

Métodos de Microscopia para a Análise do Efeito Antimicrobiano da Terapia Fotodinâmica

Walter Miyakawa e Martha Simões Ribeiro

1. INTRODUÇÃO

A microscopia é uma forma relativamente simples e direta para visualizar contornos e estruturas de fungos e bactérias, com qualidade e resolução. Mas, há algum tempo, deixou de ser meramente uma ferramenta de obtenção de imagens. Contínuos aprimoramentos tecnológicos, não só dos microscópios, como também dos computadores, *softwares*, e sistemas digitais de aquisição de imagem, transformaram a microscopia numa poderosa técnica de caracterização de superfícies, agregando informações quantitativas, e beneficiando a pesquisa científica como um todo.

Do microscópio óptico,^{1,2} em sua configuração mais básica, à família de microscópios de sonda de varredura,³ da qual faz parte o microscópio de força atômica,⁴ existe uma ampla gama de técnicas e equipamentos. Informações distintas, mas complementares entre si, podem ser obtidas e, via de regra, é aconselhável que mais de uma forma de microscopia seja utilizada.

A escolha da microscopia mais apropriada para cada situação deve levar em conta, primordialmente, os objetivos da análise (quais são as informações relevantes) e a relação custo-benefício, não só no aspecto financeiro, mas, principalmente, na facilidade técnica e no tempo de análise. Fatores críticos como magnificação, resolução (espacial e de contraste), campo de visão (extensão lateral) e/ou profundidade de foco (extensão vertical), forma de análise (de formatos, motilidade, presença de componentes químicos, de algumas atividades microbianas, ou de determinação de dimensões, parâmetros e teores de componentes ou fases etc.), e, mesmo, compatibilidade das técnicas, entre si, também devem ser considerados previamente. Obviamente, isto requer um razoável domínio dos princípios de funcionamento de cada tipo de microscopia, das formas de operação, das exigências para o preparo de amostra e, principalmente, dos possíveis artefatos (falsas estruturas) gerados pela ferramenta. Mas, este não é o foco deste texto, e uma descrição detalhada e abrangente das diversas formas de microscopia deve ser buscada em literatura específica.

O objetivo deste capítulo é fornecer subsídios ao leitor, leigo em microscopia, para auxiliá-lo na escolha da técnica, bem como na compreensão e interpretação das micrografias para a análise do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês, *antimicrobial photodynamic therapy*).

2. IMAGENS DE MICROSCOPIA

2.1 Microscopias de luz

Normalmente, o primeiro recurso utilizado para a visualização de microrganismos é o microscópio óptico.¹ Neste instrumento, assim como em outras variantes de microscopia de luz (por exemplo, luz polarizada, contraste de fase e contraste por interferência diferencial, varredura confocal a *laser* e de fluorescência), as amostras podem ser observadas em seu estado natural, embora seja necessário, em alguns casos, fixar e corar os microrganismos. A imagem é obtida em tempo real, com o auxílio, basicamente, de um par de sistemas de lentes convergentes: uma ocular e uma objetiva. A magnificação total fornecida pelo microscópio será o produto das ampliações da objetiva e da ocular. Os microscópios ópticos mais modernos chegam a produzir ampliações de 2.000×, com resolução lateral de cerca de 300 nm e vertical de, aproximadamente, 1 µm.

Um equívoco muito comum é atribuir o valor de magnificação às micrografias: por exemplo, 400×, quando se utiliza a objetiva de 40× e a ocular de 10×. Esta magnificação vale, unicamente, para a imagem vista na ocular. Ao transferi-la

para a câmera, computadores, monitores de vídeo ou papel, essa imagem sofre ampliações e reduções, que dependem dos diversos processos que ocorrem durante a trajetória. Com isso, a ampliação do sistema de lentes perde totalmente seu significado e, rigorosamente, não deve sequer ser citada. A barra de escala, sim, deve obrigatoriamente estar presente na micrografia, uma vez que acompanha as variações de ampliação que a imagem sofreu, e é, de fato, o único parâmetro de dimensão relevante da micrografia.

As antigas limitações de campo de visão e profundidade de foco (Figura 13.1A) deixaram de ser problema. Com lentes mais modernas, câmeras digitais de alta resolução (espacial, de 13 megapixels; de luz, de 12 ou 16 bits), sistemas de filtragem óptica e recursos de *software*, é possível fazer a aquisição em camadas verticais, para compor uma imagem com maior profundidade de foco, melhor definição e alto contraste, como mostra a Figura 13.1B, ou mosaicos, a partir de um conjunto de imagens laterais de um objeto de maior extensão (Figura 13.1C). Podem-se até mesmo, efetuar medidas de diâmetro (Figura 13.2A), dimensões de estruturas (Figura 13.2B), ou ângulos (Figura 13.2C).

Na microscopia de varredura confocal a *laser*⁵⁻⁷ (CSLM, do inglês *confocal scanning laser microscopy*), um feixe de *laser* é utilizado como fonte de luz, e também é possível a aquisição de imagens em planos verticais sucessivos, para compor uma imagem focalizada de microestruturas a diferentes profundidades ou alturas. Além disso, podem ser construídas visualizações tridimensionais, embora o eixo vertical represente intensidade de pixel da luz refletida ou espalhada, e não a

