



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências

Departamento de Física

Caracterização de Células Vermelhas por
Microscopia de Força Atômica

Erivelton Façanha da Costa

Dissertação apresentada ao Departamento de Física
da Universidade Federal do Ceará como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Dr. José Alexander de King Freire

23 de Agosto de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências

Departamento de Física

**Caracterização de Células Vermelhas por
Microscopia de Força Atômica**

Erivelton Façanha da Costa

Dissertação apresentada ao Departamento de Física
da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências

BANCA EXAMINADORA:

Dr. José Alexander de King Freire (Orientador, UFC)

Dra. Silvia Maria Meira Magalhães (UFC)

Dr. Ricardo Bentes de Azevedo (UnB)

23 de Agosto de 2006

*À minha mãe,
irmãos e amigos,
pois são tudo o que tenho.*

*"A superfície foi inventada
pelo diabo."
(Wolfgang Pauli)*

Agradecimentos

Ao professor Dr. José Alexander de King Freire, pelo apoio, orientação e incentivo à realização deste trabalho.

Às professoras Dra. Silvia Maria Meira Magalhães e Dra. Helena Pitombeira, pela co-orientação e encorajamento durante esta aventura da física em meio à medicina.

Ao professor Valder Nogueira Freire, pelas inspiradoras idéias e valiosas opiniões sobre este e outros trabalhos.

Ao professor Benildo de Sousa Cavada, do Departamento de Bioquímica, por disponibilizar o BIOMOL-LAB para a preparação das amostras.

À colaboradora no departamento de bioquímica, Raquel, a quem devo a paciência e presteza na preparação do sangue para os experimentos.

Ao professor Dr. Gil de Aquino Farias, pela liderança do grupo de pesquisa ao qual pertençaço.

Ao professor Dr. José Soares Andrade Jr., coordenador da pós-graduação do Departamento de Física.

Aos professores do curso de mestrado e graduação, pela valiosa formação.

À minha única irmã física, Luciana, a quem devo a companhia, toda a grande ajuda e as boas gargalhadas durante as horas cansativas de trabalho.

Aos caros amigos de laboratório Thiago e Marcelo. A este último, pelas valiosíssimas discussões sobre biologia.

À Sueli e Solenes, técnicos de laboratório de hematologia no HEMOCE - Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, pela atenção e ajuda na obtenção das amostras.

Ao Mestre Ricardo Pires dos Santos, pelas longas discussões sobre AFM e outros assuntos afins.

Às secretárias da pós-graduação, Ana Cleide e a Rejane, por toda ajuda quando necessário.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

À minha mãe, a quem eu devo a mais profunda gratidão e admiração. Sem o seu referencial de coragem e luta, certamente eu teria fraquejado durante as dificuldades desta jornada.

Aos meus irmãos, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todos os sentidos.

Resumo

A maneira mais difundida na observação de células sanguíneas (hemácias) é aquela que utiliza microscopia ótica convencional. Devido ao limite de resolução dos instrumentos óticos, novas técnicas de microscopia colocam-se como alternativas para o estudo de células, tais como: a microscopia eletrônica (de varredura e transmissão) e as técnicas de varredura por sonda. Inclui-se neste último grupo a microscopia de força atômica (AFM).

Este trabalho discute as possibilidades de uso da Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM) em ciências da vida, para ser mais específico, na caracterização de eritrócitos. Cinco experimentos envolvendo hemácias e AFM estão aqui descritos: diferenciação entre os grupos sanguíneos AB+ e O+; análise do perfil da membrana eritrocitária de indivíduos saudáveis e portadores de SMD; preparação de células vermelhas para análise em microscopia de força atômica; análise volumétrica de células vermelhas; e monitoramento do envelhecimento de um eritrócito ao ar usando o AFM.

No primeiro experimento, a rugosidade das membranas celulares dos grupos AB+ e O+ mostraram-se diferentes. Já no segundo experimento, depressões foram encontradas sobre a membrana de pacientes com SMD e indivíduos saudáveis, contudo, aparentemente mais profundas no primeiro grupo. O terceiro estudo trouxe à tona a importância da preparação adequada dos eritrócitos para medidas específicas em AFM. A quarta experiência comprovou a capacidade da técnica AFM de fornecer informação de volume, o que também foi utilizado no último experimento para monitorar o envelhecimento de uma hemácia ao ar.

Abstract

The optical microscopy is the most employed technique used for visualize red blood cells (RBCs). But, due to its resolution limit, it is necessary to use other complementary techniques to study the cells, such as: the scanning and transmission electron microscopy, and the scanning probing microscopy. The Atomic Force Microscopy (AFM) is included in the last group.

This work refers to the possibilities of using AFM in life science, focusing on the erythrocytes characterization. Five experiments involving red blood cells and AFM were carried out: AB+ and O+ blood types differentiation; RBCs membrane study of donors and patients with MDS (Myelodysplastic Syndrome); suitable preparation of red blood cells for AFM analysis; volume study of erythrocytes; and finally aging process observation of RBC in air.

The first experiment determined the cell membrane roughness for AB+ and O+ groups, which were different. For the second one, depressions were found on the cell surface of both MSD patients and healthy people. These "holes" were deeper in the first group. The third experiment showed the importance of sample (RBCs) preparation for each AFM specific analysis. The fourth experimental procedure showed the AFM technique capability for providing volume information, which was also used in the last experiment to monitor the aging process of RBCs in air.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Uma Breve História da Microscopia.	1
1.2	Poder de Resolução de um Microscópio Ótico.	6
1.3	Da Microscopia Ótica à Microscopia de Varredura por Sonda.	12
1.3.1	O Microscópio Eletrônico.	13
1.3.2	O Microscópio de Campo Iônico.	15
1.4	Os Microscópios de Varredura por Sonda.	16
1.4.1	O Microscópio de Varredura por Tunelamento.	17
1.4.2	O Microscópio Ótico de Varredura por Campo Próximo.	19
1.4.3	O AFM (Atomic Force Microscope).	23
1.5	O AFM em Biologia.	24
1.6	Síntese da Dissertação.	28
2	O Microscópio de Força Atômica - AFM.	31
2.1	O nascimento do AFM.	32
2.1.1	Forças em Nanoescala.	35
2.2	Aparato experimental.	38
2.2.1	O Scanner.	38
2.2.2	A Sonda.	40
2.2.3	O Sistema de Realimentação (<i>feedback</i>).	45
2.2.4	Modos de Operação do Microscópio de Força Atômica.	48
2.2.5	Preparação de amostras para varredura em AFM.	49
3	Eritrócitos sob a "ótica"AFM.	51
3.1	Análise de eritrócitos com AFM - Introdução.	52
3.2	Diferenciação de Grupos sanguíneos por meio de análise AFM.	53
3.2.1	Materiais e métodos.	54
3.2.2	Resultados.	57
3.3	Análise topográfica da membrana de hemácias via AFM - eritrócitos sadios <i>versus</i> SMD.	58
3.3.1	Materiais e métodos.	58
3.3.2	Resultados.	61
3.4	Preparação de eritrócitos para análise AFM - Introdução.	63

