querida *Raquel*, esposa e companheira de todas as horas, pelo amor, pela paciência e por estar do meu lado, sempre.
- E, acima de tudo, a *Deus* - por tudo que foi lembrado, por tudo que eu nem percebi e por tudo o que há de vir.

**ARTIGOS, REFERENTES A ESSE TRABALHO,
PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DA ÁREA**

1. Double layer relaxation measurements using atomic force microscopy. TESCHKE, O.; DE SOUZA, E.F.; CEOTTO, G. **Langmuir**, v. 15, n. 15, p. 4935-4939, jul 1999.
2. TESCHKE, O.; CEOTTO, G., DE SOUZA, E.F. Imaging of soft structures: Dependence of contrast in atomic force microscopy images on the force applied by the tip. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 18, n. 3, p. 1144-1150, mai-jun 2000.
3. Atomic force microscopy imaging of CTAB equilibrium adsorbed films. TESCHKE, O.; DE SOUZA, E.F.; CEOTTO, G. **Proceedings of 5th World Surfactants Congress**, Fortezza da Basso, Firenze, v.1, p. 839-844, jun 2000.
4. Interfacial aqueous solutions dielectric constant measurements using atomic force microscopy. TESCHKE, O.; CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F. **Chemical Physics Letters**, v. 326, n. 3-4, p. 328-334 ago 2000.
5. Ionic surfactant films imaged by atomic force microscopy. CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F.; TESCHKE, O. **Journal of Molecular Catalysis A – Chemical**, v. 167, n. 1-2, p. 225-233, fev 2001.
6. Dielectric constant measurements of interfacial aqueous solutions using atomic force microscopy. DE SOUZA, E.F.; CEOTTO, G.; TESCHKE, O. **Journal of Molecular Catalysis A - Chemical**, v. 167, n. 1-2, p. 235-243, fev 2001.
7. Rupture force of adsorbed bilayers of self-assembled surfactant films measurements using atomic force microscopy. DE SOUZA, E.F.; CEOTTO, G. Soares, D.M.; TESCHKE, O.; **Proceedings of the First Latin American Symposium on Scanning Microscopy, São Pedro, SP — Acta Microscópica**, v. 10, s. 1, p. 83-86, abr 2001.

8. Dielectric exchange-force effect on rupture force of adsorbed bilayers of self-assembled surfactant films. TESCHKE, O.; CEOTTO, G., DE SOUZA, E.F. **Applied Physics Letters**, v. 78, n. 20, p. 3064-3066, mai 2001.
9. Interfacial water dielectric permittivity profile measurements using atomic force microscopy. TESCHKE, O.; CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F. **Physical Review E**, v. 64, n. 1, p. 1605-1614, jul 2001.
10. Dielectric exchange force a convenient technique for measuring the interfacial water dielectric permittivity profile. TESCHKE, O.; CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, p. 3761-3768, 2001.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. Microscópio de Varredura por Sonda	5
1.2. Princípio de funcionamento dos AFM	5
1.3. Curvas de Força	11
1.4. Considerações sobre a água	15
1.5. Água interfacial	17
1.6. Determinação da distribuição da polarização da água interfacial	18
1.7. Observações de microrganismos por AFM	24
1.8. Observações de membranas de surfatante, usando AFM	25
2. METODOLOGIA	26
2.1. Observações de estruturas de microrganismos, por AFM	26
2.2. Medidas de curvas de força	27
2.3. Cálculo das forças atrativa e repulsiva resultantes da interação entre um <i>tip</i> cônico neutro e uma superfície plana de mica carregada negativamente, imersos em um meio líquido	32
2.3.1. Teoria <i>DLVO</i>	32
2.3.2. <i>Força de troca dielétrica (FTD)</i>	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. Observações de microrganismos, usando AFM	40
3.2. Medidas de curvas de força	47
3.3. Modelagem e cálculo da <i>força de troca dielétrica (FTD)</i>	56
3.3.1. <i>Força de troca dielétrica (FTD)</i> associada à imersão de <i>tips</i> de Si_3N_4 em meio líquido	57

3.2.2. <i>Força de troca dielétrica (FTD)</i> associada à imersão de <i>tips</i> de Si_3N_4 em camadas de CTAB adsorvidas em mica	62
3.3.3. <i>Força de troca dielétrica (FTD)</i> associada com <i>tips</i> metálicos	65
3.3.4. <i>Força de troca dielétrica (FTD)</i> associada à variação da permissividade elétrica da água interfacial	65
3.3.5. Observações de membranas de CTAB, usando AFM	69
4. CONCLUSÕES	73
5. REFERÊNCIAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Constituintes básicos de um SPM.....	6
Figura 1.2. <i>Tip</i> cônico (direita) montado na extremidade livre de um cantilever com formato em V (esquerda).	6
Figura 1.3. Diagrama esquemático de um scanner e dos sensores de controle de movimento.....	7
Figura 1.4. Dispositivo ótico de detecção de deflexão do cantilever.	8
Figura 1.5. Imagem de uma superfície de mica imersa em água, obtida com velocidade de varredura de 100 nm/s.	10
Figura 1.6. Imagem de fungos <i>Colletotrichum graminicola</i> em superfície de vidro.	10
Figura 1.7a. Gráfico da deflexão do <i>cantilever</i> vs. deslocamento da amostra para um <i>tip</i> aproximando-se de um substrato rígido.....	14
Figura 1.7b. Curva de força em função da distância absoluta (separação) entre um <i>tip</i> e uma superfície rígida.	14
Figura 1.8. Variação espacial da permissividade elétrica $\epsilon(H)$ nas proximidades da interface mica/água calculada a partir da <i>Equação 1.1</i>	21
Figura 1.9. Variação espacial da permissividade elétrica $\epsilon(H)$ calculada a partir da <i>Equação 1.2</i>	22
Figura 2.1. Diagrama esquemático da célula construída para a observação de amostras em meio líquido.	28
Figura 2.2. <i>Tip</i> piramidal ‘ <i>Sharpened</i> ’ (Microlevers TM): (a) Fotografia de microscopia eletrônica [124]; (b) Diagrama esquemático.....	30
Figura 2.3. <i>Tip</i> cônico (Ultralevers TM): (a) Fotografia de microscopia eletrônica [124]; (b) Diagrama esquemático.	31
Figura 2.4. Coeficiente de Hamaker em função da distância entre uma superfície de mica e um <i>tip</i> de Si ₃ N ₄ , imersos em água, formamida e DMSO.....	34
Figura 2.5. <i>Tip</i> com formato de tronco de cone, com área da extremidade inferior plana πR^2 , imerso na região da dupla camada elétrica.	38

Figura 3.1. Imagens de <i>L. innocua</i> obtidas no modo de contato, ao ar. Vista de topo (a) com representação em função da altura e (b) com “iluminação” lateral. ...	40
Figura 3.2. Imagens de células de <i>B. subtilis</i> aderidas em cupons de (a) silício e (b) vidro, obtidas no modo de contato, ao ar.	41
Figura 3.3. Imagens de células de <i>B. subtilis</i> aderidas em cupom de vidro, obtidas no modo de contato, ao ar (a). Em (b), detalhe da região de contato entre células.	42
Figura 3.4. Imagens de aglomerados de células <i>B. subtilis</i> aderidas em cupons de vidro, ao ar, obtidas no modo de contato (a) e não contato (b).	43
Figura 3.5. Imagens de aglomerado de células de <i>B. subtilis</i> aderidas em cupons de silício, ao ar, obtidas no modo de contato (a). Em (b), detalhes da superfície rugosa e da região de contato entre células.	44
Figura 3.6. Imagens de esporos de <i>B. cereus</i> em cupons de mica, obtidas no modo de contato, ao ar.	45
Figura 3.7. Imagens de esporos de <i>B. cereus</i> em cupons de silício tratado com solução de ácido fluorídrico, obtidas no modo de contato, ao ar.	45
Figura 3.8. Imagens de superfícies de esporos de <i>B. cereus</i> obtidas no modo de contato, ao ar: (a) coberto por uma fina camada de ~15 nm de ouro e (b) <i>in natura</i>	46
Figura 3.9. (a) Curva de força vs. deslocamento da amostra para um <i>tip</i> de Si ₃ N ₄ e uma superfície de mica imersos em água. (b) Curva corrigida.	48
Figura 3.10. Curva de força vs. deslocamento da amostra para <i>tips</i> com permissividades elétricas diferentes: (a) <i>tips</i> de nitreto de silício e silício e (b) <i>tips</i> com cobertura de platina-irídio e cobalto.	49
Figura 3.11. Curva de força vs. distância absoluta para um <i>tip</i> de Si ₃ N ₄ e uma superfície de mica imersos em soluções com concentrações de 10 ⁻³ M de (a) NaCl, (b) LiCl e (c) KCl.	50
Figura 3.12. Curva de força vs. distância absoluta para um <i>tip</i> de Si ₃ N ₄ e uma superfície de mica imersos em (a) dimetilsulfóxido (DMSO) e (b) formamida.	51

Figura 3.13. Imagem produzida por AFM de uma camada de CTAB adsorvida em soluções de CTAB em mica a 5×10^{-5} M.....	52
Figura 3.14. Curvas de força <i>versus</i> distância absoluta realizadas em soluções de CTAB a 5×10^{-5} M, sobre camadas de CTAB adsorvidas em mica, para as regiões mostradas na <i>Figura 3.13</i>	53
Figura 3.15. Arranjo das moléculas de CTAB entre o <i>tip</i> e o substrato: (a) monocamada, (b) bicamada não intercalada e (c) bicamada intercalada.....	55
Figura 3.16. Curvas de força vs. distância absoluta para um <i>tip</i> de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em água, capturadas com diferentes velocidades de aproximação.....	56
Figura 3.17. Curva de força vs. distância absoluta para um <i>tip</i> de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em água ()......	58
Figura 3.18. Curvas de força vs. separação para <i>tips</i> de Si_3N_4 e superfícies de mica imersos em soluções com de 10^{-3} M de (a) NaCl, (b) LiCl e (c) KCl.	59
Figura 3.19. Curva de força vs. distância absoluta para um <i>tip</i> de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em (a) dimetilsulfóxido (DMSO) e (b) formamida.....	60
Figura 3.20. Detalhe das curvas apresentadas na <i>Figura 3.13</i> . As linhas cheias correspondem aos ajustes da <i>Equação (2.7)</i> às curvas experimentais.....	61
Figura 3.21. Detalhe das curvas apresentadas nas <i>Figuras 3.14</i> e <i>3.20</i> . Cálculo da <i>força de troca dielétrica</i> que atua sobre o <i>tip</i> com extremidade inferior esférica ($R \approx 5$ nm), quando imerso em camadas de CTAB, indicado pela linha tracejada. (a) Região II e (b) região I.	63
Figura 3.22. Curva de força vs. distância absoluta para um <i>tip</i> de platina-irídio e uma superfície de mica imersos em água. A linha cheia indicada por <i>FTD</i> corresponde ao ajuste da <i>Equação (2.7)</i> à curva experimental, utilizando a função $\epsilon_{\text{DC}}(H)$, <i>Equação (1.2)</i> , cuja variação espacial é apresentada no destaque.....	66

Figura 3.23. As curvas correspondem à variação espacial da permissividade elétrica resultantes dos ajustes da <i>Equação (2.7)</i> às curvas de força experimentais.....	67
Figura 3.24. Imagem de uma estrutura formada por moléculas de CTAB adsorvida em mica, obtida por AFM, em uma solução com concentração de 5×10^{-5} M. As regiões mais claras indicam estruturas mais altas.	70
Figura 3.25. Imagens da interface solução/surfatante/mica, exibindo contrastes de imagens (a) padrão e (b) invertido, obtidas com força de varredura de 0,012 nN e 2,56 nN, respectivamente.	71
Figura 3.25. Imagens do padrão de adsorção das moléculas do surfatante CTAB na superfície de mica, obtidas após 25, 45, 60 e 105 min de imersão em solução 10^{-5} M.	72

Resumo

Quando imersas em água, muitas superfícies apresentam-se carregadas eletricamente. Por isso, durante o processo de geração de imagens por microscopia de força atômica em meio aquoso, forças de natureza repulsiva e atrativa entre o *tip* e a amostra são detectadas. Nas últimas décadas, as forças repulsivas têm sido atribuídas às interações eletrostáticas, enquanto as interações atrativas, às forças de van der Waals. Neste trabalho são descritos estudos de espectroscopia de força (curvas de força em função da distância) entre *tips* de microscópio de força atômica e substratos carregados eletricamente, imersos em meio líquido. Em função dos resultados obtidos, formulou-se um modelo denominado '*força de troca dielétrica*' (*FTD*) que explica o comportamento das curvas na interface sólido/líquido, com base na hipótese de que a força que age sobre o *tip*, nessa região, decorre da troca de 'constantes dielétricas' (ou permissividades elétricas) entre o *tip* e o sistema líquido. Em água, o *tip* de nitreto de silício (Si_3N_4), com permissividade elétrica $\epsilon_{\text{Tip}} = 7,4$, ao aproximar-se da interface carregada — região denominada 'dupla camada elétrica', com permissividade elétrica ϵ_{DC} — substitui uma parte da água equivalente ao seu volume. Essa troca responde pela repulsão observada longe da interface (iniciando a ~ 100 nm, camada difusa, onde $\epsilon_{\text{DC}} \approx 80$), seguida por uma atração quando o *tip* imerge nas camadas mais internas (~ 10 nm). A presença de substrato carregado determina a reorientação dipolar das moléculas de água, a qual, por sua vez, vem ser a causa da baixa permissividade elétrica nas imediações da interface. Suportes para o modelo proposto foram obtidos pela imersão de *tips* metálicos ($\epsilon_{\text{Tip}} \rightarrow \infty$) em água, quando um único componente atrativo foi observado, e pela imersão de *tips* de Si_3N_4 em formamida e DMSO, situação em que somente uma contribuição repulsiva foi detectada. O modelo recebeu confirmação adicional ao se observar que os *tips* de Si_3N_4 sofreram atração ao penetrarem nas bicamadas de uma substância surfatante ($\epsilon_s \approx 2 - 6$). Comparado a uma teoria que vem sendo sistematicamente empregada para explicar as interações entre superfícies — a teoria *DLVO* — o modelo de *FTD* mostrou-se mais adequado aos resultados experimentais. Esse modelo foi empregado na identificação da intensidade da força a ser aplicada a amostras frágeis, em processos de geração de imagens por microscopia de força atômica, em meio líquido.

Summary

When immersed in water, several surfaces are electrically charged. Therefore, repulsive and attractive forces between the tip and the sample are detected during image generation by atomic force microscopy in aqueous medium. In the last decades repulsive forces have been attributed to electrostatic interactions, while attractive forces have been ascribed to van der Waals forces. In this research, force spectroscopy studies (force *versus* distance curves) are described between atomic force microscope tips and electrically charged mica immersed in aqueous medium. From the data obtained, a model was formulated, named ‘*dielectric exchange force*’ which explains the behavior of the curves in the solid/liquid interface based on the hypothesis that the force acting on the tip in this region arises from the ‘dielectric constants’ (or dielectric permittivities) exchanges between the tip and the liquid system. In water, when the silicon nitride (Si_3N_4) tip, with electrical permittivity $\epsilon_{\text{Tip}} = 7.4$, approaches the charged interface (region named ‘electric double layer’, with electric permittivity ϵ_{DC}), it replaces a portion of the water corresponding to its volume. This exchange accounts for the repulsion observed far from the interface (starting at ~ 100 nm, diffuse layer, where $\epsilon_{\text{DC}} \approx 80$), followed by an attraction when the tip immerses in the inner layers (~ 10 nm). The presence of a charged mica determines dipolar orientation of the water molecules, which in turn is the source of the low electric permittivity in the interface neighborhood. Support for the model proposed was given by immersion of metallic coated tips ($\epsilon_{\text{Tip}} \rightarrow \infty$) in water, when a single attractive component was observed, and by immersion of Si_3N_4 tips in formamide and DMSO, where only a repulsive component was detected. The model was further confirmed by the observation that the Si_3N_4 tips underwent attraction when penetrating the bilayers of a surfactant substance ($\epsilon_s \approx 2 - 6$). When compared to a theory that has been systematically used to explain interactions between surfaces — *DLVO* theory —, the *FTD* model was more adequate to explain the experimental results. This model was used to identify the magnitude of the force to be applied to fragile samples, in images generation by atomic force microscopy in aqueous medium.

Introdução

O Microscópio de Força Atômica (Atomic Force Microscopy – AFM) é um equipamento de desenvolvimento relativamente recente, utilizado para obter imagens em escala submicrométrica de diferentes materiais, cujo funcionamento baseia-se na medida de forças atrativas ou repulsivas entre a amostra e uma sonda (*tip*) que a percorre [1,2]. Os equipamentos de AFM vêm sendo amplamente utilizados em diversas áreas, porém existe um consenso, entre especialistas, de que seu potencial é apenas parcialmente explorado. Tal fato leva à expectativa de que seu emprego venha a se tornar tão extensivo a ponto de transformá-lo em um instrumento analítico de uso popular, dado o seu custo — menor do que os microscópios eletrônicos de varredura (SEM) e transmissão (TEM) — e alto poder de resolução [1, 3].

A utilização do AFM permite observar materiais ao ar, em vácuo e em meio líquido. Um dos aspectos mais atrativos do AFM repousa exatamente na capacidade de obtenção de imagens de estruturas em soluções aquosas [4-8]. Apesar de a maioria dos experimentos serem realizados ao ar, os estudos em líquidos apresentam a vantagem de eliminar o menisco — inconveniente sempre presente nos trabalhos desenvolvidos ao ar — sem a necessidade da utilização de sistemas de vácuo, possibilitando reduzir de 10 a 100 vezes a força aplicada pelo *tip* à superfície [9].

Entre as aplicações do AFM, destaca-se seu potencial de uso para o estudo de materiais biológicos. Uma vez que a maioria desses materiais desnaturam quando não mantidos em soluções isotônicas e que organismos vivos dependem do fornecimento de diversos nutrientes em forma de solutos, fica evidente a importância do desenvolvimento de mecanismos de observação de processos em sistemas imersos em meios líquidos. Nesse campo, o AFM apresenta grandes vantagens, em relação a outros métodos de microscopia. No caso particular de observações de estruturas microbianas, por exemplo, a microscopia ótica convencional apresenta limitações, pois, além de exigir o uso de substratos

transparentes, a resolução fica limitada a aproximadamente metade do comprimento de onda da luz, ou seja, entre 200 e 400 nm. Já em microscopia eletrônica, ainda que o limite na resolução do microscópio ótico tenha sido superado, as amostras necessitam de uma preparação especial, que envolve fixação química, desidratação e emprego de contrastes ou revestimentos, o que leva à visualização de estruturas artificiais. Ao se observar células ou esporos aderidos em superfícies por meio de AFM, não há necessidade de luz, nem de preparo prévio da amostra e, ainda, podem-se usar substratos opacos, bastando que a superfície em exame seja plana [10].

Contudo, muitos problemas perduram na geração de imagens de materiais biológicos por AFM, o que justifica o esforço de investigar técnicas apropriadas ao preparo de amostras e interação com as mesmas, visando à superação das dificuldades advindas da natureza dinâmica dos sistemas e do meio que estão inseridos. As pesquisas têm contribuído para o desenvolvimento dos mecanismos de observação, por exemplo, em soluções salinas tamponadas e caldos de cultivo, ambientes adequados à conservação ou multiplicação de células.

Para interpretar imagens de AFM corretamente é necessário identificar as forças que atuam entre o *tip* e a superfície da amostra. Por isso, é importante conhecer os diferentes componentes da força total a fim de minimizá-la e, com isso, prevenir possíveis deformações ou destruição da amostra em estudo. Quando trabalhando em meio aquoso, diferentes forças (atrativas e repulsivas) agem entre o *tip* e a superfície [11, 12]. Longe do substrato, entre 10 e 100 nm, forças quase sempre repulsivas, supostamente eletrostáticas, agem entre o *tip* e a amostra [13-17]. Próximo à interface observa-se uma interação geralmente atrativa, atribuída a forças de van der Waals (vdW) [18-20].

Resultados descritos na literatura revelam que, em meio aquoso, a força repulsiva atribuída à interação eletrostática é significativa e deveria ser levada em consideração [11], já que, quando imersas em água, as superfícies da maioria dos materiais apresentam-se carregadas eletricamente [21].

Devido à importância das interações eletrostáticas, muitas investigações têm sido conduzidas com o intuito de quantificá-las, incluindo os trabalhos pioneiros de Derjaguin e Landau (1941) e Verveij e Overbeek (1948), conhecidos como ‘teoria *DLVO*’ [15].

A teoria *DLVO* é fundamentada na idéia de que as interações de curto e longo alcance entre partículas dispersas em solventes polares (especialmente água) são governadas por duas forças independentes: a força de vdW (atrativa) e a força eletrostática (repulsiva ou atrativa). De acordo com essa teoria, a força de interação total entre duas superfícies pode ser tratada como a soma do componente atrativo de vdW e o componente eletrostático, geralmente repulsivo. Enquanto as forças de vdW estão sempre presentes, a força eletrostática depende da existência de componentes superficiais carregados [21, 22].

No presente trabalho, com o objetivo de identificar e quantificar corretamente as forças que atuam entre o *tip* e a superfície da amostra, foram realizadas medidas de força em função da distância entre *tips* diversos e superfícies de mica, imersos em meios líquidos diferentes.

Ao se aproximar *tips* de nitreto de silício de uma superfície de mica (o primeiro eletricamente neutro ou fracamente negativo e o outro carregado negativamente [23]), em água, foram observadas contribuições repulsiva e atrativa. Segundo a teoria *DLVO*, a contribuição repulsiva seria devida à aproximação entre duas superfícies com cargas de mesmo sinal, enquanto a interação atrativa seria atribuída às forças de vdW. Assim, a curva de força entre um *tip* ligeiramente negativo e uma interface positiva, deveria apresentar exclusivamente componentes atrativos. Entretanto, contrariando a expectativa, interações repulsivas e atrativas também foram observadas em medidas de força realizadas em solução aquosa sobre bicamadas de surfatante catiônico (carregado positivamente) adsorvidas em mica [24, 25].

Experimentos realizados com *tips* de Si_3N_4 imersos nos solventes formamida e dimetilsulfoxido (DMSO) evidenciaram somente um componente repulsivo para a força, contrariando o previsto pela teoria *DLVO*, de que o componente atrativo de vdW está sempre presente. Com base nos resultados obtidos, desenvolveu-se um modelo teórico, que

foi denominado ‘*força de troca dielétrica*’ (*FTD*), capaz de reproduzir com exatidão os resultados experimentais, mostrando-se mais adequado que o *DLVO*. O modelo proposto explica o comportamento da curva de força na interface sólido/líquido, fundamentado na hipótese de que a força que age sobre o *tip* nessa região é uma consequência da troca de ‘*constantes dielétricas*’ (permissividades elétricas) entre o *tip* e o sistema líquido.

Com *tips* de Si_3N_4 e substratos de mica imersos em água pura ou solução aquosa, longe da interface (> 10 nm), os valores calculados para a força eletrostática, à luz do modelo proposto, são similares aos previstos pela teoria *DLVO*. O modelo de *FTD* também ajusta-se com grande exatidão aos resultados experimentais obtidos com *tips* de Si_3N_4 e superfícies de mica modificada (positiva), imersos em solução aquosa. No entanto, próximo à interface (≤ 10 nm), enquanto o modelo proposto ajusta-se perfeitamente às curvas de força medidas, o termo atrativo de vdW está longe de fazê-lo.

Suportes para o modelo proposto são fornecidos pelas curvas de força obtidas com *tips* metálicos ($\epsilon_{\text{Tip}} \rightarrow \infty$) imersos em água (onde um único componente atrativo foi observado, sistematicamente, ao longo de cada curva) e *tips* de Si_3N_4 imersos em formamida e DMSO, onde forças atrativas de vdW não foram detectadas.

O modelo recebeu, ainda, confirmação adicional, ao se observar que os *tips* de Si_3N_4 sofreram atração ao penetrarem nas bicamadas de uma substância surfatante ($\epsilon_s \approx 2 - 6$). Comparado à teoria *DLVO*, que há décadas vem sendo empregada para explicar as interações entre superfícies, o modelo de *FTD* mostrou-se notoriamente mais coerente com os dados experimentais. O modelo foi empregado na identificação da intensidade da força a ser aplicada a amostras frágeis, em processos de geração de imagens por microscopia de força atômica.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Microscópio de Varredura por Sonda

Há duas décadas, nascia o microscópio de tunelamento (STM – Scanning Tunneling Microscope, 1981-2) [2, 26 - 29], cujo desenvolvimento rendeu aos pesquisadores G. Binnig e H. Rohrer o prêmio Nobel de Física, em 1986. Graças à invenção do STM tornou-se possível observar, medir e manipular átomos ou moléculas, estimulando inúmeros laboratórios a desenvolver experimentos controlados em escala nanométrica. A invenção desencadeou o aparecimento de uma grande variedade de microscópios de varredura por sonda (Scanning Probe Microscopy, SPM) entre os quais destacam-se, além do próprio microscópio de tunelamento, o microscópio de força atômica (AFM – Atomic Force Microscopy, 1986), o microscópio de força magnética (MFM – Magnetic Force Microscopy), o microscópio de força eletrostática (EFM – Electrostatic Force Microscopy) e o microscópio ótico de campo próximo (SNOM – Near-Field Scanning Optical Microscopy) [2, 30].

Os vários tipos de SPM diferem quanto ao método empregado no monitoramento da amostra e quanto à forma de interação entre a ponta de prova e a superfície. Os componentes comuns a todos os SPM estão representados no diagrama a seguir (Figura 1.1).

1.2. Princípio de funcionamento dos AFM

Em 1986, Gerd Binnig, Calvin Quate e Christopher Gerber desenvolveram um dispositivo que chamaram ‘microscópio de força atômica’ [1]. Os AFM sondam a superfície de uma amostra por meio de uma ponteira (*tip*) muito fina, cuja curvatura da extremidade inferior pode ser aproximada a uma semi-esfera com raio variando entre 5 e

50 nm e comprimento entre 2 e 4 μm . Os *tips* (Figura 1.2) são montados nas extremidades livres de alavancas (*cantilevers*) com 85 a 320 μm e módulo elástico entre 0,02 e 17 N/m.

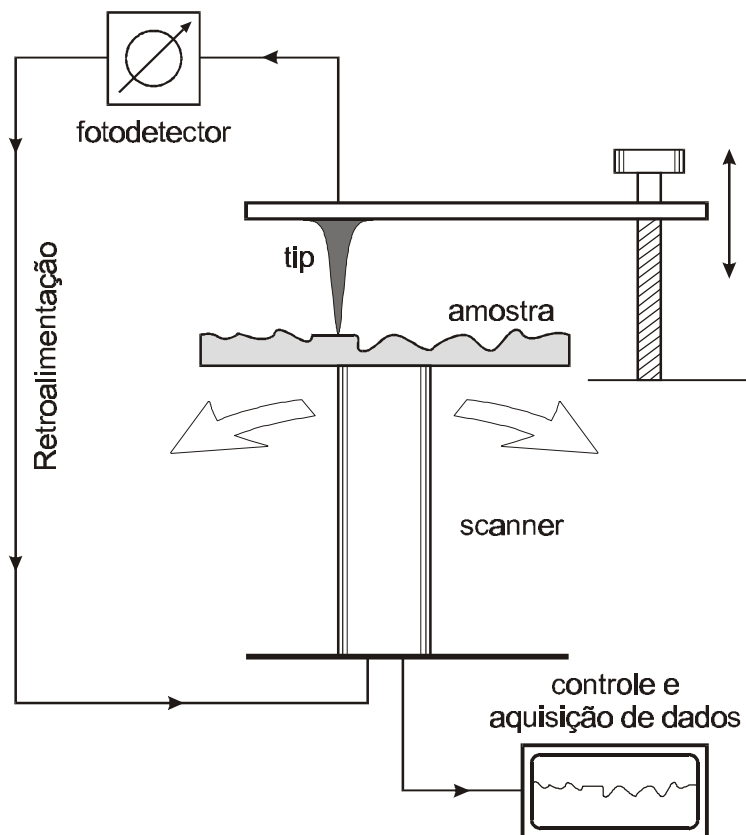


Figura 1.1. Constituintes básicos de um SPM [2].



Figura 1.2. *Tip* cônico (direita) montado na extremidade livre de um cantilever com formato em V (esquerda) [31].

Os suportes de amostras são colocados sobre um dispositivo de posicionamento extremamente preciso (*scanner*), feito de cerâmicas piezelétricas, responsável pelo ajuste da distância entre o *tip* e a amostra (na direção vertical z) e pelo deslocamento lateral da mesma (no plano x - y). Sob a ação de uma diferença de potencial os materiais piezelétricos podem sofrer expansão ou compressão na direção perpendicular ao campo aplicado. Os microscópios modernos são equipados com cerâmicas piezelétricas em formato de tubos ocos segmentados verticalmente em quatro partes (*Figura 1.3*). Eletrodos posicionados na face externa do tubo são responsáveis pelo movimento lateral da amostra nas direções $\pm x$ e $\pm y$. O eletrodo situado na parede interna do tubo responde pelo movimento na direção z , que resulta na altura observada nas imagens [2].

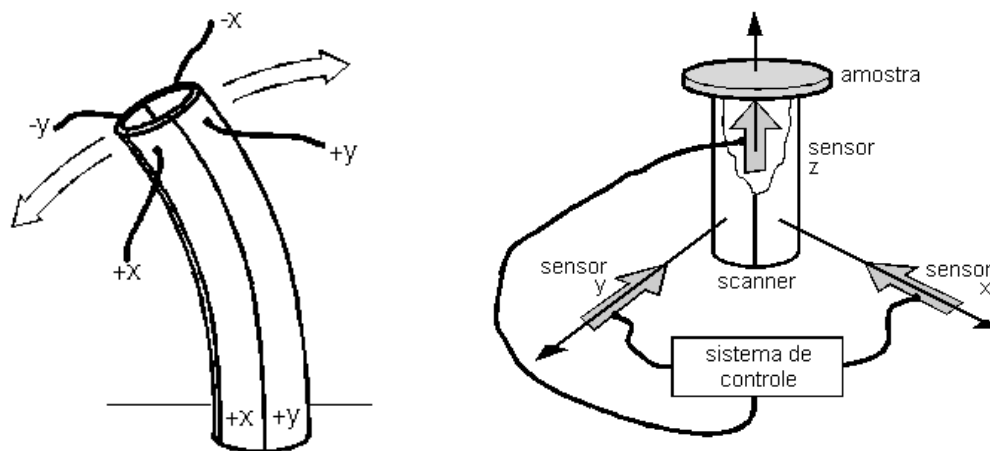


Figura 1.3. Diagrama esquemático de um scanner e dos sensores de controle de movimento [2].