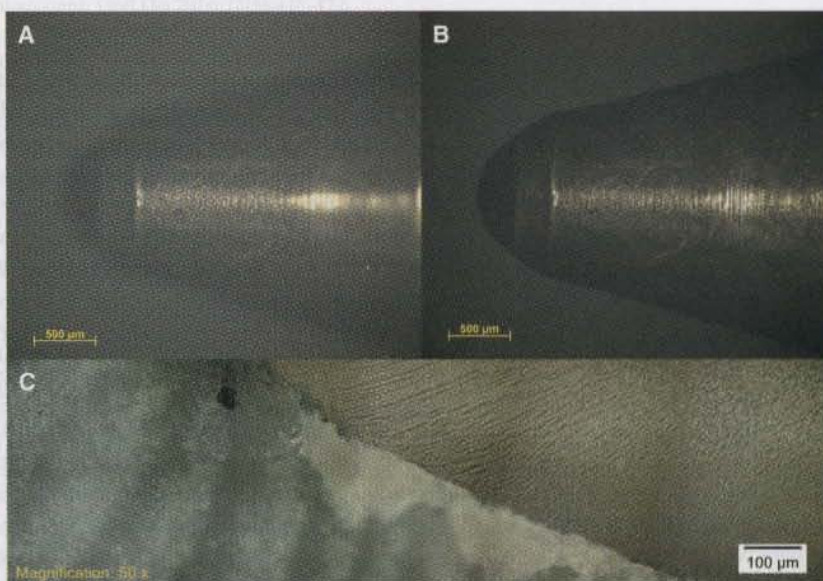


FIGURA 13.1 Fotomicrografias da extremidade de uma caneta esferográfica com um plano focal (A e B), e com maior profundidade foco, construído por composição de imagens verticais obtidas no microscópio óptico Zeiss, modelo AxioImager A2m. C, Mosaico de seção transversal de uma região de interface amelodentinária de terceiro molar humano, obtido no microscópio óptico Olympus, modelo BX51.

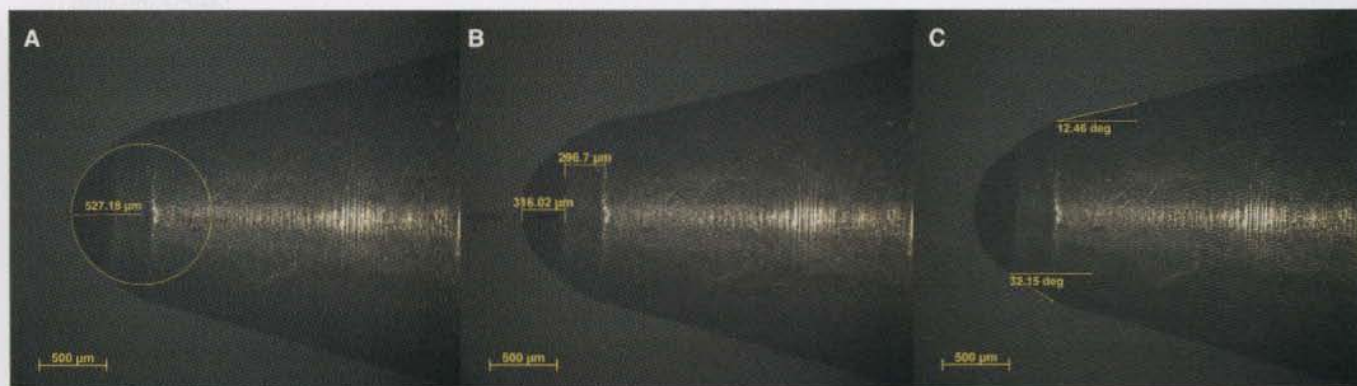


FIGURA 13.2 Medidas de (A) diâmetro, (B) distâncias e (C) ângulos da extremidade de uma caneta esferográfica, utilizando o *software* AxioVision LE, do microscópio óptico Zeiss, modelo AxioImager A2m.

topografia de superfície. Comparado ao microscópio óptico, o de varredura confocal a *laser* consegue magnificações maiores ($\sim 14.400\times$), resolução lateral de 120 nm e análise em camadas de 0,5-1,5 μm , para amostras de até 50 μm de espessura.⁵

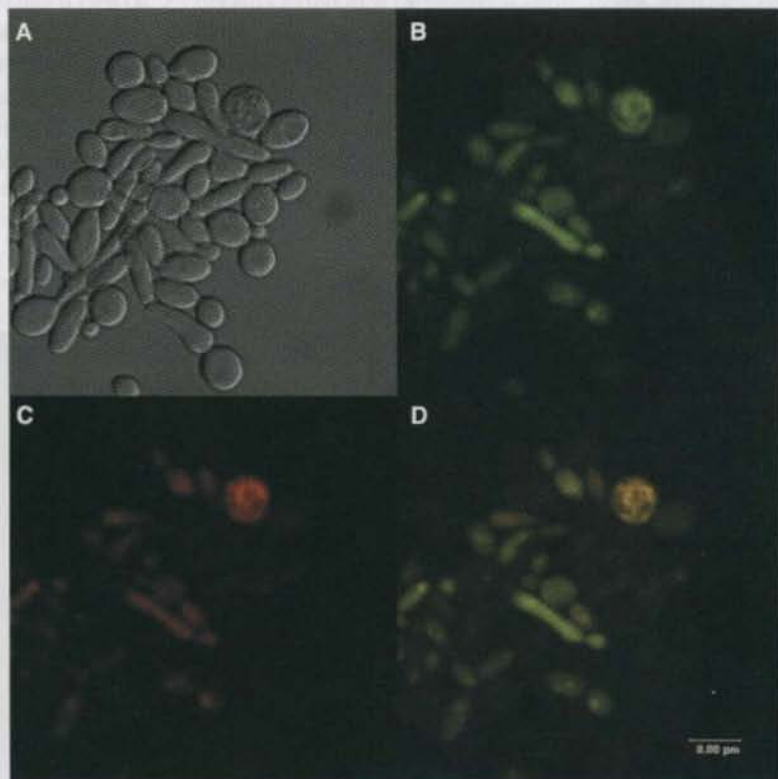
Ao utilizar um microscópio em que a fonte de luz é proveniente de um *laser*, particularmente, em estudos de terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *photodynamic therapy*) deve-se considerar a possibilidade de os fotossensibilizadores (FS), utilizados como cromóforos, e/ou de os próprios microrganismos absorverem a radiação. Os *lasers* mais comumente utilizados emitem em 352 nm, 364 nm, 405 nm, 408 nm, 430 nm, 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm, 543 nm, 561 nm, 596 nm, e 633 nm.

