



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ANTÔNIO VINNIE DOS SANTOS SILVA

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E
MECÂNICAS DE CÓRNEAS HUMANAS VIA
MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA**

FORTALEZA – CEARÁ

2013

ANTÔNIO VINNIE DOS SANTOS SILVA

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E
MECÂNICAS DE CÓRNEAS HUMANAS VIA MICROSCOPIA
DE FORÇA ATÔMICA**

Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Física da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Bacharel em Física.

Orientador: Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa

FORTALEZA – CEARÁ

2013

ANTÔNIO VINNIE DOS SANTOS SILVA

ESTUDO DAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE
CÓRNEAS HUMANAS VIA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Física da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Física.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Wandemberg Paiva Ferreira
Universidade Federal do Ceará

À minha mãe. Pelo que sou, pelo que fui, pelo que serei...

AGRADECIMENTOS

Agradecimento é, por vezes, um momento bastante injusto. Embora prestamos tributos a muitos que estão na memória, existem aqueles que, de alguma forma, se fizeram importantes. Esquecê-los não significa que foram menos importantes, mas que o exemplo que deixaram teve mais significado que a própria pessoa. Todo meu caráter é formado por pequenos exemplos, que não precisam de nomes porque tiveram significados.

À minha mãe, Miracilda, mais uma vez te agradeço, por ter sempre me dado tudo, mesmo muitas vezes não tendo nada. Mãe, eu te amo à loucura!

À minha família, em especial às minhas tias Mirandir e Miracir, à minha avó Alzira, ao meu pai e aos meus irmãos, Vinicius, Vinêncio e Victor. Todos foram importantes, cada um à sua maneira, dentro dos limites de suas possibilidades. Amo vocês!

À linda Caroline, por ter estado comigo em todos esses anos de minha graduação. Você é muito especial! Qualquer comentário que eu faça não será suficiente para traduzir o significado que você tem para mim.

Ao professor Dr. Jeanlex, pela sua simplicidade e paciência, e também por confiar em mim.

Ao Dr. Evânio Dias Martins, pelo seu desejo em querer descobrir coisas novas. Obrigado por compartilhar isso comigo.

Ao meu amigo de estudo Thiago de Melo Santiago, que, indescritivelmente, me suportou dentro do LMA. Thiago, agradeço por ter me ensinado muito do pouco que sei sobre o AFM. Obrigado por ter compartilhado comigo um pouco do seu profissionalismo e do seu caráter.

À professora Dra. Luciana Magalhães, por ter me ensinado a dar os primeiros passos dentro do LMA.

Ao professor Dr. Eduardo Bedê, pelos ensinamentos e discussões ao longo de todo esse tempo.

Ao meu amigo Holanda, pela companhia durante as disciplinas e a minha primeira viagem para fora do estado, no Encontro de Física, em Foz do Iguaçu-PR (2011). Obrigado pelo seu exemplo de honestidade. Muitas felicidades no seu matrimônio com sua amada esposa Edvânia.

À minha querida amiga Sílvia Heleny Gomes! Obrigado pela sua tão pura amizade.

Aos meus amigos espirituais Izaque Batista e Erlânio Pinheiro, por terem me segurado nos braços quando pensei que fosse cair. Meus queridos, cada um de vocês foi como um pai para mim. Caminho para que um dia tenha o conhecimento de vida que me foi mostrado.

A todos do Senai CET-AFR, em especial a Sílvia e à professora Angélica, por terem me incentivado na minha vocação. Gostaria de lembrar também todos daquela turma de 2004.

À Gisele Lima Albuquerque, pelos conselhos e pela oportunidade de melhorar um pouco quando achava que já era maduro o suficiente. Gisele, você estará para sempre na minha memória. Muitas felicidades com o Amon e sua filhinha linda Brenda. Você é especial!

Ao meu amigo Fellipe Campêlo, pela companhia nas noites de estudo de eletromagnetismo e de quântica, especialmente.

Aos meus companheiros de turma, de 2008.1 e de 2009.1 (quando transferi para o bacharelado). Em especial ao Marcos Aurélio, pelo seu exemplo de força e coragem. Dedico também aos amigos Jorge André, Diego Rabelo, Jorge Luiz (Capuã), Paulo Victor e Paulo Ricardo pela companhia e ajuda nos momentos de estudo mais difíceis.

A todas as famílias vítimas da tragédia de Santa Maria-RS. Rezo para que todos sejam saciados no desejo de justiça.

A todos da Pró Reitoria de Assuntos Estudantis – PRAE da UFC, pelo comprometimento e convivência com todos os estudantes residentes desta universidade.

Por fim, agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, pelo profissionalismo e comprometimento comum de tornar este departamento cada vez melhor. Em especial gostaria de lembrar os professores Gomes, Raimundo, Ramos, Wandemberg e Ayala, pela dedicação especial que concedem aos estudantes de graduação.

Ao CNPq e à Funcap pelo suporte financeiro.

"A diferença fundamental entre o homem comum e o guerreiro, é que o guerreiro encara tudo como desafio, enquanto o homem comum encara tudo como bênção ou maldição."

Carlos Catañeda

RESUMO

No presente trabalho, as propriedades morfológicas do tecido da córnea são investigados por meio de microscopia de força atômica. Em particular, os tecidos de córnea de seres humanos de 20 e de 60 anos de idade são comparados a fim de esclarecer a dependência em relação à idade. A córnea normal é uma estrutura avascular em camadas, em que o epitélio e o endotélio rodeiam o estroma central. As secções transversais das partes central e periférica da córnea foram examinados a fim de estudar as diferenças entre estas regiões e as respectivas camadas, em especial a do estroma, que é responsável por 90% da espessura da córnea. Mostramos também algumas curvas de força que foram obtidas. Elas mostram a rigidez do tecido ao qual as sondas foram utilizadas. O uso do AFM para esse fim foi uma tarefa difícil devido ao grande número de fibras que ocorrem principalmente na parte central. Na literatura, sabe-se que a córnea (normal) tem uma estrutura anisotrópica de fibras de colágeno, mas o arranjo destas fibras não é ainda bem compreendido. Os resultados do presente estudo mostram a existência de fibras que estão arranjadas em forma de "Y", em que uma fibra parece dar origem a outros. Nosso estudo se torna importante na medida em que contribuímos para o entendimento da formação fibrilar da córnea, que está intimamente relacionada com a sua transparência.

Palavras chave: Córnea; Fibras de Colágeno; AFM; Force Plot; Curvas de Força.

ABSTRACT

In the present work the morphological properties of the corneal tissue are investigated by means of Atomic Force Microscopy. In particular, the corneal tissues of 20 and 60 years old human beings are compared in order to shed light on the dependence on the age. The normal cornea is a layered, avascular structure in which an outer epithelium and an inner endothelium surround the central stroma. The transversal cross-sections of the central and peripheral parts of the cornea were examined in order to study the differences between these regions and their respective layers, especially the stroma, which is responsible for 90% of the thickness of the cornea. Some show of force curves were obtained. They show the stiffness of the tissue to which the probes were used. However AFM imaging was a difficult task due to the large number of fibers occurring especially in the central part. In literature it is known that the (normal) cornea has an anisotropic structure of collagen fibers, but the arrangement of these fibers is still not well understood. The results of this study show the existence of fibers which are arranged in a "Y", wherein a fiber seems to give rise to another. Our study becomes important in that contribute to the understanding of corneal fibril formation, which is closely related to its transparency.

Keywords: Cornea; Collagen fibers; AFM; Force Plot; Force Curves.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. A CÓRNEA	18
2.1. Anatomia da córnea.....	20
2.2. Fisiologia da córnea.....	21
2.3. Propriedades biomecânicas da córnea.....	23
3. O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA	25
4. MEDIDAS DE FORÇA	28
4.1.1. Uma breve introdução à reologia.....	28
4.1.1.1. Tensão de cisalhamento	31
4.1.1.2. Taxa de cisalhamento.....	32
4.1.1.3. Force Volume	33
5. O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA E AS PESQUISAS COM FIBRAS DE COLÁGENO	37
6. METODOLOGIA	41
6.1. Obtenção e preparação das amostras.....	41
6.1.1. Obtenção das Imagens.....	41
6.1.2. Medidas de Elasticidade.....	42
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
7.1. Análise Morfológica.....	43
7.2. Curvas de Força	53
8. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Formação hierárquica do colágeno desde sua composição molecular à formação do tecido. Retirado de SILVER *et. al.*, 2003.----- 19
- Figura 2. Molécula de tropocolágeno, com duas cadeias. Essas cadeias estão enroladas em hélice, unidas entre si por pontes de hidrogênio. Retirado de: <http://biologia.ifsc.usp.br/>----- 19
- Figura 3. Corte transversal da córnea humana. Adaptado de FARJO *et al.* (2008).----- 20
- Figura 4. Sistema ao qual a córnea está sujeita. Ela atua como uma barreira que estabiliza o conjunto de forças atuante, especialmente a pressão intraocular. Retirado de FARJO *et al.* (2008).----- 22
- Figura 5. Ilustração do princípio básico de funcionamento do AFM. O *cantilever* tem seu movimento acompanhado por um *laser*. Devido a irregularidades da superfície, ocorre uma variação em z, que é registrada pelo fotodiodo. Adaptado de <http://garnogroup.lsu.edu>----- 26
- Figura 6. Imagem feita no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) das sondas de AFM. A *tip* em (A) é para o modo intermitente (*tapping mode*) e em (B) para o modo contato (*contact mode*). Retirado de Veeco, Force Imaging. Support No. 228, Rev. E (1999). ----- 27
- Figura 7. Deformação de um corpo sólido à ação de uma tensão τ .----- 30
- Figura 8. Em (a) temos uma camada de determinado material, quando, em (b), ocorre o cisalhamento devido à tensão τ . Retirado de: <http://www.freedom.inf.br>.----- 32

Figura 9. Em (a) tem-se uma baixa taxa de cisalhamento provocada pela tensão aplicada, o que produz um deslocamento relativo entre as placas. Em (b) ocorre uma alta taxa de cisalhamento sob as mesmas condições, reduzindo-se apenas a espessura da camada do material cisalhado. Retirado de: <http://www.freedom.inf.br>.----- 32

Figura 10. Analogia da indentação da ponta da sonda sobre a amostra. Na figura ocorre uma penetração δ . Retirado de <http://www.physics.uwo.ca>.----- 33

Figura 11. Em (a) temos curvas de força para indentações em (b) numa amostra macia e outra amostra rígida. Observe que para a amostra rígida somente a sonda deflexiona, tendo-se uma curva de força linear. Na amostra macia, existe uma compensação entre a deflexão do *cantilever* e a amostra. Retirado de: REBELO, 2007.----- 34

Figura 12. Diferentes curvas de forças para amostras com características reológicas distintas. Retirado de REBELO, 2010.----- 35

Figura 13. Ilustração da movimentação da sonda no plano x-y e indentação em z. Retirado de Veeco, Force Imaging, Support Note No. 228, Rev. E (1999).---- 35

Figura 14. Nas figuras temos duas ilustrações de experimentos feitos com fibras de colágeno separadas. Ilustrações retiradas de GRAHAM *et. al.*, 2007 e RIJT *et. al.*, 2006, nesta ordem. Em ambos os trabalhos os autores utilizaram cola do tipo epóxi para fixar as fibrilas à superfície e à sonda do AFM. Em seguida, o *cantilever* exerce uma força, tensionando cada fibrila individualmente..----- 37

Figura 15. (A) Imagem de MEV mostrando o cantiliver sem ponta. (B) No esquema é mostrado como o experimento foi realizado, em que a sonda seria posta a pressionar em diferentes pontos da fibra. (C) Imagem de MEV mostrando uma fibra isolada sobre o PDMS. No detalhe em (C) pode-se notar

uma periodicidade, conhecida na literatura como “periodicidade em D”, que são volumes formados devido ao entrelaçamento das fibrilas. Retirado de YANG et. al., 2007.-----	39
Figura 16. Em 16A temos uma imagem de MEV mostrando a lesão irregular na fibrila. Em (B) temos uma ilustração esquemática do experimento. Retirado de WENGER et. al., 2007.-----	40
Figura 17. Processo de preparação das amostras para análise no AFM. Da esquerda para a direita vemos desde quando cortamos as lamínulas no formato das partilhas de metal, passando pela retirada da parafina e reidratação até o momento em que temos tudo pronto para a varredura no microscópio.-----	41
Figura 18. Imagens do estroma no modo intermitente. Em (a) é possível observar a presença de gomos ao longo das fibrilas; em (b) numa área maior vemos as fibras estando arranjadas paralelamente entre si; já em (c), aproximadamente observamos novamente o aspecto anisotrópico.-----	44
Figura 19. Imagem feita no modo intermitente da região estromal da córnea de um indivíduo de 20 anos. É possível observar as formações em “Y”.-----	45
Figura 20. Imagem de uma córnea de 60 anos da região periférica, no modo <i>tapping</i> , com a sonda varrendo a 1 Hz numa área quadrada de 25 µm de lado---	46
Figura 21. Em (A) vê-se manchas que talvez não seja fibrilas, caracterizando-se por um material viscoso composto por colágeno. Em (B) destacamos regiões com fibrilas de tamanhos diferentes, que “nascem” das regiões de mancha.-----	46
Figura 22. É notável a presença de manchas e fibras isoladas. A imagem foi feita sob varredura de 0,5 Hz num quadrado de lado 2,62 µm. As setas indicam formações fibrilares que se originam a partir de estruturas maiores.-----	47
Figura 23. Capturada com área de 2,6 µm de lado e frequência de 0,5 Hz. A	

imagem de fase deixa evidente as disposições paralelas entre algumas fibrilas.-	47
Figura 24. Região quadrática lado de 10,45 μm de lado do estroma corneano de um paciente de 60 anos. A frequência de varredura utilizada foi de 0,63 Hz.----	48
Figura 25. Região com área quadrática de 1,27 μm de lado. A frequência com a qual a sonda varreu foi de 0,46 Hz.-----	49
Figura 26. <i>Zoon online</i> da região de se evidencia os “dentes”. Os gomos indicados pelas setas são outra forma importante. A área da imagem é de um quadrado de 580 nm de lado, varrida numa frequência de 0,46 Hz.-----	50
Figura 27. Imagem mostrando as ramificações existentes nas fibras colágenas da córnea. A organização em “Y” das fibras é bastante evidente.-----	50
Figura 28. Seção transversal de uma córnea de 60 anos mostrando o diâmetro de uma das fibrilas, que foi de 69,990 nm.-----	51
Figura 29. Os gomos estão igualmente espaçados, o que reforça a tese de um equilíbrio estável. Retirado de YAMAMOTO <i>et. al.</i> (2000).-----	52
Figura 30. Imagem das fibrilas de colágeno com as medições da periodicidade em D e os diâmetros fibrilares para uma córnea de 60 anos.-----	52
Figura 31. Curvas de força para a córnea de 60 anos usando-se uma sonda de 0,02 N/m. A tabela se refere às indentações com <i>triggers</i> diferentes.-----	55
Figura 32. Curvas de força para o tecido de 20 anos utilizando um <i>cantilever</i> de 0,57 N/m. Na tabela correspondente às curvas de força conseguimos obter apenas valores do módulo de Young para um <i>trigger</i> de 50.-----	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Na literatura encontramos diferentes valores para o módulo de Young da córnea, que varia de acordo com o modo no qual a amostra foi preparada bem como a técnica de medição. ----- 24

Tabela 2. Valores para a periodicidade longitudinal e o diâmetro de fibrilas de colágeno de acordo com diversas técnicas. Extraído de: MELLER et. al. (1996). ----- 54

1. INTRODUÇÃO

A córnea é importante componente da superfície ocular, sendo, juntamente com a esclera, a camada mais externa e resistente do olho. O tecido corneano é avascular, localizado na parte frontal do globo ocular. É composto por quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Sendo o estroma corneano é a camada mais espessa. Lembrando que a córnea possui espessura central de 0,52 mm e periférica de 0,65 mm (BELFORT; KARA, 1996). Como as camadas têm espessura entre 4 e 12 micrometros, vemos que o processo de descamação é necessário para que o presente estudo se torne viável.

