

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

MARLOS DA COSTA MONÇORES

PROPRIEDADES MECANO-ELÁSTICAS DE
SISTEMAS BIOLÓGICOS: CARACTERIZAÇÃO
POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

Rio de Janeiro, RJ.

Fevereiro de 2008.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

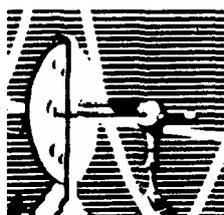
Milhares de livros grátis para download.

Marlos da Costa Monçores

Propriedades Mecano-Elásticas de Sistemas
Biológicos: Caracterização por Microscopia de
Força Atômica.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Orientação: Dr. Gilberto Weissmüller.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro, RJ.

Fevereiro de 2008.

Ficha Catalográfica

Moncores, MC

Propriedades Mecano-Elásticas de Sistemas Biológicos: Caracterização por Microscopia de Força Atômica/ Marlos da Costa Moncores. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008
x, 151 f., il.; 29,7 cm

Dissertação (Mestrado): UFRJ / IBCCF / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Orientador: Gilberto Weissmüller

Referências Bibliográficas: f. 118–121

Anexos: f. 122–151

1. Microscopia de Força Atômica 2. Elasticidade 3. *Aedes aegypti* – Dissertação

I. Weissmuller, Gilberto. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Propriedades Mecano-Elásticas de Sistemas Biológicos: Caracterização por Microscopia de Força Atômica

Dedico esse trabalho aos meus pais, que
contribuíram no embasamento desse trabalho, por serem
os pilares de minha vida.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Física Biológica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Dr. Gilberto Weissmüller, com auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência em Ciência e Tecnologia (PRONEX), pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e pelo Instituto de Biologia do Exército (IBEX).

AGRADECIMENTOS

Aproveito a oportunidade para agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, sabendo ou não, contribuíram para a minha formação. Dentre eles há alguns que gostaria de agradecer especialmente:

- Aos meus pais, por sempre terem me apoiado e incentivado.**
- Aos amigos, por estarem sempre comigo, principalmente nos momentos de diversão, que certamente não seriam os mesmos sem vocês.**
- À minha esposa Carol, por sua persistente revisão desse texto, e por ter permitido que eu acoplasse à minha existência a sua, tornando meus dias significativamente mais felizes, mesmo nos momentos de tensão. Obrigado por fazer parte da minha vida! Agradeça aos seus pais também, por terem feito você e por terem me acolhido.**
- Ao meu orientador, que antes de surgir como modelo para alguém, serviu de modelo a si próprio. Que conquistou sua vida (no sentido mais amplo da palavra), sendo essa a mais evidente lição da sua vitória. Pela amizade, e pelos momentos em que podia ter apenas respondido e ensinou, pelos outros em que podia ter simplesmente ensinado, mas orientou, e pelos demais em que poderia ter orientado, mas me ajudou na descoberta.**
- Ao Tatu, por ter feito a postura de tantos ovos e por toda a colaboração no desenvolvimento desse projeto.**

- **Às pessoas do Laboratório de Física Biológica e da Unidade Multidisciplinar de Genômica, pelos momentos de trabalho, trocas de idéias e frutíferas discussões, além dos importantíssimos momentos de socialização.**
- **Ao Paulo e a Nice, que dispuseram parte de seu tempo durante o carnaval para revisar esse texto.**
- **Ao Gustavo por ter servido de cobaia/controlado nos experimentos com fios de cabelo humano.**
- **A todos os colaboradores envolvidos nos trabalhos em andamento e já concluídos.**
- **Por último, mas não menos importante, a todos os outros aqui não incluídos.**

Cada existência firma-se e afirma-se em contacto com as existências que as rodeiam; forma, no conjunto das relações humanas, uma espécie de nó. Dentre essas relações, umas há que são privilegiadas: as dos filhos com os pais, com os irmãos ou irmãs, as relações de amizade, as relações de amor. Mas entre todas, singular é a relação do discípulo com o mestre que lhe revelou o sentido da vida e o orientou, não apenas na atividade profissional, mas na descoberta das certezas fundamentais (GUSDORF, G. *Professores para quê?* São Paulo: Martins Fontes, 1970, p. 10).

RESUMO

Nos últimos anos, a microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy* – AFM) vem sendo usada para aquisição de imagens de amostras biológicas em ambiente fisiológico, bem como na espectroscopia de força das amostras. Recentemente, a AFM revelou-se uma poderosa ferramenta para investigar propriedades mecânicas dessas amostras. Tais propriedades podem ser medidas utilizando a ponteira do AFM como um micro-indentador. Utilizamos o AFM para estudar as propriedades mecânicas de dois sistemas biológicos: 1) O enrijecimento de ovos de *Aedes aegypti* durante sua embriogênese inicial; 2) A rigidez de fios de cabelo humano em um caso de pili annulati. O *Aedes aegypti* é vetor de doenças humanas como Dengue e Febre Amarela. Logo após a postura, seus ovos são brancos, permeáveis e macios, e algumas horas depois eles tornam-se pretos, impermeáveis e rígidos. Nós descrevemos a cinética desse enrijecimento, concluindo que seu término ocorre três horas após a postura, estando acoplado a via de escurecimento. No segundo sistema biológico estudado, investigamos a elasticidade de fios de cabelo humano. Pili annulati é uma anomalia rara caracterizada por fios de cabelo com bandas claras e escuras alternadas, o que dá uma aparência brilhante ao pêlo. Nenhuma diferença morfológica pode ser encontrada entre as partes claras e escuras quando os fios foram observados por AFM e microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, nós concluímos que as partes escuras são mais rígidas do que as claras. Essa é a primeira evidência na literatura científica a corroborar com a hipótese de que as partes claras possuem espaços preenchidos por ar.

Abstract

In the past few years, atomic force microscopy (AFM) has been used to study biological samples under physiological conditions through force measurements and image acquisition. Recently the AFM has come to attention as a powerful tool to elucidate mechanical properties of biological materials. These properties can be measured using the AFM tip as micro-indenter. We have used the AFM to study the mechanical properties of two different biological systems which we are involved in: 1) *Aedes aegypti* eggshells stiffening during its initial embryogenesis; 2) Stiffness of human hair shafts in a case of pili annulati (PA). *Aedes aegypti* is a vector of dangerous human diseases like Dengue and Yellow Fever. Right after the oviposition, their eggshells are white, permeable and soft, which turn black, impermeable and stiff with time. We described the kinetics of this stiffening, showing that it is completed 3 hours after oviposition, coupled to the darkening pathway. At the second biological system studied, we investigated the elasticity of human hair shafts. Pili annulati is a rare hair shaft abnormality characterized by alternate light and dark bands in the hair shaft, leading to a shiny appearance. No morphological differences between dark and light parts of PA hair shaft were found when imaged by both AFM and scanning electron microscopy. However we concluded that dark parts are stiffer than the light ones. This is the very first evidence that corroborates the air-filled space model on light bands of PA hair shafts.

Lista de Siglas

AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> – Microscópio de Força Atômica
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> – Microscopia de Força Atômica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de Confiança
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
<i>K</i>	Constante Elástica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFM	<i>Magnetic Force Microscopy</i> – Microscopia de Força Magnética
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pili annulati
PZT	Abreviação de Transdutores Piezoelétricos e abreviação da fórmula química do Titanato Zirconato de Chumbo: $\text{Pb}[\text{Zr}_x\text{Ti}_{(1-x)}]\text{O}_3 - 0 < x < 1$
SI	Sistema Internacional
SPM	<i>Scanning Probe Microscopy</i> – Microscopia de Varredura por Sonda
SPM	<i>Scanning Probe Microscope</i> – Microscópio de Varredura por Sonda
STM	<i>Scanning Tunneling Microscopy</i> – Microscopia de Varredura por Tunelamento

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Motivação	2
1.2 – Elasticidade dos Materiais	4
1.3 – Microscopia de Força Atômica	8
1.4 – Princípios de Operação do Microscópio de Força Atômica	11
1.4.1 – Obtenção De Curvas De Força	13
1.4.2 – Materiais Piezoelétricos	18
1.5 – Os Sistemas Biológicos Analisados	21
1.5.1 – Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	21
1.5.2 – <i>Pili annulati</i>	29
II – OBJETIVOS	31
III - METODOLOGIA	35
3.1 – Microscópio de Força Atômica	36
3.2 – Teoria Utilizada nos Cálculos para Obtenção do <i>Módulo de Young</i>	37
3.3 – Cálculo da Indentação da Amostra	41
3.4 – Cálculo da Constante Elástica da Amostra	43
3.5 – Análise da Curvas de Força	46
3.6 – Postura dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	47
3.7 – Remoção do Exocório dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	48
3.8 – Imobilização das Amostras para Obtenção das Curvas de Força no AFM	49
3.9 – Análise do Escurecimento dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	50
3.10 – Análise do Inchamento dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	51
3.11 – Análise da Mudança de Permeabilidade dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	52
3.12 – Tratamento de Ovos de <i>Aedes aegypti</i> com Benserazida	53
3.13 – Medidas nos Fios de Cabelo	54
IV – RESULTADOS	55
4.1 – Condições para Aquisição de Imagens e Curvas de Força	56
4.2 – Escolha dos Cantiléveres	58
4.3 – Premissas à Comparação das Curvas de Força	60
4.5 – Enrijecimento dos Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	65
4.6 – Resposta de Ovos Velhos à Manipulação	69
4.7 – Diferenças entre Ovos Recém Postos e Ovos Velhos	70
4.8 – Escurecimento de Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	71
4.9 – Mudança de Permeabilidade de Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	73
4.10 – Enrijecimento de Ovos Tratados com Inibidor de Escurecimento	75
4.11 – Enrijecimento de Ovos não Fecundados	77
4.12 – Variação do Volume dos Ovos Durante o Enrijecimento	78
4.13 – Rigidez nas Bandas de Fios de Cabelo de um Humano com <i>Pili annulati</i>	79
4.14 – Automação da Análise dos Dados	80
V - DISCUSSÃO	82
5.1 – Obtenção de Curvas de Força com o AFM	83
5.2 – Premissas à Obtenção de Curvas de Força em Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	85
5.3 – Cinética do Enrijecimento de Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	90
5.4 – Resultados Obtidos em Outros Sistemas Biológicos	97
VI - CONCLUSÕES	98
BIBLIOGRAFIA	101
ANEXO I	106
Artigo Publicado no Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology	106
ANEXO II	109
Capítulo Microscopia de Varredura por Sonda e Microscopia de Força Atômica Publicado no Livro Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.	109

ANEXO III.....	125
Resolução da Equação [5] Para d.	125
ANEXO IV.....	128
Programa Desenvolvido para Documentação e Análise Automatizada das Curvas de Força.	128

I - INTRODUÇÃO

1.1 – Motivação

As propriedades elasto-mecânicas de sistemas biológicos desempenham um papel importante para a vida, uma vez que delas dependem processos celulares fundamentais, como a diferenciação, locomoção, divisão e adesão.

Medir a elasticidade de um material biológico não é uma tarefa tão trivial quanto seria em um material inerte de forma definida. As constantes mudanças inerentes aos sistemas vivos, à forma nada simplificada de suas estruturas e seu tamanho microscópico são alguns desafios que se interpõem para a obtenção dessas medidas. Aplicando os modelos físicos adequados, podemos utilizar a técnica de Microscopia de Força Atômica para realizar medidas precisas, em escala nanométrica, de materiais biológicos.

Nosso interesse em estudar essas propriedades em sistemas vivos nos trouxe, ao longo do desenvolvimento desse estudo, diversos modelos biológicos interessantes. Logo no começo desse trabalho, nossos colaboradores do Departamento de Entomologia do IOC/Fiocruz nos propuseram um interessante desafio: descrever o enrijecimento de ovos de *Aedes aegypti*, visando ajudar na compreensão de alguns efeitos bioquímicos que ocorrem ao longo de sua embriogênese. Esse sistema acabou se tornando o objeto principal da nossa pesquisa, não apenas por sua importância no contexto das pesquisas biológicas brasileiras, mas pelas características peculiares apresentadas que ajudaram no desenvolvimento e confirmação das nossas metodologias.

Os ovos do mosquito *Aedes aegypti* apresentam-se macios, claros e permeáveis, ao final da postura, e vão tornando-se rígidos, escuros e impermeáveis, à medida que a embriogênese evolui. Embora bastante conhecidas, tais características não foram, até então, quantificadas, nem tiveram suas cinéticas qualificadas, na literatura científica. A melhor compreensão do enrijecimento desses ovos pode ajudar a esclarecer porque eles são muito mais resistentes que os ovos de outros mosquitos. Descrevendo esse fenômeno, o

enrijecimento, podemos estabelecer um limite temporal no qual novas metodologias baseadas na inibição do enrijecimento poderão ser testadas para controlar a proliferação desses vetores.

O nosso trabalho nesta parte da pesquisa consistiu na determinação de medidas de elasticidade de amostras de ovos ao longo de fases da embriogênese. Nós utilizamos a técnica de Microscopia de Força Atômica para obter informações sobre tal propriedade numa perspectiva de evolução temporal, de forma a qualificar a cinética das características conhecidas do sistema.

Como a obtenção desse tipo de medida pode ajudar a responder várias perguntas biológicas, é natural que outros modelos biológicos também tenham sido investigados por nosso grupo utilizando esta técnica. No momento estamos estudando a mudança da elasticidade na parede de um fungo (*Fonsecae Pedrosoi*) após o tratamento com um inibidor da via que sintetiza melanina. Como esse estudo ainda não está concluído, esses dados não serão apresentados nessa dissertação.

Em um outro sistema investigado, analisamos fios de cabelo de um paciente humano que apresenta uma anomalia genética hereditária bastante rara conhecida como pili annulati. Os resultados dessa pesquisa foram publicados em um artigo no “*Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*” no final de 2007 (Streck *et al.*, 2007), mostrando esse tipo de caracterização pela primeira vez na literatura, o que trouxe importantes pistas para a elucidação de alguns mecanismos ainda pouco conhecidos da formação desses fios.

1.2 – Elasticidade dos Materiais

As deformações mecânicas são possivelmente importantes reguladoras de algumas funções celulares, tais como diferenciação, locomoção e adesão. A determinação das propriedades mecânicas de materiais biológicos, tais como células, tecidos e fluidos, é importante tanto para os avanços da pesquisa médica, como da pesquisa básica (Tao *et al.*, 1992; Weisenhorn *et al.*, 1993; Radmacher *et al.*, 1995; Vinckier & Semenza, 1998).

Todos os materiais conhecidos podem ser deformados. As deformações produzidas são classificadas em plásticas e elásticas. Quando as forças aplicadas não excedem um determinado limite, verifica-se que o material sempre volta ao seu formato original quando estas são completamente removidas. Por essa razão, estas deformações são ditas elásticas. Se as forças externas que produzem a deformação excederem tal limite, não haverá desaparecimento completo da deformação quando da remoção das forças. Esse tipo de deformação é dita plástica. Assim, definimos como dureza de um material sua resistência à deformação plástica inicial. Portanto, quando se objetiva estudar a dureza dos materiais, devem-se estudar as deformações plásticas. E quando o interesse for pela elasticidade, as deformações elásticas serão estudadas (Parbhu *et al.*, 1999).

Além da elasticidade e da plasticidade, os materiais podem também apresentar viscosidade, que corresponde a uma resistência ao escoamento.

Uma das leis mais conhecidas na mecânica é a Lei de Hooke, enunciada pelo físico britânico Robert Hooke no século XVII e que relaciona a força aplicada a um corpo, em geral uma mola, e a deformação conseqüente. A lei afirma que a relação entre essas duas grandezas é linear:

$$F = K \cdot \Delta x$$

onde F é a força aplicada, Δx é a deformação alcançada e K é a constante de proporcionalidade, a qual é característica do material e da geometria do corpo (por exemplo, aço ou ferro em formato de mola espiral ou haste).

Suponha um corpo homogêneo com geometria simplificada, como a de um cilindro metálico, mostrado na Figura 1. Ao aplicarmos uma força F nas extremidades do cilindro, uma variação ΔL será provocada.

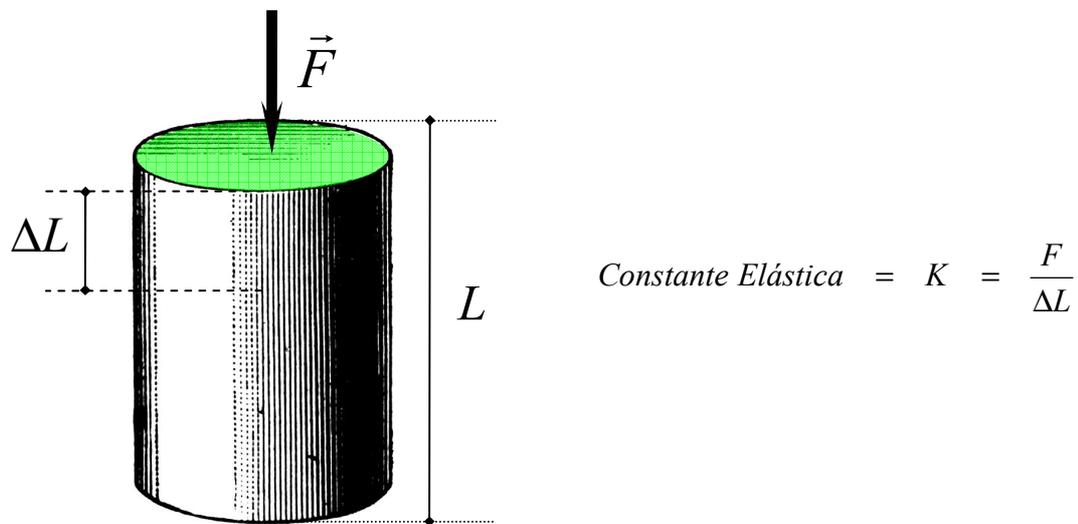


Figura 1: Cilindro de seção transversal com área A (em verde) sendo deformado ao longo do comprimento inicial (L) por uma força \vec{F} , sofrendo uma deformação.

A constante elástica K não é uma grandeza apropriada para caracterizar diferentes materiais, pois depende da geometria do corpo. Um cilindro análogo ao da Figura 1, mas de comprimento $2L$, submetido à mesma força, sofreria uma deformação $2\Delta L$. Portanto, este cilindro teria uma constante elástica menor.

A elasticidade de um objeto macroscópico pode ser descrita em termos da deformação relativa e da pressão (Timoshenko & Goodier, 1970). A pressão corresponde ao estresse provocado pela força de deformação aplicada em uma pequena área do material. Já a deformação relativa é expressa como uma variação percentual nas dimensões iniciais do material. A razão entre a deformação relativa e a pressão é igual a uma constante, que depende do material e da deformação. Esta constante, a elasticidade, é específica para cada

material e válida apenas para as deformações elásticas do material (Timoshenko & Goodier, 1970).

Assim, se substituirmos na Lei de Hooke a força e a deformação por, respectivamente, pressão e deformação relativa, chegaremos a uma nova grandeza característica do material:

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L}} = \frac{\text{pressão}}{\text{deformação relativa}}$$

Este módulo de elasticidade, chamado de *Módulo de Young* ou Módulo Elástico, mostra como se dá a deformação do material ao longo de um de seus eixos quando forças opostas são aplicadas ao longo do mesmo.

Existem outros módulos de elasticidade, como por exemplo o módulo de compressibilidade volumétrica e o módulo de cisalhamento (Vinckier & Semenza, 1998), os quais não serão abordados neste trabalho. Um mesmo material terá diferentes valores para cada um desses módulos de elasticidade. No caso de uma amostra com geometria simplificada, como um fino cilindro metálico, o valor do *Módulo de Young* pode ser calculado medindo-se a força aplicada na secção do fio e a variação do comprimento do cilindro, conforme ilustrado na Figura 1. O valor da *Constante Elástica* da mola equivalente também é facilmente obtido medindo-se a intensidade da força F aplicada, e a compressão que a mesma causa na amostra (ΔL). A partir da lei de Hooke, obtemos o valor desta constante elástica (K):

$$K = \frac{F}{\Delta L}$$

Existem várias técnicas experimentais que há muito tempo já permitem um estudo das propriedades mecânicas em uma escala macroscópica. Existem ainda outras tecnologias mais recentes que permitem medidas em escalas micro e nanoscópicas (Vinckier & Semenza, 1998), entre elas destacamos a microscopia de força atômica.

Nesse estudo serão focados o *Módulo de Young* e a *Constante Elástica*, que podem ser usados para estudar sistemas micro e macroscópicos. Esses dois módulos foram escolhidos para o estudo com AFM porque são os mais comumente estudados, possuindo vasta literatura disponível para os estudos teóricos (Radmacher, 2002), possibilitando comparações dos resultados experimentais (Vinckier & Semenza, 1998; Alonso & Goldmann, 2003).

O *Módulo de Young*, o qual muitas vezes será referido neste trabalho como elasticidade, tem como dimensão força por unidade de área $[N].[m]^{-2}$, que equivale a um Pascal (Pa). Já a *Constante Elástica*, tem como dimensão força por unidade de comprimento $[N].[m]^{-1}$. Enquanto a relação entre a deformação relativa e a pressão for linear, a deformação do material será elástica. Quando essa relação deixa de ser linear, observa-se a plasticidade do material. Atingindo esse ponto, o material já não será mais capaz de retomar seu formato original após a força aplicada ser retirada do sistema. Em deformações ainda mais intensas, o material poderá atingir seu limite de rompimento.

1.3 – Microscopia de Força Atômica

Em 1982, surgiu um novo tipo de microscopia de varredura capaz de criar imagens tridimensionais em escala atômica, a Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM, do inglês *Scanning Tunneling Microscopy*), que mede correntes de tunelamento entre superfícies condutoras ou semicondutoras bastante próximas, mas não em contato. Essa técnica possibilitou a visualização individual de átomos (Binnig *et al.*, 1982). A Figura 2 mostra alguns átomos de iodo adsorvidos em uma superfície de platina (Griffith & Kochanski, 1990)

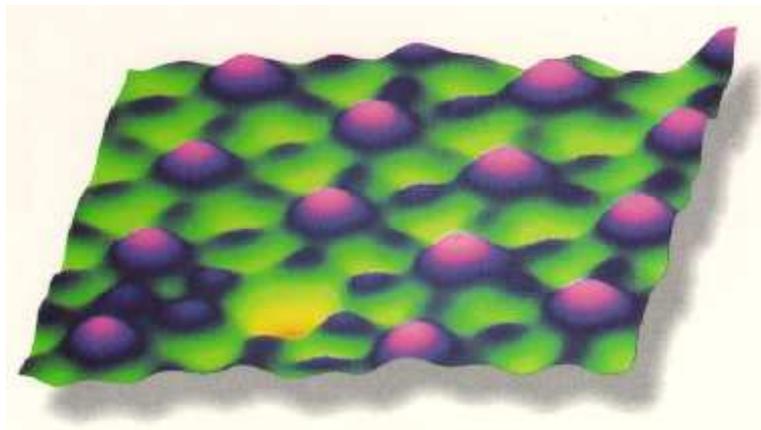


Figura 2: Imagem de átomos de iodo adsorvidos sobre uma superfície de platina obtida a partir de *Scanning Tunneling Microscopy*. Os núcleos de iodo estão mostrados em roxo. (Griffith & Kochanski, 1990).

Após a invenção do primeiro instrumento para operar em escala atômica (Binnig *et al.*, 1982), o microscópio de varredura por tunelamento, as técnicas de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM, do inglês *Scanning Probe Microscopy*) se desenvolveram rapidamente.

As técnicas de SPM diferem de outros tipos de microscopia, como a óptica e a eletrônica, por não terem sido inspiradas em nosso sentido de visão. Assim, as técnicas de SPM não utilizam lentes para desviar feixes de luz ou de elétrons no intuito de gerar uma imagem ampliada. Essas técnicas têm como pilar um outro sentido dos seres humanos: o tato. As técnicas de SPM vêm se desenvolvendo continuamente desde sua invenção, voltando-se para aplicações em física de superfícies, ciências dos materiais, física da matéria condensada,

química, engenharias, física de semicondutores, dentre outras. Não demorou muito para que imagens de materiais biológicos, como bacteriófagos, também fossem obtidas por Microscopia de Força Atômica (Baro *et al.*, 1985), uma das mais relevantes técnicas de SPM.

Para “tatear” a amostra, as técnicas de SPM utilizam uma pequena haste flexível dotada de uma sonda em uma de suas extremidades. Essa terminação extremamente afilada (alguns poucos nanômetros) é colocada suficientemente próxima à amostra para varrer¹ a sua superfície e mapear suas propriedades, a partir de interações que se estabelecem entre ela e a amostra. O tipo de sensor e, portanto, da interação medida, define o tipo de SPM. Quando a interação medida é uma corrente de tunelamento, temos a Microscopia de Varredura por Tunelamento; quando a interação é magnética, passa a denominar-se Microscopia de Força Magnética (MFM, do inglês *Magnetic Force Microscopy*).

Há mais de 20 tipos de interações que podem ser estudadas desta forma. Com os tipos de técnicas de SPM disponíveis é possível estudar, por exemplo, o material biológico vivo, sem uso de fixação, mapeando propriedades elasto-mecânicas, ópticas, elétricas, adesivas e eletrônicas, átomo por átomo. Estas técnicas servem ainda como ferramenta para a manipulação de amostras em escala molecular (nano-manipulação).

A Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy* e/ou *Atomic Force Microscope*) é uma importante técnica de SPM, na qual a interação medida é a força entre átomos da extremidade de uma agulha rígida (que é a sonda nessa situação) e átomos da amostra. O AFM destaca-se desde a sua invenção, em 1986 (Binnig *et al.*, 1986), principalmente nas áreas biológicas porque possibilita o uso de amostras imersas no ar, em líquidos, ou no vácuo, com resolução para detectar forças na faixa do picoNewton (pN).

A AFM tem fornecido imagens de superfícies celulares, biomoléculas e agregados biomiméticos, em condições fisiológicas, com resolução na faixa do nanômetro (Cidade *et al.*,

¹ As palavras varrer e varredura são usadas nesse texto com o mesmo sentido que os termos em inglês *scan* e *scanning*, respectivamente.

2003). A AFM combina alta sensibilidade em aplicar e medir forças com a possibilidade de operar em líquidos, particularmente em condições fisiológicas (Drake *et al.*, 1989), com a altíssima precisão em posicionar a sonda em relação à amostra nas três dimensões. A investigação da mecânica celular é um excelente modelo para utilizar essas três facilidades que o equipamento disponibiliza, sendo a medida de propriedades elásticas de células vivas uma excitante aplicação disto.

1.4 – Princípios de operação do Microscópio de Força Atômica

O conjunto de equipamentos que integram o AFM do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, no qual foram realizadas as medidas deste trabalho, são mostrados na Figura 3.

Os elementos principais ficam na parte do equipamento chamada de “cabeça”, mostrada em detalhe na Figura 5. Dentro dela, encontra-se a sonda que interage com a amostra. Quanto mais afilada for essa sonda, melhor será a resolução espacial do sistema. Para a varredura é necessário um sistema de posicionamento lateral (x e y) e de um controle retroalimentado de sua altura (z), para evitar que a sonda se afaste da superfície ou a perfure.



Figura 3: Foto do AFM utilizado nesse trabalho, mostrando todo o aparato computacional complementar, a controladora eletrônica e o sistema anti-vibração. A cabeça do equipamento é composta de três partes essenciais do microscópio.

A sonda é uma espécie de agulha afilada presa na extremidade de uma haste flexível que se comporta como uma mola. Essa haste flexível, de aproximadamente 100-200 micrômetros de comprimento, é chamada de cantiléver (Figura 5). Nesse trabalho usamos uma sonda de forma piramidal.

A força de interação entre a sonda – muitas vezes referida nesse trabalho como ponteira – e a superfície da amostra provoca a deflexão do cantiléver, que é medida por meio de um sensor óptico (ver seção 1.4.1). Enquanto essa deflexão for mantida no regime elástico, o deslocamento será diretamente proporcional à força, fornecendo assim uma medida direta da força de interação (lei de Hooke). A topografia da amostra é adquirida através da varredura da ponteira sobre a superfície da amostra em uma seqüência de linhas paralelas. A imagem da superfície é obtida pelo registro do movimento da ponteira nas três dimensões.

1.4.1 – Obtenção de Curvas de Força

Em uma situação na qual quiséssemos descobrir, de olhos vendados, o trajeto mais seguro a adotar em um piso empoçado, poderíamos utilizar uma haste para apalpar a superfície antes de definir os movimentos. De maneira análoga, o AFM pode servir de bengala à pesquisa. No AFM, a aproximação entre a base inferior que suporta a amostra e a base superior que acopla o cantiléver é feita através de um material piezoelétrico, chamado de piezo, responsável pelo controle do movimento relativo entre a amostra e o cantiléver. Este mecanismo será explicado na seção 1.4.2. A visualização desta aproximação pode ser feita a partir de um gráfico, chamado de Curva de Força, que esboça na abscissa o movimento do piezo, e na ordenada o deslocamento do cantiléver.

Aproximando-se a amostra e o cantiléver, haverá um momento no qual as duas estarão em contato, e a partir desse ponto, a amostra começará a exercer uma pressão no cantiléver (Figura 4 e Figura 5), assim como o cantiléver exerce uma pressão na amostra (3ª Lei de Newton). Considerando-se nesse ponto a elasticidade do cantiléver como constante, a resistência mecânica da amostra fará com que a sonda penetre mais ou menos na amostra, deslocando a haste do cantiléver (que nesse caso é uma mola com formato bem diferente do helicoidal clássico) verticalmente e para cima, de maneira distinta para cada material. O nome dessa penetração do cantiléver na amostra é indentação, que nada mais é do que a pequena moosa produzida na superfície pela ponteira. Caso o deslocamento relativo entre amostra e cantiléver seja devido ao deslocamento vertical de um piezo posicionado abaixo do porta-amostra, essa indentação terá sempre sentido contrário ao deslocamento do piezo. Se obrigarmos o equipamento a manter esse deslocamento do cantiléver constante, será preciso que o piezo tenha um deslocamento positivo maior para amostras mais macias, para compensar a indentação. Garantir que o deslocamento máximo do cantiléver seja sempre

constante é fundamental para assegurar que a força máxima estudada seja constante, pois pela lei de Hooke: $F = -k.\Delta x$.

O movimento do piezo causa uma variação na deflexão do cantiléver (Figura 4) e, com isso, o feixe óptico que está incidindo sobre o cantiléver é desviado de acordo com a deflexão da haste. O feixe é conduzido por um sistema de espelhos até um sensor óptico, que detecta quanto o feixe é deslocado de sua posição original. Tal deslocamento é proporcional à compressibilidade do conjunto amostra, ponteira e cantiléver. A resolução desta técnica é alta, podendo medir forças de até 20 pN.

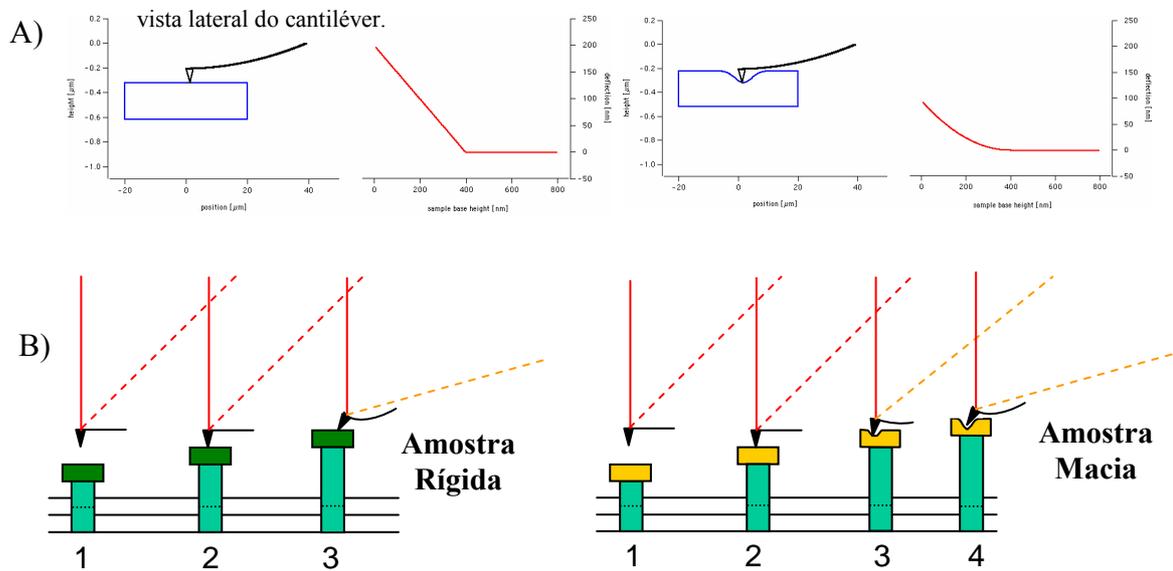


Figura 4: A) Exemplo de como ficam as curvas de força (em vermelho) se uma amostra for mais rígida (esquerda) que outra (direita). B) Considerando a linha contínua como o feixe de laser incidindo no *cantiléver*, e a linha tracejada o feixe de laser que vai para o detector, percebe-se que os sinais provenientes de amostras com diferentes rigidezes incidirão no detector em posições diferentes.

Note que na Figura 4, para a força no cantiléver ser constante, é necessário que o piezo na amostra macia desloque-se um pouco mais para cima. Isso obviamente aumenta a indentação, que pode ser obtida a partir do valor de Z (deslocamento do piezo). Na figura acima, sendo Z_4 (o valor de Z em 4), e Z_{3d} (o valor de Z em 3 na Amostra Rígida), a

indentação necessária para que a amostra perceba, na Amostra Macia, a mesma força exercida em 3 na amostra rígida seria $Z_4 - Z_{3d}$.

O deslocamento vertical do cantiléver provocado pelo deslocamento da base é detectado pela deflexão de um feixe de laser, que atinge o cantiléver na parte superior (que é espelhada), e é refletido em outro espelho (Figura 5), em direção a um detector composto por dois fotodetectores (**a** e **b**). A variação no sinal do laser refletido, para cima ou para baixo, modifica o potencial produzido nos fotodetectores. A diferença de potencial elétrico entre *a* e *b* (**a-b**) é transmitida para um computador, que os pode desta forma construir um gráfico do tipo *Deslocamento do piezo X Voltagem* (Figura 6).

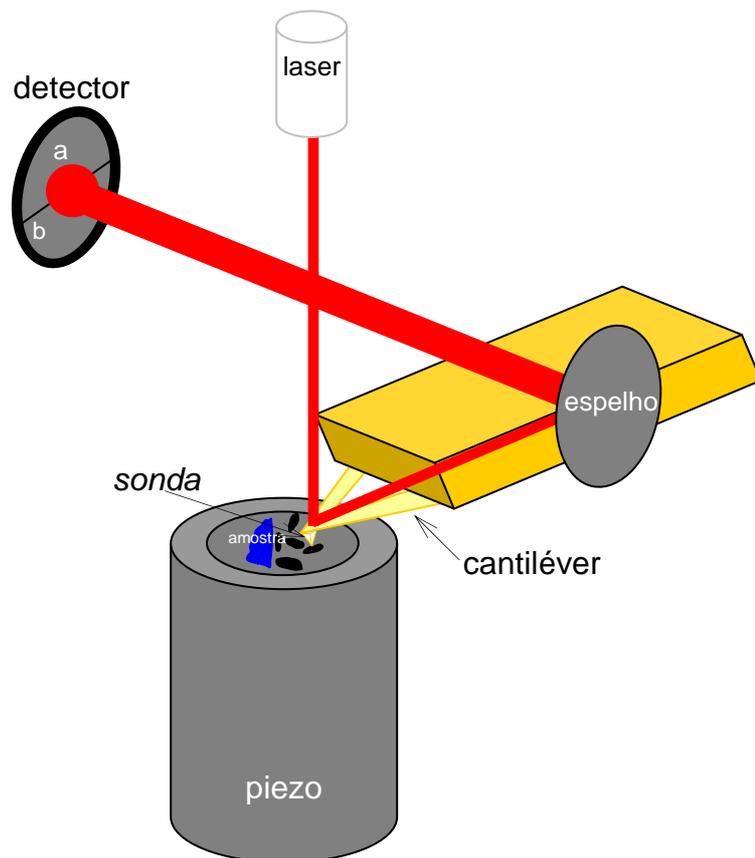


Figura 5: Detalhe das partes essenciais do equipamento mostradas na Figura 3: o piezo, o cantiléver e o sensor óptico.