As forças de interação entre o *tip* e a amostra causam deflexão no *cantilever* enquanto o *tip* percorre a amostra — ou, antes, quando a amostra se desloca sob o *tip*. Em geral, os AFM são capazes de medir deflexões do *cantilever* (d_c) de até $0,1 \text{ \AA}$. Para isso a maioria dos AFM dispõe de um dispositivo ótico de baixo custo e fácil manuseio, capaz de alcançar uma resolução comparável à de um interferômetro [32,33]. O dispositivo ótico (*Figura 1.4*) é formado por um laser, um espelho (parte superior do *cantilever*) e um sensor de posicionamento vertical (fotodetector), o qual consiste em dois fotodiodos montados

lado a lado. O feixe de laser, após refletir na parte espelhada do cantilever, incide no fotodetector.

Quando o cantilever sofre deflexão, a posição do feixe de laser no detector é deslocada e a diferença entre os sinais dos fotodiodos indica o novo ponto de incidência e, assim, a deflexão angular do cantilever. Uma deflexão angular (θ) do cantilever e, portanto, do ângulo de incidência do laser, implica em deflexão angular duas vezes maior (2θ) no feixe refletido. Além disso, a distância do espelho ao detector é suficientemente grande para que pequenas deflexões do cantilever resultem em grandes deslocamentos no detector. Os sinais provenientes do fotodetector, que monitora o posicionamento vertical do *tip* e do sistema de controle do piezelétrico, são armazenados e processados por um microcomputador, permitindo-lhe gerar um mapa topográfico da superfície em estudo.

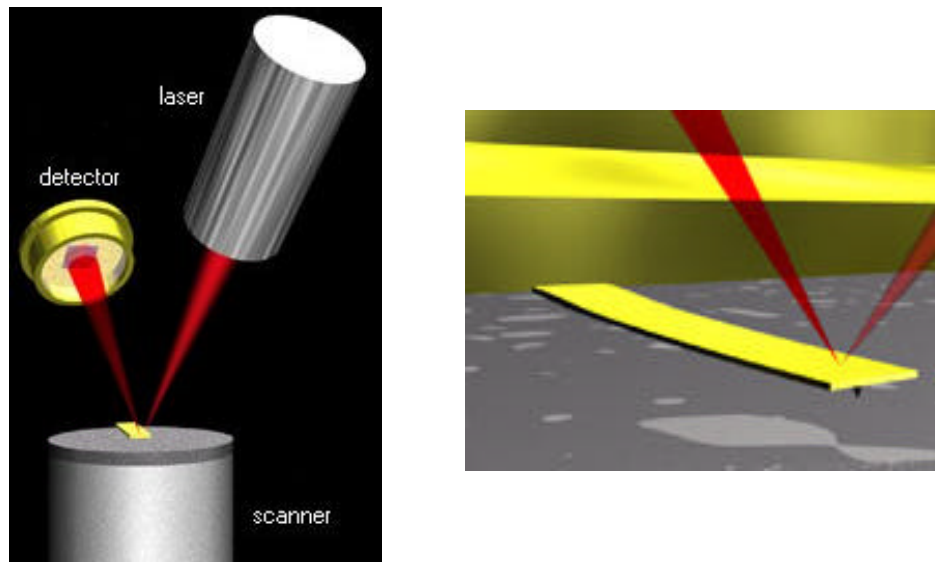


Figura 1.4. Dispositivo óptico de detecção de deflexão do cantilever [34].

O AFM funciona medindo forças atrativas ou repulsivas entre o *tip* e a amostra [1]. No *modo repulsivo* (*'repulsive mode'*), também chamado *modo de contato* (*'contact mode'*), o *tip* “toca” suavemente a superfície da amostra, medindo forças de repulsão entre *tip* e amostra. Este modo de operação fornece informação topográfica com definição horizontal inferior a 10 Å e definição vertical menor do que 1 Å. Neste modo de operação a

observação de materiais biológicos, como células, requer cuidados especiais no preparo das amostras, a fim de se evitar que materiais viscosos como, por exemplo, meios de cultivo à base de ágar, mascarem a imagem e sujem o *tip*. Uma variação do *modo de contato* recebe a denominação de ‘*microscopia de força lateral*’ (LFM) que produz imagens a partir de deflexões laterais (torções) do *cantilever*. Estudos de LFM são particularmente adequados a superfícies não homogêneas [2].

Outra força geralmente presente durante a operação do AFM, ao ar, no *modo de contato*, é a força de capilaridade. Superfícies expostas ao ar ambiente geralmente acham-se cobertas por uma fina camada de água. Ao entrar em contato com a superfície, o *tip* é envolvido pela água e forma-se um menisco entre *tip* e superfície, responsável por uma força atrativa intensa ($\sim 10^{-8}$ N) que os mantém em contato. A força de capilaridade resulta da separação entre o *tip* e a amostra [2].

Operando no *modo de contato*, o AFM pode gerar imagens da superfície de duas formas distintas.

No primeiro caso, *modo de altura-constante*, a variação espacial da deflexão do *cantilever* pode ser usada diretamente para gerar o conjunto de dados topográficos porque a altura do *scanner* é pré-determinada e mantida constante durante todo o processo de varredura. O *modo de altura-constante* é freqüentemente usado para capturar imagens em escala atômica, de superfícies absolutamente planas (vide *Figura 1.5*), onde as deflexões do *cantilever* e as variações na força aplicada são pequenas. Este modo de operação é também essencial para o registro em tempo real, de imagens de superfícies dinâmicas, quando alta velocidade de varredura é essencial [2].

No outro caso, *modo de força-constante*, a deflexão do *cantilever* é usada como entrada de um circuito de retroalimentação que move o *scanner* para cima e para baixo em *z*, em resposta à topografia, mantendo a deflexão do *cantilever* constante. Neste caso, a imagem é gerada a partir do movimento do *scanner*. Como a deflexão é mantida constante, a força total aplicada à amostra também o é. No *modo de força-constante*, a velocidade de exploração é limitada pelo tempo de resposta do circuito de retroalimentação, mas a força

total exercida na amostra pelo *tip* é bem controlada. O *modo de força-constante* é preferido, geralmente, para a maioria das aplicações (Figura 1.6).

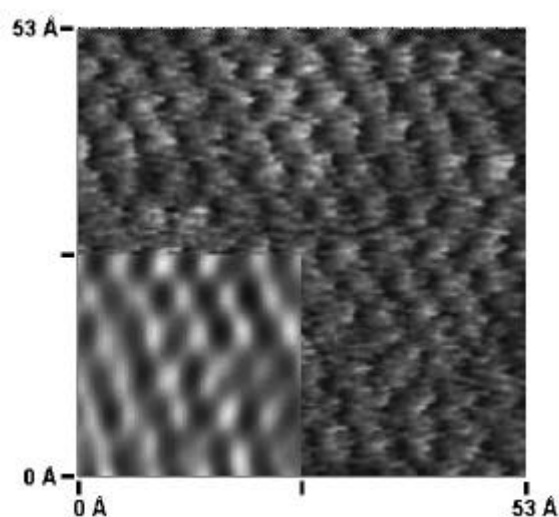


Figura 1.5. Imagem de uma superfície de mica imersa em água, obtida com velocidade de varredura de 100 nm/s. No destaque, a imagem transformada de Fourier [35].

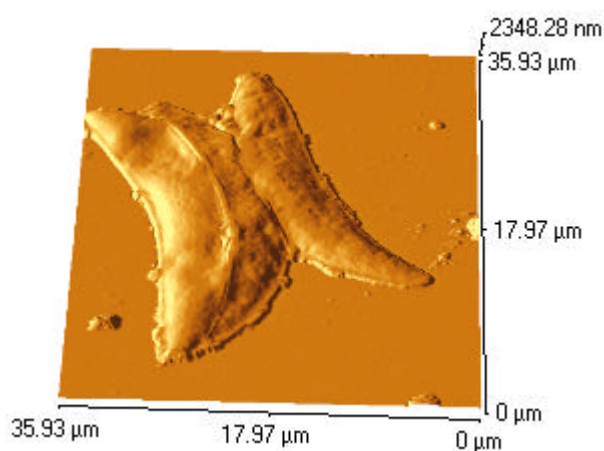


Figura 1.6. Imagem de fungos *Colletotrichum graminicola* em superfície de vidro [36].

No *modo atrativo* (*'attractive mode'*), ou *modo de não-contato* (*'noncontact mode'*), o AFM mantém o *tip* e a amostra separados por uma distância previamente ajustada (10 — 20 nm) enquanto monitora efeitos decorrentes de interações atrativas atribuídas a forças de van der Waals (vdW). Uma das vantagens deste modo de operação repousa no fato de o *tip* não tocar a amostra. Entretanto, a resolução é normalmente pobre, sendo raramente usado em materiais biológicos [37].

O *modo de contato intermitente* (*'tapping mode'*) é similar ao *modo de não-contato*, exceto pelo fato de que o *cantilever* oscila de tal maneira que, ao final de seu curso (~100 nm), o *tip* toca a amostra. Algumas amostras são melhor exploradas através do emprego do *modo de contato-intermitente* em vez dos *modos de contato* ou *de não-contato*. O *modo de contato intermitente* tem-se consolidado como uma técnica importante de AFM por superar algumas das limitações dos *modos de contato* e *de não-contato*. Comparado ao *modo de contato*, o *modo de contato-intermitente* elimina os danos provenientes das *forças laterais* (fricção ou arrasto) entre o *tip* e a amostra. Por outro lado, neste modo de operação, para que o *tip* possa penetrar e sair da camada de água, a força vertical deve ser grande o bastante para superar a força de capilaridade (10^{-8} N), podendo danificar e/ou deformar superfícies macias ou materiais elásticos. Em relação ao *modo de não-contato*, o *modo de contato-intermitente* tem-se mostrado mais eficaz para varrer amostras que apresentem grande variação de topografia.

1.3. Curvas de Força

O AFM também permite a construção de curvas de força em função da distância entre *tip* e amostra [2, 13 – 15, 38 - 42]. Essas medidas são essenciais para se definir forças verticais que devem ser aplicadas a uma superfície, para a captação de imagens.

Forças entre superfícies vêm sendo estudadas experimentalmente bem antes da invenção do AFM, através de SFA (*'Surface Force Apparatus'*) [43 – 49]. Em SFA, duas superfícies 'idênticas' — tanto na geometria como no material que as compõe — curvadas em forma de cilindro, com raios de curvatura de ~1 - 2 cm, dispostas transversalmente, são

aproximadas, primeiramente por meio de um sistema mecânico e, posteriormente, por um piezelétrico. As forças ($\sim 10^{-2}$ - 10^{-7} N) são calculadas através da lei de Hooke, a partir das medidas das deflexões de uma alavanca, em cuja extremidade uma das superfícies encontra-se instalada. A separação entre as superfícies é medida com precisão de $\sim 0,1$ nm, por análise de franjas de interferência produzidas a partir de reflexões múltiplas na face inferior espelhada da alavanca [30, 50, 51].

Comparado ao SFA, o AFM tem-se revelado mais adequado para medir forças interfaciais, pois, além de mapear as superfícies em estudo com uma resolução espacial de poucos angstroms, possibilita, a partir das imagens geradas, escolher onde medir as referidas forças. Se um *cantilever* de baixa constante elástica for usado — por exemplo, com $k_c = 0,03$ N/m — a resolução da força na direção perpendicular à superfície será $F = k_c \times d_c = (0,03 \text{ Nm}^{-1}) \times (0,1 \times 10^{-10} \text{ m}) = 3 \times 10^{-13}$ N, enquanto em condições favoráveis o SFA alcança no máximo 10^{-8} N.

A representação gráfica da força aplicada ao *tip* do AFM, enquanto a amostra é aproximada e afastada, constitui a chamada ‘curva de força’. As curvas de força são complexas e específicas para diferentes sistemas em estudo. Em princípio, esses gráficos evidenciam a força requerida para atingir uma certa profundidade de deformação, o que possibilita a determinação de parâmetros viscoelásticos de materiais. Assim se examinam plaquetas, bactérias e células ou se estudam propriedades micromecânicas de ossos e de outros materiais.

Apesar das amplas demonstrações da utilidade do AFM no estudo de materiais biológicos, há várias dificuldades experimentais em coletar e analisar dados de curvas de força. Um dos problemas é a determinação exata do ponto de contato entre *tip* e amostra. Uma amostra muito macia (em relação à sensibilidade de detecção do AFM) irá se deformar, em resposta ao *tip*, antes de a deflexão do *cantilever* ser mensurável. Assim, o verdadeiro ponto de contato não será facilmente detectado, o que pode determinar erros significativos nas medidas de profundidade das deformações, de módulos elásticos ou de outros parâmetros definidos pelo ponto de contato.

A soma das forças que atuam no *tip*, responsáveis pelas deflexões do *cantilever*, pode resultar em atração e/ou repulsão. Na verdade, o sistema não mede as forças e sim as deflexões do *cantilever*. Medidas de deflexões em função da posição da amostra ao longo do eixo z são obtidas durante o movimento vertical de aproximação e afastamento do piezelétrico em relação ao *tip*. A Figura 1.7a representa uma simplificação do que seria uma curva da deflexão do *cantilever* em função do deslocamento da amostra colhida em vácuo. O eixo vertical representa a deflexão experimentada pelo *cantilever* (que é proporcional à variação do sinal de saída do fotodiodo) e o eixo horizontal, o deslocamento da amostra. No gráfico, o ciclo inicia-se à direita, quando o *tip* e a amostra encontram-se afastados (1). À medida que a separação torna-se pequena o suficiente para que forças atrativas de vdW ajam entre ambos, o *tip* mergulha em direção a superfície, flexionando o *cantilever* para baixo (2). Uma vez estabelecido o contato, o *cantilever* sofre deflexão idêntica à expansão do piezelétrico. Após atingir o deslocamento máximo (3) o *scanner* inicia o caminho inverso, trazendo o *tip* aderido à superfície da amostra até finalmente soltar-se (4), voltando o *cantilever* à condição inicial de relaxamento.

As forças podem ser calculadas a partir da deflexão ($\Delta z = d_c$) do *cantilever*, de constante elástica k_c , usando a lei de Hooke: $F = k_c d_c$. Como os AFM não fornecem uma medida da distância absoluta entre *tip* e amostra, faz-se necessária a construção de um novo gráfico cuja coordenada horizontal (H) é obtida a partir da soma da deflexão do *cantilever* (d_c) com o deslocamento da amostra (Z_a) [52, 53]. A curva corrigida exibida no novo gráfico é chamada ‘*curva de força em função da distância*’ ou, simplesmente, ‘*curva de força corrigida*’ (Figura 1.7b). Esta técnica é largamente empregada no estudo de propriedades viscoelásticas de materiais biológicos [54–65], em medidas de espessura de filmes [40–42, 66–69] e, mais recentemente, de permissividade elétrica em interfaces [13–15, 42].

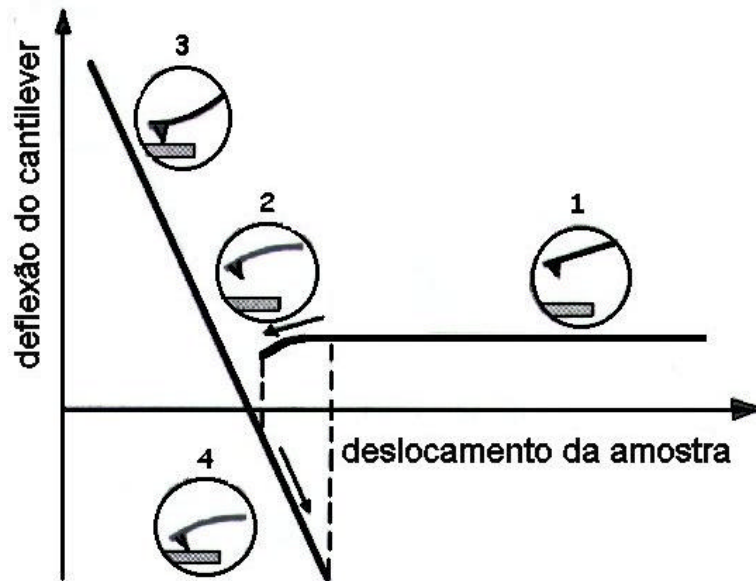


Figura 1.7a. Gráfico da deflexão do *cantilever* vs. deslocamento da amostra para um *tip* aproximando-se de um substrato rígido. O diagrama esquemático retrata as posições relativas do *tip* e da superfície da amostra.

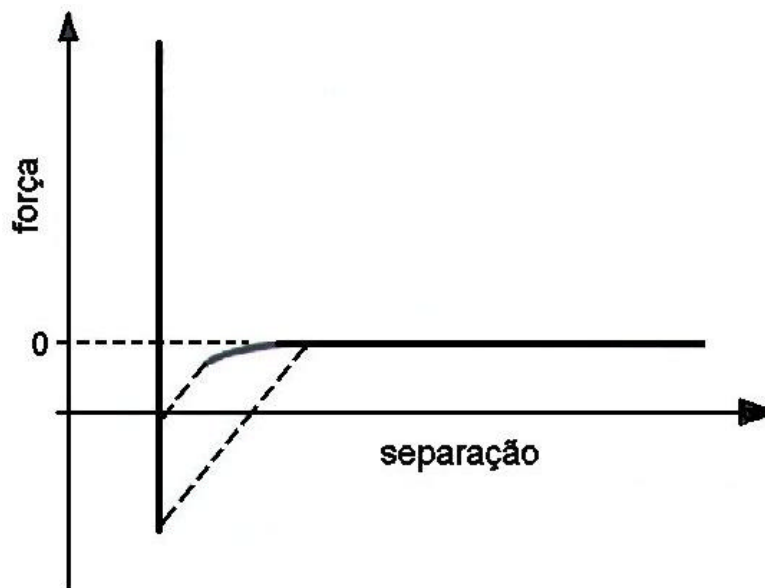


Figura 1.7b. Curva de força em função da distância absoluta (separação) entre um *tip* e uma superfície rígida.

1.4. Considerações sobre a água

A água apresenta uma infinidade de aplicações em ciência e tecnologia, relacionadas a questões como capacidade de molhagem, limpeza, corrosão, processos eletroquímicos, formação de emulsões, conformação de membranas e hidratação protéica, para citar algumas [70], tendo sido extensiva e intensivamente estudada por décadas [71]. Todavia, a compreensão de suas propriedades físicas e químicas é ainda limitada.

A água (em estado líquido) é um sistema complexo, com propriedades incomuns, se não únicas. Essa complexidade é devida a uma combinação do tamanho pequeno da molécula e à distribuição polar de cargas [72]. Embora a molécula de água seja eletricamente neutra, suas cargas são separadas, resultando em um dipolo elétrico. Por causa dessa separação de cargas, duas moléculas de água podem se atrair por forças eletrostáticas entre a carga negativa do átomo de oxigênio de uma molécula e a carga positiva do átomo de hidrogênio de outra. Na verdade, a água e seus íons (H^+ e OH^-) influenciam profundamente as propriedades de muitos componentes importantes das células, como as enzimas, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios. A grande maioria das interações moleculares em sistemas vivos ocorre em meio aquoso.

A distribuição de cargas pode ser representada por quatro braços de um tetraedro, de forma a permitir que, teoricamente, cada molécula de água possa formar pontes de hidrogênio com até quatro moléculas vizinhas. A intensa atração entre moléculas de água adjacentes confere à água líquida grande coesão interna e, por conseguinte, ponto de fusão, ponto de ebulição, calor de vaporização e tensão superficial mais altos que a maioria dos líquidos comuns. Disso resulta, também, sua inadequação para dissolver solutos inertes (apolares ou hidrofóbicos), com os quais não pode interagir por meio de forças polares igualmente fortes [73, 74].

A capacidade de a água ligar-se fortemente a compostos polares e hidrofílicos, dissolvendo-os, faz com que seja um excelente solvente para uma grande variedade de

moléculas e íons, para manter em suspensão partículas coloidais e para viabilizar estruturas biológicas como proteínas, DNA, vírus e células [74].

A água é muito melhor solvente que a maioria dos líquidos comuns. Sais cristalinos — por exemplo, cloreto de sódio (NaCl) — dissolvem-se facilmente em água, mas são praticamente insolúveis em líquidos não-polares, como o clorofórmio ou o benzeno. Esta propriedade é um exemplo do caráter dipolar da molécula de água. O mosaico cristalino de um sal é mantido por forças de atração eletrostáticas muito fortes entre íons alternadamente positivos e negativos. Quando o NaCl cristalino é exposto à água, suas moléculas dipolares são fortemente atraídas para os átomos do sal e os retiram do mosaico, formando os íons Na^+ e Cl^- hidratados, em solução. A água também dissolve muitos compostos orgânicos simples que possuem grupos carboxila e amino, os quais tendem a se ionizar pela interação com o solvente [74].

Outra classe de substâncias que podem ser dispersas pela água são as que possuem simultaneamente grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, freqüentemente chamados de compostos *anfipáticos*. Um exemplo simples são os surfatantes (tensoativos), como o brometo de cetil-trimetil-amônio ou brometo de hexadecil-trimetil-amônio, $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{Br}^-$ (CTAB), com várias aplicações em ciências biológicas e em química. O CTAB é um surfactante catiônico extensivamente estudado e usado industrialmente em processos de esterilização, amaciamento de produtos têxteis e muitas outras aplicações [75]. Pelo fato de sua longa cadeia hidrocarbonada ser hidrofóbica e intrinsecamente insolúvel em água, o CTAB apresenta pouca tendência para formar solução verdadeira. Entretanto, o composto facilmente se dispersa em água, formando agregados chamados *micelas*, em que os grupos hidrofílicos (cabeças polares), carregados positivamente, são expostos e interagem com a fase aquosa, enquanto as cadeias hidrocarbonadas (caudas) não-polares e hidrofóbicas, voltam-se para o interior da estrutura [76]. As micelas de CTAB podem conter centenas ou milhares de moléculas, permanecendo uniformemente suspensas na água pelo fato de serem carregadas positivamente e, portanto, com tendência a se repelir.

1.5. Água interfacial

As propriedades da água têm sido estudadas sistematicamente há mais de um século. Contudo, os avanços no conhecimento acerca de sua estrutura ainda são insuficientes, especialmente no que se refere à água interfacial.

No artigo “Water at Interfaces: A Colloid-Chemical Approach” J. Lyklema [94] afirma: “It is obvious that water in the immediate surroundings of a solid surface is different from bulk water. The big questions are: How different is it and how far from the surface do these differences persist?” Infelizmente, o autor não respondeu às questões e as dúvidas persistem.

Heniker, *apud* Drost-Hansen [77], publicou uma revisão, que se tornou clássica, sobre a orientação de líquidos perto de interfaces (“*The depth of the surface zone of a liquid*”), em que a ênfase repousa na existência de ordenamento de longo alcance em muitas interfaces sólido/líquido. Depois disso, argumentos prós e contra o ordenamento da água em interfaces foram apresentados por outros autores. Posteriormente, Derjaguin, também citado por Drost-Hansen [77], sugeriu a existência de alterações significativas na estrutura da água nas proximidades de uma interface particular (quartzo), considerando-as evidências de que a água pudesse existir em estados outros que não aqueles reconhecidos classicamente (sólido, líquido e gasoso).

Durante as últimas décadas, quase toda a informação a respeito do comportamento de moléculas de água nas proximidades de interfaces originou-se de estudos teóricos, especialmente aqueles envolvendo simulações numéricas [78–80], enquanto a pesquisa experimental sobre o assunto esteve limitada. Recentemente, vários estudos vêm sendo desenvolvidos abordando questões relacionadas à organização em camadas (*layering*) e à orientação de moléculas de água em superfícies [81–84]. Medidas de forças obtidas entre duas superfícies imersas em solução aquosa, porém separadas por distâncias moleculares, parecem indicar que as moléculas de água próximas a superfícies sofrem ordenamento tanto de translação quanto de orientação [85, 86]. Estudos de ressonância magnética nuclear também mostram evidências de que moléculas de água em superfícies comportam-se

diferentemente daquelas no interior da massa líquida [87]. Experimentos realizados com as técnicas de SHG (*‘optical second harmonic generation’*) e SFG (*‘optical sum-frequency generation’*) revelaram que moléculas de água perto de uma superfície carregada encontram-se fortemente orientadas [88–91].

A interação entre sítios ativos da superfície de um sólido e moléculas de água induzem alterações na estrutura da água, a qual decorre das pontes de hidrogênio. Portanto, as propriedades da água interfacial são diferentes daquelas observadas longe das interfaces [76, 92, 93].

1.6. Determinação da distribuição da polarização da água interfacial

Em água, muitas superfícies apresentam-se carregadas [21]. As cargas das superfícies provêm da dissociação de componentes superficiais ou da adsorção de íons sobre a superfície. Evidentemente, a eletroneutralidade exige que carga idêntica e de sinal oposto se encontre nas proximidades. A idéia de que essas cargas se distribuem em duas camadas é muito antiga, tendo sido sugerida por Helmholtz em meados do século XIX. Uma das camadas de carga encontra-se presente na superfície e a outra, formada por íons de carga igual e oposta, no líquido adjacente. Dessa imagem simples originou-se a designação ‘dupla camada elétrica’. De acordo com o modelo de Helmholtz, a dupla camada elétrica deveria comportar-se como um capacitor formado por placas planas e paralelas.

Posteriormente, o modelo de Helmholtz foi modificado por G. Gouy, em 1910, e G. Chapman, em 1913 [95, 96]. Trabalhando independentemente, estes pesquisadores propuseram a *‘teoria da camada de difusão’*. Na teoria de Gouy-Chapman, os íons são considerados cargas pontuais sujeitas, simultaneamente, ao movimento térmico e à atração ou repulsão pela superfície carregada. A força eletrostática decorrente da presença das cargas superficiais tende a ordenar os íons, como descreve o modelo de Helmholtz. A agitação térmica, por sua vez, tende a distribuir os íons uniformemente na solução.

Uma situação de compromisso se estabelece entre as duas tendências opostas, resultando em uma camada difusa de íons. Nas proximidades da superfície, prevalece a força eletrostática, a qual diminui com a distância. Portanto, a concentração dos íons de carga oposta à da superfície diminui, também, à medida que dela se afasta, até que, a partir de certa distância, a solução torna-se perfeitamente homogênea. Desse modo, origina-se uma camada difusa de cargas na fase líquida.

Para tornar o modelo de Guoy-Chapman mais realista, Stern [95, 96] abandonou a aproximação de cargas puntiformes. Admitiu, então, que, em consequência de seu tamanho, os íons não chegam até a interface, mas permanecem distanciados, dispostos em posições fixas, num plano de aproximação máxima, também chamado '*plano de Helmholtz externo*'. Assim, o modelo de Stern divide a dupla camada elétrica em duas partes: 1) a dupla camada compacta, compreendida entre a interface e o *plano Helmholtz*; e 2) a dupla camada difusa, que se estende do plano em questão até o interior da solução (*bulk*) e dentro da qual os íons se distribuem de acordo com a teoria de Guoy-Chapman. O modelo de Stern, desse modo, é uma associação dos modelos de Helmholtz e Guoy-Chapman. No modelo de Stern, a dupla camada elétrica é equivalente a dois capacitores ligados em série. O modelo de Guoy-Chapman-Stern, embora apresente deficiências, conduz a resultados satisfatórios [21].

A formação da dupla camada acarreta a presença de um campo elétrico na interface que decresce exponencialmente com o aumento da distância à superfície [13- 15, 21, 97]. As interações eletrostáticas na região da dupla camada elétrica são obtidas através da solução da equação de Poisson-Boltzmann, para a geometria em questão [16].

A existência de repulsões de longo alcance entre superfícies mergulhadas em água, devidas ao ordenamento estrutural de moléculas de água, é fato há muito conhecido. Entretanto, tem havido muita discordância, ao longo dos anos, sobre a extensão efetiva dessa estrutura modificada, se pequena (alguns angstroms) ou grande (alguns milhares de angstroms) [98]. Palmer *et al.* [99] descobriram que, quando um determinado volume de água está contido entre duas placas de mica, sua permissividade elétrica decresce com a espessura da camada líquida. Para espessuras de 5 μm e 2 μm foram obtidos valores de

permissividade elétrica iguais a 20 e 10, respectivamente. Metsik *et al.* [100, 101] mediram valores de ϵ muito baixos para películas de água entre placas de mica, por exemplo: $\epsilon(H_1) = 8$ e $\epsilon(H_2) = 4,5$, para separações $H_1 = 100$ nm e $H_2 = 70$ nm, respectivamente. Bockris e Khan [102] e Kaatz [103] sugeriram que o valor da permissividade elétrica da primeira camada altamente orientada de água é em torno de 4, valor bastante reduzido quando comparado ao do meio líquido ($\epsilon_{bulk} \approx 80$). De acordo com Derjaguin [104] e Churaev *et al.* [105, 106], camadas de água nas quais as moléculas encontram-se altamente orientadas podem atingir espessuras de até 100 nm.