Vários problemas oftalmológicos estão associados a anomalias na córnea, entre eles está o ceratocone, que ocorre devido à curvatura excessiva do tecido corneano, o que resulta no astigmatismo. Esse encurvamento provoca um erro refrativo (e, portanto, da principal função corneana), podendo ser percebido quando um indivíduo tem a visão distorcida.

Com o AFM também é possível investigar as propriedades mecânicas em micro-escala. Um microscópio de força atômica é formado por um conjunto de instrumentos compostos basicamente de sonda sensora e cerâmica piezométrica utilizadas para posicionar a amostra em relação à sonda, circuitos de realimentação para o controle da posição vertical da sonda e um computador para realizar a movimentação dos scanners de varredura, armazenar os dados extraídos nas medidas e os converter em imagens. Além de produzir imagens topográficas, o AFM também é capaz de investigar as propriedades mecânicas e outras características fundamentais de materiais complexos, tais como aderência e elasticidade locais, interações magnéticas e eletrostáticas (BHUSHAN, 2004).

As propriedades elásticas de um material são descritas primariamente pelo parâmetro conhecido como Módulo de Young, cujo valor informa a dureza do material. Quanto maior, mais rígido é o material. Em se tratando da córnea, elas precisam ser flexíveis para que se ajustem ao peso das pálpebras quando os olhos estão fechados, mas que rapidamente recupere sua forma original quando os olhos estão abertos. Esta perda da capacidade de reassumir a forma original pode ser entendida como um enrijecimento do tecido corneano.

Mais especificamente, o AFM consiste numa adequada ferramenta para fazer medidas de elasticidade de amostras delicadas como amostras biológicas, pois é capaz de aplicar forças da ordem de picoNewtons sobre as amostras de forma bastante controlada

(ZANETTE, 2010). Basicamente, este equipamento fornece dados da altura (z) do *cantilever* e de sua deflexão (d), com os quais é possível fazer gráficos de força z versus d .

Considerando-se que a deflexão do *cantilever* assemelha-se a deformação de uma mola, pode-se obter a força que a superfície faz sobre o *cantilever* como $F = k (z-z_0)$, onde k é a constante de mola do *cantilever* (fornecida pelo fabricante), e z_0 é a altura na qual o *cantilever* toca a amostra (SANTOS, 2012).

Com a curva $F \times z$, é possível utilizar o modelo de Hertz para extrair os dados de elasticidade (módulo de Young) da amostra. Esta técnica consiste em indentar a amostra com o *cantilever*, e colocar o *cantilever* para oscilar com uma frequência conhecida (sem perder contato com a amostra).

2. A CÓRNEA

A córnea é a principal superfície refrativa do olho, correspondendo a 2/3 do poder óptico total. O tecido corneano possui forma elíptica e, conforme podemos presumir a partir de sua dioptria, tem como função essencial assegurar a transmissão da luz para a retina. É composto principalmente por colágeno na forma de fibras, onde sua estrutura é formada a partir do entrelaçamento destas. A organização fibrilar constitui fator importante na transparência da córnea. Além de sua transparência intrínseca – a qual foi alvo de intenso estudo – o tecido corneano exerce papel importante no que diz respeito à proteção do globo ocular contra choques mecânicos. A sensibilidade da córnea é o maior fator de proteção da superfície do olho. A oclusão das pálpebras, bem como a retração do bulbo ocular e ao prolapso da glândula da terceira pálpebra (também conhecido por “*Cherry Eye*”), formam um conjunto de reflexos fundamentais que se iniciam quando a córnea é tocada ou lesionada (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

A córnea é composta essencial por colágeno e seus variantes. Ao todo, há 25 tipos de colágeno que vão formar diversos tipos de estrutura, presente exclusivamente nos mamíferos (num indivíduo, em média, corresponde de 25 a 35% das proteínas do corpo). No tecido muscular o colágeno constitui de 1 a 2% do total. No ser humano a concentração é ainda maior: 66% do total de proteínas (KADLER, 1994).

O colágeno possui uma organização que vai desde a dimensão molecular à composição fibrilar, de modo que a estrutura final é um tecido avascular, porém bastante ramificado. Existem 25 tipos de colágeno identificados (SUN et. al., 2002), que podem ser encontrados em dois tipos de estruturas: fibrilar e as estruturas não-fibrilares de conformação. O colágeno na forma fibrilar compreende os tipos I, II, III, V e XI (SILVER et. al., 2003) – o tipo I é o mais abundante, sendo encontrado em quase todo o corpo humano (LEE et. al., 2001). A formação dessas fibrilas de colágeno é caracterizada por uma montagem hierárquica de subestruturas (Figura 1).

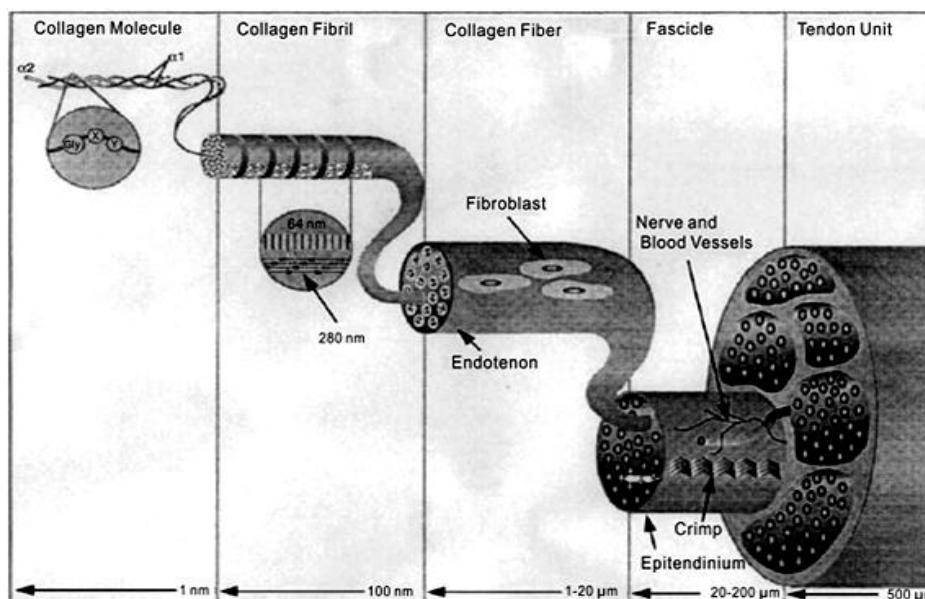


Figura 1. Formação hierárquica do colágeno desde sua composição molecular à formação do tecido. Retirado de SILVER *et. al.*, 2003.

Neste arranjo hierárquico, as moléculas de colágeno, que consistem em três cadeias polipeptídicas, unem-se em fibrilas com diâmetros de 10 - 500nm. A união das fibrilas origina estruturas maiores: as fibras de colágeno, que por sua vez, através dos proteoglicanos, originam o tecido. Os proteoglicanos são estruturas proteicas menores que têm a função de ligar as cadeias fibrilares maiores.

O colágeno, proteína que compõe as fibras, é resultado da polimerização de uma unidade – o procolágeno – que se transforma no espaço extracelular em tropocolágeno. Abaixo segue uma ilustração. Cada feixe com 280 nm de extensão forma uma molécula de tropocolágeno, que é formado por duas cadeias peptídicas que se ligam por pontes de hidrogênio. A cada 8,6 nm uma cadeia completa um ciclo (BELFORT; KARA, 1996).

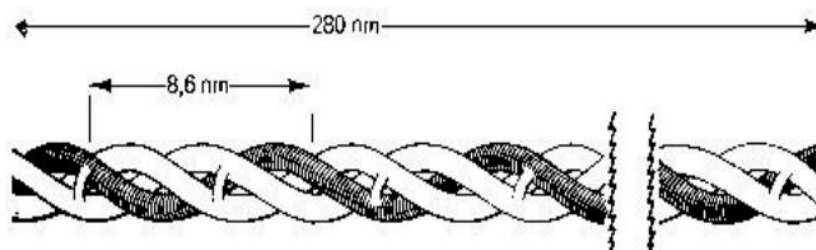


Figura 2. Molécula de tropocolágeno, com duas cadeias. Essas cadeias estão enroladas em hélice, unidas entre si por pontes de hidrogênio. Retirado de: <http://biologia.ifsc.usp.br/>

Substâncias glicídicas funcionam como adesivos, formando, então, feixes com 50 μm ou mais de diâmetro. É válido ressaltar que temos fibras que variam de 1,5 nm a 50 μm de espessura. Assim, dentro de uma mesma imagem podemos identificar diversas fibras com os mais variados tamanhos.

Na literatura, os trabalhos com colágeno se concentram em sua maior parte no estudo das propriedades mecânicas das fibrilas individualmente. Neste estudo trabalhamos na análise do tecido inteiro, dando ênfase à parte central: o estroma. A seguir, detalhamos como foi feito todo o procedimento de preparação das amostras.

2.1. Anatomia da córnea

A espessura corneana varia da parte central à borda, sendo maior na periferia. Além disso, a córnea é composta por cinco camadas (em geral nos mamíferos): epitélio, membrana Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 3). A conformação dessas camadas se faz necessária na medida em que proporciona uma regularidade estrutural e metabólica (SAMUELSON, 2007).

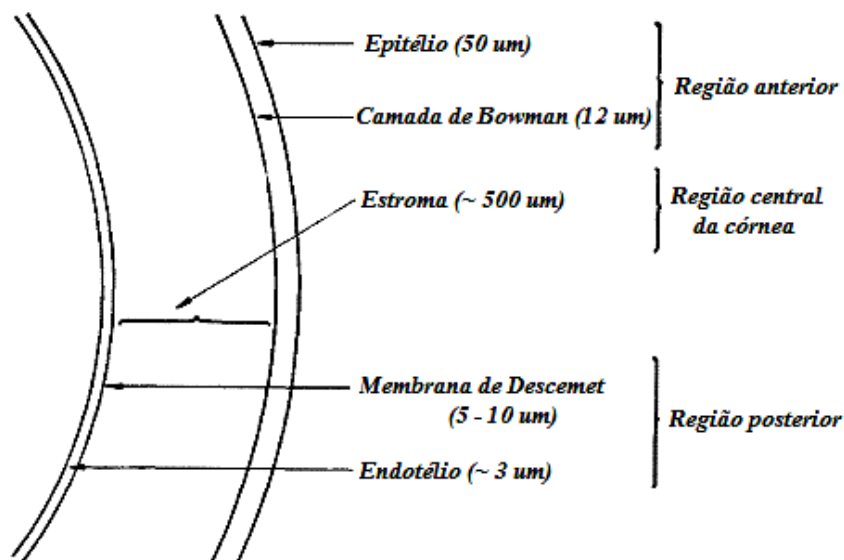


Figura 3. Corte transversal da córnea humana. Adaptado de FARJO *et al.* (2008).

O epitélio, camada inicial, corresponde a 10% da espessura total da córnea, e é uma região bastante coesa, sendo mantida pelos desmossomas e hemidesmossomas. A segunda camada, chamada a membrana de Bowman, é uma estrutura acelular formada por

fibras de colágeno do tipo 1 e que estão organizadas de forma relativamente densas. Ao contrário do epitélio, a membrana de Bowman não se regenera no caso de lesão. A terceira camada, talvez a mais importante no que se refere às propriedades mecânicas da córnea, é a camada que ocupa maior parte do tecido corneano, perfazendo um total de 90% da espessura. Similarmente à membrana de Bowman, o estroma possui grande concentração de fibras de colágeno relativamente compactadas, que são intercaladas por estruturas menores responsáveis pela coesão das ligações fibrilares, os proteoglicanos (BOOTE ET AL., 2003). Já a membrana de Descemet trata-se de uma estrutura amorfa, isto é, não possui uma organização fibrilar bem definida. Todavia, contém propriedade elástica importante para as características biomecânicas da córnea. Um fato interessante é que a espessura da membrana de Descemet aumenta com a idade. Por fim, o endotélio corneano, camada mais interna, é composto por células planas em formato de hexágono. A quantidade de células sofre uma regressão com a idade. O endotélio desempenha uma função relevante na manutenção da hidratação da córnea.

2.2. Fisiologia da córnea

O tecido corneano desempenha papel de proteção à visão, bem como contribui de forma crucial para a formação de imagens sobre a retina. A córnea é composta essencialmente por um conjunto formado por diferentes tipos de colágeno. Este, aliás, compõe basicamente todo o corpo humano, tendo, entre outras funções, a de sustentação e elasticidade da pele. Relativamente aos outros tipos de colágeno, o do tipo II (o qual compõe a córnea), confere à córnea um módulo de Young baixo, da ordem de 2,76 – 27,5 MPa (HJORTDAL, 1996). Dessa forma, a córnea se mostra uma estrutura de proteção importante principalmente devido a sua sensibilidade, em que reações naturais desencadeadas protegerão o globo ocular de uma possível lesão (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

A córnea também é responsável, juntamente com a esclera, por manter estável a forma do globo ocular, uma vez que se interpõe à pressão intraocular.

À forma como se estabelece o arranjo estrutural das fibras de colágeno está associada a sua transparência. Todavia, a córnea está diretamente ligada aos demais componente do globo ocular, tais como o filme lacrimal, o humor aquoso, a pressão intraocular e as pálpebras (Figura 4). Assim, qualquer patologia pode provocar danos a

estrutura da córnea, os quais poderão causar perda de sua transparência (GUM; GELATT; ESSON, 2007).

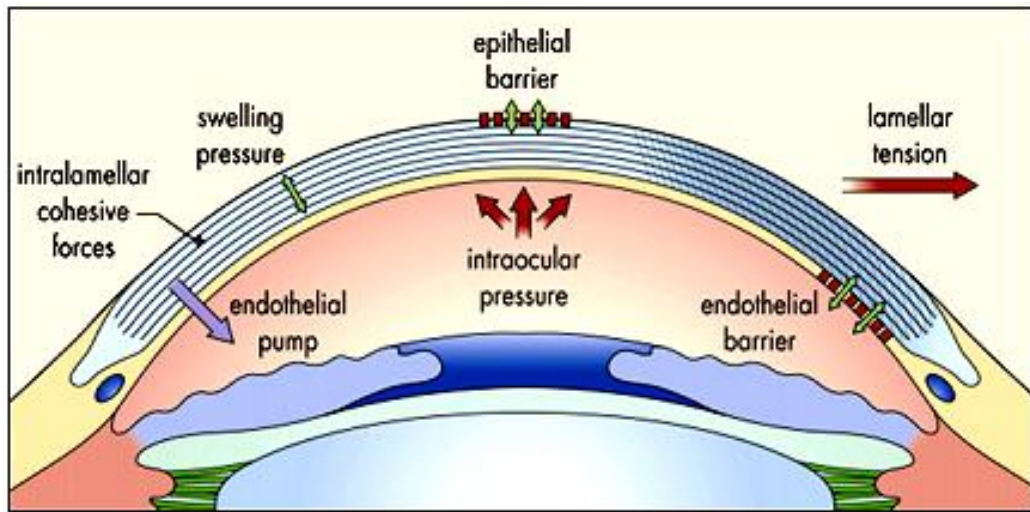


Figura 4. Sistema ao qual a córnea está sujeita. Ela atua como uma barreira que estabiliza o conjunto de forças atuante, especialmente a pressão intraocular. Retirado de FARJO *et al.* (2008).