A maioria dos microscópios confocais também permite a obtenção de imagens da fluorescência emitida pela amostra. Este recurso, conhecido como microscopia de fluorescência, tem sido muito utilizado na terapia fotodinâmica.⁶⁻¹⁴

A ideia básica dessa microscopia^{15,16} é induzir a fluorescência na amostra ou em suas subestruturas, iluminando com radiação com comprimento de onda apropriado. Filtrando a luz de retorno, podem-se coletar somente as componentes de maior comprimento de onda, ou seja, a fluorescência emitida pelo fluoróforo. A microscopia de fluorescência tem maior sensibilidade, uma vez que o sinal é coletado por um detector fotomultiplicador; é seletiva, pois, escolhendo-se o fluoróforo apropriado, visualiza-se somente a estrutura de interesse; e permite a visualização de mais de um fluoróforo, simplesmente alterando-se a luz de excitação ou os filtros.

A Figura 13.3 mostra um exemplo de visualização de mais de um fluoróforo. Para isso, células do fungo *Candida albicans* foram coradas com azul de metileno (AM) (fluorescência na região do vermelho), e com rodamina 123 (fluorescência na região do verde). As imagens, gentilmente cedidas pelo Dr. Renato A. Prates, foram obtidas em um microscópio confocal (Leica TCS NT, Leica Mikroskopie und System GmbH, Wetzlar, DE), utilizando um espelho dicróico, para 580 nm, acoplado a um filtro passa-banda de 525-550 nm, para a região verde, e o espelho dicróico associado ao filtro passa-banda maior que 665 nm para o vermelho. A Figura 13.3A mostra a micrografia confocal de transmissão do campo avaliado, a qual podem ser vistas células do microrganismo. A Figura 13.3B e C apresenta as imagens para a fluorescência do azul de metileno e da rodamina 123, respectivamente. Como a imagem filtrada por cor (comprimento de onda) é monocromática, falsas cores (verde e vermelha) foram sobrepostas para a formação das imagens exibidas. Na Figura 13.3D foi feita a sobreposição das fluorescências. Como a rodamina acumula-se preferencialmente em mitocôndrias, a coloração amarela na imagem indica que o azul de metileno deve também estar presente nessas mitocôndrias.

FIGURA 13.3 A a D, Imagens por microscopia de fluorescência do fungo *Candida albicans* coradas com azul de metileno e rodamina 123. (Imagens gentilmente cedidas por R. A. Prates.)



Diversos fatores contribuem para a qualidade das imagens por fluorescência:¹⁶ escolha dos fluoróforos, intensidade e comprimento de onda da luz de excitação, filtros utilizados, magnificação e, principalmente, a fotodegradação dos próprios fluoróforos, que podem se tornar irreversivelmente não fluorescentes, pela reação com oxigênio e seus radicais.¹⁷

2.2 Microscopias eletrônicas

Os dois tipos principais de microscopia eletrônica usados em PDT são a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A MEV, por apresentar excelente profundidade de foco, permite a análise de superfícies, enquanto a MET permite a análise interna das amostras.

A MET desenvolveu o primeiro microscópio eletrônico.¹⁸ Seu *design* óptico básico é comparável àquele do microscópio óptico básico. É um microscópio constituído por um sistema de iluminação (encarregado de gerar o feixe de elétrons), uma coluna que contém o sistema de lentes (condensadoras, objetivas, intermediárias e projetoras), um sistema de aquisição de informação e o porta-amostras. O coração do MET é a lente objetiva, porque é ela que limita o poder de resolução do microscópio. As lentes intermediárias e projetoras são as encarregadas de projetar e magnificar a imagem, seja numa tela fosforescente, num filme fotográfico, seja capturada por uma câmera CCD.¹⁹

A MET, portanto, consiste na geração de um feixe de elétrons, que é transmitido através de uma amostra ultrafina (transparente ao feixe). Os feixes resultantes da interação com a amostra combinados através da lente objetiva vão trazer informação interna do material analisado.²⁰

A microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta poderosa para a observação de células e/ou tecidos biológicos, já que permite não só visualizar morfologia, mas também identificar as ultraestruturas celulares (Figura 13.4A e B).

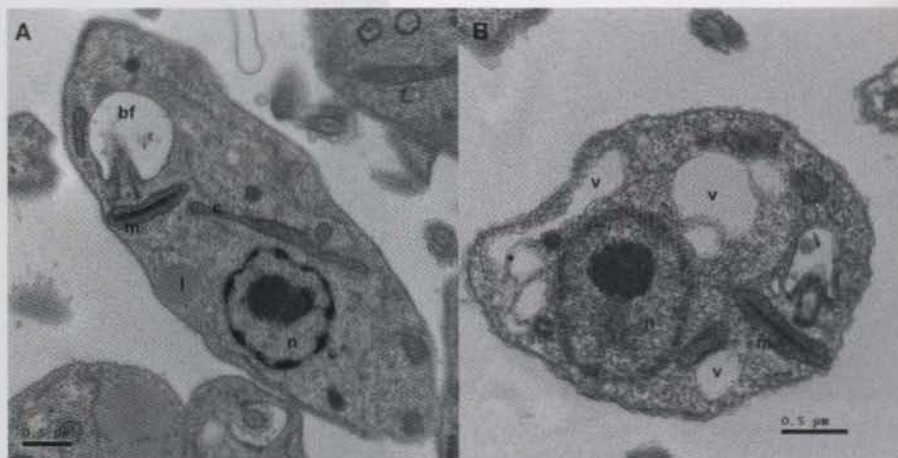
Em geral, MET operam com tensão de aceleração de 50 a 1.000 KV, oferecendo uma magnificação de 1.000 a 300.000× com resolução de 3Å. Até hoje, a MET continua sendo o equipamento de escolha para caracterização de amostras com altas magnificação e resolução.

A microscopia eletrônica de varredura^{21,22} também é uma técnica com grande poder de ampliação (10 a 200.000 ×) e profundidades de campo cerca de 300× maiores do que as de um microscópio óptico. Na MEV, um feixe focalizado de elétrons é acelerado contra a superfície da amostra, com tensões entre 1 e 50 KV, de modo a varrer a superfície da amostra, ao longo de linhas sucessivas e justapostas. Em cada linha, as interações, ponto a ponto, são detectadas e utilizadas para gerar uma imagem de vídeo em tempo real.