Várias estimativas têm sido apresentadas na literatura para a permissividade elétrica em função da distância, na região da dupla camada elétrica de interfaces sólido/líquido: Gur *et al.* [107] propuseram a inclusão de uma permissividade elétrica variável na equação de Poisson-Boltzmann. A expressão explícita para essa função é dada por

$$\epsilon(E) = n^2 + (\epsilon_{bulk} - n^2)(3/\beta E)L(\beta E), \quad (1.1)$$

sendo $\beta = 5\mu(n^2 + 2)/2k_B T$ e $L(\beta E) = \coth(\beta E) - 1/(\beta E)$ a função de Langevin. Assumindo para a água o momento de dipolo $\mu = 6,18 \times 10^{-30}$ Cm, o índice de refração óptico $n = 1,333$, a permissividade elétrica no *bulk* $\epsilon_{bulk} = 78,5$, à temperatura absoluta $T = 298$ K, sendo a constante de Boltzmann $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$ J/K, então $\beta = 1,42 \times 10^{-8}$ m/V. Admitindo, nas imediações da interface, uma distribuição de campo elétrico com um decaimento exponencial $E(H) = E_0 \exp(-2H/\lambda)$ e usando a densidade superficial de carga da mica $\sigma_{mica} = (1,6 \times 10^{-19} \text{ C})/(4,8 \times 10^{-19}) = 0,333 \text{ Cm}^{-2}$, com a permissividade elétrica do vácuo $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$, então $E_0 = \sigma/2\epsilon_0 = 1,882 \times 10^{10} \text{ NC}^{-1}$, e a variação espacial da permissividade elétrica a partir da interface apresenta um perfil sigmoidal iniciando em $\epsilon(0) = \epsilon_{min} = 2,63$ ($> n^2 = 1,78$) e atingindo o valor máximo $\epsilon_{max} = \epsilon_{bulk} = 78,5$ para um ponto distante ($H > 10$ nm). Na Figura 1.8 são apresentados aspectos da função $\epsilon(H)$ para três valores de coeficiente de decaimento exponencial, $\lambda = 2, 5$ e 10 nm.

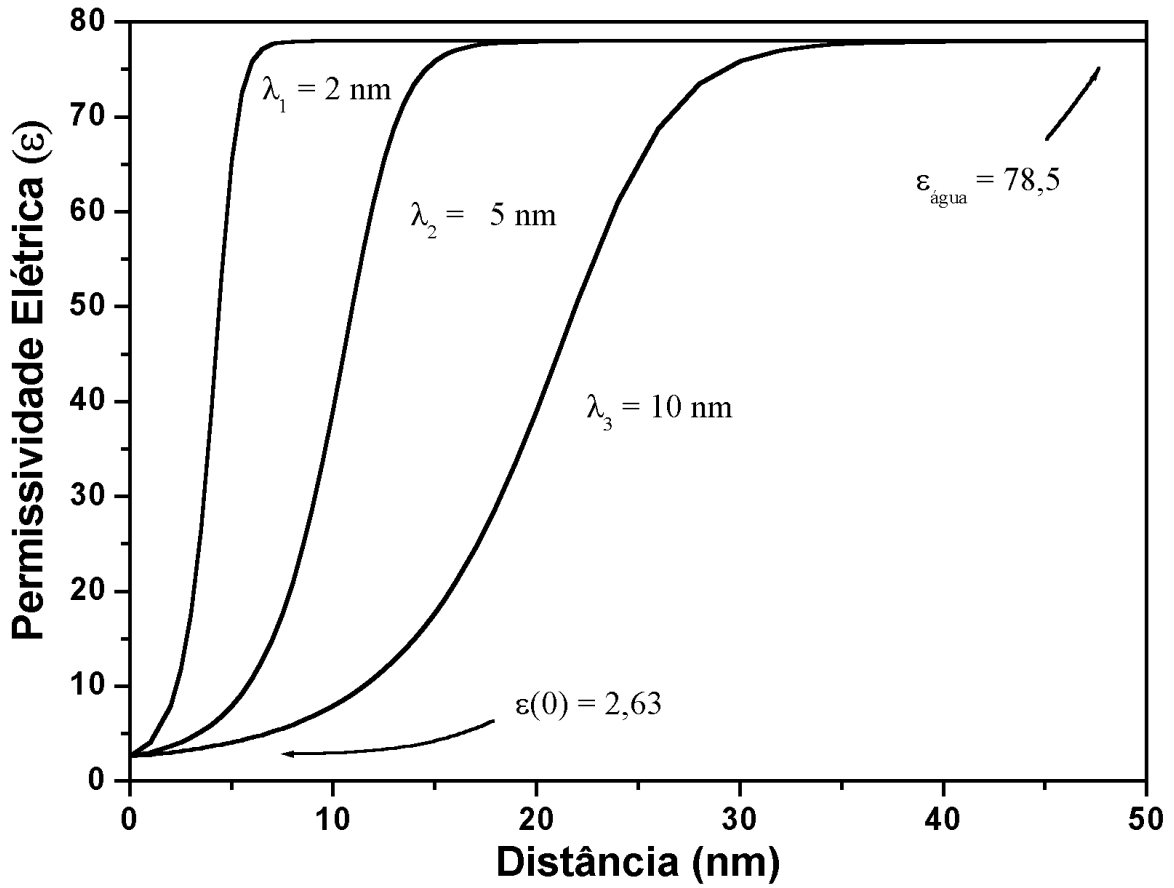


Figura 1.8. Variação espacial da permissividade elétrica $\epsilon(H)$ nas proximidades da interface mica/água calculada a partir da *Equação 1.1*, onde $n = 1,333$, $\epsilon_{bulk} = 78,5$, $\beta = 5\mu(n^2 + 2)/2k_B T = 1,42 \times 10^{-8} \text{ mV}^{-1}$, $\mu = 6,18 \times 10^{-30} \text{ Cm}$, $k_B = 1,38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$, $T = 298 \text{ }^\circ\text{C}$, $L(\beta E) = \coth(\beta E) - 1/(\beta E)$ é a função de Langevin, $E(H) = E_0 \exp(-2H/\lambda)$, e $E_0 = 1,882 \times 10^{10} \text{ NC}^{-1}$, para $\lambda_1 = 2 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 5 \text{ nm}$, e $\lambda_3 = 10 \text{ nm}$.

Podgornik *et al.* [108] propuseram a seguinte expressão para descrever o comportamento da permissividade elétrica em função da distância:

$$\epsilon_{DC}(H) = \frac{\epsilon_{max}}{1 + (\epsilon_{max}/\epsilon_{min} - 1) \exp(-2H/\lambda)} \quad (1.2)$$

Na *Figura 1.9* são apresentadas duas curvas geradas a partir da *Equação 1.2* para $\epsilon_{max} = 79$, $\lambda = 5$ nm e os seguintes valores para a permissividade elétrica na interface: $\epsilon_{min} = n^2 = 1,78$ (linha tracejada) e $\epsilon_{min} = 6$ (linha cheia).

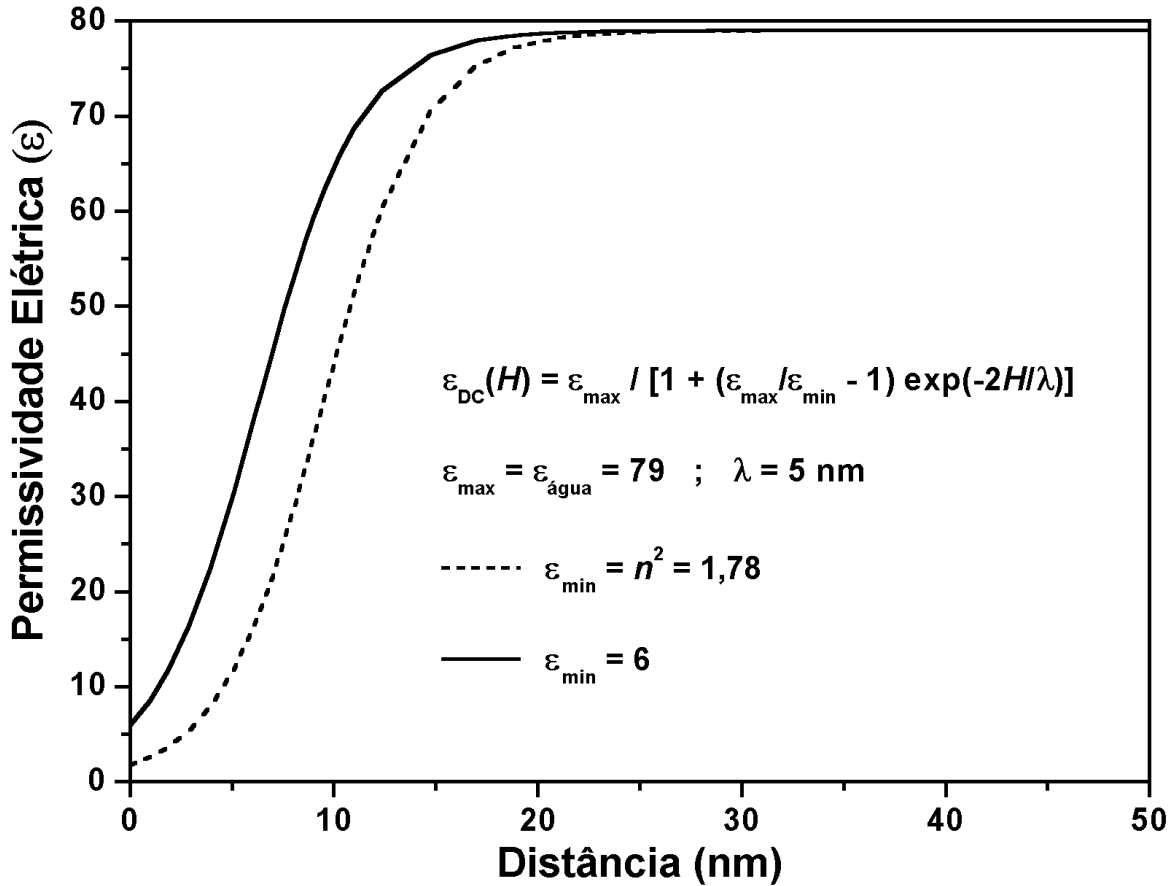


Figura 1.9. Variação espacial da permissividade elétrica $\epsilon(H)$ calculada a partir da *Equação 1.2* para $\epsilon_{max} = 79$, $\lambda = 5$ nm e os seguintes valores para a permissividade elétrica na interface: $\epsilon_{min} = n^2 = 1,78$ (linha tracejada) e $\epsilon_{min} = 6$ (linha cheia).

No passado foram realizadas muitas experiências para medir o índice de refração interfacial da água a frequências ópticas. Recentemente Kékicheff e Spalla [109], utilizando luz visível (538,140 nm e 567,433 nm), mediram o índice de refração para a água confinada entre superfícies de mica, obtendo, independentemente da separação entre elas, sempre o mesmo valor $n = 1,333$. Este resultado é esperado quando o experimento é realizado empregando-se radiação eletromagnética na faixa do visível ($\nu \approx 10^{14}$ Hz). A razão disso é que, para substâncias dielétricas apolares, a menor frequência ν_0 na qual ocorre absorção apreciável situa-se, normalmente, na faixa do visível, ou na região do ultra-violeta. Assim, para $\nu < \nu_0$ a permissividade elétrica ϵ deveria ser igual à permissividade estática e, portanto, satisfazer a relação de Maxwell $\epsilon = n^2$. Entretanto, substâncias polares tanto exibem polarização no visível quanto no infra-vermelho, enquanto substâncias dipolares (como a água) apresentam, também, polarização devido à orientação dipolar.

Quando a água é submetida à uma frequência $\nu \cong 10^8$ Hz ocorre um decréscimo no valor de ϵ , de ~ 80 para $\sim 5,9$. Para $\nu \cong 10^{14}$ Hz, há uma diminuição acentuada para $\epsilon = n^2 \cong 1,8$. O primeiro declínio corresponde à frequência em que a inversão de fase no campo aplicado é rápida demais para que as moléculas o sigam, de modo que os movimentos cooperativos não mais ocorrem (as moléculas passam a comportar-se como se estivessem dissociadas). Para frequências superiores a 10^{14} Hz, os núcleos não podem mais seguir as mudanças de sentido do campo e, assim, a permissividade elétrica residual decorre somente das distorções das camadas eletrônicas, devido à ação do campo externo alternado [95, 102].

A permissividade elétrica da água pode ser calculada a partir da fórmula de Kirkwood [110]

$$\epsilon - n^2 = \frac{\epsilon}{2\epsilon + n^2} \frac{N_0 \mu \mu^*}{\epsilon_0 k_B T}, \quad (1.3)$$

onde $\mu \mu^* = g \mu^2$ e g o fator de correlação de orientação de Kirkwood. Uma vez que $n^2 \ll \epsilon$, então,

$$\epsilon \approx \frac{7(n^2 + 2)^2 g_{\text{água}} \mu^2 N_0}{54 \epsilon_0 k_B T} = 78,4, \quad (1.4)$$

para $g_{\text{água}} = 2,82$, $\mu = 6,18 \times 10^{-30}$ Cm, $N_0 = (N_A \rho / M) = 3,35 \times 10^{28} \text{ m}^{-3}$ ($N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ é o número de Avogadro, $\rho = 1 \text{ g/mL}$ a densidade, $M = 18 \text{ g/mol}$ o peso molecular), $k_B = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ e $T = 298 \text{ K}$. Esse resultado ($\epsilon = 78,4 \gg n^2$) é praticamente idêntico ao valor experimental 78,5.

1.7. Observações de microrganismos por AFM

Estruturas microbianas podem ser investigadas por AFM, em ar ou em líquido. Quando estudadas ao ar, a preparação das amostras é relativamente fácil e as imagens obtidas revelam toda a morfologia da superfície das células. Assim, muitas imagens de amostras biológicas têm sido obtidas com sucesso, em trabalhos como os que se seguem exemplificados. Butt *et al.* [111] obtiveram imagens de *Halobacterium halobium*, capazes de revelar estruturas com dimensões da ordem de 10 nm, ainda que sem identificá-las. Gunning *et al.* [112] estudaram a morfologia de biofilmes de *Pseudomonas putida* e Kasas *et al.* [3] investigaram a morfologia de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, após as células terem sido tratadas com antibiótico. Johansen *et al.* [113] investigaram o efeito da protamina na morfologia das células de *E. coli* e *B. subtilis*. Braga e Ricci [114] examinaram alterações morfológicas e superficiais, induzidas por antibiótico, em *E. coli*. Mais recentemente, Camesano *et al.* [115] investigaram alterações superficiais causadas por fixadores químicos em *Pseudomonas stutzeri* e *Burkholderia cepacia*.

Já a obtenção de imagens em meio líquido requer a firme adesão dos microrganismos aos substratos — caso contrário, poderão ser deslocados pelo *tip* ou mesmo removidos da região que se quer visualizar, tão logo se inicie o processo de varredura [116–118].

1.8. Observações de membranas de surfatante, usando AFM

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos, usando AFM, com o intuito de obter imagens de estruturas maleáveis [66, 119–122]. O mapeamento de estruturas com tais características, como surfatantes ou material biológico, pode levar à inversão no contraste de imagem. De acordo com o contraste padrão dos AFM, as estruturas altas são exibidas como claras e as estruturas baixas como escuras. Em caso de inversão, as áreas claras passam a corresponder às estruturas baixas e vice-versa. Recentemente, Teschke *et al.* [40] e Ceotto *et al.* [41] trabalharam com membranas fluidas de surfatante, em meio líquido, investigando o efeito da força aplicada pelo *tip*, durante o processo de varredura, na formação do contraste de imagem. Estruturas auto-organizadas, formadas sobre substratos de mica imersos em soluções do tensoativo CTAB (brometo de cetil-trimetil-amônio — surfatante catiônico) em concentrações diversas, foram mapeadas e caracterizadas através da análise de curvas de força.

2. Metodologia

2.1. Observações de estruturas de microrganismos, por AFM

Um breve ensaio do uso AFM para observar materiais biológicos ao ar foi desenvolvido, usando esporos de *Bacillus cereus* e células vegetativas de *Bacillus subtilis* e *Listeria innocua*.

Células de *B. cereus* foram inoculadas em meio sólido apropriado à esporulação e, após cinco dias, a massa de crescimento foi suspensa em água destilada e submetida repetidamente à centrifugação, a 5.000 g, por 20 min a 4°C, para separar e concentrar os esporos. Desta forma, obtiveram-se suspensões com $\geq 98\%$ de esporos, em populações superiores a 10^{10} por mL. As suspensões de células de *B. subtilis* e *L. innocua* foram obtidas por cultivo em meio líquido.

As estruturas desses microrganismos foram examinadas aderidas a cupons de mica e silício (discos com ~1 cm de raio), e cupons de vidro (quadrados com ~1 cm de lado). As observações foram feitas à temperatura ambiente (entre 22 e 25°C), sendo as imagens obtidas segundo três diferentes protocolos de preparação das amostras (a, b e c, a seguir). Em todos os casos, depois dos procedimentos de contaminação (por imersão ou gotejamento), os cupons eram lavados com água destilada e deixados secar em ambiente asséptico, à temperatura ambiente.

- (a) Segundo o primeiro procedimento, com o propósito de obter superfícies limpas e hifrofílicas, os cupons de mica foram clivados imediatamente antes de receber cada suspensão. Os cupons de silício foram mergulhados em solução de ácido fluorídrico por cerca de 1 minuto, para que as superfícies se tornassem hidrofóbicas e, em seguida, eram lavados com água Milli-Q. Em seguida, os cupons de mica e silício foram impregnados por gotejamento com suspensões de esporos de *B. cereus*

(> 10⁹ esporos/mL). As observações foram feitas entre um e sete dias, após o preparo do material.

- (b) No segundo procedimento, cupons esterilizados de vidro e silício foram simultaneamente colocados em frascos contendo 100 mL de meio para cultivo bacteriano, inoculados com células de *B. subtilis* por tempo suficiente para que ocorresse multiplicação e adesão do microrganismo (aproximadamente 18 h). Em seguida, os cupons eram lavados com água bi-destilada para remover as células não aderidas. Após secagem, o material ficou resguardado de contaminação até o momento da observação em AFM, dentro de aproximadamente 48 horas.
- (c) No terceiro caso, cupons de vidro foram colocados em frascos contendo suspensões de células de *L. innocua*, pré-cultivadas em meio líquido. Após intervalos compreendidos entre 12 e 18 h de contato com os microrganismos, os cupons foram retirados e lavados com água bi-destilada, de forma a manter somente as células bem aderidas. Neste caso, a observação deu-se imediatamente após a secagem dos cupons.

2.2. Medidas de curvas de força

As experiências foram realizadas utilizando-se um AFM comercial, Topometrix TMX2000. Foram usados *tips* diversos, imersos em líquidos, para medir a interação entre *tip* e substrato. O movimento do *cantilever* foi monitorado por um sensor de deflexão convencional que usa um detector de quatro quadrantes capaz de medir forças tanto verticais como laterais.

Uma célula especial foi construída para executar observações em meio líquido. A célula é composta de quatro partes (*Figura 2.1*): 1) um suporte externo de níquel, 2) um cilindro de Teflon™, que constitui a parede lateral interna, 3) a parte inferior, que constitui o próprio substrato, trocado a cada experimento e 4) um anel de vedação de Viton™ colocado entre a lateral de Teflon™ e o substrato. A fim de evitar que o feixe de laser cruze a interface ar-líquido, geralmente curva, um novo suporte para *cantilevers*, incorporando

uma placa de vidro, também foi construído (*Figura 2.1*). A célula era fixada sobre o ímã localizado na parte superior do *scanner* que a deslocava nas direções *x*, *y*, e *z* sob o *tip* estacionário.

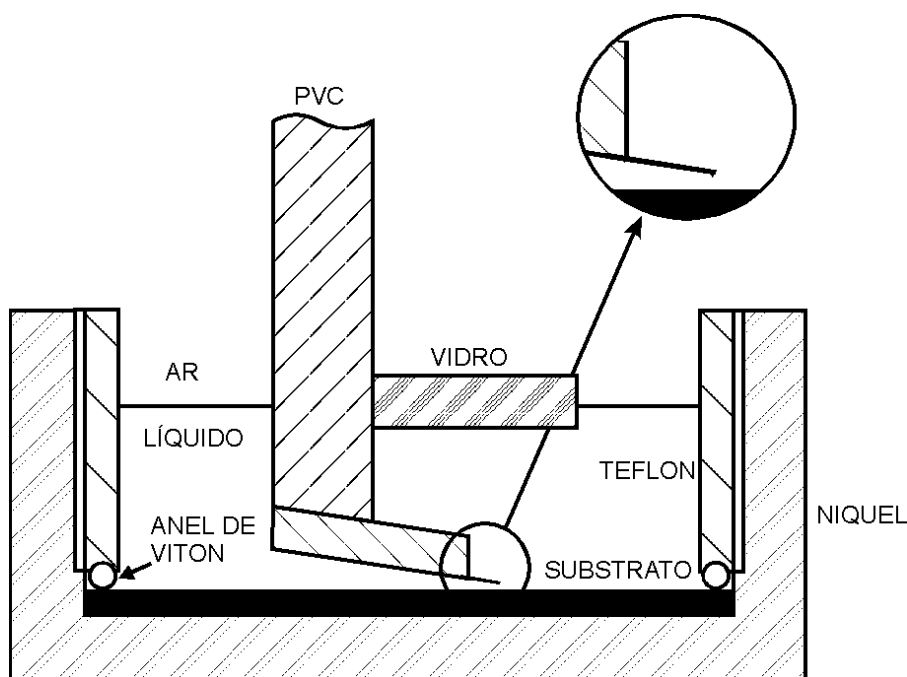


Figura 2.1. Diagrama esquemático da célula construída para a observação de amostras em meio líquido.

Foram utilizados diversos líquidos:

- solventes - água (Milli-Q, resistividade: 18 MΩ·cm a 25°C), dimetilsulfóxido (DMSO) e formamida;
- soluções aquosas - formadas com os sais NaCl, KCl, LiCl, MgCl₂ e surfatante (tensoativo) catiônico CTAB [C₁₆H₃₃(CH₃)₃N⁺Br, brometo de cetil-trimetil-amônio, concentração micelar crítica, *cmc* ≈ 0.9 mM].

Imediatamente após a fixação de uma superfície de mica recém clivada no interior da célula, a mesma era montada sobre o *scanner* e, em seguida, preenchida com um desses líquidos (~0,41 mL). As experiências foram realizadas à temperatura ambiente (~22 °C).

Com relação ao CTAB, sua adsorção iniciava-se após a introdução da solução na célula líquida, ficando o *tip* e a mica recém-clivada imersos nessa solução antes da operação.

A estrutura do surfatante foi investigada medindo-se a força que age sobre o *tip* ao penetrar a camada adsorvida na interface entre a solução aquosa e o substrato. Para isso, foram realizadas observações topográficas e obtidas curvas de força, a fim de caracterizar camadas estruturalmente diferentes.

Substrato (mica)

O cristal de mica $[KAl_2(Si_3Al)O_{10}(OH)_2]$ é freqüentemente usado como substrato, em AFM. Sua escolha deve-se ao fato de possuir uma superfície altamente lisa, em nível molecular, o que possibilita a obtenção de imagens com boa resolução. Em princípio, a mica representa um substrato ideal para a captura de imagens de moléculas orgânicas adsorvidas ou depositadas, isto porque as imagens podem ser interpretadas sem os inconvenientes decorrentes de rugosidades superficiais. Entretanto, o aproveitamento das propriedades ímpares da mica como substrato — especialmente ao se pretender a obtenção de imagens não-destrutivas — requer um conhecimento dos fatores que determinam as interações entre o *tip* e a mica.

A mica apresenta-se sempre carregada negativamente em água e em soluções eletrolíticas [123]. Quando colocada em água, assume-se que o mecanismo para a formação da dupla camada elétrica é devido tanto à dissolução de íons K^+ quanto à troca de íons K^+ por íons H^+ ou H_3O^+ . Quando se adiciona CTAB à água, os íons K^+ são também substituídos por $C_{16}H_{33}(CH_3)_3N^+$ [40, 41].

Tips (ou sondas, ou ponteiras)

Foram utilizados quatro tipos diferentes de *tips*: de nitreto de silício (Si_3N_4), de silício (Si) e *tips* metálicos, cobertos com cobalto (Co) ou platina-irídio (Pt-Ir).

Os *tips* de nitreto de silício (Microlever™, type B) foram adquiridos da ThermoMicroscopes. Esses *tips* eram montados em *cantilevers* bastante flexíveis, com constante elástica nominal de 0,03 N/m, apresentando ângulo de ápice de 18° e 3 μm de comprimento (Figura 2.2). As aferições das constantes de mola dos *cantilevers* foram realizadas segundo método desenvolvido por Sader *et al.* [124] e revelaram valores semelhantes (< 3%) aos fornecidos pelo fabricante.

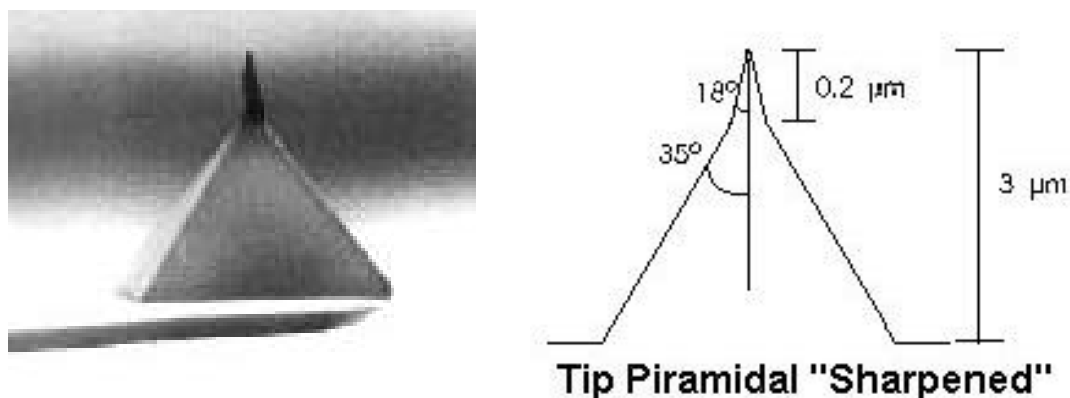


Figura 2.2. Tip piramidal ‘Sharpened’ (Microlevers™): (a) Fotografia de microscopia eletrônica [125]; (b) Diagrama esquemático.

Em solução aquosa, para uma faixa de variação de pH razoavelmente extensa (pelo menos entre 6 e 8,5), a superfície hidrolisada do *tip* comercial de Si_3N_4 apresenta-se neutra ou ligeiramente carregada negativamente [23], permitindo supor que, em água pura, a densidade da carga superficial do *tip* é muito menor que a da mica ($\sigma_{\text{Tip}} \ll \sigma_{\text{Mica}}$).

Medidas de força entre um *tip* de nitreto de silício e uma superfície de mica, realizadas após 1, 24 e 36 horas de imersão em água, forneceram resultados idênticos, permitindo concluir que não há, pelo menos nesse intervalo de tempo, ‘envelhecimento’ do *tip*.

Os *tips* de silício e os metálicos apresentavam ângulo de ápice de 12° e 4 μm de comprimento (Figura 2.3). Esses *tips* (Ultralevers, ThermoMicroscopes) eram montados em *cantilevers* mais rígidos, com os seguintes valores nominais de constante de mola: 0.26 N/m para os *tips* de silício e 3.3 N/m para os *tips* metálicos.

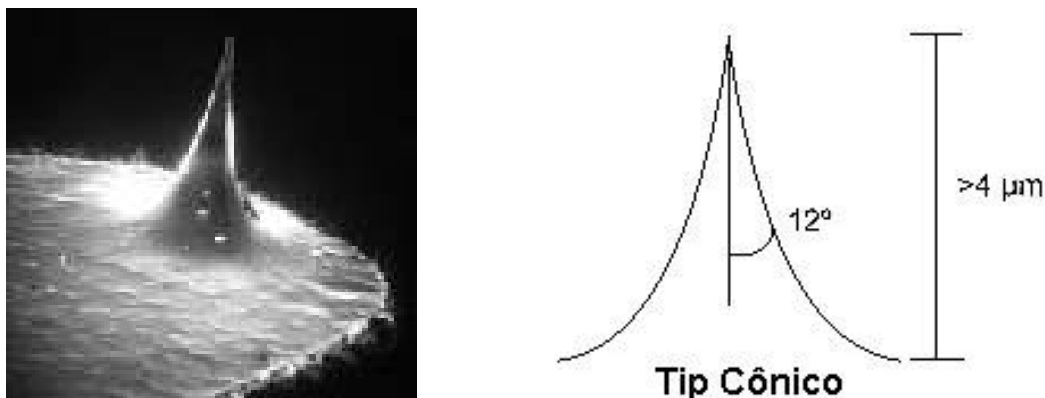


Figura 2.3. *Tip* cônico (Ultralevers™): (a) Fotografia de microscopia eletrônica [125]; (b) Diagrama esquemático.

Os raios dos *tips* de nitreto de silício foram caracterizados comparando as dimensões das estruturas de silício poroso medidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e AFM [126]. Este procedimento permitiu estimar possíveis distorções das imagens obtidas com o AFM devidas ao tamanho finito do raio do *tip*. Os valores estimados estão de acordo com os fornecidos nos prospectos do fabricante (ThermoMicroscopes). Dentre os *tips* selecionados, os de Si_3N_4 apresentaram raio de curvatura de $\sim 5 \text{ nm}$, os de Si $\sim 10 \text{ nm}$ e os “metálicos” (Pt-Ir e Co) $\sim 25 \text{ nm}$.

2.3. Cálculo das forças atrativa e repulsiva resultantes da interação entre um *tip* cônico neutro e uma superfície plana de mica carregada negativamente, imersos em um meio líquido

2.3.1. Teoria *DLVO*

De acordo com a teoria *DLVO*, a força de interação total entre duas superfícies imersas em um meio líquido pode ser considerada como a soma do componente atrativo de vdW (F_{vdW}) e um componente eletrostático repulsivo ou atrativo (F_e).

- **Força atrativa de vdW**

Os cálculos para determinação da interação de vdW devem-se adequar às combinações ‘*tip*-meio-amostra’, em razão das diferentes morfologias dos corpos interagentes (*tip* e amostra) e dos diferentes meios de imersão [127].