A eficiente transmissão de luz feita pela córnea é atribuída à sua organização estrutural, bem como à acelularidade e ausência de vasos. Interessante citar que a ausência de vascularização ocorre devido ao fato de o tecido corneano ser demasiadamente compacto, o que impede que os vasos o penetrem. Além disso, o estroma secreta uma substância que inibe o crescimento vascular (FARJO *et al.*, 2008).

A transparência da córnea sempre intrigou pesquisadores. Anos de estudos destacaram duas teorias que explicam essa propriedade fundamental. A primeira, conhecida como teoria de Maurice (em homenagem ao cientista D. M. Maurice, que em 1958 publicou trabalho pioneiro acerca da transparência corneana), argumenta que o arranjo anatômico do tecido é o responsável pela transparência da córnea e que um edema provocará uma desorganização e conseqüente opacidade do tecido. A segunda teoria, conhecida como teoria de Goldmann, explica que as fibrilas de colágeno que compõem a córnea possuem um tamanho inferior ao comprimento de onda da luz, o que seria o responsável pela transparência do tecido corneano (BENEDEK, 1970). Acreditava-se que a variação brusca (25-480 nm) no diâmetro nas fibrilas da esclera, além dos grandes espaços fibrilares era que determinava a opacidade.

2.3. Propriedades biomecânicas da córnea

As propriedades biomecânicas do tecido corneano podem ser exploradas amplamente do ponto de vista morfológico. O rearranjo das fibrilas no tecido está intimamente ligado à sua rigidez. Por exemplo, devido à hidrofiliabilidade, o estroma quando é lesionado sofre uma reorganização, alterando a elasticidade da córnea. Estudos diferenciam muito quanto ao módulo de elasticidade (LEANDRO, 2010).

O estroma é a camada especialmente determinante para a caracterização das propriedades mecânicas da córnea (HJORTDAL, 1996). Isso se deve ao simples fato de ele compor cerca de 90% do volume do tecido. Sabe-se, ainda, que as camadas menores, como o epitélio e as membranas de Descemet e de Bowman pouco influenciam sobre as propriedades mecânicas da córnea (SEILER et AL., 1992; ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008a). O estudo morfológico da córnea se torna importante na medida em que pesquisas recentes mostram que o arranjo formado pelas fibras de colágeno que compõe a córnea bem como sua orientação são fatores determinantes para a elasticidade do tecido (KOTECHA, 2007). O volume dessas fibras e o seu módulo de elasticidade determinam as características mecânicas do conjunto (BOOTE et al., 2005).

Dois fatores são considerados determinantes na avaliação das propriedades mecânicas da córnea: a paquimetria e a hidratação. Estudos mostram que córneas mais espessas possuem maior rigidez (TOUBOUL et. al., 2008). Quanto à hidratação, estudos concluíram que córneas mais hidratadas apresentam maior rigidez (HENNIGHAUSEN *et al.*, 1998). Uma vez que o tecido corneano é hidrofílico, quando lesionado, o estroma absorve o fluido invasor, o que provoca o inchamento das fibras. A córnea também tem a elasticidade modificada pela idade, uma vez que ocorre acúmulo contínuo de colágeno, deixando as fibras mais espessas (ELSHEIKH et. al., 2007).

Todavia, existe uma gama de estudos que mostram resultados diferentes quanto ao módulo de elasticidade. A depender da forma de preparação e técnica utilizadas, o módulo de Young pode variar de 0,05 a 27,5 MPa (Tabela 1). Fato é que, é uma vez fora do seu sistema biológico, isto é, para estudos *ex vivo*, a córnea exibe um módulo de Young inteiramente variável, apresentando, assim, um comportamento elástico não-linear (HJORTDAL, 1996).

Módulo de Young (MPa)	Referência
3 – 20	(HJORTDAL, 1995)
2,76 – 27,5	(HJORTDAL, 1996)
3,3 – 4,45	(ZENG et al., 2001)
0,05 – 12,0	(JAYASURIYA et al., 2003)
0,1 – 0,9	(LIU; ROBERTS, 2005)
0,13 – 0,43	(HAMILTON; PYE, 2008)

Tabela 1. Na literatura encontramos diferentes valores para o módulo de Young da córnea, que varia de acordo com o modo no qual a amostra foi preparada bem como a técnica de medição.

A elasticidade do tecido corneano é fator preponderante quando nos referimos a doenças como o ceratocone e o *diabetes mellitus* (GOLDICH et al., 2009; WIEGAND, 2009), o que nos mostra uma relação intrínseca entre a rigidez e anomalias estruturais com determinadas patologias. Inclusive, após intervenção cirúrgica (como a cirurgia refrativa), a natureza biomecânica da córnea pode ser alterada, o que compromete a recuperação no conhecido período pós-operatório (ORTIZ et al., 2007; CHEN et al., 2008; OHMOTO, 2009).

Finalizamos esta subseção comentando as formas mais utilizadas na literatura para medição do módulo de Young da córnea. Simplesmente tracionar o tecido não produz um resultado consistente devido à curvatura da estrutura. A técnica de extensometria uniaxial é muito utilizada, mas possui essa limitação (HJORTDAL, 1995, 1996; PIERSCIONEK, 2008). A grande vantagem se deve apenas à simplicidade do procedimento, o que, em contrapartida, não resulta num resultado próximo do real. Outro teste bastante utilizado, inclusive mais comum que o primeiro, é o teste de inflação, que, como vantagem, não altera a curvatura do tecido.

3. O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA

O Microscópio de Força Atômica (AFM) surgiu a partir da variação do microscópio de tunelamento. Foi desenvolvido por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christopher Gerber (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986). O diferencial do AFM frente ao microscópio eletrônico é a possibilidade de medidas em amostras biológicas, uma vez que o microscópio eletrônico precisa de que o material seja condutor. Na verdade, o microscópio eletrônico pode sim obter imagens de materiais não condutores. Todavia, é necessário o processo de metalização, onde a amostra é recoberta com metal, o que resulta numa perda de detalhes da ordem da espessura da camada. Outras vantagens do AFM, as quais ficarão estritamente evidentes neste trabalho, é que ele constitui técnica não-destrutiva: é possível obter imagens de alta resolução na escala de nanômetros, que complementam medidas de curvas de força quando o aparelho é posto a operar no modo *Force Plot* (ou *Force Volume*).

Para exemplificar como funciona o AFM, vamos fazer uma analogia com algo mais cotidiano. É incrível como os portadores de deficiência visual conseguem transitar pelas ruas, embora elas não sejam tão regulares como se deseja. Para caminhar, o cego utiliza uma haste que o ajuda a identificar o que há pela frente. Essa haste utilizada pelo cego pode ser comparada ao *cantilever* do AFM, que varre toda a superfície da amostra. O braço do transeunte, que regula a quantidade de vezes e forma com que o bastão toca o chão faz a função da cerâmica piezométrica, que é um tipo específico de material sensível à aplicação de diferença de potencial (uma tensão variável é aplicada de acordo com o material). Assim, conforme a sonda varre a superfície da amostra, a depender da irregularidade, ocorre uma variação da tensão aplicada ao piezo, de forma que o *cantilever* se mantém a altura constante. Na Figura 5 vemos um esquema para a varredura da sonda sobre uma superfície. Enquanto a amostra está sobre o plano x - y , as irregularidades que variam em z fazem a sonda oscilar ao longo deste eixo.

Uma fonte de *laser* emite um feixe sobre a extremidade livre do *cantilever*. Antes de operar o *laser* e o fotodetector são ajustados de modo a ter um ponto inicial como referência. A partir dele as variações da sonda, que produzirão oscilações correspondentes ao *laser*, o fotodetector enviará todas essas informações ao controlador, que as transformará em aplicações de tensões à cerâmica piezométrica. Essas variações na diferença de potencial produzirão uma imagem adequada às variações.

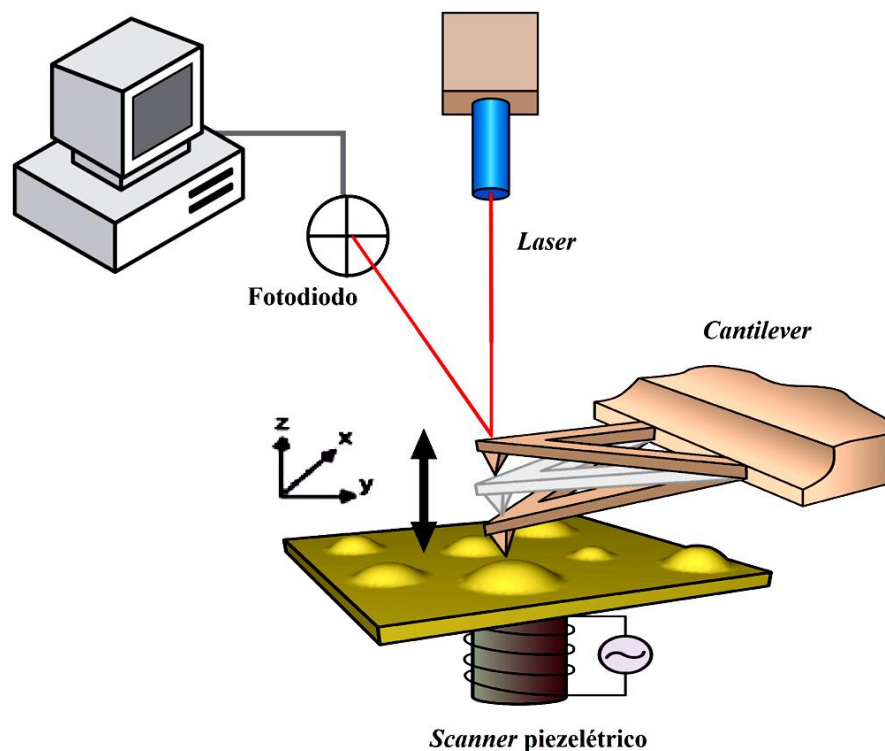


Figura 5. Ilustração do princípio básico de funcionamento do AFM. O *cantilever* tem seu movimento acompanhado por um *laser*. Devido a irregularidades da superfície, ocorre uma variação em *z*, que é registrada pelo fotodiodo. Adaptado de <http://garnogroup.lsu.edu>

A ponta do *cantilever* do AFM bem como seu modo de operar são partes importantes durante as medidas. A ponta (denominada também de *tip*) é utilizada nas medidas das propriedades mecânicas, no que se refere à questão da obtenção de curvas de força. Isso se deve à vantagem de se trabalhar com um indentador (a *tip*) com geometria conveniente. Em geral, a sonda é produzida com ponta no formato piramidal. Acoplando-se a ela uma esfera, pode-se obter uma nanodeformação de tal forma que se pode estudá-la pelo modelo matemático de Hertz. Vale ressaltar que o modelo de Hertz é válido para qualquer geometria (SANTOS, 2010).

Com relação à obtenção de imagens, o AFM pode utilizar dois tipos de sonda: uma para o modo intermitente (*tapping mode*) e a outra para o modo de contato (*contact mode*). No modo intermitente a sonda é aproximada junto à superfície do material até o momento em que inicia o seu processo de oscilação. Como o contato ocorre de forma intermitente, forças laterais (que poderia mover uma amostra que não estivesse bem aderida ao substrato) são muito pequenas ou até mesmo nulas (HANSMA *et. al.*, 1994). Assim, esse tipo de sonda é muito utilizada em materiais sensíveis mecanicamente (como amostras

biológicas, por exemplo). Como o modo intermitente fica bem menos tempo em contato com a amostra (ao contrário do modo de contato que veremos a seguir), os ruídos e interferências são igualmente bem menores.

Para o modo de contato utilizamos um *cantilever* com ponta triangular. Ela opera a altura constante em relação à superfície da amostra e é mais estável devido ao seu formato (Figura 6).

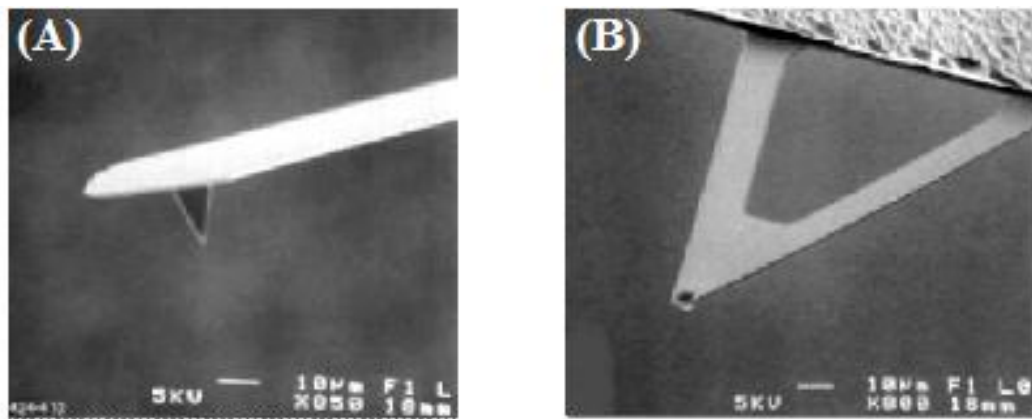


Figura 6. Imagem feita no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) das sondas de AFM. A *tip* em (A) é para o modo intermitente (*tapping mode*) e em (B) para o modo contato (*contact mode*). Retirado de Veeco, Force Imaging. Support No. 228, Rev. E (1999).

O modo de contato é utilizado especialmente no estudo de deformações (na literatura, de modo geral, as pesquisas pautam seus trabalhos em encontrar o módulo de Young dos materiais). Para obtenção de imagens em materiais biológicos deve ser utilizada uma sonda de constante elástica pequena de modo que a ponta não danifique ou mesmo altere o material. No que concerne ao estudo da deformação do material, a constante elástica dependerá da dureza do dele, uma vez que utilizando uma sonda muito flexível para uma amostra relativamente rígida, o que teremos ao final será apenas a deflexão do *cantilever*.

4. MEDIDAS DE FORÇA

4.1. Uma breve introdução à reologia

Por questões óbvias, vamos introduzir o conceito de reologia e a ideia por traz dos parâmetros reológicos dos materiais. Em seguida vamos voltar nossa atenção ao AFM, exibindo suas características, bem como seus modos de operação. Por fim, vamos estabelecer uma conexão entre a reologia e o papel do AFM sobre ela, dando ênfase nas principais potencialidades do microscópio de força atômica.

A palavra Reologia advém do grego, onde

Rheo = Deformação

Logia = Ciência ou estudo

A reologia é uma área da ciência que estuda as propriedades mecânicas de um corpo, tendo como instrumento básico de medida o reômetro.

O Microscópio de Força Atômica (AFM) vem sendo cada vez mais utilizado na fabricação de trabalhos científicos que tenham como propósito caracterizar as propriedades mecânicas de um material.

Além de não ser destrutiva, a microscopia de força atômica é capaz de produzir imagens em alta resolução (e em três dimensões), diferenciando-se do microscópio ótico pelo fato de usar baixo comprimento de onda (o que lhe permite um alcance maior). O AFM também possibilita maior liberdade, sendo possível a manipulação em escala nanométrica dos materiais.

Dessa forma, fica mais intuitivo inferir que a reologia descreve a deformação de um corpo que está sujeito a tensões. Na ideia proposta aqui, podemos considerar o material no em um dos três estados: sólido, líquido ou gasoso. Fisicamente, temos:

- Sólidos ditos ideais sofrem deformação elástica, de modo que a energia utilizada para a sua deformação é totalmente recuperada quando a condição de tensão é cessada.