As interações ocorrem da seguinte forma: uma parte dos elétrons provoca a emissão de raios X e dos chamados elétrons secundários. Os elétrons secundários têm baixa energia (< 50 eV) e são responsáveis pela formação de imagens de relevo da superfície, com alta resolução (3-5 nm). A outra parte dos elétrons primários é retroespalhada, possui energia predominantemente próxima ao do feixe incidente (> 50 eV) e, além de informações topográficas, fornece contrastes relacionados ao número atômico dos elementos presentes nas camadas mais superficiais da amostra.

Uma vantagem adicional da MEV é a sua capacidade de análise química, conhecida como microanálise por energia dispersiva de raios X,²¹ ou espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS, do inglês, *energy-dispersive X-ray*

FIGURA 13.4 Eletromicrografias de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. **A**, Célula após irradiação (LED de emissão vermelha, 100 mW, 5 min). **B**, Após aPDT mediada por azul de metileno (50 µm por 10 min de pré-irradiação). Após somente irradiação, nenhuma mudança significativa foi observada em relação a células-controle sem tratamento. Após aPDT, note o encolhimento celular, a intensa vacuolização do citoplasma, a mitocôndria aumentada e a cromatina dispersa no núcleo.³⁷ bf, bolsa flagelar; m, mitocôndria; n, núcleo; l, corpo lipídico; c, cinetoplasto; v, vacúolos.



spectrometer). Quando um elétron do feixe incidente colide com um átomo na superfície da amostra e provoca a emissão de um elétron de um nível mais interno (elétron Auger), o fóton formado fica em um estado excitado instável. O decaimento é imediato e acompanhado pela emissão de raios X. O sinal de raios X é captado por detector de dispersão de energia, fornecendo uma curva de intensidade de sinal em função da sua energia. Como o espectro é característico do elemento que o produziu, podem-se, assim, obter a identificação e o teor relativo dos elementos na superfície observada.

Até pouco tempo atrás, as análises só podiam ser feitas em câmaras a baixa pressão (10^{-6} torr, lembrando que a pressão atmosférica é de 760 torr), e amostras biológicas deveriam, necessariamente, ser desidratadas e recobertas com um filme fino, condutor elétrico.

Na desidratação de microrganismos, por exemplo, utiliza-se etanol, à concentração de 70% (ou 77°GL), em uma de suas etapas. Mas, o etanol também é solvente de lipídeos.²³⁻²⁵ Desse modo, estruturas lipídicas de membranas, tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas, sofrem alterações já no processo de desidratação, o que pode comprometer a análise.

Mas, assim como a microscopia de luz, a microscopia eletrônica de varredura também passou por significativos avanços. Atualmente, os equipamentos podem operar a pressões variáveis, entre 0,07 e 2,00 torr, com diferentes gases, ou mesmo, com vapor de água. Também foram desenvolvidas MEV chamadas de *tabletop*, menores, portáteis, versáteis e de operação quase tão simples quanto a do microscópio óptico. Não há necessidade de desidratação de amostras ou de recobrimento com filmes finos condutores, e recursos de *software* para a realização de medidas quantitativas das estruturas foram também incorporados.

A Figura 13.5 apresenta micrografias eletrônicas de varredura de biofilmes de leveduras do gênero *Candida*. Os biofilmes foram crescidos sobre placas de poliuretano, de 1 cm × 1 cm, por 48 h, em incubadora *shaker*, a 37 °C e sob agitação constante a 110 rpm. As imagens foram obtidas com as amostras sem nenhum tipo de preparo, ou seja, não foram desidratadas nem recobertas com filme fino condutor.

Tradicionalmente, na microscopia eletrônica de varredura, os elétrons do feixe primário são gerados por emissão termiônica. Um filamento, geralmente de tungstênio, é aquecido a temperaturas na quais seus elétrons tenham energia suficiente para escapar do material. Em seguida, são focalizados e acelerados em direção à amostra.

Atualmente, existe um sistema mais refinado de emissão de elétrons, chamado de emissão por campo elétrico. Em vez do filamento, utiliza-se uma agulha, também de tungstênio, com raio, na extremidade de emissão, da ordem de centena de nanômetros. Ao ser submetido a campos eletrostáticos suficientemente intensos, ocorre a emissão de elétrons na ponta. A vantagem desse sistema é a produção de feixes muito mais intensos ($\sim 1.000\times$ a do filamento), finos (raios da ordem de nm) e com baixas energias (~ 1 KV). Em contrapartida, esse sistema exige condições de vácuo mais alto do que na MEV convencional. Além de reduzir a necessidade de amostras condutoras, esses feixes produzem magnificações maiores, com imagens de alta resolução e contraste. Na PDT, a microscopia eletrônica de varredura com elétrons por emissão de campo (FE-SEM, do inglês, *field emission-scanning electron microscopy*) já está sendo utilizada, por exemplo, para caracterizar nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4), com dimensões da ordem de 100 nm, que são conjugadas com o fotosensibilizador hematoporfirina, para avaliar o seu efeito anticancerígeno.²⁶ Essa técnica também foi usada na avaliação do efeito da aPDT em *Staphylococcus aureus*, quando se utilizam nanotubos de carbono de parede única, conjugados com a porfirina como fotossensibilizador.²⁷

As microscopias eletrônicas são comumente usadas como padrão para a caracterização de materiais, pois fornecem imagens de alta credibilidade e não apresentam dificuldades de interpretação. Mas, uma das desvantagens para o estudo dos efeitos da aPDT é a impossibilidade de avaliação das mesmas amostras, antes e após a aPDT.