A energia de interação entre um *tip* cônico com extremidade esférica e uma superfície plana, associada à atração de vdW, foi calculada a partir da expressão:

$$W(H, T) = -\frac{2A(H, T)}{(n-2)(n-3)} \times (W_{SE} + W_{TC}) \quad (2.1)$$

onde $A(H, T)$ é o coeficiente de Hamaker, H é a distância a partir da superfície, T é a temperatura absoluta, n é um número inteiro, sendo:

$$W_{SE} = \int_{z=0}^{z=R} \frac{(2R-z)z}{(H+z)^{n-3}} dz$$

e

$$W_{TC} = \int_{z=0}^{z=(3\kappa^{-1}-R-H)} \frac{[R+(\tan \alpha)z]^2}{(H+z)^{n-3}} dz$$

termos que correspondem às contribuições referentes à extremidade inferior (semi-esférica - W_{SE}) e ao corpo do *tip* (tronco de cone - W_{TC}).

A força atrativa de vdW, $n = 6$ [17], foi calculada a partir da expressão:

$$F_{vdW}(H, T) = -\frac{\partial W(H, T)}{\partial H}. \quad (2.2)$$

• O coeficiente de Hamaker

Os cálculos para a determinação do coeficiente de Hamaker foram baseados na aproximação empreendida por Vassilieff e Ivanov, esboçada por Nir e Vassilieff [127], que simplificaram os resultados obtidos a partir da teoria macroscópica para uma interação efetiva entre dois corpos denotados por 1 e 2, imersos em um terceiro meio dielétrico 3. O coeficiente de Hamaker foi reduzido, então, a

$$A(H, T) = A_{v=0}(T) + A_{12}^*(H) - A_{13}^*(H) - A_{23}^*(H) + A_{33}^*(H) \quad (2.3)$$

onde

$$A_{v=0}(T) = \frac{3}{4} k_B T \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[\left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon_3}{\epsilon_1 + \epsilon_3} \right) \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \right) \right]^n$$

e

$$A_{ij}^*(H) = \frac{3\hbar}{4\pi} \frac{a_i a_j}{b_i + b_j} \rho_{ij}(H)$$

$$a = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1}$$

$$\rho_{ij}(H) = 1 - \left[\frac{r_{ij}(H)}{1 + r_{ij}(H)} \right]^3$$

$$b = -\frac{1}{\xi} \ln \left\{ \frac{1}{a} \left[\frac{\epsilon(i\xi) - 1}{\epsilon(i\xi) + 1} \right] \right\}$$

$$r_{ij}(H) = \frac{2 \langle \epsilon_3^{1/2} \rangle H}{c(b_i + b_j)}$$

$$\epsilon(i\xi) = \frac{1 + 2\beta(i\xi)}{1 - \beta(i\xi)}$$

$$\langle \epsilon_3^{1/2} \rangle = \frac{1}{2} (n_3 + 1)$$

$$\beta(i\xi) = \frac{C_{UV}}{1 + \left(\frac{\xi}{\omega_{UV}} \right)^2}$$

O primeiro termo da *Equação (2.3)*, $A_{v=0}(T)$, fornece a energia de interação de vdW à frequência zero, sendo ϵ_1 , ϵ_2 e ϵ_3 as permissividades elétricas dos três meios. Os termos seguintes, $A_{ij}^*(H)$, fornecem a energia de dispersão em função dos parâmetros a e b , os quais são obtidos a partir do índice de refração n dos meios.

Os coeficientes obtidos para água, dimetilsulfóxido e formamida, em função da distância, foram calculados a partir da *Equação (2.3)* e são apresentados na *Figura 2.4*.

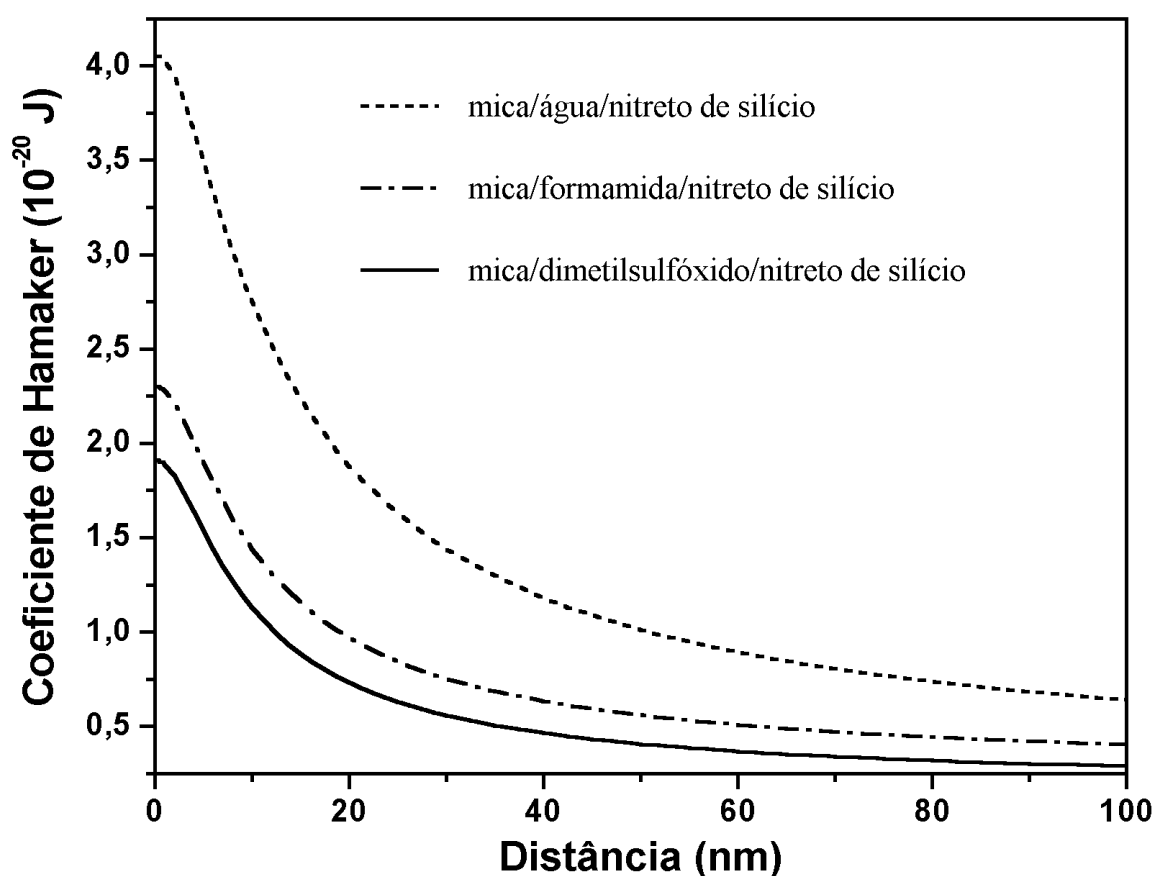


Figura 2.4. Coeficiente de Hamaker em função da distância entre uma superfície de mica e um *tip* de Si_3N_4 , imersos em água (linha tracejada), formamida (linha tracejada e pontilhada) e DMSO (linha cheia).

- **Força eletrostática repulsiva**

A força eletrostática que age em um *tip* imerso em uma solução aquosa pode ser obtida integrando o tensor de Maxwell de campo elétrico e a pressão osmótica sobre toda a interface *tip*/eletrólito ou usando o método da energia livre [22]. Mas, segundo Butt [128], o cálculo numérico exato do tensor do campo elétrico e a pressão osmótica sobre a interface é um procedimento longo, complicado e inconveniente de se usar. Para contornar esses problemas Parsegian e Gingell [129] deduziram uma expressão analítica simples para a força eletrostática (por unidade de área) entre duas superfícies planas semi-infinitas e com diferentes densidade de carga. Posteriormente, Butt [128] deduziu uma expressão para cálculo da força eletrostática entre *tips* cônicos e superfícies carregadas de mica obtendo um resultado proporcional a $\exp(-2\kappa H)$, onde H é a separação entre o *tip* e o substrato e κ^{-1} o comprimento de Debye-Hückel.

A dupla camada elétrica é caracterizada pela distribuição de carga de uma superfície isolada ($\sigma = \epsilon\epsilon_0\kappa\phi_0^1$) e um comprimento de Debye-Hückel dado por

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_{\text{bulk}} k_B T}{e^2 \sum n_i^\infty Z_i^2}}, \quad (2.4)$$

onde e é a carga elementar, n_i^∞ é a uma densidade iônica da solução e Z_i representa a valência. O somatório refere-se a todos os íons presentes.

O termo repulsivo foi calculado a partir da expressão analítica deduzida por Butt [128], para um *tip* cônico com extremidade esférica, a qual, para $\sigma_{\text{Tip}} \ll \sigma_{\text{Mica}}$, é dada por

¹ Esta equação é idêntica à de um capacitor de placas paralelas separadas por uma distância $d = \kappa^{-1}$, $\sigma = \epsilon\epsilon_0 E = \epsilon\epsilon_0 \phi_0 / d$, tendo densidades de carga $\pm\sigma$ e diferença de potencial ϕ_0 . Essa analogia com um capacitor deu origem ao nome *dupla camada difusa* para descrever a atmosfera iônica próxima a uma superfície carregada, cujo comprimento característico ou “espessura” é o comprimento de Debye, $1/\kappa$.

$$F_e = \frac{\pi \sigma_{\text{Mica}}^2}{\epsilon_0 \epsilon \kappa^2} \times e^{-2\kappa H} \times G \quad (2.5)$$

sendo G o fator geométrico dado por $G = 2\kappa R - 1 + e^{-2\kappa R} \times e^{2\kappa R \sin \alpha} \times (1 + \tan^2 \alpha)$, onde R é o raio da extremidade esférica do *tip* e α o ângulo de ápice. O ajuste da curva (gerada pela Equação 2.5) aos pontos experimentais foi obtido variando-se os parâmetros κ e σ_{Mica} .

• Força resultante

A combinação das Equações (2.2) e (2.5) resulta na expressão

$$F = F_{\text{vdW}} + F_e \quad (2.6)$$

que é a essência da teoria *DLVO*. As forças atrativas, de vdW, e as repulsivas, eletrostáticas, foram calculadas com o auxílio do programa Mathematica 4 e ajustadas às curvas experimentais obtidas para a água, o DMSO e a formamida.

2.3.2. Força de troca dielétrica (FTD)

Primeiramente, com o objetivo de elucidar qualquer dúvida que porventura possa existir, com relação a uma possível interferência do *cantilever* nas medidas, faz-se necessária uma análise das forças que nele agem.

Nas medidas que serão apresentadas foram empregados *cantilevers* de silício com as superfícies superiores cobertas por uma fina camada de ouro altamente refletiva (espelho). Em decorrência disso — lado superior de ouro e inferior de silício — há uma diferença de carga entre as superfícies, que poderia determinar deformação ou deflexão do *cantilever*. Contudo, tal deflexão estaria presente durante todo o processo de aproximação, adicionando sempre uma força extra à linha de referência (linha de base). Presume-se que a influência da carga do *cantilever* na variação da força experimentada pelo *tip* ao aproximar-se do substrato seja insignificante, uma vez que a espessura da dupla camada elétrica da mica imersa em água Milli-Q é ~100 nm e o comprimento do *tip*, que limita a distância

entre o substrato e o *cantilever*, é $\geq 3 \mu\text{m}$. Conseqüentemente, somente uma pequena parte do *tip* — e não o *cantilever* — terá penetrado na região da dupla camada elétrica.

- **Modelagem e cálculo da *FTD***

A força que age sobre o *tip* na região da dupla camada elétrica foi tratada como decorrente da substituição (troca) da permissividade elétrica do líquido interfacial pela do *tip*.

É suposto, inicialmente, que o campo elétrico decorrente de uma distribuição fixa de cargas, exista em um meio de permissividade elétrica tal que pode ser uma função do tipo $\epsilon_{\text{DC}}(H)$. Supondo constante a distribuição de carga, a densidade de energia eletrostática pode ser expressa como uma função do vetor deslocamento elétrico [13, 15, 39, 130]. Assim, por hipótese, com as fontes fixas nas suas posições, introduz-se um corpo dielétrico de volume V_{Tip} e permissividade elétrica ϵ_{Tip} no campo, assumindo, também, que a forma do *tip* não influencia este campo.

Segundo Born, citado por Butt [128], é energeticamente favorável para uma superfície carregada estar cercada por um meio com alta permissividade elétrica como, por exemplo, água. Ao penetrar na região da dupla camada o *tip* substitui uma parte de água equivalente ao seu volume e, se o material que o constitui tiver uma permissividade elétrica inferior à da água ($\epsilon_{\text{Tip}} < \epsilon_{\text{água}}$), a configuração tornar-se-á energeticamente desfavorável. Conseqüentemente, nessa região, o *tip* será repellido. Com base nestes argumentos, *tips* condutores, que têm a permissividade estática ‘infinita’ ($\epsilon_{\text{Tip}} \gg \epsilon_{\text{água}}$), serão atraídos pela superfície carregada.

Com base nos pressupostos acima, foi deduzida uma expressão analítica simples para a força eletrostática.

Para estimar a intensidade da *FTD* supôs-se que a troca de energia envolvida na imersão do *tip* na região da dupla camada é dada pelo produto entre o volume submerso do *tip*, a variação da permissividade elétrica e o quadrado do vetor deslocamento elétrico. Para

efeito de cálculos, a extremidade do *tip* foi definida como tendo a forma de um tronco de cone cuja área da extremidade plana é dada por πR^2 (vide *Figura 2.5*). O diagrama esquemático de um tronco de cone comparado a um cone com extremidade esférica é mostrado no destaque da *Figura 2.5*, com a diferença entre as seções transversais indicada pela área tracejada. Uma vez que a força experimentada pelo *tip* está associada à imersão do mesmo na região do campo elétrico gerada pela mica, e sendo a espessura da dupla camada ~ 100 nm, o efeito devido a um *tip* com extremidade esférica com raio de 5 nm é insignificante, comparado a outro de extremidade plana com o mesmo raio. Cálculos numéricos dão suporte a essa afirmação.

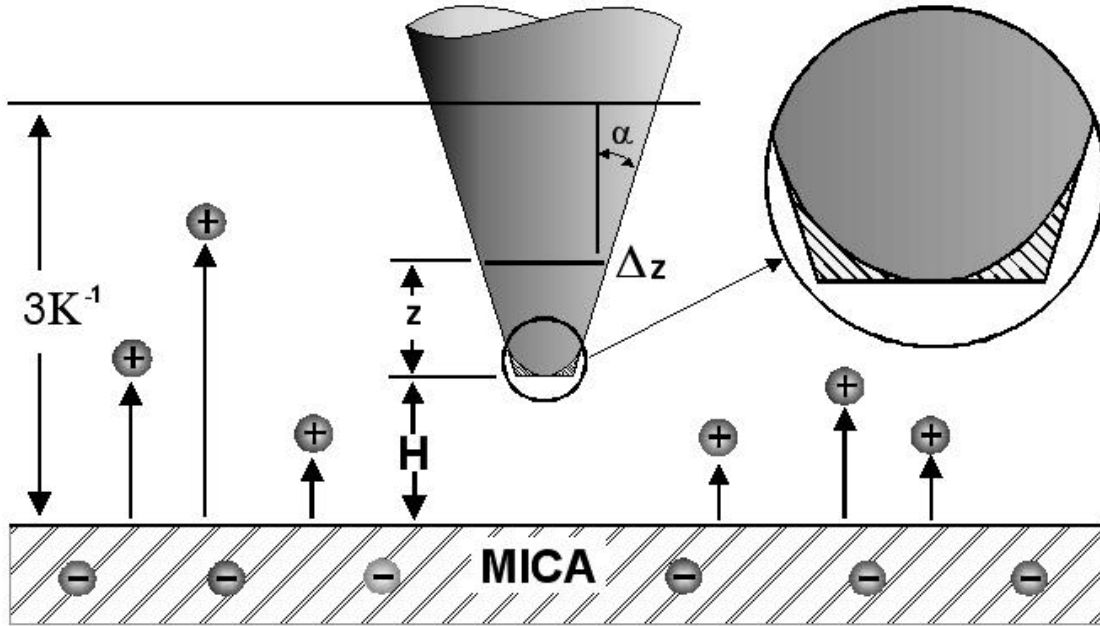


Figura 2.5. *Tip* com formato de tronco de cone, com área da extremidade inferior plana πR^2 , imerso na região da dupla camada elétrica. H representa a distância entre o substrato e a extremidade inferior do *tip*, z a variável de integração do elemento de volume Δz e α o ângulo de ápice.

No destaque, para efeito de comparação, é apresentado o diagrama esquemático da superposição de dois *tips* cônicos com extremidades inferiores plana e esférica. A diferença é indicada pela região tracejada.

Supõe-se, também, que o *vetor deslocamento elétrico* (\vec{D}) — cuja amplitude (D_0) é determinada pela distribuição de carga na superfície de mica, usando a lei de Gauss — apresente um decaimento exponencial nas imediações da interface. O diagrama esquemático da imersão do *tip* na região dupla camada é exibido na *Figura 2.5*, onde z é a variável de integração do volume do *tip* (tronco de cone) e H é a distância entre a superfície de mica e a extremidade inferior do *tip*. O elemento de volume (dv) do *tip* imerso na região da dupla camada é dado por $dv = \pi [R + (\tan \alpha) z]^2 dz$ e a variação da energia elétrica, decorrente da troca da permissividade elétrica da dupla camada (ϵ_{DC}) pela do *tip* (ϵ_{Tip}), é calculada integrando-se a expressão da energia

$$\Delta W = \frac{1}{2\epsilon_0} \int_0^{10\kappa^{-1}-H} \left[\frac{1}{\epsilon_{DC}(z)} - \frac{1}{\epsilon_{Tip}} \right] D^2(z) \pi [R + (\tan \alpha) z]^2 dz \quad (2.7)$$

sobre o volume do *tip* imerso na região da dupla camada. A força experimentada pelo *tip* é obtida calculando-se o gradiente da expressão da energia, isto é,

$$F_z = -\text{grad } \Delta W . \quad (2.8)$$

3. Resultados e Discussão

3.1. Observações de microrganismos, usando AFM

Uma vez que o propósito desta etapa do estudo foi realçar as possibilidades oferecidas pela técnica de AFM, os resultados restringir-se-ão a exibição de imagens, sem dados numéricos.

Na *Figura 3.1* são apresentadas imagens de *L. innocua*, bactéria em forma de bastonete, aderida em cupom de vidro, possivelmente em plena divisão celular.

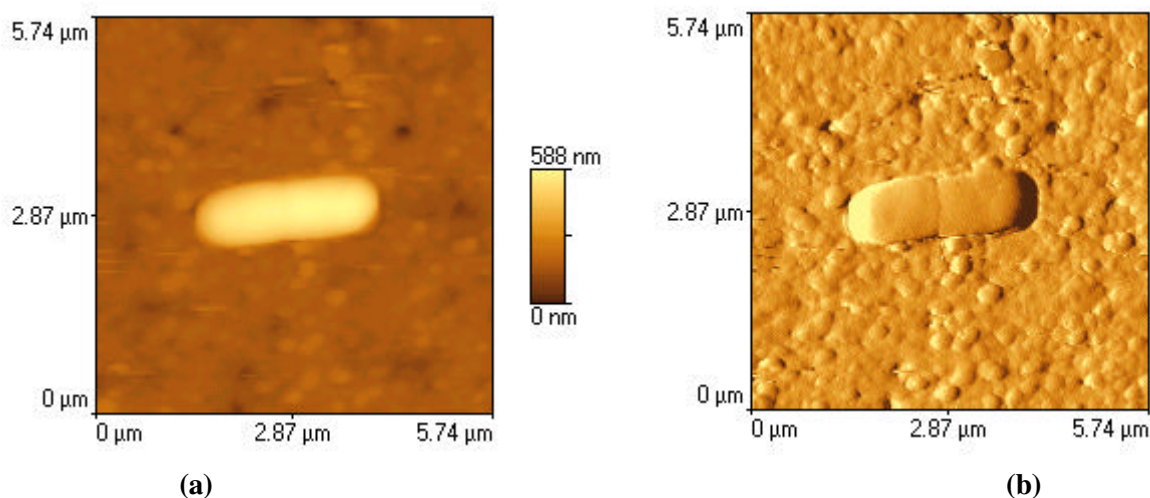
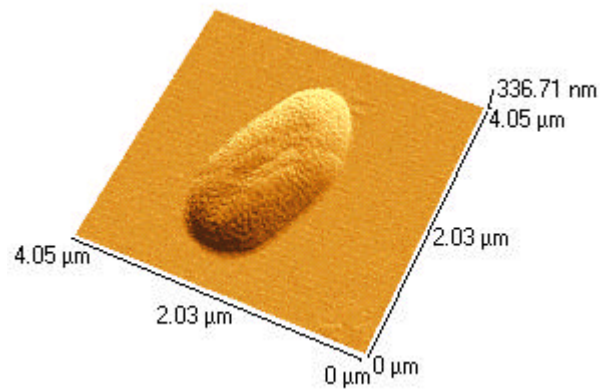
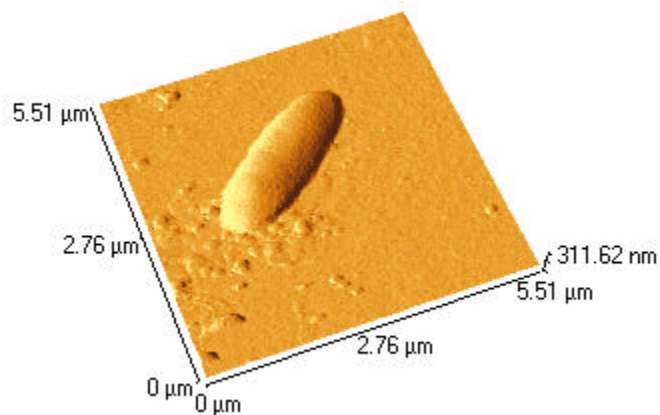


Figura 3.1. Imagens de *L. innocua* obtidas no modo de contato, ao ar. Vista de topo (a) com representação em função da altura e (b) com “iluminação” lateral.

Nas Figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5 são apresentados imagens de células de *B. subtilis* aderidas em cupons de vidro e de silício.

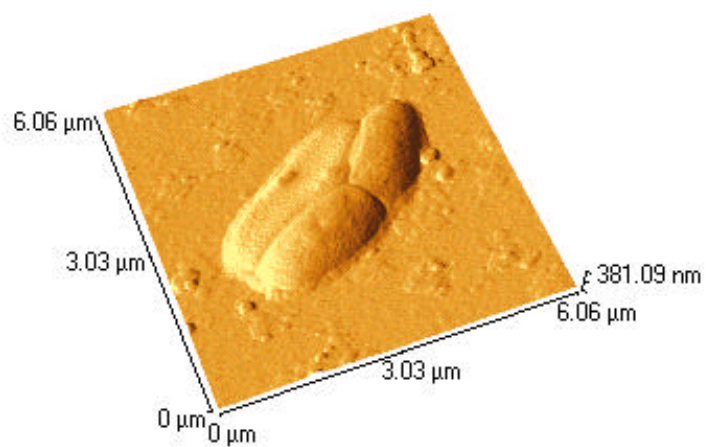


(a)

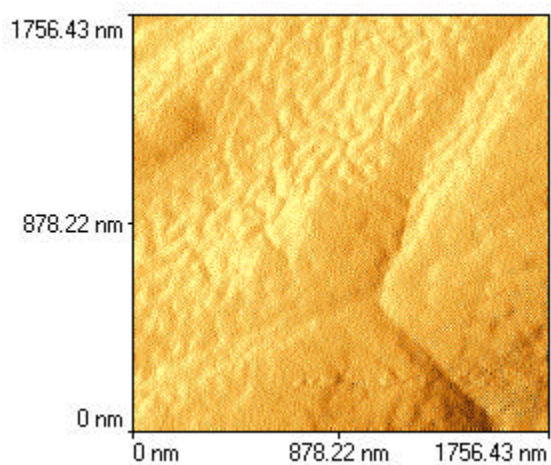


(b)

Figura 3.2. Imagens de células de *B. subtilis* aderidas em cupons de (a) silício e (b) vidro, obtidas no modo de contato, ao ar.

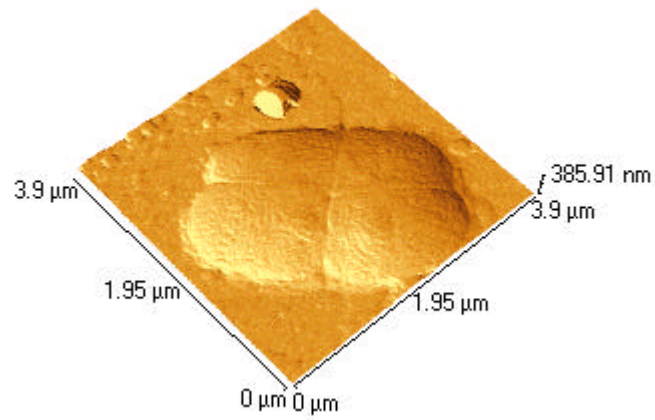


(a)

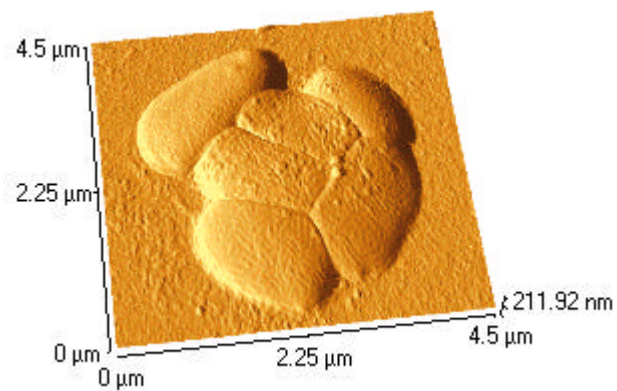


(b)

Figura 3.3. Imagens de células de *B. subtilis* aderidas em cupom de vidro, obtidas no modo de contato, ao ar (a). Em (b), detalhe da região de contato entre células.



(a)



(b)

Figura 3.4. Imagens de aglomerados de células *B. subtilis* aderidas em cupons de vidro, ao ar, obtidas no modo de contato (a) e não contato (b).

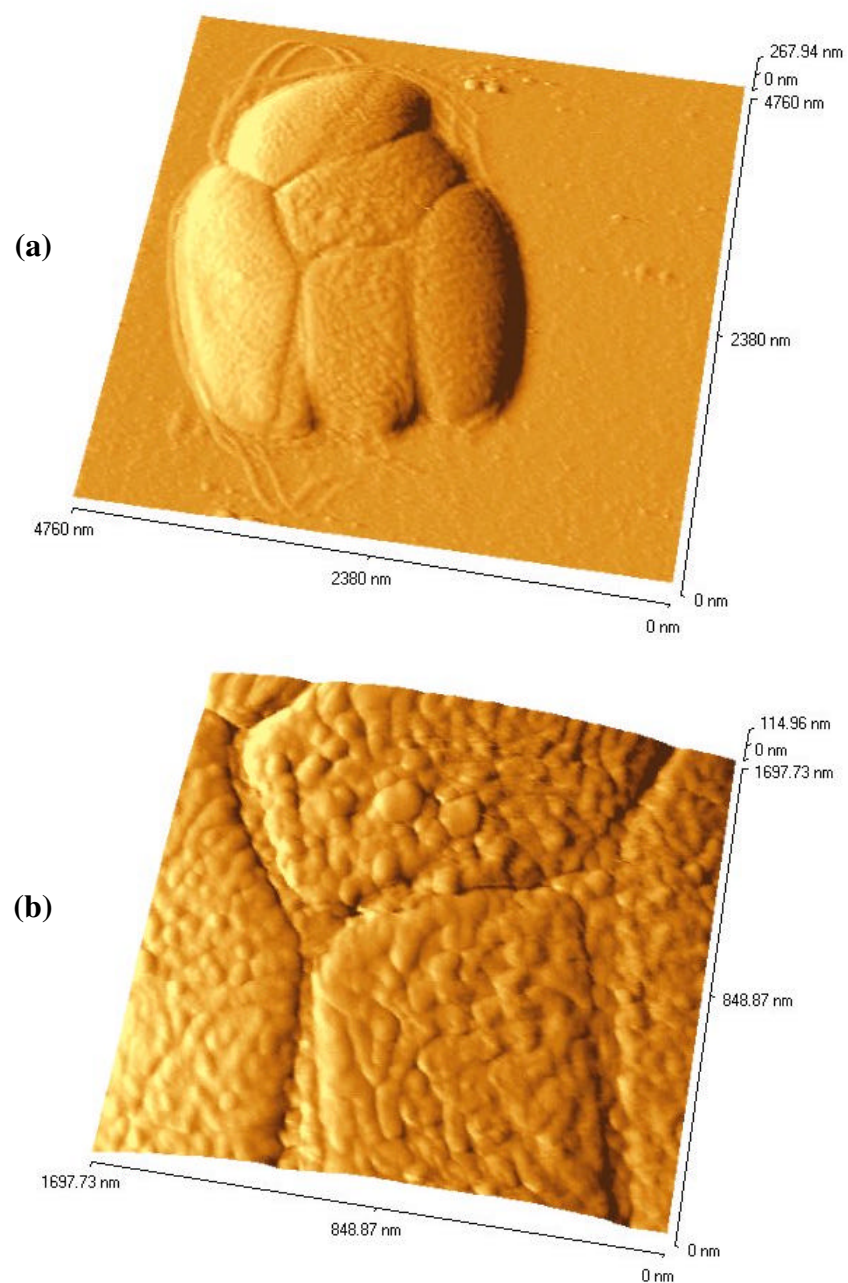


Figura 3.5. Imagens de aglomerado de células de *B. subtilis* aderidas em cupons de silício, ao ar, obtidas no modo de contato (a). Em (b), detalhes da superfície rugosa e da região de contato entre células.

As Figuras 3.6 e 3.7 são imagens de esporos de *B. cereus* em cupons de mica e de silício.