- Quando observamos um corpo, seja no estado líquido ou gasoso, temos, então, um fluido, que é considerado ideal quando sua deformação é irreversível, isto é, simplesmente

ele flui. Ao contrário do sólido ideal, a energia utilizada na deformação do fluido é dissipada na forma de calor, não sendo possível recuperá-la quando a tensão é interrompida.

Fazer ciência, construir uma teoria a partir de uma idealização é importante para o desenvolvimento progressivo e sistemático. Todavia, vale ressaltar que corpos *reais* não são nem sólidos ideais e nem fluidos ideais. Isso implica que alguns sólidos, ao contrário do que foi dito, podem sim sofrer deformação permanente, bastando para isso que se aplique uma força de intensidade suficiente. Um exemplo incontestado é o aço, sólido bastante resistente, mas que é muito forçado (pela indústria especialmente) a fluir para a produção de chapas na estampagem de peças de automóveis.

De maneira geral, os líquidos apresentam um comportamento reológico que os classifica em uma região entre os líquidos e os sólidos, sendo elásticos e viscosos (daí serem chamados de viscoelásticos).

Para caracterizar o comportamento de certo material é necessário analisar as respostas de uma tensão aplicada relacionando-a com o tempo de deformação. Para todos os materiais, um fator de tempo peculiar “ λ ” pode ser determinado, onde λ é grande para sólidos elásticos ideais e próximo de zero para líquidos. No entanto, os processos de deformação estão relacionados com os valores característicos de tempo “ t ”. A relação entre λ e t é conhecida como número de Deborah (BINGHAM; REINER, 1928):

$$De = \frac{\lambda}{t} \quad (1)$$

Um valor alto para o número de Deborah implica no comportamento de um sólido, enquanto que um baixo valor do número de Deborah define um líquido.

Para entender melhor o número de Deborah (note que estamos tratando de uma grandeza adimensional), vamos supor que um jato d’água com sai em alta velocidade da extremidade de uma mangueira contra uma parede. Devido a colisão, as gotas são deformadas, mas logo recuperam seu formato original (num intervalo de tempo quase nulo). Nesse processo de deformação, um tempo t pequeno resulta em um número de Deborah grande ainda que λ seja pequeno. Ou seja, para De grande temos um comportamento elástico, caso contrário, teríamos uma deformação irreversível e a energia é dissipada.

Sólidos ideais submetidos a tensões de cisalhamento reagem com a seguinte deformação (Figura 7):

$$\tau = E \cdot \frac{dx}{dh} = E \cdot \tan \gamma \approx E \cdot \gamma \quad (2)$$

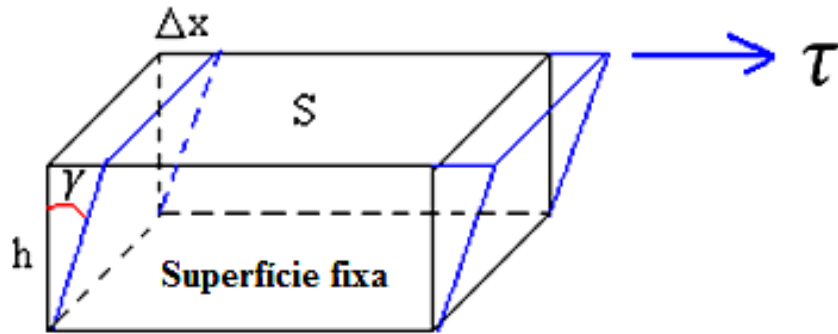


Figura 7. Deformação de um corpo sólido à ação de uma tensão τ .

A resistência de um fluido à mudança irreversível de seus elementos de volume é chamada de viscosidade. Essa mudança ocorre a partir da aplicação de uma tensão de cisalhamento τ , movendo uma lâmina do fluido. A Figura 8 mostra a variação ΔL maior para as placas superiores, decrescendo no sentido da base fixa.

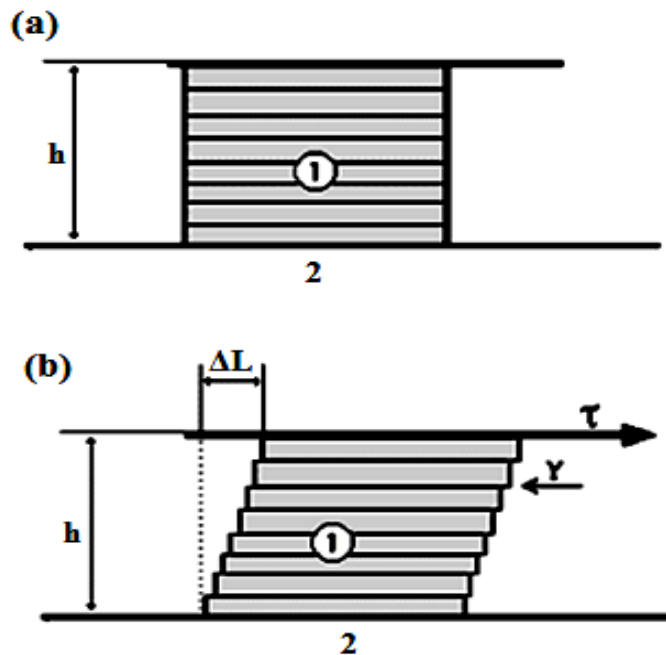


Figura 8. Em (a) temos uma camada de determinado material, quando, em (b), ocorre o cisalhamento devido à tensão τ . Retirado de: <http://www.freedom.inf.br>.

Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de fluxo de um líquido ideal:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (3)$$

onde:

τ = Tensão de cisalhamento

η = viscosidade

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento

Definimos anteriormente a viscosidade de uma amostra como sendo a resistência à mudança irreversível de qualquer elemento de volume. No entanto, é importante entender os parâmetros que envolvem a viscosidade, tal qual são mostrados na equação (1).

4.1.1. Tensão de cisalhamento

É definida como a força aplicada tangencialmente em certa área. Essa área é a interface entre a placa superior (que está sujeita diretamente a tensão) e o líquido abaixo. Dividindo o fluido em placas paralelas, conforme mostra a Figura 9, vemos que a tensão de cisalhamento provocará um fluxo, isto é, teremos uma velocidade de fluxo. Mantendo a tensão de cisalhamento constante, o que vai controlar a velocidade de fluxo é justamente a resistência interna do líquido, isto é, a viscosidade.

$$\tau = \frac{F \text{ (força)}}{A \text{ (área)}} = \frac{N}{m^2} = Pa \text{ (pascal)} \quad (4)$$

4.1.2. Taxa de cisalhamento

A tensão de cisalhamento induz o fluido a tomar um perfil característico. A velocidade máxima do fluxo encontra-se na camada superior (Figura 9). A velocidade diminui até chegar a zero na camada ligada a placa fixa.

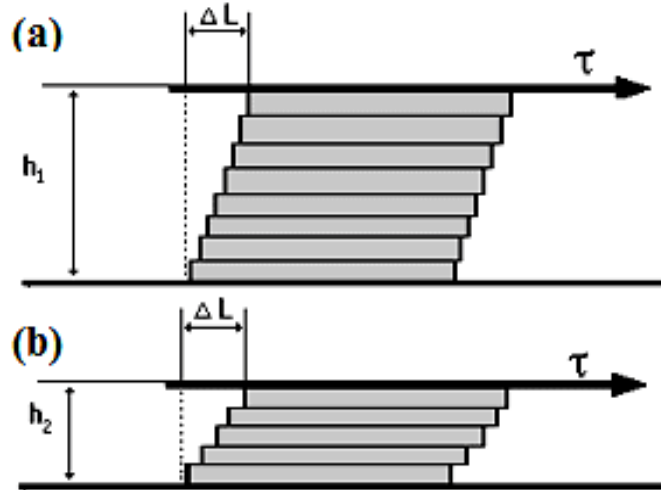


Figura 9. Em (a) tem-se uma baixa taxa de cisalhamento provocada pela tensão aplicada, o que produz um deslocamento relativo entre as placas. Em (b) ocorre uma alta taxa de cisalhamento sob as mesmas condições, reduzindo-se apenas a espessura da camada do material cisalhado. Retirado de: <http://www.freedom.inf.br>.

O gradiente de velocidade define a taxa de cisalhamento. Temos:

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh} \quad (5)$$

Porém, o ponto acima de γ indica que a taxa de cisalhamento é derivada do tempo da deformação causada pela ação da tensão de cisalhamento sobre a lâmina de um líquido. Assim, teremos que:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{dl/dh}{dt} = \frac{dl/dt}{dh} = \frac{dv}{dh} \quad (6)$$

A equação (3) pode ser reescrita como:

$$\tau = \eta \frac{dv}{dh} = n\dot{\gamma} \quad (7)$$

Comparando as equações (2) e (7), podemos observar outra diferença básica entre os sólidos e líquidos: a tensão de cisalhamento causa deformação nos sólidos, conforme

equação (2), enquanto que em ela causará uma *taxa* de deformação. Isso implica que os sólidos são elasticamente deformáveis, já os líquidos simplesmente fluem.

As constantes G e n , de fato, constituem um fator resistência ligado, que caracterizam a amostra quando ela está sob tensão.

4.2. *Force Volume*

O *Force Volume* é um modo de operação do AFM onde a sonda (de contato) desce sobre a amostra, indentando-a de forma a provocar uma deformação do corpo. A variação de deflexão no *cantilever* é medida e os dados correspondentes gerados pelo *software* que controla o AFM. No laboratório de microscopia avançada (LMA - UFC) do departamento de Física, inserimos esses dados num programa desenvolvido no Matlab[®] pelo professor Dr. Jeanlex Soares de Sousa. O programa (chamado FVload) processa esses dados e fornece informações diversas.

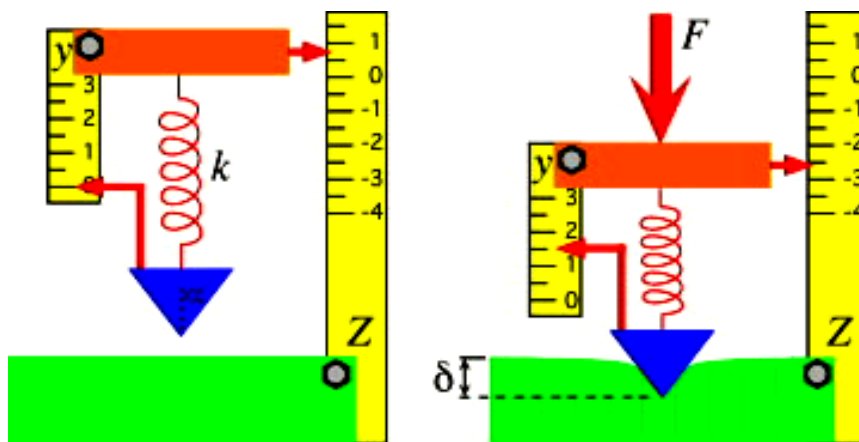


Figura 10. Analogia da indentação da ponta da sonda sobre a amostra. Na figura ocorre uma penetração δ . Retirado de <http://www.physics.uwo.ca>.

Vale lembrar que a sonda indenta a amostra várias vezes, gerando curvas de força em função da deflexão. Essas curvas fornecem dados preciosos acerca da indentação. Na Figura 9 temos um exemplo de curvas de força. Podemos aproximar a variação do *cantilever* para linear. Neste caso a amostra se comportou “rígida”, e somente a sonda se deflexionou.

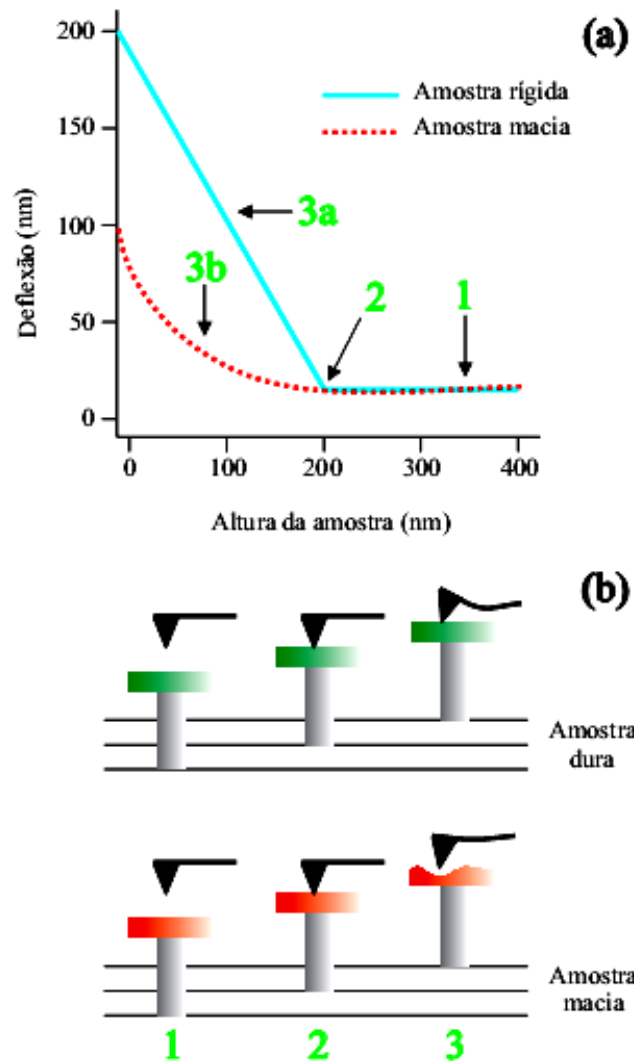


Figura 11. Em (a) temos curvas de força para indentações em (b) numa amostra macia e outra amostra rígida. Observe que para a amostra rígida somente a sonda deflexiona, tendo-se uma curva de força linear. Na amostra macia, existe uma compensação entre a deflexão do *cantilever* e a amostra. Retirado de: REBELO, 2007.

Ainda sobre o gráfico, podemos notar que há deflexão negativa (situação em que a sonda fica presa no momento de subir ou é atraída quando se aproxima da superfície da amostra devido, entre outras, a forças de capilaridade). Mostramos abaixo várias curvas de força para amostras macias e rígidas, além de sistemas com superfície carregada.

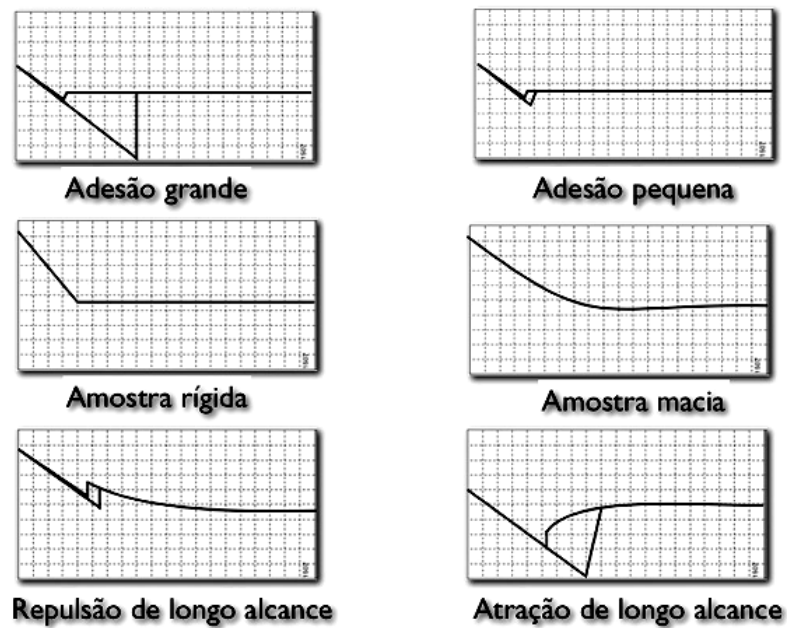


Figura 12. Diferentes curvas de forças para amostras com características reológicas distintas. Retirado de REBELO, 2010.