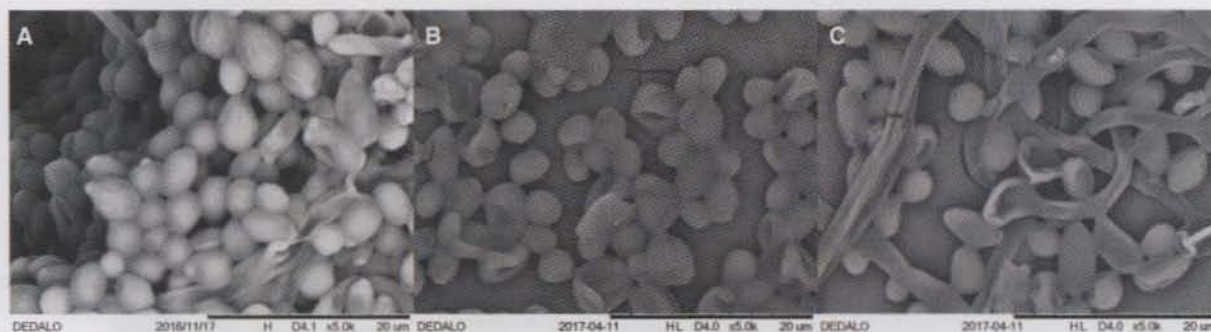


FIGURA 13.5 Eletromicrografias de varredura de (A) *Candida parapsilosis*, (B) *Candida tropicalis* e (C) *Candida albicans*.

2.3 Microscopia de força atômica

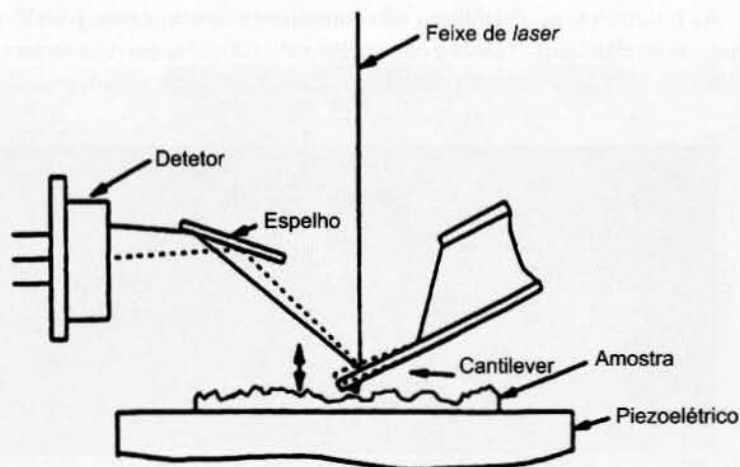
A microscopia de força atômica^{3,4} (AFM, do inglês, *atomic force microscopy*) é uma técnica de caracterização de superfícies que, assim como as microscopias confocal e eletrônica, baseia-se na varredura da superfície da amostra. Mas, em vez do feixe de *laser*, ou de elétrons, a AFM utiliza uma sonda em forma de agulha (ponta), extremamente fina, para fazer a varredura. Esta sonda está localizada na extremidade de uma haste flexível, chamada *cantilever*, e, durante a varredura, o *cantilever* sofre deflexões de acordo com as variações de topografia da superfície. Estas variações são detectadas com o auxílio de um feixe de *laser* refletido pelo *cantilever* sobre um fotodetector, como mostra a Figura 13.6. O sinal do fotodetector é enviado a um computador, que realimenta o circuito e transforma esse sinal em coordenadas *x,y,z*. Com base nessas coordenadas, a imagem da superfície é facilmente reconstruída pelo *software* da AFM.

Como bem descrito por Morris et al.,⁴ diferentemente das outras microscopias (de luz e eletrônica), a microscopia de força atômica gera imagens "tateando", e não "olhando" a amostra. Conseguem-se ampliações equivalentes a um bilhão de vezes, com o mesmo nível de precisão lateral e vertical (da ordem de décimos de nanômetros). Também não requer preparo de amostra, o que a torna bastante atraente para aplicações não só na microbiologia,²⁸⁻³⁰ como também na aPDT,^{7,31-34} pois é possível examinar as mesmas amostras antes e depois da aPDT sem que nenhum tratamento adicional seja necessário. Como são armazenadas coordenadas espaciais das microestruturas da superfície da amostra, é possível realizar medidas, cálculos e estatísticas de diversos parâmetros. Em outras palavras, a AFM é uma técnica que, além de imagens bi e tridimensionais, de alta resolução e contraste, fornece diretamente informações quantitativas.

O microscópio de força atômica pode operar de três modos diferentes: contato, não contato e contato intermitente. No modo de contato, a varredura é feita mantendo-se a ponta em contato permanente, com o *cantilever* levemente pressionado contra a amostra. No modo de não contato, a varredura é feita com o *cantilever* oscilando a frequências próximas às de ressonância do *cantilever*, a uma altura constante da superfície da amostra, de forma que variações de topografia sejam detectadas monitorando-se as variações de frequência e/ou amplitude de oscilação do *cantilever*. No modo de contato intermitente, a varredura também é feita com o *cantilever* oscilando a frequências próximas às de ressonância, mas a distâncias intermediárias, entre as do modo de contato e as de não contato, de maneira que a ponta "toque" gentilmente a superfície da amostra. As variações de topografia também são detectadas monitorando-se as variações de frequência e/ou amplitude de oscilação do *cantilever*. A escolha do modo de operação depende de características da amostra, como adesividade, rigidez e fragilidade.

Uma das maiores desvantagens da microscopia de força atômica está no tempo de obtenção da imagem. As varreduras não são tão rápidas quanto na MEV ou no microscópio confocal, pois, a cada ponto de medida, ao longo de uma linha, ocorre um processo mecânico, de deflexão do *cantilever*, que deve ser estável e preciso. As variações de deflexão são detectadas por um fotodetector, transformadas em coordenadas de altura, por meio de cálculos numéricos, e armazenadas no computador. Assim, uma imagem com resolução de 512 pixels \times 512 pixels, o que significa medir 512 linhas, com 512 pontos por linha, a uma taxa de varredura de uma linha por segundo, demora 512 segundos (\sim 8,5 minutos) para ser concluída. Dependendo das características da amostra, é bastante comum uma demora de 40 minutos, ou mais, para a aquisição de uma primeira imagem, que, geralmente, não é a mais representativa da amostra. Porém, uma vez adquirida a imagem, é fácil efetuar cálculos e gráficos de dimensões, estruturas, caracterizar grãos, determinar parâmetros de rugosidade, avaliar o perfil de linhas em qualquer região e em qualquer direção de uma imagem, ou em subáreas dessa imagem.

FIGURA 13.6 Diagrama esquemático do microscópio de força atômica.