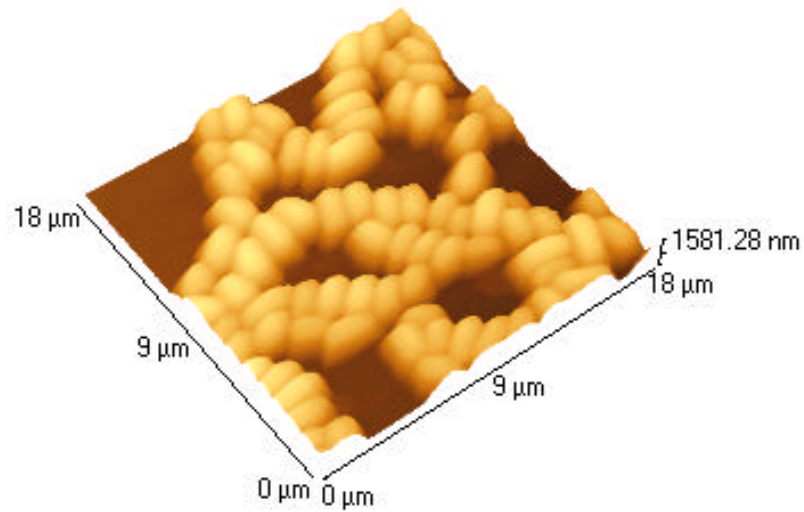


Figura 3.6. Imagens de esporos de *B. cereus* em cupons de mica, obtidas no modo de contato, ao ar.

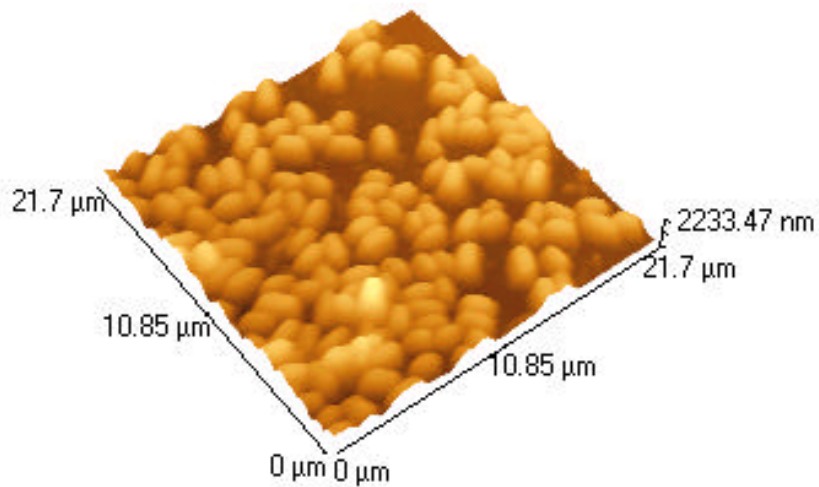
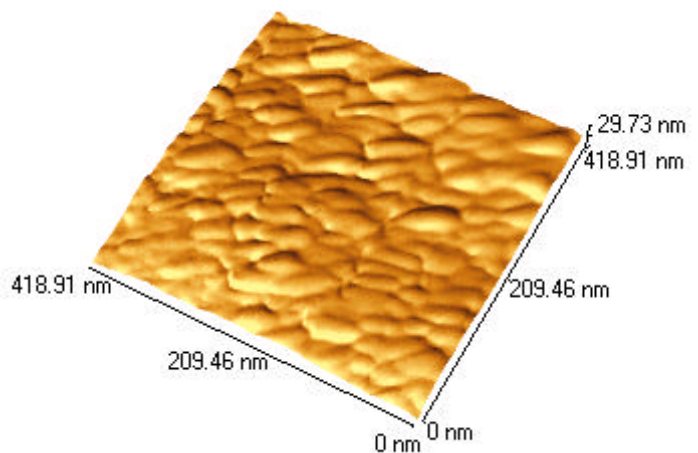
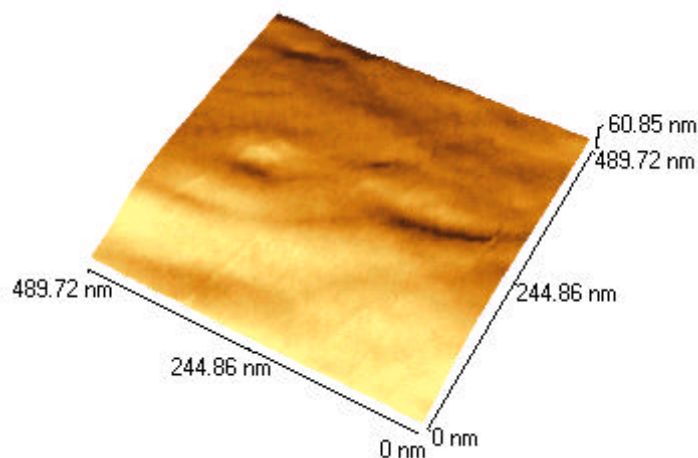


Figura 3.7. Imagens de esporos de *B. cereus* em cupons de silício tratado com solução de ácido fluorídrico, obtidas no modo de contato, ao ar.

A *Figura 3.8a* exibe detalhes da superfície de uma amostra preparada para ser visualizada por SEM. Na *Figura 3.8b* observa-se a superfície de um esporo de *B. cereus* no estado natural, condição apropriada para visualização por AFM. Tais imagens revelam diferenças marcantes entre a amostra sem preparação prévia e a que foi recoberta pela fina camada (~15 nm) de ouro.



(a)



(b)

Figura 3.8. Imagens de superfícies de esporos de *B. cereus* obtidas no modo de contato, ao ar: (a) coberto por uma fina camada de ~15 nm de ouro e (b) *in natura*.

3.2. Medidas de curvas de força

Os gráficos apresentados a seguir consistem em representações das curvas mais representativas das medidas tomadas segundo diferentes velocidades de aproximação, em pontos distintos da superfície, empregando-se *tips* e substratos diversos.

As curvas de força são capturadas medindo-se a deflexão experimentada pelo cantilever (d_c) enquanto a amostra se desloca em direção ao *tip*. Na *Figura 3.9a* é apresentada uma curva de força entre um *tip* neutro de Si_3N_4 e uma superfície carregada de mica mergulhados em água. O eixo vertical representa a força medida pelo *tip* ($F_c = k_c d_c$), e o eixo horizontal representa o deslocamento (vertical, Z_a) da amostra. Nesta curva, quando a separação entre o *tip* e o substrato é grande (> 100 nm) nenhuma deflexão do cantilever é observada. À medida que a distância diminui uma força repulsiva é detectada e, a partir de um certo ponto A, o *tip* é atraído para a superfície. Após o contato, ponto O, conforme a amostra se desloca, o cantilever sofre idêntico deslocamento (deflexão). Como na curva em questão não é possível determinar, com a certeza requerida, o ponto de contato nem a distância absoluta entre o *tip* e o substrato, torna-se necessário a construção de um novo gráfico com a coordenada horizontal igual a $H = Z_a + d_c$, onde H corresponde à separação (distância absoluta) entre o *tip* e a superfície da amostra [52, 53]. Na *Figura 3.9b* é apresentada a curva de força em função da distância absoluta, que corresponde à curva da *Figura 3.9a* corrigida.

Ainda em água, outras curvas de força foram medidas utilizando *tips* com permissividade elétrica diferentes. Na *Figura 3.10a* são mostradas as curvas de força em função do deslocamento da amostra para os *tips* de nitreto de silício ($\epsilon = 7,4$) e silício ($\epsilon = 11,6$) imersos na dupla camada elétrica da mica. As curvas de força apresentadas na *Figura 3.10b* foram medidas com *tips* revestidos com platina-irídio e cobalto, ambos com $\epsilon \approx \infty$, exibindo comportamento apenas atrativo, diferente das curvas da *Figura 3.10a*.

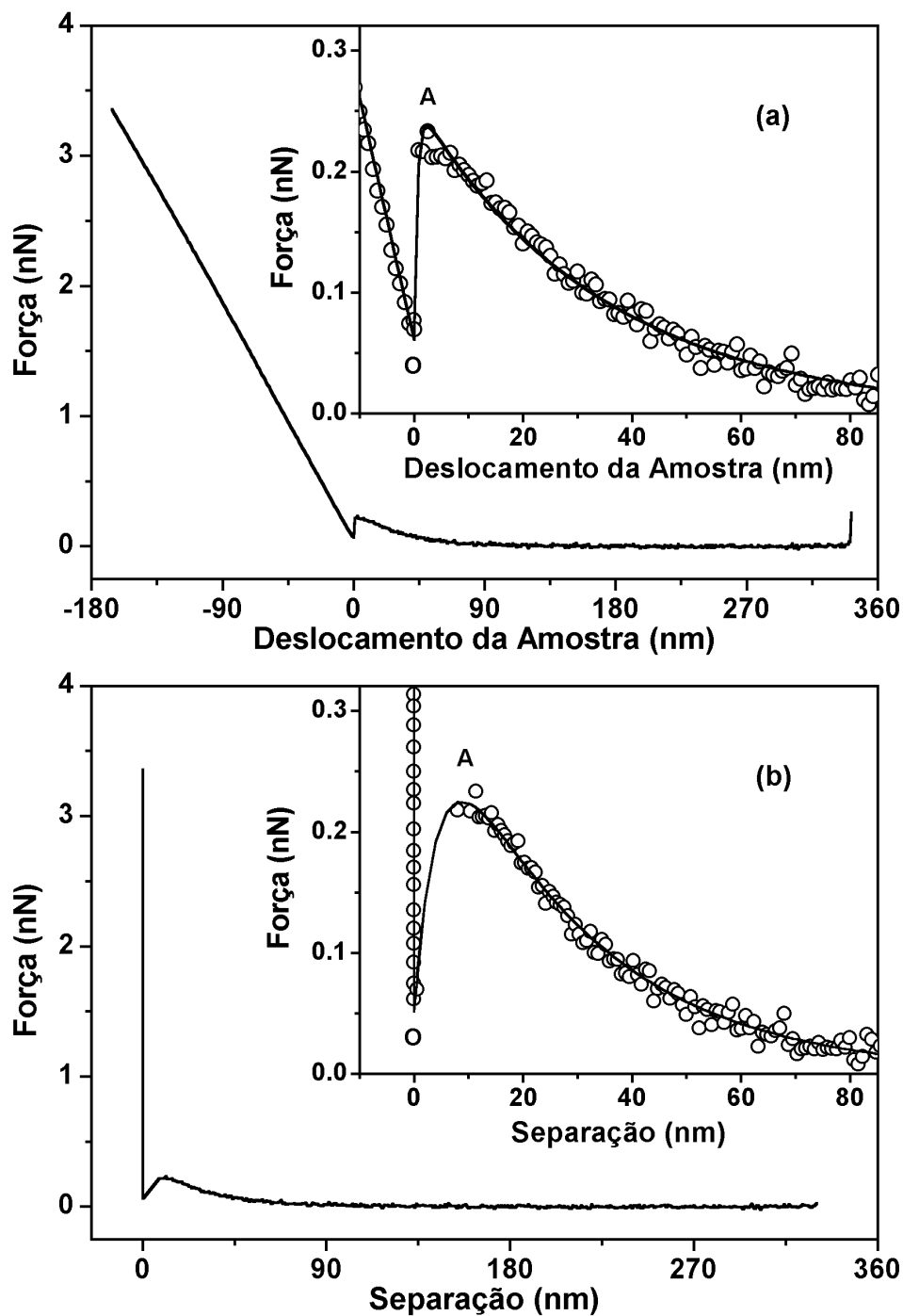


Figura 3.9. (a) Curva de força vs. deslocamento da amostra para um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em água. Velocidade de aproximação igual a $0,1 \mu\text{m/s}$. No destaque: escala estendida destacando a região próxima à interface. Os pontos experimentais são indicados por (). A linha cheia serve de guia para os olhos. (b) Curva corrigida.

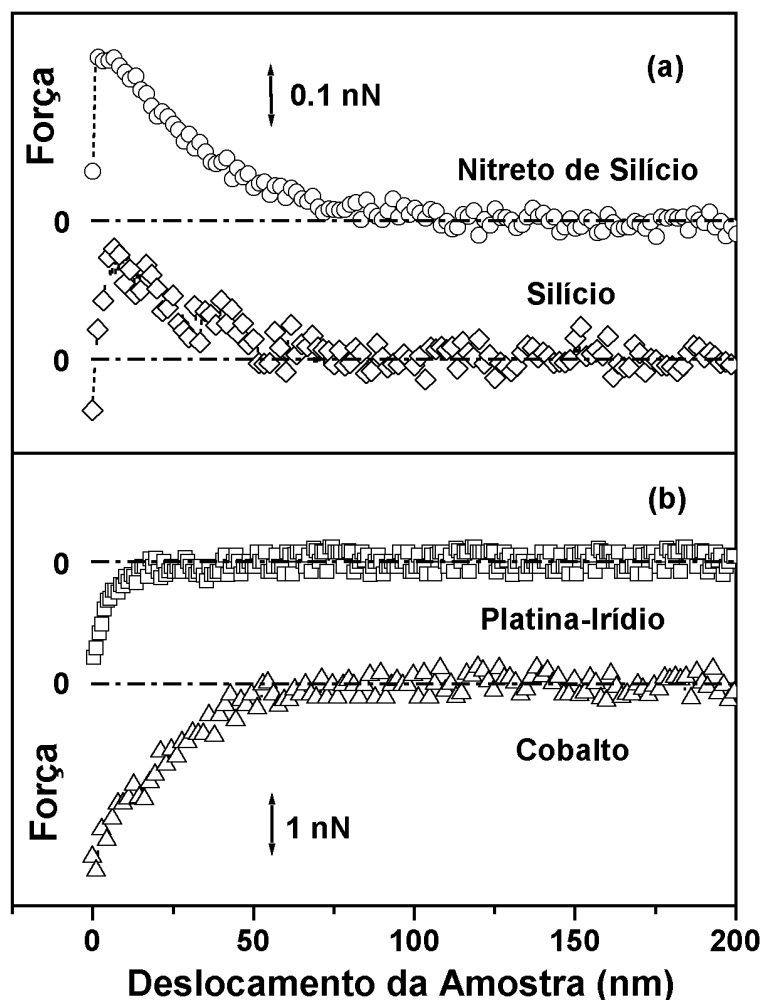


Figura 3.10. Curva de força vs. deslocamento da amostra para *tips* com permissividades elétricas diferentes: (a) *tips* de nitreto de silício e silício e (b) *tips* com cobertura de platina-irídio e cobalto.

Nas Figuras 3.11a, 3.11b e 3.11c são apresentadas as curvas de força obtidas com o *tip* de nitreto de silício e o substrato (mica), imersos em soluções com concentração de 10^{-3} M de NaCl, LiCl e KCl, respectivamente. Outras concentrações dos sais também foram analisadas. Em solução mais concentrada de NaCl, por exemplo 0,1 M, as curvas de força apresentam-se mais deslocadas em direção à origem (mais perto da superfície), porém bem mais afastadas que as medidas para 1,0 M. A intensidade da força também diminui com o

aumento da concentração de eletrólitos. Estes resultados permitem supor que tais forças são devidas à dupla camada elétrica presente na interface líquido/sólido.

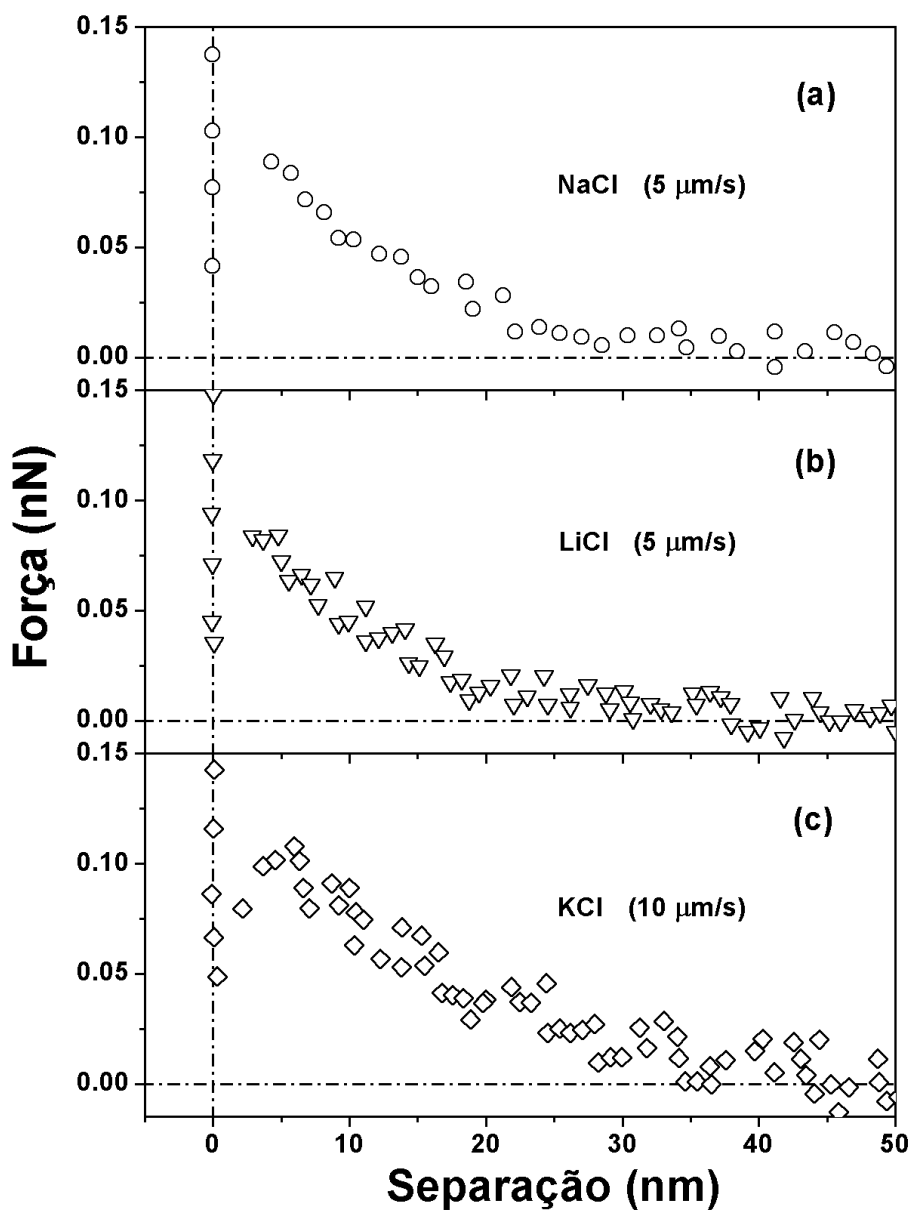


Figura 3.11. Curva de força vs. distância absoluta para um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em soluções com concentrações de 10^{-3} M de (a) NaCl, (b) LiCl e (c) KCl.

Nas Figuras 3.12a e 3.12b são apresentadas curvas de força entre um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica mergulhados em DMSO e formamida, respectivamente. Diferentemente das figuras anteriores, nenhuma atração é observada nas proximidades da superfície.

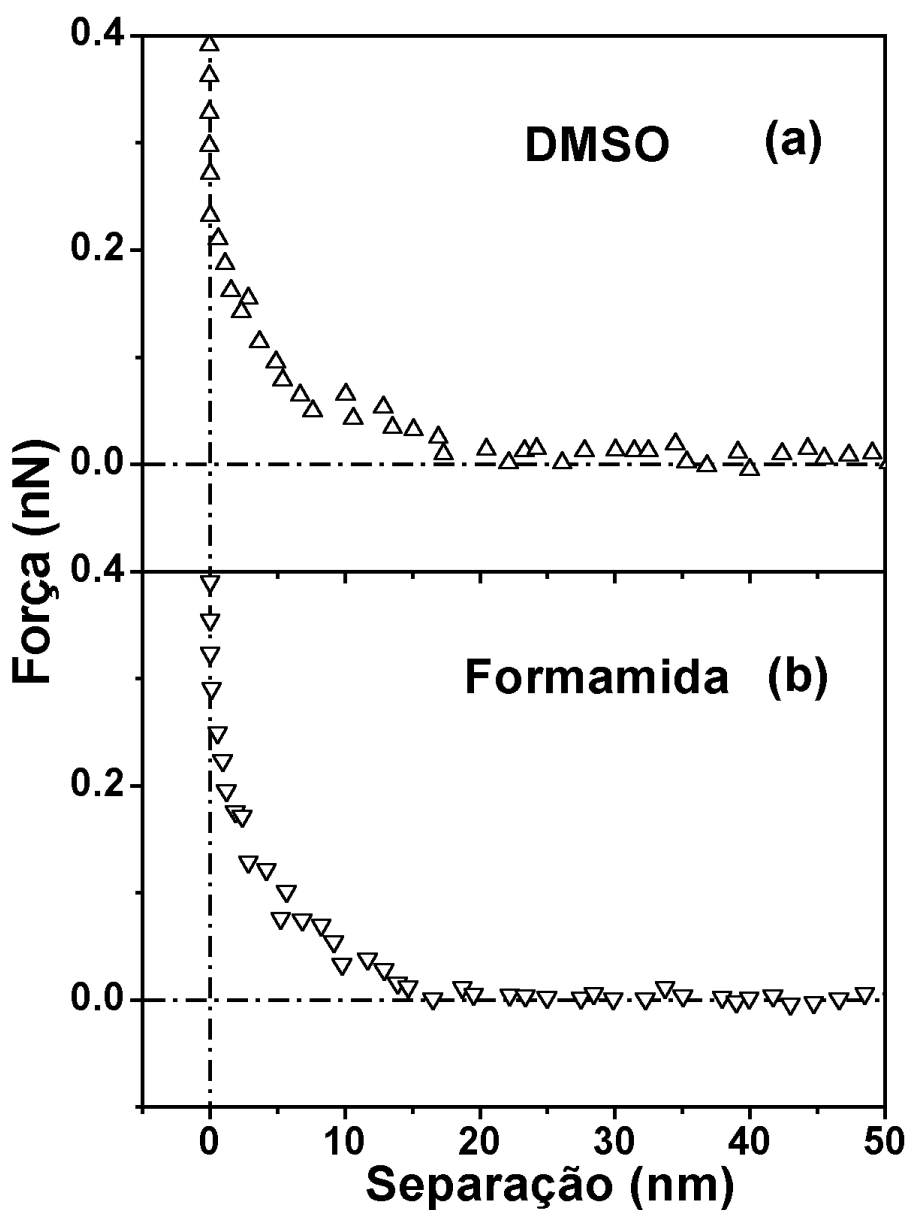


Figura 3.12. Curva de força vs. distância absoluta para um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em (a) dimetilsulfóxido (DMSO) e (b) formamida.

Imagens de CTAB adsorvido em mica revelam que, sob exposição prolongada, as moléculas de CTAB agregam-se para formar ‘ilhas’ na superfície da mica [40,41]. A *Figura 3.13* exibe diferentes tamanhos de agregados adsorvidos na interface. Com o objetivo de determinar a espessura da estrutura foram realizadas medidas de curvas de força nas ‘ilhas’ (região I) e fora delas (região II).

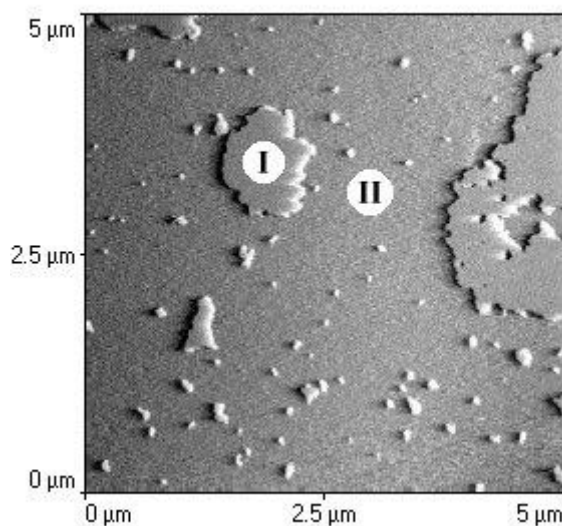


Figura 3.13. Imagem produzida por AFM de uma camada de CTAB adsorvida em soluções de CTAB em mica a 5×10^{-5} M. As ilhas (manchas, I) indicam estruturas maiores que o fundo (*background*, II).

Na *Figura 3.14* são apresentadas curvas de força relativas às regiões I e II [curva I (ΔE para velocidades de aproximação $v = 0,1 \mu\text{m/s}$ e $1 \mu\text{m/s}$, respectivamente) e curva II (ΔE para $v = 1 \mu\text{m/s}$ e $5 \mu\text{m/s}$, respectivamente)] [40,41,119]. A diferença no perfil de ambas as curvas, nas imediações do substrato ($< 5 \text{ nm}$), são indicativos de que as camadas adsorvidas são formadas por arranjos moleculares diferentes.

Para concentrações inferiores à *cmc* as moléculas de CTAB adsorvem sobre superfícies formando, preferencialmente, monocamadas com cabeças polares (hidrofílicas) voltadas para a mica e caudas (hidrofóbicas) voltadas para a solução [131]. Ainda que toda a superfície se encontrasse recoberta por uma única camada, persistiria uma carga residual

negativa na interface mica/cabeças polares, uma vez que a superfície de mica apresenta um sítio negativo por $0,48 \text{ nm}^2$ [132], enquanto numa micela a cabeça polar da molécula (*headgroup*) ocupa $\sim 0,64 \text{ nm}^2$ [133]. Para as regiões cobertas por bicamadas, a carga residual a partir da interface cabeças polares/água, é positiva [24, 25]. Em função dos resultados obtidos (destaque da *Figura 3.14*, curvas I e II — mesma intensidade e decaimento) é possível supor que ambas as regiões apresentam carga residual de mesma intensidade, porém, com sinais contrários.

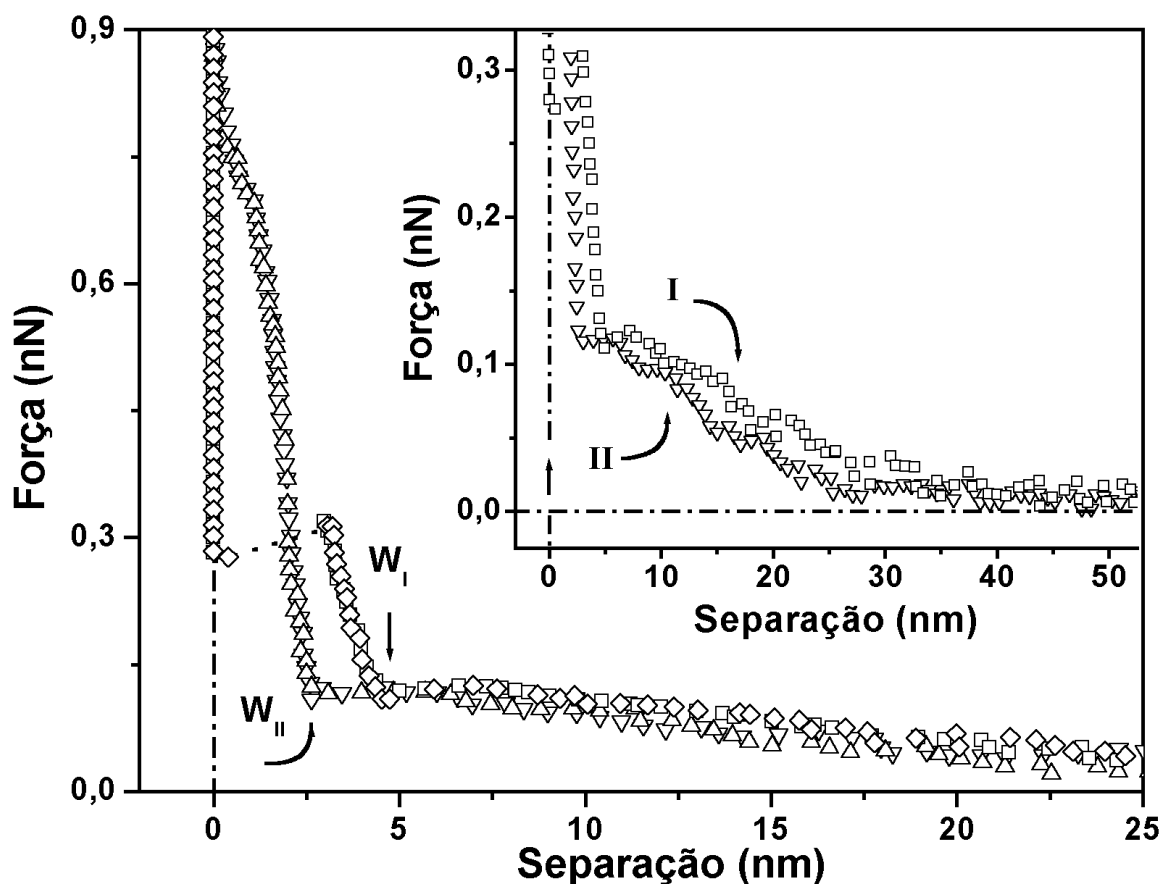


Figura 3.14. Curvas de força *versus* distância absoluta realizadas em soluções de CTAB a $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, sobre camadas de CTAB adsorvidas em mica, para as regiões mostradas na *Figura 3.13* [curva I (\square e ∇ , para $v = 1 \text{ } \mu\text{m/s}$ e $5 \text{ } \mu\text{m/s}$, respectivamente) e curva II (\square e ∇ , para $v = 0.1 \text{ } \mu\text{m/s}$ e $1 \text{ } \mu\text{m/s}$, respectivamente)]. Destaque do mesmo gráfico revelando, em ambas as curvas, as forças de atração e repulsão que atuam entre o *tip* de Si_3N_4 e a camada de surfatante antes do contato.

A partir da região de contato entre o *tip* e a camada do surfatante, ambas as curvas apresentam comportamento semelhante ao observado nas Figuras 3.9b, 3.10a e 3.11. O *tip* ao aproximar-se da superfície sofre uma pequena repulsão (~ 2 vezes inferior à da água), seguida de uma atração (vide Figura 3.14), semelhante aos resultados obtidos por Rutland e Parker [119]. Na Figura 3.14, curvas I e II, os componentes de longo alcance (repulsiva e atrativa) encontram-se deslocados em relação à origem (superfície de mica) pelas espessuras das camadas de surfatante, indicadas por W_I e W_{II} . A $(2,3 \pm 0,1)$ nm da superfície, região II (Figura 3.14, curvas I e II), há uma rápida variação na força para uma pequena variação na distância *tip*-superfície. O valor da espessura desta camada está de acordo com a formação de monocamadas (vide Figura 3.15a), sendo o comprimento da molécula $\sim 2,2$ nm [135, 136]. Aplicando-se uma força relativamente grande ($\sim 0,8$ nN), a camada de surfatante é removida do espaço entre o *tip* e a superfície.