Em cada ponto que a sonda desce, uma curva de força é gerada. A sonda varre toda a área selecionada descendo conforme a resolução solicitada. Por exemplo, para 32 pixels temos que a sonda indentará esse valor em cada linha percorrida. Em seguida ela avança um passo para formar uma nova linha com 32 pontos.

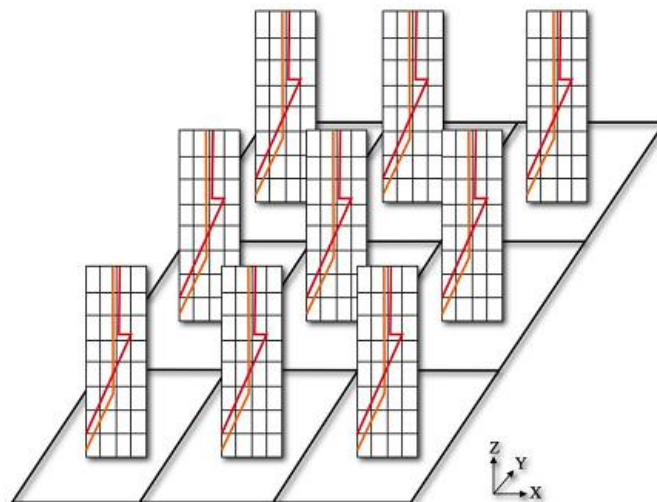


Figura 13. Ilustração da movimentação da sonda no plano x-y e indentação em z. Retirado de Veeco, Force Imaging, Support Note No. 228, Rev. E (1999).

É importante perceber que a amostra é percorrida no plano x-y, mas a indentação ocorre ao longo do eixo-z (Figura 13). Dessa forma se tem amostra medida em três dimensões (daí o nome *Force Volume* ou Volume de Força).

Mas, afinal, para que utilizar as curvas de força? Na verdade, o principal interesse de numa indentação, dentre outros, é a extração do módulo de Young. Assim, podemos encaixar os dados num modelo teórico, o modelo de Hertz. Isso porque a interação-deformação de dois corpos não dependem necessariamente apenas da força aplicada de um sobre o outro, mas também da geometria do indentador . Considerando a ponta do AFM cônica, teremos as seguintes equações (SANTOS, 2010):

$$F_{el} = K_c(d - d_0) \quad (8)$$

$$F_{Hertz} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-v^2} \tan(\alpha) \delta^2 \quad (9)$$

$$\delta = (z_0 - z) - (d - d_0) \quad (10)$$

$$slope = \frac{dF}{d\delta^2} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-v^2} \tan(\alpha) \quad (11)$$

$$E = \frac{\pi}{2} \frac{1-v^2}{\tan(\alpha)} slope \quad (12)$$

onde E é o módulo de Young e a Força de Hertz se aplica para a geometria cônica.

5. O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA E AS PESQUISAS COM FIBRAS DE COLÁGENO

O AFM é uma ferramenta de extremo potencial, que permite que pesquisadores tenham liberdade para estudar as propriedades mecânicas dos materiais. No próprio *software* do microscópio (a depender do fabricante, é claro), é possível mudar parâmetros de modo a tornar a técnica ainda mais adequada. Com relação às sondas, há uma variedade delas, cada uma adequada a determinado tipo de material e objetivo (essa afirmação se torna mais evidente quando se compara as Figuras de 14 a 16). A seguir, nas Figuras 14 e 15, vemos alguns exemplos do uso da sonda de contato para determinar o módulo de Young de fibras de colágeno isoladas.

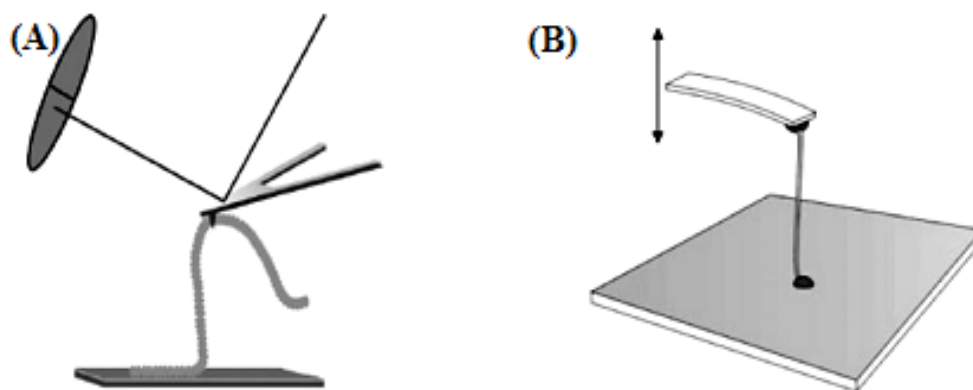


Figura 14. Nas figuras temos duas ilustrações de experimentos feitos com fibras de colágeno separadas. Ilustrações retiradas de GRAHAM *et. al.*, 2007 e RIJT *et. al.*, 2006, nesta ordem. Em ambos os trabalhos os autores utilizaram cola do tipo epóxi para fixar as fibrilas à superfície e à sonda do AFM. Em seguida, o *cantilever* exerce uma força, tensionando cada fibrila individualmente.

O que se observa na literatura, em geral, é que grande parte dos estudos ligados à deformação de estrutura de colágeno apenas ocorrem para fibras isoladas, tendo como resultado módulos de Young que variam da ordem de algumas dezenas de MPa até alguns décimos de GPa, a depender do meio (líquido ou ar) utilizado na medida. Nos experimentos em questão da Figura 14, as fibras de colágeno eram dispersas sobre uma lamínula de vidro. Para fixá-las nas extremidades foi o utilizado, em ambos os casos, cola epóxi. No primeiro trabalho o resultado obtido para o módulo de Young foi de 32 MPa. Na figura (B) o autor fez medidas em ar e em líquido, estando as fibrilas imersas em solução PBS (Ph = 7,4). Sob

condições ambiente foi encontrado um módulo de Young no intervalo 2 – 7 GPa. Na segunda etapa, estando as fibras em líquido, o intervalo de medida foi de 0,2 – 0,8 GPa.

Na próxima figura os autores vão além, fazendo testes para medida de flexão. No experimento é utilizado colágeno de tendão bovino. Na Figura 15 vê-se a sequência de procedimentos do experimento. Na Figura 15A temos uma imagem de MEV da sonda sem a ponta. Esta foi retirada através do FIB (em português, feixe de íons focalizado, que muito se assemelha ao MEV, sendo que este utiliza feixe de elétrons). O objetivo em se retirar a ponta é de se evitar que as fibras sejam lesionadas, uma vez que o intuito do trabalho é tão somente buscar medidas de elasticidade por meio de flexão. Na Figura 15B é ilustrado com ocorrência as medidas. A sonda baixará sobre a superfície do polímero para que seja medida sua dureza, a qual é utilizada como parâmetro para as outras deformações. As fibras foram agitadas num aparelho que simula uma espécie de liquidificador. Em seguida o material é lavado com água Milli-Q, sendo filtrado posteriormente. Um polímero (do tipo PDMS - polidimetilsiloxano) é moldado de forma que se tenha um sulco ao centro, uma espécie de canal com $5,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de largura por $0,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de profundidade. O PDMS será a superfície na qual após as fibras serem agitadas, serão depositadas. Algumas se depositarão no canal, outras não. Nas fibras que estão sobre o polímero o *cantilever*, de constante elástica 0,5 N/m, deformará a fibra em quatro pontos diferentes. Na ilustração 15C é mostrada uma imagem de MEV de uma fibra sobre o polímero. No trabalho os autores consideraram apenas as fibras de comprimento muito maior que a largura do sulco. Em detalhe, são mostradas tonalidades diferentes, que representam os gomos ao longo da fibra de colágeno. Esses gomos são protuberâncias proveniente do entrelaçamento entre as fibrilas menores. A essa sequência de volumes a literatura atribui o nome de periodicidade em D, onde cada período é em torno de $65 \pm 0,8 \text{ nm}$.

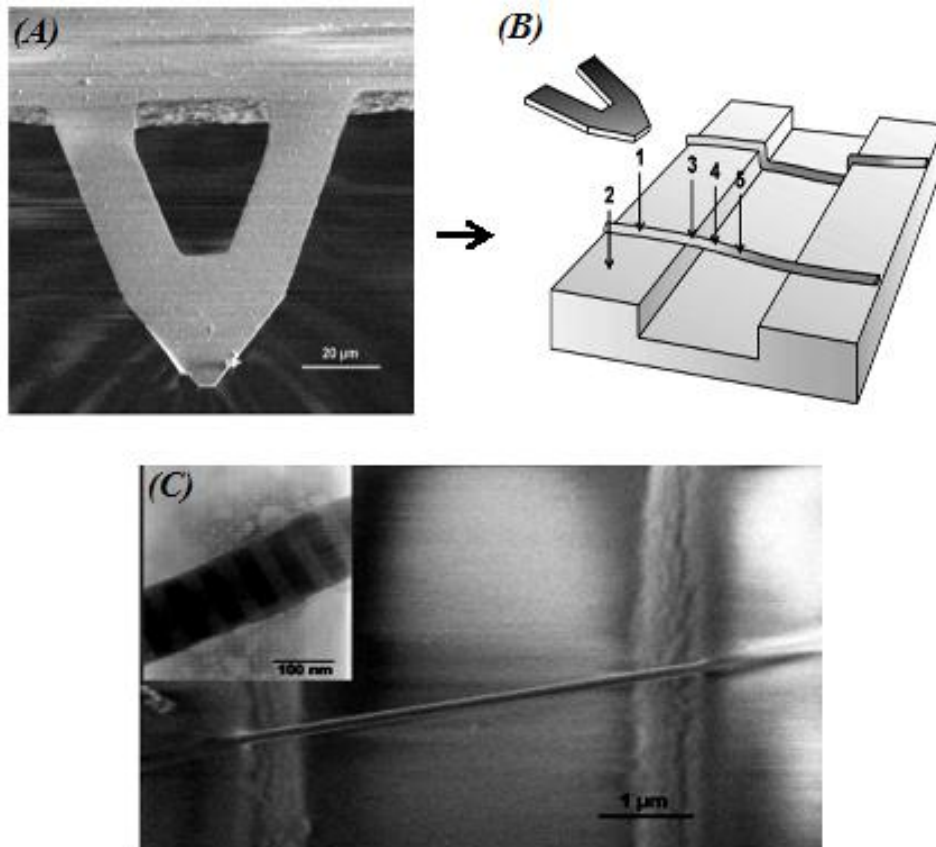


Figura 15. (A) Imagem de MEV mostrando o cantiliver sem ponta. (B) No esquema é mostrado como o experimento foi realizado, em que a sonda seria posta a pressionar em diferentes pontos da fibra. (C) Imagem de MEV mostrando uma fibra isolada sobre o PDMS. No detalhe em (C) pode-se notar uma periodicidade, conhecida na literatura como “periodicidade em D”, que são volumes formados devido ao entrelaçamento das fibrilas. Retirado de YANG *et. al.*, 2007.

Na literatura, em geral, pesquisadores afirmam que experimentos assim poderiam ser falhos (GRAHAM *et. al.*, 2004). Todavia, selecionando fibras de colágenos bem maiores que a largura do sulco, o efeito que poderia ser causado pelas bordas, pôde ser desprezado. Assim, foi encontrado um módulo de Young de 5,4 GPa, o que não se distâcia muito dos valores encontrados na literatura, principalmente quando comparamos com os resultados dos artigos da Figura 14.

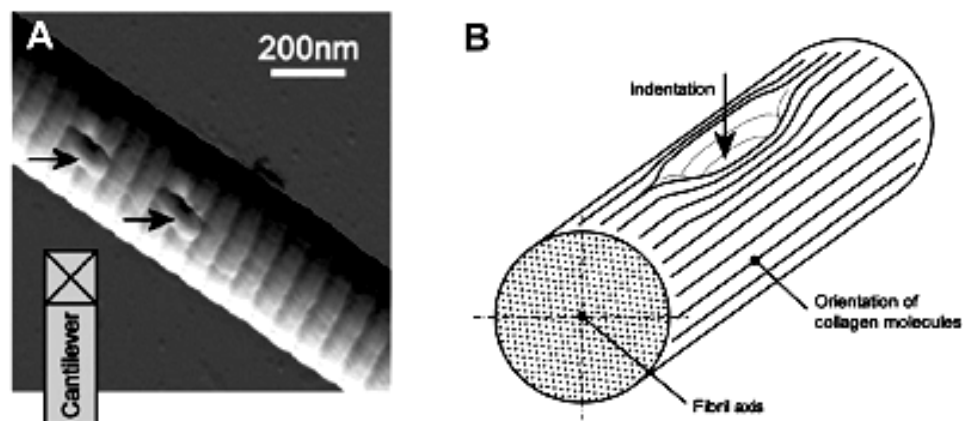


Figura 16. Em 16A temos uma imagem de MEV mostrando a lesão irregular na na fibrila. Em (B) temos uma ilustração esquemática do experimento. Retirado de WENGER et. al., 2007.

Por fim, como último exemplo da aplicação do AFM (apesar de existirem fantasticamente muitos outros), vamos tecer alguns comentários sobre o artigo que é representado pela Figura 16.

A partir da interação envolvendo forças da ordem de $2 \mu\text{N}$ (vale lembrar que normalmente o AFM opera sob interações que compreendem forças da ordem de 10^{-9} a 10^{-12} N). Houve também o cuidado de escolher uma fibrila que tivesse diâmetro maior que o diâmetro da ponta do *cantilever*. Como resultado, o que se vê na Figura 16A são duas marcas causadas pela penetração da ponta. A irregularidade do efeito da ponta sobre a superfície comprova o caráter anisotrópico das fibras, em que modelos atribuem à fibrila uma conformação de subfibrilas de tamanhos diversos (SILVER *et. al.*, 2003).

6. METODOLOGIA

6.1. Obtenção e preparação das amostras

Foram seccionadas transversalmente córneas (de um paciente de 20 anos e outro de 60) de olho humano do Banco de Olhos do Estado do Ceará.

Cada amostra foi fixada com parafina em lamínulas de vidro. Porém, para a análise do material, foi preciso retirar a parafina com tratamento em xilol, submergindo as amostras em duas sessões de cinco minutos. Em seguida, para reidratar os tecidos, eles foram imersos em concentrações decrescentes de álcool 100% (5 min.), 90% (3 min.), 80% (3 min.), 70% (3 min.) e 60% (3 min). As imagens (Figura 17) a seguir ilustram as etapas do trabalho. A primeira imagem à esquerda mostra vários cortes do tecido depositados sobre a lamínula de vidro. Essa lamínula eventualmente precisava ser cortada de modo a se encaixar no local destinado no AFM. No terceiro quadro vemos os depósitos onde as amostras são imersas no álcool. No quarto quadro temos duas amostras já prontas para a medida no AFM. Elas ficam depositadas nas lamínulas de vidro, que por sua vez ficam nas pastilhas de metal que ficam encaixadas no suporte (scanner) do Microscópio. No último quadro à direita temos, todo o equipamento, que fica sobre uma mesa, livre de vibrações e ruídos externos.



Figura 17. Processo de preparação das amostras para análise no AFM. Da esquerda para a direita vemos desde quando cortamos as lamínulas no formato das pastilhas de metal, passando pela retirada da parafina e reidratação até o momento em que temos tudo pronto para a varredura no microscópio.