Durante a obtenção das curvas de força no AFM, o piezo desloca-se até que a amostra esteja em contato com a sonda. A partir deste ponto, começa a indentação da superfície. Após

chegar a um máximo de indentação, a amostra continua apenas deflexionando o cantiléver, até chegar a um valor máximo de deflexão, onde a força é máxima. A partir daí, o piezo retorna progressivamente, até que finalmente a superfície da amostra deixa de estar em contato com a sonda (Figura 6).

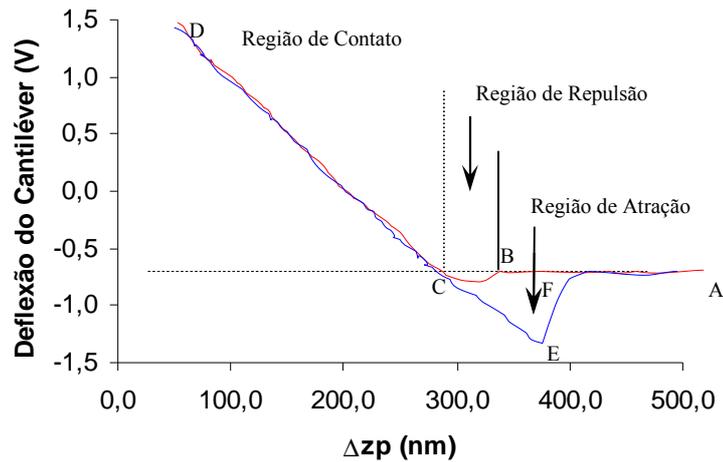


Figura 6: Exemplo de um gráfico de V versus Δz_p . A curva em vermelho é a de aproximação, e a em azul é a de retração. Modificado de Vanlandingham *et al.*, 1997.

A deflexão do cantiléver produz uma mudança na tensão V do fotodiodo, que pode ser monitorada em função do deslocamento do piezo (Δz_p). A Figura 6 mostra um exemplo de gráfico de V versus Δz_p que se obtém com o AFM. A curva em vermelho representa a aproximação do piezo em relação à ponteira (a partir de A). Enquanto o piezo se move em direção à superfície da amostra, a tensão V que indica a deflexão da haste continua constante (A até B) até que a ponta faça contato com a superfície em B . Imediatamente antes do contato da ponteira com a amostra, a sonda pode ser puxada em direção à superfície por forças atrativas como capilaridade ou interações elétricas, por exemplo, causando uma pequena redução em V (entre B e C). Aproximar mais o piezo faz com que o cantiléver seja deflexionado no sentido oposto, tendo por resultado um sinal aumentado de V (C até D). Durante a retração (curva mostrada em azul), a deflexão cantiléver fica cada vez menor (D até C), até que a ponta se separe da superfície da amostra. Entretanto, freqüentemente a ponta

adere à superfície, causando uma diminuição em V maior que na aproximação (C até E), até que a ponta separe da superfície (ponto E), quando desaparece essa força de interação. Entre os pontos C e E , o cantiléver está puxando a amostra para cima, enquanto a força de interação entre a amostra e a ponteira gera uma força para baixo. Exatamente no ponto E essas forças se igualam, podendo esse ponto ser usado para calcular a força desta interação. É deste modo que se pode calcular a força de interação entre duas moléculas, como por exemplo, um antígeno e seu respectivo anticorpo.

1.4.2 – Materiais Piezoelétricos

Os materiais piezoelétricos são cerâmicas que mudam suas dimensões em resposta a um campo elétrico aplicado, assim como desenvolvem um potencial elétrico em resposta à uma pressão mecânica. Essas cerâmicas podem ser projetadas em forma de tudo para moverem-se nos eixos x, y, e z, expandindo em alguns sentidos e contraindo-se em outros (Figura 7). Apesar de utilizar este modelo tubular mais ilustrativo para explicar o comportamento deste tipo de material, os equipamentos mais modernos utilizam piezos separados para o controle de cada um dos eixos.

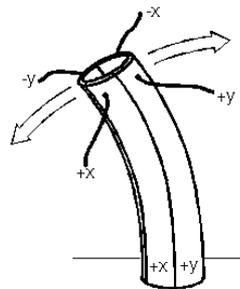


Figura 7: Tubo constituído de 4 cerâmicas piezoelétricas diferentes, o que lhe confere mobilidade em todo eixo xy.

Materiais piezoelétricos para SPM são fabricados geralmente de titanato zirconato de chumbo (PZT, uma abreviação de Transdutores Piezoelétricos, além de ser também uma abreviação da fórmula química: $Pb [Zr_x Ti_{(1-x)}] O_3 - 0 < x < 1$), com diferentes impurezas (como a dopagem com Lântanio) adicionadas para criar propriedades específicas. As cerâmicas são feitas sob pressão, resultando em um sólido policristalino. Cada um dos cristais em um material piezoelétrico tem seu próprio momento de dipolo elétrico. É graças a esses momentos de dipolo que os varredores² estão aptos a se mover em resposta a uma tensão aplicada.

Os momentos de dipolo no interior da cerâmica estão alinhados aleatoriamente, e se não forem alinhados, o piezo não terá quase nenhuma habilidade de mover-se. Um processo

² Os termos varredores e varredor são usados como tradução dos termos em inglês *scanners* e *scan*, respectivamente.

chamado *poling* é usado para alinhar os momentos do dipolo. Durante a polarização, os varredores são aquecidos aproximadamente a 200°C para desalinhar os dipolos naturais, enquanto uma tensão de corrente contínua é aplicada ao material. Depois de algumas horas os dipolos tornam-se alinhados. Nesse ponto, o piezo é refrigerado para “congelar” os dipolos em seu estado alinhado. Finalizado o processo, o piezo já será capaz de responder às tensões, estendendo e contraindo.

O uso ocasional do piezo ajudará a mantê-lo polarizado. A tensão elétrica aplicada para informar o movimento da varredura realinha os dipolos dispersos que retornaram à orientação aleatória. Se o varredor não for utilizado regularmente, uma fração significativa dos dipolos tomará novamente uma posição aleatória em algumas semanas. Esse processo pode ser acelerado se o varredor for submetido às temperaturas acima de 150°C.

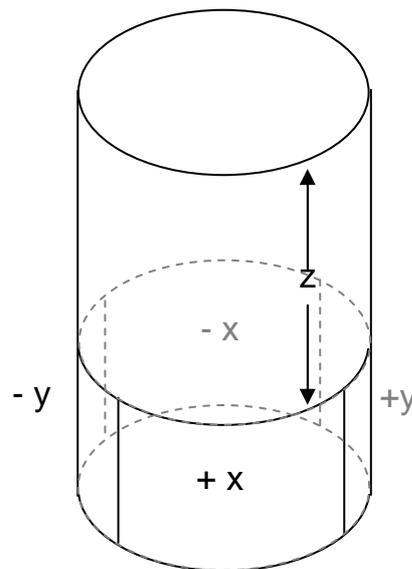


Figura 8: Tubo piezoelétrico constituído de 5 cerâmicas diferentes. Este tubo pode mover-se em todas as 3 dimensões (xyz), de forma controlada.

A parte inferior do tubo é dividida eletricamente em quadrantes verticais: +x, +y, -x, e -y, onde há eletrodos unidos à parte externa do tubo. Há ainda um par de eletrodos no tubo que fica em cima, para fornecer o movimento no sentido de z. Quando tensões opostas são aplicadas a +x e -x, por exemplo, a tensão induzida do tubo causa uma curvatura para a

frente ou para trás no sentido de x (Figura 8). Tensões aplicadas no eletrodo de z fazem o piezo estender-se ou contrair-se na vertical.

Na maioria dos casos em que imagens de AFM são obtidas, a tensão elétrica aplicada ao eletrodo de z do varredor em cada ponto da medida constitui a Força-constante do AFM, ou seja, a tensão aplicada é de tal forma que faz com que a deflexão do cantiléver naquele ponto retorne à posição original. Essa série de tensões aplicadas ao eletrodo de z gera os dados para reconstrução da topografia e análise.

A janela máxima de varredura que pode ser atingida por um material piezoelétrico depende do diâmetro do tubo, da espessura de sua parede, e da pressão a que são submetidos durante sua fabricação. Tipicamente, essa resolução lateral vai de alguns angströms até pouco mais de 100 micrômetros. Já verticalmente, esses varredores podem distinguir diferenças de altura que vão de escalas abaixo do angström, até alguns micrômetros. Os piezos são partes extremamente críticas na confecção de um SPM, pois a resolução sub-angström do varredor depende deles, assim como as respostas extremamente rápidas e a miniaturização dos equipamentos.

1.5 – Os Sistemas biológicos analisados

1.5.1 – Ovos de *Aedes aegypti*

A dengue é hoje um dos grandes problemas de Saúde Pública no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 50 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente, com cerca de 2,5% fatalidades por conseqüências da doença. Esta enfermidade é causada por um vírus que é transmitido por mosquitos, sendo o *Aedes aegypti* (Figura 9) o mais importante deles (<http://www.who.int/topics/dengue/en/>). A dengue é uma doença que afeta muitas pessoas todos os anos no Brasil, atingindo indiscriminadamente pequenas cidades ou grandes metrópoles.



Figura 9: Fotografia de um *Aedes aegypti* alimentando-se em um humano (<http://www.ars.usda.gov/is/graphics/photos/aug00/k4705-9.htm>).

Por outro lado, o *Aedes aegypti* é também o vetor de outra relevante doença viral, a Febre Amarela, que atinge principalmente regiões tropicais da África e das Américas. A OMS

estima que ocorram anualmente 200 mil casos de Febre Amarela, com aproximadamente 30 mil fatalidades por ano (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>).

Os vírus causadores dessas doenças são arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) pertencentes à família *Flaviviridae* que engloba, aproximadamente, 70 espécies, sendo que cerca de 30 causam doenças ao homem. Dentre os vírus dessa família, podemos destacar o vírus da encefalite e o vírus da hepatite C, por exemplo.

O *A. aegypti* pode infectar-se quando se alimenta de sangue contaminado e pode transmitir esses vírus à sua progênie. Os vírus replicam-se no interior do corpo dos mosquitos, preferencialmente em algumas regiões, como a parte mesodermal intermediária do intestino, os ovários, e a camada mais externa de gordura do inseto, antes de escapar para a cavidade interna do corpo, atingindo também o sistema nervoso do animal. Outra região importante atingida pelos vírus são as glândulas salivares. Uma vez infectadas, as fêmeas tornam-se infecciosas pelo restante de suas vidas, sem que os vírus lhes causem nenhum mal. Os vírus com capacidade de infectar as glândulas salivares mostraram-se muito mais eficientes que os demais, e provavelmente por esse motivo foram selecionados evolutivamente.

Várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* podem servir como vetores virais. No Brasil, duas delas estão instaladas: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo este último o principal vetor de manutenção da dengue na Ásia. Taxonomicamente esses insetos pertencem ao RAMO *Arthropoda* (pés articulados), CLASSE *Hexapoda* (três pares de patas), ORDEM *Diptera* (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), FAMÍLIA *Culicidae* e GÊNERO *Aedes* (Martins Jr, 2002).

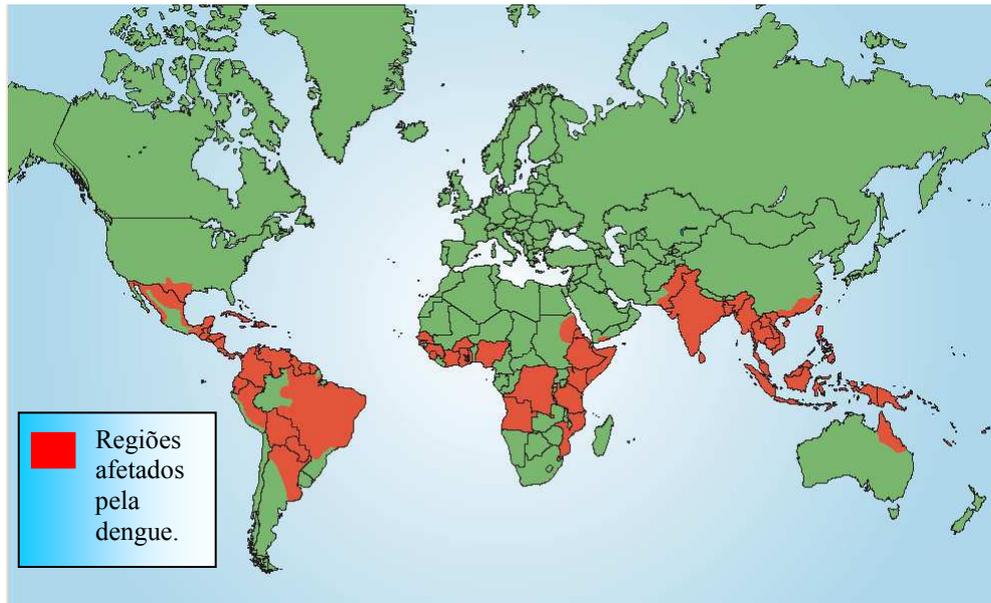


Figura 10: Áreas de maior incidência de dengue (em vermelho): América Central, Caribe (exceto Cuba e Ilhas Cayman), América do Sul (exceto Chile, Uruguai e grande parte da Argentina), México na América do Norte, alguns países da África, Austrália, China, Ilhas do Pacífico, Índia, Sudeste Asiático e Taiwan. Nos Estados Unidos a ocorrência de dengue é incomum, mas em 1995 foram registrados casos de transmissão no Texas. Adaptado de Kroeger *et al.*, 2004.

A dengue é conhecida no Brasil desde os tempos de colônia. Como o *A. aegypti* tem origem africana, é provável que ele tenha chegado ao Brasil junto com os navios negreiros. Tal suposição fundamenta-se no fato de os ovos de *A. aegypti*, ao contrário dos ovos da maioria dos outros mosquitos, resistirem em ambiente seco por vários meses, já tendo sido observada a eclosão desses ovos até 15 meses após a postura (Christophers, 1960).

O ciclo biológico do *A. aegypti* é de aproximadamente 12 dias, em condições favoráveis, a partir da postura dos ovos (oviposição). Durante o seu desenvolvimento, os mosquitos passam por 4 diferentes fases: a primeira fase, aquática, é iniciada pela postura dos ovos em ambientes úmidos, seguida pelo desenvolvimento em larva e pupa, terminando na fase terrestre, quando se torna um mosquito adulto.

Os ovos de *A. aegypti* são muito resistentes, conferindo um grande obstáculo ao controle da doença. Eles eclodem apenas quando colocados em contato com a água. Os ovos são depositados pelas fêmeas em recipientes naturais (como buracos em árvores, bambu e

cascas de côco) ou artificiais (como pneus e vasos de planta) úmidos, fora do meio líquido, próximo à superfície da água, podendo ficar aderidos em suas paredes internas por vários meses ou até entrar em contato com a água. Após esse estímulo, levam em média de 2 a 3 dias para originar as larvas.

Após a eclosão dos ovos, as larvas sofrem várias alterações, passando a maior parte do tempo se alimentando de detritos orgânicos, bactérias, fungos e protozoários existentes na água. São providas de grande mobilidade e têm como função primária o crescimento. A duração da fase larval, em condições de temperatura entre 25°C e 29°C e boa oferta de alimentos, é de 5 a 10 dias.

A fase final do desenvolvimento aquático é representada pelas pupas. Não se alimentam, apenas respiram, sendo dotadas de boa mobilidade. É nessa fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para adulto. A duração da fase pupal, em condições favoráveis é de 2 a 3 dias em média.

Chegando à fase adulta, o mosquito é escuro e rajado de branco, alimentando-se durante o dia. Macho e fêmea alimentam-se de néctar e sucos vegetais, sendo que a fêmea, após o acasalamento, necessita de sangue para maturação dos ovos, alimentando-se preferencialmente nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. O intervalo entre a alimentação sangüínea e a oviposição varia de 2 a 3 dias. A fecundação ocorre durante a postura e um único acasalamento permite que as fêmeas fertilizem todos os ovos que venham a pôr em toda a sua vida (dois a três ciclos gonotróficos, podendo pôr de 100 a 200 ovos por vez). Os mosquitos adultos não apresentam grande dispersão, os machos costumam permanecer próximos aos criadouros, onde ocorre o acasalamento. Em condições favoráveis, os mosquitos vivem, em média, 35 dias (Christophers, 1960; Clements, 1992 e Martins Jr, 2002).

Os ovos do *Aedes aegypti* têm contorno alongado e fusiforme, medindo de 500 μm a 1 mm de comprimento, ficando no limite do visível. À olho nu, eles são vistos como apenas pequenos pontos pretos. Uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação. O embrião do mosquito é coberto por uma casca composta, que forma o que chamamos de casca do ovo. Essa casca é formada pelo exocócion, pelo endocócion, e pela cutícula serosa, que surge quando o ovo tem em torno de 15 horas de desenvolvimento (Martins Jr, 2002).

O endocócion é uma estrutura bastante homogênea, enquanto que o exocócion apresenta tubérculos protuberantes em sua parte externa (Figura 11).

Aedes e *Anopheles* são dois gêneros de mosquitos da família *Culicidae* muito usados em estudos de embriologia comparada, apesar de terem algumas diferenças. O exocócion de *Aedes*, por exemplo, é um pouco diferente do *Anopheles* (Monnerat *et al.*, 1999).

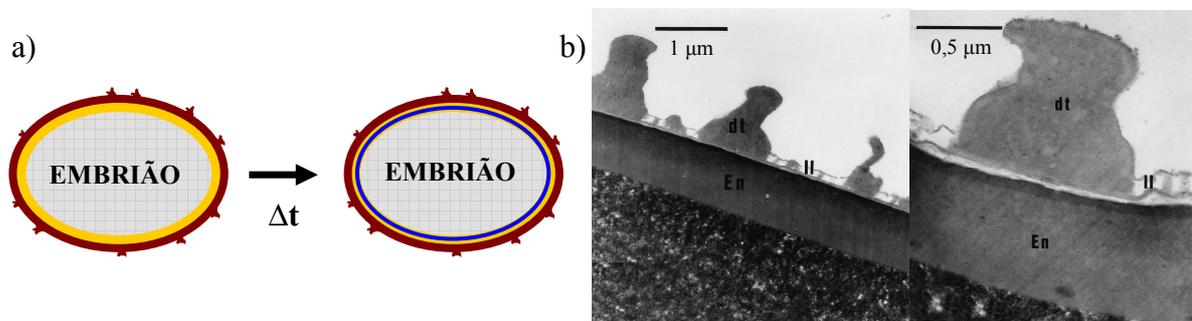


Figura 11: a) Composição do cócion: exocócion (em vermelho), endocócion (em amarelo), e a serosa (em azul). b) Microscopia eletrônica adaptada de (Monnerat *et al.*, 1999) na qual as estruturas do exocócion e do endocócion de ovos de *Anopheles* podem ser vistas com mais detalhes. Nesta, *dt* representa o equivalente aos tubérculos e *En* representa o equivalente ao endocócion de *A. aegypti*.

No momento da oviposição, ovos de *Aedes* e *Anopheles* recém-fertilizados são claros, flexíveis e permeáveis. Com o passar das horas eles se tornam escuros, rígidos e impermeáveis. Existe uma primeira barreira de permeabilidade nos ovos, que em *Anopheles*, desaparece do momento da postura até cerca de 12 a 15 horas depois da oviposição. Antes do surgimento dessa barreira, os ovos são permeáveis à entrada de Rodamina B e de etileno

glicol (Martins Jr, 2002). Alguns autores sugerem que esses três eventos estariam acoplados (Clements, 1992), enquanto dados de outros autores indicam que esses três processos podem ocorrer de forma independente para *Anopheles* (Martins Jr, 2002).

O processo de escurecimento é verificado facilmente por observação visual. No momento da postura os ovos são brancos e logo começam a escurecer. Após cerca 1 ou 2 horas quase todos os ovos já estão escuros, pretos (Figura 12). Esse escurecimento pode ser inibido utilizando-se a benserazida, uma droga que inibe a enzima dopa-descarboxilase, que é a responsável por transformar L-dopa em dopamina, um dos precursores da melanina, que é necessária para o escurecimento.

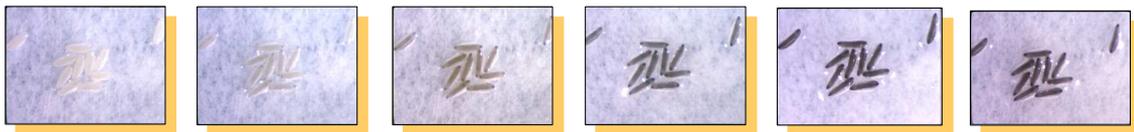


Figura 12: Observação de ovos de *Anopheles* sem nenhum tipo de tratamento especial escurecendo ao longo de 3 horas.

A mudança da permeabilidade à água é verificada por experimentos nos quais se observa o murchamento dos ovos em *Anopheles* (Figura 13). No caso de *Anopheles*, a segunda barreira de permeabilidade surge entre 15 e 17 horas, uma vez que até 14 horas após a oviposição, 100% dos ovos murcham após 15 minutos de contato com o ar com pouca umidade enquanto ovos de 18 horas após a postura não apresentam nenhum ovo murcho após 15 minutos de exposição à ambientes secos (Martins Jr, 2002).

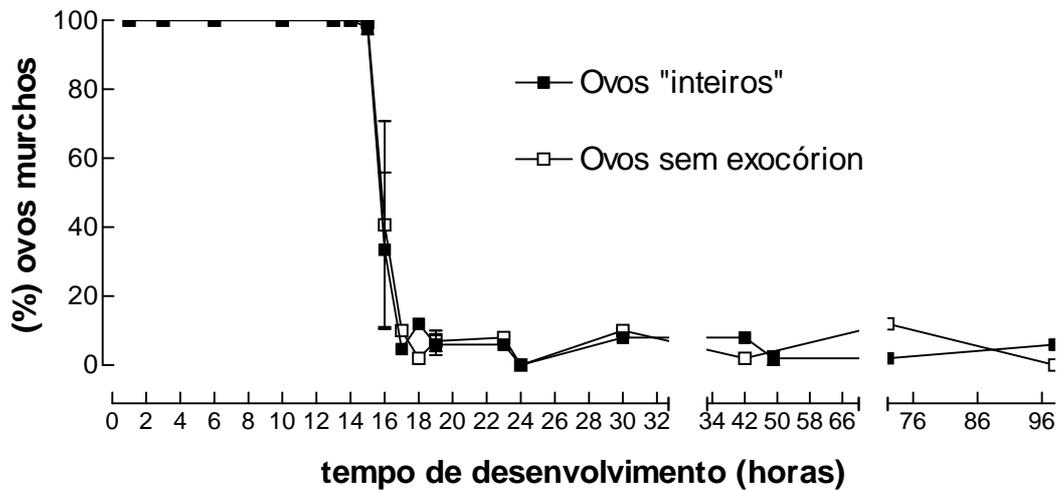


Figura 13: A barreira de permeabilidade surge entre 15 e 18 horas em *Anopheles*. Note que não há diferenças entre os ovos com e sem exocórrion. Adaptado de Ademir de Jesus Martins Jr., 2002. Para *A. aegypti*, essa mudança ocorreria entre 12 e 15 horas (Gustavo Lazzaro Rezende do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, comunicação pessoal).

Uma das grandes dificuldades no controle do *Aedes aegypti* é que seus ovos são extremamente resistentes, dificultando a sua eliminação. Um tratamento capaz de matar todos os mosquitos não evita a eclosão dos ovos remanescentes e o nascimento de novos mosquitos nos próximos meses. A melhor compreensão do enrijecimento desses ovos pode ajudar a esclarecer porque eles são mais resistentes do que os ovos de outros mosquitos, podendo sobreviver a longos períodos de dessecação. A caracterização da cinética do enrijecimento desses ovos viabilizará o teste de possíveis inibidores da via de enrijecimento nos períodos adequados, antes que o processo de enrijecimento já esteja completo. Tendo em vista que ovos que não enrijecem não formam embriões viáveis, drogas que interfiram no enrijecimento desses ovos podem ser promissoras no combate desses vetores.

A rigidez dos ovos, entretanto, é um parâmetro de difícil análise, tanto qualitativa quanto quantitativa. Uma solução para se medir o grau de elasticidade (relacionada com a rigidez) do ovo é utilizar o AFM para medir a elasticidade da casca do ovo de *A. aegypti* em

diferentes momentos da embriogênese após a oviposição. Isso é possível uma vez que essa técnica é capaz de medir a elasticidade de sistemas ainda mais sensíveis, como células (Horber *et al.*, 1995). Até o momento não há nenhum trabalho na literatura no qual a elasticidade de ovos de mosquito tenha sido estudada. A determinação precisa das propriedades do ovo durante a embriogênese é importante para as pesquisas básicas e profiláticas. Este trabalho está sendo realizado em colaboração com o grupo da professora Denise Valle – Departamento de Entomologia – Fiocruz – Rio de Janeiro – Brasil.

1.5.2 – Pili annulati

Pili annulati (PA) foi descrita, pela primeira vez, por Landois, em 1866 (Landois, 1866). PA é uma anomalia humana rara, caracterizada por fios de cabelo “zebrados”, com bandas claras e escuras alternadas, que conferem ao cabelo um aspecto brilhante, bastante semelhante a pêlo de gatos (Streck *et al.*, 2007). Esse aspecto pode ser visto em detalhe na Figura 14.



Figura 14: Fotografia da parte de trás da cabeça de uma mulher loira de 29 anos que apresenta pili annulati.

PA é definido como uma anomalia hereditária autossômica, apesar de casos esporádicos já terem sido descritos (Dawber, 1997; Musso, 1970; Giehl *et al.*, 2004). Os mecanismos moleculares desta anomalia ainda não estão esclarecidos, mas acredita-se que PA seria causado por formação defeituosa de matriz (Musso, 1970), já que estudos recentes apontam que PA não deve ser causada por um defeito na citoqueratina (Giehl *et al.*, 2005). Não há nenhum consenso sobre a origem das bandas claras, sendo que alguns autores propõem que as bandas claras são originadas em decorrência de espaços preenchidos por ar (Giehl *et al.*, 2005), enquanto outros atribuem essa diferença ao material protéico.

Apesar das diferenças facilmente visualizadas por microscopia óptica (Figura 15), nenhuma diferença morfológica pôde ser observada nas imagens obtidas por microscopia eletrônica e por AFM (dados não mostrados).

Diante da ausência na literatura científica de pesquisas referentes às propriedades mecano-elásticas de amostras de cabelo PA e visando apresentar algum suporte experimental para os modelos explicativos da doença, decidimos medir a elasticidade das bandas claras e escuras de pelos dessa natureza, utilizando a técnica AFM

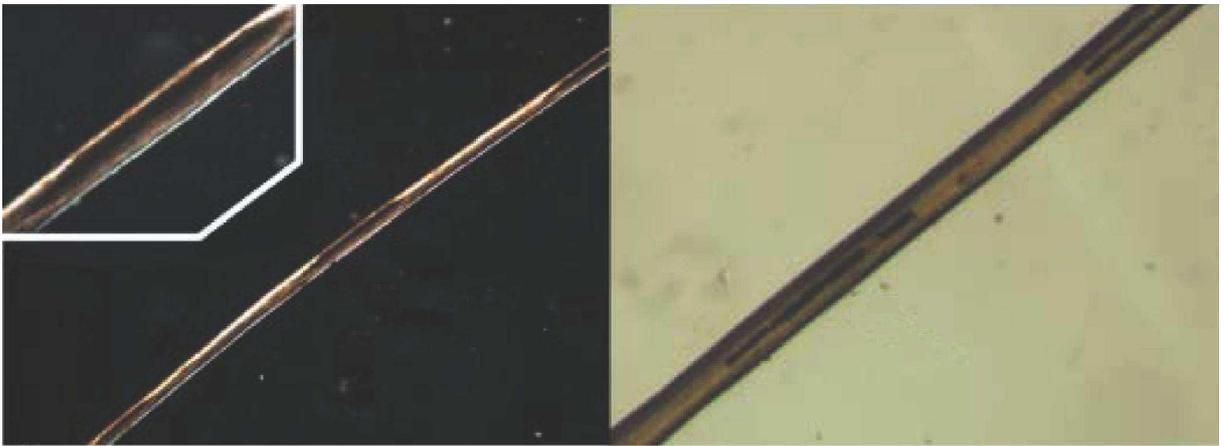


Figura 15: Aparência Clínica do fio de cabelo de uma mulher loira com 29 anos que apresenta PA desde a infância. Microscopia de luz polarizada à esquerda ($\times 5$ e $\times 10$ no detalhe) e microscopia de luz refletida à direita ($\times 10$) mostrando as partes escuras ao longo do fio de cabelo e uma paciente de PA.

II - OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Medidas de elasticidade de sistemas biológicos podem ajudar na compreensão de diversos fenômenos biológicos, desde uma simples caracterização à compreensão de processos bioquímicos.

Pretendemos acompanhar a mudança na elasticidade em ovos de *A. aegypti* ao longo de sua embriogênese pela técnica de Microscopia de Força Atômica. Comparar essa mudança com outros fenômenos que ocorrem no mesmo período pode ajudar na compreensão da resistência desses ovos. Para isso, determinaremos as condições nas quais ovos de *A. aegypti* podem ser estudados por AFM, e os modelos físicos e as condições experimentais a serem utilizadas para o estudo de elasticidade. Em seguida, precisaremos quando se dão as mudanças de coloração, permeabilidade e volume. Assim, seremos capazes de definir quando e quanto a elasticidade de ovos de *A. aegypti* muda ao longo de sua embriogênese, comparando-as com outros processos que possam estar acoplados.

Determinar a elasticidade das bandas claras e escuras existentes em fios de cabelo humano de portadores da anomalia pili annulati e compará-las com a elasticidade de fios de cabelo normais. Como ainda não se sabe qual diferença, além da coloração, as bandas claras e escuras apresentam, as medidas de elasticidade feitas nessas duas partes poderão servir de teste para hipóteses existentes na literatura.

Objetivos Específicos:

- Definição dos protocolos de preparação da amostra, bem como do ambiente no qual elas serão analisadas.
- Determinação dos tipos de cantiléver mais adequados ao estudo.
- Determinação de diversas condições experimentais, como velocidade de aproximação do cantiléver, sistemas de amortecimento, ambiente experimental, temperatura, etc.
- Escolha de superfícies controle e de modelos físicos apropriados para o estudo de elasticidade nos sistemas biológicos.
- Desenvolvimento de programas computacionais que possibilitem análise automatizada das curvas de força para a obtenção dos parâmetros desejados e sua documentação.
- Definição dos parâmetros que serão utilizados durante a análise dos dados, como a quantidade de deformação do cantiléver usada nos ajustes do modelo de Hertz e da inclinação final.
- Medida quantitativa da elasticidade do endocóxon.
- Verificação de diferenças nos valores de elasticidade de ovos de *A. aegypti* em diferentes momentos após a oviposição.
- Determinar a variação dos valores do *Módulo de Young* e de *Constante Elástica* dos ovos recém postos de *A. aegypti* ao longo da embriogênese, caracterizando o período exato, no qual ocorrem as mudanças nos valores de elasticidade.
- Verificar se há relação entre o endurecimento observado e o influxo de água que ocorre nas primeiras horas do desenvolvimento, comparando com a variação de volume.
- Comparar a mudança de elasticidade dos ovos com o escurecimento.
- Comparar a mudança de elasticidade dos ovos com a mudança de permeabilidade.

- Utilizar drogas que interfiram no escurecimento, como a Benserazida, e verificar seu efeito no enrijecimento dos ovos.
- Estudar ovos não fertilizados, já que o escurecimento desses não necessita do embrião viável (Rezende, G. comunicação pessoal).
- Realizar medidas de elasticidade em outros sistemas biológicos, nesse caso, em fios de cabelo de uma pessoa acometida de pili annulati para caracterização da elasticidade de suas bandas claras e escuras.

III - METODOLOGIA

3.1 – Microscópio de Força Atômica

O microscópio de força atômica (AFM) utilizado neste trabalho é o modelo MFP-3D fabricado pela empresa *Asylum Research, Santa Barbara – Califórnia – USA*. Em todos os experimentos para obtenção das curvas de força o AFM foi utilizado em modo contato. As ponteiros utilizadas para as curvas de força são tetraédricas, feitas de silício (AC160TS da Olympus) e com constante de mola, determinada pelo método de ruído térmico (Lévy & Maaloum, 2002 e Burnham *et al.*, 2003), geralmente entre 40 e 60 N/m e raio de curvatura do indentador menor do que 10 nm. As ponteiros utilizadas para a obtenção de imagens são tetraédricas, feitos de nitrito de silício (NP-S da Veeco – Digital Instruments Inc.) e constante de mola de 0,12 N/m (determinada pelo método de ruído térmico). Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente. As medidas foram feitas em água miliQ no caso dos ovos de *Aedes aegypti* e no ar no caso dos fios de cabelo de paciente de pili annulati. Uma lâmina de vidro foi utilizada como superfície rígida para calibrar a sensibilidade do foto-detector.

Esse modelo de AFM permite o desempenho de ciclos do tipo “*approach-retraction*”, nos quais a força de contato máxima, o tempo de interação e as velocidades de aproximação-afastamento podem ser controlados independentemente. As curvas de força foram adquiridas a 5,5 $\mu\text{m/s}$; com no máximo 300 nm de deslocamento do cantiléver, e o tempo de interação (intervalo entre o fim da aproximação do piezo e o início da retração) selecionado foi zero. As medidas foram realizadas com o AFM como em Hofmann, *et al.*, 1997.

3.2 – Teoria utilizada nos cálculos para obtenção do *Módulo de Young*

O modelo visco-elástico em paralelo apresentado na Figura 16 representa uma boa aproximação para amostras biológicas, que têm um componente elástico, que armazena energia, e um componente viscoso, que dissipa energia. Neste modelo, cada componente responde de forma “independente” e simultânea às pressões aplicadas. Cada elemento suportará uma parcela da pressão aplicada, sendo a deformação total a mesma para os dois elementos, em cada instante. As contribuições dos componentes viscosos são pequenas na escala de tempo em que uma curva de força é obtida com o AFM (A-Hassan *et al.*, 1998).

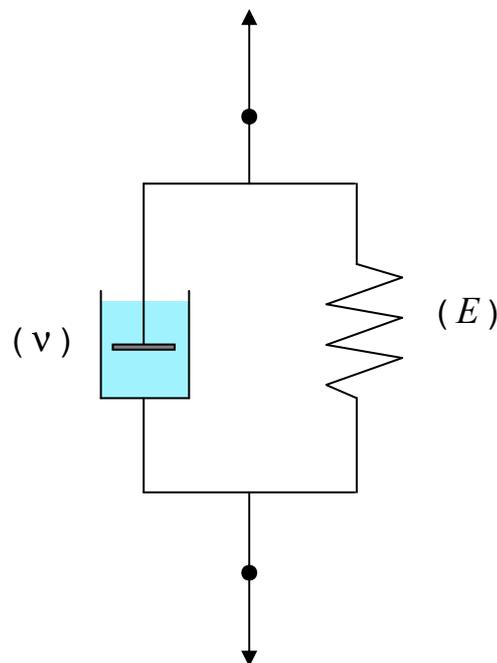


Figura 16: Modelo visco-elástico em paralelo, onde v é a viscosidade e E é a elasticidade.

Dentre as muitas técnicas que podem ser utilizadas para a determinação de propriedades mecânicas de amostras biológicas (Vinckier & Semenza, 1998), a técnica de Microscopia de Força Atômica foi escolhida nesse trabalho para a determinação das propriedades elásticas de interesse: *Módulo de Young* e *Constante Elástica*. Isto foi feito com base na teoria geral esboçada anteriormente. Entretanto, como as amostras biológicas têm geometria significativamente mais complexa que o cilindro esboçado na introdução deste

trabalho, utilizamos modelos mais complexos para obter os valores de *Módulo de Young* em amostras biológicas. Uma forma relativamente simples de realizar essa medida é através da indentação da amostra (Figura 17), que é a moosa produzida pela aplicação de uma força em uma superfície.