3.4.1	Materiais e métodos.	64
3.4.2	Resultados Método I - Sangue total.	67
3.4.3	Resultados Método II - NaCl.	67
3.4.4	Resultados Método III - PBS+ALB.	68
3.4.5	Resultados Método IV - PBS.	69
4	Análise volumétrica de eritrócitos com o AFM.	73
4.1	O VCM - Volume corpuscular médio.	74
4.2	Determinação do volume de partículas com o AFM.	77
4.3	Materiais e métodos.	80
4.3.1	Preparação da Amostra.	80
4.3.2	Análise no Microscópio de Força Atômica.	81
4.3.3	Análise quantitativa das imagens AFM.	81
4.3.4	Resultados.	82
4.4	Envelhecimento de eritrócitos ao ar - Introdução.	85
4.4.1	Materiais e métodos.	86
4.4.2	Resultados.	87
5	Conclusões e Perspectivas	91
	Referências	96
	Glossário	103
A	Tabelas de dados.	107
B	Apresentações em Conferências.	119
C	Artigos Publicados.	121
D	Aprovação do Comitê de Ética	123

Lista de Figuras

1.1	Máximo ângulo de abertura da lente objetiva de um microscópio ótico.	7
1.2	Formação da imagem através de uma lente num sistema ótico, como por exemplo um microscópio ótico.	8
1.3	Campo elétrico E incidindo sobre o plano $(x,y,0)$, propagando-se na direção z positivo.	9
1.4	Espectro de radiação eletromagnética.	14
1.5	Diagrama esquemático de um microscópio eletrônico de varredura.	16
1.6	Operação do microscópio de tunelamento (a) no modo corrente constante (a distância s não muda) e (b) altura constante (s varia).	19
1.7	Imagens com resolução atômica do Si(111) obtidas com o STM. (a) Primeira imagem da superfície de uma amostra de Si(111) 7x7 obtida por Binnig e Rohrer, inventores do Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM)(Retirado de G. Binnig and H. Rohrer, Rev. Mod. Phys. 59 , 615 (1987)). (b) Imagem da mesma superfície obtida com uma STM moderno (Retirado de Y. Chen, K. S. Schneider, B. G. Orr, M. M. Banaszak Holl, Phys. Rev. B. 70 85402 (2004)).	20
1.8	Foto de uma sonda SNOM vista com um microscópio ótico convencional. O raio da ponta é da ordem de 50nm. (Retirado de Dužan VOBORNIK's Thesis, SCANNING NEAR-FIELD INFRARED MICROSCOPY AND SPECTRO-MICROSCOPY APPLIED TO NANO-SYSTEMS AND CELLS (2005)).	22

1.9	Superfície sob análise em um microscópio de força atômica.[Adaptado de Nanotechnology: A Brief Overview, www.barrett-group.mcgill.ca-teaching-nanotechnology-nano02.htm].	24
1.10	(A) Imagem topográfica de um cromossomo humano após dissecação. (B) Imagem de microscopia eletrônica da sonda utilizada na dissecação. É visível o depósito de material biológico na ponta da sonda. A barra de escala indica $1\mu\text{m}$ [Retirado de Vesenka J, Mosher C, Schaus S, Ambrosio L, Henderson E., <i>Biotechniques</i> . 1995 19 (2) 852 (1995)].	26
1.11	(a) Sonda funcionalizada com a lectina HPL presa à sua ponta. (b) Evento de interação entre a sonda e uma célula vermelha do grupo A. Ao entrar em contato com a amostra, a sonda é repelida. Quando o scanner retrai-se, devido à adesão da lectina com a célula (atração), o cantilever é flexionado até que a força elástica rompe a ligação entre a lectina e a superfície celular (ruptura) [Retirado de M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit and H. E. Gaub., <i>J. Histochem. Cytochem.</i> 48 (5) 719 (2000)].	27
1.12	(a) Mapa de força de adesão entre a sonda e a amostra. Os pontos brancos correspondem a eventos de maior atração. Note que essas regiões demarcam a existência de células vermelhas do tipo A, como pode ser visto na imagem topográfica em (b). Barra de escala $5\mu\text{m}$. [Retirado de M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit and H. E. Gaub., <i>J. Histochem. Cytochem.</i> 48 (5) 719 (2000)].	28
2.1	(a) Varredura STM com a distância sonda-amostra s estável em materiais rígidos. (b) Materiais de baixa resistência mecânica levavam à instabilidade de s , logo, do sinal de corrente de tunelamento.	34
2.2	Gráfico do potencial entre dois átomos a distâncias microscópicas.	35
2.3	(a) Ciclo de força. (b) Gráfico de força correspondendo aos 5 pontos A-E do ciclo de força.	36
2.4	Camada de umidade contaminante sobre a amostra.	36

2.5	Medidas de força da interação entre uma sonda de nitreto de silício e uma superfície de mica em diferentes pHs. Note que para um pH baixo, existe uma atração forte entre a sonda e amostra. A situação é reversa para altos pHs, quando a repulsão entre íons domina. (Retirado de H. J. Butt, <i>Biophys J.</i> 60(26) , 1438 (1991)).	37
2.6	Diagrama esquemático do sistema de microscopia de Força Atômica	39
2.7	<i>Cantilever</i> (a) em forma de haste retangular e (b) em forma triangular. Nas duas figuras pode-se ver a ponta localizada na extremidade do cantilever. . .	41
2.8	Deflexão do cantilever devido às forças de interação sonda-amostra. (a) Atração à distância entre a sonda e a amostra. (b) Repulsão devido ao contato entre a ponta e a amostra.	41
2.9	(a) Perfil caracterizado com uma ponta de baixo <i>aspect ratio</i> . (b) A imagem resultante do processo de varredura em (a) pouco tem a ver com a estrutura real. (c) O mesmo perfil agora é caracterizado com uma sonda de alto <i>aspect ratio</i> . (d) Isso resulta numa aproximação maior com o perfil real da amostra.	43
2.10	A razão entre a altura (y) e a largura da ponta (x) determinam o <i>aspect ratio</i> da sonda AFM. Esta medida nos diz quão comprida é a ponta em relação a sua base.	43
2.11	(a) Exemplo de sonda de baixo aspect ratio DNP-S (Veeco Probes). (b) Sonda de alto aspect ratio TESPA-HAR (Veeco Probes).	44
2.12	Diferença entre a imagem obtida (linha pontilhada) de pequenos perfis de uma amostra quando caracterizados com sondas de raios de curvatura da ponta diferentes. (a) Pequeno raio de curvatura da ponta. (b) Sonda de raio de curvatura da ponta maior.	44
2.13	Esquema do sistema de realimentação do primeiro AFM. As duas técnicas funcionavam simultaneamente, o que experimentalmente trazia algumas dificuldades, entre elas, a de alinhamento entre a sonda AFM e a STM.	46