Uma curva de força diferente é observada na região I (curvas I e II na Figura 3.14). O grande desvio repulsivo que inicia a $(4,4 \pm 0,1)$ nm do contato — que corresponde ao diâmetro mínimo de uma micela ou à espessura de uma bicamada não intercalada (vide Figura 3.15b) —, é seguido por um regime atrativo, quando a força atinge $\sim 0,3$ nN, valor observado quando o *tip* encontra-se a $\sim 3,2$ nm — que corresponde à espessura de uma bicamada intercalada (vide Figuras 3.14 e 3.15c). O regime atrativo, posterior ao rompimento da camada, indica que a compressão é seguida de uma atração do *tip* em direção ao substrato. As moléculas que formam as camadas delgadas deveriam ser mais fáceis de expulsar da zona de contato quando comparadas àquelas que formam as camadas espessas, mas observou-se exatamente o oposto.

Vale a pena ressaltar que em todas as curvas de força efetuadas sobre bicamadas, independente da concentração da solução, observou-se um ‘mergulho’ do *tip* em direção ao substrato a 3,2 nm do mesmo, o que sugere a ruptura de uma bicamada bem definida existente sobre a superfície de mica. Este valor (3,2 nm) está de acordo com as espessuras de bicamadas medidas por Pashley *et al.* (3,3 nm) [75], Kékicheff *et al.* (3,2 nm) [50] e Fragneto *et al.* (3,2 nm) [137].

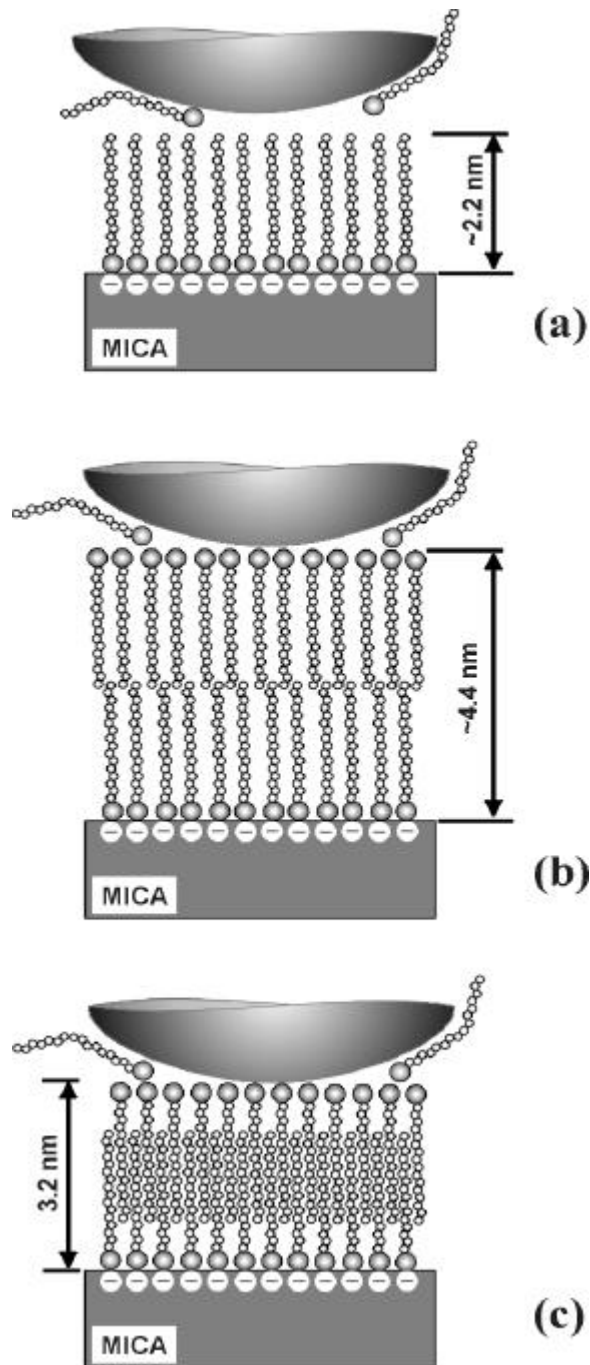


Figura 3.15. Arranjo das moléculas de CTAB entre o *tip* e o substrato: (a) monocamada, (b) bicamada não intercalada e (c) bicamada intercalada.

3.3. Modelagem e cálculo da força de troca dielétrica (FTD)

Um ajuste da *Equação* (2.7), simulando a média de um conjunto de medidas realizadas em água, é representado na *Figura 3.16* pela linha cheia indicada por *FTD*. O ajuste foi obtido em duas etapas: inicialmente, substituindo-se $\epsilon_{DC}(z)$ por ϵ_{bulk} ($= 79$) na *Equação* (2.7), foi possível ajustar a parte repulsiva da curva (linha tracejada) e determinar os parâmetros κ^{-1} e D_0 . Em seguida, manipulando-se os parâmetros ϵ_{min} e λ na expressão $\epsilon_{DC}(z)$, obteve-se o ajuste final.

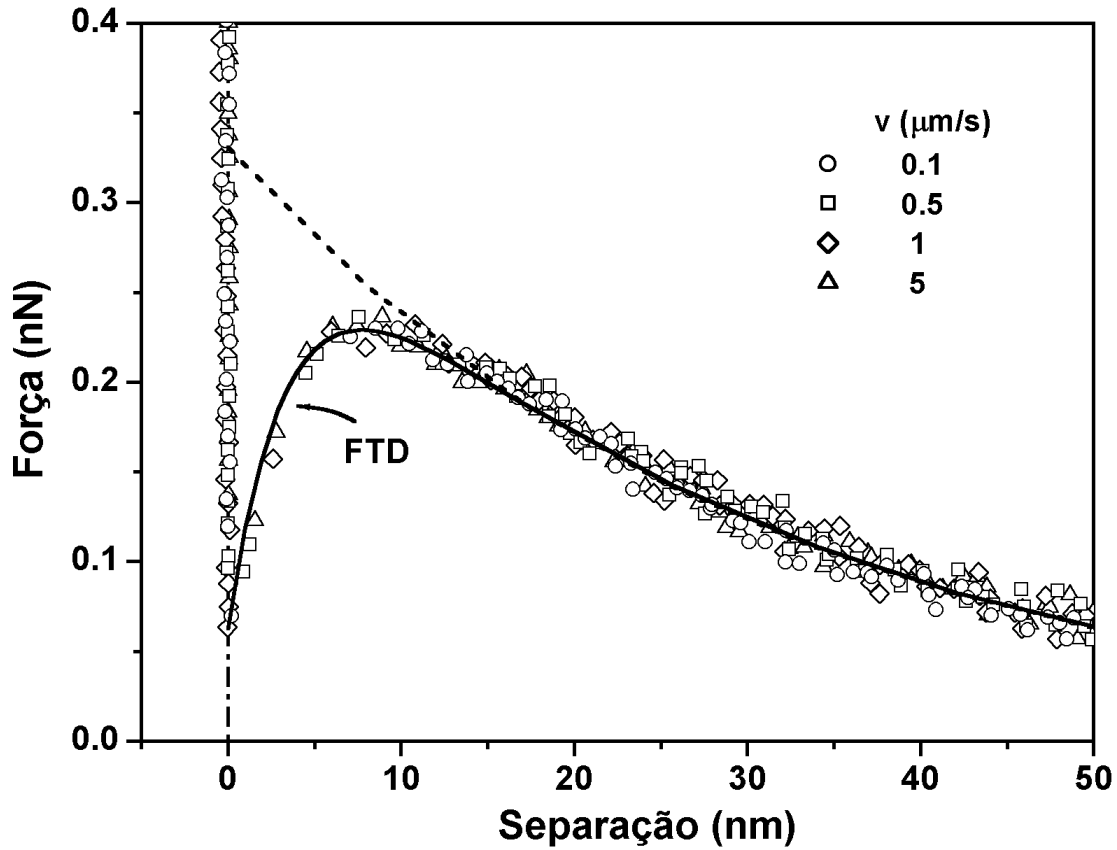


Figura 3.16. Curvas de força vs. distância absoluta para um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em água, capturadas com diferentes velocidades de aproximação. A linha tracejada representa o ajuste da força repulsiva, obtida substituindo-se $\epsilon_{DC}(z)$ por ϵ_{bulk} ($= 79$) na *Equação* (2.7). A linha cheia indicada por *FTD*, representa o ajuste final.

3.3.1. Força de troca dielétrica (FTD) associada à imersão de *tips* de Si₃N₄ em meio líquido

Nas Figuras 3.17, 3.18a, 3.18b, 3.18c, 3.19a e 3.19b, são apresentados os ajustes aos pontos experimentais, representados por linhas cheias indicadas por *FTD*, para a água “pura”, soluções aquosas de NaCl, LiCl e KCl, e os solventes formamida e dimetilsulfóxido. Para a solução aquosa (concentração iônica de $\sim 10^{-6}$ M), a espessura medida para a dupla camada difusa (κ^{-1}) foi ~ 60 nm, estando de acordo com o valor (56 nm) obtido por Kékicheff *et al.* [50]. O valor calculado para o comprimento de Debye-Hückel para soluções de 10^{-3} M de NaCl e KCl foi ~ 10 nm, enquanto os medidos foram, respectivamente, ~ 11 nm e ~ 13 nm. Os valores de κ^{-1} medidos para soluções de LiCl, MgCl₂ e os solventes formamida e dimetilsulfóxido encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros da dupla camada elétrica medidos com o *tip* de nitreto de silício.

Solvente	ϵ_{bulk}^*	κ^{-1} (nm)	ϵ_{DC} (superfície)
H ₂ O	79	60	3,8
MgCl ₂ (10^{-3} M)	79	15	2,5
KCl (10^{-3} M)	79	13	7,1
NaCl (10^{-3} M)	79	11	3,7
LiCl (10^{-3} M)	79	10	8,7
DMSO	46	14	46 ^{**}
Formamida	109	11	109 ^{**}

* Extraído da referência [138].

** $\epsilon_{DC}(H) = \text{constante}$

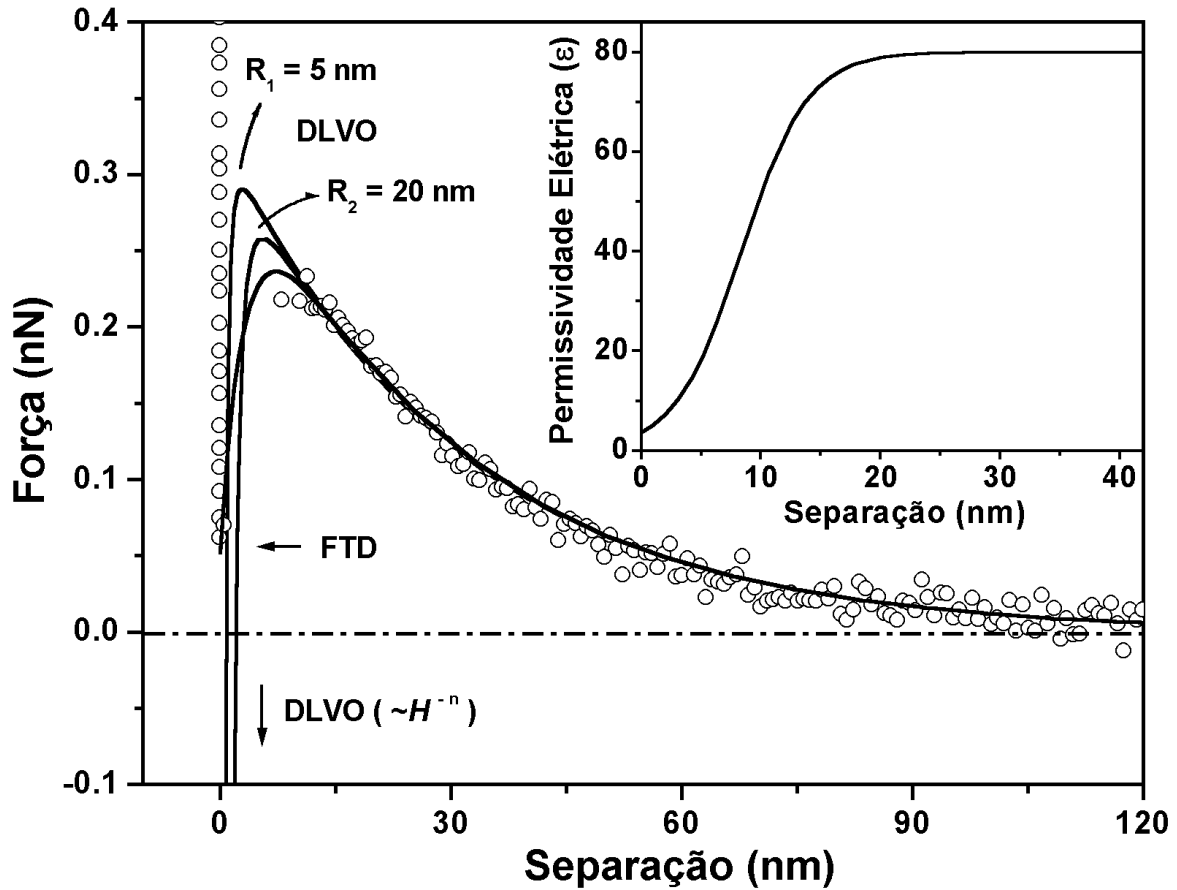


Figura 3.17. Curva de força vs. distância absoluta para um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em água (). A linha cheia indicada por *FTD* corresponde ao ajuste da *Equação (2.7)* à curva experimental. As linhas cheias indicadas por R_1 e R_2 correspondem aos ajustes obtidos com a teoria *DLVO* usando para o raio do *tip* os valores 5 e 20 nm, respectivamente. No destaque: perfil da permissividade elétrica $\epsilon(H)$ correspondente ao ajuste da *Equação (2.7)*.

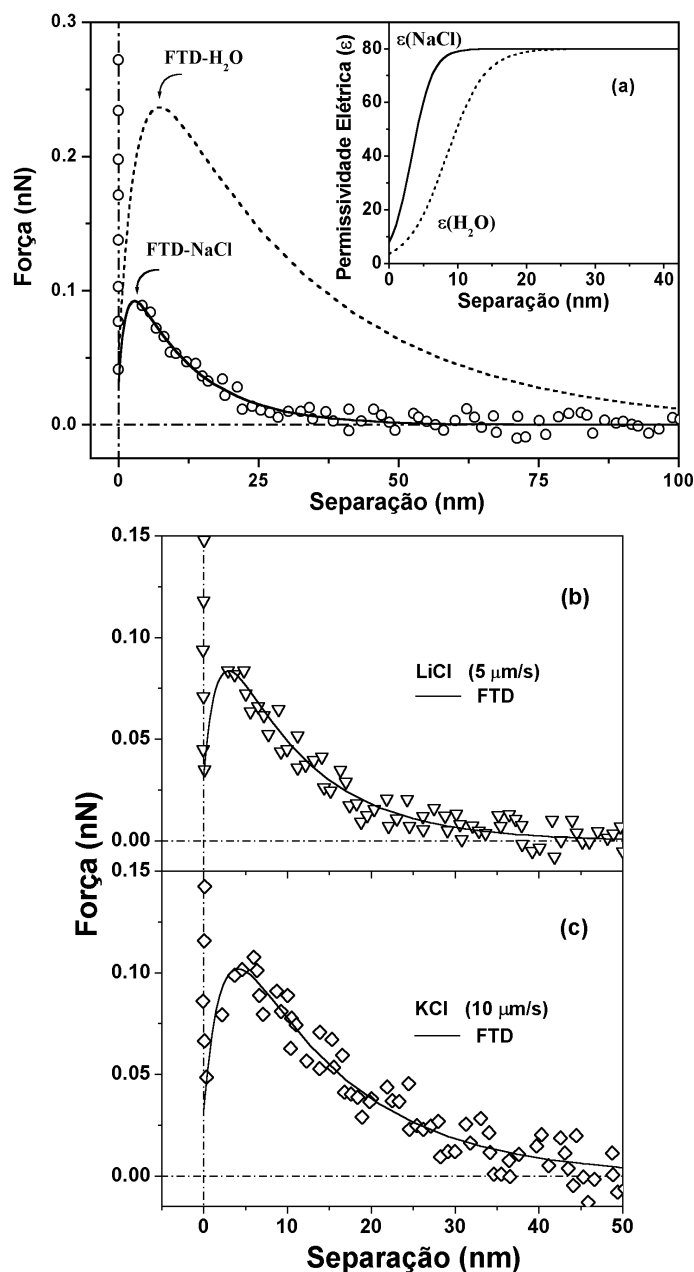


Figura 3.18. Curvas de força vs. separação para *tips* de Si_3N_4 e superfícies de mica imersos em soluções com de 10^{-3} M de (a) NaCl, (b) LiCl e (c) KCl. As linhas cheias correspondem aos ajustes da Equação (2.7) às curvas experimentais. Em (a), a linha tracejada indicada por FTD- H_2O corresponde ao ajuste da *força de troca dielétrica* para a água (Figura 3.17). No destaque: as curvas indicadas por $\epsilon(\text{H}_2\text{O})$ e $\epsilon(\text{NaCl})$ correspondem à variação espacial da permissividade elétrica da água e solução de NaCl, respectivamente, geradas a partir da Equação (1.2).

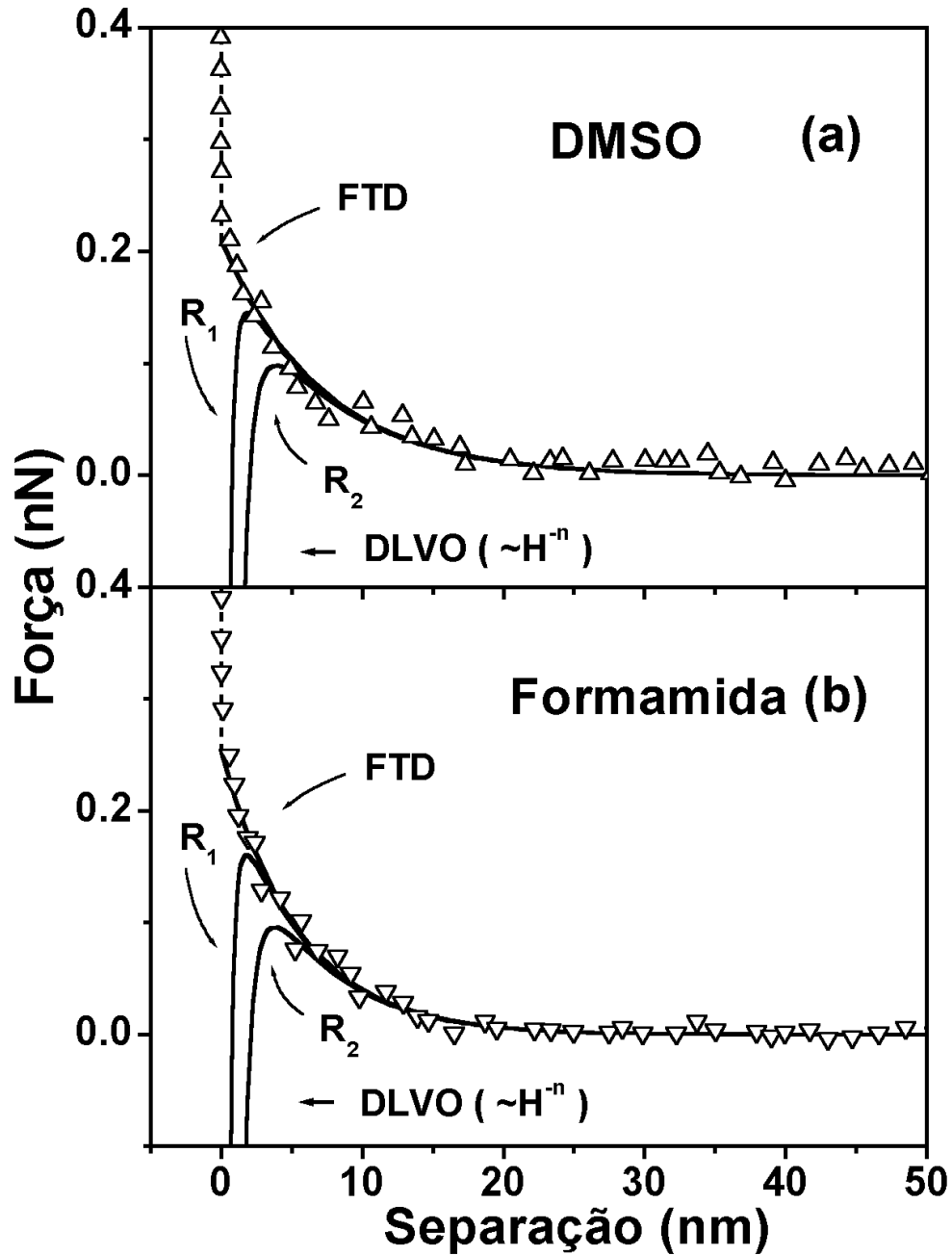


Figura 3.19. Curva de força vs. distância absoluta para um *tip* de Si_3N_4 e uma superfície de mica imersos em (a) dimetilsulfóxido (DMSO) e (b) formamida. A linha cheia indicada por *FTD* corresponde ao ajuste da Equação (2.7) à curva experimental. A linha tracejada indica a região onde o *tip* e o substrato estão em contato. As linhas cheias indicadas por R_1 (5 nm) e R_2 (20 nm) correspondem aos ajustes obtidos com a teoria *DLVO*.

Na Figura 3.20 são apresentados os ajustes aos pontos experimentais, representados por linhas cheias, para uma solução de CTAB 10^{-5} M e, no destaque, água “pura”. O exame da Figura 3.20 permite verificar que, distante da camada de surfatante, há um campo de força que diminui exponencialmente com a distância, com um comprimento de Debye de ~ 27 nm, semelhantemente ao medido em mica por McGuiggan e Pashley [139].

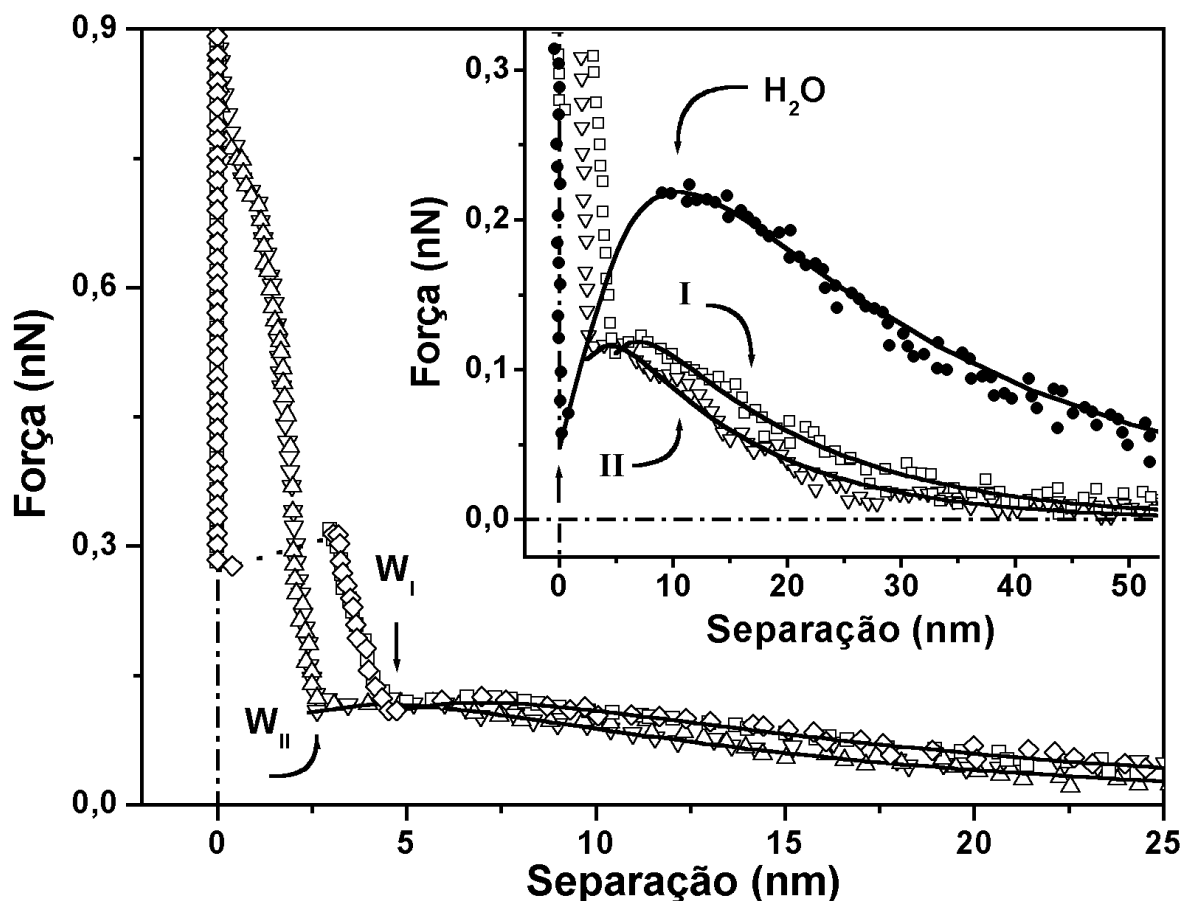


Figura 3.20. Detalhe das curvas apresentadas na Figura 3.13. As linhas cheias correspondem aos ajustes da Equação (2.7) às curvas experimentais. No destaque é apresentado um detalhe do mesmo gráfico revelando, em ambas as curvas, as forças de atração e repulsão que atuam entre o *tip* de Si_3N_4 e a camada de surfatante antes do contato; para efeito de comparação, foi introduzida uma curva de força medida em água (●).

Longe das interfaces ($H \gg 1$ nm) as curvas exibem decaimento exponencial. A intensidade máxima da força medida em água é duas vezes superior à obtida na solução de surfatante.

Para *tips* de nitreto de silício (Si_3N_4) — superfície eletricamente neutra ou ligeiramente negativa [23] — e mica (superfície carregada negativamente, $\sigma_{\text{Mica}} \gg \sigma_{\text{Tip}}$), imersos em água pura e soluções salinas, foram observadas contribuições repulsiva e atrativa. Interpretando os resultados à luz da teoria *DLVO*, é possível supor que (a) a contribuição repulsiva seja devida à aproximação entre duas superfícies com cargas de mesmo sinal — o *tip* ligeiramente negativo e a mica também negativa — e (b) a intensidade da interação diminui em função do aumento de concentração de íons, responsáveis pela blindagem das cargas superficiais. A interação atrativa é atribuída às forças de vdW. Comportamento semelhante, e inesperado, foi observado nas medidas de força realizadas em solução aquosa sobre bicamadas de surfatante catiônico (carregado positivamente) adsorvidas em mica [24, 25]. De acordo com a teoria *DLVO*, era de se esperar que a curva de força entre um *tip* ligeiramente negativo e uma interface positiva, apresentasse unicamente componentes atrativos.

O presente modelo (*FTD*) fornece uma descrição consistente para as curvas de força quando *tips* de Si_3N_4 , são inseridos na região da dupla camada elétrica formada a partir de interfaces positivas e negativas.

3.2.2. Força de troca dielétrica (*FTD*) associada à imersão de *tips* de Si_3N_4 em camadas de CTAB adsorvidas em mica

Para explicar o resultado inesperado, segundo o qual as camadas delgadas de surfatante (região II) apresentam forças de ruptura superiores às observadas em camadas espessas (região I), foi proposto que um componente extra da força está presente quando o *tip* imerge nas camadas delgadas ou espessas, e seu valor está associado com a permissividade elétrica das mesmas.

Para sustentar tais afirmações, esse componente foi calculado usando a *Equação* (2.7), assumindo um formato semi-esférico para a extremidade inferior do *tip*, já que somente sua porção esférica, com volume elementar $dv = \pi [R^2 - (R - z)^2] dz$, é imersa nas

camadas de surfatante com permissividade elétrica ϵ . O efeito da *força de troca dielétrica* quando o *tip* penetra na região coberta pela camada menos espessa será discutida a seguir.

A energia gasta para aproximar o *tip* do substrato corresponde à área coberta pelo triângulo (0-1-2) na *Figura 3.21a*; parte desta energia foi atribuída à imersão do *tip* numa região com permissividade elétrica $\epsilon_{II} > \epsilon_{Tip}$. O resultado é mostrado na *Figura 3.21a* pela linha pontilhada, identificada como “*FTD repulsiva*”. Este componente foi subtraído da curva experimental, e o resultado está indicado pela linha cheia 3-4. O ajuste foi obtido substituindo ϵ_{DC} na *Equação 2.7* por $\epsilon_{II} \approx 36$. Este valor está de acordo com os publicados para permissividade elétrica de soluções de CTAB a *cmc* [140].