6.2. Obtenção das Imagens

Com o AFM operamos de três modos diferentes. Primeiro, na obtenção das imagens de altura, foi feito uso de três tipos de sonda (OTR8, OTR4 e TESP). As sondas OTR4 e OTR8 são para o modo de contato, enquanto a TESP é para o modo intermitente (tapping) de varredura.

6.3. Medidas de Elasticidade

Para a segunda parte do trabalho, no que concerne a elasticidade do material, utilizamos o modo de volume de força (Force Volume), que consiste em curvas de deflexão em função da aproximação/retração da sonda sobre a amostra. São necessárias, entretanto, algumas considerações. Primeiro que devemos ter um material que não seja tão duro a ponto de não “sentir” o contato da sonda. Assim, como não temos o privilégio de escolher amostras que se adéquem às sondas, devemos trabalhar sob outro ponto de vista, isto é, escolhendo a sonda mais conveniente para cada amostra.

Diante disso, depois de várias sondas testadas, nossa segunda parte do trabalho tornou-se um processo de investigação acerca da melhor sonda. Essa sonda “ideal” se caracteriza pela propriedade que ela terá de indentar o tecido corneano de forma que não o perfure, nem tão pouco seja insensível a ponto de não deformá-lo. O protocolo é iniciado com a preparação da solução tampão salina. Essa solução, para cada litro, é preparada da seguinte forma. Comece com 800 ml de água destilada. Em seguida, deve ser obedecida a sequência abaixo (DULBECCO, 1954).

- i. Adicionar 8 g de NaCl.
- ii. Adicionar 0,2 g de KCl (Cloreto de potássio).
- iii. Adicionar 1,44 g de Na_2HPO_4 (Fosfato de sódio cristalizado).
- iv. Adicionar 0,24 g de KH_2PO_4 . (Fosfato monopotássico)
- v. Ajustar o pH para 7,4 com HCl (ácido clorídrico).
- vi. Adicionar água destilada para um volume total de 1 litro.

Na etapa 5 utilizamos o pHmetro para controlar o PH, que para uma amostra como a que utilizamos é de 7,4. Assim, com essa solução simulamos o ambiente em que a córnea está imerso.

Nossa dificuldade foi de separar as fibras, uma vez que estão firmemente ligadas. Utilizamos um aparelho de ultrassom, o qual nos forneceu um resultado razoável, mas que precisa ser melhorado. Uma concentração salina mal feita pode comprometer todo o processo por causa da contaminação causada pelos cristais de sal. Essa etapa da pesquisa ainda encontra-se em fase de otimização.

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1. Análise Morfológica

Obtivemos imagens de altura onde mostram a princípio uma irregularidade no material. A orientação das fibras de colágeno na córnea foi analisada por Daxer e Fratzl (1997) através do padrão de espalhamento de raios-X, o que revelou a estrutura anisotrópica em córneas normais. Essa anisotropia é vista inicialmente na Figura 18. Em (a) temos a região de um quadrado de 1,5 μm de lado evidenciando a presença de estruturas mais altas ao longo de cada fibrila, enquanto que em (b) ocorre irregularidades na disposição das fibras de colágeno. Apesar disso, em (b) vemos algumas regiões onde as fibras estão dispostas paralelamente entre si. As imagens abaixo são de uma córnea de um paciente saudável de 60 anos. Nelas é evidente o aspecto anisotrópico, havendo, contudo, uma periodicidade axial. Na figura (d) ocorre a mesma irregularidade para uma região diferente da figura (c) da imagem da córnea de 60 anos.

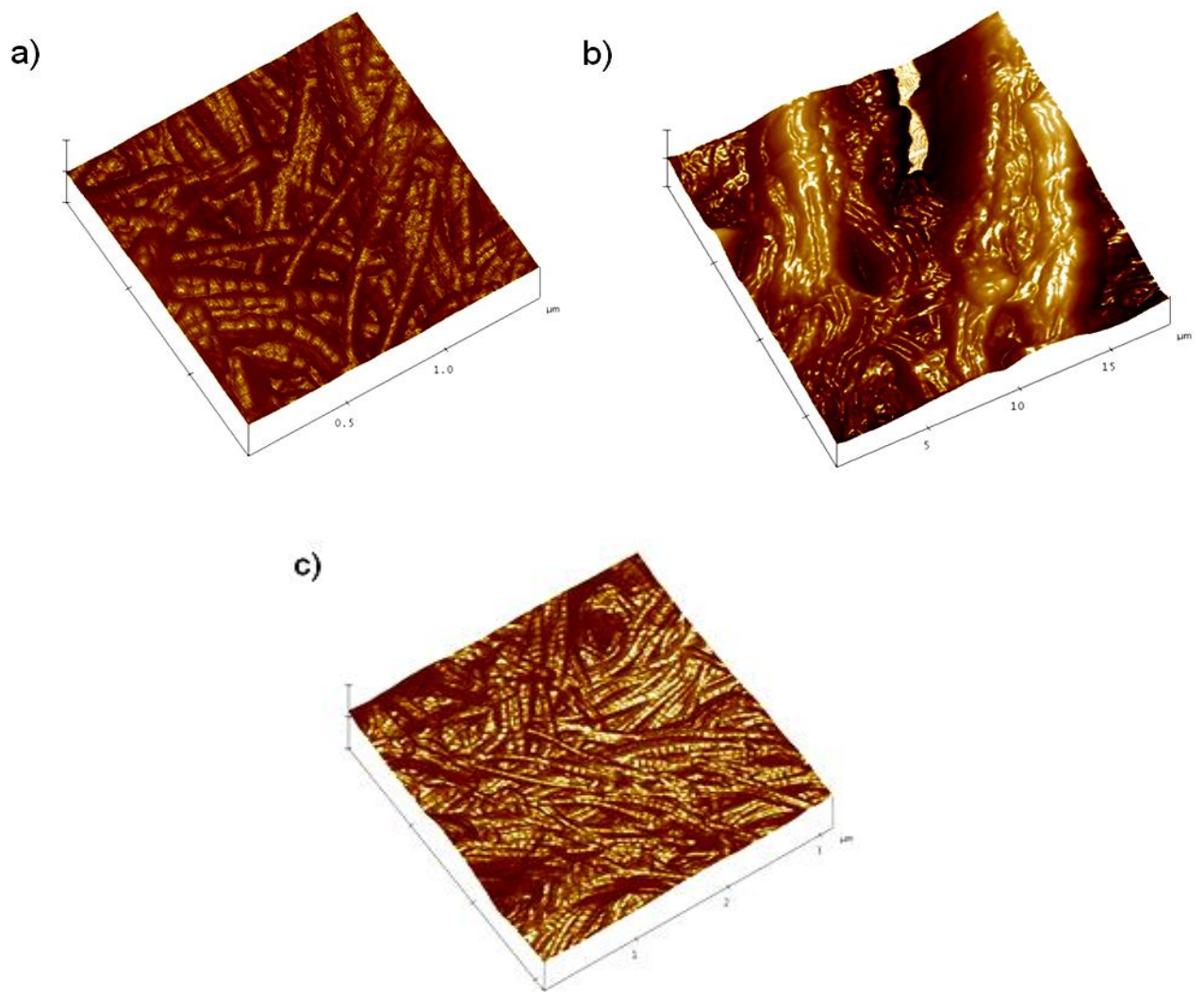


Figura 18. Imagens do estroma no modo intermitente. Em (a) é possível observar a presença de gomos ao longo das fibrilas; em (b) numa área maior vemos as fibras estando arranjadas paralelamente entre si; já em (c), aproximadamente observamos novamente o aspecto anisotrópico.

Na Figura 19 temos uma estrutura interessante. Nessa imagem da córnea de um indivíduo de 20 anos vemos várias ramificações, que unidas formam estruturas em “Y”. A imagem revela estruturas maiores que são mais unidas na região central enquanto que nas bordas as fibras divergem.

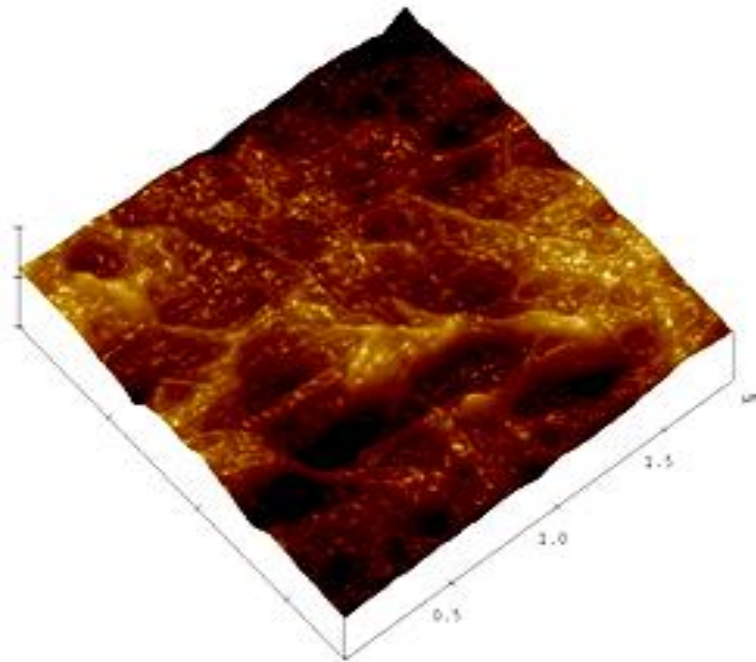


Figura 19. Imagem feita no modo intermitente da região estromal da córnea de um indivíduo de 20 anos. Na estrutura é possível observar as formações em “Y”.

A Figura 20 a seguir foi feita numa região da periferia. De imediato podemos notar os “vazios” que existem entre as conexões de fibras. Esse fato reforça ainda mais a teoria de uma densidade baixa da quantidade de fibras por unidade de área (ou volume). Outra conclusão é que em algumas partes, como no canto superior esquerdo, vemos apenas um conjunto de manchas, o que em nada lembra a formação fibrilar. Isso indica que as fibrilas não estão sozinhas no tecido. Portanto, há a presença de um material composto essencialmente por colágeno (não fibrilar), que contribui para sustentação do tecido. Foi observado que, por material biológico, relativamente sensível, para frequências de varreduras muito altas (a partir de 1Hz) a imagem resultante apresentava ruído. Ao contrário, para frequências de varredura muito baixas (menor que 0,3 Hz), a imagem também apresentava indefinições. Isso ocorria porque, a pequenas frequências, a ponta da sonda interagia com a superfície da amostra. Assim, houve uma frequência que tornava a medida mais estável, que foi de 0,3 Hz. Apesar disso, em algumas regiões mais regulares era possível aumentar a frequência de varredura., especialmente quando cobríamos áreas da ordem de micrômetros. A imagem foi feita com uma frequência de 1 Hz, numa região de 25 μm de lado. Ao centro temos já os primeiros ramos.

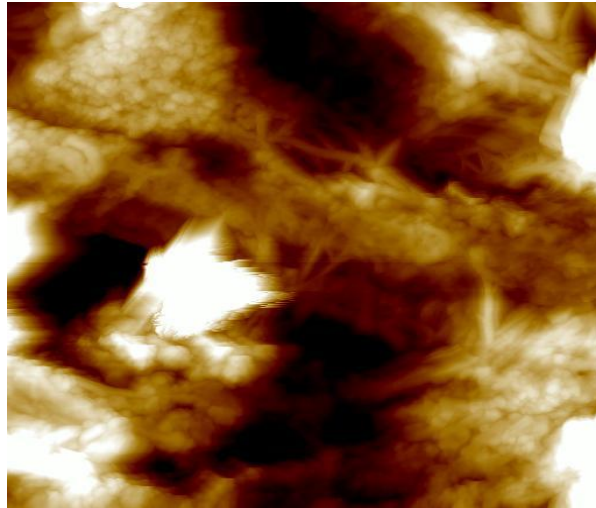


Figura 20. Imagem de uma córnea de 60 anos da região periférica, no modo *tapping*, com a sonda varrendo a 1 Hz numa área quadrada de 25 μm de lado.

Para melhor visualização, temos abaixo (Figura 21) um *zoom* digital da parte superior esquerda da Figura 20. A Figura 21 é um *zoom* digital da ramificação de fibras mostradas na figura acima. Vale lembrar a diferença entre *zoom* digital e *zoom online*. Este é feito quando enquanto o microscópio ainda está trabalhando sobre a amostra, enquanto que aquele é produzido com a imagem original já concluída pela varredura.

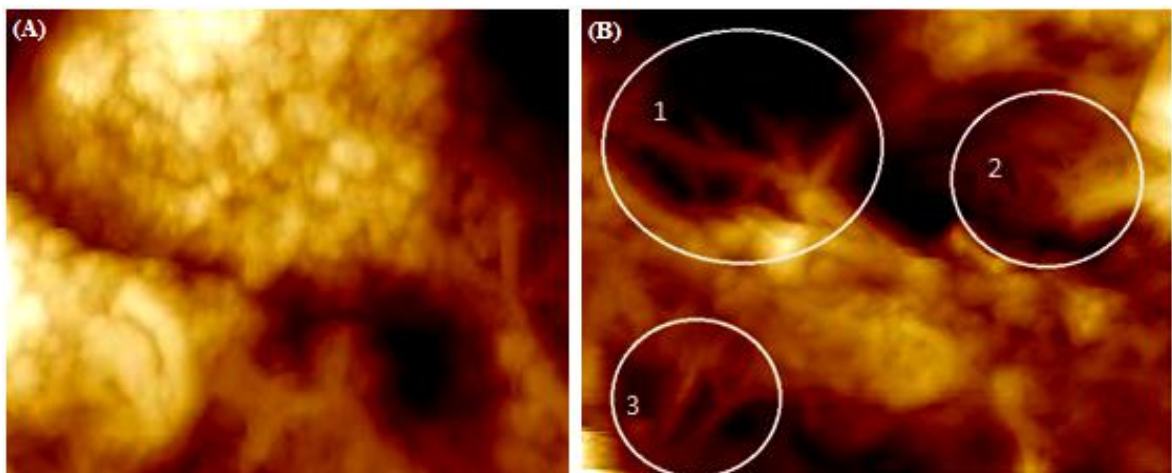


Figura 21. Em (A) vê-se manchas que talvez não seja fibrilas, caracterizando-se por um material viscoso composto por colágeno. Já em (B) destacamos regiões com fibrilas de tamanhos diferentes, que “nascem” das regiões de mancha.

A Figura 22 abaixo é um *zoom* online da mesma região discutida inicialmente. Destacamos duas regiões onde se evidencia novamente ramificações mais discretas de fibras

de tamanhos variados. Nas marcações, círculos 1 e 2, vê-se pelo menos 3 fibras divergindo a partir de um ponto comum.

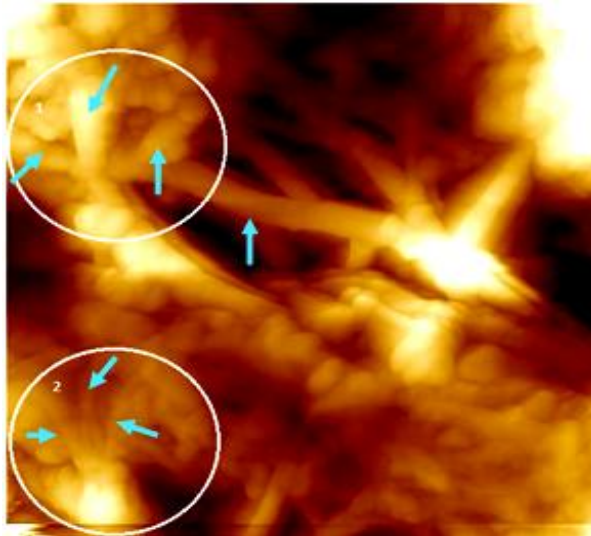


Figura 22. É notável a presença de manchas e fibras isoladas. A imagem foi feita sob varredura de 0,5 Hz num quadrado de lado 2,62 μm . As setas indicam formações fibrilares que se originam a partir de estruturas maiores.