2.14	(a) Seguintos do fotodetector. (b) Campos A e B, cuja diferença de sinal fornece informao do deslocamento do cantilever na direo vertical z. (c) Campos B e C, cuja diferença no sinal fotoelétrico fornece informao de torço do cantilever na direo horizontal. (1-5) Funcionamento do sistema de <i>feedback</i> para controle do scanner na direo z.	47
2.15	Modo tapping de varredura.	49
3.1	Ilustrao da presença de antígenos na membrana de eritrócitos.	52
3.2	Imagem tridimensional de uma hemácia vista com o AFM.	53
3.3	Vista superior da membrana de uma hemácia com o AFM (rea 4.85 x 4.85 μ m) e zoom sobre a membrana (rea 1 x 1 μ m).	54
3.4	Preparao da amostra para análise AFM. (a) Coleta com capilar; (b) Deposio da gota sobre a lamínula; (c) Esfregaço com extensor; (d) Secagem da amostra.	55
3.5	Análise de rugosidade.	56
3.6	Diferença de rugosidade entre os dois grupos.	58
3.7	"Buracos" encontrados sobre a membrana celular.	59
3.8	Análise da seo transversal da membrana eritrocitária.	60
3.9	(a) Medida de profundidade (vertical) das depressões na membrana. (b) Medida do raio de abertura (horizontal) da depressão.	60
3.10	(a) Histograma com a frequência dos valores de profundidade (P) para 10 indivíduos sadios. (b) Histograma com a frequência dos valores de profundidade (P) para 8 indivíduos portadores de SMD.	61
3.11	(a) Histograma com a frequência dos valores do raio de abertura abertura (A) para 10 indivíduos sadios. (b) Histograma com a frequência do raio de abertura (A) para 8 indivíduos com SMD.	62
3.12	Ilustrao hipotética do filme de plasma sobre a hemácia.	64

3.13	Imagens AFM de células vermelhas numa amostra de sangue total (Área de varredura-50.2 x 50.2 μ m.) (b). Seção transversal da imagem precedente. (c) Um <i>zoom</i> sobre a membrana da célula (Área de varredura-2.5 x 2.5 μ m.) (d) Superfície do vidro (Área de varredura-2.5 x 2.5 μ m.)	68
3.14	(a) Imagens AFM de células vermelhas lavadas em NaCl (Área de varredura - 50.2 x 50.2 μ m). (b) Imagem feita sobre uma região do vidro, onde podemos ver pequenos cristais de sal (Área da imagem - 5 x 5 μ m). (c) Cristais encontrados sobre a superfície das células (Área da imagem - 5 x 5 μ m.) (d) Superfície celular livre do filme de plasma (Área da imagem - 1 x 1 μ m). (e) Reconstituição tridimensional da imagem anterior.	69
3.15	(a) Imagens AFM de células vermelhas lavadas em solução tampão de PBS contendo albumina 6% (Área de varredura - 50.2 x 50.2 μ m). (b) A forma circular e bicôncava foi preservada. (c) Partículas sobre a membrana celular (Área de varredura - 5 x 5 μ m). (d) Partículas sobre o vidro (Área de varredura - 5 x 5 μ m).	70
3.16	(a) Imagens AFM de células vermelhas lavadas em solução tampão de PBS (Área da imagem - 50.2 x 50.2 μ m). A forma das células foi novamente afetada. (b) Contudo, sobre a membrana não houve deposição de cristais (Área da imagem - 5 x 5 μ m). (c) Rugosidade característica da membrana celular (Área da imagem - 1 x 1 μ m). (e) Reconstituição tridimensional da imagem anterior.	71
4.1	(a) Normais, (b) hemácias microcíticas, (c) macrocitose e pleocarióticos, (d) macrocitose, (e) eliptocitose, (f) estomatócitos, (g) acantócitos (<i>spurr cells</i>), (h) esquistócitos [Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática Ed. Atheneu p.80 (2001)].	76
4.2	(a) Hemácias falciformes, (b) hemácias em alvo, (c) hemácias piriformes, (d) hemácias semilunares ou em capacete, (e) esferócitos, (f) hemácias crenadas (Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática Ed. Atheneu p.82 (2001)).	77

4.3	Partículas isoladas pelo plano <i>Threshold</i> de acordo com a altura dos pixels da imagem.	78
4.4	<i>Particle Analysis</i> . Os parâmetros métricos de cada partícula foram coletados individualmente (hemácia marcada em vermelho). No quadro inferior, pode-se ver os valores de altura (<i>Hight</i>) e área (<i>Area</i>) dos pixels selecionados.	79
4.5	Dimensões consideradas no cálculo do volume dos eritrócitos com o AFM: MH (Mean Hight) e MA (Mean area).	80
4.6	Imagens AFM de células vermelhas. (a) Hemácias macrocíticas , VCM = 105 fl. (b) Hemácias normocíticas, VCM = 88 fl. (a) Hemácias microcíticas, VCM = 67 fl.	82
4.7	Histogramas de frequência dos volumes para as amostras A[$VPM(AMF) = 19.98 fl$], B[$VPM(AMF) = 20.86 fl$], C[$VPM(AMF) = 22.94 fl$], D[$VPM(AMF) = 24.65 fl$], E[$VPM(AMF) = 25.73 fl$] e F[$VPM(AMF) = 28.78 fl$].	83
4.8	Relação entre o volume calculado via AFM (VPM-AFM) e o volume fornecido pelo contador de células vermelhas (VCM).	85
4.9	(a) Hemácia exposta ao ar - 0h. (b) Hemácia após 84h de exposição ao ar.	87
4.10	(a) Comportamento do volume do eritrócito exposto ao ar por 3.5 dias. (b) Primeira curva reportada deste mesmo experimento [Retirado de Y. Chen, J. Cai, <i>Micron</i> 37 339 (2006)].	88
4.11	Comportamento do volume do eritrócito em 24h de exposição ao ar.	89

Lista de Tabelas

1.1	Técnicas de microscopia, meio de operação e poder de magnificação.	23
2.1	Modelos de <i>scanners</i> tubulares e suas respectivas amplitudes laterais.	40
3.1	Rugosidade de uma área de $1\mu\text{m}^2$ sobre a superfície de eritrócitos dos grupos AB+ e O+.	57
3.2	Testes de normalidade com resultados aplicados às variáveis P e A.	63
3.3	Teste Mann-Whitney para as variáveis P e A entre os grupos: sadios e portadores de SMD.	63
3.4	Vantagens e desvantagens dos métodos de preparação de eritrócitos o AFM.	71
4.1	Formas anormais de eritrócitos e suas ocorrências [Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática Ed. Atheneu p.79 (2001)].	74
4.2	Parâmetros fornecidos pelo hemograma (Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática Ed. Atheneu p.83 (2001)).	75
4.3	Comparação entre os valores de VCM e VPM(AFM)	84
A.1	Valores das profundidades (P) dos buracos encontrados sobre a membrana de doadores e pacientes com SMD.	109
A.2	Valores das aberturas (A) dos buracos encontrados sobre a membrana de doadores e pacientes com SMD.	110
A.3	Valores de volume para a amostra A.	111
A.4	Valores de volume para a amostra B.	112