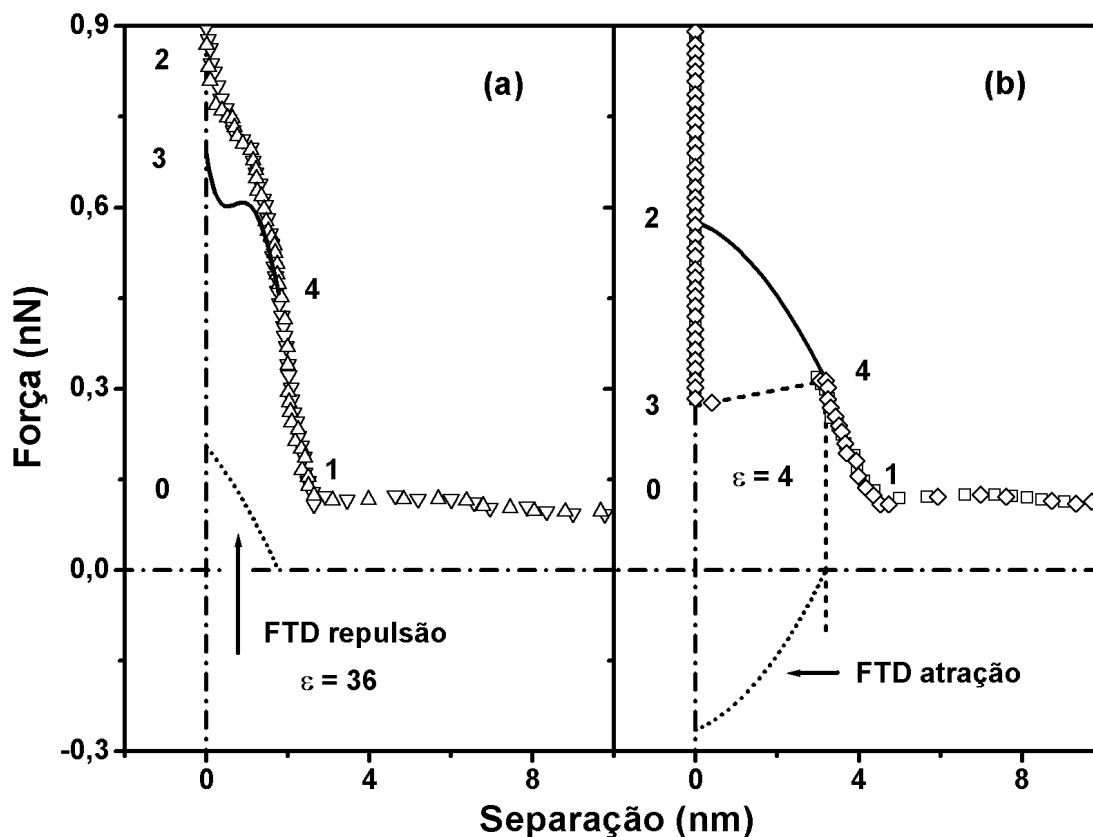


Figura 3.21. Detalhe das curvas apresentadas nas *Figuras 3.14* e *3.20*. Cálculo da *força de troca dielétrica* que atua sobre o *tip* com extremidade inferior esférica ($R \approx 5$ nm), quando imerso em camadas de CTAB, indicado pela linha tracejada. (a) Região II e (b) região I.

A energia associada à imersão do *tip* na camada espessa está representada na *Figura 3.21b*, correspondendo à área limitada pela linha pontilhada, apontada como “*FTD* atrativa”. A permissividade elétrica no interior da bicamada é suposta homogênea, caracterizada por $2 \leq \epsilon_I \leq 6$ [139]. O valor da permissividade elétrica que possibilitou tal ajuste foi $\epsilon_I \approx 4$. Subtraindo este componente da curva original, obtém-se uma curva similar àquela obtida quando da imersão do *tip* na camada delgada. O presente modelo (*FTD*) fornece uma descrição consistente para as curvas de força distintas, medidas quando o *tip* imerge numa camada de surfatante, assumindo a camada espessa com uma permissividade elétrica $\epsilon_I \approx 4$ e a camada delgada com $\epsilon_{II} \approx 36$.

Assim, como em estudos anteriores [40,41], verificou-se que superfícies de mica imersas em soluções de CTAB à concentração de 10^{-5} M não apresentam cobertura homogênea, dando suporte à idéia de que a adsorção ocorre na forma de agregados [40,41]. Estes agregados ou ilhas têm uma espessura total de 3,2 nm e assemelham-se muito a fragmentos de bicamada, como registrado previamente [137]. O fato de que a região I é constituída por bicamadas ficou evidente, uma vez que a espessura medida antes da ruptura foi de 3,2 nm e o valor da permissividade elétrica medido foi $\epsilon_I \approx 4$. Portanto, na região I, a película adsorvida é formada por um arranjo molecular compacto. Estes agregados fundiram-se o suficiente para formar uma estrutura constituída por duas camadas de moléculas (bicamadas) intercaladas.

O valor da permissividade elétrica medido na região delgada (que corresponde à monocamada), $\epsilon_{II} \approx 36$, sugere a existência de uma fração significativa de água nessa região, conforme reportado por Fragneto *et al.* [137]. Essa fração seria responsável, provavelmente, pelo fato de ϵ_{II} ser maior do que ϵ_I . As curvas de força são, portanto, especialmente úteis para discriminar entre formação de monocamada e bicamada, já que tanto a espessura quanto a permissividade elétrica da estrutura são medidas simultaneamente.

Quando a força aplicada é suficientemente grande, a camada de surfatante é comprimida e expulsa da região entre o *tip* e a mica. Este valor é definido como a força de

ruptura da película, e é aproximadamente igual a $\sim 0,8$ nN para a região II e $\sim 0,3$ nN para a região I. Os resultados apresentados demonstram que a *força de troca dielétrica* responde pela diferença na força de ruptura das duas camadas com diferentes espessuras e permissividades elétricas.

3.3.3. *Força de troca dielétrica (FTD) associada com tips metálicos*

Tips revestidos com platina e cobalto foram empregados para testar a hipótese de que a força repulsiva observada a distâncias superiores a 10 nm está diretamente associada com a diferença de permissividade elétrica entre a solução e o *tip*. As curvas de força obtidas com tais *tips* (Figura 3.10b) mostram comportamento diferente, em comparação àquelas medidas com *tips* de silício e nitreto de silício (Figura 3.10a). Estes resultados devem-se ao fato de os condutores apresentarem permissividade estática infinita, que implica num campo elétrico nulo no interior do *tip* e, conseqüentemente, numa energia elétrica interna também nula. Assim, a força medida é atrativa, uma vez que a imersão do *tip* no campo elétrico da dupla camada minimiza a energia total da configuração. A variação da energia decorrente da imersão do *tip* metálico nessa região é obtida pela Equação (2.7) para $1/\epsilon_{Tip} \approx 0$. O ajuste da Equação (2.7) aos pontos experimentais, mostrado na Figura 3.22, foi obtido usando os valores ϵ_{DC} e κ^{-1} listados na Tabela 1.

3.3.4. *Força de troca dielétrica (FTD) associada à variação da permissividade elétrica da água interfacial*

O componente da *força de troca dielétrica* também está presente quando o *tip* imerge na camada de água mais interna que se forma junto à interface solução/mica. O valor da permissividade elétrica da camada de água mais interna que resulta nos melhores ajustes da Equação (2.7) às curvas experimentais (vide Figuras 3.17, 3.22 e 3.23) é ~ 4 , bem próximo aos valores 4,2 e 3,48 reportados por Kaatze [103] e Kindt e Schmuttenmaer [141], respectivamente.

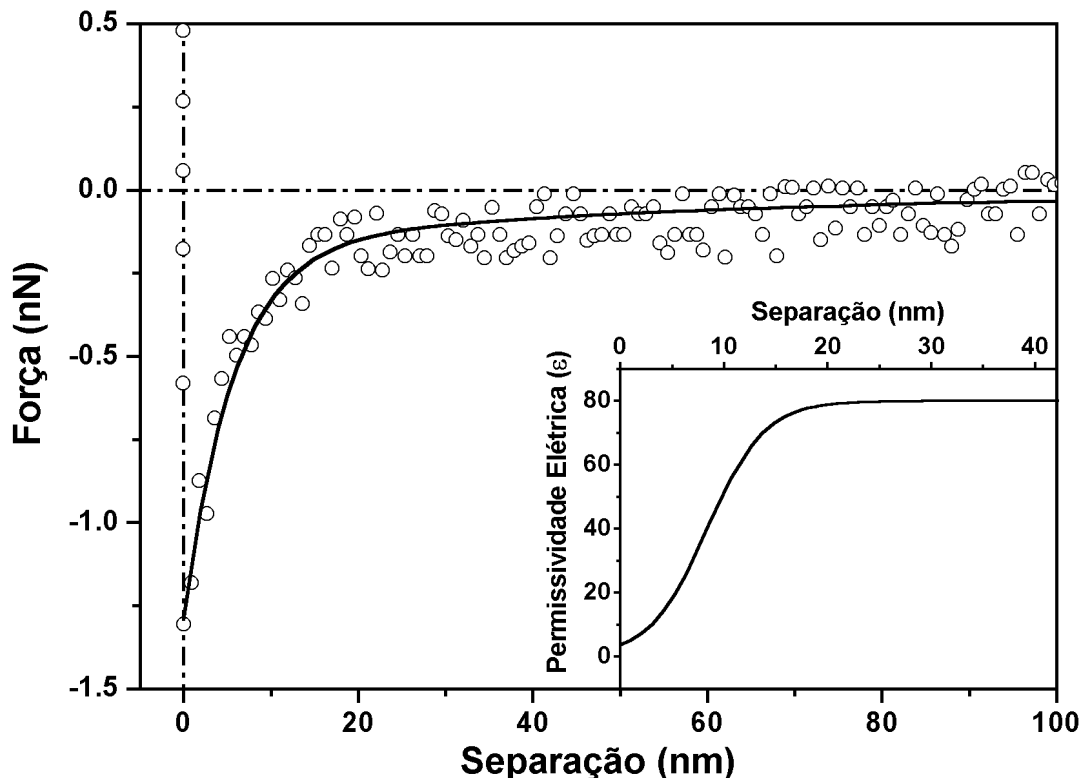


Figura 3.22. Curva de força vs. distância absoluta para um *tip* de platina-irídio e uma superfície de mica imersos em água. A linha cheia indicada por *FTD* corresponde ao ajuste da Equação (2.7) à curva experimental, utilizando a função $\epsilon_{DC}(H)$, Equação (1.2), cuja variação espacial é apresentada no destaque.

A diminuição da permissividade elétrica da dupla camada em relação ao meio é associada à atração sofrida pelo *tip* perto da superfície. Essa força de curto alcance é atribuída à mudança na permissividade elétrica da água, induzida pela carga superficial da mica, capaz de ordenar as moléculas de água, e explica os resultados experimentais mostrados no presente trabalho.

O modelo formulado prediz uma força atrativa (ou menos repulsiva, quando comparada à repulsão da dupla camada) que é determinada pelo grau de polarização da camada de moléculas de água na interface líquido/sólido, responsável pela diminuição da permissividade elétrica da água de ~ 80 para um valor ~ 4 . A diferença entre a permissividade elétrica da porção da dupla camada imersa pelo *tip* e a permissividade

elétrica do *tip* determina o sinal da força [vide *Equação (2.7)*]. O perfil da permissividade elétrica medido para cada uma das soluções estudadas é apresentado na *Figura 3.23*.

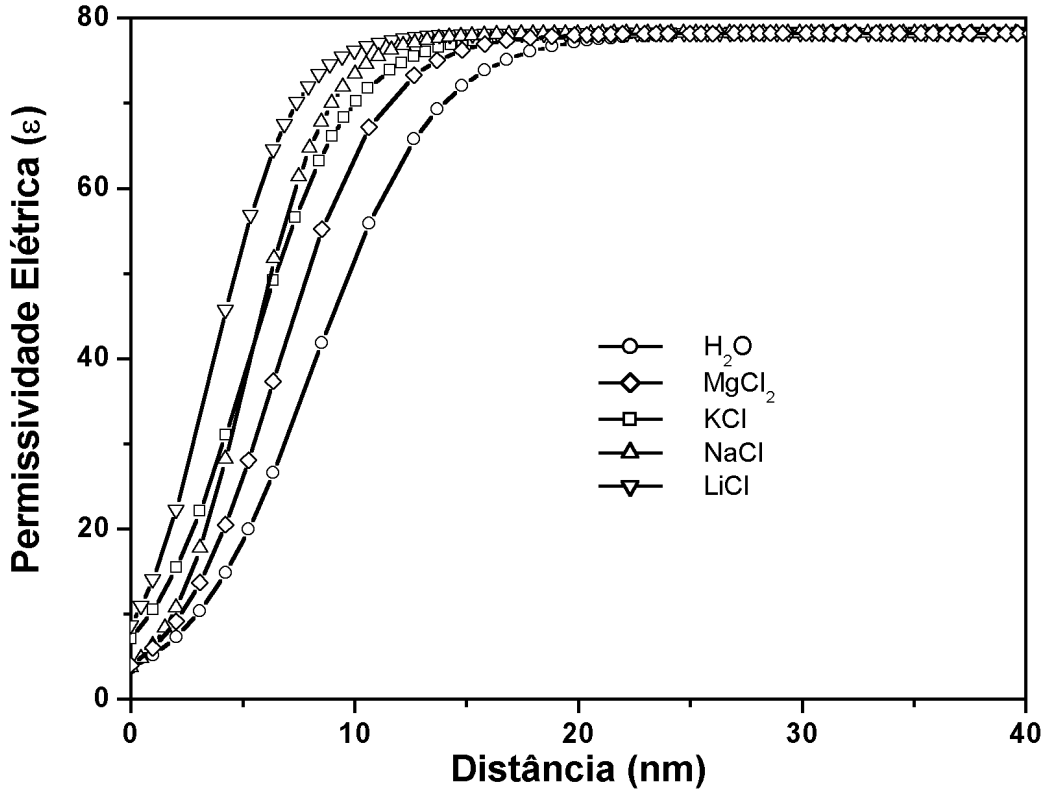


Figura 3.23. As curvas correspondem à variação espacial da permissividade elétrica resultantes dos ajustes da *Equação (2.7)* às curvas de força experimentais.

O presente modelo apresenta bons ajustes mesmo para distâncias inferiores a 10 nm. O comportamento atrativo do *tip* quando imerso na camada interna é associado à reorientação parcial dos dipolos de água na interface e não à atração de vdW, que tem uma faixa de atuação muito curta, ~ 1 nm [127].

Uma possível influência da força atrativa de vdW na forma da curva da força também foi investigada. A força de vdW entre uma superfície plana e um *tip* cônico com extremidade inferior esférica é dada pelas *Equações (2.1)* e (2.2). O coeficiente de Hamaker para um substrato de mica e um *tip* de nitreto de silício é calculada pela expressão $A(H,T) = A_0 + A_1 \exp(-H/H_1)$, onde, para a água, $A_0 = 6,81 \times 10^{-21}$ J, $A_1 = 3,44 \times 10^{-20}$ J, e $H_1 = 19,95$

nm. As curvas de força calculadas, indicadas por *DLVO*, são mostradas na *Figura 3.17* para água pura, *Figura 3.19a* para o DMSO e *Figura 3.19b* para a formamida. Tais resultados evidenciam claramente que a atração de vdW, cujo decaimento é proporcional a $1/H^n$, é inadequada para explicar a força atrativa observada próximo à interface (≤ 10 nm), pelo menos para a água pura, DMSO e formamida.

Um ponto que merece atenção é o baixo valor calculado para a permissividade elétrica da água para distâncias de até ~ 10 nm da superfície. Na literatura, entretanto, baixos valores de ϵ são mencionados para distâncias menores, até ~ 6 diâmetros moleculares.

Alguns pontos devem ser considerados a fim de explicar os valores medidos neste trabalho. A descrição clássica da dupla camada interna da água é baseada em medidas de capacitância da camada interna de Helmholtz [21, 83, 98]. A camada de saturação é determinada a partir de medidas de capacitância nas interfaces, em soluções altamente concentradas, com valores κ^{-1} pequenos. Uma capacitância de aproximadamente $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ está associada com uma camada hidratada de espessura de ~ 1 nm e $\epsilon \approx 6$. Nestas medidas somente a relação entre a permissividade e a largura da camada é determinada, enquanto no presente trabalho, tanto a espessura da região de atração, equivalente à largura da camada, e a permissividade elétrica, são determinadas, simultaneamente. Assumindo, arbitrariamente, que a espessura da camada de saturação corresponde à distância na qual a permissividade elétrica atinge a metade de seu valor máximo (vide *Figura 3.23*), obtém-se, para a orientação de dipolos, os valores ~ 8 nm para água Milli-Q e ~ 3 nm para a solução de NaCl 10^{-3} M. Para soluções altamente concentradas ($\sim 10^{-1}$ M), o valor determinado por medidas de capacitância é ~ 1 nm [83, 98].

Um outro ponto que deve ser considerado é que a energia de dissolução, calculada usando a expressão de Born, é proporcional a $(1/\epsilon_2 - 1/\epsilon_1)$ [107, 142]. Assim, os átomos se dissociam como íons em solução, numa taxa proporcional à diferença dos inversos das permissividades elétricas. Esta é a primeira etapa no processo dinâmico. Na etapa seguinte, as moléculas de água orientam-se em torno dos íons, formando uma camada de hidratação.

Esse processo promove uma diminuição acentuada da energia do sistema. Um procedimento semelhante ocorre na superfície da mica.

Medidas da permissividade elétrica em soluções muito diluídas sugerem a existência de uma camada — formada pelo ordenamento consecutivo de moléculas (dipolos) de água — muito mais espessa que a esperada em soluções concentradas. Os dipolos podem ser parcialmente orientados em uma região próxima à interface cuja espessura pode ser estimada como se segue. O campo elétrico da mica imersa em soluções com baixas concentrações iônicas pode orientar os dipolos até uma distância $H = L$, obtida a partir da expressão

$$k_B T \approx \bar{\mu} \cdot \vec{E}(L) = \frac{\bar{\mu} \cdot \vec{D}(L)}{\epsilon_0 \epsilon(L)}, \quad (3.1)$$

onde $k_B T \approx 4,11 \times 10^{-21}$ J é a energia responsável pela distribuição aleatória das moléculas. O módulo do vetor deslocamento elétrico gerado pela mica, supondo que todos os íons K^+ estejam dissociados, é $D_0 \approx 0,17$ C/m². Em tais circunstâncias os dipolos poderiam manter-se orientados até uma distância $L \approx 7$ nm da interface, a qual corresponde a $\epsilon(L) \approx 27$.

3.3.5. Observações de membranas de CTAB, usando AFM

A interação com os grupos que seriam responsáveis pelo preparo das amostras de microrganismos apresentou algumas dificuldades logísticas – resultado das distâncias e eventuais incompatibilidades de cronogramas. Tais dificuldades acabaram por orientar a investigação e mapeamento de estruturas não-biológicas, porém igualmente frágeis e maleáveis, de forma que, ao invés de prosseguir na obtenção de imagens de microrganismos em meio líquido, passou-se à observação de membranas formadas por moléculas do surfatante CTAB, adsorvidas na interface entre a solução aquosa e o substrato (mica) [40, 41].

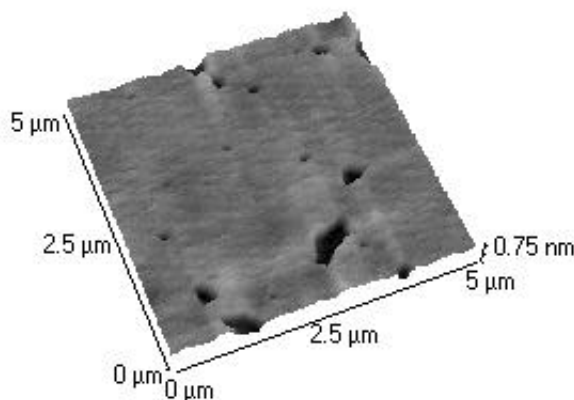


Figura 3.24. Imagem de uma estrutura formada por moléculas de CTAB adsorvida em mica, obtida por AFM, em uma solução com concentração de 5×10^{-5} M. As regiões mais claras indicam estruturas mais altas.

Na primeira imagem obtida (*Figura 3.24*), em que se usou uma solução 5×10^{-5} M de CTAB, observou-se uma região clara intercalada por manchas escuras. Uma vez que o contraste de imagens em microscopia de força atômica diferencia estruturas altas e estruturas baixas como regiões claras e escuras, respectivamente, concluiu-se que o substrato encontrava-se recoberto por saliências entremeadas por algumas depressões. Em imagem obtida com velocidade de varredura de $15 \mu\text{m/s}$, mediu-se uma diferença de altura aparente entre as duas estruturas (regiões escuras e claras) de $\sim 0,5$ nm. Com o intuito de determinar a altura real de cada estrutura, foram realizadas medidas de força em função da distância em ambas as regiões (*Figuras 3.14, 3.20 e 3.21*). Desta forma, as curvas de força revelaram que a região escura, apresentada como mais baixa na imagem da *Figura 3.24* era, na realidade, mais alta que a região clara, ou seja, um caso típico de inversão no contraste de imagem [40, 41].

Objetivando entender a razão da inversão no contraste apresentado na *Figura 3.24*, amostras com diferentes padrões de adsorção em mica foram investigadas em função da concentração de surfatante, da velocidade de varredura e da força exercida pelo *tip* sobre a amostra durante o processo de varredura ('força de varredura'), verificando-se que:

- Em soluções de CTAB a 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M, as superfícies de mica apresentavam-se totalmente cobertas por uma única camada, cuja ruptura ocorria a 3,2 nm do substrato. Em tais concentrações, esta dimensão corresponde à espessura da bicamada de CTAB [50, 119, 136, 137].
- Imagens obtidas com velocidades de varredura entre 15 e 50 $\mu\text{m/s}$ apresentaram-se praticamente idênticas e de boa qualidade. Para velocidades superiores a 50 $\mu\text{m/s}$, a imagem perdia nitidez, perdendo definição de contornos, apresentando mudanças a cada varredura.
- Apenas a ‘força de varredura’ exerce papel determinante sobre o contraste da imagem, sendo o contraste padrão restabelecido quando se ajusta o valor da força de varredura para valores inferiores à força de ruptura da camada mais espessa.

Na *Figura 3.25* são apresentadas as imagens real (*Figura 3.25a*) e invertida (*Figura 3.25b*) de uma mesma região, obtidas a uma concentração de 5×10^{-5} M, com forças de varredura de 0,012 nN para 2,56 nN, respectivamente.

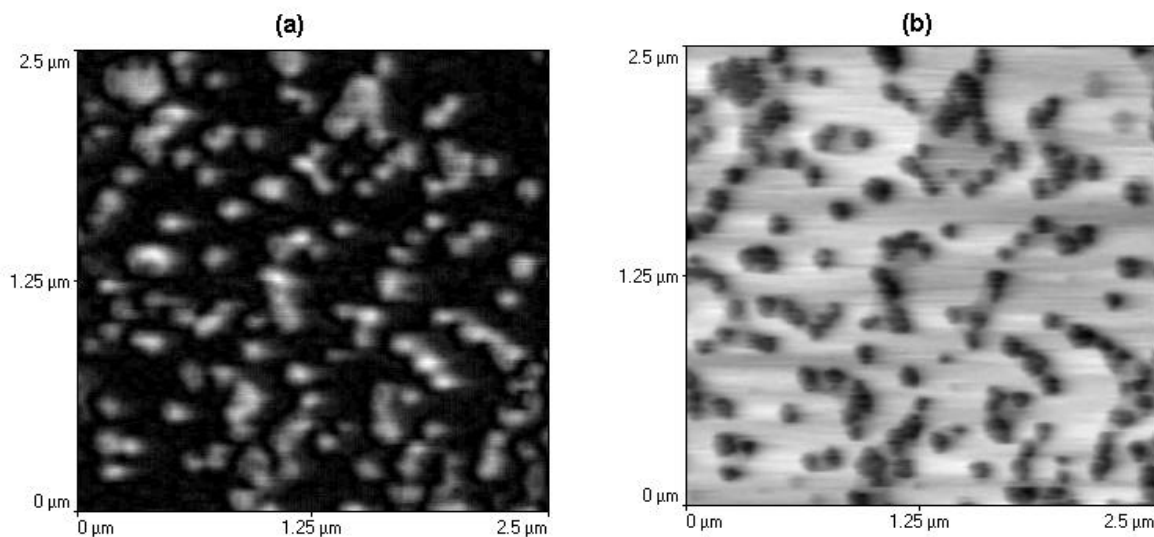


Figura 3.25. Imagens da interface solução/surfatante/mica, exibindo contrastes de imagens (a) padrão e (b) invertido, obtidas com força de varredura de 0,012 nN e 2,56 nN, respectivamente.

As imagens apresentadas na *Figura 3.26*, capturadas após 25, 45, 60 e 105 min de imersão em solução 1×10^{-5} M de CTAB, evidenciam estruturas auto-organizadas, decorrentes da adsorção de moléculas do surfatante sobre a mica, apresentando coeficientes de crescimento diferenciados. Essas imagens exibem o contraste padrão de AFM e foram tomadas mediante o devido ajuste na ‘força de varredura’.

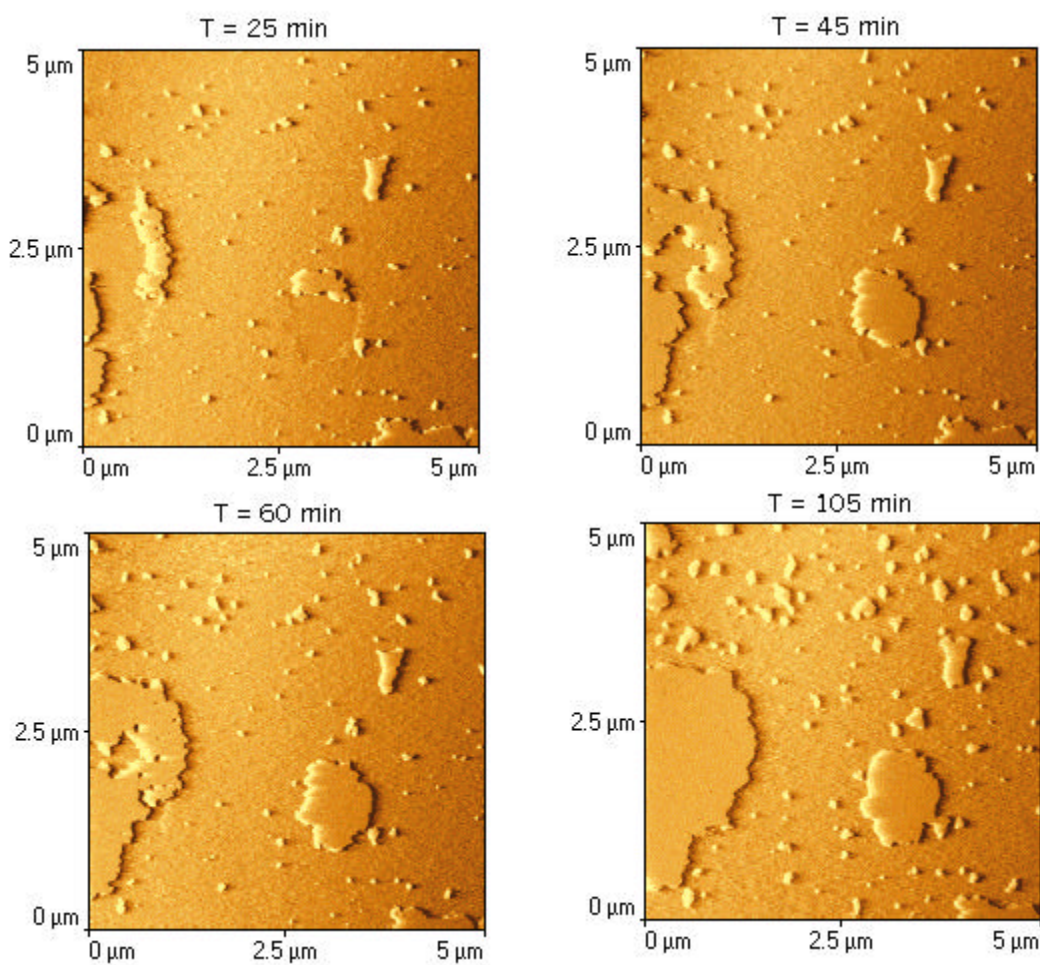


Figura 3.25. Imagens do padrão de adsorção das moléculas do surfatante CTAB na superfície de mica, obtidas após 25, 45, 60 e 105 min de imersão em solução 10^{-5} M.

4. Conclusões

Segundo os resultados aqui apresentados, quando um *tip* é mergulhado em solução aquosa e desloca-se em direção a uma superfície de mica, sofre a ação de forças, atrativas ou repulsivas, ao penetrar na região da dupla camada elétrica. Analisados à luz da teoria *DLVO* e do modelo *FTD* (*força de troca dielétrica*), esses resultados são fortes indícios de que os componentes dessas forças experimentadas pelo *tip* — inicialmente repulsivas e posteriormente atrativas — estão associados com a substituição de uma porção da região da dupla camada com $\epsilon_{DC}(H)$, pelo *tip* com ϵ_{Tip} .

O efeito da troca dielétrica descreve de forma consistente a força que age sobre o *tip*, supondo a existência de uma região da dupla camada, a partir da superfície, que apresente uma polarização de perfil variável (decrecendo em função da distância à superfície).

Com base nas curvas de força medidas por AFM e no modelo proposto, foi possível determinar, pela primeira vez, a variação espacial da permissividade elétrica em interfaces sólido/líquido.

A observação de apenas um componente atrativo da força, quando *tips* com revestimento metálico ($\epsilon_{Tip} \rightarrow \infty$) penetram a dupla camada da interface água/mica, oferece suporte para o modelo proposto. Outra evidência decorre da observação de que *tips* de Si_3N_4 ($\epsilon_{Tip} \approx 7$) são repelidos ou atraídos ao penetrarem em monocamadas ($\epsilon_I \approx 36$) ou bicamadas ($\epsilon_{II} \approx 4$) de CTAB, respectivamente. Suporte adicional é fornecido pela medida de somente um componente repulsivo, quando um *tip* de nitreto de silício mergulha num solvente que não interage com a mica e, conseqüentemente, não apresenta ordenamento na interface.

A investigação e compreensão de mecanismos de adsorção de moléculas representam uma contribuição para diversos setores da indústria, em especial aqueles para os quais os filmes surfatantes são de grande importância tecnológica.

Paralelamente, investigou-se o efeito da força aplicada pelo *tip* durante o processo de varredura sobre o contraste de imagem em AFM. Durante o mapeamento de estruturas maleáveis como surfatantes ou material biológico, imagens invertidas podem ser observadas quando o *tip* penetra as camadas varridas. Membranas fluidas — estruturas formadas por sistemas solvente-surfatante-substrato em superfícies de mica em soluções a 1×10^{-5} , 3×10^{-5} e 5×10^{-5} M de CTAB — foram mapeadas e caracterizadas por medidas de força *versus* distância. Por meio de ajuste da força aplicada e da velocidade de varredura, o contraste convencional pode ser obtido. No processo de obtenção de imagem da frágil camada adsorvida, a intensidade da força aplicada pelo *tip*, durante a varredura, é de fundamental importância. Quando forças intensas são aplicadas, ocorre a remoção da estrutura. Sendo aplicadas forças médias, são geradas imagens de contraste invertido. Somente o emprego de forças de baixa intensidade resulta na obtenção do contraste real.