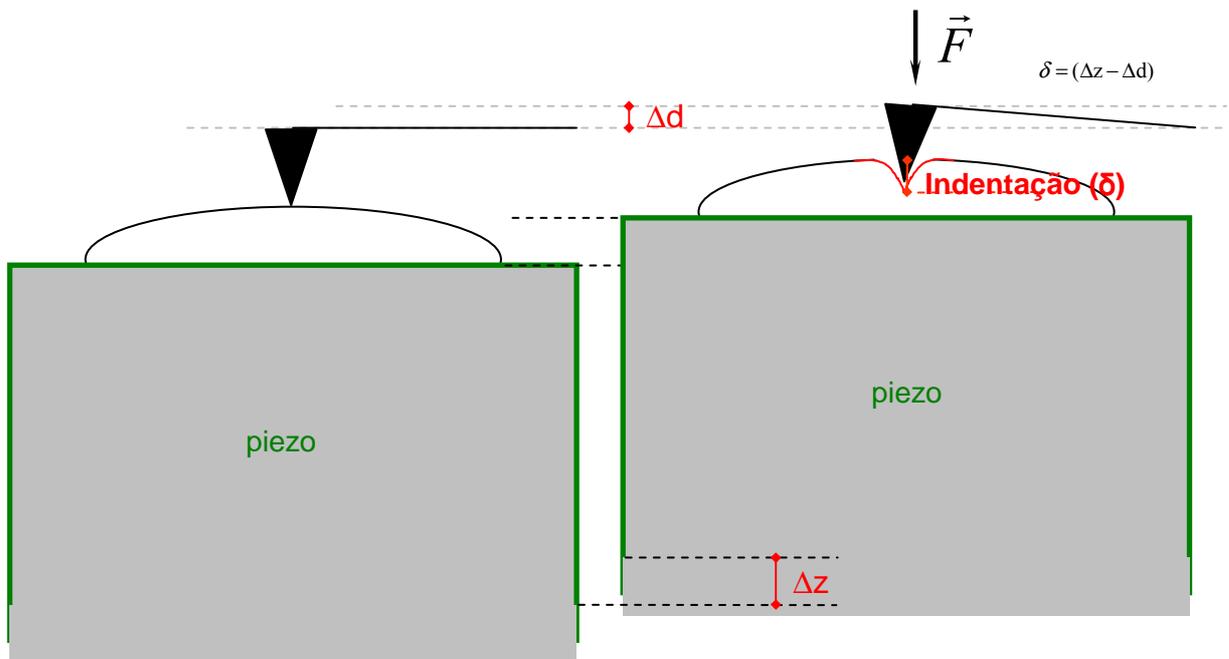


Figura 17: O deslocamento do piezo (z), assim como o deslocamento do cantiléver, aumentam no mesmo sentido em que a indentação diminui. Por isso, o valor da indentação deve ter o mesmo módulo que a soma entre a variação de z e de d , mas sinal contrário: (equação [4]).

O valor do *Módulo de Young* poderá ser obtido a partir da medida da força aplicada na amostra, e da indentação que será causada por ela. É claro que essa elasticidade será diferente para indentadores de diferentes formas. Hertz descreveu modelos simples para se calcular a indentação causada por indentadores esféricos e parabolóides, por exemplo. A teoria de Hertz (Timoshenko & Goodier, 1970; Vinckier & Semenza, 1998; Radmacher, 2002) descreve a deformação, τ , de uma esfera elástica sob uma força externa, F , contra uma amostra lisa e rígida, (Heuberger *et al.*, 1996), da seguinte forma:

$$\tau^3 = \frac{9(1-\nu_{ip}^2)^2 F^2}{16E_{ip}^2 R}$$

onde R é o raio da curvatura da esfera e E_{tip} e ν_{tip} são, respectivamente, o *Módulo de Young* e a relação de Poisson do indentador. A relação de Poisson é definida como a razão entre a deformação relativa transversal (ortogonal) e a deformação relativa no sentido de alongação, e traz informação sobre a compressibilidade do material, sendo útil para determinar quanto o material se estende ortogonalmente ao sentido da força aplicada. O valor de ν está sempre entre -1 e $\frac{1}{2}$, sendo que materiais com valores negativos são raramente encontrados (Timoshenko & Goodier, 1970; Weisenhorn *et al.*, 1993; Heuberger *et al.*, 1996).

Embora os experimentos sejam realizados em uma escala microscópica, a teoria clássica ainda pode ser usada porque a ponta indenta 100 ou mais átomos da superfície. As pontas de AFM podem ter diferentes geometria, sendo as cônicas, parabólicas e esféricas as mais comuns. Dependendo da forma do indentador, utiliza-se uma equação específica para o cálculo da elasticidade, pois a superfície que está em contato com a amostra é extremamente relevante nesse cálculo. No caso dos indentadores piramidais utilizados nesse trabalho, a melhor aproximação para a indentação é a do tipo cônica, que é bastante satisfatória (Radmacher, 2002). As modificações feitas por Sneddon à teoria de Hertz, equação [1], nos fornece o modelo apropriado para obter os valores de elasticidade com os indentadores piramidais utilizados nesse estudo (Vinckier & Semenza, 1998; Radmacher, 2002 e Radmacher 2007). Nesse modelo, os indentadores são considerados infinitamente rígidos e a amostra deformável e lisa (Weisenhorn *et al.*, 1993; Heuberger *et al.*, 1996).

Para um indentador cônico com ângulo de abertura α , a força total F_{cone} em função da indentação (δ) é descrita por:

$$F_{cone}(\delta) = \frac{2E^*}{\pi} \delta^2 \cdot \text{tg}(\alpha), \quad [1]$$

onde E^* é o *Módulo de Young* relativo:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \mu_{tip}^2}{E_{tip}} + \frac{1 - \mu_{sample}^2}{E_{sample}}, \quad (\text{Vinckier \& Semenza, 1998}).$$

Se $E_{sample} \ll E_{tip}$, então $1/E^*$ pode ser simplificado para:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \mu_{sample}^2}{E_{sample}} \quad [2].$$

Substituindo [2] em [1], obtêm-se:

$$F_{cone} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha) \quad [3].$$

onde E_{sample} é o *Módulo de Young* do material estudado; e $\nu = \mu_{sample}$, é a razão de Poisson da amostra.

Neste modelo, a estrutura atômica das amostras não é considerada, e é suposto que a distribuição da matéria destas é *homogenea*, ou seja, continuamente distribuída por seu volume. Nessa hipótese, considera-se a maior parte do volume estudado como *isotrópica*, ou seja, têm propriedades elásticas semelhantes em todas as direções (Timoshenko & Goodier, 1970).

3.3 – Cálculo da indentação da amostra

A indentação (δ) é dada pela diferença entre o deslocamento do piezo ($z-z_0$) e o deslocamento do cantiléver ($d-d_0$):

$$\delta = (\Delta z - \Delta d) \text{ ou } \delta = (-z + z_0) - (d - d_0) \quad \text{ou}$$

$$\delta = (z_0 - d) - (z - d_0). \quad [4].$$

A convenção dos sinais positivos e negativos utilizadas aqui está ilustrada na Figura 18. Para isso, estamos utilizando como exemplo equipamentos nos quais o movimento relativo entre a base e o cantiléver se dão por um piezo localizado abaixo da amostra (Figura 18).

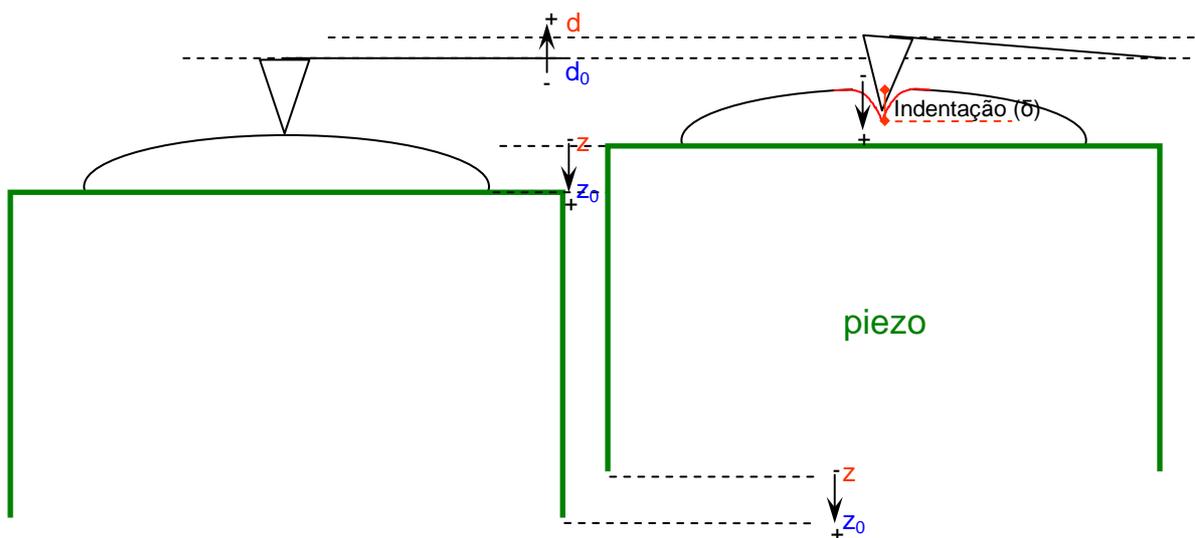


Figura 18: O deslocamento do piezo (z), assim como o deslocamento do cantiléver, aumentam no mesmo sentido em que a indentação diminui. Por isso, o valor da indentação deve ter o mesmo módulo que a soma entre a variação de z e de d , mas sinal contrário: (equação [4]).

O modelo mais simples que se pode utilizar para obter a indentação a partir das curvas de força é o modelo baseado no trabalho de Heinrich Hertz (Radmacher, 2002). O Modelo de Hertz descreve a indentação elástica de uma amostra de extensão infinita. Quando a área da ponteira (a maior seção reta tem aproximadamente $300 \mu\text{m}^2$) é muito menor que a superfície dos materiais estudados, essa é uma boa aproximação. No caso de ovos de *Aedes aegypti*, essa

área é de aproximadamente $100.000 \mu\text{m}^2$. A equação para esses indentadores cônicos é a equação [3], descrita anteriormente.

Esta equação é a modificação do modelo de Hertz pela mecânica de Sneddon (Rotsch *et al.*, 1999), onde E é a elasticidade (*Módulo de Young*) da amostra em N.m^{-2} ; ν é a razão de Poisson, que no caso de amostras incompressíveis, como células biológicas, pode-se utilizar o valor 0,5 (Radmacher, 2002), e α é o ângulo de meia-abertura do cone (Domke & Radmacher, 1998).

Essa força é a mesma que atua no cantiléver. A lei de Hooke diz que uma força atuando sobre uma mola é proporcional ao deslocamento a partir da posição de equilíbrio e tem sentido oposto ao deslocamento:

$F = -k.\Delta x$, no caso de uma força atrativa. Na convenção aqui utilizada uma força repulsiva é positiva, e uma atrativa é negativa. No caso de uma amostra sendo comprimida por uma mola, essa força é repulsiva, logo positiva. Então:

$$F = k.\Delta x; \quad \text{ou: } K_c.(d-d_0) = F, \text{ onde } k_c \text{ é a constante de mola do cantiléver.}$$

Substituindo:

$$K_c.(d - d_0) = F_{\text{cone}} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha) \cdot \delta^2$$

Substituindo δ pela equação [4], obtêm-se:

$$\Rightarrow K_c.(d - d_0) = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha) \cdot [(z_0 - z) - (d - d_0)]^2 \quad [5].$$

As curvas obtidas experimentalmente pelo AFM são inicialmente *voltagem versus* deslocamento do piezo. Após a calibração feita a partir da constante elástica do cantiléver, obtemos uma curva de deslocamento do cantiléver (d) *versus* deslocamento do piezo (z). Resolvendo a equação [5] para d em função de z , encontramos o valor de E que melhor se ajusta a cada curva experimental. A resolução desta equação encontra-se no *ANEXO III*.

3.4 – Cálculo da *Constante Elástica* da amostra

Em uma curva experimental típica de amostras macias (Figura 19), podemos observar 3 momentos distintos durante a aquisição da curva. Começando da direita para a esquerda da curva vermelha, primeiro o deslocamento do cantiléver mantêm-se constante com a variação do deslocamento do piezo. Isso ocorre porque ainda não há contato. No momento do contato, a ponteira piramidal começa a penetrar na amostra. Se isso não ocorresse, o deslocamento do cantiléver seria linear, ou caso a amostra não sofresse nenhuma compressão, exatamente igual ao deslocamento do piezo (como na curva em verde). Conforme a ponteira piramidal penetra na amostra, a área de contato entre elas também varia. Por isso ocorre essa relação complexa (equação [3]), não linear nesse momento da curva. Observando essa parte da curva, vemos claramente um comportamento parabolóide, justificado pela função quadrática na equação [3]. Assim que a ponteira deforma o máximo que pode a superfície da amostra, cessa a indentação, e agora a amostra é comprimida como um todo. Deste modo, a relação entre os deslocamentos do piezo e do cantiléver volta a ser linear, como pode ser observado da parte azul em diante.

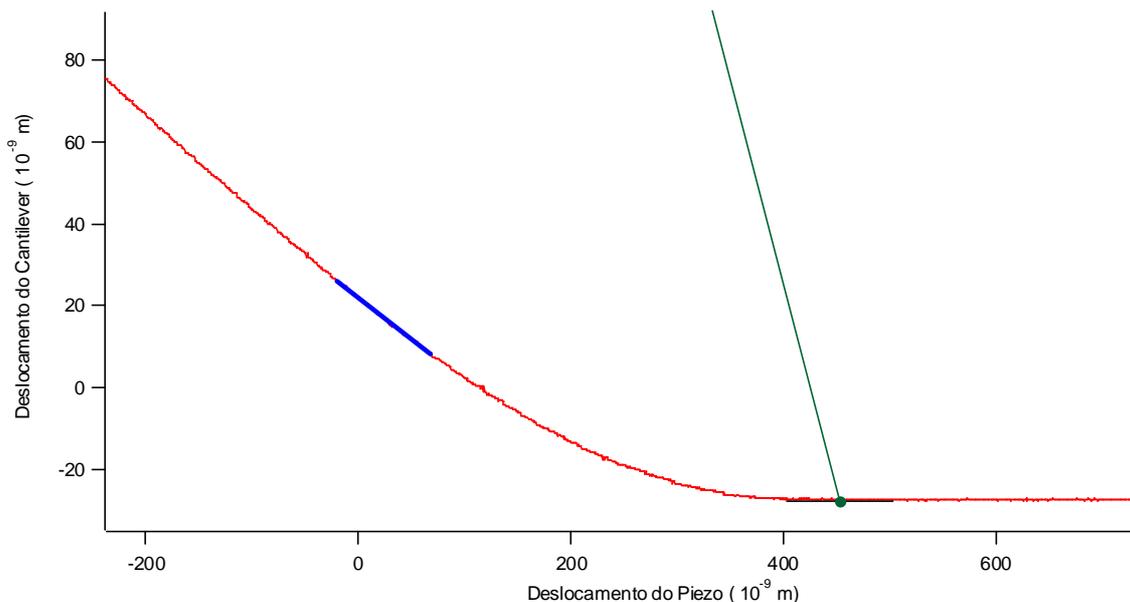


Figura 19: Curva típica de um material com *Módulo de Young* de 10^8 Pa (em vermelho). A curva em verde representa um material que não sofre indentação (observe as diferenças nas escalas). A semi-reta azul é o fragmento utilizado para os cálculos da constante de mola.

No intervalo no qual a relação entre deslocamento do cantiléver e deslocamento do piezo volta a ser constante, pode-se dizer que toda amostra está sendo comprimida homogeneamente. Pode-se então imaginar que, uma vez cessada a indentação, há um sistema composto por duas molas (Figura 20), o cantiléver e a amostra.

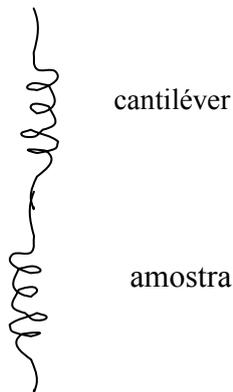


Figura 20: Esquema representando um modelo de duas molas em série.

Quando uma força é aplicada em um sistema de duas molas em série, o seu valor é o mesmo em qualquer ponto ao longo do sistema. Se as molas possuírem diferentes constantes de mola, os comprimentos de seus encurtamentos ou alongamentos, que dependem do sentido da força, serão diferentes.

O deslocamento do cantiléver medido no AFM (d_c) pode ser utilizado para calcular a força resultante F que atua no sistema, já que se sabe o valor da constante de mola dos cantilêveres (k_c).

$$F = k_c \cdot d_c$$

A força F é a mesma que atua na amostra abaixo do cantiléver, que pode ser obtida pela relação:

$F = k_{am} \cdot d_{am}$, onde K_{am} é a constante elástica da mola equivalente da amostra, e d_{am} é o deslocamento da amostra, ou sua indentação. Como as duas forças são iguais, tem-se que:

$$F = k_c \cdot d_c = k_{am} \cdot (d_p - d_c) \quad , \quad k_{am} = \frac{k_c \cdot d_c}{d_p - d_c} = \frac{k_c}{\left(\frac{d_p}{d_c} - 1\right)}$$

Onde d_p é o deslocamento do piezo. Como a inclinação da reta no gráfico da Figura 20

é exatamente $\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{d_c}{d_p} = b$, tem-se o k_{am} em função apenas de k_c e da inclinação da reta, b .

$$k_{am} = \frac{k_c}{\frac{1}{b} - 1}$$

3.5 – Análise das curvas de força

Os resultados que caracterizam a elasticidade são retirados da análise da curvatura inicial e da inclinação final das curvas de aproximação, utilizando a teoria de Hertz para o cálculo quantitativo do *Módulo de Young* (Rotsch *et al.*, 1999; Radmacher, 2002) e o modelo de molas em série para o cálculo da *Constante Elástica*. Todos os dados foram analisados no programa desenvolvido por mim e pelo meu orientador utilizando o pacote Igor Pro® da Wavemetrics, Inc. e está completamente descrito e comentado no ANEXO I. Os valores do *Módulo de Young* e da *Constante Elástica* em todas as curvas de força foram obtidos, a partir do ajuste dos modelos explicados nas seções 3.2 e 3.4, por esse programa.

A análise das curvas para obtenção do *Módulo de Young* foi, sempre que possível, feita com os cursores do programa de análise posicionados entre o ponto de contato, determinado visualmente, e o ponto correspondente a uma deflexão do cantiléver igual a 50 nm acima deste ponto de contato. Isso foi feito para que em todas as análises a força que atuava na amostra fosse sempre a mesma. Nesse intervalo o modelo de Hertz modificado pela mecânica de Sneddon era ajustado. Pelo mesmo motivo, as análises para a determinação dos valores de *Constante Elástica* foram feitas, sempre que possível, com os cursores do programa de análise posicionados nos pontos correspondentes a 100 e 150 nm de deflexão do cantiléver, contatos a partir do ponto de contato.

3.6 – Postura dos ovos de *Aedes aegypti*

A postura dos ovos de *Aedes aegypti* foi induzida como em Martins Jr, A.(2002). As fêmeas de *A. aegypti* foram alimentadas com sangue três dias antes da postura forçada, que consistiu em estressá-las com frio ou altas concentrações de CO₂ até adormecerem, sendo então transferidas para uma placa de petri forrada com papel filtro ou papel celofane. Assim que as fêmeas acordam, um pouco de água destilada (entre 0,6 e 1,2 mL) é adicionada sob o papel, tornando o ambiente úmido, estimulando as fêmeas a pôr ovos. O intervalo de tempo utilizado para a postura é de 10 a 15 minutos a 25 °C.

Para os experimentos com ovos não fertilizados, foi necessário garantir que as fêmeas não tivessem nenhum contato com os machos, pois um único acasalamento permite que a fêmea fertilize todos os ovos que venha a pôr. Ainda na fase de pupas, os mosquitos eram separados, e colocados em recipientes individuais. Uma vez que os mosquitos adultos já tivessem eclodido, o Gustavo L. Rezende (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC - FIOCRUZ) verificava visualmente quais eram fêmeas e as separava. Esse processo era checado três vezes, para garantir que não haveria nenhum macho no grupo. A postura dos ovos foi induzida da mesma forma que para fêmeas normais, que acasalaram.

3.7 – Remoção do exocócion dos ovos de *Aedes aegypti*

A remoção do exocócion nos ovos se deu através de uma lavagem durante 2 min em hipoclorito de sódio 30%, seguida de abundante lavagem com água milliQ ou PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, - pH 7,4), dependendo do experimento. É necessário esperar pelo menos 30 minutos após o fim da postura antes de tratar os ovos com hipoclorito de sódio 30%. Apenas esperando-se este tempo os embriões permanecem viáveis após o tratamento (Mazur, P. e Valle, D., comunicação pessoal).

A remoção do exocócion foi confirmada (Figura 21) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) feita por Bruno S. Vale (Laboratório de Patologia, IOC – FIOCRUZ) e Gustavo L. Rezende (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC - FIOCRUZ).

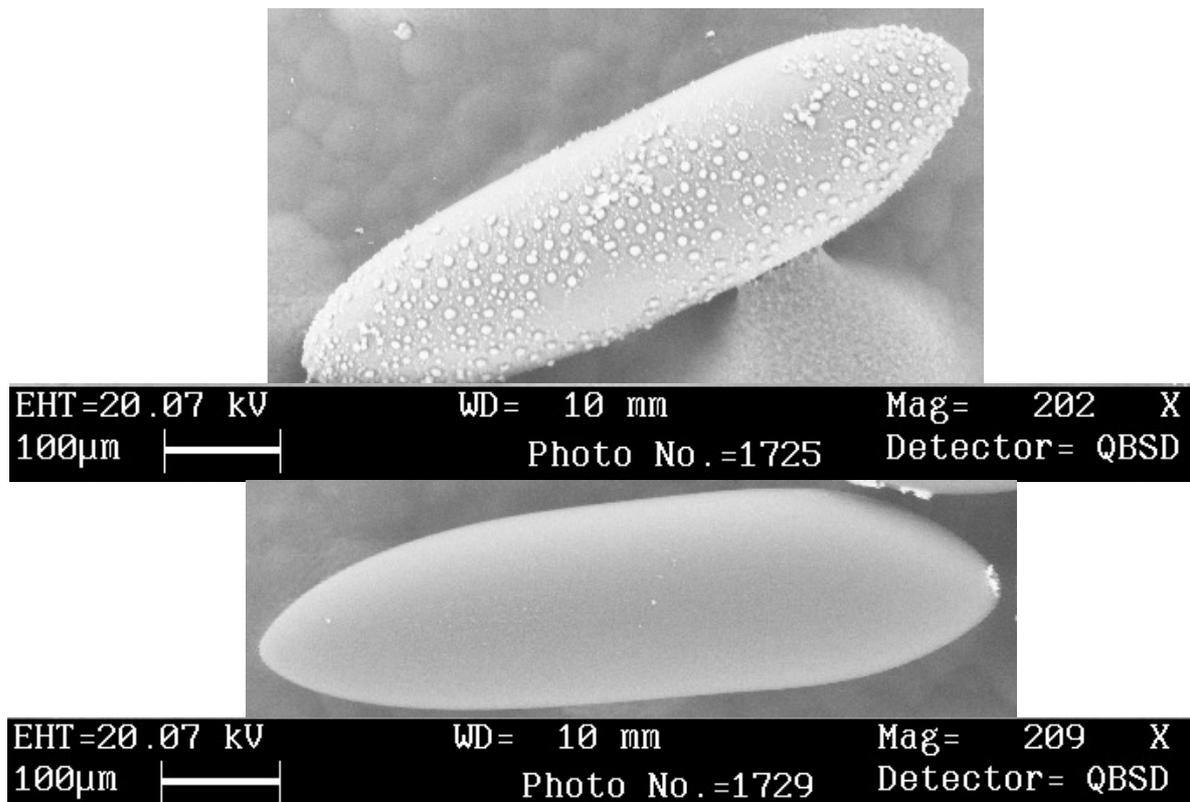


Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando ovos de *A. aegypti* com o exocócion (acima), e após o tratamento para a remoção deste (abaixo). Imagens produzidas por Bruno S. Vale (Laboratório de Patologia, IOC – FIOCRUZ) e Gustavo L. Rezende (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC - FIOCRUZ).

3.8 – Imobilização das amostras para obtenção das curvas de força no AFM

Sobre a lâmina de vidro utilizada no experimento é depositada uma fina fita dupla face transparente. As amostras de ovos e de cabelos foram colocadas sempre sobre essas fitas dupla face para garantir a imobilização. No caso dos ovos de *Aedes aegypti* com menos de 18 horas, é imprescindível que a água seja colocada sobre a amostra assim que o ovo for depositado sobre a cola, do contrário, esse ovo irá murchar e poderá morrer, já que ainda está num intervalo de tempo onde a permeabilidade é crítica (Martins Jr, 2002). No caso de ovos mais velhos, não há necessidade de colocar a água imediatamente, sobrando mais tempo para que se posicionem mais ovos sobre a fita.

Nos experimentos com fios de cabelo da paciente com pili annulati e da pessoa controle, não há nenhuma preparação especial da amostra. Os fios são depositados diretamente sobre a fita dupla face, e as curvas de força são obtidas em ar.

3.9 – Análise do escurecimento dos ovos de *Aedes aegypti*

Ovos postos sincronizadamente foram observados ao longo do tempo através de uma lupa dotada de sistema digital de captura de imagens. A densitometria dos ovos foi realizada com o programa IMAGE J.

Nosso colaborador Gustavo L. Rezende foi o responsável pela execução desses experimentos de escurecimento no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ.

3.10 – Análise do inchamento dos ovos de *Aedes aegypti*

Ovos postos sincronizadamente foram observados ao longo do tempo através de uma lupa dotada de sistema digital de captura de imagens. Os ovos foram depositados ao lado de uma grade de microscopia eletrônica, que serviu como escala interna de nossos experimentos.

A partir do contorno das imagens dos ovos era ajustada a elipse mais próxima de cada ovo. O valor dos dois diâmetros obtidos foi utilizado para o cálculo do volume do sólido que mais se aproxima aos ovos, um elipsóide. O volume do elipsóide pode ser obtido a partir de seus três diâmetros:

$$\text{Volume} = \frac{4}{3} \times \pi \times a \times b \times c, \text{ onde } a, b \text{ e } c \text{ são as três dimensões que definem o}$$

elipsóide.

Como os ovos apresentam um diâmetro grande e dois pequenos, para efeito desses cálculos, utilizamos as dimensões b e c como idênticas.

Esse experimento também foi feito por nosso colaborador Gustavo L. Rezende, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ.

3.11 – Análise da mudança de permeabilidade dos ovos de *Aedes aegypti*

Ovos postos sincronizadamente foram colocados em contato com ar durante 15 minutos em diferentes idades embrionárias. O percentual de ovos murchos, que desidrataram, após esse tratamento foi anotado. Em seguida, a resistência à digestão por cloro também foi avaliada nesses ovos.

Novamente, esses experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, por nossos colaboradores Gustavo L. Rezende e Ademir de Jesus Martins Jr.

3.12 – Tratamento de ovos de *Aedes aegypti* com Benserazida

A Benserazida é extremamente foto-sensível, além de letal para os embriões. Por esse motivo, a solução de Benserazida 1 mM é preparada imediatamente antes da postura dos ovos, sempre na presença de um anti-oxidante, no caso ácido ascórbico 1mM. Os ovos entram em contato com a solução de Benserazida já durante a postura, e ficam em contato com a mesma até o início do processo de remoção do exocócion, que ocorre 30 minutos após o fim da postura.

Os embriões tratados com Benserazida não se desenvolvem completamente, morrendo antes do fim das primeiras 18h.

3.13 – Medidas nos fios de cabelo

Nos experimentos com fios de cabelo da paciente com pili annulati e da pessoa controle, não há nenhuma preparação especial da amostra. Os fios são removidos diretamente da cabeça da pessoa, controle e doente, e depositados diretamente sobre a fita dupla face, para a obtenção das curvas realizadas em ar.

Os fios de cabelo controle foram gentilmente cedidos pelo Gustavo Miranda Rocha, aluno de Doutorado do nosso laboratório. Os fios de cabelo da paciente com pili annulati foram cedidos pela própria paciente e co-autora desse trabalho, Ana Paula Streck, da Pós-graduação em Dermatologia Clínica da UERJ.

IV - RESULTADOS

4.1 – Condições para aquisição de imagens e curvas de força

A visualização dos ovos de *A. aegypti* e a aquisição de curvas de força somente foram possíveis após a remoção do exocócion e escolha do meio líquido para a realização dos experimentos. Isso permitiu a visualização direta do endocócion (Figura 22), e todo o estudo de espectroscopia de força. A confirmação da remoção do exocócion também foi verificada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 21).

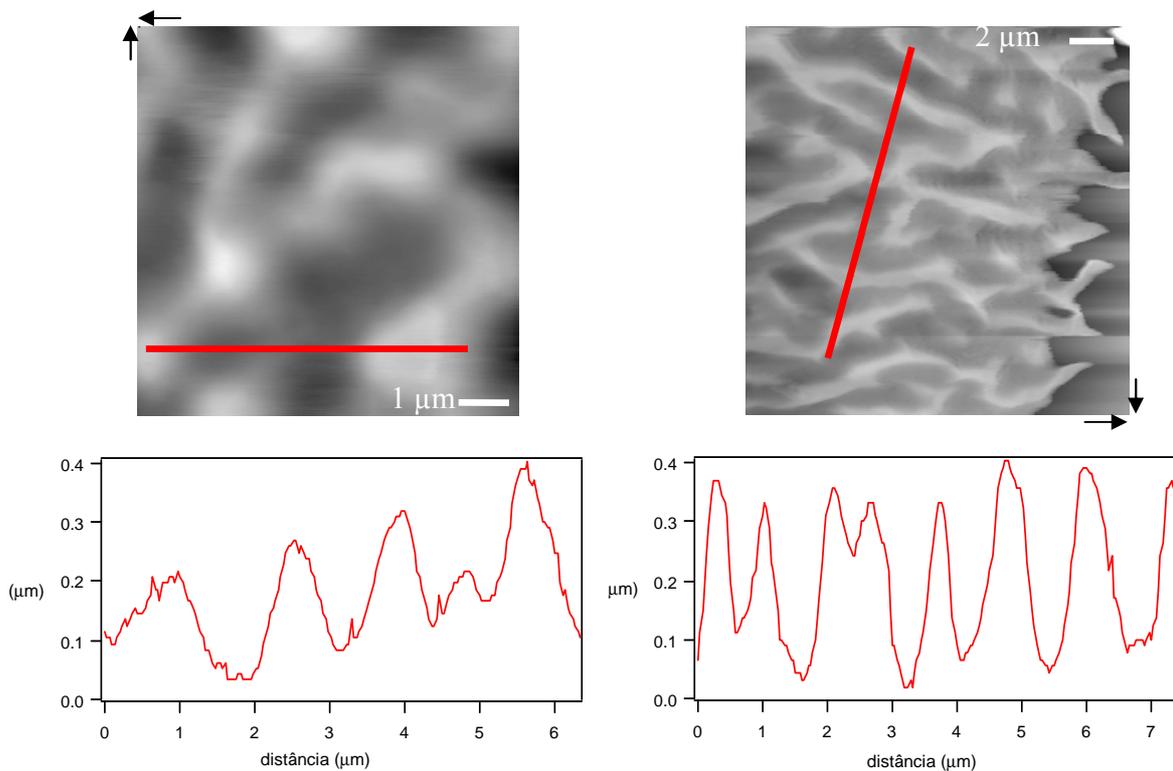


Figura 22: Imagens de varredura feitas em ovos de *Aedes aegypti* sem exocócion e imersos em água milliQ através do AFM operando em modo contato. As setas indicam o sentido da varredura. As barras de escala das imagens de AFM são de $2\mu\text{m}$ (esquerda) e $2\mu\text{m}$ (direita). Os gráficos inferiores mostram o detalhe da topografia das linhas em vermelho, revelando a superfície ondulada dos ovos sem exocócion.

Ao estudar ovos sem o exocócion, pudemos constatar que o endocócion apresenta uma superfície bastante ondulada, com diferenças de altura de cerca de 0,5 micrômetros (Figura 22).

Para aquisição das curvas de força em diferentes pontos de um mesmo ovo, ou em diferentes ovos, é preciso mover a base que suporta a amostra. O mesmo ocorre quando é

preciso alternar entre diferentes ovos. Nossas observações mostraram que a mudança de posição da base não afeta o coeficiente angular das curvas experimentais, permitindo que os parâmetros de elasticidade medidos possam ser comparados.

4.2 – Escolha dos cantiléveres

Um cantiléver de 0,12 N/m foi apropriado para a obtenção das imagens. Entretanto, não foi capaz de detectar diferenças de elasticidade entre os ovos de diferentes idades embrionárias, e nem entre ovos e uma superfície muito rígida, nesse caso o vidro. Através de simulações computacionais, foi possível concluir que esses cantiléveres eram capazes de medir com precisão Módulos de Young numa faixa entre 10^3 e 10^7 Pa (Tabela 1). Posteriormente confirmamos que os Módulos de Young para ovos de *Aedes aegypti* não poderiam ser medidos apenas com esse intervalo. Prosseguindo com as simulações, verificamos que um cantiléver 500 vezes mais rígido, de 60 N/m, seria eficaz para medir com precisão Módulos de Young no intervalo entre 10^6 a 10^{10} Pa. Como ainda não se sabia a faixa na qual os valores de Módulos de Young para ovos de *A. aegypti* se encontravam, os ovos foram investigados com estes cantiléveres. Verificamos então que esses cantiléveres mais rígidos mostravam-se eficientes em detectar diferenças entre ovos com mais de 3 meses e vidro, e posteriormente verificamos que as diferenças de rigidez de um ovo ao longo do seu desenvolvimento estavam contidas neste mesmo intervalo.

0,06 N/m	-----	[7×10^2 ; 2×10^8] Pa
0,50 N/m	-----	[3×10^3 ; 1×10^9] Pa
6,00 N/m	-----	[5×10^4 ; 8×10^9] Pa
60,00 N/m	-----	[5×10^5 ; 9×10^{10}] Pa
100,00 N/m	-----	[7×10^5 ; 2×10^{11}] Pa

Tabela 1 – Resultado de simulação computacional que indica os valores de constantes de mola nominais (valores à esquerda) adequadas para estudar diferentes faixas de *Módulo de Young* (valores à direita).

4.3 – Premissas à comparação das curvas de força

Todos os experimentos descritos até a secção 4.5 foram realizados com ovos de pelo menos um mês de idade, ou seja, algumas semanas após a postura.

Pudemos observar que medidas realizadas em diferentes posições do ovo (Figura 23) apresentam diferenças significativas nos valores de elasticidade. Medidas realizadas em regiões mais ao centro (em vermelho) ou mais laterais (em azul) apresentam diferenças perceptíveis visualmente tanto na curvatura inicial, quanto na inclinação final (Figura 24).