Tomando como base a fibra maior disposta na diagonal (assinalada pela seta), observamos que as outras, duas a duas, estão unidas numa ponta, sendo que à medida que percorremos a fibrila, é nítida uma divergência, dando o aspecto de uma formação em “Y”. Complementando a imagem logo acima, temos uma imagem de amplitude capturada sob os mesmos parâmetros e na mesma região.

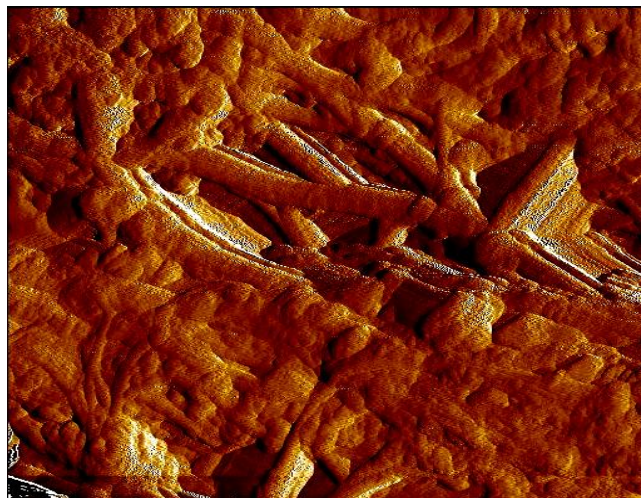


Figura 23. Capturada com área de 2,6 μm de lado e frequência de 0,5 Hz. A imagem de fase deixa evidente as disposições paralelas entre algumas fibrilas.

É importante sempre fazer imagens de uma área relativamente grande, para em seguida ir aplicando um *zoom* online compassadamente, a fim de que a região não seja perdida por causa do chamado *drift*. Assim, sempre iniciava as capturas em regiões quadráticas de 20 μm de lado. O lado poderia variar numa faixa de 20 – 10 μm para que começassem a aparecer as primeiras estruturas. Isso é devido à variabilidade no tamanho e aspecto das fibras.

Na Figura 24 destacamos uma região (assinalada pela elipse), onde temos uma fibrila na diagonal. Foi dado *zoom* neste ponto, que segue na Figura 25. Convém observar que escolhemos uma determinada região. Todavia, a Figura 24 deixa claro que toda a região tem um aspecto fibrilar.

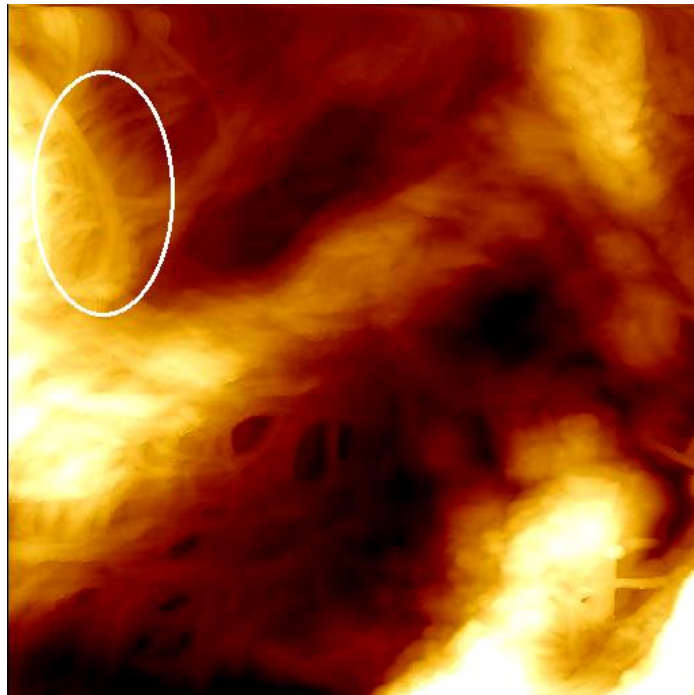


Figura 24. Região quadrática lado de 10,45 μm de lado do estroma corneano de um paciente de 60 anos. A frequência de varredura utilizada foi de 0,63 Hz.

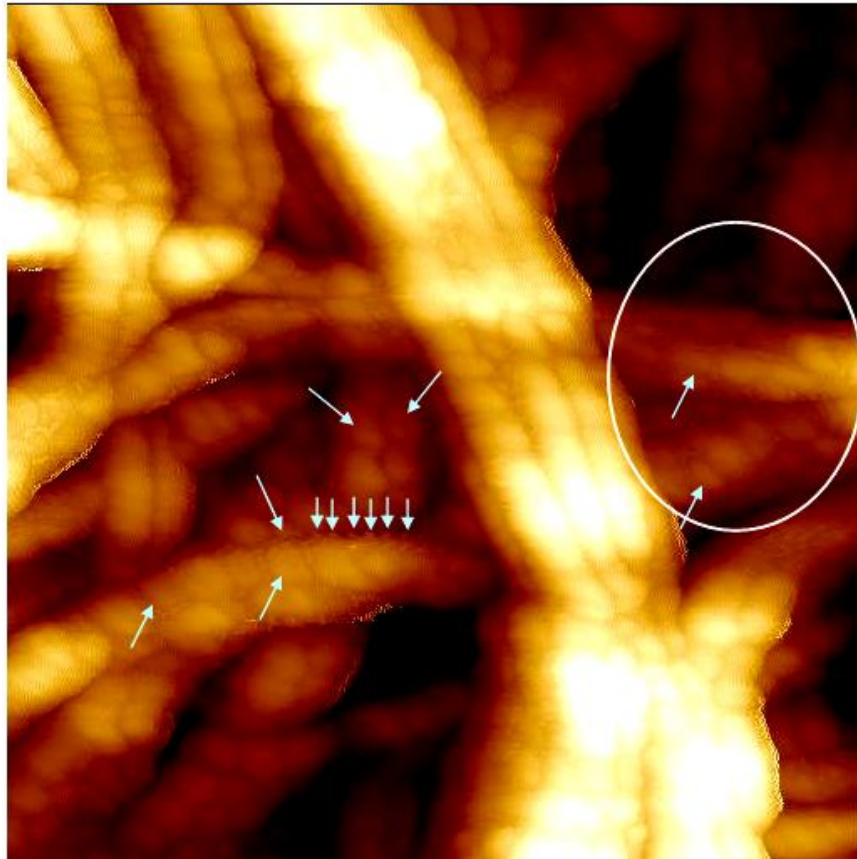


Figura 25. Região com área quadrática de $1,27 \mu\text{m}$ de lado. A frequência com a qual a sonda varreu foi de $0,46 \text{ Hz}$.

Na Figura 25 podemos visualizar claramente fibras predominantemente organizadas aos pares. Além disso, já aparecem também gomos com “dentes”¹ assinalados pelas setas à esquerda (Figura 25). A impressão é a de que são microfibrilas enroladas sobre a fibra maior. Se admitirmos isso, poderíamos também pensar que essas fibras menores estariam provocando uma torção nas fibras maiores. Portanto, todas estariam sofrendo uma tensão permanente, o que contribui para a alteração da elasticidade do tecido em geral.

A circunferência destaca uma região onde se vê dois cilindros “perfeitos”, o que dá a entender que as amarrações das microfibrilas são regulares, isto é, tem-se a formação de estruturas estáveis.

¹ Na verdade os dentes são fibras ainda menores de colágeno que envolvem as maiores. Essas fibrilas componentes são as fibrilas colágenas, que são compostas pela polimerização do tropocolágeno. Cada molécula de tropocolágeno mede cerca de 280 nm de comprimento por $1,5 \text{ nm}$ de espessura.

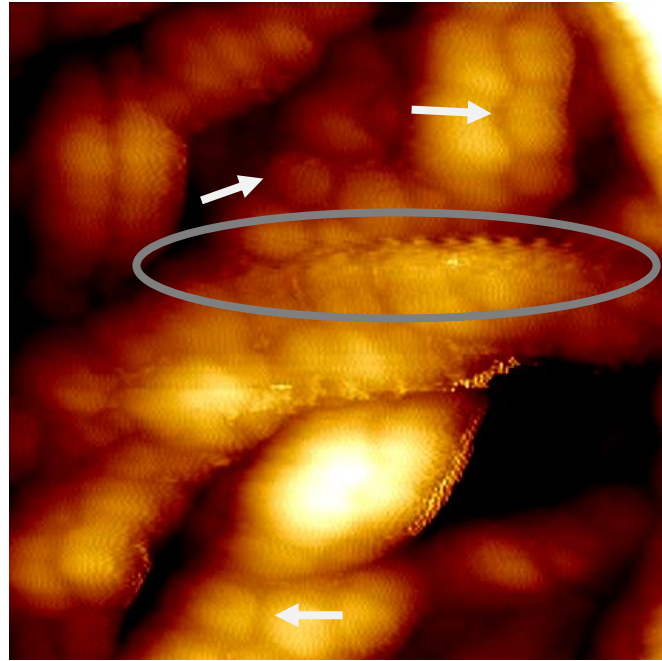


Figura 26. *Zoon online* da região de se evidencia os “dentes”. Os gomos indicados pelas setas são outra forma importante. A área da imagem é de um quadrado de 580 nm de lado, varrida numa frequência de 0,46 Hz.

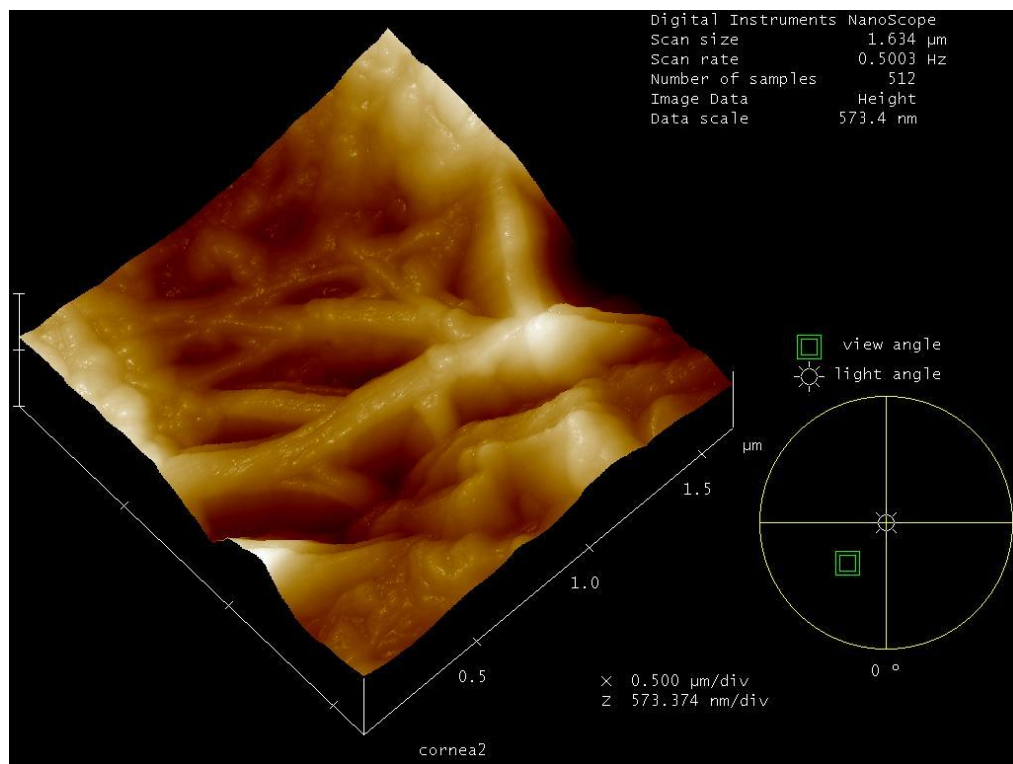


Figura 27. Imagem mostrando as ramificações existentes nas fibras colágenas da córnea. A organização em “Y” das fibras é bastante evidente.

Na Figura 28 acima temos uma versão em 3D, permitida pelo AFM, da estrutura. De modo geral, vemos mais uma vez a organização das fibras em “Y”. Nota-se também que , enquanto numa ponta há uma convergência, na outra as fibras encontram-se consideravelmente separadas, o que contribui para as formas em “Y”. Esse fato condiz com a retificação da antiga teoria de que as fibras eram dispostas de tal forma que se cruzavam perpendicularmente, além de iniciarem e findarem nas pontas da córnea; ou seja, que uma única fibra colágena percorre toda a extensão do tecido. Porém “A Teoria do Y” (dominação essa que estamos arbitrando, uma vez que não há indicação dessa nomenclatura na literatura ate o presente trabalho) indica que as fibras estão dispostas aleatoriamente.

N a Figura 28, exibimos o perfil da seção transversal da camada estromal de uma córnea de 60 anos, onde temos uma simetria entre os gomos, conforme já fora observado. Esse fato reforça a tese de que as estruturas formadas por uma suposta torção sofrida pelas fibras maiores é realmente estável. Além disso, observamos também que o diâmetro de uma fibrila foi de 69,990 nm, o que está de acordo com muitos trabalhos da literatura científica (YAMAMOTO *et. al.* 2000).

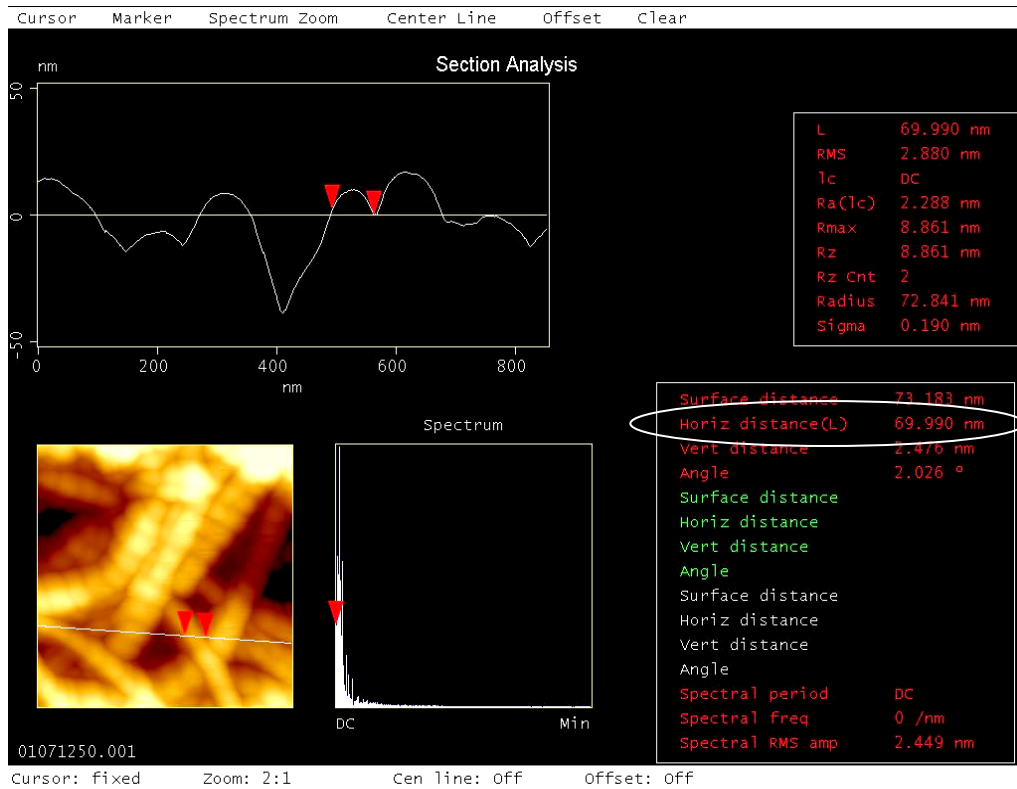


Figura 28. Seção transversal de uma córnea de 60 anos mostrando o diâmetro de uma das fibrilas, que foi de 69,990 nm.