A.5	Valores de volume para a amostra C.	113
A.6	Valores de volume para a amostra D.	114
A.7	Valores de volume para a amostra E.	115
A.8	Valores de volume para a amostra F.	116
A.9	Valores de volume em 24h de envelhecimento.	117
A.10	Valores de volume em 84h de envelhecimento, com intervalos de 12h entre medidas.	117

1

Introdução

1.1 Uma Breve História da Microscopia.

Um observador interessado em examinar pequenos detalhes de um objeto traz o mesmo para bem próximo de seu olho, de forma que sua imagem pareça maior. À medida que o objeto é aproximado, sua projeção na retina vai aumentando de tamanho e permanece em foco até o ponto onde o cristalino pode garantir acomodação adequada dos raios. Além deste ponto, conhecido como ponto próximo, a imagem perde resolução e torna-se embaçada. Chegou-se ao limite da visão humana para pequenos objetos. Hoje, sabemos que uma simples lente convergente, também conhecida como lente de aumento, é capaz de contornar este problema. Contudo, o experimento descrito acima e a limitação imposta por ele tem grande chance de ter sido a motivação que levou as gerações passadas a concentrar esforços para entender e dominar os fenômenos óticos. Os primeiros artefatos da tecnologia ótica remontam à antiguidade (1200 AC), quando lemos no livro de Êxodo 38:8 que uma mulher doa o metal de suporte de suas lentes de enxergar para a confecção de um lavatório de metal usado em cerimoniais no tabernáculo [1]. Fisólofos gregos como Pitágoras, Demócritus, Empedocles, Platão, Aristóteles, dentre outros, apresentaram suas próprias teorias sobre a natureza da luz. Euclides (300 AC) registrou que conhecia o fenômeno da propagação retilínea da luz em seu livro *Catoptrics*. Uma lente convergente usada para concentrar os raios luminosos e produzir fogo é descrita por Aristófanes em sua peça *As Nuvens* (50 DC):

"...- Você já viu nas lojas dos droguistas aquela pedra, bonita, transparente, com a

qual se acende fogo?

- *Está falando do cristal?*

- *Sim. Ora, que aconteceria se eu a tomasse no momento em que o escrivão estivesse anotando a queixa, de longe, assim, parado diante do Sol, e fizesse derreter os documentos do meu processo?*

- *Você fala com sabedoria. Sim, pelas Graças!"*[2].

Os registros do historiador Plínio revelam que os romanos possuíam tais lentes. Mais que isso, exemplares de esferas de vidro e cristal, que provavelmente serviam ao propósito de acender fogueiras, foram encontradas entre ruínas romanas. Já o filósofo romano Seneca (3 AC - 65 DC) observou em sua obra que esferas de vidro cheias de água poderiam ser usadas como lentes de aumento. É possível que artistas romanos possam ter usado tais lentes para facilitar a confecção de trabalhos artesanais de grande precisão.

Com a queda do império romano (475 DC) marca-se o início da idade média. Neste período, o progresso científico estancou na Europa e muito do que já havia sido escrito pelos antigos foi esquecido em função do domínio da cultura cristã greco-romana. Contudo, a tomada de Alexandria pelos muçulmanos em 642 DC deu início à ocupação islâmica do ocidente. Pelo final do sétimo século, o império de Alá estendia-se da Pérsia à Espanha, passando por toda a costa sul do Mediterrâneo. O império árabe passou então a possuir o conhecimento do velho mundo e muito da sabedoria antiga foi traduzida e preservada. No que concerne aos avanços em ótica, Alhazen (1000 DC) deu sua contribuição para a lei da reflexão, colocando o ângulo de incidência e reflexão no mesmo plano normal à interface. Ele também ensaiou sobre espelhos parabólicos e esféricos, além de registrar uma descrição detalhada do mais comum e eficiente instrumento ótico, o olho humano.

A Europa começaria a sair de seu torpor intelectual pelo final do século XIII. Desta época, sabe-se que o trabalho de Alhazen fora traduzido para o latim, influenciando a obra do bispo de Lincoln Robert Grossete (1175-1253) e do matemático polonês Vitello. Posteriormente, seus estudos em ótica influenciaram o trabalho do franciscano Roger

Bacon (1215-1294). Acredita-se que partiu dele a primeira iniciativa de usar lentes para corrigir os problemas da visão humana. Bacon também sugeriu a combinação de lentes para a construção de um telescópio.

Após a morte de Bacon não há registros de outros estudos envolvendo ótica. Contudo, parece que seu trabalho serviu à popularização dos instrumentos óticos como por exemplo, os óculos como os conhecemos hoje. Datam da segunda metade do século XIII várias obras de artistas retratando monges usando óculos. Leonardo da Vinci (1452-1519) ensaiou sobre a câmara escura [3], popularizada posteriormente por Giovanni Battista Della Porta (1535-1615). Em seu livro *Magia Naturalis* (1589), Porta descreve a combinação de lentes convergentes e divergentes [4].

Os grandes avanços na ótica viriam apenas no século XVII. Quase que concomitantemente foram inventados o telescópio e o microscópio. O primeiro como instrumento de auxílio à visão do muito grande, ou do muito distante, enquanto o segundo à visão do muito pequeno. Tais instrumentos são provas da necessidade de ver além do que se vê. Não está claro quem construiu o primeiro telescópio, mas há registros de que em 2 de outubro de 1608, o fabricante de óculos holandês Hans Lippershev (1587-1619) requereu a patente do novo equipamento. Sabe-se que em Pádua, Galileu Galilei (1564-1642) ao tomar conhecimento da nova invenção, pôs-se a trabalhar na fabricação do seu próprio telescópio, o que conseguiu finalizar em alguns meses polindo as lentes à mão. Pelos mesmos tempos, o microscópio composto (*i.e.*, que usa duas ou mais lentes combinadas) foi construído pelo holandês Zacharias Janssen (1588-1632).

A partir de então, as modificações e descobertas viriam em turbilhão. Francisco Fontana (1580-1656) de Nápoles, substituiu a lente ocular côncava do microscópio por uma convexa. Uma modificação semelhante foi feita no telescópio por Johannes Kepler (1571-1630). Olhando para o céu com seu telescópio, Galileu descobriu as luas de Júpiter em 6 de janeiro de 1610. No mesmo ano ele conseguiu ver os anéis de Saturno. Ele também concluiu que o Sol possuía uma rotação pela observação de manchas que se moviam em sua superfície. Kepler publicaria seu livro *Dioptrice* em 1611, no qual relatava a descoberta da reflexão interna total. Também apresentou o tratamento

da ótica de primeira ordem para sistemas de lentes delgadas, além de descrever com detalhes o funcionamento do telescópio galileano (ocular divergente) e o kepleriano (ocular convergente). Em 1621 ocorre um dos grandes momentos no desenvolvimento da ótica moderna. Willebrord Snell (1591-1626), professor em Leyden, descobriu de maneira empírica a lei da refração.