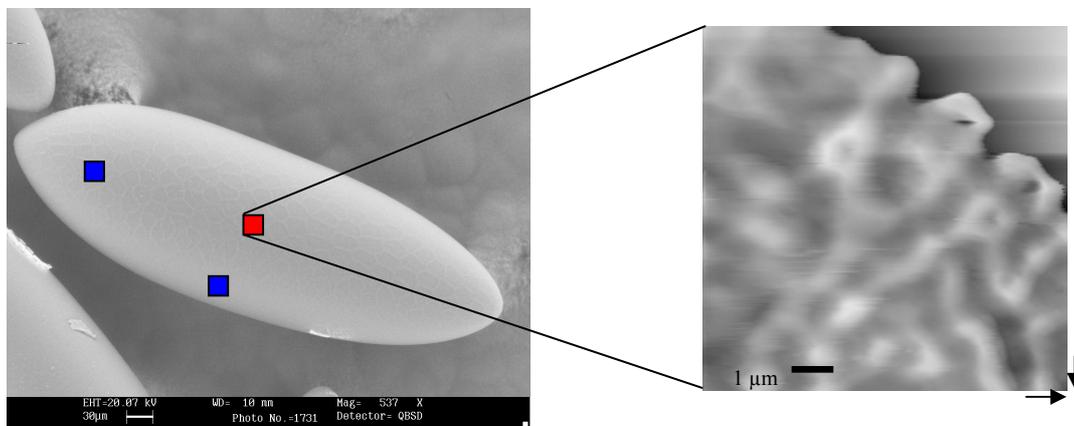


Figura 23: Microscopia Eletrônica de Varredura (esquerda) cedidas por Bruno S. Vale (Laboratório de Patologia, IOC – FIOCRUZ) e Gustavo L. Rezende (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC - FIOCRUZ) de um ovo de *Aedes aegypti* sem exocório. Na imagem está representado o que foi definido como região central (em vermelho) e lateral (em azul) dos ovos. A imagem da direita, obtida por AFM, mostra uma pequena região de varredura, na qual os experimentos passaram a ser realizados, a barra tem 1 µm. A barra da MEV tem 30 µm. Não foi possível detectar nenhuma estrutura no canto superior direito da imagem de AFM por causa da área de trabalho do piezo Z. Devido a grande curvatura da amostra, não é possível detectar todas as regiões em uma mesma varredura.

Os valores ajustados para obter o *Módulo de Young* e a *Constante Elástica* retornam valores bastante diferentes para essas curvas realizadas em pontos distantes em um mesmo ovo (Figura 24). Portanto, a partir desses dados, apenas as medidas da região central dos ovos foram analisadas.

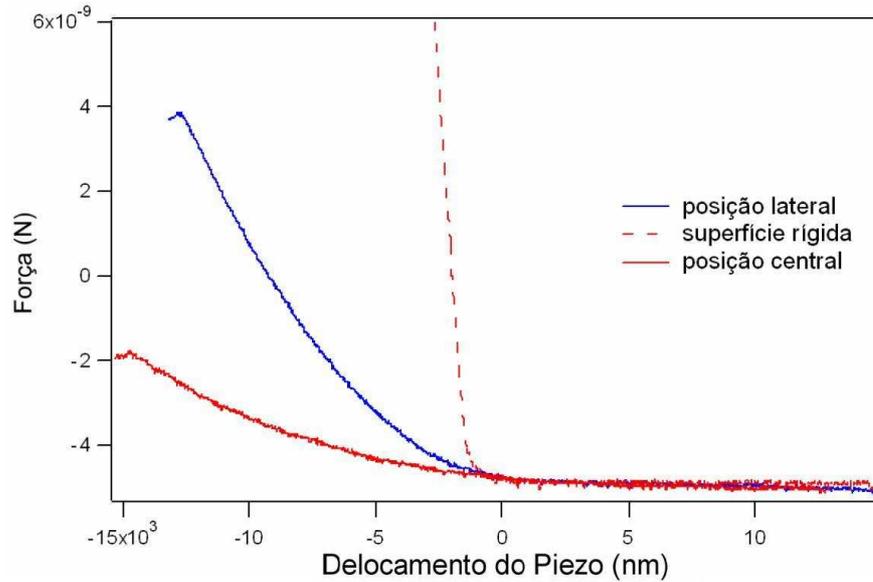


Figura 24: Diferenças entre medidas realizadas no centro dos ovos (curva cheia em vermelho) e em regiões mais laterais (curva em azul). As curvas em azul representam as áreas marcadas em azul na Figura 23, e a curva cheia em vermelho a área em vermelho na Figura 23. A curva tracejada é a superfície rígida de referência, o vidro.

Das medidas realizadas ao longo da região central dos ovos, verificamos que as variações dentro de uma área de varredura (o quadrado de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ampliado na Figura 23, por exemplo) não eram significativas (Figura 25).

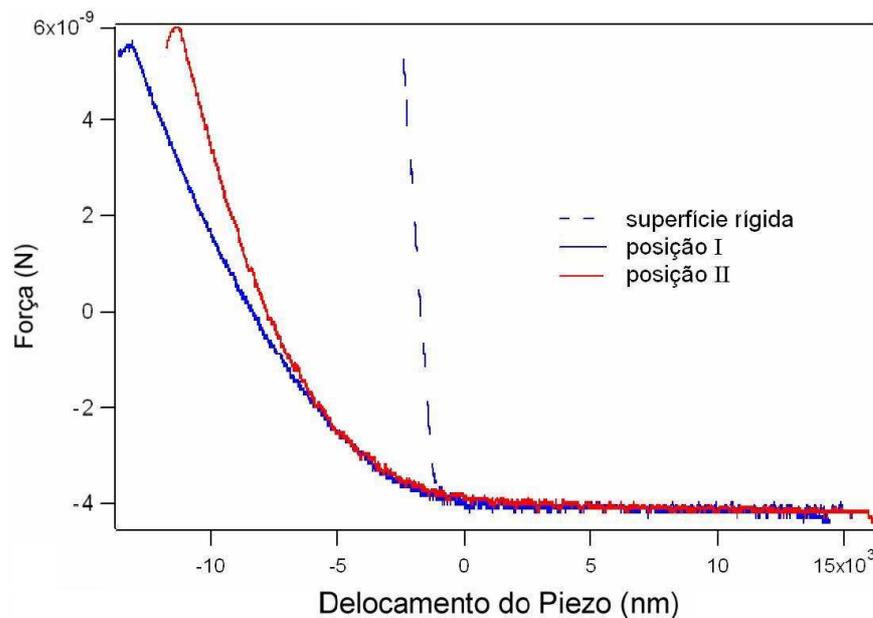


Figura 25: Diferenças entre as medidas realizadas mais ao centro (posição I) ou mais no canto (posição II) de uma mesma região de varredura no centro dos ovos (quadrado vermelho da Figura 23) são desprezíveis, não interferindo nos resultados. A curva tracejada novamente representa a superfície rígida.

Em seguida, investigamos se seria possível comparar os valores de elasticidade obtidos em ovos de diferentes tamanhos, já que o tamanho desses ovos pode variar em até 3 vezes. Para possibilitar a comparação de dois ovos diferentes o cantiléver foi sempre posicionado na região central dos ovos. Assim, pudemos verificar que ovos de diferentes tamanhos não mostram diferenças críticas, como ilustrado por duas curvas experimentais realizadas em 2 ovos diferentes na Figura 26, e pelas inúmeras comparações feitas após a análise dos parâmetros em ovos com tamanhos variados (Figura 27 e Figura 28).

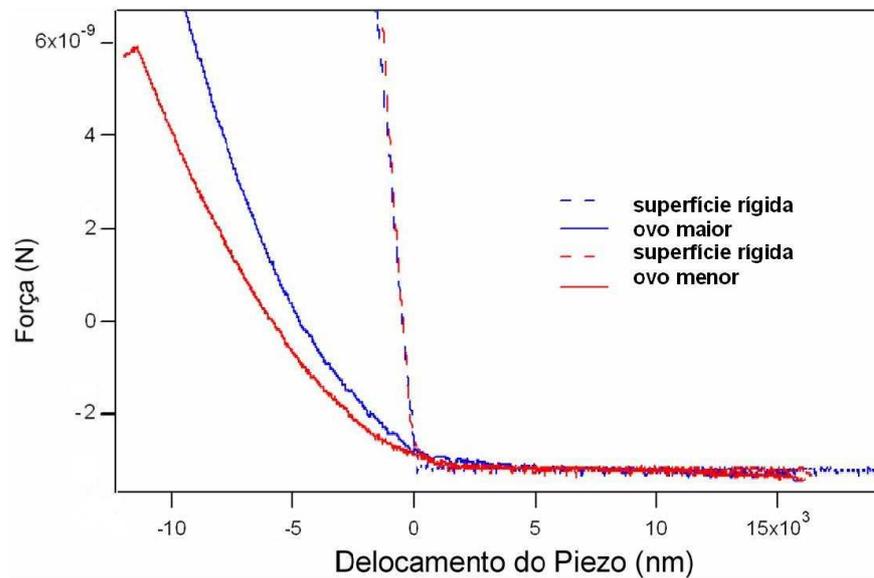


Figura 26: Diferenças entre as medidas realizadas em um ovo grande (linha cheia em azul) e um ovo menor (linha cheia em vermelho) não são críticas para a análise da elasticidade. As medidas no vidro feitas antes (linha tracejada em vermelho) e depois (linha tracejada em azul) das medidas realizadas nos dois ovos mostram que o laser se manteve bem estável.

4.4 – Valores da *Constante Elástica (K)* e do *Módulo de Young* para ovos de *Aedes aegypti* com no mínimo 3 horas de idade

Medindo a elasticidade de os ovos três horas após a postura, já escuros, verifica-se que não há diferenças nos valores obtidos para o *Módulo de Young* e para *Constante Elástica* desses ovos e de ovos com 3 meses (Figura 27 e Figura 28). Nestes experimentos, feitos em dias distintos, diferentes ovos foram analisados. A distribuição dos valores obtidos esta representada nas Figura 27 e Figura 28, sendo que no quadro a direita destas figuras, é mostrado o gráfico com o intervalo de confiança que admite um erro de até 5% ($IC_{95\%}$). O valor da mediana ($5,4 \times 10^8$ Pa e $48,5$ N/m), indica o valor central em torno do qual os outros valores medidos oscilam, diminuindo a contribuição de valores muito altos ou muito baixos.

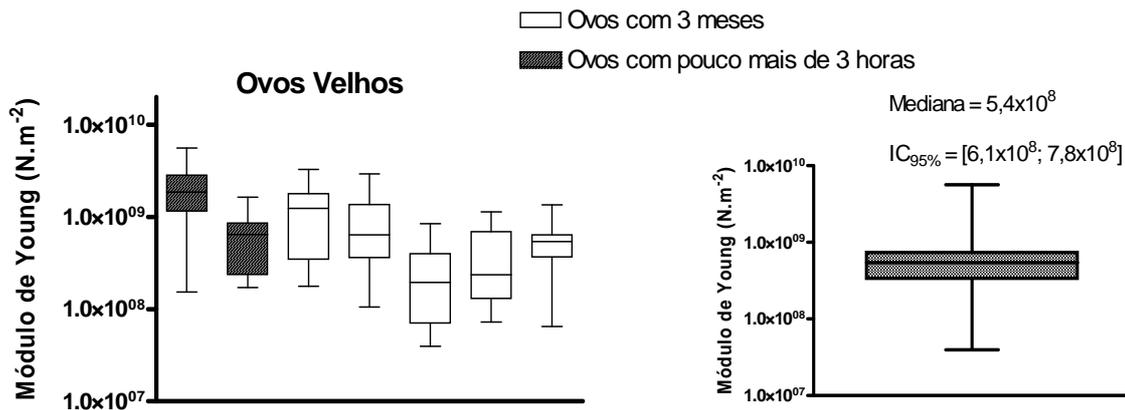


Figura 27: *Box plot* com os valores do *Módulo de Young* para ovos velhos. No gráfico à esquerda observamos que a distribuição dos valores medidos para ovos diferentes não varia muito. À direita está representada a distribuição de todos os valores medidos e o intervalo de confiança ($IC_{95\%}$) [$6,1 \times 10^8$; $7,8 \times 10^8$] N/m² para esses ovos.

Independentemente do modelo ajustado, Hertz (Figura 27) ou molas em série (Figura 28), os valores obtidos como resultado da análise das curvas feitas em diferentes ovos apresenta um desvio padrão bem pequeno.

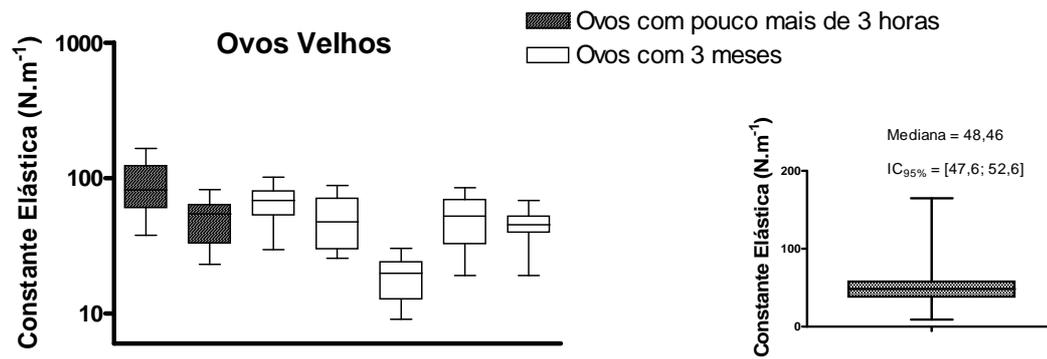


Figura 28: *Box plot* com os valores de *Constante Elástica* para ovos velhos. No gráfico à esquerda observamos que a distribuição dos valores medidos para ovos diferentes, analogamente ao observado para o *Módulo de Young*, não varia muito. À direita está representada a distribuição de todos os valores medidos e o respectivo intervalo de confiança (IC_{95%}) [47,6; 52,6] N/m para esses ovos.

4.5 – Enrijecimento dos ovos de *Aedes aegypti*

O próximo experimento (Figura 29) visava comprovar se os ovos eram mais macios no momento da postura. Em todos os experimentos as posturas levavam em média 15 minutos e os ovos só resistem ao tratamento com cloro para a remoção do exocórcion se forem tratados 30 minutos após o fim da postura. Portanto, levando em conta ainda o tempo de preparação para o AFM, as primeiras curvas de força foram obtidas sempre com ovos que foram postos entre 40 e 55 minutos antes da primeira medida.

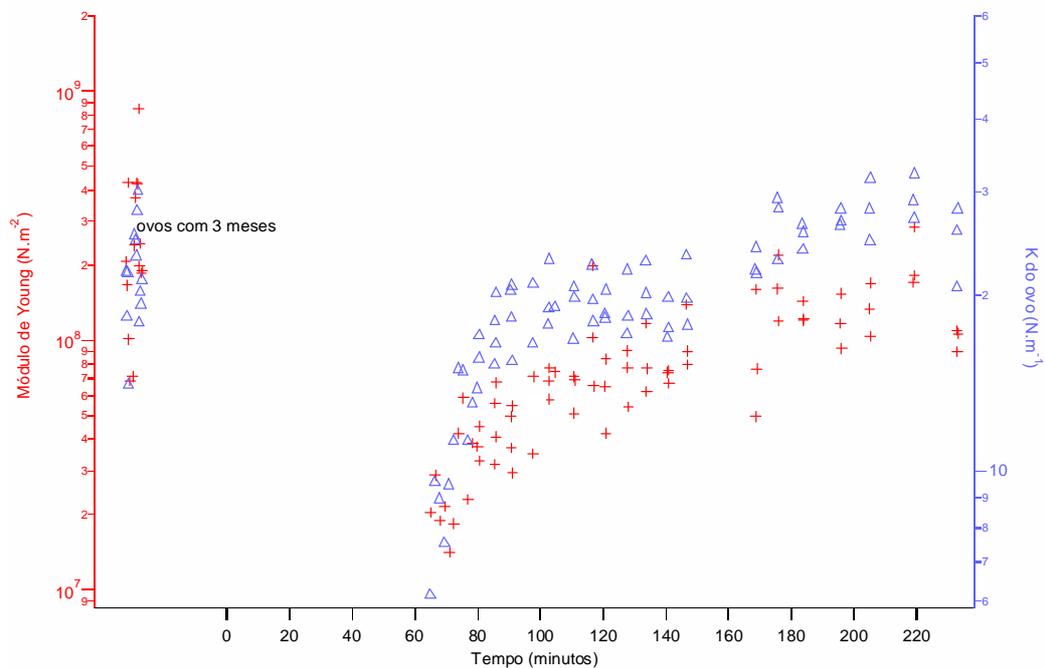


Figura 29: O endurecimento de um ovo de *Aedes aegypti* sem exocórcion recém posto pode ser observado na curva da direita, na qual a partir da postura (tempo = 0) os valores aumentam até ficarem próximos aos valores dos pontos à esquerda, que foram obtidos em ovos com 3 meses. Entretanto, essa mudança parece ser maior no início, entre 60 e 120 minutos, tempo no qual os ovos ainda estão escurecendo. Os pontos em azul correspondem ao eixo da direita, que contém os valores de *Constante Elástica* obtidos. Os pontos em vermelho correspondem ao eixo da esquerda, que contém os valores de *Módulo de Young*.

A Figura 29 ilustra o resultado da análise de um experimento no qual foram obtidas curvas de força numa mesma região no centro de ovos com 3 meses (pontos à esquerda) algumas horas antes dessas mesmas medidas serem realizadas em um ovo recém posto (pontos a partir do minuto 60). Os pontos à direita são desse segundo ovo, e mostram que os

valores medidos também numa mesma região no centro do ovo no início deste experimento tinham valores tanto de *Constante Elástica* quanto de *Módulo de Young* bem menores que os observados no ovo com 3 meses. Com o passar dos minutos, observou-se que ambos os valores dos ovos recém postos foram sofrendo acréscimos, até que, aproximadamente 3 horas após a postura (tempo no qual todos os ovos postos já haviam ficado escuros), foram atingidos valores tanto de *Constante Elástica* quanto de *Módulo de Young* bastante parecidos com os que tinham sido medidos no primeiro ovo de três meses. É importante ressaltar que ambas as curvas (azul e vermelha) apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo.

A maior mudança nos valores de elasticidade observados ocorreu entre 60 e 120 minutos, tanto para *Constante Elástica* quanto para *Módulo de Young*. O objetivo a partir desse resultado foi aumentar a quantidade de curvas de força medidas, principalmente nesse intervalo, em outros ovos para uma análise mais precisa.

A mudança dos valores de elasticidade de um ovo recém posto de *Aedes aegypti* é melhor apresentada na Figura 30. Neste experimento, um pequeno pedaço de vidro foi colocado ao lado dos ovos. Primeiramente, foram realizadas medidas em ovos velhos (ovos velhos são definidos aqui como ovos que já atingiram o valor máximo de elasticidade, ou seja, foram postos há pelo menos 3 horas) enquanto as fêmeas faziam a postura em outro local. Depois, um ovo recém posto foi colocado ao lado do vidro e desse ovo velho já analisado, no mesmo porta amostra, e a mudança em sua elasticidade foi acompanhada. Isso possibilitou que fossem realizadas medidas se alternado entre esses dois tipos de ovos e o vidro. É importante notar que os valores encontrados tanto para o *Módulo de Young* quanto para *Constante Elástica* do vidro não são valores precisos. Isso porque esse cantiléver de 60 N/m não tem precisão para identificar Módulos de Young acima de 10^{10} Pa. Assim, era de se esperar que os valores encontrados para o vidro apresentassem uma discrepância muito grande entre si. Após a colocação do ovo recém-posto no porta-amostra, foram coletadas

curvas sobre o mesmo durante os primeiros 30 minutos. Em seguida a base foi movida para que o cantiléver ficasse sobre o vidro, e algumas curvas de força foram obtidas, antes de voltarmos a fazer medidas sobre o ovo recém-posto. Após cerca de 60 minutos de medidas, a base foi movida para que o cantiléver ficasse sobre outro ovo. Esse outro ovo serviu para fornecer algumas curvas características de ovos velhos (pontos envoltos pela elipse na Figura 30), possibilitando uma comparação direta entre as curvas medidas no ovo recém-posto em estudo. Após a análise, foi possível confirmar que os valores obtidos para esse ovo velho eram muito semelhantes aos valores obtidos em outros ovos velhos no momento da postura. Após a coleta de curvas no ovo velho, o cantiléver foi reposicionado acima do ovo recém-posto e, mais algumas curvas foram coletadas. Observa-se mais uma vez que ao longo de todo o experimento os valores de *Constante Elástica* e do *Módulo de Young* variaram de forma semelhante. Novamente os valores obtidos para ovos recém-postos têm módulo muito menor do que os obtidos para ovos mais velhos. Esses valores aumentam até chegar aos mesmos patamares.

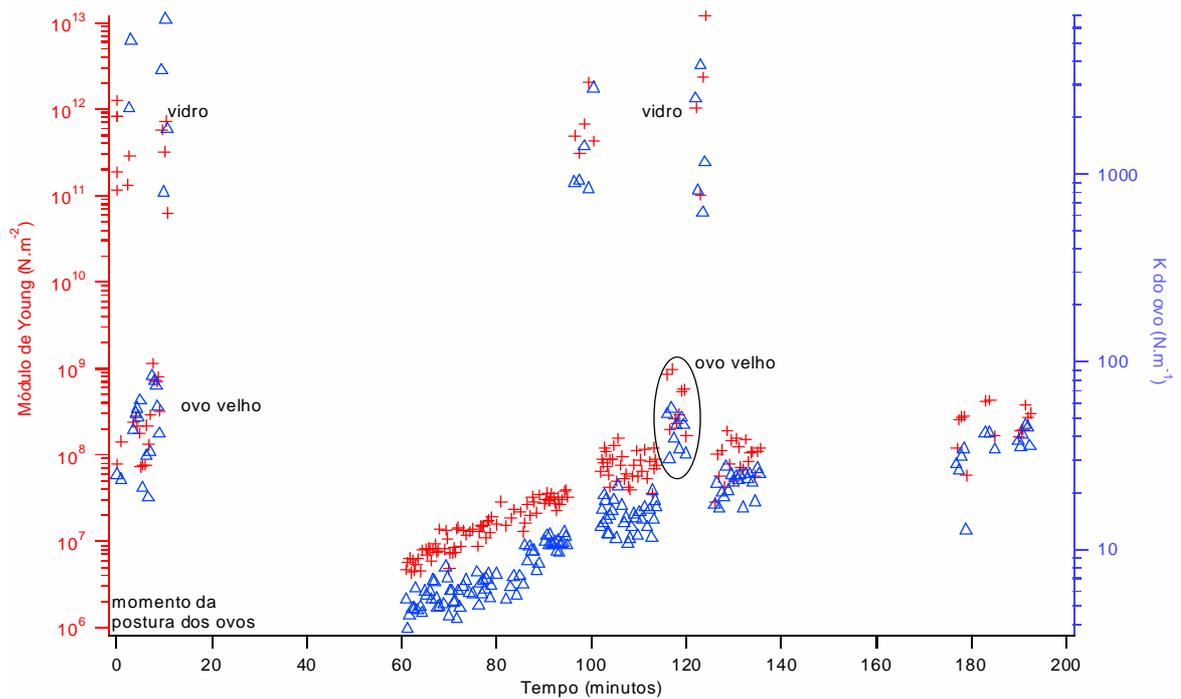


Figura 30: Gráfico típico do enrijecimento, a partir da postura, de ovos de *Aedes aegypti* recém postos sem exocóron. O grupo de pontos mais acima foi calculado a partir de curvas obtidas em vidro, e os mais abaixo a partir de curvas obtidas em ovos de *A. aegypti*. Os pontos em azul correspondem ao eixo da direita, que contém os valores de *Constante Elástica (K)* obtidos. Os pontos em vermelho correspondem ao eixo da esquerda, que contém os valores de *Módulo de Young*. Os pontos obtidos entre 60 e 115 minutos mostram que há um aumento progressivo tanto nos valores do *Módulo de Young*, quanto nos valores de *K*, que continuaram a crescer até a terceira hora. Os pontos delineados pela elipse correspondem a curvas feitas em um ovo diferente, com mais de 3 meses que foi depositado ao lado do ovo recém posto nesse experimento

4.6 – Resposta de ovos velhos à manipulação

O endurecimento observado poderia ser fruto da manipulação experimental. Poderia ser, por exemplo, uma resposta do ovo ao estresse mecânico causado pelo cantiléver. Para excluir essa hipótese, foi verificada a influência da realização aproximadamente duzentas medidas, realizadas ao longo de 3 horas em um ovo com 3 meses (Figura 31).

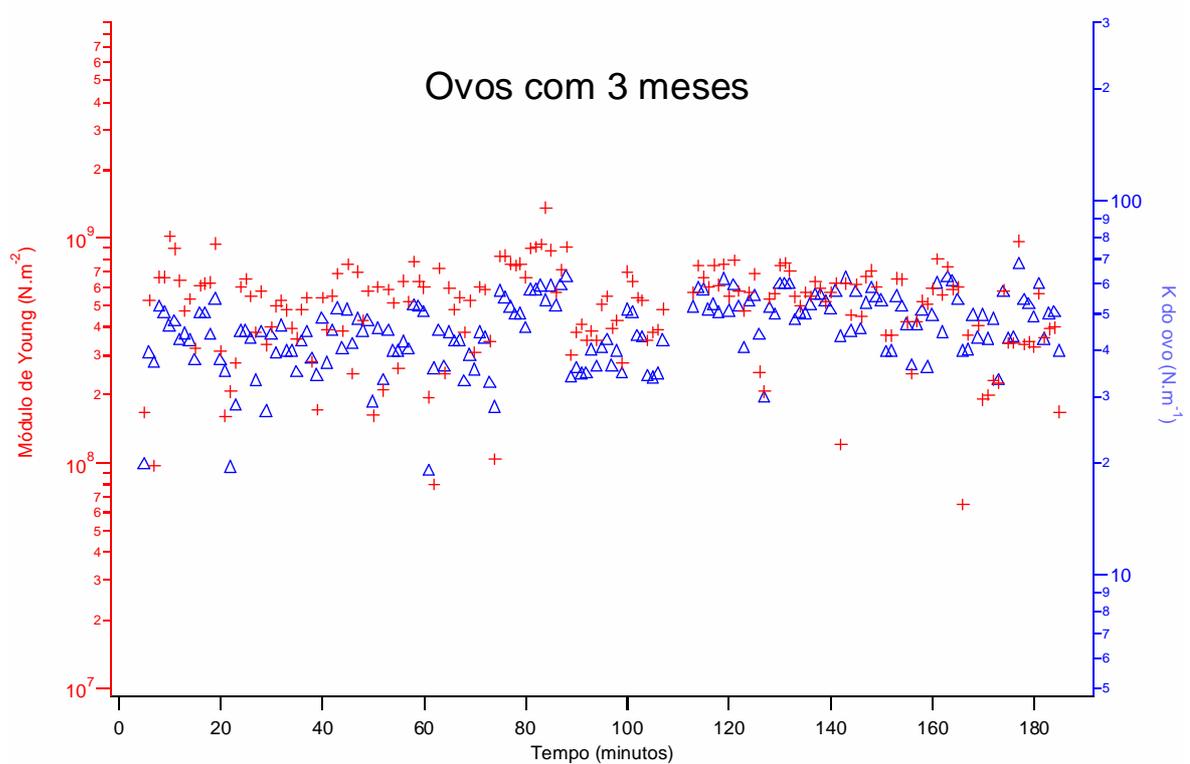


Figura 31: Variação dos valores da *Constante Elástica (K)* e do *Módulo de Young* em ovos de *Aedes aegypti* sem exocócion com mais de 3 meses. Para verificar se não era a simples manipulação dos ovos com o AFM a responsável pelo enrijecimento que vinha sendo observado, foram feitas várias medias ao longo de 3 horas em ovos com 3 meses. O tempo zero nesse experimento não representa o momento da postura, apenas representa o início das medidas, uma vez que esses ovos foram postos mais de 3 meses antes. Nenhuma variação com o tempo e/ou quantidade de manipulação pôde ser observada. Os pontos em azul correspondem ao eixo da direita, que contém os valores de *Constante Elástica (K)* obtidos. Os pontos em vermelho correspondem ao eixo da esquerda, que contém os valores de *Módulo de Young*.

4.7 – Diferenças entre ovos recém postos e ovos velhos

Apesar de os valores de elasticidade obtidos para ovos recém-postos e ovos velhos serem visualmente distintos, foi feita a análise de variância entre esses valores (Figura 32). Um valor de p tão pequeno significa que a probabilidade de que a diferença observada entre as duas amostras tenha ocorrido ao acaso é muito pequena, menos de um em 10 mil ($p < 0,0001$). Esse resultado é significativo, e indica que realmente há diferença entre as elasticidades desses ovos.

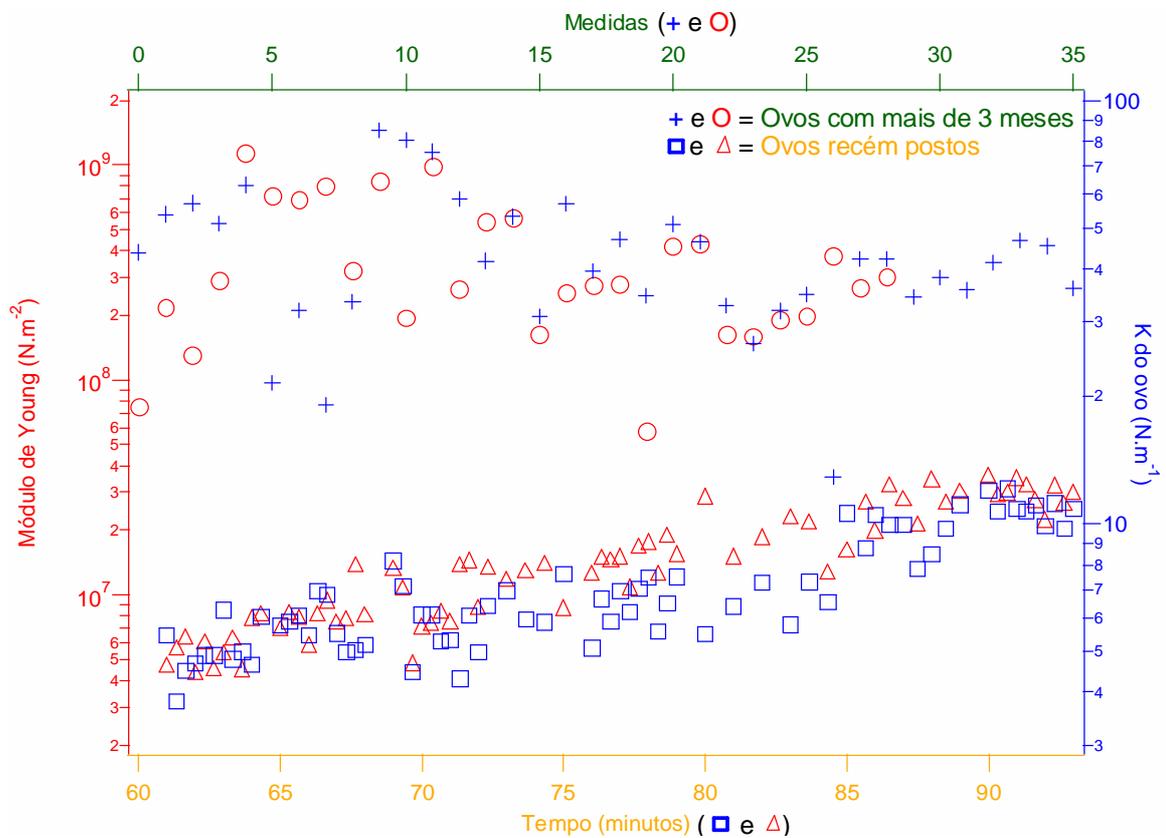


Figura 32: Análise das diferenças nos valores do *Módulo de Young* e de *Constante Elástica* (K) em ovos de *A. aegypti* recém postos e com mais de 3 meses. Quando ovos recém postos (□ e Δ) são comparados com ovos velhos (O e +), as diferenças são facilmente visualizadas, tanto para os valores medidos para *Módulo de Young*, quanto para os valores de K . Em ambos os casos o p obtido é $<0,0001$. Os pontos em vermelho correspondem ao eixo da esquerda, que contém os valores de *Módulo de Young*. Os pontos em azul correspondem ao eixo da direita, que contém os valores de *Constante Elástica* (K) obtidos. O Eixo inferior, em amarelo, corresponde ao tempo durante o desenvolvimento dos ovos recém postos (□ e Δ). O eixo superior, em verde, é apenas uma escala arbitrária que corresponde a cada medida realizada em ovos velhos (O e +), já que o tempo zero não é o momento da postura, e esses valores não variam ao longo do tempo.

4.8 – Escurecimento de ovos de *Aedes aegypti*

O escurecimento dos ovos de *Aedes aegypti* foi avaliado a partir de experimentos realizados com ovos que tiveram posturas feitas sincronizadamente (Figura 33). Além do escurecimento de ovos normais, também foi acompanhado o escurecimento de ovos não fertilizados e de ovos tratados com Benserazida (Figura 33 e Figura 34).

Nosso colaborador Gustavo L. Rezende, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, foi o responsável pela execução e análise dos experimentos de escurecimento apresentados nas Figura 33 e Figura 34, apesar de termos idealizado juntos esses experimentos.

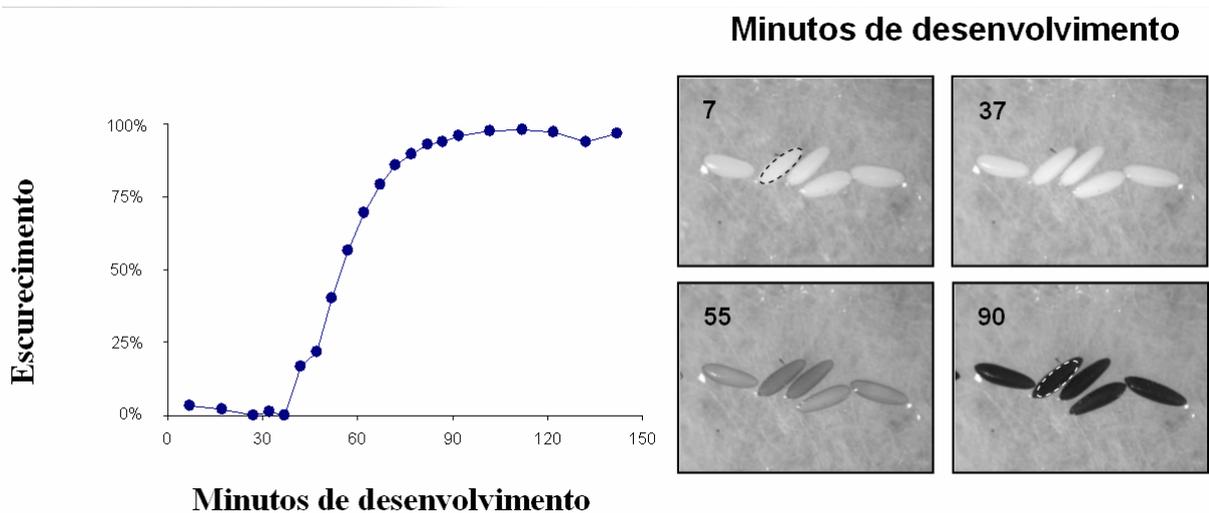


Figura 33: Escurecimento de ovos de *A. aegypti* normais e ovos não fertilizados acompanhado a partir da postura. O gráfico à esquerda mostra que o escurecimento, que se dá de forma bastante semelhante para esses dois tipos de ovos, ocorre em aproximadamente 90 minutos. À direita, podemos ver quatro fotografias desses ovos em diferentes tempos após a postura: 7, 37, 55 e 90 minutos, conforme indicado em cada uma. Ovos com 37 minutos, apesar de estarem já mais inchados, ainda estão completamente brancos, à medida que ovos com 90 minutos, apesar de continuarem inchando, já estão completamente escuros. As elipses representadas nas imagens de 7 e 90 minutos ilustram as áreas que foram analisadas para a realização da densitometria pelo programa IMAGE J. Esse experimento foi realizado por nosso colaborador Gustavo L. Rezende, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ.

O escurecimento dos ovos se dá de forma bastante similar entre ovos normais e ovos não tratados (Figura 33 e Figura 34). Apesar de os ovos incharem continuamente durante os

primeiros minutos, o escurecimento só começa aproximadamente 37 minutos após o final da postura. Aproximadamente 90 minutos após o fim da postura esse processo já está completado (Figura 33). Entretanto, ovos tratados com Benserazida não escurecem normalmente (Figura 33 e Figura 34).