A divisão encontrada, conforme a imagem da Figura 28 exibindo os gomos já era de se esperar, conforme temos na imagem 29 logo abaixo.

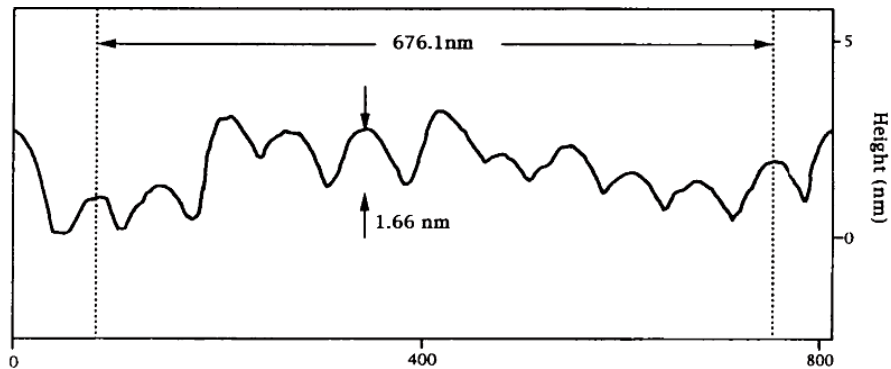


Figura 29. Os gomos estão igualmente espaçados, o que reforça a tese de um equilíbrio estável. Retirado de YAMAMOTO *et. al.* (2000).

Na imagem abaixo, Figura 30, temos algumas medidas dos espaçamentos longitudinais. A periodicidade encontrada, conhecida na literatura como periodicidade em D, exibe um caráter regular.

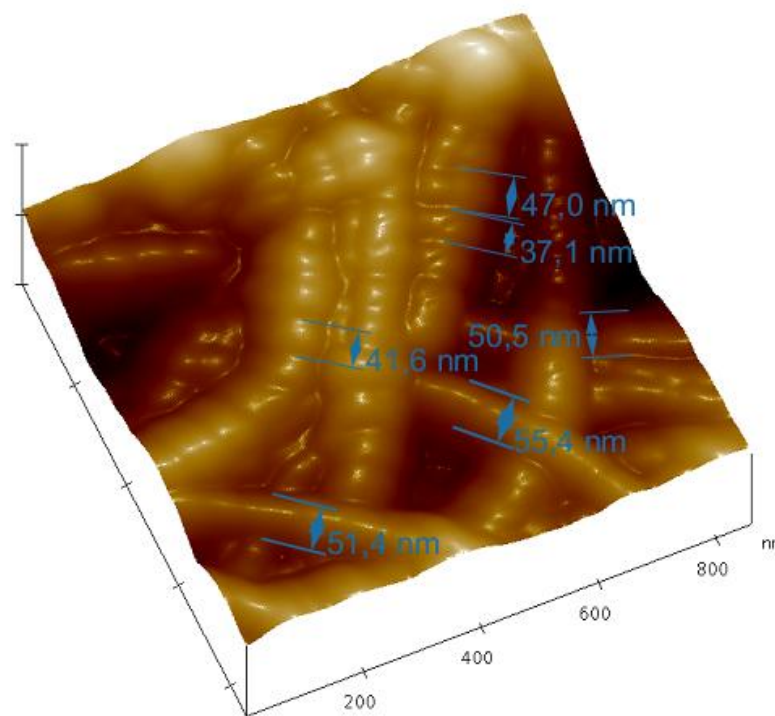


Figura 30. Imagem das fibrilas de colágeno com as medições da periodicidade em D e os diâmetros fibrilares para uma córnea de 60 anos.

O resultado encontrado para as medidas da periodicidade longitudinal bem como para os diâmetros das fibrilas de colágeno já era esperado, conforme Tabela 2.

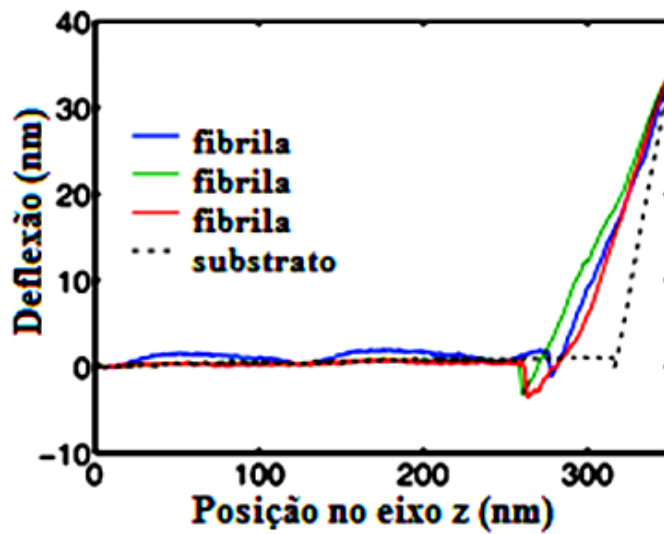
Author	Tissue	Technique ^a	D-periodicity (nm)	Diameter (nm)
Baselt et al. 1993	Native rat tail and reconstituted bovine dermal type I collagen	AFM	60–70	–
Fullwood et al. 1995	Bovine cornea, bovine sclera	AFM	20–60 55–67	35–48 up to 900
Gotoh and Sugi 1985	Rat tail collagen	Quick-freezing & deep-etching	64.2±0.9	318±12
Hirsch et al. 1989	Rabbit cornea	Quick-freezing & deep-etching	–	35
Hogan et al. 1971	Human cornea	EM	62–64	21–65
Jakus 1961	Human cornea	EM	55–60	160–340
Komai and Ushiki 1991	Human cornea, human sclera	EM	– –	20–35 20–230
Marshall et al. 1993	Human sclera	EM	65	–
Revenko et al. 1994	Rat tail tendon: native (n) and reconstituted (r) fibers	AFM	69–71 (n) 67 (r)	100–200 (n) 90–130 (r)
Spitznas et al. 1970	Rabbit sclera	EM	70	150–250
Spitznas 1971	Human sclera	EM	65	62–125
Yamabayashi et al. 1991	Rabbit cornea, rabbit sclera	Quick-freezing & deep-etching	62.0±2.8 67.5±1.4	40.6±5.0 217.3±50

^a EM, Electron microscopy; AFM, atomic force microscopy

Tabela 2. Valores para a periodicidade longitudinal e o diâmetro de fibrilas de colágeno de acordo com diversas técnicas. Extraído de: MELLER et. al. (1996).

7.2. Curvas de Força

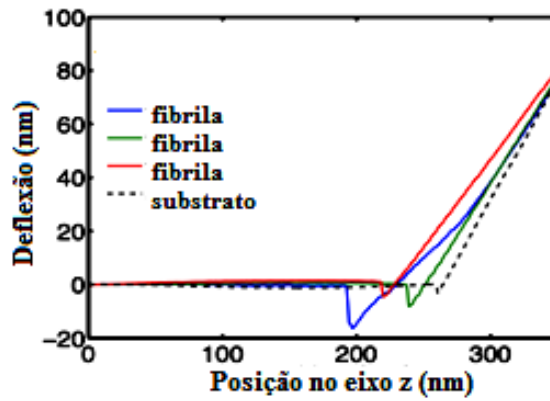
Nas curvas de forças obtidas inicialmente foi verificado que para sondas de constantes elásticas de 0,02, 0,08 e 0,15 N/m o tecido corneano se mostrou bastante rígida de modo que qualquer medida de dureza a partir dessas curvas de força daria o valor da própria constante de mola da sonda. Além disso, é evidente a pouca adesão. Abaixo temos curvas de força para um *cantilever* de 0,02 N/m em uma córnea de 60 anos. Logo abaixo das curvas de força mostramos as uma tabela com os dados de elasticidade correspondentes às curvas. O *trigger* para cada coluna corresponde ao valor que a sonda pode defletir em nanômetros sobre a amostra. Por exemplo, um *trigger* de 50 significa que a sonda pode defletir até 50 nm.



FIBRILA	TRIGGER 50	TRIGGER 100	TRIGGER 150
1	21.6 MPa	13.0 MPa	175 MPa
2	40.0 MPa	74 MPa	131 MPa
3	38.0 MPa	25 MPa	----

Figura 31. Curvas de força para a córnea de 60 anos usando-se uma sonda de 0,02 N/m. A tabela se refere às indentações com *triggers* diferentes.

Em seguida utilizamos uma sonda de 0,57 N/m para indentar na amostra de 20 anos. As curvas de força abaixo mostram uma rigidez do material. Isso nos dá dois indicativos: ou a sonda continua a ser sensível demais para a estrutura tão resistente às deformações ou (o que talvez seja mais plausível) houve ressecamento do tecido corneano, ocasionando perda das suas propriedades elásticas naturais.



FIBRILA	TRIGGER 50
1	0.5 MPa
2	0.7 MPa
3	0.6 MPa

Figura 32. Curvas de força para o tecido de 20 anos utilizando um *cantilever* de 0,57 N/m. Na tabela correspondente às curvas de força conseguimos obter apenas valores do módulo de Young para um *trigger* de 50.

8. CONCLUSÕES

O trabalho consistiu, sobre as propriedades elásticas, em indentar a superfície da amostra com sondas de constante elástica 0,02 e 0,57 N/m. Todavia, na literatura os trabalhos se concentram em descobrir o módulo de Young das fibras de colágeno separadamente. Sendo assim, eram encontrados valores que diferenciavam em várias ordens de grandeza (conforme Tabela e Figura 14). Para o módulo de Young da córnea de 60 anos foram encontrados valores de até algumas centenas de MPa, enquanto que para a córnea de 20 anos não chegamos sequer a 1 MPa. De acordo com o método de extração da elasticidade, pode-se encontrar módulos de Young que variavam desde 0,1 MPa até algumas dezenas de GPa. Todos esses valores totalmente discrepantes são para estudos em fibrilas isoladas, o que nos permite concluir que não conseguiríamos muita informação (como de fato aconteceu), pois estávamos indentando o tecido (um aglomerado de fibras).

Quanto a análise morfológica, obtivemos resultados mais consistentes e bem próximos aos da literatura científica. A princípio, observou-se que numa visão geral as fibras se dispõem de forma desorganizada. Entretanto, foi encontrada a um tipo de formação em “Y” que se repetia bastante ao longo das regiões. Esse fato se evidencia devido ao desentrelaçar das fibras de colágeno. Além disso, fazendo uma análise de apenas uma fibra, é bastante perceptível que há uma periodicidade axial. As fibras também se mostraram com um diâmetro constante, o que nos permite presumir que as fibrilas se entrelaçam igualmente, isto é, que a tensão em cada ponto ao longo da fibrila é a mesma.

Por fim, concluímos que o AFM é de fato uma ferramenta poderosíssima no estudo das propriedades mecânicas da córnea. Porém, vale ressaltar que o modo como as amostras são preparadas e analisadas são partes tão importantes quanto a própria medida da sonda.

REFERÊNCIAS

- AMELINCKX, S., D. van Dyck, J. van Landuyt, G. van Tendeloo, *Electron Microscopy – Principles and fundamentals*. Weinheim: VCH (1997).
- BELFORT, JR. R. KARA-JOSÉ, N. *Córnea clínica-cirúrgica*. São Paulo:Roca; 1996.
- BHUSHAN,B. *Springer Handbook of Nanotechnology*, Springer-Verlag Berlin.
- COSTA, A. S.; MAGALHÃES, S. M. M.; PITOMBEIRA, M. S.; FREIRE, J. A. K.; FREIRE, V. N.; BARRETO, M. S. F.; REBELO, L. M.; SANTOS, R. P.; FARIAS, G. A. Evaluation of red blood cells of healthy subjects and patients with myelodysplastic syndrome. *Microscopy and Microanalysis*. 11, 2005.
- COSTA, E. F. *Caracterização de células vermelhas por microscopia de força atômica*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2006.
- DANTAS, AM. *Anatomia funcional do olho e seus anexos*. Rio de Janeiro; Revinter,2002;80
- DULBECCO, R. et al. (1954): formação de placa e isolamento de linhas puras com vírus da poliomielite. In: *J. Exp. Med.* Vol. 99 (2), pp 167-182. PMID 13130792
- ELSHEIKH, A. et al. Characterization of age- related variation in corneal biomechanical properties. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 7, n. 51, p. 1475-1485, 2010.
- FEUK, T. On the transparency of the stroma in the mammalian cornea. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, vol. 17, No. 3, 1970.
- FARJO, A. McDermott M, Soong HK. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. In: Yanoff M, Duker JS, eds, *Ophthalmology*, 3a ed. St. Louis, MO, Mosby, 2008; 203–208.
- GRAHAM, J.S., Vomund AN, Phillips CL, Grandbois M. Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy. *Exp. Cell Res.* 2004; 299: 335-342.
- HANSMA, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. FRITZ, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley and V. Elings. Tapping mode Atomic Force Microscopy in liquids. *Appl. Phys Lett.*v. 64, n. 13, p. 1738-1740, 1994.

- KADLER, K. Extracellular matrix. 1: fibril-forming collagens. *Protein Profile* 1994 ; 1: 519-638.
- LEE, C.H., Single A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 2001; 221: 1-22.
- MAURICE, D. M. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res* 1970; 10:107–108.
- MARSHALL GE, Konstas AGP, Lee WR. Collagens in ocular tissues. *British Journal of Ophthalmol.* 1993,77:515-524.
- REINER M., BINGHAM E. C. The Deborah Number. *Physics Today*: 1928.
- PAIGE, M., J. Rainy, M. Goh, A study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy. *Micron* 32: 341-353 , 2001.
- PANDOLFI, A. A model for the human cornea: constitutive formulation and numerical analysis. Springer-Verlag, 2006.
- REBELO, L. M.; DE SOUSA, J. S.; MENDES FILHO, J.; RADMACHER, M. Viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypy measured with atomic force microscopy. *Soft Matter*. Submetido em 22 de dezembro de 2011.
- WIESENDANGER, R. *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994.
- SAMBROOK, Fritsch e Maniatis (1989) *Clonagem Molecular: Um manual de laboratório*, 2^a ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York, volume 3, apêndice B.12.
- SILVER, F.H., Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.* 2003; 36: 1529-1553.
- SMITH, JW. The transparency of the corneal stroma, 1969. *Vision Res* 9:393–396.
- SUN, YL, Luo ZP, Fertala a, Na KN. Direct quantification of the flexibility of type I collagen monomer. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2002**; 295: 382-386.
- VAN DER RIJT, van der Werf KO, Bennink ML, Dijkstra PJ, Feijen J. Micromechanical testing of individual collagen fibrils. *Macromol. Biosci.* 2006; 6: 697-702.

YANG, L. et al. Micromechanical Bending of Single Collagen Fibrils using AFM. J. Biomed. Mater. Res. A 2007; 82: 160-168.

YAMAMOTO, S., J. Hitomi, M. Shigeno, S. Sawaguchi, H. Abe e T. Ushiki: The Subfibrillar Arrangement of Corneal and Scleral Collagen Fibrils as Revealed by Scanning Electron and Atomic Force Microscope. Arch. Histol. Cytol., Vol. 63, No 2 (2000), p. 127-135.