Ao entender de maneira precisa como os raios de luz se comportam ao atravessar uma interface entre dois meios, Snell abriu de uma só vez a porta para o desenvolvimento da ótica moderna. Depois disso, o primeiro a publicar a lei da refração em termos de senos como a conhecemos hoje foi René Descartes (1596-1650) [5]. Também Pierre Fermat (1601-1665) formulou sua versão para a lei da refração. Este último propôs que a luz propagava-se de um ponto a outro tomando o caminho cujo tempo de percurso era o menor possível. Este é o famoso princípio do tempo mínimo.

Também digna de menção é a descoberta do fenômeno da difração (o desvio da luz de sua trajetória retilínea ao passar por um orifício ou obstáculo muito pequeno) pelo professor jesuíta Francesco Maria Grimaldi (1618-1663), em Bolonha na Itália. Ele observou bandas de luz (claros e escuros) na sombra de uma haste fina quando iluminada por uma pequena fonte de luz. Paralelamente, Robert Hooke, na Inglaterra, descreveu em seu famoso livro *Micrographia* (1665) padrões de interferência coloridos gerados por filmes finos. Hooke concluiu corretamente que tais padrões eram devidos à interação entre a luz refletida nas superfícies frontal e posterior do filme. Além disso, Hooke propôs a idéia de que a luz era um movimento vibratório rápido que se propagava num meio a alta velocidade. Propôs ainda que cada pulso ou vibração de um corpo luminoso geraria uma esfera. Foi o nascimento da teoria ondulatória da luz.

As realizações de Hooke em ciência não se restringiram apenas à física. Ele também contribuiu em áreas como paleontologia, química, meteorologia e biologia. Nesta última, seu livro *Micrographia* tem especial relevância [6]. Ao trazer descrições detalhadas de suas observações com o microscópio ótico de diversos sistemas biológicos como insetos, penas de aves, esponjas, etc., seu livro tornou-se um best-seller de seus dias. Uma de suas observações mais famosas é a de um fino corte de cortiça. Olhando

os poros no tecido da cortiça, Hooke descreveu:

"... estes poros ou células, foram de fato os primeiros poros microscópicos que eu já vi, ou que alguém já viu, isso porque ainda não encontrei nenhum escritor ou pessoa que os tenha mencionado." [7, 8]

De fato, esta foi a primeira vez que a palavra célula foi utilizada. Para ele, as células retangulares do tecido da cortiça lembravam as celas de um monastério (em inglês, as duas palavras têm a mesma grafia *cell*).

Apesar do *Micrographia* ter popularizado a microscopia como técnica, alguns atribuem ao holandês Antony van Leeuwenhoek o mérito de ter aplicado o microscópio ótico a estudos mais precisos de microsistemas. Leeuwenhoek, um comerciante de Delft, Holanda, não era rico, não tinha formação acadêmica e nem falava outra língua senão o holandês. Isso já o colocaria de antemão fora da comunidade científica. No entanto, sua determinação, curiosidade e a mente livre do pensamento científico dogmático da época, o levaram a grandes descobertas em biologia. Leeuwenhoek foi o primeiro a observar a vida em escala microscópica. Dentre suas descobertas estão: hemácias (tema deste trabalho), espermatozóides, protozoários e talvez a mais relevantes de todas, as bactérias.

Fabricante de suas próprias lentes e microscópios, ele conseguiu com acurácia e habilidade surpreendentes imagens com aumento de até duzentas vezes, enquanto o microscópio composto, inventado em 1595, cerca de quarenta anos antes de Leeuwenhoek nascer, era capaz de aumentos de apenas vinte a trinta vezes. Suas cartas, destinadas à Royal Society of London, eram traduzidas do holandês para o inglês e latim e só então publicadas no *Philosophical Transactions of the Royal Society*.

As descobertas de Antony mostraram ao mundo científico um mundo microscópico onde a vida também acontecia. Elas também renderam-lhe a ascensão a membro da Royal Society em 1680, ao lado de nomes como Robert Hooke, Henry Oldenburg, Robert Boyle, dentre outros. Contudo, ele jamais compareceria a nenhum dos encontros da sociedade. Após sua morte em 30 de agosto de 1723, o pastor da New Church em

Delft escreveu à Royal Society:

"Antony van Leeuwenhoek considerou que o que é verdadeiro em filosofia natural pode ser ainda mais frutífero se investigado pelo método experimental, suportado pelas evidências dos nossos sentidos. Por esta razão, com diligência e trabalho incansável, fez com suas próprias mãos lentes de considerável qualidade, com a ajuda das quais descobriu diversos segredos da natureza, agora famosos por todo o mundo filosófico."[9, 10]

Os microscópios óticos compostos da época de Hooke e Leeuwenhoek tinham poder de resolução similar aos atuais utilizados em laboratório. Isso mostra que apesar de a tecnologia de fabricação de lentes ter atingido considerável avanço, bem como os métodos de iluminação e captação da luz refletida pela amostra, o desenvolvimento da microscopia ótica atingiu um ponto de saturação. De fato, no século XIX, descobriu-se que os microscópios óticos têm um poder de resolução limitado, não importando quão excelente seja a fabricação de suas lentes ou as condições experimentais em que se observa a amostra.

1.2 Poder de Resolução de um Microscópio Ótico.

O poder de resolução de um microscópio ótico é determinado pela capacidade do mesmo de mostrar de maneira distinguível a imagem de dois pontos separados por uma distância d . Costuma-se considerar nesta definição o famoso critério de Rayleigh (1842-1919) [11]. Ou seja, a imagem de dois objetos é dita resolvida quando, o máximo do padrão de difração de Airy do primeiro ponto coincide com o primeiro mínimo do padrão de difração do outro ponto. Para muitos, o critério de Rayleigh é algum tipo de lei natural escrita por anjos em tábuas de ouro. Para o próprio Rayleigh, ele não passa de uma aproximação. Contudo, sabe-se que não foi o Lord Rayleigh o primeiro a anunciar o poder de resolução de um sistema ótico [12].

Em meados do século XIX Carl Zeiss (1816-1888) dirigia uma pequena fábrica

de microscópios em Jena, Alemanha. Naquela época, os microscópios ainda eram fabricados de maneira imprecisa e rudimentar. Logo Zeiss perceberia que o método tentativa e erro levava a avanços insignificantes. Foi quando em 1866 ele persuadiu o físico Ernest Abbe, então professor na Universidade de Jena, a trabalhar com ele e estabelecer bases científicas para o funcionamento do microscópio [13, 14]. Abbe foi o primeiro a definir a mínima distância transversal (D) entre dois objetos pontuais, a partir da qual os mesmos podem ser resolvidos numa imagem, como

$$D = \frac{1,22\lambda}{n_o \sin \theta_{max}} \quad , \quad (1.1)$$

onde n_o é o índice de refração do meio entre a amostra e a lente e θ_{max} é o ângulo máximo de abertura da objetiva (Fig. 1.1). Abbe descobriu por meio da experiência que uma grande abertura resultava em maior resolução, mesmo que o cone de luz incidente preenchesse apenas uma pequena porção da objetiva. De alguma maneira, a região escura ao redor do cone de luz estava contribuindo para a imagem.