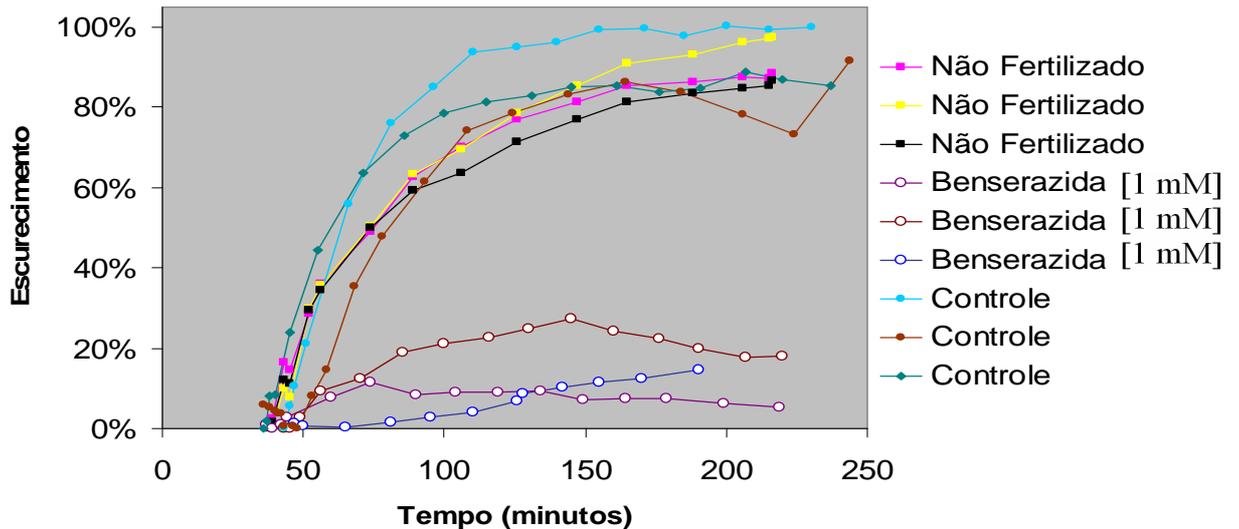


Figura 34: Escurecimento de ovos de *A. aegypti* Normais (Controle), Não Fertilizados e Tratados com Benserazida 1 mM, após a remoção do exocório. O comportamento do escurecimento dos ovos Controle e dos Não Fertilizados é bastante semelhante, sendo finalizado aproximadamente 90 minutos após o fim da postura. Os ovos tratados com Benserazida não escurecem da mesma forma que os ovos não tratados. Esse experimento foi realizado por nosso colaborador Gustavo L. Rezende, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ.

4.9 – Mudança de permeabilidade de ovos de *Aedes aegypti*

A mudança na permeabilidade dos ovos foi avaliada indiretamente, a partir da observação do “murchamento” desses ovos (Figura 35). Ovos de *Aedes aegypti* sem exocócion foram retirados do ambiente úmido, no qual havia sido realizada a postura, e colocados em contato com ar, durante 15 minutos, em diferentes tempos ao longo da embriogênese. A mudança na permeabilidade ocorre de forma abrupta, entre a 11^a e a 13^a hora após a postura (Figura 35 – A). Antes da 11^a hora, todos os ovos colocados em contato com ar murcharam, implicando na morte do embrião (Figura 35 – B). Após a 13^a hora, nenhum dos os ovos colocados em contato com ar murchou (Figura 35 – C). Os ovos submetidos a esses experimentos foram submetidos à digestão por cloro (Figura 35 – D e E). Apenas os ovos com mais de 13 horas, que não murcharam no experimento anterior, resistem à digestão por cloro (Figura 35 – D e E).

Nossos colaboradores Gustavo L. Rezende e Ademir de Jesus Martins Jr., ambos do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, idealizaram juntos esses experimentos de mudança de permeabilidade que foram feitos e analisados pelo próprio Gustavo.

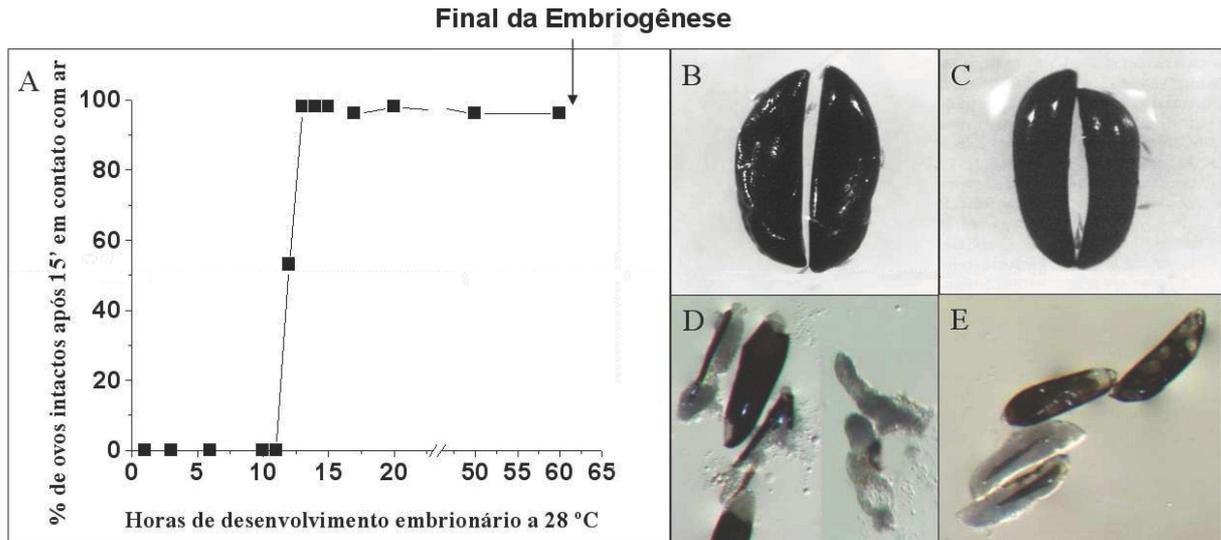


Figura 35: Ovos de *Aedes aegypti* expostos a ambientes secos durante 15 minutos em diferentes etapas da embriogênese. A) Percentual de ovos intactos após contato com ambiente seco, a seta indica o final da embriogênese (61,5 horas após a postura (Luana Cristina Farnesi Ferreira do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, comunicação pessoal). B) Ovos de até 11 horas após 15 minutos em ambiente seco. C) Ovos com mais de 13 horas após 15 minutos em ambiente seco. A abrupta aquisição de impermeabilidade entre 11 e 13 horas coincide com o surgimento da cutícula serosa, como mostrado pela digestão por cloro (D e E). Apenas ovos com mais de 13 horas resistem à digestão por cloro (E).

4.10 – Enrijecimento de ovos tratados com inibidor de escurecimento

Nessa etapa do trabalho, verificamos que os ovos tratados com Benserazida além de não escurecerem normalmente (Figura 34), também não enrijecem (Figura 36). Os valores obtidos para o *Módulo de Young* não variam ao longo do tempo. Já nos valores obtidos para a *Constante Elástica*, pode-se observar um pequeno incremento ao longo do tempo. Entretanto, essa variação é significativamente menor do que a observada em ovos não tratados (Figura 37).

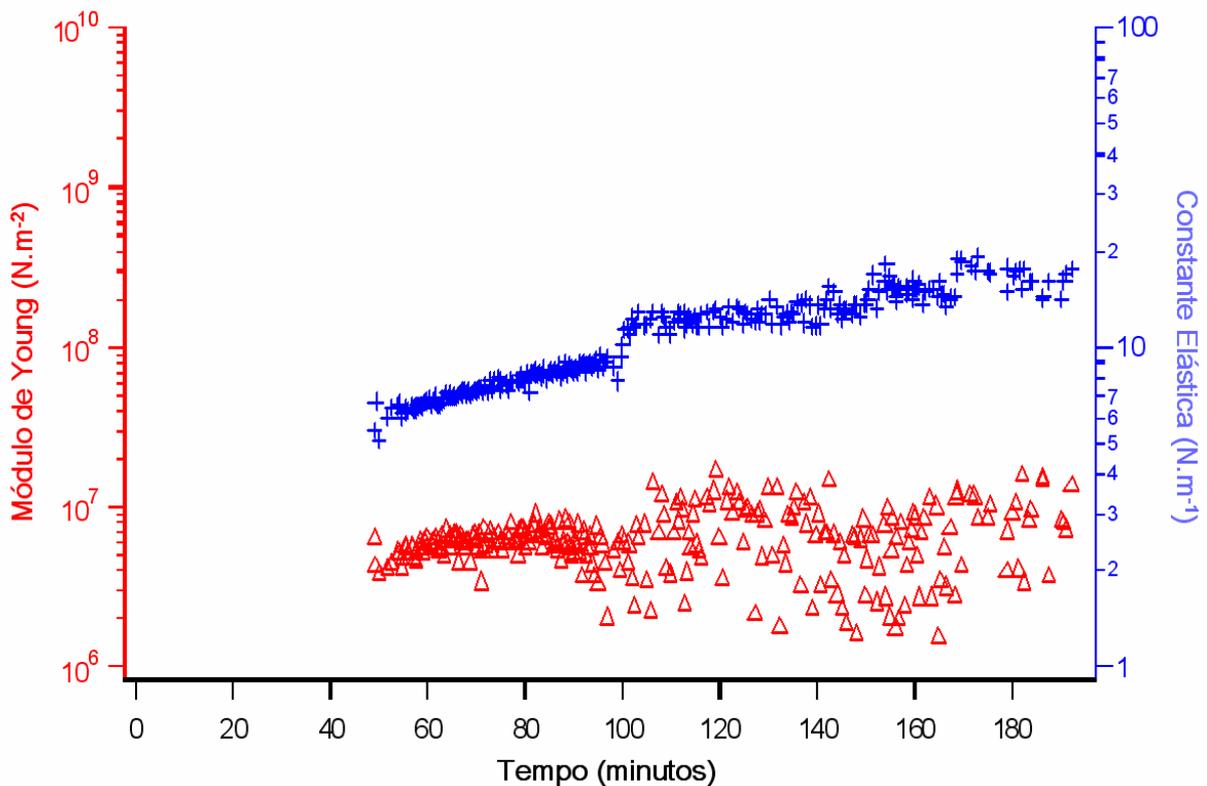


Figura 36: Experimento representativo do enrijecimento de ovos de *Aedes aegypti* recém-postos tratados com Benserazida. Nenhum acréscimo é observado nas medidas de *Módulo de Young* ao longo do tempo. O incremento observado na *Constante Elástica* é significativamente menor do que o observado em ovos não tratados ($p < 0,0001$).

O enrijecimento se dá sobretudo entre os minutos 60 e 120 após a postura para ovos normais (Figura 30). Por isso, esse intervalo foi utilizado para comparação entre os valores medidos para *Módulo de Young* e *Constante Elástica* em ovos tratados e não tratados com

Benserazida (Figura 37). O mesmo resultado foi obtido quando foi utilizado um intervalo maior. Comparando-se as três primeiras horas após a postura, também se obtém um valor de $p < 0,0001$ para o teste t (Figura 37).

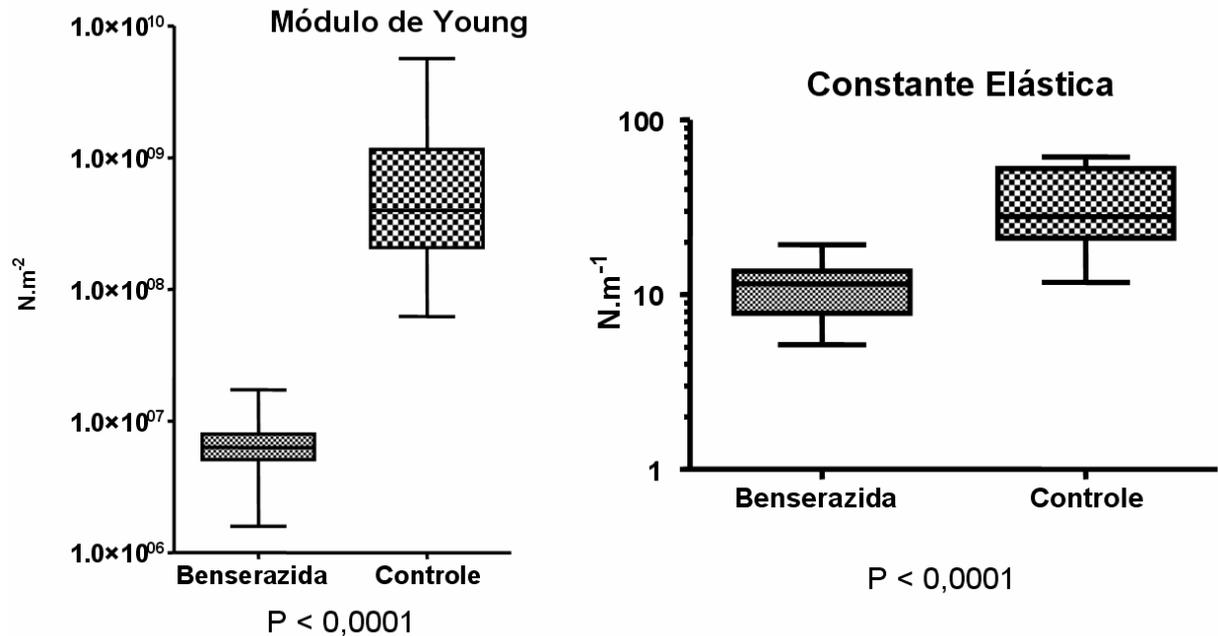


Figura 37: *Box plot* com a distribuição dos valores de *Módulo de Young* e *Constante Elástica* obtidos para ovos tratados e não tratados com Benserazida. Visualmente percebe-se que diferença entre tratado e controle em ambos os modelos. Utilizando um teste t para diferenciar controle e tratado, obtemos um valor de p menor que 0,0001. O mesmo resultado é obtido quando se analisa todo o experimento, ou apenas os primeiros 60 minutos, período no qual o enrijecimento é mais pronunciado.

4.11 – Enrijecimento de ovos não fecundados

Ao avaliar ovos não fertilizados, que escurecem normalmente (Figura 34), mas não possuem embrião, observamos que o enrijecimento ocorre normalmente, similarmente ao que ocorre com ovos normais.

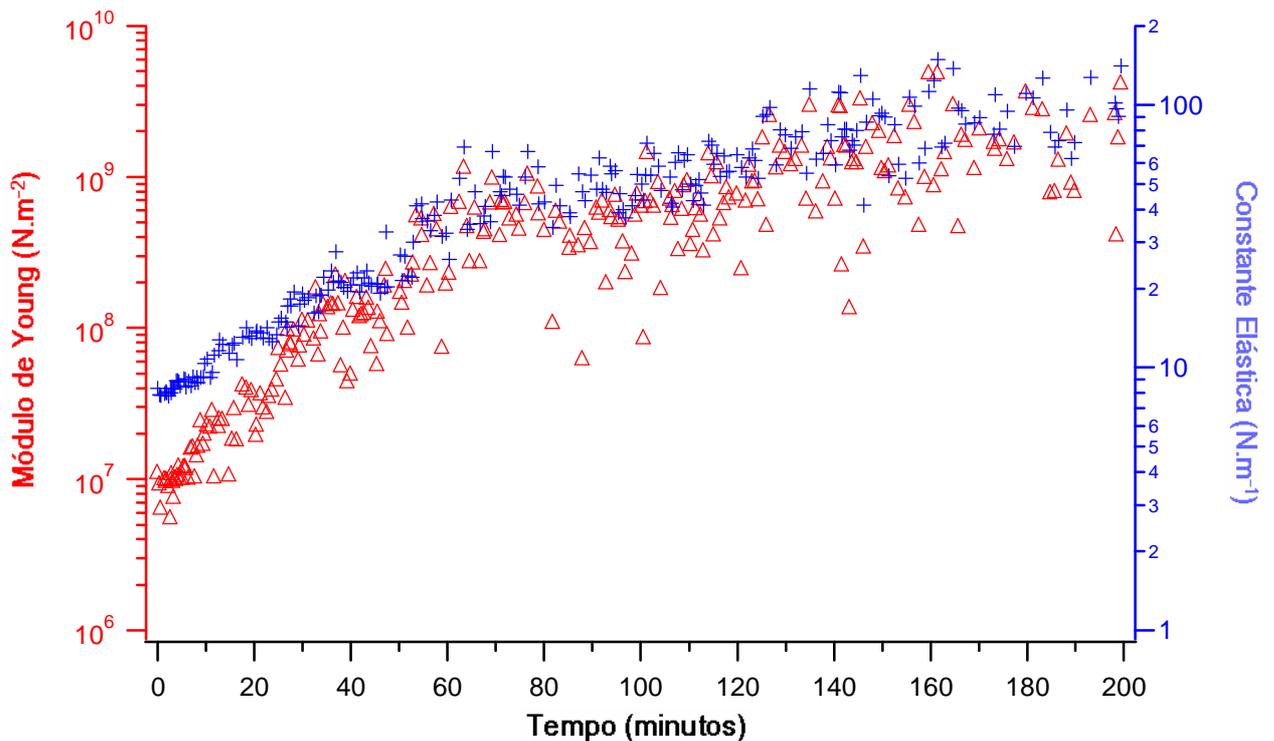


Figura 38: Experimento representativo do enrijecimento de ovos não fertilizados de *Aedes aegypti* recém-postos. O tempo zero nesse gráfico representa 45 minutos após o final da postura. Como observado nos ovos normais, há um incremento em ambos, *Módulo de Young* e *Constante Elástica*, principalmente durante os 60 primeiros minutos de medidas. Aproximadamente 180 minutos após o fim da postura, o enrijecimento está completo e os valores alcançados são da mesma magnitude que ovos normais velhos.

4.12 – Variação do volume dos ovos durante o enrijecimento

O inchamento dos ovos de *Aedes aegypti* foi acompanhado a partir da variação da área de seu contorno. Acompanhamos o inchamento de ovos normais, ovos não fertilizados e ovos tratados com Benserazida. Não observamos nenhuma diferença na variação do volume desses três tipos de ovos durante as duas primeiras horas após a postura, tempo no qual o efeito do enrijecimento é acentuado (Figura 29 e Figura 30). De um modo geral, a variação do volume desses ovos ocorre de maneira semelhante, aumentando progressivamente ao longo das quatro primeiras horas a uma taxa praticamente constante.

Esses experimentos também foram idealizados em conjunto com nosso colaborador Gustavo L. Rezende, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, que realizou os experimentos, que foram analisados por mim.

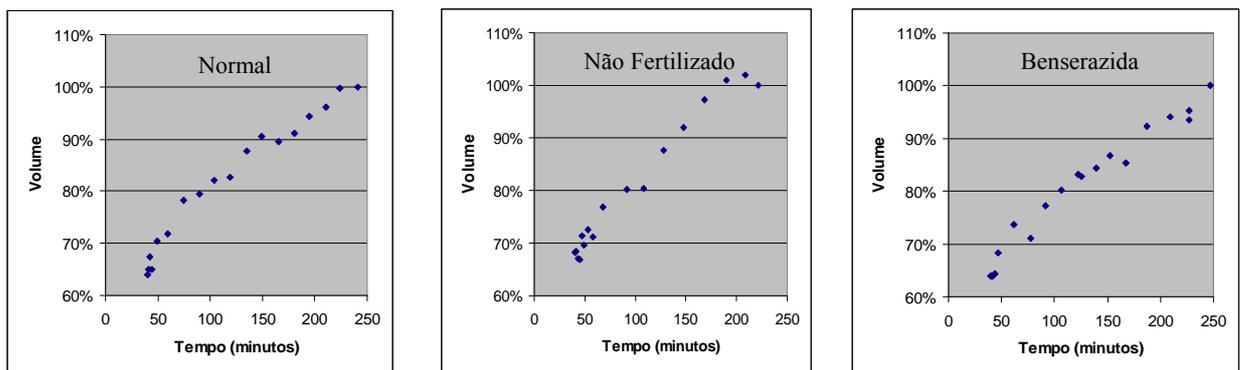


Figura 39: Inchamento dos ovos de *Aedes aegypti* ao longo das primeiras horas após o fim da postura. Três tipos diferentes de ovos foram avaliados nesse experimento: ovos normais (esquerda), ovos não fertilizados (centro) e ovos tratados com Benserazida (direita). A alteração no volume desses ovos se dá de maneira semelhante: crescem progressivamente ao longo das primeiras 4 horas, a uma taxa praticamente constante. Nenhuma diferença pode ser observada durante as primeiras duas horas após a postura, tempo no qual o efeito do enrijecimento é pronunciado. Nosso colaborador Gustavo L. Rezende, do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ, realizou esses experimentos que foram analisados por mim.

4.13 – Rigidez nas bandas de fios de cabelo de um humano com pili annulati

Os resultados deste experimento constam no artigo publicado por nosso grupo em setembro de 2007 (ANEXO I).

4.14 – Automação da análise dos dados

Todas as análises foram feitas com alto nível de automatização pelo programa que desenvolvemos especialmente para isso. Uma imagem da principal área de trabalho do programa está representada na Figura 40. É possível visualizar as variáveis mais importantes que são sempre mostradas nessa tela.

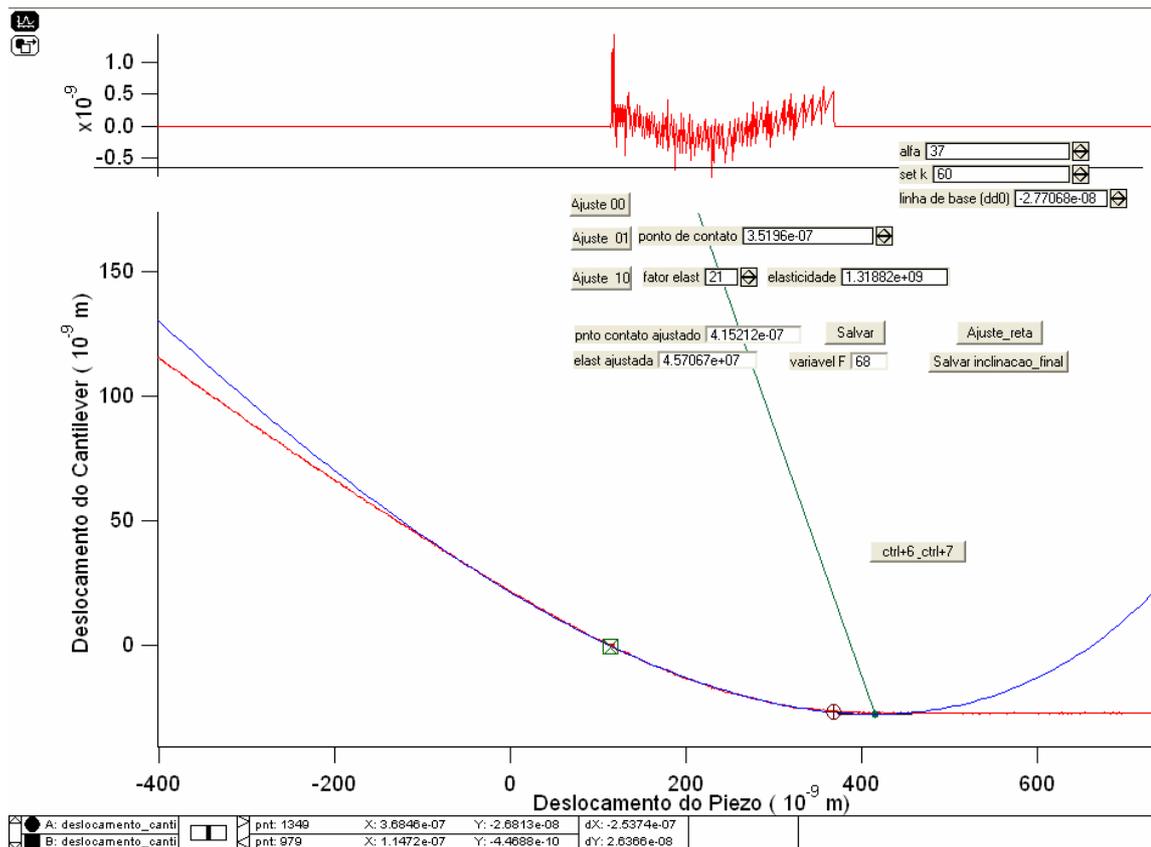


Figura 40: Imagem da principal janela de trabalho do programa desenvolvido por nosso grupo para obter os parâmetros de elasticidade das curvas de força experimentais. A curva inferior em vermelho é uma curva experimental, a azul é o ajuste do modelo de Hertz entre os cursores, e a superior em representa o resíduo do ajuste. A curva em verde é apenas uma reta de 45° (que representa uma superfície com elasticidade infinita) que sempre passa pelo ponto de contato da curva experimental. O restante são mostradores de variáveis ou botões que executam procedimentos, como descrito no ANEXO I.

Os botões para salvar os parâmetros tanto da curva ajustada pelo modelo de Hertz, quanto da curva ajustada pela reta, também estão nessa janela. Esses valores salvos são direcionados para uma tabela. Os valores salvos nas tabelas são: wave_elasticidade; wave_elasticidade_erro; k_ovo; wave_ponto_contato; wave_ponto_contato_erro;

wave_inclinacao_final_b; wave_inclinacao_final_a. A origem e função destas e de outras variáveis, assim como os procedimentos que as contém estão descritos no ANEXO I.

V - DISCUSSÃO

5.1 – Obtenção de Curvas de Força com o AFM

A AFM é ainda uma técnica em desenvolvimento, por isso os protocolos experimentais merecem especial cuidado, para que os dados gerados e suas análises sejam confiáveis. A parte inicial desse trabalho foi toda desenvolvida com os ovos de *Aedes aegypti*, sendo este o primeiro trabalho envolvendo medidas de propriedades elásticas realizado por nosso grupo, e que serve como referência para os demais estudos realizados, ou em progresso, em outros sistemas biológicos. A partir dos resultados obtidos nesse sistema, conseguimos definir os protocolos básicos para aquisição de curvas de força. O programa para análise das curvas de força desenvolvido nessa parte do trabalho pode ser eficientemente utilizado em outros sistemas biológicos e inertes.

Determinamos que, para efeito de análise, a linha de base das curvas de força (parte na qual ainda não há contato entre amostra e a sonda) deve ser visualmente reta, caso contrário o laser provavelmente está mal ajustado ou há alguma sujeira no cantiléver. Essa linha de base deverá possuir pelo menos 200 nm. Qualquer mudança na intensidade do laser afeta a inclinação das curvas de força e, por esse motivo, as alterações nesse sinal devem ser constantemente monitoradas.

A escolha do cantiléver para o estudo de elasticidade é um ponto crucial. Diferenças podem deixar de ser percebidas quando o cantiléver não é escolhido de forma apropriada. Cantiléveres muito macios, como um de 0,12 N/m, não são capazes de detectar valores exatos de *Módulo de Young* maiores que 10^7 Pa. Na verdade, esses cantiléveres medem com precisão e exatidão apenas *Módulos de Young* contidos no intervalo 10^3 e 10^7 Pa, sendo que, quanto mais próximo dos extremos desse intervalo, 10^3 ou 10^7 , menor a precisão e exatidão dos valores medidos. Medidas realizadas em amostras que apresentem *Módulos de Young* fora desse intervalo apresentarão um desvio padrão muito grande, de modo semelhante aos valores

obtidos para as medidas feitas no vidro na Figura 30, e, assim, uma análise equivocada poderia encontrar diferenças entre amostras de mesma elasticidade.

A constante elástica do cantiléver deve ser obtida por simulações baseadas no modelo teórico que se pretende usar para estudar a propriedade física (Tabela 1), e nos valores de elasticidade de amostras semelhantes já conhecidas, como as da Tabela 2.

Material	<i>Módulo de Young</i> (Pa)
Cardiócitos	$2 - 20 \times 10^3$
Cartilagem	$1,6 - 6 \times 10^5$
Fibroblastos	$2 - 20 \times 10^5$
Borracha	1×10^6
Colágeno	1×10^9
Tíbia (osso da perna)	$2,2 \times 10^{10}$
Parede de <i>Methanospirillum hungatei</i>	$3 - 4 \times 10^{10}$
Mica	$2 - 8 \times 10^{10}$
Aço	2×10^{11}

Tabela 2 – Exemplos do valor do *Módulo de Young* de algumas amostras biológicas e de algumas superfícies rígidas. Adaptado de Vinckier & Semenza, 1998 e J. L. Alonso, W. H. Goldman, *Life Science* 72 (2003) 2553-2560.

5.2 – Premissas à obtenção de curvas de força em ovos de *Aedes aegypti*

Um dos grandes problemas em erradicar a dengue é a resistência dos ovos de *Aedes aegypti*. Mesmo que seja possível matar todos os mosquitos em uma determinada área, ainda sobram os ovos, que são capazes de eclodir até muitos meses após a postura. A resistência mecânica desses ovos pode ter um papel muito importante na sua longa sobrevivência. Desde 1988, já é sabido que a resistência desses ovos altera-se ao longo de sua embriogênese (Mcgrane *et al.*, 1988), porém não havia nenhum trabalho que mostrasse quando e quanto essa elasticidade mudava. Há poucos anos, acreditava-se que o endurecimento, o escurecimento e a impermeabilização dos ovos de *Aedes* e *Anopheles* ocorriam ao mesmo tempo (Clements, 1992). Mais tarde, no entanto, foi demonstrado que a impermeabilização ocorre várias horas após o escurecimento (Martins Jr, 2002) para ovos de *Anopheles*. Entender o momento em que ocorre a mudança na elasticidade dos ovos pode fornecer uma ferramenta muito importante para futuros trabalhos que visem testar substâncias inibidoras ou bloqueadoras do enrijecimento, por exemplo.

O exocócion dos ovos revelou-se uma camada bastante macia e pegajosa. Quando se tentou fazer espectroscopia de força ou imagens dos ovos com exocócion, os cantiléveres ficavam sujos, mostrando grande adesão nas curvas de força e imagens completamente borradas. Isso acontecia porque o exocócion deixava resíduos no cantiléver, o que era de se esperar de uma estrutura macia e com o aspecto mostrado na Figura 11-b. Além de mudar a massa do cantiléver, o que descalibra todo o experimento, aumentava em muito a área de interação entre o cantiléver e a amostra. Durante a obtenção das imagens o cantiléver terminava por espalhar o exocócion, sem conseguir revelar efetivamente a topografia da amostra. Por essas razões, a remoção do exocócion foi essencial para que as curvas de força e as imagens dos ovos pudessem ser adequadamente obtidas. Após a remoção do exocócion

com hipoclorito de sódio foi testada a viabilidade dos embriões: o tratamento não impediu que os embriões eclodissem normalmente dos ovos.

Tentou-se então observar os ovos velhos sem exocócion por AFM a seco. Devido à camada de hidratação na superfície dos ovos, forças de atração por capilaridade ocorriam quando o cantiléver ficava suficientemente próximo dos ovos, o que dificultava tanto a obtenção de imagens quanto a espectroscopia de força. No caso dos ovos recém postos, todos os experimentos deveriam ser feitos em ambiente úmido, caso contrário, os ovos não iriam se desenvolver completamente (Clements, 1992 e Figura 35). Por esses motivos, todos os experimentos realizados com ovos de *A. aegypti* foram feitos em meio líquido, neste caso apenas água milliQ.

Os detalhes da topografia obtidos com AFM também poderiam ser obtidos por microscopia eletrônica de varredura, porém a facilidade de obter com grande exatidão os valores desse relevo, sem necessidade de fixação, é muito maior com o AFM.

Passando à análise das curvas de força, pudemos concluir, a partir de nossas observações, que mesmo mudanças na posição da base de até um centímetro não afetam a calibração das curvas experimentais, permitindo que os parâmetros de elasticidade medidos em regiões distintas do porta-amostra possam ser comparados. Isso é importante, já que precisamos mover a base sempre que queremos mudar de um ovo em estudo para outro, ou mesmo de um ovo para o vidro, ou ainda quando queremos mudar a posição do cantiléver em relação ao ovo para fazer medidas em diferentes partes do mesmo.

Para garantir a menor variação possível durante a obtenção das curvas de força nos diferentes experimentos e assegurar que as comparações feitas entre estes experimentos é válida, determinamos que as curvas devem ser sempre realizadas na região central dos ovos, evitando variações de mais do que 10 micrômetros. Essa região central de ovos de diferentes tamanhos pode ser comparada sem problemas.

Como os ovos apresentam formato aproximadamente elipsoidal, não seria esperado que as regiões ao longo de uma mesma linha central do ovo, apresentassem diferenças nos valores medidos. Se o ovo mostrado na Figura 23 fosse girado ao longo de seu maior eixo, no sentido horário, de modo que sua área representada em azul ficasse no ápice do ovo, e sua região representada em vermelho ficasse na região diametralmente oposta a que estava a região azul anteriormente (Figura 41), a região em vermelho apresentaria agora maior elasticidade. Esse resultado é esperado, pois apesar de se estar medindo uma mesma região ao longo de uma “seção do ovo”, há uma variação no ângulo de ataque do cantiléver. Esse ângulo é a inclinação com que o cantiléver se aproxima da amostra. Assim, mesmo que estejamos medindo uma mesma região do ovo, variando o ângulo de ataque deveremos obter valores de elasticidade diferente.

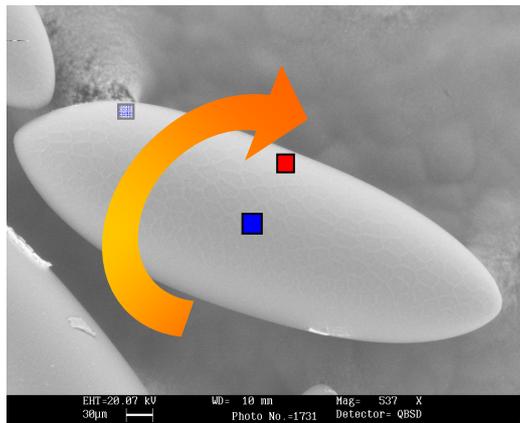


Figura 41: Representação da Figura 23 após uma rotação ao longo de seu maior eixo, no sentido horário, de modo que a área azul de interesse foi para o ápice do ovo, e a região em vermelho para a região diametralmente oposta a que estava a região azul anteriormente. A outra região em azul que aparece na Figura 23 foi esmaecida aqui, pois não é o foco nesse momento.

As medidas realizadas com o AFM também não alteraram em nada a viabilidade desses ovos, que eclodiam normalmente quando estimulados após as medidas (Gustavo L. Rezende, comunicação pessoal). Todos os ovos submetidos à análise de elasticidade tiveram sua viabilidade verificada: os ovos normais formavam embriões viáveis, enquanto os ovos não fertilizados e os tratados com benserazida nunca chegavam a formar um embrião viável.

Após a definição dos modelos físicos e de algumas simulações matemáticas computacionais, concluímos que os cantiléveres de 0,12 N/m utilizados eficientemente para aquisição de imagens não eram apropriados para detectar diferenças nem mesmo entre ovos velhos e o vidro. Isto porque tanto os ovos de *A. aegypti* quanto o vidro podem ser considerados superfícies infinitamente rígidas para um cantiléver de 0,12 N/m que, por ser muito macio, não é capaz de indentar nenhuma das duas amostras. Portanto, também não eram apropriados para medir possíveis diferenças entre ovos velhos. Com base nas simulações computacionais que fizemos e, com os valores de elasticidade de ovos velhos e de ovos recém postos, concluímos também que esses cantiléveres muito macios não teriam sido capazes de detectar diferenças entre esses ovos (Figura 27 até Figura 32).

O próximo intervalo investigado foi entre 10^6 a 10^{10} Pa, o qual, de acordo com os resultados de nossa simulação computacional, seria satisfatoriamente abrangido por um cantiléver de aproximadamente 60 N/m. Com cantiléveres de constante elástica dessa magnitude foi possível verificar diferenças entre ovos velhos e o vidro (Figura 30), e principalmente, entre ovos recém-postos e ovos velhos (Figura 32). Entretanto, não se pode precisar com esse cantiléver o valor do *Módulo de Young* para o vidro, o que também não é objetivado nesse estudo. A superfície de vidro serve apenas como uma superfície infinitamente rígida para controle e calibração do cantiléver, o que é uma aproximação razoável, pois não se observa nenhuma indentação deste cantiléver no vidro. Com cantiléveres de aproximadamente 60 N/m não é possível fazer imagens dos ovos, pois como ele é muito rígido, ele acaba danificando a amostra quando é arrastado por sua superfície.