Também as imagens de estruturas microbianas obtidas, de excelente qualidade, confirmaram o potencial do AFM para visualizar e estudar materiais biológicos. Entre uma grande diversidade de aplicações, citam-se a investigação de mecanismos de adesão de esporos e formação de biofilmes, de grande interesse para as ciências agrárias e diversos campos das ciências biológicas, incluindo a área médica.

5. Referências

1. BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930-933, mar 1986.
2. THERMO MICROSCOPES. **A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy**. Disponível em: < <http://www.thermomicro.com/spmguide/contents.htm> >. Acesso em: 16 jun 2001.
3. KASAS, S.; FELLAY, B.; CARGNELLO, R. Observation of the action of Penicillin on *Bacillus subtilis* using atomic force microscopy: technique for the preparation of bacteria. **Surface and Interface Analysis**, v. 21, n. 6-7, p. 400-401, jun-jul 1994.
4. TESCHKE, O.; DOUGLAS, R.A. Viscous drag effect on imaging of linearized plasmid deoxyribonucleic acid in liquid medium with atomic force microscope. **Applied Physics Letters**, v. 70, n. 15, 1977-1979, abr 1997.
5. SHAO, Z.F.; MOU, J.; CZAJKOWSKY, D.M.; YANG, J.; YUAN, J.-Y. Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed. **Advanced Physics**, v. 45, n. 1, 1-86, jan-fev 1996.
6. HANSMA, H.G.; HOH, J. Biomolecular imaging with the atomic force microscope. **Annual Review of Biophysical Biomolecular Structure**, v. 23, 115-139, 1994.
7. ENGEL, A.; SCHOENENBERG, C.A.; MÜLLER, D.J. High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 2, p. 279-284, abr 1997.
8. BUSTAMANTE, C.; ERIE, D.A.; KELLER, D. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 5, p. 750-760, out 1994.

9. WEINSENHORN, A.L.; HANSMA, P.K.; ALBRECHT, T.R.; QUATE, C.F. Forces in Atomic Force Microscopy in air and Water. **Applied Physics Letters**, v. 54. N. 26, p. 2651-2653, jun 1989.
10. HANSMA, P.K.; ELINGS, V.B.; MARTI, O.; BRACKER, C.E. Scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. **Science**, v. 242, n. 4876, p. 209-216, out 1988.
11. BONNELL, D.A. **Scanning Tunneling Microscopy and Spectroscopy : Theory, Techniques, and Applications**. 2 ed. New york: Wiley-VCH, 2000.
12. COHEN, S.H.; LIGHTBODY, M.L. **Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy 3**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
13. TESCHKE, O.; CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F. Interfacial aqueous solutions dielectric constant measurements using atomic force microscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 326, n. 3-4, p. 328-334 ago 2000.
14. DE SOUZA, E.F.; CEOTTO, G.; TESCHKE, O. Dielectric constant measurements of interfacial aqueous solutions using atomic force microscopy. **Journal of Molecular Catalysis A - Chemical**, v. 167, n. 1-2, p. 235-243, fev 2001.
15. TESCHKE, O.; CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F. Interfacial water dielectric permittivity profile measurements using atomic force microscopy. **Physical Review E**, v. 64, jul 2001. Disponível em: <<http://link.aps.org/abstract/PRE/v64/e011605>>. 10.1103/PhysRevE.64.011605. Acesso em: 20 jul 2001.
16. RUSSEL, W.B.; SAVILLE, D.A.; SCHOWALTER, W.R. **Colloidal Dispersions**. Cambridge: University Press, 1989.
17. ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and Surface Forces**. London: Academic Press, 1989. p. 187-191.
18. GIRARD, C.; VAN LABEKE, D.; VIGOUREUX, J. M. van der Waals force between a spherical tip and a solid-surface. **Physical Review B - Condensed Matter**, v. 40, n. 18, p. 12133-12139, dez 1989.

19. GOODMAN, F.O.; GARCIA, N. Roles of the attractive and repulsive forces in atomic-force microscopy. **Physical Review B - Condensed Matter**, v. 43, n. 6, p. 4728-4731, fev 1991.
20. HARTMANN, U. van der Waals interactions between sharp probes and flat sample surfaces. **Physical Review B - Condensed Matter**, v. 43, n. 3, p. 2404-2407, jan 1991.
21. RABOCKAI, T. **Físico-química de superfícies**. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1979.
22. HUNTER, R.J. **Foundations of Colloid Science**. New York: Oxford University Press, 1987.
23. DRUMMOND C.J.; SENDEN, T.J. Examination of the geometry of long-range tip-sample interaction in atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces A** **87**, v. 87, n. 3, p. 217-234, ago 1994.
24. ISRAELACHVILI, J.N.; Pashley, R.M. Measurement of the hydrophobic interaction between 2 hydrophobic surfaces in aqueous-electrolyte solutions. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 98, n. 2, p. 500-514, 1984.
25. CLAESSEON, P.; Horn, R.G.; Pashley, R.M. Measurement of surface forces between mica sheets immersed in aqueous quaternary ammonium ion solutions. **Journal of Colloid and Interface Science.**, v. 100, n. 1, p. 250-263, 1984.
26. BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. Tunneling through a controllable vacuum gap. **Applied Physics Letters**, v. 40, n. 2, p. 178-180, 1982.
27. BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. Vacuum tunneling. **Physica B & C**, v. 110, n. 1-3, p. 2075-2077, 1982.
28. BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. 7×7 reconstruction on Si(111) resolved in real space. **Physical Review Letters**, v. 50, n. 2, p. 120-123, 1983.

29. BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. (111) facets as the origin of reconstructed Au(110) surfaces. **Surface Science**, v. 131, n. 1, p. L379-L384, 1983.
30. WIESENDANGER, R. **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy – Methods and Applications**. Cambridge: University Press 1994.
31. THERMO MICROSCOPES. Disponível em:
< <http://store.yahoo.com/thermomicro/ultralevers.html> >. Acesso em: 16 jun 2001.
32. MEYER, E.; HEINZELMANN, H.; GRÜTTER, P.; JUNG, T.; WEISSKOPF, T.; HIDBER, H.-R.; LAPKA, R.; RUDIN, H.; GÜNTHERODT, H.-J. Comparative-study of lithium-fluoride and graphite by atomic force microscopy (AFM). **Journal of Microscopy - Oxford**, v. 152, p. 269-280, Part 1 out 1988.
33. ALEXANDER, S.; HELLEMANS, L.; MARTI, O.; SCHNEIR, J.; ELINGS, V.; HANSMA, P.K.; LONGMIRE, M.; GURLEY, J. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical-lever. **Journal of Applied Physics**, v. 65, n. 1, p. 164-167, jan 1 1989.
34. **Atomic force microscopy - Measuring intermolecular interaction forces**. Disponível em: < <http://stm2.nrl.navy.mil/how-afm/how-afm.html> >. Acesso em: 16 jun 2001.
35. CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F.; DOUGLAS, R.A.; TESCHKE, O. Efeitos do tempo de relaxação da dupla camada na resolução das imagens obtidas por microscopia de força atômica. **Anais do XXII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada**, Caxambu, MG, p. 403, mai 1999.
36. CEOTTO, G.; ANDRADE, N.J.; TESCHKE, O. Uso de microscopia de força atômica (AFM) na observação de células e esporos bacterianos, aderidos a superfícies. **Anais do V Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**, Águas de Lindóia, SP, nov 1998.
37. LAL, R.; JOHN, S.A. Biological applications of atomic force microscopy. **American Physiological Society**. v. 266, n. 1, p. C1 – C21, Part 1, jan 1994.

38. BOTTOMLEY, L.A.; COURY, J.E.; FIRST, P.N. Scanning probe microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 12, R185-R230, jun 1996.
39. TESCHKE, O.; DE SOUZA, E.F.; CEOTTO, G. Double layer relaxation measurements using atomic force microscopy. **Langmuir**, v. 15, n. 15, p. 4935-4939, jul 1999.
40. TESCHKE, O.; CEOTTO, G., DE SOUZA, E.F. Imaging of soft structures: Dependence of contrast in atomic force microscopy images on the force applied by the tip. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 18, n. 3, p. 1144-1150, mai-jun 2000.
41. CEOTTO, G.; DE SOUZA, E.F.; TESCHKE, O. Ionic surfactant films imaged by atomic force microscopy. **Journal of Molecular Catalysis A – Chemical**, v. 167, n. 1-2, p. 225-233, fev 2001.
42. TESCHKE, O.; CEOTTO, G., DE SOUZA, E.F. Dielectric exchange-force effect on rupture force of adsorbed bilayers of self-assembled surfactant films. **Applied Physics Letters**, v. 78, n. 14, mai 2001.
43. TABOR, D.; WINTERTON, R.H. Direct measurement of normal and retarded van der Waals forces. **Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences**, v. 312, n. 1511, p. 435-&, 1969.
44. ISRAELACHVILI, J.N.; TABOR, D. Measurement of van der Waals dispersion forces in range 1.5 to 130 nm. **Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences**, v. 331, n. 1584, p. 19-&, 1972.
45. ISRAELACHVILI, J.N.; ADAMS, G.E. Direct measurement of long-range forces between 2 mica surfaces in aqueous KNO₃ solutions. **Nature**, v. 262, n. 5571, p. 773-776, 1976.
46. ISRAELACHVILI, J.N.; NINHAM, B.W. Intermolecular forces - long and short of it. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 58, n. 1, p. 14-25, 1977.

47. ISRAELACHVILI, J.N.; KOTT S.J. Liquid structuring at solid interfaces as probed by direct force measurements - the transition from simple to complex liquids and polymer fluids. **Journal of Chemical Physics**. v. 88, n. 11, p. 7162-7166, jun 1988.
48. ISRAELACHVILI, J.N.; MCGUIGGAN, P.M. Forces between surfaces in liquids. **Science** v. 241, n. 4867, p. 795-800, ago 1988.
49. ISRAELACHVILI, J.N.; MCGUIGGAN, P.M. Adhesion and short-range forces between surfaces .1. new apparatus for surface force measurements. **Journal of Materials Research**, v. 5, n. 10, p. 2223-2231, oct 1990.
50. KÉKICHEFF, P.; CHRISTENSON, H.K.; NINHAM, B.W. Adsorption of cetyltrimethylammonium bromide to mica surfaces below the critical micellar concentration. **Colloids and Surfaces**, v. 40, n. 1-2, p. 31-41 set 1989.
51. DUCKER, W.A.; PASHLEY, R.M. The forces between mica surfaces in ammonium-chloride solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 131, n. 2, p. 433-439, set 1989.
52. DUCKER, W.A.; SENDEN, T.J.; PASHLEY, R.M. Measurement of forces in liquids using a force microscope. **Langmuir**, v. 8, n. 7, p. 1831-1836, jul 1992.
53. BUTT, H.J.; JASCHKE, M.; DUCKER, W. Measuring Surface Forces In Aqueous-Electrolyte Solution With The Atomic-Force Microscope. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 38, n. 1, p. 191-201, ago 1995.
54. A-HASSAN, E.; HEINZ, W.F.; ANTONIK, M.D.; D'COSTA N.P.; NAGESWARAN, S.; SCHOENENBERGER, C.A.; HOH, J.H. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 3, p. 1564-1578, mar 1998.
55. RADMACHER, M.; CLEVELAND, J.P.; FRITZ, M.; HANSMA, H.G.; HANSMA, P.K. Mapping interaction forces with the atomic-force microscope. **Biophysical Journal**, v. 66 n. 6, p. 2159-2165, jun 1994.

56. RADMACHER, M.; FRITZ, M.; HANSMA, P.K. Imaging soft samples with the atomic-force microscope - gelatin in water and propanol. **Biophysical Journal**, v. 69, n. 1, p. 264-270 jul 1995.
57. RADMACHER, M.; FRITZ, M.; KACHER, C.M.; CLEVELAND, J.P.; HANSMA, P.K. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 1, p. 556-567, jan 1996.
58. FRITZ, M.; RADMACHER, M.; PETERSEN, N, GAUB, H.E. Visualization and identification of intracellular structures by force modulation microscopy and drug-induced degradation. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 12, n. 3, p. 1526-1529, mai-jun 1994.
59. SHROFF, S.G.; SANER, D.R.; LAL, R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic-force microscopy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 38, n. 1, p. C286-C292, jul 1995.
60. SHROFF, S.G.; SANER, D.R.; LAL, R. Atomic-force microscopy of atrial cells - local viscoelastic mechanical-properties and imaging of cytoskeleton. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 2, p. A278-A278, Part 2, fev 1994.
61. GOLDMANN, W.H.; EZZELL, R.M. Viscoelasticity in wild-type and vinculin-deficient (5.51) mouse F9 embryonic carcinoma cells examined by atomic force microscopy and rheology **Experimental Cell Research**, v. 226, n. 1, p. 234-237, jul 1996.
62. PUTMAN, C.A.J.; VANDERWERF, K.O.; DEGROOTH, B.G.; VANHULST, N.F.; GREVE, J. Viscoelasticity of living cells allows high-resolution imaging by tapping mode atomic-force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 67, n. 4, p. 1749-1753, out 1994.
63. HAYDON, P.G.; LARTIUS, R.; PARPURA, V.; MARCHESERAGONA S.P. Membrane deformation of living glial cells using atomic force microscopy. **Journal of Microscopy - Oxford**, v. 182, n. 114-120, Part 2, mai 1996.

64. HOH, J.H.; SCHOENENBERGER, C.-A. Surface-morphology and mechanical-properties of MDCK monolayers by atomic-force microscopy. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 1105-1114, Part 5, mai 1994.
65. LANEY, D.E.; GARCIA, R.A.; PARSONS, S.M.; HANSMA, H.G. Changes in the elastic properties of cholinergic synaptic vesicles as measured by atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 72, n. 2, p. 806-813, Part 1, fev 1997.
66. SHARMA, B.G.; BASU, S.; SHARMA, M.M. Characterization of adsorbed ionic surfactants on a mica substrate. **Langmuir**, v. 12, n. 26, p. 6506-6512, dez 1996.
67. WANLESS, E.J.; DUCKER, W.A. Weak influence of divalent ions on anionic surfactant surface-aggregation. **Langmuir**, v. 13, n. 6, p. 1463-1474, mar 1997.
68. HAYES, W.A.; SCHWARTZ, D.K. Two-stage growth of octadecyltrimethylammonium bromide monolayers at mica from aqueous solution below the Krafft point. **Langmuir**, v. 14, n. 20, p. 5913-5917, set 1998.
69. GRANT, L.M.; TIBERG, F.; DUCKER, W.A. Nanometer-scale organization of ethylene oxide surfactants on graphite, hydrophilic silica, and hydrophobic silica. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 22, p. 4288-4294, mai 1998.
70. ISRAELACHVILI, J.; WENNERSTRÖM, H. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. **Nature**, v. 379, n. 6562, p. 219-225, jan 1996 .
71. FRANKS F. **Water: A Comprehensive Treatise**. New York: Plenum, v. 7, 1982.
72. ALLEN M.P.; TILDESLEY D.J. **Computer Simulations of Liquids**. Claredon: Oxford University Press, 1989.
73. ADAMSON A.W. **Physical Chemistry of Surfaces**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1976.
74. LEHNINGER A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

75. PASHLEY, R.M.; MCGUIGGAN, P.M.; HORN, R.G.; NINHAM, B.W. Forces between bilayers of cetyltrimethylammonium bromide in micellar solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 126, n. 2, 569-578, dec 1988.
76. PENFOLD, J.; RICHARDSON, R.M.; ZARBAKHS, A.; WEBSTER, J.R.P.; BUCKNALL, D.G.; RENNIE, A.R.; JONES, R.A.L.; COSGROVE, T.; THOMAS, R.K.; HIGGINS, J.S.; FLETCHER, P.D.I.; DICKINSON, E.; ROSER, S.J.; MCLURE, I.A.; HILLMAN, A.R.; RICHARDS, R.W.; STAPLES, E.J.; BURGESS, A.N.; SIMISTER, E.A.; WHITE, J.W. Recent advances in the study of chemical surfaces and interfaces by specular neutron reflection. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions**, v. 93, n. 22, p. 3899-3917, nov 1997.
77. DROST-HANSEN W. Structure of water near solid interfaces. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 10-&, 1969.
78. CARNIE, S.L.; TORRIE, G.M. The statistical-mechanics of the electrical double-layer advances in chemical physics. v. 56, p. 141-253, 1984.
79. RAGHAVAN, K.; FOSTER, K.; BERKOWITZ, M. Comparison of the structure and dynamics of water at the Pt(111) and Pt(100) interfaces - molecular-dynamics study. **Chemical Physics Letters**, v. 177, n. 4-5, p. 426-432, mar 1991.
80. ROSE, D.A.; BENJAMIN, I. Adsorption of Na^+ and Cl^- at the charged water platinum interface. **Journal Of Chemical Physics**. v.98, n. 3, p. 2283-2290, fev 1993.
81. DU, Q.; FREYSZ, E.; SHEN Y.R. Vibrational-spectra of water-molecules at quartz water interfaces. **Physical Review Letters**, v. 72, n. 2, p. 238-241, jan 1994.
82. PORTER, J.D.; ZINN, A.S. Ordering of liquid water at metal-surfaces in tunnel junction devices. **Journal Of Physical Chemistry**, v. 97, n. 6, p. 1190-1203, fev 1993.

83. ISRAELACHVILI, J.N. Solvation forces and liquid structure, as probed by direct force measurements. **Accounts of Chemical Research**, v.20, n. 11, p. 415-421, nov 1987.
84. GLOSLI, J.; PHILPOTT, M. Microscopic models electrolyte interfaces. **Proceedings Symposium of the Electrochemical Society**, Pennington, NJ, v. 93-5, p. 90, 1993.
85. PASHLEY, R.M.; ISRAELACHVILI, J.N. Molecular layering of water in thin-films between mica surfaces and its relation to hydration forces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 101, n. 2, p. 511-523, 1984.
86. MARCELJA, S.; RADIC, N. Repulsion of interfaces due to boundary water. **Chemical Physics Letters**, v. 42, n. 1, p. 129-130, 1976.
87. LENK, R.; BONZON, M.; GREPPIN, H. Dynamically oriented biological water as studied by NMR. **Chemical Physics Letters**, v. 76, n. 1, p. 175-177, 1980.
88. GUYOT-SIONNEST, P.; HUNT, J.H.; SHEN, Y.R. Sum-frequency vibrational spectroscopy of a langmuir film - study of molecular-orientation of a two-dimensional system. **Physical Review Letters**, v. 59, n. 14, p. 1597-1600, out 1987.
89. SUPERFINE, R.; HUANG, J.Y.; SHEN, Y.R. Experimental-determination of the sign of molecular dipole-moment derivatives - an infrared visible sum frequency generation absolute phase measurement study. **Chemical Physics Letters**, v. 172, n. 3-4, p. 303-306, set 1990.
90. GUYOT-SIONNEST, P.; SUPERFINE, R.; HUNT, J.H.; SHEN, Y.R. Vibrational spectroscopy of a silane monolayer at air solid and liquid solid interfaces using sum-frequency generation. **Chemical Physics Letters**, v. 144, n. 1, p. 1-5, fev 1988.
91. DU, Q.; SUPERFINE, R.; FREYSZ, E.; SHEN, Y.R. Vibrational spectroscopy of water at the vapor water interface. **Physical Review Letters**, v. 70, n. 15, p. 2313-2316, abr 1993.

92. DERJAGUIN, B.V.; ZORIN, Z.M.; RABINOVICH, Y.I.; CHURAEV, N.V. Results of analytical investigation of composition of anomalous water. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 46, n. 3, p. 437-441, 1974.
93. ETZLER, F.M.; DROST-HANSEN, W. Recent thermodynamic data on vicinal water and a model for their interpretation. **Croatica Chemica Acta**, v. 56, n. 4, p. 563-592, 1983.
94. LYKLEMA, J. Water at interfaces - colloid-chemical approach. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 58, n. 2, p. 242-250, 1977.
95. BOCKRIS J.O'M.; REDDY, A.K.N. **Modern Electrochemistry**. New York: Plenum Press, 1970.
96. GRAHAME, D.C. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. **Chemical Reviews**, v. 41, n. 3, p. 441-501, 1947.
97. MCLAUGHLIN, S. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. In: BRONNER, F.; KLEINZELLER, A. (Eds.) **Current topics in membranes and transport 9**. New York: Academic Press, Inc., 1977. 71-144 p.
98. ISRAELACHVILI, J.N.; ADAMS, G.E. Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous-electrolyte solutions in range 0-100 nm. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I**, v. 74, p. 975-&, Part 4 1978.
99. PALMER, L.S.; CUNLIFFE, A.; HOUGH, J.M. Dielectric constant of water films. **NATURE**, v. 170, n. 4332, p. 796-796, 1952.
100. METSIK, M.S.; PEREVERTAEV, V.D.; LIOPO, V.A.; TIMOSHTCHENKO, G.T.; KISELEV, A.B. New data on structure and properties of thin water films on mica crystals. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 43, n. 3, p. 662-669, 1973.
101. METSIK, M.S.; PEREVERTAEV, V.D.; LYUBAVIN, A.K. In: DERJAGUIN, B.V. (Ed.) **Research in Surface Forces**. New York and London: Consultants Bureau, 1975. vol. 4, section IV, 203-217 p.

102. BOCKRIS, J.O'M.; KHAN, S.U.M. **Surface Electrochemistry – A Molecular Level Approach**. New York: Plenum Press, 1993.
103. KAATZE, U.J. The dielectric properties of water in its different states of interaction. **Journal of Solution Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1049-1112, nov 1997.
104. DERJAGUIN, B.V. The world of neglected thicknesses and its place and role in nature and technology. **Colloids and Surfaces A**, v. 79, n. 1, p. 1-9, out 1993.
105. CHURAEV, N.V.; BARDASOV, S.A.; SOBOLEV, V.D. On the non-freezing water interlayers between ice and a silica surface. **Colloids and Surfaces A**, v. 79, n. 1, p. 11-24, out 1993.
106. CHURAEV, N.V. On the forces of hydrophobic attraction in wetting films of aqueous-solutions. **Colloids and Surfaces A**, v. 79, n. 1, p. 25-31, out 1993.
107. GUR, Y.; RAVINA, I.; BABCHIN, A.J. Electrical double-layer theory 2. Poisson-Boltzmann equation including hydration forces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 64, n. 2, p. 333-341, 1978.
108. PODGORNIK, R.; CEVC, G.; ZEKS, B. Solvent structure effects in the macroscopic theory of vanderwaals forces. **Journal of Chemical Physics**, v. 87, n. 10, p. 5957-5967, nov 1987.
109. KÉKICHEFF, P.; SPALLA, O. Refractive index of thin aqueous films confined between two hydrophobic surfaces. **Langmuir**, v. 10, n. 5, p. 1584-1591, mai 1994.
110. FRÖHLICH, H. **Theory of Dielectrics**. New York: Oxford University Press, 1949.
111. BUTT, H.-J.; WOLFF, E.K.; GOULD, S.A.C.; NOTHERN B.D.; PETERSON, C.M.; HANSMA, P.K. Imaging cells with the atomic force microscope, **Journal of Structural Biology**, v. 105, n. 1-3, p. 54-61, out-dez 1990.
112. GUNNING, P.A.; KIRBY, A.R.; PARKER, M.L. GUNNING, A.P.; MORRIS, V.J. Comparative imaging of *Pseudomonas putida* bacterial biofilms by scanning electron

- microscopy and both DC contact and AC non-contact atomic force microscopy.
Journal of Applied Bacteriology, v. 81, n. 3, p. 276-282, set 1996.
113. Johansen, C.; Gill, T.; Gram, L. Changes in cell morphology of *Listeria monocytogenes* and *Shewanella putrefaciens* resulting from the action of protamine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1058-1064, mar 1996.
 114. BRAGA, P.C.; RICCI, D. Atomic force microscopy: Application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 18-22, jan 1998.
 115. CAMESANO, T.A.; NATAN, M.J.; LOGAN, B.E. Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. **LANGMUIR**, v. 16, n. 10, p. 4563-4572, mai 2000.
 116. FIRTEL, M.; BEVERIDGE, T.J. Scanning probe microscopy in microbiology. **Micron**, v. 26, n. 4, p. 347-362, 1995.
 117. KIRBY, A.R.; GUNNING, A.P.; WALDRON, K.W.; MORRIS, V.J.; NG, A. Visualization of plant cell walls by atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 3, p. 1138-1143, mar 1996.
 118. SANTSCHI, P.H.; BALNOIS, E.; WILKINSON, K.J.; ZHANG, J.W.; BUFFLE, J. Fibrillar polysaccharides in marine macromolecular organic matter as imaged by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. **Limnology and Oceanography**, v. 43, n. 5, p. 896-908, jul 1998.
 119. RUTLAND, M.W.; PARKER, J.L. Surface forces between silica surfaces in cationic surfactant solutions - adsorption and bilayer formation at normal and high pH. **Langmuir**, v. 10, n. 4, p. 1110-1121, abr 1994.
 120. YAMINSKY, V.; JONES, C.; YAMINSKY, F.; NINHAM, B.W. Onset of hydrophobic attraction at low surfactant concentrations. **Langmuir**, v. 12, n. 15, p. 3531-3535, jul 1996.

121. RADLER, J.; RADMACHER, M.; GAUB, H.E. Velocity-dependent forces in atomic-force microscopy imaging of lipid films. **Langmuir**, v. 10, n. 9, p. 3111-3115, set 1994.
122. BLACKMAN, G.S.; MATE, C.M.; PHILPOTT, M.R. Interaction forces of a sharp tungsten tip with molecular films on silicon surfaces. **Physical Review Letters**, v. 65, n. 18, p. 2270-2273, out 1990.
123. SENDEN, T.J.; DRUMMOND, C.J. Surface chemistry and tip-sample interactions in atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces A**, v. 94, n. 1, p. 29-51, jan 1995.
124. SADER, J.E.; LARSON, I. MULVANEY, P.; WHITE, L.R. Method for the calibration of atomic-force microscope cantilevers. **Review of Scientific Instruments**, v. 66, n. 7, p. 3789-3798, jul 1995.
125. **Atomic force microscopy - Measuring intermolecular interaction forces.** Disponível em: < <http://stm2.nrl.navy.mil/how-afm/how-afm.html> >. Acesso em: 16 jun 2001.
126. SASSAKI, R.M.; DOUGLAS, R.A.; KLEINKE, M.U.; TESCHKE, O. Structure imaging by atomic force microscopy and transmission electron microscopy of different light emitting species of porous silicon. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 14, n. 4, p. 2432-2437, jul-ago 1996.
127. NIR S.; VASSILIEFF, C.S. van der Waals interaction in thin films. In: IVANOV, I.B. (Ed.) **Thin Liquid Films: Fundamental and Applications**. New York: M. Dekker Inc., 1988, 207-274 p.
128. BUTT H.-J. Electrostatic interaction in atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 60, n. 4, p. 777-785, out 1991.
129. PARSEGIAN, V.A.; GINGELL, D. Electrostatic interaction across a salt solution between 2 bodies bearing unequal charges. **Biophysical Journal**, v. 12, n. 9, p. 1192-& 1972.

130. BECKER R.; SAUTER, F. **Electromagnetic Fields and Interactions**. New York: Dover, 1982.
131. LI, B.Y.; FUJII, M.; FUKADA, K.; KATO, T. SEIMIYA, T. Time dependent anchoring of adsorbed cationic surfactant molecules at mica/solution interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 209, n. 1, p. 25-30, jan 1999.
132. GAINES, G.L.; TABOR, D. Surface adhesion and elastic properties of mica. **Nature**, v. 178, n. 4545, p. 1304-1305, 1956.
133. WARR, G.G.; SEN, R.; EVANS, D.F.; TREND, J.E. Microemulsion formation and phase-behavior of dialkyldimethylammonium bromide surfactants. **Journal of Physical Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 774-783, fev 1988.
134. CLAEISSON, P.; HORN, R.G.; PASHLEY, R.M. Measurement of surface forces between mica sheets immersed in aqueous quaternary ammonium ion solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 100, n. 1, p. 250-263, 1984.
135. TANFORD, C. **The Hydrophobic Effect**. New York: Wiley, 1980.
136. CAMPANELLI, A.R.; SCARAMUZZA, L. Hexadecyltrimethylammonium bromide. **Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications**, v. 42, Part 10, p. 1380-1383, out 1986.
137. FRAGNETO, G. THOMAS, R.K.; RENNIE, A.R. PENFOLD, J. Neutron reflection from hexadecyltrimethylammonium bromide adsorbed on smooth and rough silicon surfaces. **Langmuir**, v. 12, n. 25, p. 6036-6043, dez 1996.
138. LIDE, D.R. (Editor-in-Chief) **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 78th ed. Boca Raton/New York: CRC Press, 1997-1998.
139. MCGUIGGAN, P.M.; PASHLEY, R.M. Forces between mica surfaces in dilute-solutions of a double-chained quaternary ammonium ion surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 124, n. 2, p. 560-569, ago 1988.

140. JOHNSON, S.B.; DRUMMOND, C.J.; SCALES, P.J.; NISHIMURA, S.
Comparison of techniques for measuring the electrical double-layer properties of surfaces in aqueous-solution - hexadecyltrimethylammonium bromide self-assembly structures as a model system. **Langmuir**, v. 11, n. 7, p. 2367-2375, jul 1995.
141. KINDT, J.T.; SCHMUTTENMAER, C.A. Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 24, p. 10373-10379, jun 1996.
142. PAUNOV, V.N.; DIMOVA, R.I.; KRALCHEVSKY, P.A.; BROZE, G.; MEHRETEAB, A. The hydration repulsion between charged surfaces as an interplay of volume exclusion and dielectric saturation effects. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 182, n. 1, p. 239-248, set 1996.