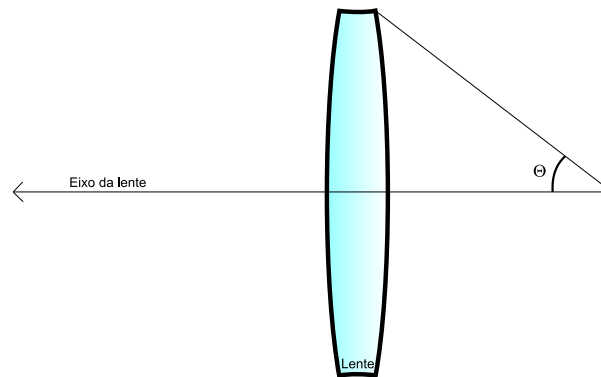


Figura 1.1: Máximo ângulo de abertura da lente objetiva de um microscópio ótico.

A Fig. 1.2 mostra uma fonte de luz coerente iluminando uma grade de difração, esta poderia ser, por exemplo, uma amostra de tecido sobre uma lamínula transparente. Observe que a abertura da lente não é suficiente para coletar toda a luz difratada, ou seja, a imagem não corresponde exatamente ao objeto observado. Na realidade, a imagem que se vê no plano I é resultado do padrão de difração coletado por L . Sabe-se que a porção de luz perdida está associada às ordens mais altas do padrão

de difração e a remoção desta porção de informação resulta exatamente na perda de definição e resolução da imagem. Do ponto de vista conceitual, a grade de difração G só poderia ser considerada estritamente periódica se ela tivesse uma largura infinita. Isto significa que na prática ela tem um espectro de Fourier contínuo, dominado pelos termos discretos da série de Fourier próximos à periodicidade considerada da grade, mais os termos de ordem maior, contudo, com amplitude menor. Assim, superfícies complicadas e irregulares naturalmente apresentarão um espectro de Fourier contínuo, logo, podemos concluir que desde que a lente objetiva de um microscópio ótico não tem uma abertura infinita, ela funciona com um filtro passa-baixa, rejeitando as frequências de ordem superior a uma dada frequência, deixando passar todas as outras abaixo. Conseqüentemente, qualquer lente real é limitada em sua habilidade de reproduzir as características de um objeto relacionadas às componentes de alta frequência da luz difratada pela amostra, quando sob iluminação coerente [15].

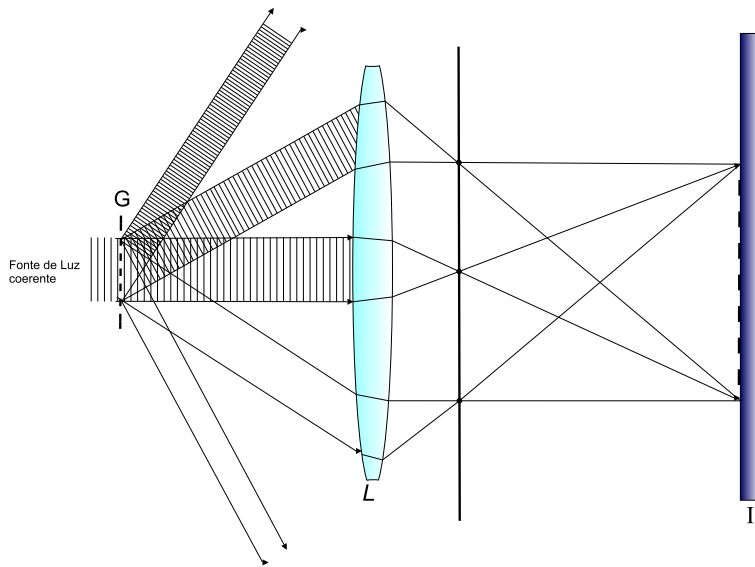


Figura 1.2: Formação da imagem através de uma lente num sistema ótico, como por exemplo um microscópio ótico.

Uma outra abordagem para o problema da resolução de um sistema ótico pode ser feita por meio da análise de Fourier [16, 17, 18]. Consideremos uma amostra sobre uma lamínula, sendo o plano da lamínula $(x, y, 0)$. Suponhamos que uma onda plana \vec{E}

incide transversalmente sobre o plano da lamínula, se propagando na direção positiva de z (Fig. 1.3). A transformada de Fourier em duas dimensões para o campo \vec{E} pode ser escrita como:

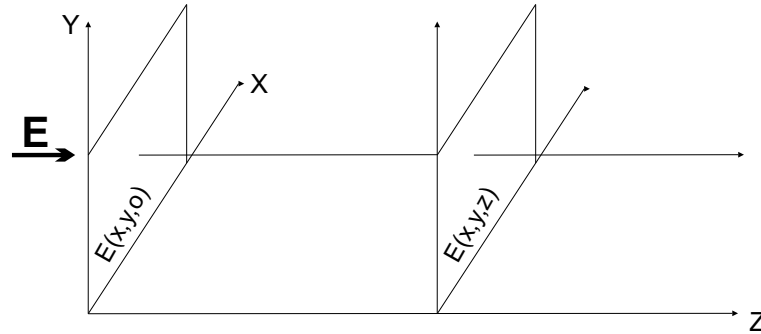


Figura 1.3: Campo elétrico E incidindo sobre o plano $(x, y, 0)$, propagando-se na direção z positivo.

$$\vec{E}(w_x, w_y) = \int \int \vec{E}(x, y, 0) e^{-2i\pi(w_x x + w_y y)} dx dy. \quad (1.2)$$

Na Eq.(1.2) w_x e w_y são as frequências espaciais das estruturas sobre o plano de incidência, as quais, de maneira geral podem assumir qualquer valor entre 0 e ∞ . Assim, $\vec{E}(x, y, 0)$ pode ser escrito em termos da sua transformada de Fourier inversa:

$$\vec{E}(x, y, 0) = \int \int \vec{E}(w_x, w_y, 0) e^{2i\pi(w_x x + w_y y)} dx dy. \quad (1.3)$$

O campo sobre o plano da amostra pode então ser considerado como a superposição de ondas planas propagando-se na direção dos vetores de onda:

$$\vec{k} = (\vec{k}_x, \vec{k}_y, \vec{k}_z) = (\alpha, \beta, \gamma) \frac{2\pi}{\lambda}, \quad (1.4)$$

cujos cossenos do ângulo de propagação são:

$$\alpha = \lambda w_x, \beta = \lambda w_y, \gamma = \sqrt{1 - \alpha^2 - \beta^2}. \quad (1.5)$$

De maneira semelhante a Eq.(1.3), o campo elétrico \vec{E} para a região $z > 0$ pode ser escrito como:

$$\vec{E}(x, y, z) = \int \int \vec{E}(w_x, w_y, z) e^{2i\pi(w_x x + w_y y)} dw_x dw_y. \quad (1.6)$$

Da eletrodinâmica, sabemos que considerando o meio de propagação homogêneo, isotrópico e linear, o campo elétrico \vec{E} deve satisfazer à equação de Helmholtz

$$\nabla^2 \vec{E} + k^2 \vec{E} = 0. \quad (1.7)$$

A aplicação direta desta condição ao campo da Eq.(1.6) nos leva à seguinte solução:

$$\vec{E}(w_x, w_y, z) = \int \int \vec{E}(w_x, w_y) e^{2iz\pi\sqrt{\frac{1}{\lambda^2} - w_x^2 - w_y^2}} dx dy. \quad (1.8)$$