Para garantir maior exatidão dos valores que seriam medidos, nunca utilizamos o valor informado pelo fabricante para a constante de mola dos cantiléveres, nesse caso 60 N/m. Isso porque há uma variação provável entre diferentes cantiléveres e, por esse motivo, a constante de mola deve ser determinada para cada cantiléver utilizado (Lévy & Maaloum, 2002 e

Burnham *et al.*, 2003). Em todos os experimentos que realizamos, determinamos a constante de mola do cantiléver pelo método de ruído térmico. Todos os cantiléveres utilizados possuíam constante elástica entre 40 e 60 N/m.

5.3 – Cinética do enrijecimento de ovos de *Aedes aegypti*

Observando ovos três horas após a postura, já escuros, verificando sua elasticidade e buscando o momento do enrijecimento, não conseguimos encontrar diferenças significativas nos valores de elasticidade obtidos. Após muitas tentativas e várias mudanças de protocolos para tentar detectar essa diferença de rigidez esperada (Mcgrane *et al.*, 1988; Clements, 1992), só conseguimos reforçar nossos resultados de que realmente não há diferenças entre os ovos com três horas e os ovos com algumas semanas (Figura 27, Figura 28 e Figura 31).

Os valores de elasticidade obtidos com ovos recém-postos a partir da terceira hora e com ovos velhos ficam em um intervalo de confiança (IC95%) bem definido: [47,6; 52,6] N/m para os valores de *Constante Elástica* e [6,1x10⁸; 7,8x10⁸] N/m² para os valores de *Módulo de Young*, confirmando a reprodutibilidade de nossos experimentos. As variações encontradas para o *Módulo de Young* e para *Constante Elástica* nos experimentos levou a um intervalo de confiança relativamente pequeno, semelhante a alguns encontrados na literatura (Parbhu *et al.*, 1999; Dimitriadis *et al.*, 2002).

A informação contida nas medianas dos valores de elasticidade de ovos velhos, 5,4x10⁸ Pa e 48,5 N/m, é bastante útil, porque indica o valor central em torno do qual os valores medidos oscilam, diminuindo a contribuição de valores muito altos ou muito baixos, que possam ter sido gerados. Um ponto passível de erro é que em nosso modelo admitimos uma razão de Poisson que pode não corresponder à realidade (Mahaffy *et al.*, 2004). Isso leva a uma possível perda na exatidão dos valores calculados, mas não prejudica os estudos comparativos entre ovos velhos e ovos recém-postos.

Acompanhando ovos de 60 minutos após a postura até a 3^a hora do desenvolvimento, verificamos que há um enrijecimento progressivo nesse período, principalmente entre 60 e 120 minutos após a postura (Figura 29 e Figura 30).

Um dos objetivos desse trabalho, além de descrever a cinética de enrijecimento, é relacioná-la a dois outros fenômenos que ocorrem durante a embriogênese inicial: escurecimento e impermeabilização. Fazendo com ovos de *Aedes aegypti* o mesmo tipo de testes que nossos colaboradores haviam feito para *Anopheles* (Martins Jr, 2002), verificamos que, para ovos de *Aedes aegypti*, escurecimento e impermeabilização também não ocorrem ao mesmo tempo.

Observando os resultados de enrijecimento, concluímos que o mesmo ocorre bem antes da impermeabilização, que pode ser percebida apenas a partir de 11 horas após a postura. Assim como o enrijecimento, o escurecimento também ocorre durante as três primeiras horas, estando completo em cerca de 100 minutos, sugerindo que esses dois fenômenos podem estar acoplados de alguma forma.

Verificamos em um mesmo experimento o enrijecimento de um ovo recém-posto e de um ovo velho, já escuro, comparando os valores de elasticidade entre eles (Figura 30). Isso possibilitou a obtenção de medidas entre esses ovos com a menor variação temporal possível, pois como os ovos estavam colocados lado a lado, era possível fazer medidas em um ovo, e em seguida mudar rapidamente para o outro ovo, sem necessidade de refazer calibrações no sistema. A relevância de esse procedimento ser feito desta forma, em paralelo, é que, além de diminuir o tempo entre o estudo dos ovos velhos e dos recém postos, minimiza as variações de outros parâmetros que possam influenciar as medidas. Algumas variações relevantes que são minimizadas com essa montagem experimental são: menor variação da intensidade do laser; menor variação das condições ambientais da sala; pequena variação no horário, que modifica a quantidade de ruído experimental; não há necessidade de trocar ou limpar o cantiléver; entre outras coisas. Aproximadamente uma hora após a postura, os ovos são muito macios, sendo que algumas horas mais tarde, já estão tão rígidos quanto ovos com mais de 3 horas. Ainda com o intuito de confirmar se as diferenças visíveis nos valores de elasticidade

entre ovos recém-postos e ovos velhos eram significativas, foi feito um teste t. O resultado da análise de variância retornou um valor de $p < 0,0001$, indicando que, estatisticamente, há diferença entre as elasticidades desses ovos.

Vale a pena ressaltar que o estudo da mudança de elasticidade tem realmente que ser feito em líquido, pois além de no ar não se conseguir fazer medidas de modo adequado, verificamos que o aumento na elasticidade ocorre justamente numa escala de tempo em que o ovo ainda é permeável. Portanto, se os experimentos fossem realizados no ar, os ovos murchariam durante o experimento. Nessas primeiras horas ocorre um grande influxo de água nos ovos de *A. aegypti*, observado pelo aumento em seu peso, em média, de 5 para 12 μ g (Clements, 1992). Esse influxo ocorre principalmente nas primeiras 2 horas, mas continua até a décima, décima segunda hora (Clements, 1992). É justamente no momento em que esse influxo é grande que observamos a mudança na elasticidade. Isso poderia levar-nos a crer que o inchamento causado por esse influxo é o responsável por esta mudança. No entanto, verificamos que a variação do volume tem comportamento bastante diferente do enrijecimento. De um modo geral, a variação do volume desses ovos ocorre de maneira semelhante, aumentando progressivamente ao longo das quatro primeiras horas a uma taxa praticamente constante (Figura 39). Comparando com o enrijecimento, não observamos nenhuma diferença na variação do volume desses três tipos de ovos durante as duas primeiras horas após a postura, tempo no qual o efeito do enrijecimento é acentuado.

Os valores medidos para *Módulo de Young* e para *Constante Elástica* aumentam progressivamente ao longo do tempo até atingirem um platô em valores próximos aos dos ovos velhos analisados. Assim, a mudança na elasticidade atinge um patamar igual ao de ovos mais velhos em um período de, no máximo, 3 horas. Se a mudança na elasticidade fosse um reflexo do influxo de água, ela deveria continuar pelo menos até a décima hora (Clements, 1992), ou ao menos até a quarta hora (Figura 39).

Para verificar se o endurecimento observado não era fruto da manipulação experimental, já que poderia ser uma resposta do ovo ao estresse mecânico causado pelo cantiléver, por exemplo, foi verificada a influência da realização de quase duzentas medidas durante 3 horas em um ovo com três meses de idade (Figura 31). Essa manipulação extrema não mostrou nenhuma resposta nos ovos analisados.

Mais relevante do que os dados quantitativos, os dados qualitativos demonstraram indubitavelmente a forma como se dá o enrijecimento durante as primeiras horas.

Como tudo indica que a mudança na elasticidade dos ovos está ocorrendo ao mesmo tempo em que verificamos o escurecimento dos mesmos, esses dois fenômenos devem realmente estar bioquimicamente acoplados. Os ovos começam a escurecer após cerca de 40 minutos, e seria muito interessante verificar se há alguma mudança na elasticidade antes desse ponto. Infelizmente, não conseguimos remover o exocóricion antes desse tempo sem causar a morte do embrião.

Para testar a hipótese de que escurecimento e enrijecimento estariam realmente acoplados, resolvemos estudar ovos tratados com benserazida, um conhecido inibidor do escurecimento. A benserazida inibe a enzima dopa-descarboxilase, que é a responsável por transformar L-dopa em dopamina, um dos precursores da melanina, que é necessária para o escurecimento. Conforme esperado, confirmamos que ovos tratados com benserazida não escurecem normalmente. Com esse resultado em mãos, acompanhamos o enrijecimento de ovos recém-postos tratados com benserazida (Figura 36). Verificamos que esses ovos além de não escurecerem, também não enrijecem normalmente. Apesar de algum enrijecimento ao longo do tempo poder ser notado em ovos tratados com benserazida, principalmente na *Constante Elástica*, verificamos após a realização de um teste t que os valores obtidos para *Módulo de Young* e *Constante Elástica* nestes ovos são significativamente diferentes daqueles obtidos para ovos não tratados (Figura 37). Esse experimento é mais um indício que reforça a

hipótese de que as vias que levam ao escurecimento e enrijecimento estariam acopladas, já que se o escurecimento for inibido, os ovos não enrijecem normalmente.

A partir do resultado com ovos que não escureciam, precisávamos agora de um controle no qual os ovos escurecessem normalmente, mas não completassem seu desenvolvimento embrionário. Nosso colaborador Gustavo L. Rezende (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC – FIOCRUZ) havia verificado que fêmeas virgens (que nunca tiveram contato com mosquitos machos) de *Aedes aegypti*, quando induzidas a pôr ovos da mesma forma que fêmeas criadas com machos, faziam a postura normalmente. Acompanhando o desenvolvimento desses ovos não fertilizados, ele verificou que os mesmos escureciam normalmente, apesar da ausência de embrião (Figura 34). Com esse resultado em mãos, escolhemos esses ovos como controle de ovos que escureceriam normalmente, mas não completariam a embriogênese, e avaliamos seu enrijecimento. O enrijecimento dos ovos não fertilizados se dá de forma análoga ao que foi verificado para ovos normais (Figura 38). Concluimos então que quando ocorre o escurecimento, o ovo também enrijece, mesmo na ausência das estruturas que formarão o embrião.

Resumindo o que foi avaliado, concluimos que o escurecimento é terminado em, aproximadamente, 90 minutos após o fim da postura (Figura 42). Um pouco mais tarde, aproximadamente 3 horas após o fim da postura, termina o enrijecimento, sendo que os ovos nesse momento têm a mesma elasticidade que ovos com várias semanas de idades (Figura 42). E por fim, aproximadamente 13 horas após a postura, os ovos deixam de ser permeáveis à água ao mesmo tempo em que a cutícula serosa já está presente (Figura 42). A partir desse ponto, os ovos já são resistentes à dessecação.

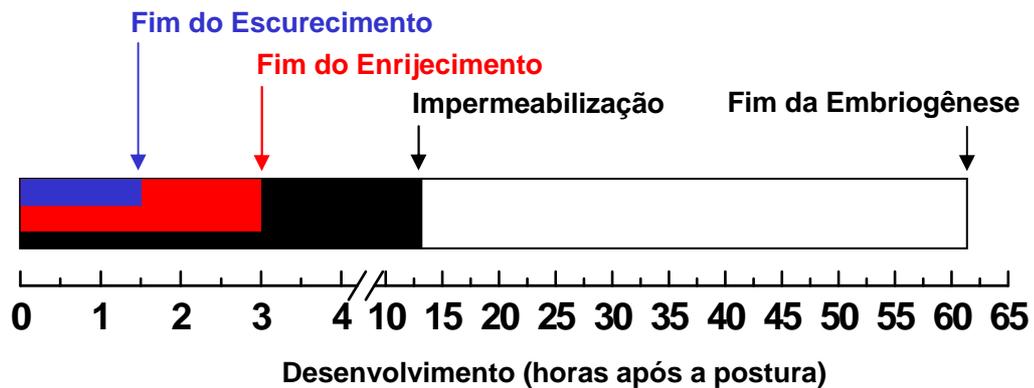


Figura 42: Resumo das análises feitas para os três fenômenos, escurecimento, enrijecimento e impermeabilização, ao longo da embriogênese. O tempo zero marca o final da postura. O escurecimento termina 90 minutos após o final da postura. Três horas após o fim da postura o enrijecimento está completo. O processo de impermeabilização está finalizado 13 horas após o final da postura. A embriogênese termina 61 minutos após o fim da postura.

Uma das grandes dificuldades no controle do *Aedes aegypti* é que seus ovos são extremamente resistentes, podendo sobreviver a longos períodos de dessecação. Um tratamento que mate todos os mosquitos não evita que novos mosquitos nasçam nos próximos meses. Nós mostramos pela primeira vez que a mudança de rigidez desses ovos ocorre ao longo das três primeiras horas após a postura. Drogas que interfiram no enrijecimento desses ovos podem ser promissoras no combate desses mosquitos vetores. Assim, para se testar possíveis inibidores da via de enrijecimento, é necessário que o tratamento seja realizado o mais cedo possível, já que a partir da terceira hora após a postura não ocorre mais nenhum enrijecimento.

Nós somos o primeiro grupo a utilizar AFM para acompanhar o enrijecimento de ovos de mosquitos ao longo da embriogênese. Nossos resultados mostram a cinética desse enrijecimento além de quantificar esse efeito. Utilizando a técnica de AFM combinada com algumas outras abordagens relativamente simples, fomos capazes de fazer inferências sobre vias bioquímicas, mesmo sem utilizar técnicas de biologia molecular. Nossos colaboradores do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (IOC – FIOCRUZ) fazem os

estudos de biologia molecular nessa área, que se somam aos nossos resultados para auxiliar na compreensão da embriologia desses animais.

5.4 – Resultados obtidos em outros sistemas biológicos

As medidas de elasticidade podem ajudar a responder várias perguntas biológicas. Nosso grupo já utilizou e vem utilizando as metodologias desenvolvidas durante o estudo dos ovos de *Aedes aegypti* em outros sistemas biológicos. Em setembro de 2007 publicamos um trabalho aplicando medidas de elasticidade em outro sistema biológico. No trabalho intitulado “*Study of nanomechanical properties of human hair shaft in a case of pili annulati by atomic force microscopy*” (Streck *et al.*, 2007), nós analisamos fios de cabelo de um paciente humano que apresenta uma anomalia genética hereditária bastante rara conhecida como pili annulati. O trabalho, que se encontra na íntegra no ANEXO I, mostrou pela primeira vez na literatura esse tipo de caracterização nesses pêlos, o que trouxe importantes pistas para a elucidação de alguns mecanismos ainda pouco conhecidos sobre a formação desses fios.

Além dessa publicação, a experiência obtida com AFM durante meu mestrado contribuiu para mais duas outras relevantes publicações: um artigo utilizando o AFM para fazer imagens e avaliar tamanho de Fibrilas e Protofibrilas de α -sinucleína após diferentes tratamentos (Follmer *et al.*, 2007); e um capítulo sobre microscopia de varredura por sonda e AFM, publicado em um livro (Weissmüller *et al.*, 2007).

VI - CONCLUSÕES

- O exocócion deve ser removido e as medidas devem ser feitas em líquido. A elasticidade do cantiléver a ser utilizado deve levar em conta a elasticidade da amostra.
- As medidas devem sempre ser feitas na região central dos ovos de *A. aegypti*, não havendo necessidade de se preocupar com o tamanho.
- Os valores do *Módulo de Young* e *Constante Elástica* para ovos com mais de 3 horas variam entre $6,1 \times 10^8$ e $7,8 \times 10^8$ Pa e entre 47,6 e 52,6 N/m, respectivamente, concordando com os valores previstos na literatura para agregados protéicos.
- De uma a 3 horas após a postura os ovos de *A. aegypti* enrijecem progressivamente, principalmente entre a primeira e a segunda hora.
- Os valores aproximados do *Módulo de Young* e de *Constante Elástica* para ovos até 100 minutos após a postura variam entre 10^6 e 10^8 Pa e entre 5 e 40 N/m, respectivamente.
- Ovos de *A. aegypti* velhos não endurecem quando manipulados da mesma forma que ovos recém-postos. Os valores de elasticidade medidos para esses dois tipos de ovos variam significativamente, $p < 0,0001$.
- O escurecimento dos ovos de *A. aegypti* começa 35 minutos após a postura, e demora cerca de 60 minutos para estar completo.
- A mudança de permeabilidade dos ovos de *A. aegypti* ocorre entre 11 e 13 horas após a postura.
- Ovos tratados com Benserazida não escurecem e não enrijecem durante as 3 primeiras horas após a postura.
- Tanto o enrijecimento quanto o escurecimento ocorrem na ausência de um embrião viável, já que ambos ocorrem normalmente em ovos não fertilizados.

- Durante as 4 primeiras horas os ovos de *A. aegypti* aumentam seu volume homogeneamente ao longo do tempo.
- O enrijecimento de ovos de *A. aegypti* ocorre enquanto os ovos estão escurecendo, sugerindo que as vias bioquímicas que dirigem os mesmos possam estar acopladas, como uma consequência da esclerotização.
- O modelo de Hertz modificado pela mecânica de Sneddon e o modelo de molas em série ajustam-se muito bem às curvas experimentais. O programa desenvolvido realiza eficientemente todos os cálculos, além de facilitar a documentação e o acesso aos dados.

Bibliografia

A-Hassan, E.;Heinz, W. F.;Antonik, M. D.;D'costa, N. P.;Nageswaran, S.;Schoenenberger, C. A. & Hoh, J. H. 1998. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J*, **74** (3): 1564-1578.

Alonso, J.L.; Goldmann, W.H. 2003. Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sciences*, **72** (23) 2553-2560.

Baro, A. M.;Miranda, R.;Alaman, J.;Garcia, N.;Binnig, G.;Rohrer, H.;Gerber, C. & Carrascosa, J. L. 1985. Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy. *Nature*, **315** (6016): 253-254.

Binnig, G.;Quate, C. F. & Gerber, C. 1986. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, **56** (9): 930-933.

Binnig, G.;Rohrer, H.;Gerber, C. & Weibel, E. 1982. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letters*, **49** (1): 57-61.

Burnham, N.A.; Chen, X; Hodge C.S.; Matei, G.A.; Thoreson, E.J.; Roberts, C.J.; Davies, M.C.; Tendler, S.J. 2003. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology*. **14**, 1–6.

Christophers, S.R. 1960. *Aedes aegypti*, the Yellow Fever Mosquito; its Lifehistory, Bionomics and Structure. *Cambridge Univ. Press*, London.

Cidade, G. A.;Costa, L. T.;Weissmuller, G.;Da Silva Neto, A. J.;Roberty, N. C.;De Moraes, M. B.;Prazeres, G. M.;Hill, C. E.;Ribeiro, S. J.;De Souza, G. G.;Da Silva Pinto Teixeira, L.;Da Costa Moncores, M. & Bisch, P. M. 2003. Atomic force microscopy as a tool for biomedical and biotechnological studies. *Artif Organs*, **27** (5): 447-451.

Clements, A. N. 1992. The biology of mosquitoes. *Chapman & Hall*, v. I London.

Dawber R. 1997. Diseases of the Hair and Scalp. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 3rd: 286–288.

Dimitriadis, E. K.;Horkay, F.;Maresca, J.;Kachar, B. & Chadwick, R. S. 2002. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J*, **82** (5): 2798-2810.

Domke, J. & Radmacher, M. 1998. Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope. *Langmuir*, **14** (12): 3320 -3325.

Drake, B.;Prater, C. B.;Weisenhorn, A. L.;Gould, S. A.;Albrecht, T. R.;Quate, C. F.;Cannell, D. S.;Hansma, H. G. & Hansma, P. K. 1989. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*, **243** (4898): 1586-1589.

Follmer C.; Romão L.; Einsiedler C.; Porto T.; Lara F.; Moncores M.; Weissmüller G.; Lashuel H.; Lansbury P.; Neto V.; Silva J.; Foguel D. 2007. Dopamine affects the stability, hydration, and packing of protofibrils and fibrils of the wild type and variants of alpha-synuclein. *Biochemistry*. **46** (2):472-82.

- Giehl K.; Dean D.; Dawber R.; Leigh I.; de Berker D.; Wojnarowska F. 2005. Cytokeratin expression in pili annulati hair follicles. *Clin Exp Dermatol*, **30**: 426-428.
- Giehl K.; Ferguson D.; Dawber R.; Pittelkow M.; Foehles J.; de Berker D. 2004. Update on detection, morphology and fragility in pili annulati in three kindreds. *European Academy of Dermatology and Venereology*; **18**: 654-658.
- Griffith, J. E. & Kochanski, G. P. 1990. Scanning Tunneling Microscopy. *Annual Review of Material Science*, **20**: 219-244.
- Henderson, E.;Haydon, P. G. & Sakaguchi, D. S. 1992. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, **257** (5078): 1944-1946.
- Heuberger, M.;Dietler, G. & Schlapbach, L. 1996. Elastic deformations of tip and sample during atomic force microscope measurements. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, **14** (2): 1250-1254.
- Hofmann, U. G.;Rotsch, C.;Parak, W. J. & Radmacher, M. 1997. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J Struct Biol*, **119** (2): 84-91.
- Horber, J. K.;Mosbacher, J.;Haberle, W.;Ruppersberg, J. P. & Sakmann, B. 1995. A look at membrane patches with a scanning force microscope. *Biophys J*, **68** (5): 1687-1693.
- Kroeger, A.;Nathan, M. & Hombach, J. 2004. Dengue. *Nat Rev Microbiol*, **2** (5): 360-361.
- Landois L. 1866. Das plötzliche Ergrauen der Haupthaare. *Arch Pathol Anat Physiol*; **35** : 575-599.
- Lévy, R. & Maaloum, M. 2002. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, **13**: 33-37.
- Mahaffy, R. E.;Park, S.;Gerde, E.;Kas, J. & Shih, C. K. 2004. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophys J*, **86** (3): 1777-1793.
- Martins Jr, A. J. 2002. Investigação da permeabilidade de culicídeos como requisito para a manutenção de mosquitos transgênicos. *Monografia de Bacharelado em Genética – Instituto de Biologia – UFRJ*.
- Mcgrane, V.; Carlson, J. ;Miller, B. & Beaty, B. J. 1988. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am J Trop Med Hyg*, **39** (5): 502-510.
- Monnerat, A. T.;Soares, M. J.;Lima, J. B.;Rosa-Freitas, M. G. & Valle, D. 1999. Anopheles albitalis eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol*, **45** (10): 915-922.
- Musso L. 1970. Pili annulati. *Australas J Dermatol*, **11**:67-65.

Parbhu, A.; Bryson, W. & Lal, R. 1999. Disulfide bonds in the outer layer of keratin fibers confer higher mechanical rigidity: correlative nano-indentation and elasticity measurement with an AFM. *Biochemistry*, **38** (36): 11755-11761.

Radmacher, M. 2002. Measuring the elastic Properties of Living Cells by the Atomic Force Microscope. Editado por Bhanu P. Jena and J.K. Heinrich Horber. Atomic Force Microscopy in Cell Biology. *Methods in cell biology*, v. **68**. p. 67-90.

Radmacher, M. 2007. Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy. *Methods Cell Biol.*, **83**: 347-72.

Radmacher, M.; Fritz, M. & Hansma, P. K. 1995. Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. *Biophys J*, **69** (1): 264-270.

Radmacher, M.; Tillmann, R. W.; Fritz, M. & Gaub, H. E. 1992. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, **257** (5078): 1900-1905.

Rotsch, C.; Braet, F.; Wisse, E. & Radmacher, M. 1997. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell Biol Int*, **21** (11): 685-696.

Rotsch, C.; Jacobson, K. & Radmacher, M. 1999. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (3): 921-926.

Streck A.; Moncores M.; Sarmiento D.; Barbosa H.; Weissmüller G.; Baetas-Da-Cruz W.; 2007. Study of nanomechanical properties of human hair shaft in a case of pili annulati by atomic force microscopy. *Eur Acad Dermatol Venereol.*, **21**(8):1109-10.

Tao, N. J.; Lindsay, S. M. & Lees, S. 1992. Measuring the microelastic properties of biological material. *Biophys J*, **63** (4): 1165-1169.

Timoshenko, S. P. & Goodier, J. N. 1970. Theory of Elasticity. *McGraw-Hill Kogakusha*, v.I. 3rd ed.

VanLandingham, M. R.; Mcknight, S. H.; Palmese, G. R.; Eduljee, R. F.; Gillespie, J. W. & Mcculough, J. R. L. 1997. Relating elastic modulus to indentation response using atomic force microscopy. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE LETTERS*, **2**: 117-119.

Vinckier, A. & Semenza, G. 1998. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett*, **430** (1-2): 12-16.

Weisenhorn, A. L.; Khorsandi, M.; Kasa, S.; Gotzos, V. & Butt, H.-J. 1993. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*, **4**: 103-113.

Weissmüller, G.; Moraes, M. B. D.; Prazeres, G. M. P.; Teixeira, L.; Costa, L. T.; Batista, E. D. J. O.; Carneiro, F. A.; Ishimaru, D.; Rezende, G. L.; **Moncores**, M.; Bastos, G. G.; Valle, D.; Poian, A. T. D.; Silva, J. L.; Souza, W. D. & Bisch, P. M. 2003. Multiple Applications of Atomic Force Microscopy in Biology. *ACTA MICROSCOPICA*, **12**, **Supplement A**: 29-33.

Weissmüller, G.; Rocha G. M.; Moncores M. 2007. Microscopia de Varredura por Sonda e Microscopia de Força Atômica. Editado por Wanderley de Souza. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. *Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise*, p. 344-356.

ANEXO I

Artigo publicado no *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.

KP Kyriakis,* C Michailides, I Palamaras,
S Terzoudi, G Evangelou, E Damoulaki
Department of Dermatology and Venereology,
West Attica General Hospital 'St. Barbara', Athens,
Greece, *Corresponding author, MPH, Koumanoudi str. 52,
Athens 11474, Greece, tel. +30 210 5301255;
fax +30 210 5613565; E-mail: fountou@otenet.gr

References

- 1 Rowell NR, Goldsmith MJD. The connective tissue diseases. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FJG, eds. *Textbook of Dermatology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1992: 2163–2294.
- 2 Rowell NR. Lupus erythematosus, scleroderma and dermatomyositis. In: Rook AJ, Wilkinson DS, Ebling FJ, eds. *Textbook of Dermatology*, 2nd edn. Blackwell, Oxford, 1972: 1061–1136.
- 3 Jacyk WK, Damisah M. Discoid lupus erythematosus in the Nigerians. *Br J Dermatol* 1979; 131–135.
- 4 Burch PRJ, Rowell NR. The sex- and age distributions of chronic discoid lupus erythematosus in four countries. *Acta Derm Venereol* 1968; 48: 33–46.
- 5 Burch PRJ, Rowell NR. Lupus erythematosus. *Acta Dermatovener (Stockholm)* 1970; 50: 293–301.
- 6 Graham S, Marshall J, Hanghey B *et al.* An inquiry into the epidemiology of melanoma. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 606–619.

DOI: 10.1111/j.1468-3083.2007.02095.x

Study of nanomechanical properties of human hair shaft in a case of pili annulati by atomic force microscopy

Editor

Pili annulati (PA) is a rare hair shaft abnormality characterized by alternate light and dark bands in the hair shaft, leading to a shiny appearance.¹ It is an autosomal dominant inheritance with variable penetrance, although sporadic cases have also been described.^{1,2} There is no consensus on the origin of the light bands, caused by double diffraction of transmitted light. Some authors propose that the light bands are due to air-filled spaces³ while others attribute this alteration to proteinaceous materials.⁴ Light bands observed by clinical examination appear as dark bands when imaged by light microscopy.²

We report a 29-year-old blonde woman with a scalp hair abnormality since childhood. Physical examination showed alternating light and dark areas, giving the scalp a shiny appearance (fig. 1a). Morphological analysis correlating polarizing (fig. 1b) and reflecting light microscopy (fig. 1c) provided information about the morphology of dark bands in PA hair shafts. Examination of the scalp showed no substantial increase in fragility of the hair shaft or other abnormalities (fig. 1a). Alterations in axillary and pubic hair were not observed. No other remarkable

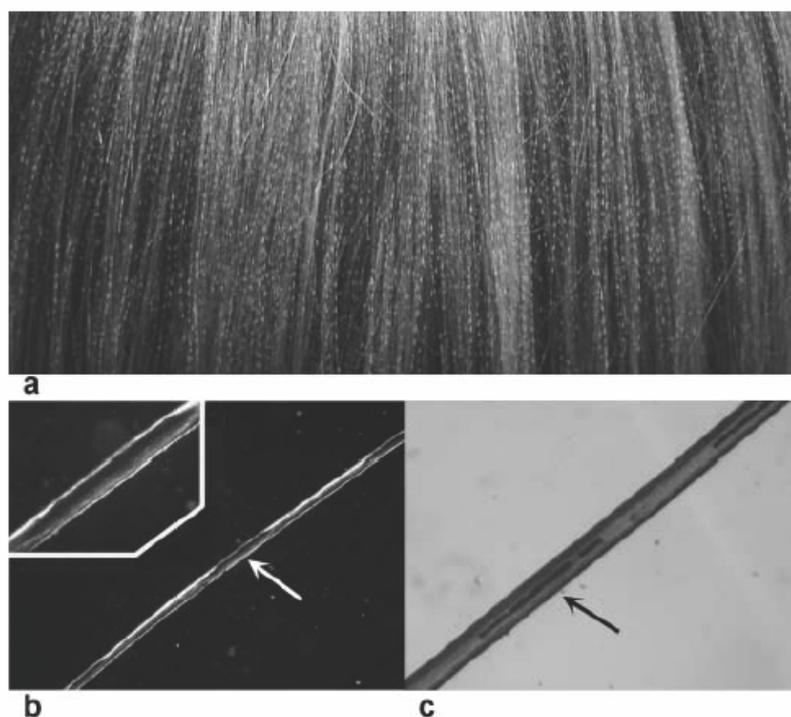


fig. 1 Clinical appearance of PA. (a) Hair of a 29-year-old blonde woman with light and dark bands. Polarizing (b) and reflecting (c) light microscopy showing dark bands (arrows) along the PA hair shaft. Inset: higher magnification showing a dark band in the PA hair shaft (original magnifications: (b) $\times 5$, (c) $\times 10$, and inset $\times 10$).

Table 1 Mean, geometric mean and confidence interval (CI) values for stiffness of control and PA hair samples

	Lower 95% CI of geometric mean (N/m)	Upper 95% CI of geometric mean (N/m)	Geometric mean (N/m)	Median (N/m)	Mean \pm Std error (N/m)	n
Control	305	604	429	359	1078 \pm 232 (21%)	61
Light (PA)	228	380	294	337	497 \pm 68 (14%)	69
Dark (PA)	418	698	540	443	993 \pm 244 (24%)	51

dermatological alterations were revealed in the physical examination. No similar case was found in first-degree relatives when carefully examined for PA.

In the past few years, atomic force microscopy (AFM) has been used to study biological samples under physiological conditions through force measurements and image acquisition.⁵ The AFM is a powerful tool to elucidate mechanical properties of biological materials,⁶ and we used it to elucidate transversal stiffness of hair shafts in a case of PA. The morphology of human hair structure has traditionally been investigated by light and electron microscopy.^{2,4} Nevertheless, AFM can be used for characterization of biological materials in ambient conditions without requiring any sample preparations or surface treatment, other than immobilization on a surface.⁷

In this study, hair shafts were laid on a thin double-face tape. AFM force–distance curves were obtained at room temperature, using a MFP-3D (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) and Si cantilevers (AC160TS from Olympus, Tokyo, Japan; spring constant measured by the thermal noise method of 42 N/m and nominal tip radius lower than 10 nm). All measurements were performed in air, and a glass slide was used as a rigid surface to calibrate photo-detector sensitivity. Force curves were recorded at 5.5 $\mu\text{m/s}$, with typical piezo displacements ranging from 2 to 3 μm . Data between 100 and 150 μm after the contact point were analysed with self-developed software to calculate stiffness, considering hair and cantilever as two strings in series.

Both dark and light parts of the patient hair sample were analysed. A hair sample from another person with blonde hair was used as control (Table 1). We evaluated four different hair shafts from the same patient; for each shaft 12 different regions were analysed using 10-force curves per region. Use of the Mann–Whitney test enabled us to conclude that there was a significant difference between dark and light parts of PA hair samples ($P = 0.027$) (Table 1). No morphological differences between dark and light parts of PA hair shaft were found when imaged by both AFM and scanning electron microscopy (data not shown). We observed that dark parts (993 ± 244 N/m) were stiffer than the light ones (497 ± 68 N/m). Although

transversal stiffness cannot be considered to determine hair fragility, a conflicting PA phenotype,² it can be a useful parameter to characterize PA. These results are the first evidence that corroborates the air-filled space model on light bands of PA hair shafts. It is the first time that AFM has been used to investigate a PA case, and our results open a new path to investigate PA mechanisms.

AP Streck,[†] M Moncores,[‡] DF Sarmiento,[†] HS Barbosa,[§] G Weissmüller,[‡] W Baetas-Da-Cruz*[§]
[†]Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Gaffrêe e Guinle, Escola de Medicina e Cirurgia, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, [‡]Laboratório de Física Biológica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, [§]Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21040–900 Rio de Janeiro, Brazil, *Corresponding author, tel. +55 21 2598 4413; fax +55 21 2260 4434; E-mail: wagner@ioc.fiocruz.br or wagner.baetas@gmail.com

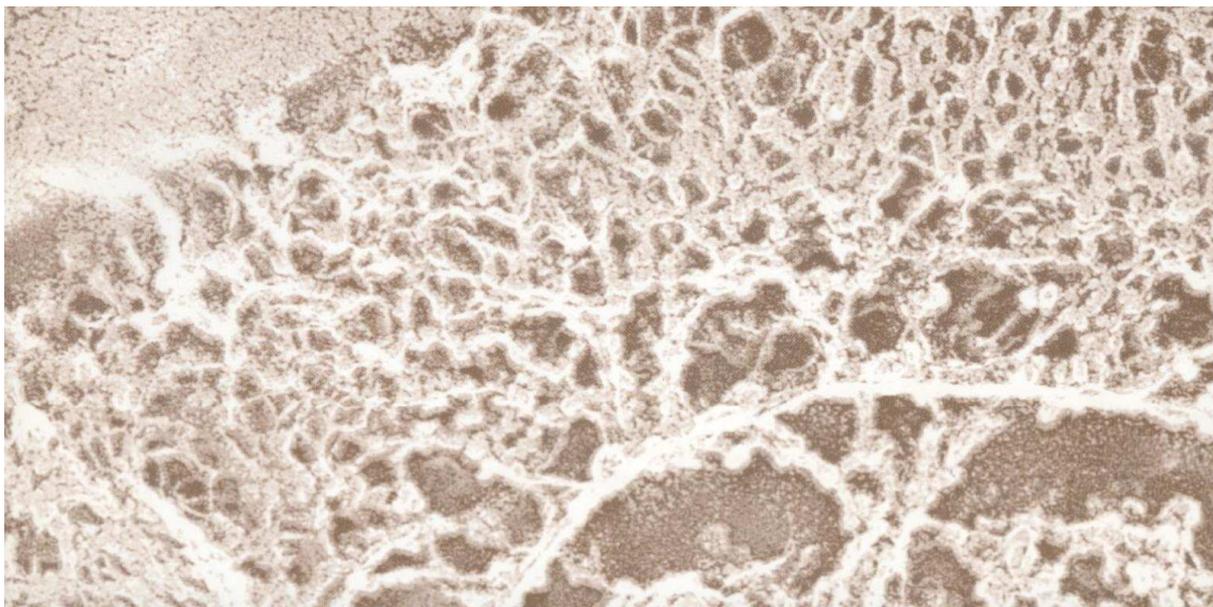
References

- Musso LA. Pili annulati. *Australas J Dermatol* 1970; **11**: 65–67.
- Giehl KA, Ferguson DJP, Dawber RPR *et al*. Update on detection, morphology and fragility in pili annulati in three kindreds. *European Acad Dermatol Venereol* 2004; **18**: 654–658.
- Giehl KA, Dean D, Dawber RPR *et al*. Cytokeratin expression in pili annulati hair follicles. *Clin Exp Dermatol* 2005; **30**: 426–428.
- Gummer CL, Dawber RPR. Pili annulati: electron histochemical studies on affected hairs. *Br J Dermatol* 1981; **105**: 303–309.
- Cidade GA, Costa LT, Weissmüller G *et al*. Atomic force microscopy as a tool for biomedical and biotechnological studies. *Artif Organs* 2003; **27**: 447–451.
- Santos NC, Castanho MA. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophys Chem* 2004; **107**: 133–149.
- Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Meth Cell Biol* 2002; **68**: 67–90.