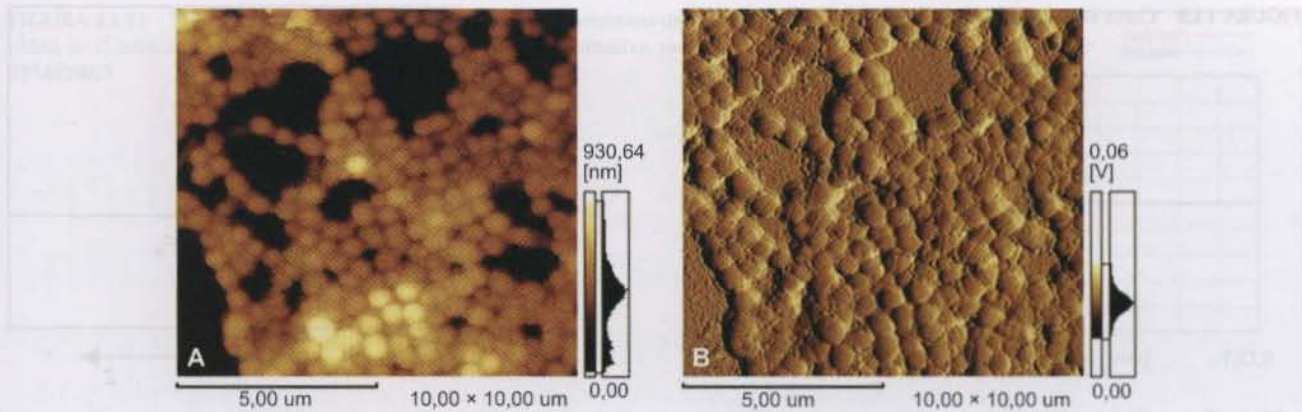


FIGURA 13.7 Visualizações bidimensionais de imagens de biofilme de *Streptococcus mutans* obtidas por AFM (SPM9500J3, Shimadzu Corp., JP), em modo de contato intermitente, com área de varredura de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, exibindo (A) topografia e (B) deflexão do *cantilever*.

A Figura 13.7 mostra imagens de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre lâmina de microscópio, obtida por AFM (SPM9500J3, Shimadzu Corp., JP), em modo de contato intermitente, com área de varredura de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Na visualização bidimensional de alturas (Figura 13.7A), observam-se células esféricas de *S. mutans*, com distribuição uniforme de tamanho, envolvidas por uma pequena quantidade de matriz extracelular (EPS, do inglês, *extracellular polymeric substance*). As células de coloração mais clara estão topograficamente mais altas, revelando sobreposição de microrganismos em algumas regiões do biofilme. À direita da imagem, são mostrados uma escala de cores e o histograma de alturas correspondente à cada tonalidade de cor. Para esta micrografia, em particular, a diferença de altura, medida entre o ponto mais baixo e o mais alto da imagem, foi de 930,64 nm. Na Figura 13.7B, o mapa de variação de deflexão (movimentação não convertida em altura) do *cantilever*, da mesma região em que foi feita a imagem de topografia, pode ser interpretado como o equivalente ao que uma pessoa cega sente ao tatear um objeto para avaliar sua forma, textura e rigidez. Além de melhor definição de contorno das células, as microestruturas de baixo relevo ficam mais bem evidenciadas. Várias células apresentaram um sulco na região central da membrana, bem como resíduos, provavelmente de EPS, que também está presente nas regiões da lâmina em que não há bactérias. Essas características nem sempre ficam visíveis na imagem topográfica. É importante notar que a escala de cores, à direita da imagem, está associada, agora, a um histograma de tensão elétrica, e não mais de alturas. Para este mapa, seria necessária a aplicação de 60 mV para provocar a máxima variação deflexão detectada durante a varredura.

A análise de perfil é bastante útil para identificar características visuais, de forma mais analítica. Na Figura 13.8A, por exemplo, visualizam-se células de *Candida albicans*, cultivadas por 24 h, obtidas com varredura da esquerda para a direita. Na Figura 13.8B, a imagem foi obtida na mesma região, com varredura da direita para a esquerda. A linha AB, em ambas

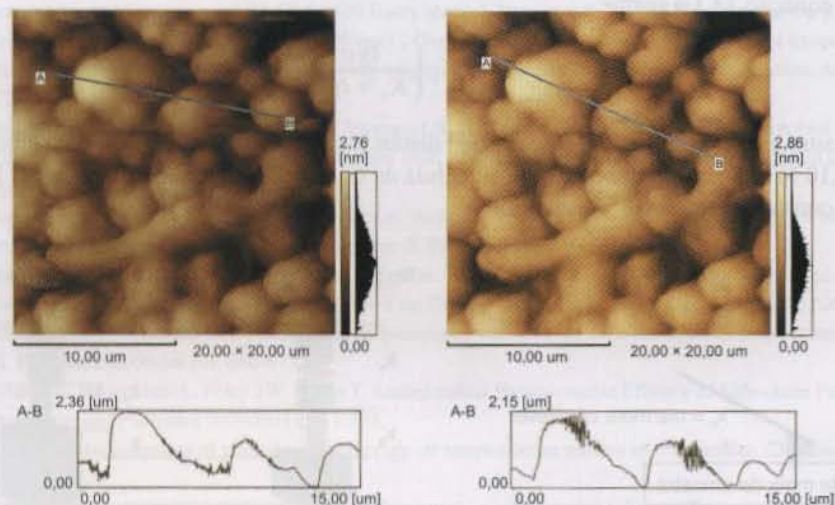
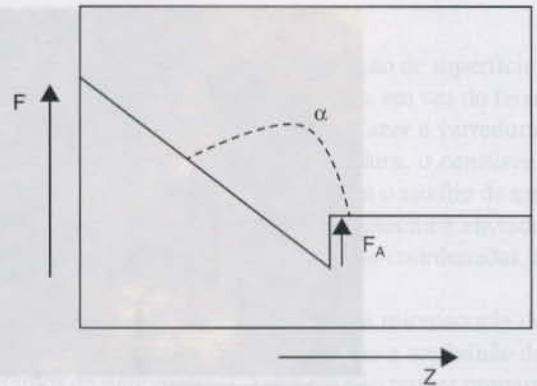


FIGURA 13.8 Recurso de análise de perfil de imagem para traço (A) e retraço (B) de um biofilme de *Candida albicans*.