Combinando as Eq.(1.8) e (1.6), obtemos o valor do campo elétrico para $z > 0$:

$$\vec{E}(x, y, z) = \int \int \vec{E}(w_x, w_y) e^{2i\pi(w_x x + w_y y + z\sqrt{\frac{1}{\lambda^2} - w_x^2 - w_y^2})} dw_x dw_y. \quad (1.9)$$

Têm-se então duas situações possíveis:

$$1 - w_x^2 + w_y^2 < \frac{1}{\lambda^2}.$$

Neste caso, o argumento da função exponencial na Eq.(1.8) é imaginário, o que corresponde a uma onda que se propaga no eixo z em direção ao plano de observação.

$$2 - w_x^2 + w_y^2 > \frac{1}{\lambda^2}.$$

Agora, a função exponencial na Eq.(1.8) tem um argumento real. Isto nos permite reescrever a Eq.(1.8) como:

$$\vec{E}(w_x, w_y, z) = \int \int \vec{E}(w_x, w_y) e^{-2z\pi\sqrt{w_x^2 + w_y^2 - \frac{1}{\lambda^2}}} dx dy. \quad (1.10)$$

Consequentemente, a amplitude da onda cai exponencialmente na direção de z .

Isto nos leva a crer que para frequências espaciais baixas, as ondas se propagam normalmente em z na direção do plano de observação. Estas ondas são conhecidas como componentes de campo distante (far-field) do espectro de frequência. Enquanto que as ondas devidas às altas frequências espaciais decaem exponencialmente ao se afastarem

da amostra, não atingindo o plano de observação. A região onde estas ondas podem ser detectadas é conhecida como campo próximo (near-field). Nesta região trabalha o SNOM, uma técnica de microscopia ótica que consegue atingir considerável resolução. Falaremos desta técnica mais adiante.

Num microscópio ótico convencional, as lentes estão localizadas numa região onde apenas as componentes de campo distante podem ser captadas. Como visto anteriormente, as únicas ondas captadas pela lente objetiva são aquelas limitadas pela abertura da lente. Na Eq.(1.1), o numerador $n_o \sin \theta_{max}$ foi chamado por Abbe de abertura numérica da lente, ou NA (*numerical aperture*). Considerando então que o índice de refração do ar n_o é igual a 1, e θ é $\theta(\vec{z}, \vec{k})$, as ondas captadas pela lente são aquelas que obedecem à seguinte condição:

$$\sin(\theta(\vec{z}, \vec{k})) < NA. \quad (1.11)$$

Agora, sabendo que para os cossenos direcionais definidos pela Eq.(1.5) vale a relação:

$$\theta = \arcsin \sqrt{\alpha^2 + \beta^2}, \quad (1.12)$$

concluimos por meio da Eq.(1.5) e (1.11) que:

$$\alpha^2 + \beta^2 < (NA)^2, \quad (1.13)$$

$$w_x^2 + w_y^2 < \left(\frac{NA}{\lambda}\right)^2, \quad (1.14)$$

$$\sqrt{w_x^2 + w_y^2} < \left(\frac{NA}{\lambda}\right). \quad (1.15)$$

Do lado esquerdo da Eq.(1.15) temos a frequência espacial da superfície da amostra em suas duas componentes dimensionais. Por definição, a frequência espacial é:

$$w = \frac{1}{\lambda_e}, \quad (1.16)$$

sendo λ_e o comprimento de onda espacial da amostra e $w = \sqrt{w_x^2 + w_y^2}$. Ora, λ_e é a distância no plano (x,y) da amostra entre, por exemplo, dois máximos do padrão regular de superfície, portanto podemos dizer que $\lambda_e = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$, o que nos deixa com:

$$\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2} > \left(\frac{\lambda}{NA}\right). \quad (1.17)$$

As Eq.(1.15) e (1.17) nos dizem que apenas frequências espaciais menores que NA/λ são detectadas, correspondendo a distâncias no plano (x,y) maiores que λ/NA . Logo, o máximo poder de resolução do microscópio ótico está limitado a λ/NA . Este resultado está de acordo com o que Abbe havia previsto experimentalmente, posteriormente também anunciado por Rayleigh [Eq.(1.1)]. Em termos práticos, isto significa que uma amostra iluminada com luz branca de comprimento de onda efetivo de 560nm, considerando a abertura numérica $NA=1.6$, o que se pode conseguir quando coloca-se óleo entre a lente objetiva e a amostra, a distância máxima resolvível é da ordem de 350nm. Para a ciência de hoje este é um limite absurdamente grande, uma vez que a escala de grandeza dos processos mais estudados atualmente estão dentro da escala de alguns nanômetros (nanociência).

1.3 Da Microscopia Ótica à Microscopia de Varredura por Sonda.

Uma forma de transpor o limite imposto pelo critério de Rayleigh é diminuir o comprimento de onda da radiação incidente sobre a amostra, mas esta não se mostrou uma boa saída experimental para o problema, como veremos adiante. De fato, as primeiras observações bem sucedidas em escalas atômicas só vieram depois de uma descoberta básica em mecânica quântica. Isto é, a de que a luz e a matéria exibem ambas as naturezas, tanto de partículas como de ondas. Em 1927 C.J. Davison e L.H. Germer confirmaram experimentalmente a natureza ondulatória do elétron. Eles

também constataram que elétrons de alta energia apresentavam um comprimento de onda menor que o de elétrons de baixa energia.

Estas descobertas, juntamente com o estabelecimento da ótica geométrica eletrônica, levaram à construção do primeiro microscópio eletrônico por E. Ruska e M. Knoll em 1931. Desde então, uma gama de tipos de microscópios foram desenvolvidos. Dentre os mais conhecidos poderíamos citar o Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM-Scanning Electron Microscope), o Microscópio de Transmissão Eletrônica (TEM - Transmission Electron Microscope), Microscópio de Campo Iônico (FIM-Field Ion Microscope) e os Microscópios de Varredura por Sonda (SPM-Scanning Probe Microscope). Neste último grupo estão inclusos o Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM-Scanning Tunneling Microscope), o Microscópio Ótico de Varredura de Campo Próximo (SNOM-Scanning Near-field Optical Microscope) e finalmente o Microscópio de Força Atômica (AFM-Atomic Force Microscope).

1.3.1 O Microscópio Eletrônico.

A solução imediata para o limite de resolução imposto pela Eq.(1.1) aos instrumentos óticos, era diminuir o comprimento de onda da radiação incidente sobre a amostra. Contudo, radiações acima do espectro de luz visível (Fig. 1.4) não funcionavam bem em microscopia. Por exemplo, o uso do ultravioleta apresentava problemas de absorção. Já os raios-X interagem fracamente com a amostra e com outros materiais, dificultando a fabricação de lentes e portanto levando a problemas de focalização. Estas dificuldades só puderam ser superadas com a invenção do microscópio eletrônico em 1931.