DOI: 10.1111/j.1468-3083.2006.02096.x

ANEXO II

Capítulo *Microscopia de Varredura por Sonda e Microscopia de Força Atômica* publicado no Livro *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*.



Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas

Editor: Wanderley de Souza

Antonio Haddad
Antonio Sesso
Gilberto Weissmuller
Gustavo Miranda Rocha
Márcia Attias
Marcos Farina
Maria Cristina Motta
Maria de Nazareth Meirelles
Marina Silveira
Marlene Benchimol
Marlos da Costa Monçores
Maurílio J. Soares
Ortrud Monika Barth
Telma M.T. Zorn
Thais Souto Padron
Ulysses C. Lins
Wanderley de Souza



Microscopia de Varredura por Sonda e Microscopia de Força Atômica

Gilberto Weissmuller, Gustavo Miranda Rocha e Marlos da Costa Monçores - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro

1 - Introdução

O microscópio de tunelamento (STM, do inglês “*Scanning Tunneling Microscopy*”) desenvolvido pelos pesquisadores Gerd Binnig e Henrich Rohrer em 1981 foi o primeiro instrumento capaz de gerar de forma direta uma imagem tridimensional com resolução atômica. A técnica chegou ao conhecimento da comunidade científica em 1982, e, já em 1986, os pesquisadores Gerd Binnig e Henrich Rohrer foram laureados com o prêmio Nobel de física (Binnig *et al.*, 1982). Esta técnica, entretanto, pode ser aplicada somente para estudar a superfície de materiais condutores de eletricidade. Baseados nos mesmos princípios utilizados neste instrumento, Binnig e colaboradores desenvolveram em 1985 o microscópio de força atômica (AFM, do inglês “*Atomic Force Microscopy*”) o qual eliminou a limitação do STM e pode ser aplicada ao estudo de superfícies condutoras ou isolantes (Binnig *et al.*, 1986). A partir da introdução destas duas técnicas, muitas outras análogas foram desenvolvidas e, atualmente nos referimos a este ramo ou família de microscopias como microscopias de varredura por sonda (SPM, do inglês *Scanning Probe Microscopy*).

É bastante conhecida a afirmação: a invenção dos microscópios e dos telescópios estendeu o nosso sentido de visão. No entanto, é importante refletir sobre o significado desta *extensão*: não apenas podemos ver objetos muito pequenos e detalhes de objetos muito distantes, como podemos observá-los em comprimentos de onda diferentes do visível, por exemplo, com Raios-X, ultravioleta ou infravermelho, além de podermos produzir imagens com partículas (elétrons, por exemplo). Com isso, além de obter imagens, podemos analisar a composição química dos objetos, ou ainda, observá-los com propriedades da luz para as quais os nossos olhos são insensíveis, por exemplo, com polarização.

As microscopias de varredura por sonda, de forma análoga, ampliam o sentido do tato para o mundo micro- e nanoscópico (100 μm até 0,1 \AA) e proporcionam novas possibilidades. O tato é um sentido bastante complexo, com o qual podemos mapear a topografia de objetos e, com isso, criar imagens de forma independente da visão. Além disso, o usamos para perceber, por exemplo, a adesividade, a elasticidade e a temperatura de superfícies. Essa nova família de microscopias nos permite perceber e mapear estas propriedades em escalas nanoscópicas e também estende o sentido do tato para mapearmos propriedades às quais somos insensíveis, tais como, propriedades elétricas, magnéticas e ópticas.

Os microscópios de varredura por sonda não usam lentes que desviam feixes de luz ou de elétrons para gerar uma imagem ampliada. O que caracteriza todas as SPMs é o uso de uma pequena sonda que varre a superfície da amostra, mapeando suas propriedades. A sonda é um sensor, cuja extremidade pode ter poucos nanômetros de diâmetro e que, operando próxima à superfície da amostra, mede algum tipo de interação com a amostra. O tipo de sensor e, portanto, de interação medida, define o tipo de SPM. Por exemplo, quando a interação medida é a força entre átomos da extremidade de uma agulha rígida (ponta de prova) e os átomos da amostra, a técnica é denominada microscopia de força atômica; quando a corrente elétrica de tunelamento entre estes átomos é medida, a técnica é denominada microscopia de tunelamento.

Dentre as SPMs, o AFM, a segunda a ser desenvolvida, é a mais simples conceitualmente e também a mais extensamente usada. A sonda usada no AFM consiste de uma haste flexível (cantiléver) de aproximadamente 100-200 micrômetros de comprimento, que contém uma agulha afilada (ponta de prova) montada em sua extremidade livre. O cantiléver pode ser visto como um braço nanorrobótico que pode ser utilizado para realizar diferentes funções, o que confere ao AFM uma grande versatilidade: ao varrer uma superfície leva a obtenção de imagens; ao ser pressionado contra uma superfície e, em seguida, retraído, permite mapear suas propriedades adesivas e elásticas; pode ser modificado quimicamente com a imobilização de grupos funcionais, ou macromoléculas, para medirmos forças de

interações específicas, tais como as de um anticorpo com diferentes antígenos¹; e, finalmente, ele pode ser utilizado para a manipulação das amostras em escala nanométrica.

As medidas de força (elásticas ou de adesão) deram origem à área chamada **espectroscopia de força**, e, quando as medidas envolvem as forças internas que atuam sobre uma única molécula ou as forças de interação entre um único par de moléculas, **espectroscopia de força de molécula única** (SMFS, do inglês *single molecule force spectroscopy*). Estas técnicas podem ser aplicadas ao simples estudo das propriedades das macromoléculas, sem envolver o conceito de microscopia. Entretanto, como a elasticidade e as forças de adesão podem ser mapeadas sobre uma superfície, a partir destas medidas podemos reconstruir imagens que refletem suas propriedades mecânicas ou químicas. Portanto, a espectroscopia de força pode ser considerada uma aplicação especial da microscopia de força atômica e os equipamentos disponíveis no mercado sempre incluem as duas possibilidades: imagens por varredura e medidas de força local.

Neste capítulo, após uma breve introdução aos princípios básicos envolvidos nos microscópios de varredura por sonda, discutiremos em mais detalhe a técnica de AFM, incluindo a espectroscopia de força, e suas aplicações.

2 - A família de Microscopia de Varredura por Sonda

O esquema básico de um SPM é simples, como podemos ver na Figura 1. O elemento principal é a sonda local que interage com a amostra e que, para que tenhamos uma boa resolução espacial, deve possuir uma extremidade bastante afilada. O detector acoplado à sonda medirá diferentes grandezas dependendo do SPM, por exemplo, em um AFM temos um sensor óptico para medir a deflexão do cantiléver e, em um STM, um medidor de corrente. Para realizar a varredura é necessário um sistema de posicionamento lateral (x e y) com alta precisão e, para que a sonda se mantenha próxima à amostra, existe um controle para a altura da sonda (z). O detector da sonda e o sistema de posicionamento vertical (z) devem estar acoplados via um sistema de retro-alimentação, para evitar que a sonda se afaste da superfície ou que a danifique. Além do posicionamento fino é necessário um sistema de posicionamento macroscópico e um sistema para exibir as imagens produzidas. Finalmente, todo o equipamento deve ser protegido contra vibrações mecânicas (mesa anti-vibratória) e acústicas.

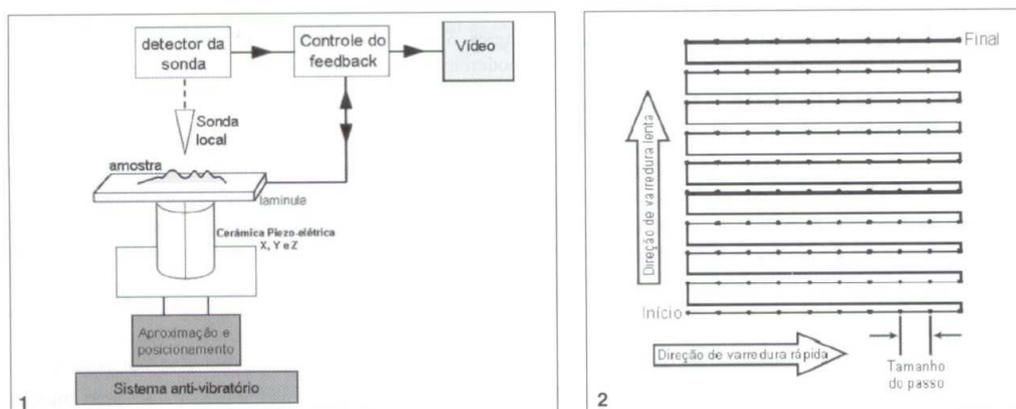


Figura 1: Diagrama de um microscópio de varredura por sonda (SPM). **Figura 2:** Movimento de varredura do posicionador piezo-elétrico durante a aquisição dos dados.

¹ A modificação química da ponta de prova para medir forças específicas sugere ainda a comparação destas técnicas com outros sentidos: olfato e gustação.

Todos os SPM utilizam um posicionador piezo-elétrico para realizar a varredura, isto é, para mover a sonda sobre a amostra (ou alternativamente, a amostra sob a sonda). A Figura 2 mostra o padrão típico de movimento: o posicionador se move através da primeira linha, volta, e é levemente deslocado para cima para iniciar a próxima linha. Se desejarmos uma imagem de 512x512 pixels, a área será varrida com 512 linhas e em cada linha tomaremos 512 medidas com espaçamento regular. Em um SPM os dados são adquiridos sempre na mesma direção de movimento, já que não linearidades do posicionador piezo-elétrico ou mesmo a interação da ponta de prova com a amostra pode provocar pequenas diferenças ao alterarmos a direção de movimento.

Materiais piezo-elétricos são cerâmicas que mudam de dimensões em resposta a uma voltagem aplicada. Reciprocamente, eles também geram diferenças de potencial se forem submetidos a uma pressão mecânica. Um posicionador piezo-elétrico (x, y e z) é construído com três ou mais elementos cerâmicos que se contraem e expandem de forma independente.

A qualidade do posicionador é um fator crítico para a qualidade das imagens obtidas. Os materiais piezo-elétricos são utilizados universalmente nos equipamentos devido à sua grande resolução, que pode chegar a um décimo de Angstrom. Entretanto, a resolução de um elemento piezo-elétrico depende da distensão máxima que ele pode alcançar. Um exemplo encontrado em equipamentos comerciais consiste de uma base que movimenta a amostra nas direções x e y (com resolução de dezenas de Angstroms e amplitude máxima de 100 μm), e um terceiro elemento que regula a altura da sonda (com resolução de frações de Angstrom e amplitude máxima de 16 μm).

Os diferentes tipos de interação entre a sonda e a superfície da amostra determinam os diferentes tipos de microscopias. Citaremos aqui apenas alguns exemplos de SPM já bem estabelecidos:

Microscopia Ótica de Campo Próximo (NSOM, do inglês, *Near-field scanning optical microscopy*): Se a sonda for a ponta muito afilada de uma fibra ótica, nenhum feixe de luz é formado na extremidade. Ao aproximarmos a sonda da amostra, uma pequena quantidade de luz será emitida pela fibra. A luz refletida ou transmitida reflete a interação sonda-amostra, que detectada, fornece informações sobre a superfície.

Microscopia de Força Magnética (MFM, do inglês, *Magnetic force microscopy*): Se a sonda for uma ponteira magnética muito pequena presa a uma mola, ao aproximarmos a sonda de uma amostra também magnética, surgirão forças de repulsão ou atração entre a ponta e a superfície que podem ser detectadas através da medida de deflexão da mola. O contraste obtido reflete as propriedades magnéticas da amostra.

Microscopia de Varredura Térmica (SThM, do inglês, *Scanning thermal microscopy*): Se a sonda for um pequeno termômetro, ao encostarmos a sonda na amostra, poderemos mapear as propriedades térmicas da superfície.

Microscopia de Condutância Iônica (SICM, do inglês, *scanning ion-conductance microscopy*): Se a sonda for um pequeno eletrodo, poderemos mapear a condutância de superfície imersa em eletrólito.

Em todas as técnicas de SPM, as interações são extremamente sensíveis à distância, em alguns casos (por exemplo, no STM) podemos detectar variações de 0,1 Å na distância entre a amostra e a sonda. A alta resolução alcançada é consequência desta sensibilidade e do tamanho das sondas, cuja extremidade pode ser menor que 20 nm (por exemplo, no AFM). A seguir, discutiremos em mais detalhes a técnica pioneira, a microscopia de tunelamento (STM), e na seção seguinte descreveremos a microscopia de força atômica.

2.1 Microscopia de Tunelamento (STM)

Se a sonda for uma fina ponta condutora de eletricidade e estiver suficientemente próxima de uma amostra também condutora, ao aplicarmos uma diferença de potencial entre elas, surgirá uma corrente elétrica de tunelamento. A corrente de tunelamento é um fenômeno previsto pela mecânica quântica e consiste em uma corrente elétrica que surge ao aplicarmos uma diferença de potencial entre dois condutores que estejam muito próximos. Classicamente, se os elétrons não tiverem energia suficiente para pular de um condutor para o outro, nenhuma corrente deve ser

observada, entretanto, mesmo com energias baixas, se a distância entre os dois condutores for menor do que 1 nm, observa-se uma corrente elétrica (de tunelamento).

A corrente de tunelamento (I_t) é proporcional à voltagem (V) aplicada, mas apresenta um decaimento exponencial com a distância (d) entre os condutores:

$$I_t \propto Ve^{-cd} \text{ onde } c \text{ é uma constante característica dos materiais envolvidos.}$$

No STM, o mecanismo de feedback tem a função de manter a corrente de tunelamento constante, através do reposicionamento vertical da ponta de prova condutora durante a varredura (Figura 3). A dependência exponencial entre a corrente e a distância confere ao STM uma resolução não igualada por nenhuma outra técnica.

Para que não ocorra acúmulo de cargas na superfície da amostra, esta deve possuir uma boa condutividade elétrica. A Figura 4 apresenta a imagem produzida pela técnica STM de um fragmento de DNA depositado em uma superfície de grafite (HOPG, *Highly Ordered Pyrolytic Graphite*).

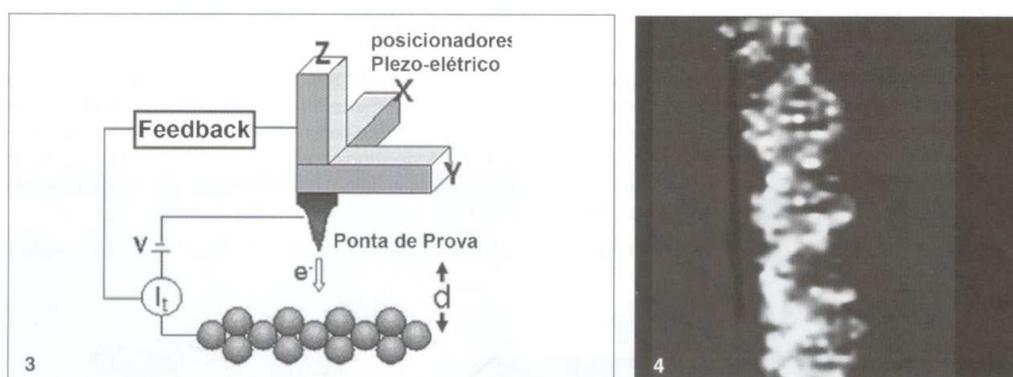


Figura 3: Diagrama de um STM. Figura 4: Imagem STM de um fragmento de DNA depositado sobre grafite (Wolfgang Schonert, GSI - Gesellschaft für Schwerionenforschung).

3 - Microscopia de Força Atômica

A sonda é uma pequena ponta de prova presa a um cantiléver, uma haste flexível que funciona como uma mola (Figura 5a). Ao aproximarmos a sonda da amostra, surgirão forças inter-atômicas repulsivas entre a ponta e a superfície que podem ser detectadas pela deflexão da mola. Esta deflexão, medida por um sensor óptico enquanto a ponta percorre a área que desejamos analisar, reflete a topografia da amostra. A Figura 3b e 3c mostram a imagem de uma semi-esfera rígida de 2 μm de diâmetro com resolução de 20x20 e 512x512 pixels, respectivamente. Durante o processo de varredura, a deflexão do cantiléver é medida e os valores são representados em uma escala de cinza: o valor mínimo é representado pela cor preta e o máximo pela cor branca, o que, dependendo da resolução, permite uma boa representação gráfica da topografia.

Entretanto, a superfície da esfera não foi varrida sempre com a mesma força: quando estamos sobre o centro da esfera, temos a deflexão máxima do cantiléver, e, portanto, uma força máxima. Se a esfera fosse macia, estaríamos deformando mais a região central, ou até mesmo, danificando a amostra com a ponta e prova. Para evitar este problema, usamos o mecanismo de retro-alimentação (*feedback*) entre o posicionador vertical e o sensor óptico de deflexões.

Este mecanismo tem como função, no AFM, retrain ou aproximar o cantiléver da amostra, sempre que a deflexão do cantiléver se alterar em relação a um valor pré-definido. Com isso, pré-definindo um valor pequeno para a deflexão (ou seja, uma força pequena), este valor não será alterado durante a varredura. Agora, os dados que são representados na imagem, são os valores de retração ou aproximação do cantiléver (ou seja, o movimento do elemento piezo-elétrico vertical). Ainda que a pequena força pré-definida provoque uma pequena deformação na amostra, esta será homogênea em todo o campo.

As imagens no AFM são geradas a partir das medidas das deflexões do cantiléver em contato com a amostra durante a varredura. As deflexões são causadas pela forças produzidas a partir da interação entre os átomos da amostra e os da sonda (Binnig et al., 1986). A deflexão do cantiléver é detectada pelo movimento de um feixe de luz (por exemplo, de um laser-diodo), que atinge o cantiléver na sua parte superior, e, através de um espelho, é direcionado à um detector segmentado, como mostra a Figura 6. A diferença de potencial elétrico produzido entre os segmentos **a** e **b** do detector indica quaisquer modificações de curvatura ocorridas no cantiléver. Inicialmente, ajustamos o espelho para que a diferença de potencial $V_a - V_b$ seja nula quando o cantiléver está livre de forças externas (afastado da amostra). Portanto, um valor negativo na diferença de potencial ($V_a - V_b < 0$) indica uma deflexão do cantiléver para baixo, ou seja, uma força atrativa. Analogamente, se o cantiléver se deflexionar para cima, obteremos $V_a - V_b > 0$, o que indica uma força repulsiva.

Esta medida de diferença de potencial pode ser transmitida diretamente para um computador, para a construção de uma imagem, chamada imagem de erro. O sinal $V_a - V_b$ também pode ser transmitido ao mecanismo de *feedback* para regular a posição vertical do cantiléver de forma que este sinal seja mantido constante. Neste caso, o sinal que deve ser transmitido ao computador para a reconstrução da imagem é o deslocamento vertical gerado pelo mecanismo de *feedback*, e a imagem produzida se chama imagem de altura. Estes dois modos de funcionamento são chamados **modo de altura constante** e **modo de força constante**, respectivamente.

Abaixo da amostra se encontra uma plataforma piezo-elétrica, que se movimenta nos planos XY para a varredura lateral e também no eixo vertical z.

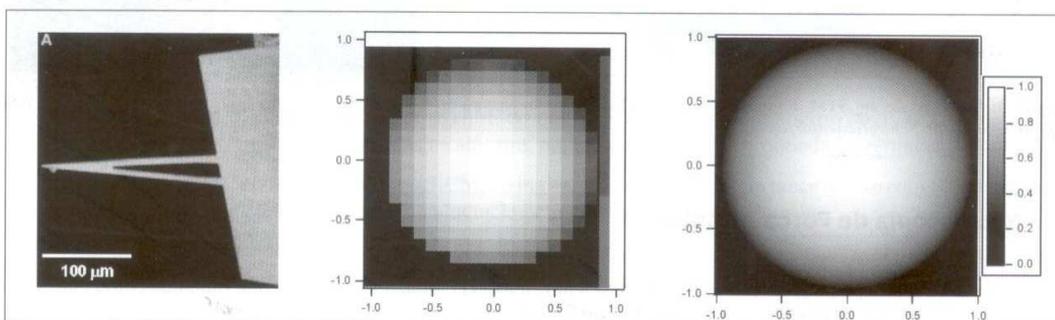


Figura 5 - a) Imagem de um cantiléver por microscopia eletrônica. b) e c) simulações de imagens de AFM de uma semi-esfera rígida de 2 μm de diâmetro em diferentes resoluções: 20x20 e 512x512 pixels.

As dimensões da extremidade da ponta de prova é um fator crucial para a resolução da imagem de AFM. A Figura 7 apresenta dois tipos de ponta de prova, piramidal e cônico, os quais têm a extremidade com dimensões típicas de 50 e 10 nm, respectivamente.

O cantiléver, usualmente constituído de silício ou nitreto de silício, tem comprimento de 100 a 500 micrômetros e espessura de 0,5 a 5 μm , pode ser triangular ou retangular, e, para pequenas deflexões, pode ser considerado como uma mola que obedece a lei de Hooke (figura 8).

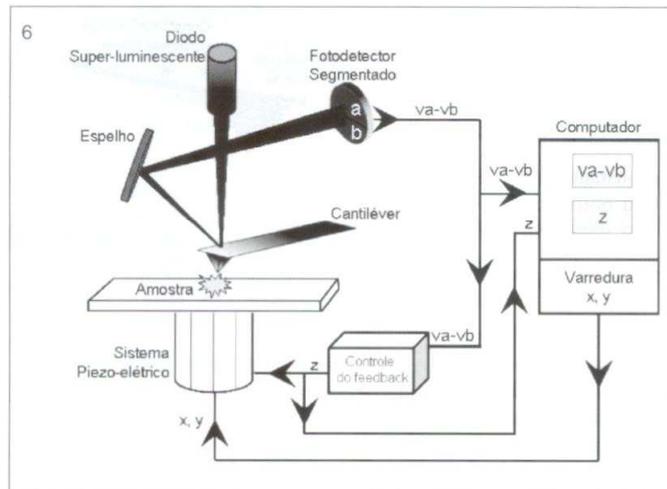


Figura 6: Diagrama geral de um Microscópio de Força Atômica.

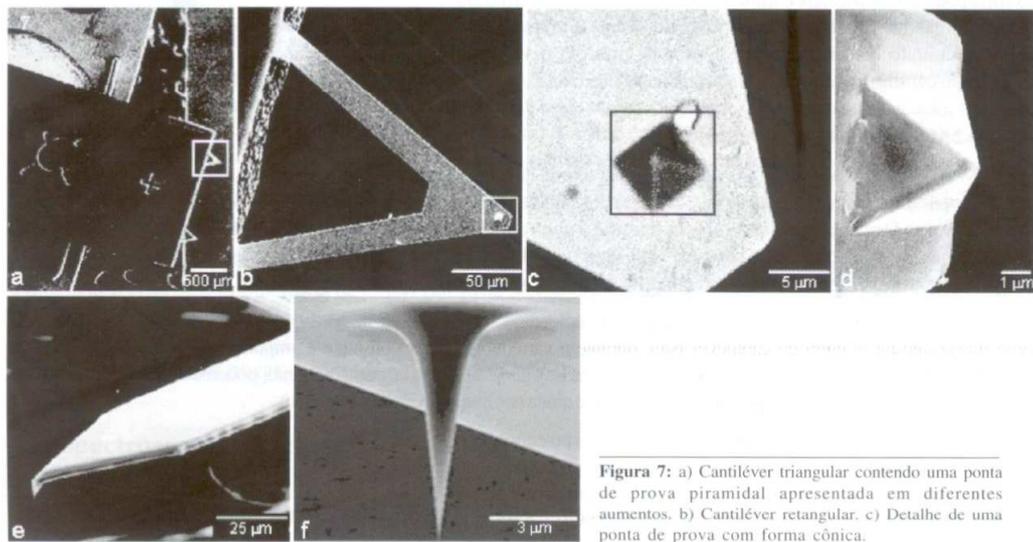


Figura 7: a) Cantiléver triangular contendo uma ponta de prova piramidal apresentada em diferentes aumentos. b) Cantiléver retangular. c) Detalhe de uma ponta de prova com forma cônica.

$\Delta F = k\Delta d$ onde k é a constante elástica da mola e Δd a deflexão do cantiléver. Atualmente encontramos uma ampla faixa de constantes de mola no mercado (0,003 N/m – 100 N/m) e a escolha é feita de acordo com o tipo de amostra; em geral, amostras macias requerem constantes de mola menores.

Além dos modos de altura e de força constantes, definidos pelo uso do feedback, podemos ainda definir outros modos de operação do microscópio, dependendo do movimento que impomos ao cantiléver durante a varredura:

3.1 Modo de contato

A sonda faz um contato suave com a amostra através de um cantiléver de baixa constante de elasticidade para evitar danos à superfície em análise. No modo de contato a ponta de prova nunca se afasta da superfície durante a varredura. Este modo pode ser utilizado para imagens de alta resolução, tais como resolução atômica de cristais inorgânicos ou de cristais de proteína, onde podemos identificar as subunidades protéicas. A força vertical máxima pode ser controlada e minimizada, mas durante a varredura surgem forças laterais que podem provocar danos à amostra. No modo de contato o mecanismo de *feedback* controla o valor da deflexão do cantiléver.

3.2 Modo de contato intermitente

Neste modo, o cantiléver é forçado a oscilar a uma determinada frequência e a certa altura da amostra, de forma a tocá-la periodicamente. Ao ajustarmos a altura para que a interação ocorra durante uma pequena porção do período de oscilação, as forças laterais que surgem durante a varredura são bastante reduzidas, e este modo de operação pode ser usado para a aquisição de imagens de amostras que não estão firmemente imobilizadas em uma superfície, tais como fragmentos de DNA depositados em uma superfície de mica.

A grandeza de interesse, medida com o detector segmentado, é a amplitude de oscilação, e o mecanismo de feedback tem como função ajustar a altura do cantiléver para, durante a varredura, manter constante a amplitude de oscilação. No contato intermitente, uma maior amplitude implica menores forças de interação com a amostra, portanto, podemos minimizar os danos à amostra, ao utilizarmos a maior amplitude de oscilação que ainda permita a obtenção da imagem.

Existem diferentes formas de forçar oscilações no cantiléver. O cantiléver pode ser excitado diretamente por piezo-elétrico acoplado próximo ao seu ponto de apoio, ou por um campo magnético oscilante, se o cantiléver for magnetizado. Para que tenhamos suficiente amplitude, o cantiléver é usualmente excitado em uma frequência próxima à sua frequência de ressonância, a qual depende da sua massa e constante de mola.

3.3 Aplicações

A microscopia de força atômica, apesar de ser uma técnica nova, é considerada bem estabelecida nas diversas áreas em que é utilizada, tais como ciências dos materiais e biologia, pois já trouxe uma quantidade expressiva de resultados relevantes.

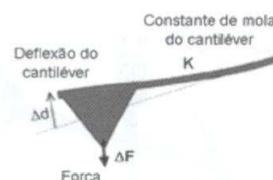
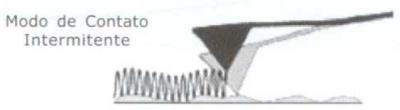


Figura 8 - A força elástica produzida pela deflexão do cantiléver obedece a lei de Hooke.



Os avanços na área biológica foram mais lentos, pois necessitaram do surgimento de métodos especiais, por exemplo, para diminuir a interação entre a ponta de prova e a amostra durante a varredura. Com o surgimento do modo de contato intermitente em 1993, verificou-se um rápido crescimento no número de sistemas estudados. Atualmente, é improvável encontrarmos um ramo da biologia, no qual esta técnica não tenha sido utilizada, ainda que de forma incipiente. Entretanto, devido ao seu potencial, pode-se considerar que as aplicações se encontram em uma fase inicial.

O potencial do AFM para as aplicações biológicas pode ser avaliado pelas exigências na preparação da amostra. Como na microscopia ótica, as amostras podem estar em seu ambiente "natural", imersas em uma solução fisiológica, com temperatura controlada. As condições podem ser alteradas, e os efeitos podem ser registrados em tempo real. Entretanto, como se trata de uma técnica de análise de superfície por varredura, a amostra deve estar imobilizada sobre um substrato, e suficientemente aderida, de forma a suportar a interação com a ponta de prova.

Com isso, conclui-se que cada sistema particular poderá exigir uma preparação distinta, apresentar um maior ou menor grau de dificuldade na aquisição das imagens e permitirá uma diferente resolução máxima. A resolução é fortemente dependente do grau de imobilização da amostra. Superfícies sólidas cristalinas, como a mica, permitem a obtenção de resolução atômica e a superfície extremamente macia de algumas células pode impedir totalmente a aquisição de imagens nítidas de sua superfície. Neste último caso, uma fixação branda com paraformaldeído pode ser empregada para melhorar o contraste.

A qualidade da ponta de prova também é importante para a resolução. Ela deve ter o ápice terminando em 50-20 nm, dependendo da resolução desejada. Durante a varredura de amostras biológicas o ápice pode ser facilmente contaminado, comprometendo a resolução.

Macromoléculas, tais como DNA e polissacarídeos, têm dimensões muito pequenas e, portanto, não podem ser imobilizados sobre uma lamínula de vidro, cuja rugosidade pode ser maior do que o diâmetro da molécula. Para estes fins, o substrato mais utilizado em AFM é a mica, um mineral de baixo custo, composto por camadas cristalinas que, ao serem separadas (clivadas), criam uma superfície atômica plana e totalmente limpa.

A visualização de macromoléculas em escala nanométrica é de suma importância tanto para a pesquisa básica como para aplicações tecnológicas.

Recentemente, nosso grupo tem se dedicado, utilizando a técnica de AFM, a identificar novas estruturas e também correlacionar organelas já descritas por Microscopia Eletrônica no estudo de protozoários patogênicos. Poucos eram os trabalhos já publicados e sua resolução e detalhamentos de estruturas eram escassos (Dvorak *et al.*, 2000). Uma padronização da técnica se fez necessário e após um empenho de nosso grupo, chegamos a um nível de resolução que novas estruturas em escala nanométrica estão sendo descritas (Rocha *et al.*, *in press*).

4 - Espectroscopia de Força

A espectroscopia de força corresponde basicamente ao registro da deflexão do cantiléver durante um ciclo de compressão e distensão do cristal piezo-elétrico que controla a posição vertical do cantiléver. Como mencionamos anteriormente, este procedimento, realizado em um ponto da amostra, possui uma analogia direta com a nossa experiência cotidiana de tocar localmente uma superfície com as mãos. Portanto, podemos conjecturar que informações análogas àquelas que percebemos, elasticidade e adesividade, também possam ser medidas em um AFM. Entretanto, no AFM, coletamos dados cuja interpretação é bastante mais simples do que os dados enviados ao nosso cérebro: uma curva de força, ou seja, uma curva **deslocamento do cantiléver versus deslocamento do posicionador**. Observe que o deslocamento do cantiléver é proporcional à força exercida sobre o cantiléver (lei de Hooke).

4.1 Medidas de forças de adesão

Suponha que a amostra seja rígida e que exista uma força de atração (por exemplo, de origem eletrostática) entre ela e a ponta de prova. Inicialmente, discutiremos todos os processos que ocorrem ao aproximarmos a ponta de prova à amostra. Um esquema das posições do cantilêver durante uma seqüência de aproximação e retração é mostrado na Figura 9.



Figura 9: Posições do cantilêver durante a aproximação com a amostra. A - A sonda não toca a superfície. B - A sonda é atraída pela superfície. C - Após o contato o cantilêver é flexionado pela superfície. D - A amostra e a sonda estão se afastando, mas as forças de atração mantêm o cantilêver preso à superfície. E - A força elástica do cantilêver se torna superior às forças atrativas e o cantilêver se desprende da superfície.

O registro das deflexões do cantilêver durante uma seqüência de aproximação e retração origina a curva **deflexão do Cantilêver versus deslocamento do Piezo-elétrico** (Figura 10). No início do registro a sonda esta longe da superfície da amostra e não ocorrem interações nem deflexões do cantilêver (Posição 1 na Figura 10). Conforme a sonda avança na direção da amostra, podem ocorrer deflexões causadas por interações atrativas ou repulsivas de curto ou longo alcance. Na curva apresentada na Figura 10 é apresentada uma deflexão repulsiva de longo alcance (Posição 2 - cabeças de seta) seguida de uma atração (Posição 2 - seta). Quando ocorre o contato da sonda com a amostra rígida, a deflexão do cantilêver é idêntica ao deslocamento do piezo e a curva torna-se linear (Posição 3). Após o contato, a sonda cessa o avanço e inicia-se a retração. No início da retração, a sonda e a amostra ainda estão em contato (Posição 4). As interações atrativas entre a sonda e a amostra provocam deflexões negativas no cantilêver em relação ao seu ponto de equilíbrio (Posição 5). Quando a força elástica do cantilêver supera a de adesão, isto é, as forças de adesão entre o cantilêver e a amostra rompem-se (Posição 6), o cantilêver volta a sua posição de equilíbrio (Posição 7).

Na posição 5, as forças de adesão são superiores à força elástica do cantilêver, a qual aumenta com a retração do cantilêver. Portanto, a força de adesão corresponde ao valor máximo alcançado pela força elástica.

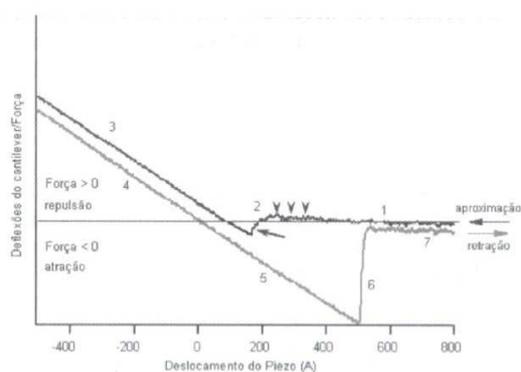


Figura 10: Curva de força típica da interação da sonda com uma superfície rígida. (1) Sonda e amostra afastadas e cantilêver na posição de equilíbrio; (2) deflexões causadas por interações repulsivas (cabeças de seta) ou atrativas (seta) de curto ou longo alcance; (3) contato sonda-superfície da amostra e consequente deflexão do cantilêver; (4) retração do cantilêver ainda flexionado; (5) a retração do cantilêver associado a adesão sonda-amostra, promove uma deflexão negativa no cantilêver; (6) rompimento da adesão sonda-amostra; (7) o cantilêver volta ao ponto de equilíbrio.

4.1.1 Aplicações

Diversas aplicações para as medidas de adesão podem ser encontradas na literatura. A seguir discutiremos alguns exemplos.

- Medidas de adesão celular. Cantilêveres com esferas (vidro ou polímero e 50-100 μm de diâmetro) como ponta de prova podem ser empregados para estudos de adesão celular. A superfície destas esferas permite modificações químicas para simular virtualmente qualquer substrato de interesse. Pode-se também promover o crescimento de uma camada de células sobre elas. Esta esfera modificada quimicamente, ou com uma camada de células, é aproximada e retraída de uma segunda camada crescida sobre o substrato, e as forças de adesão são medidas como descrito acima (Jena & Hörber, 2002).
- Interação receptor-ligante. A modificação química das superfícies da ponta de prova e do substrato para a imobilização de pares receptor-ligante permite estudos de reconhecimento molecular. Para que a interação ocorra de forma a mimetizar o que ocorre quando as moléculas estão livres, é necessária a utilização de espaçadores (*spacers*), como indicado na figura 11. Polietilenoglicol (PEG) e vários outros *spacers* têm sido empregados para o estudo de inúmeros sistemas, tais como, avidina-biotina (Florin et al., 1994), antígeno-anticorpo (Hinterdorfer et al., 1996), Proteína-DNA (Kuhner et al., 2004) e diversas outras proteínas celulares isoladas ou associadas à membrana celular (Kienberger et al., 2006).