FIGURA 13.9 Curva ideal de força por deslocamento.



as imagens, foi colocada para avaliar o perfil da superfície, que é apresentado nos gráficos logo abaixo de cada imagem. O ruído que aparece no gráfico de perfil evidencia os pontos em que a adesividade da superfície interfere na varredura, quando a ponta se move para a direita ou para a esquerda.

Mesmo considerando-se somente as aplicações biológicas e microbiológicas, a microscopia de força atômica tem, na verdade, um potencial muito maior do que o aqui apresentado.^{4,30} O simples fato de permitir a observação de amostras no interior de uma célula contendo um meio líquido,^{3,4} coloca a AFM em posição de vantagem em relação às outras microscopias. Touhami et al. obtiveram imagens de *Staphylococcus aureus* em meio de cultura (caldo caseína de soja) para estudar o processo de crescimento e divisão celulares.³⁵ Silva Junior e Teschke avaliaram o efeito do peptídeo antimicrobiano PGLa em *Escherichia coli* utilizando não só as imagens da bactéria em célula líquida contendo solução fisiológica, mas também analisaram curvas de força versus distância, para avaliar a rigidez da membrana celular.³⁶

Medidas de curva de força versus distância, técnica conhecida como espectroscopia de força, pode ser feita em ambiente líquido ou em ar, e é outro diferencial da microscopia de força atômica. Como a ponta de varredura “toca” a amostra, o *cantilever* pode “sentir” a reação da superfície ao toque. Do ponto de vista da física, à medida que a ponta se aproxima da superfície, atuam, no *cantilever*, forças atrativas de Van de Waals, cujas intensidades aumentam de modo inversamente proporcional à distância. Quando a ponta atinge a superfície, começam a atuar forças repulsivas, que impedem que a agulha penetre superfície adentro. Assim, dependendo da elasticidade do material, pode ocorrer uma pequena compressão do material na aproximação e, conforme a aderência, um leve estiramento ao afastar a ponta. Desse modo, a curva de força versus distância (Figura 13.9) entre a ponta e a amostra pode fornecer informações sobre a rigidez ou o grau de elasticidade da membrana celular de um microrganismo.

O cálculo da constante elástica da amostra pode ser feito considerando-se o sistema *cantilever*-amostra apresentado na Figura 13.10, onde k_c e k_a são, respectivamente, as constantes elásticas do *cantilever* e da amostra, como um sistema massa-mola, z_c é a deflexão sofrida pelo *cantilever*, e z , a compressão da amostra quando o *cantilever* é pressionado contra a amostra, a partir da equação 13.1 a seguir:

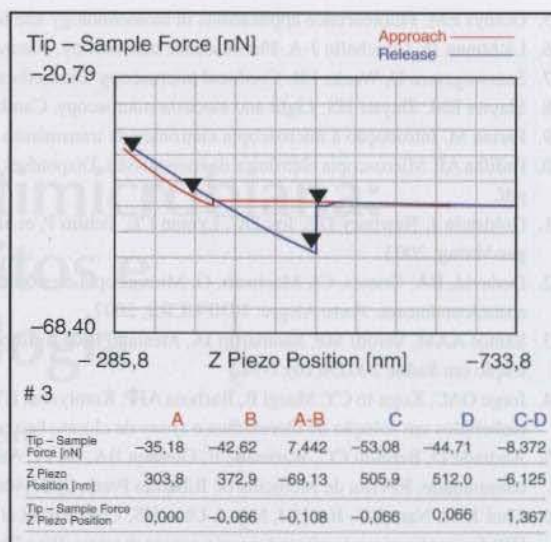
$$K_a = -K_c \left(\frac{tg\alpha}{K_c + tg\alpha} \right) \tag{13.1}$$

A Figura 13.11 mostra uma típica curva de força versus distância, obtida com uma ponta, cujo *cantilever* tinha constante elástica nominal de 0,10 N/m, para a membrana de uma célula de *C. albicans*. Utilizando a equação 13.1, obtém-se o valor de 0,052 N/m, para a constante elástica da membrana.



FIGURA 13.10 Diagrama esquemático de *cantilever* e amostra (A) e sistema massa-mola equivalente (B).

FIGURA 13.11 Típica curva de força *versus* distância para a membrana de uma célula de *C. albicans*, obtida no microscópio de força atômica Shimadzu, modelo SPM9500J3.