Tais experimentos permitem avaliar a afinidade, as constantes de ligação e ainda fornecem dados estruturais sobre o sítio de ligação.



Figura 11: Receptor e ligante imobilizados na ponta de prova e no substrato por meio de *spacers* para medidas de força.

- Mapeamento de receptores. A ponta de prova funcionalizada com ligantes pode ser utilizada para mapear a presença de receptores na superfície celular, levando ao conceito de imagens de reconhecimento molecular.

4.2 Medidas de forças elásticas

O segundo exemplo a ser discutido envolve uma superfície não rígida, a qual cede mecanicamente quando em contato com a ponta de prova. Na posição 3 da figura 10 o cantilêver exerce uma pressão na amostra e a resistência mecânica da amostra determinará o grau de indentação (deformação da amostra). Portanto, amostras com diferentes elasticidades sofrerão diferentes indentações e provocarão diferentes deflexões do cantilêver.

Como mostrado na figura 12, a indentação (δ) é dada pela diferença entre o deslocamento do piezo (Δz) e a deflexão do cantilêver (Δd):

$$\delta = (\Delta z - \Delta d)$$

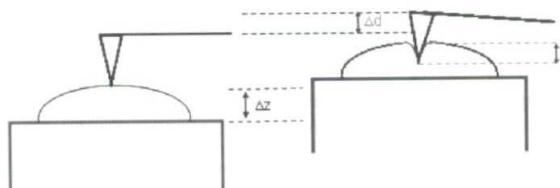


Figura 12: Indentação de uma amostra macia durante a aproximação sonda-amostra.

Para superfícies rígidas, a indentação é nula e a curva de força é linear. Para uma superfície macia, a curva de força reflete para cada deslocamento ΔZ (deslocamento do piezo), a indentação correspondente, como mostrado na Figura 13.

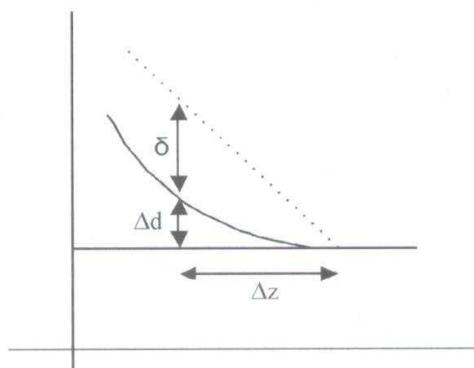


Figura 13: Curva de força obtida com materiais macios.

Todos os sólidos podem ser deformados pela atuação de forças externas, havendo dois tipos principais de deformações: as plásticas e as elásticas. Quando as forças aplicadas não excedem um determinado limite, o material sempre volta ao seu formato original quando estas são completamente removidas. Por essa razão, estas deformações são ditas elásticas. Se as forças externas que produzem a deformação excederem tal limite, não ocorre o desaparecimento completo da deformação, quando da remoção das forças. Este tipo de deformação é dita plástica (Parbhu *et al.*, 1999).

Além da elasticidade e da plasticidade, os materiais podem também apresentar viscosidade, que corresponde a uma resistência ao escoamento. Algumas propriedades mecânicas dos materiais são exemplificadas na Tabela I.

Tabela I – Propriedades mecânicas dos materiais. Fonte: <http://www.unoescjba.rcet-sc.br/~laila/disciplinas/mat.con.civ/capitulo1mat.htm>

Propriedade	Definição	Unidade (SI)
Pressão (stress)	Força/unidade de área (F/A)	Pascal (N/m ²)
Deformação relativa (strain)	Deformação percentual (DL/L)	adimensional
Elasticidade ou Módulo de Young, E	Pressão/deformação elástica	Pascal (N/m ²)
Dureza	Resistência à deformação plástica inicial	Pascal (N/m ²)
Viscosidade	Resistência ao escoamento	Pa.s

A elasticidade de um objeto macroscópico pode ser descrita pela lei de Hooke em termos da deformação relativa e da pressão (Timoshenko & Goodier, 1970). A pressão corresponde ao estresse provocado pela força de deformação aplicada em uma pequena área do material, e a deformação relativa pode ser expressa como uma variação relativa às dimensões iniciais do material,

$$\frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L}$$

Esta relação mostra que a razão entre a deformação relativa e a pressão é igual a uma constante, chamada elasticidade ou módulo de Young (E), e é característica de cada material.

A elasticidade do substrato em uma escala microscópica pode ser determinada com a força aplicada ao sistema pela ponta de prova e pela medida da deformação resultante (indentação). Entretanto, as pontas de prova podem ter diferentes geometrias, sendo as cônicas, parabólicas e esféricas as mais comuns. Para cada forma do indentedor,

encontraremos uma relação diferente entre a força e a deformação, pois a área de contato é distinta. O indentador cônico é a ponta de prova mais comumente encontrada, e apresenta a seguinte relação entre a força aplicada e a indentação:

$$F = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha) \quad (\text{indentador cônico})$$

onde α é o ângulo de abertura do cone e ν é razão de Poisson da amostra. O efeito deste indentador foi estudado por Hertz (1881) e, portanto, o modelo é chamado de “Modelo de Hertz”.

A razão de Poisson é definida como a razão entre a deformação relativa transversal (ortogonal) e a deformação relativa no sentido de alongamento, e traz informação sobre a compressibilidade do material, e determina o quanto o material se estende ortogonalmente ao sentido da força aplicada. Materiais com baixa compressibilidade apresentam valores de ν próximos a 0,5 (Timoshenko & Goodier, 1970; Weisenhorn et al., 1993; Heuberger et al., 1996).

No modelo de Hertz, a estrutura atômica das amostras não é considerada, e é suposto que a matéria seja homogênea e continuamente distribuída por seu volume. Embora os experimentos sejam realizados em uma escala microscópica, esta teoria ainda pode ser usada porque a ponta interage com um grande número de átomos da superfície. Além disso, considera-se a maior parte do volume estudado como isotrópico, ou seja, tem propriedades elásticas semelhantes em todas as direções (Timoshenko & Goodier, 1970).

Como vimos anteriormente, $F = k\Delta d$ onde k é a constante elástica do cantiléver, $\delta = (\Delta z - \Delta d)$ é o Δd deslocamento do cantiléver e Δz é o deslocamento do piezo. Substituindo estas relações na equação anterior, obtém-se uma equação que pode ser usada para o ajuste às curvas experimentais (método dos mínimos quadrados), fornecendo a elasticidade (E) do material.

4.2.1 Aplicações

As deformações mecânicas são, possivelmente, importantes reguladoras de certas funções celulares, incluindo diferenciação, locomoção e adesão. A determinação das propriedades mecânicas de materiais biológicos, tais como células, tecidos e fluidos é importante tanto para os avanços da pesquisa médica, como da pesquisa básica (Tao et al., 1992; Weisenhorn et al., 1993; Radmacher et al., 1995; Vinckier & Semenza, 1998). O AFM tem permitido um interesse crescente na caracterização de propriedades mecânicas de amostras biológicas (Santos & Castanho, 2004; Simon & Durrieu, 2006).

O nosso grupo tem desenvolvido estudos nesta área, por exemplo, pudemos acompanhar pela primeira vez a mudança de rigidez de ovos de *Aedes aegypti* ao longo de sua embriogênese, relacionando-a com outros fenômenos bioquímicos também necessários à formação de embriões viáveis (Moncores et al., in press).

Em outro estudo relatamos uma diferença de rigidez existente entre as partes claras e escuras dos fios de cabelos de pessoas afetadas por pili annulati, uma disfunção de origem genética caracterizada por fios de cabelo com bandas alternadas claras e escuras. Mesmo não havendo diferenças morfológicas evidenciadas por imagens de microscopia eletrônica e microscopia de força atômica, mostramos que há diferença da rigidez entre bandas claras e escuras, sendo que as bandas mais claras são menos rígidas que às escuras. Ainda existe controvérsia sobre os aspectos estruturais dos fios anormais, mas tais resultados ajudam na avaliação dos diversos modelos propostos (Streck et al., 2007).

Referências Bibliográficas

- Binning, G.; Quate, C.F; Gerber, Ch.** Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, v.56, n.9, p.930-933, 1986.
- Binning, G.; Rohrer, H; Gerber, Ch.; Weibel, E.** Surfaces studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, v.49, n.1, p.57-61, 1982.
- Dvorak, j.a.; Kobayashi, s.; Abe, k.; Fujiwara, t.; Takeuchi, t.; Nagao, e.** The application of the atomic force microscope to studies of medically important protozoan parasites. *J Elec Microsc*, v.49, n.3, p.429-435, 2000.
- Florin, e.I.; Moy, v.t.; Gaub, h.e.** Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, v.264, n.5157, p.415-7, 1994.
- Hertz, H.** Über den Kontakt elastischer Körper. *J. Reine. Angew. Mathematik*. v.92, p.156-171, 1881.
- Hinterdorfer, P.; Baumgartner, W; Gruber, H.J.; Schilcher,K.; Schindler, h.** Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc natl acad sci usa*, v.93, n.8, p.3477-81, 1996.
- Jena, B.P.; Hörber,H.** Atomic Force Microscopy in Cell Biology, Academic Press, 2002.
- Kienberger, f.; ebner, a.; gruber, h.j.; hinterdorfer, P.** Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules. *Acc Chem Res*, v.39, n.1, p. 29-36, 2006.
- Kuhner, F.;Costa, L.T.; Bisch, P.M.;Thalhammer, S; Heckl, Wm.; Gaub, h.e.** Lexa-dna bond strength by single molecule force spectroscopy. *Biophys j*, v.87, n.4, p.2683-90, 2004.
- Parbhu, A.N.;Bryson, W.G. ; Lal,R.** Disulfide bonds in the outer layer of keratin fibers confer higher mechanical rigidity: correlative nano-indentation and elasticity measurement with an AFM. *Biochemistry*, v. 38, n.36, p.11755-11761, 1999.
- Radmacher, M.; Fritz, m.; hansma, P. K.** Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. *Biophys J*, v. 69, n.1, p.264-270, 1995.
- Santos,N.C.; Castanho, M.A.** An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophys Chem*, v. 107, n.2, p.133-49, 2004.
- Simon, A.; Durrieu, M.C.** Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. *Micron*, v.37, n.1, p.1-13, 2006.
- Tao, n. J.;lindsay, S. M. & LEES, S.** Measuring the microelastic properties of biological material. *Biophys J*, v. 63, n.4, p.1165-1169, 1992.
- Timoshenko, S.P.; Goodier, J.N.** Theory of Elasticity. Mcgraw-Hill Kogakusha, v.I. 3rd ed, 1970.
- Vinckier, A. & Semenza, G.** Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *Febs Lett*, v. 430, n.1-2, p.12-16, 1998.
- Weisenhorn, a.I.; Khorsandi, m.; Kasa, s.; gotzos, v.; butt, h.-j.** Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*, v.4, p. 103-113,1993.
- Zhong, Q.; Inniss, D; kjoller, k.; Eings, V.B.** Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surf sci leu*, v.290: p.L688-L692, 1993.

ANEXO III

Resolução da equação [5] para d .

$$Kc.(d - d_0) = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha) \cdot [(z_0 - z) - (d - d_0)]^2$$

Portanto:

$$Kc.(d - d_0) = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha) \cdot [(z_0 - d) - (z - d_0)]^2 \quad [6]$$

O termo $\frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha)$ só varia em função da elasticidade, pois é ν e α

são constantes: $\nu = 0,5$ e $\alpha = 37^\circ$, neste estudo. Esse termo será denominado ξ . Assim:

$$\xi = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha). \quad [7]$$

Logo:

$$Kc.(d - d_0) = \xi \cdot [(z_0 - d) - (z - d_0)]^2 \quad \text{ou}$$

$$Kc.(d - d_0) - \xi \cdot [(z_0 - d) - (z - d_0)]^2 = 0 \quad [8]$$

Resolvendo no MAPLE[®] 7 a equação [8] para d , tem-se:

> `solve(kc*(d-d0)- EE*(z0-z-(d-d0))^2, d);`

em que $\xi = EE$ (pois o MAPLE não reconhece o ξ), ou seja,

$$\frac{1}{2} \frac{kc + 2 EE z_0 + 2 EE d_0 - 2 EE z + \sqrt{kc^2 + 4 kc EE z_0 - 4 kc EE z}}{EE},$$

$$\frac{1}{2} \frac{kc + 2 EE z_0 + 2 EE d_0 - 2 EE z - \sqrt{kc^2 + 4 kc EE z_0 - 4 kc EE z}}{EE}$$

ou simplesmente: $d_0 + (z_0 - z) + \frac{k_c \pm \sqrt{k_c^2 + 4\xi \cdot k_c (z_0 - z)}}{2\xi}$

Que também pode ser reescrita da seguinte forma:

$$d_0 + \frac{k_c + 2\xi(z_0 - z) \pm \sqrt{k_c^2 + 4\xi \cdot k_c(z_0 - z)}}{2\xi} \quad [9]$$

Resolvendo a equação estendia: $Kc \cdot (d - d_0) - \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \tan(\alpha) \cdot [(z_0 - d) - (z - d_0)]^2 = 0$

O resultado obtido no MAPLE[®] 7 é:

> solve(kc*(d-d0)-(2/pi)*(E/(1/ni^2)*tan(a)*(z0-z-(d-d0))^2), d);

$$\frac{1}{4} (kc \pi + 4 E ni^2 \tan(a) z_0 + 4 E ni^2 \tan(a) d_0 - 4 E ni^2 \tan(a) z + \sqrt{kc^2 \pi^2 + 8 kc \pi E ni^2 \tan(a) z_0 - 8 kc \pi E ni^2 \tan(a) z}) / (E ni^2 \tan(a)),$$

$$\frac{1}{4} (kc \pi + 4 E ni^2 \tan(a) z_0 + 4 E ni^2 \tan(a) d_0 - 4 E ni^2 \tan(a) z - \sqrt{kc^2 \pi^2 + 8 kc \pi E ni^2 \tan(a) z_0 - 8 kc \pi E ni^2 \tan(a) z}) / (E ni^2 \tan(a))$$

ou simplesmente:

$$\frac{kc \cdot \pi + 4 \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha) \cdot z_0 - 4 \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha) \cdot z + 4 \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha) \cdot d_0}{4 \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha)} \pm \frac{\sqrt{kc^2 \cdot \pi^2 - 8 \cdot kc \cdot \pi \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha) \cdot z + 8 \cdot kc \cdot \pi \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha) \cdot z_0}}{4 \cdot E \cdot \nu^2 \cdot \tan(\alpha)}$$

Como a equação possui duas respostas, é preciso entender o que elas representam. A resposta positiva (+) da equação [9] não tem significado físico, não há nenhuma parte da curva de ajuste que seja ao menos parecida com as curvas reais. Já o resultado negativo (-) da equação [9] representa exatamente o que se quer, podendo ser utilizada como resposta do modelo de Hertz para amostras incompressíveis indentadas por uma ponta piramidal.

ANEXO IV

Programa desenvolvido para documentação e análise automatizada das curvas de força.

Tudo que está comentado digitado em vermelho dentro dos macros após // são apenas comentários, e em nada interferem nos programas.

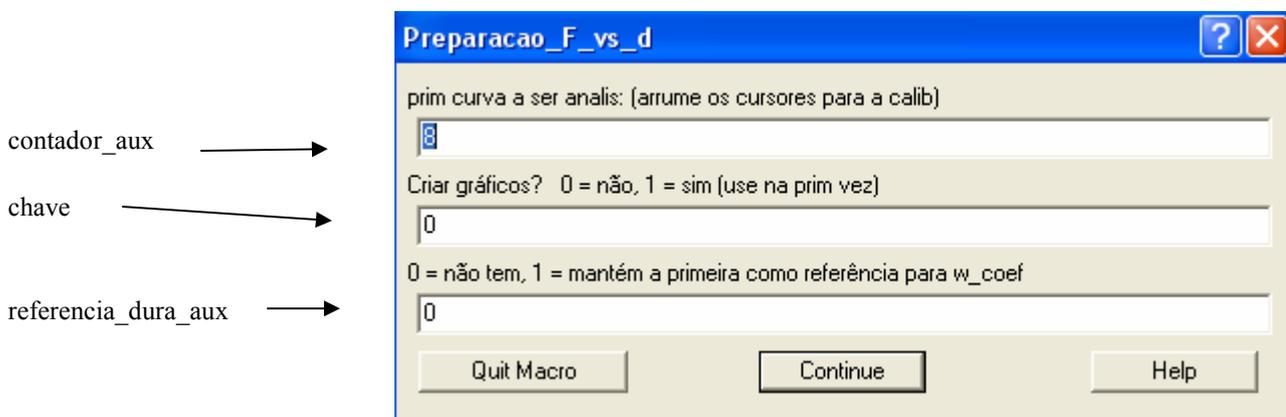
Durante a análise dos dados, com todas as curvas já importadas para o Igor Pro, o **PRIMEIRO** macro rodado é:

```
Macro Preparacao_F_vs_d(contador_aux, chave, referencia_dura_aux)
  variable contador_aux=contador, chave=0, referencia_dura_aux=0 //contador eh uma
                                                                //variavel global (ver lista no inicio), referencia_dura é global
Prompt contador_aux, "prim curva a ser analis: (arrume os cursores para a calib)"
prompt chave, "Criar gráficos? 0 = não, 1 = sim (use na prim vez)"
prompt referencia_dura_aux, "0 = não tem, 1 = mantém a primeira como referência para w_coef"
string aux1, aux2

contador=contador_aux
referencia_dura=referencia_dura_aux
referencia=contador
aux1="F"+num2str(contador)
aux2="B"+num2str(contador)
Duplicate /O $aux1 desloc_cantilF,forcaF, distanciaF //duplica a onda $aux1 ou 2 (é preciso o $
                                                    //para o igor procurar a onda associada ao sting, se nao o igor vai procurar a onda
                                                    //aux1 ou 2, q nao existe). o /O faz com q as ondas q jah existam sejam sobrescritas.
                                                    //Todas as ondas depois do $aux1 ou 2 serao reescritas
Duplicate /O $aux2 desloc_cantilB,forcaB, distanciaB
desloc_cantilF=x
desloc_cantilB=x //muda de acordo com a própria escala da onda
if (chave==1)
  Display/W=(10,50,390,250) forcaF vs desloc_cantilF
  ShowInfo
  Cursor/P A forcaF 300; Cursor/P B forcaF 500
  Label left "\\Z10Força (\\u N ) "; Label bottom "\\Z10deslocamento do piezo (\\u Å ) "
  DoWindow/C windowcursorF
  Display/W=(10,280,390,480) forcaB vs desloc_cantilB
  ShowInfo
  Cursor/P A forcaB 300; Cursor/P B forcaB 500
  ModifyGraph rgb=(0,0,65535)
  Label left "\\Z10Força (\\u N ) "; Label bottom "\\Z10deslocamento do piezo (\\u Å ) "
  DoWindow/C windowcursorB

  Display/W=(405,50,795,250) forcaF vs distanciaF
  ShowInfo
  Label left "\\Z10Força (\\u N ) "; Label bottom "\\Z10distância (\\u Å ) "
  DoWindow/C graph_F_vs_d_F
  Display/W=(405,280,795,480) forcaB vs distanciaB
  ShowInfo
  ModifyGraph rgb=(0,0,65535)
  Label left "\\Z10Força (\\u N ) "; Label bottom "\\Z10distância (\\u Å ) "
  DoWindow/C graph_F_vs_d_B
endif
endmacro
```

Esse macro começa abrindo a seguinte janela, onde é digitado o valor das seguintes variáveis:



Depois a variável *contador* recebe o valor de *contador_aux*; em quanto, a variável *referencia_dura* recebe o valor de *referencia_dura_aux*, e a variável *referencia* recebe o valor de *contador*. Depois são criadas os strings *aux1* e *aux2*, que correspondem aos nomes das ondas F”contador” e B”contador do experimento, por exemplo, F3 e B3.

Em seguida são duplicadas as ondas \$aux1 e \$aux2 (é preciso o \$ para o Igor procurar a onda associada ao sting, F3 e B3 no exemplo anterior, se não o Igor vai procurar as ondas aux1eou2, q não existem). O /O faz com que as ondas que já existam sejam sobrescritas. Todas as ondas depois do \$aux1e2 serão reescritas. Elas são: *desloc_cantilF*, *forcaF*, *distanciaF* no caso de \$aux1, e *desloc_cantilB*, *forcaB*, *distanciaB* no caso de \$aux2.

Em seguida é atribuído às ondas *desloc_cantilF* e *desloc_cantilB* o valor de *x*, que é a escala interna das ondas criadas no experimento, o que corresponde ao deslocamento do piezo.

Se na variável *chave* for digitado 0, nada ocorre, mas se for digitado 1, serão cridas janelas para mostrar os seguintes gráficos *Display/W*; com suas respectivas dimensões; seguidos de seus novos nomes:

forcaF vs *desloc_cantilF* (*Display/W*); (10,50,390,250); *windowcursorF* (*DoWindow/C*)
forcaB vs *desloc_cantilB* (*Display/W*); (10,280,390,480); *windowcursorB* (*DoWindow/C*)
forcaF vs *distanciaF* (*Display/W*); (405,50,795,250); *graph_F_vs_d_F* (*DoWindow/C*)
forcaB vs *distanciaB* (*Display/W*); (405,280,795,480); *graph_F_vs_d_B* (*DoWindow/C*)

Todas essas janelas contêm a função *ShowInfo*, que posiciona os cursores (*Cursor/P A forcaB 300; Cursor/P B forcaB 500*) e escreve as legendas (*Label left "\\Z10Força (\\u N) "; Label bottom "\\Z10deslocamento do piezo (\\u Å) ")*)

Há ainda nos gráficos “*forcaB vs desloc_cantilB*” e “*forcaB vs distanciaB*” a função “*ModifyGraph rgb=(0,0,65535)*”, que zera as quantidades de vermelho e verde da curva mostrada, e maximiza o valor da cor azul.

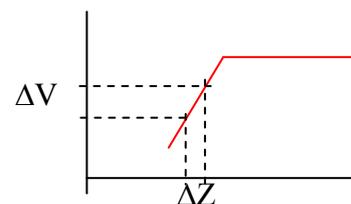
O **SEGUNDO** macro é rodado após serem ajustadas as posições dos cursores:

```
Macro ximo_rior() // ctrl + 7
silent !; PauseUpdate
DoWindow/F windowcursorF
  CurveFit/Q line forcaF(xcsr(A),xcsr(B)) //para transformar em força
  if (contador == referencia)
    referencia_coef = W_coef[1];
  else
    print "mantendo coef angular da ", referencia
  endif
  forcaF=-forcaF*60*1e-10/referencia_coef //W_coef[1]
  CurveFit/Q line desloc_cantilF(xcsr(A),xcsr(B)) /X=forcaF/D
  distanciaF=desloc_cantilF-(W_coef[0]+W_coef[1]*forcaF)
  Print "A onda analisada é a", "F"+num2str(contador)
  ModifyGraph offset={0,-forcaF[50000]} //um número grande= último ponto

DoWindow/F windowcursorB
  CurveFit/Q line forcaB(xcsr(A),xcsr(B)) //para transformar em força
  forcaB=-forcaB*60*1e-10/W_coef[1]
  CurveFit/Q line desloc_cantilB(xcsr(A),xcsr(B)) /X=forcaB/D
  distanciaB=desloc_cantilB-(W_coef[0]+W_coef[1]*forcaB)
  Print "A onda analisada é a", "B"+num2str(contador)
  ModifyGraph offset={0,-forcaB[50000]} //um número grande= último ponto

DoWindow/F graph_F_vs_d_F
  ModifyGraph offset={0,-forcaF[50000]} //um número grande= último ponto
DoWindow/F graph_F_vs_d_B
  ModifyGraph offset={0,-forcaB[50000]} //um número grande= último ponto
//apenas para elasticidade
definir_escala_e_parametros(); DoWindow/F elasticidade
Endmacro
```

O macro acima pode ser executado a partir do atalho do teclado “ctrl+7”. Ele começa com os comandos *silent* e *PauseUpdate*, o primeiro impede que as operações sejam mostradas na linha de comando, aumentando a velocidade do programa, assim como o segundo, que também melhora o desempenho evitando todas as atualizações de gráficos, mostrando apenas a última, que é a que realmente interessa. O processo *DoWindow/F* traz as janelas *windowcursorF* *windowcursorB* *graph_F_vs_d_F* *graph_F_vs_d_B* para frente. Nela é executado o comando *CurveFit/Q line forcaF(xcsr(A),xcsr(B))*, que faz uma curva, em forma de reta, que melhor se ajuste aos dois pontos dados (A e B). Esses pontos são os cursores, e é desta forma que a inclinação da curva é obtida. Como discutido anteriormente, ao realiza-se esse processo numa medida obtida no vidro, que a superfície infinitamente rígida utilizada como referência, obtêm-se a inclinação que deverá ser subtraída das curvas de materiais mais macios. A curva obtida como resultado é característica para cada tipo de elasticidade, e o modelo de Hertz é utilizado para extrair essa informação. Entretanto, essa onda "F"+num2str(contador) vinda do equipamento como $\Delta V \times \Delta Z$ (Voltagem \times Deslocamento do piezo), que até esse ponto do programa tem seu valor na onda *ForçaF*, deve ser transformada para que se obtenha o gráfico Força \times Deslocamento do piezo. Para tanto serão utilizadas as seguintes relações:



$\frac{\Delta V}{\Delta Z} = \text{arcTg}\alpha$, onde $\text{arcTg}\alpha = W_coef$, que será igualado a *referencia_coef* mais adiante.

$$\text{Assim sendo, } \Delta Z(\text{Angstroms}) = \frac{\text{ForçaF}(\text{Volts})}{W_coef}.$$

Utilizando a lei de Hook ($F=k.\Delta x$), obtém-se:

$$F = k(\text{newton / metro}).\Delta Z.10^{-10}(\text{metro}) \longrightarrow F = k. \frac{\text{ForçaF}}{W_coef}.10^{-10}$$

Assim o valor da força já está em Newtons, para melhorar a visualização, a curva será multiplicada por (-1), invertendo a inclinação. O valor de F será colocado na própria onda *ForçaF*. Assim, o próximo passo do programa seria calcular:

$$\text{forcaF} = -\text{forcaF} * 60 * 1e-10 / \text{referencia_coef},$$

Porém, é preciso antes garantir que ao se analisar uma onda de material mole, a curva de referência do vidro seja mantida. Por isso, escolhe-se previamente qual curva do vidro servirá de referência para a análise das curvas macias. Feito isso, deve-se informar (1) no último item do primeiro menu (**prompt** *referencia_dura_aux*, "0 = não tem, 1 = mantém a primeira como referência para *w_coef*") do macro *Preparacao_F_vs_d*. deste modo o passo seguinte do programa é:

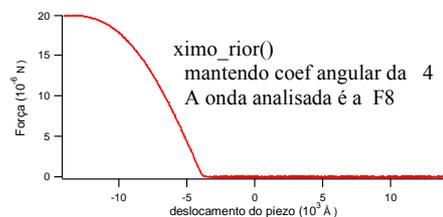
```
if (contador == referencia)
    referencia_coef = W_coef[1];
else
    print "mantendo coef angular da ", referencia
endif
```

Ou seja, apenas no caso inicial, quando o contador for igual à referência, o valor de *W_coef[1]* será colocado em *referencia_coef*, do contrário, sempre será calculado um novo *W_coef[1]*, mas ele não será reescrito no valor de *referencia_coef*, que manterá o coeficiente angular da onda escolhida inicialmente como referência.

Na última linha desse macro:

`definir_escala_e_parametros(); DoWindow/F elasticidade`

O macro: `macro definir_escala_e_parametros()` é rodado.



Para mudar as curvas, utilizo:

```
Macro Pro() // ctrl + 6
contador+=1
string aux1, aux2
silent 1; PauseUpdate
aux1="F"+num2str(contador) //Definir variavel "contador" na linha de comando
aux2="B"+num2str(contador)
print aux1, aux2
Duplicate /O $aux1 desloc_cantilF,forcaF, distanciaF
Duplicate /O $aux2 desloc_cantilB,forcaB, distanciaB

desloc_cantilF=x //muda de acordo com a própria escala da onda
desloc_cantilB=x
Print "ESCOLHA A POSIÇÃO DOS CURSORES !!"
endmacro
```

Com isso, o contador recebe um incremento de +1. A seguir F* e B* recebem também esse mesmo incremento, passando por exemplo de F2 e B2, para F3 e B3. Essas curvas são as experimentais, e ao serem duplicadas em: desloc_cantilF, forcaF, distanciaF e desloc_cantilB, forcaB, distanciaB, modificam os dados que estarão sendo analisados a seguir para os valores das curvas que queremos estudar no momento. Há um *display* na tela do programa que sempre mostra em qual curva estamos, ou seja, o valor do contador que é o mesmo de aux1 e aux2.

A impressão: Print "ESCOLHA A POSIÇÃO DOS CURSORES !!" é interessante para que nunca se esqueça que antes de analisar uma curva é imprescindível que se posicione os cursores na parte reta da curva, a não ser que esteja-se mantendo o coeficiente angular da primeira onda analisada.

```
Macro Ante() // ctrl + 8
contador-=1
string aux1, aux2
silent 1; PauseUpdate
aux1="F"+num2str(contador) //Definir variavel "contador" na linha de comando
aux2="B"+num2str(contador)
print aux1, aux2
Duplicate /O $aux1 desloc_cantilF,forcaF, distanciaF
Duplicate /O $aux2 desloc_cantilB,forcaB, distanciaB

desloc_cantilF=x
desloc_cantilB=x
endmacro
```

esse macro faz com que o contador receba um incremento de -1. portanto, na sequencia F* e B* receberão também esse mesmo incremento, passando por exemplo de F4 e B4, para F3 e B3. Como antes, essas curvas são as experimentais, e ao serem duplicadas em: desloc_cantilF, forcaF, distanciaF e desloc_cantilB, forcaB, distanciaB, modificam os dados que estarão sendo analisados a seguir para os valores das curvas que queremos estudar no momento.

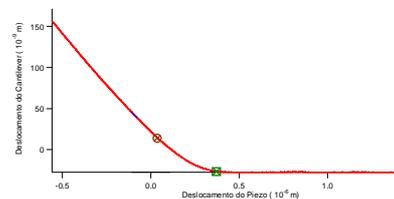
O **TERCEIRO** macro rodado, que é chamado no final do macro: `Macro ximo_rior()` // `ctrl + 7` é:

```
macro definir_escala_e_parametros()
Variable/G zz0, dd0, kc, ni, EE, alfa, alfaRad, b
Make/N=1000/D/O zz, dd, dura
zz0 =0
dd0 =0
kc =60 // arrumando as unidades
ni =0
EE = 0.1 // young's mod em N/m2
alfa =37 // alfa em graus
zz= -(2000)*p/(1000-1)*1e-9 // zz em nm
dura=-zz
arrumando_escalas()
endmacro
```

Esse macro cria e determina o valor inicial de algumas variáveis que serão utilizadas em futuros macros, além de ajustar as escalas para o sistema internacional de medidas (SI), pela execução do macro: `macro arrumando_escalas()` mostrado abaixo:

```
macro arrumando_escalas()
Duplicate/O forcaF forcaF_elast
Duplicate/O desloc_cantilF desloc_cantilF_elast
forcaF_elast /= 60//1e-10
desloc_cantilF_elast /= 1e10 // desloc_cantilF_elast = desloc_cantilF_elast / 1e10
endmacro
```

O **QUARTO** macro é o que fará o ajuste da parte curva (delimitada pelos cursores na figura ao lado) do gráfico. Para isso é necessário posicionar os cursores sobre a curva à ser ajustada, e executar o macro “ajuste”: `macro elasticidade_ajustada00()`



Entretanto, antes de tratarmos do `macro elasticidade_ajustada00()`, vamos entender como funciona a função que ajusta a curva (`Functiont Fdeslocamento_cantilever(w,x)`) que criamos baseados no modelo de Hertz:

`Functiont Fdeslocamento_cantilever(w,x) : FitFunc`

// Função: deslocamento do cantilever em funcao do !!!deslocamento do piezo!!!

```
Wave w
Variable x
WAVE zz,dd
NVAR dd0, kc, ni, alfa, alfaRad, yy
alfaRad = alfa*pi/180
yy = 2/pi*tan(alfaRad)*w[0]/(1-ni*ni) // análogo a  $\xi = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \tan(\alpha)$  equação [7]:
return dd0 + abs((kc - 2*yy*(x - w[1]) - sqrt( abs( (-kc + 2*yy*(x - w[1]))^2 - 4*yy^2*(x - w[1])^2 ) ) )/(2*yy))
End
```

Onde dd_0 é o ponto de contato, kc é a constante de mola do cantiliver, ni é a razão de Poisson, α é o ângulo de abertura do indetador, α_{Rad} é o ângulo de abertura do indetador em radianos, e yy é o *Módulo de Young*, x é Z e $w[1]$ é Z_0 . Esses valores estão referidos na

solução da equação [8]:
$$d = d_0 + (z_0 - z) + \frac{k_c \pm \sqrt{k_c^2 + 4\xi \cdot k_c (z_0 - z)}}{2\xi}$$

```
macro elasticidade_ajustada00()
Res_deslocamento_cantileverF=0
Make/D/N=2/O W_coef, retax, retax
```

```

W_coef = {elast, contato}

FuncFit/X=1/H="00" Fdeslocamento_cantilever W_coef deslocamento_cantileverF[pcsr(A),pcsr(B)] /X=desloc_piezoF_elast /D /R
// /C=T_Constraints
retax = {W_coef[1], min(xcsr(A, "elasticidade"), xcsr(B, "elasticidade"))/1e10} //curva de referencia em 45 graus no
//minimo da ajustada, os cursores devem estar na curva experimental
retay = { dd0, -retax[1]+W_coef[1]+dd0} //y = -(x-w_coef[1])+dd0

SetScale/P x (w_coef[1]),1,"", procuralinhabase /////// acho q realmente faltou
DIVIDIR pelo k do cantilever
//res_forcaF_elast *= 100/forcaF_elast
endmacro

```

O macro “macro elasticidade_ajustada00()” tenta ajustar a função descrita acima à curva experimental. Isso nem sempre é simples, muitas vezes os cálculos travavam por os valores estarem muito distantes. Para resolver esse problema, incluímos três pequenos macros (macro elasticidade_ajustada01(), macro elasticidade_ajustada10(), macro elasticidade_ajustada11()) que resolvem o problema, simplesmente aproximando os valores mantendo uma das duas variáveis ($W_coef[0]$, $W_coef[1]$) com o valor fixo e a calculando apenas o da outra, ou mantendo as duas variáveis fixas. Esses macros são descritos abaixo:

```

macro elasticidade_ajustada01()
Res_deslocamento_cantileverF=0

Make/D/N=2/O W_coef
W_coef = {elast, contato}
FuncFit/X=1/H="01" Fdeslocamento_cantilever W_coef deslocamento_cantileverF[pcsr(A),pcsr(B)] /X=desloc_piezoF_elast /D /R
//////////////////////////////////////////////////elast=w_coef[0]
//W_coef = {1e8,W_coef[0]}
//FuncFit/X=1/H="01" teste W_coef forcaF_elast[pcsr(A),pcsr(B)] /X=desloc_piezoF_elast /D /R
//FuncFit/X=1/H="00" teste W_coef forcaF_elast[pcsr(A),pcsr(B)] /X=desloc_piezoF_elast /D /R
//Res_forcaF_elast=forcaF_elast-fit_forcaF_elast
endmacro

macro elasticidade_ajustada10()
Res_deslocamento_cantileverF=0

Make/D/N=2/O W_coef
W_coef = {elast, contato}
FuncFit/X=1/H="10" Fdeslocamento_cantilever W_coef deslocamento_cantileverF[pcsr(A),pcsr(B)] /X=desloc_piezoF_elast /D /R
endmacro

macro elasticidade_ajustada11()
Res_deslocamento_cantileverF=0
elast=exp(elast_exp)
Make/D/N=2/O W_coef
W_coef = {elast, contato}
FuncFit/X=1/H="10" Fdeslocamento_cantilever W_coef deslocamento_cantileverF[pcsr(A),pcsr(B)] /X=desloc_piezoF_elast /D /R
endmacro

```

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)