Obviamente, existem dificuldades na avaliação de microrganismos por AFM. Por exemplo, se as células não estiverem suficientemente aderidas ao biofilme, pode ocorrer deslocamento ou remoção de microrganismos. Meios de cultura, metabólitos, matriz extracelular e até mesmo uma fina camada de água sobre o biofilme formam meniscos que resultam em artefatos de imagem devido às forças capilares entre a ponta e o meio. O controle da força exercida pela ponta sobre a amostra também requer atenção, pois podem ocorrer desde pequenas alterações morfológicas até danos irreversíveis nas células. Assim, embora a obtenção de informações precisas e fidedignas utilizando a microscopia de força atômica demande *expertise*, o seu potencial de aplicações transcende, em muito, a proposta inicial da microscopia, de simplesmente fornecer imagens de superfície.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kapitza HG. Microscopy from the very beginning. 2nd rev. ed. Jena (GmbH): Dipl. Bibl. Susanne Lichtenberg, 1997.
- Bradbury HSM, Bracegirdle B. Introduction to light microscopy (Microscopy Handbooks). 2nd ed. Abingdon (UK): Garland Science – Taylor & Francis Group, 1998.
- Meyer E, Hug H-J, Bennewitz R. Scanning probe microscopy: the lab on a tip, 1st ed. Berlin (DE): Springer-Verlag, 2003.
- Morris VJ, Kirby AR, Gunning AP. Atomic force microscopy for biologists. 2nd ed. London (UK): Imperial College Press, 2010.
- Olympus Confocal Scanning Laser Microscope LEXT OLS 3100 Users Manual. Version 6.0. Tokyo (JP): Olympus Corp., 2008.
- Li C, Lin F, Sun W, Wu F-G, Yang H, Lv R, Zhu Y-X, Jia H-R, Wang C, Gao G, Chen Z. Self-assembled rose bengal-exopolysaccharide nanoparticles for improved photodynamic inactivation of bacteria by enhancing singlet oxygen generation directly in the solution. ACS Appl. Mater. Interfaces 2018;10: 16.715–16.722.
- Gavrina AI, Shirmanovaa MV, Aksenovac NA, Yuzhakovaa DV, Snopova LB, Solovievac BA, et al. J Photochem Photobiol B: Biol 2018;178: 614-622.
- Duse L, Pinnapireddy SR, Strehlow B, Jedelská J, Bakowsky U. Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. Euro J Pharmac & Biopharmac 2018;126: 233-241.
- Yang KW, Gitter B, Rueger R, Wieland GD, Chen M, Liu XL, et al. Antimicrobial peptide-modified liposomes for bacteria targeted delivery of temoporfin in photodynamic antimicrobial chemotherapy. Photochem & Photobiol Sci 2011;10(10): 1.593-1.601.
- Saino E, Sbarra MS, Arciola CR, Scavone M, Bloise N, Nikolov P, et al. Photodynamic action of Tri-meso (N-methyl-pyridyl), meso (N-tetradecyl-pyridyl) porphine on *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown on Ti6Al4V alloy. Int J of Artif Org 2010;33(9): 636-645.
- Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie 2009;64(10): 666-673.
- Verma S, Sallum UW, Athar H, Rosenblum L, Foley JW, Hasan T. Antimicrobial Photodynamic Efficacy of Side-chain Functionalized Benzo[a]phenothiazinium Dyes. Photochem and Photobiol 2009;85(1): 111-118.
- Zou ZH, Gao P, Yin HJ, Li YX. Investigation of photodynamic therapy on streptococcus mutans of oral biofilm. Chinese Optics Letters 2008;6(12): 947-949.
- George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. Photochem Photobiol 2008;84(3): 734-740.

15. Goldys EM. Fluorescence applications in biotechnology and life sciences. 1st ed. New Jersey (USA) Wiley Blackwell – John Wiley & Sons, 2009.
16. Lichtman JF, Conchello J-A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods* 2005;2(12): 910-919.
17. Semwogerere D, Weeks ER. Confocal microscopy. *Biomedical Engineering* 2005;23(2):1-10.
18. Slayter EM, Slayter HS. Light and electron microscopy. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 312 p.
19. Farina M. Introdução à microscopia eletrônica de transmissão. São Paulo: Livraria da Física, 176 p.
20. Padilha AF. Microscopia eletrônica de transmissão. Disponível em: http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_3_MET_PMI-2201.pdf.
21. Goldstein J, Newbury DE, Joy DC, Lyman CE, Echlin P, et al. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. 3rd ed. Berlin (DE): Springer-Verlag, 2003.
22. Dedavid, BA, Gomes, CI, Machado, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
23. Santos AAM, Verotti MP, Sanmartin JA, Mesiano ERAB. Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. *Revista de Administração em Saúde* 2002;4(16):7-14.
24. Jorge OAC, Koga-to CY, Maegi B, Barbosa APP, Komiyama EY. Desinfecção de superfície em odontologia: avaliação do álcool gel 70% INPM, lenços embebidos em solução de clorexidina e *spray* de cloreto benzalcônio. *Revista Gaúcha de Odontologia*, 2005;53(2):151-154.
25. Andrade D, Beraldo CC, Watanabe E, Oliveira BA, Ito IY. Atividade antimicrobiana in vitro do álcool gel 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. *Revista de Medicina de Ribeirão Preto*, 2007;40(2):250-254.
26. Choi K-H, Nam KC, Jim H-J, Min J, Uhm HS, Choi EH, et al. Synthesis and characterization of photo-functional magnetic nanoparticles (Fe₃O₄@HP) for applications in photodynamic cancer therapy. *JKor Phys Soc* 2014;65(10):1.658-1.662.
27. Sah, U, Sharma, K, Chaudhri, N, Sankar, M, Gopinath, P. Antimicrobial photodynamic therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light mediated inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018;162:108-117.
28. Mikoliunaite L, Makaraviciute A, Suchodolskis A, Ramanaviciene A, Oztekin Y, Stirke A, et al. Atomic force microscopy study of living Baker's yeast cells. *AdvSci Let* 2011;4(2): 368-376.
29. Diaz C, Schilardi PL, Salvarezza RC, de Mele MFL. Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2011; 82(2): 536-542.
30. Dufrene YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* 2002;184(19): 5.205-5.213.
31. Jin H, Huang X, Chen Y, Zhao HX, Ye HY, Huang FC, et al. Photoinactivation effects of hematoporphyrin monomethyl ether on Gram-positive and -negative bacteria detected by atomic force microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;88(3): 761-770.
32. Tomankova K, Kolarova H, Kolar P, Kejlova K, Jirova D. Study of cytotoxic effect of photodynamically and sonodynamically activated sensitizers in vitro. *Toxicology in vitro* 2009;23(8): 1.465-1.471.
33. Jung S-H, Park J-Y, Yoo J-O, Shin I, Kim Y-M, Ha K-S. Identification and ultrastructural imaging of photodynamic therapy-induced microfilaments by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 2009;109(12): 1.428-1.434.
34. Sahu K, Bansal H, Mukherjee C, Sharma M, Gupta, PK. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of toluidine blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B-Biology* 2009;96(1): 9-16.
35. Touhami A, Jericho MH, Beveridge TJ. Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004;186(11): 3.286-3.295.
36. Silva Junior A, Teschke O. Dynamics of antimicrobial peptide PGLa action on *Escherichia coli* monitored by atomic force microscopy. *World J Microbiol & Biotechnol* 2005;21: 1.103-1.110.
37. Aureliano DP, Lindoso JAL, de Castro Soares SR, Takakura CFH, Pereira TM, Ribeiro MS. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. *PhotodiagPhotodyn Ther* 2018;S1.572-1.000(17):30.487-30.488.