O princípio de funcionamento destes equipamentos é análogo ao de um microscópio ótico. Porém, ao invés de usar luz e lentes de vidro como meio de magnificação e focalização da imagem, o microscópio eletrônico utiliza um feixe de elétrons focalizado por meio de lentes magnéticas. Como seu princípio de funcionamento também obedece às leis físicas da ótica, ele também está sujeito ao limite de resolução imposto pela relação de Abbe [Eq.(1.1)]. A chave para sua maior resolução está na troca do uso de ondas eletromagnéticas, como elemento de interação com o sistema observado, por

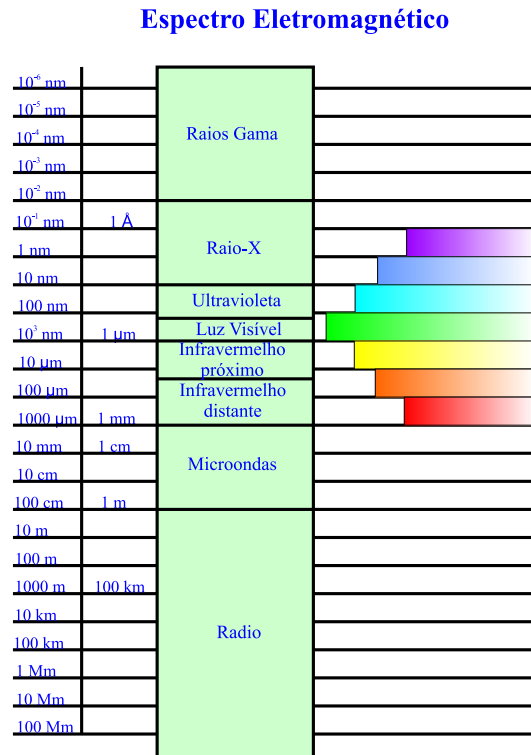


Figura 1.4: Espectro de radiação eletromagnética.

"ondas de matéria".

O conceito de "onda material" veio com a mecânica ondulatória, proposta por de Broglie em 1921 [19]. Segundo ele, uma partícula em movimento possui uma onda associada ao seu movimento, cujo comprimento de onda é dado por:

$$\lambda = \frac{h}{p}, \quad (1.18)$$

onde h é a constante de Planck ($4,135667 \times 10^{-15} \text{ eV}\cdot\text{s}$) e p é o momento da partícula.

Para um elétron em movimento, sua energia relativística é dada por:

$$E^2 = pc^2 + (m_r c^2)^2 = K + m_r c^2, \quad (1.19)$$

com m_r igual a massa de repouso do elétron ($9,11 \times 10^{-31} \text{ Kg}$), c é a velocidade da luz ($299.792.458 \text{ m/s}$) e K a energia cinética do elétron. Se isolarmos p na Eq.(1.19) e o substituirmos na Eq.(1.18), obtemos para o comprimento de onda do elétron a seguinte

expressão:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_r K(1 + \frac{K}{2m_r c^2})}}. \quad (1.20)$$

A pista que levou os físicos da década de 30 a construir um microscópio a partir de um feixe eletrônico está na equação acima. Ora, se submetermos um elétron a uma diferença de potencial de 100kV (o que não é difícil de se conseguir em laboratório), o mesmo ganhará energia cinética K suficiente para exibir comprimento de onda da ordem de $\lambda \simeq 0,0037\text{nm}$. Isto era suficiente para fazer crer que um microscópio eletrônico deveria ter um limite de resolução deveras maior que um microscópio ótico comum (que utiliza luz com λ da ordem de 550nm).

O esquema de um microscópio eletrônico de varredura está representado na Fig. 1.5. O equipamento é constituído basicamente por uma coluna mantida sob vácuo inferior a 10^{-4} Torr, onde existe na parte superior um filamento de tungstênio aquecido a 2700°K. O filamento é mantido a um potencial negativo da ordem de 40kV em relação ao anodo. Assim, os elétrons liberados pelo filamento aquecido são acelerados devido à diferença de potencial, ganham energia e viajam até a amostra. Durante o percurso, o feixe é focalizado pelas lentes magnéticas, como visto na figura. Tal diferença de potencial de 40kV, segundo a Eq.(1.20), é capaz de gerar elétrons cuja onda associada tem comprimento $\lambda \simeq 0,006018\text{nm}$.

1.3.2 O Microscópio de Campo Iônico.

Em 1951, E.W. Muller inventou o Microscópio de Campo Iônico (FIM - Ion Field Microscope) [20], um instrumento com altíssima sensibilidade para caracterizar superfícies. Nesta técnica, átomos de H_2 e He são ionizados próximo à amostra que deve ser preparada de forma que tenha o formato de uma ponta muito fina. O gás ionizado é então acelerado por um campo elétrico, atingindo posteriormente um anteparo que funciona como catodo do sistema. Então, uma imagem de campo iônico correspondente ao arranjo atômico da amostra é mostrada numa tela.

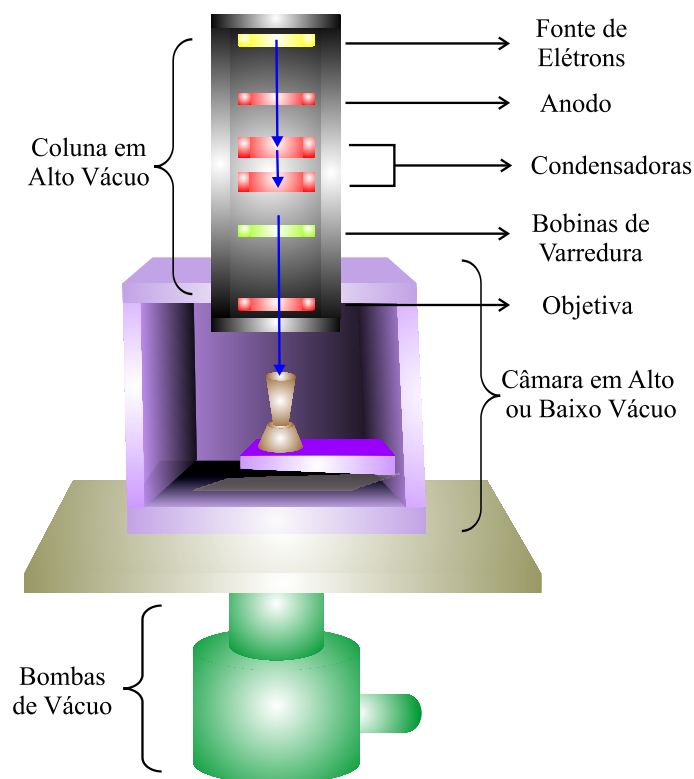


Figura 1.5: Diagrama esquemático de um microscópio eletrônico de varredura.

Para atingir a intensidade de campo elétrico necessária sobre a superfície, a amostra deve ser preparada na forma de uma ponta cuja curvatura deve estar em torno de algumas dezenas a centenas de Angstroms. Tal método de preparação da amostra, deveras complicado, aliado ao fato de requerer que o material analisado deve permanecer estável quando submetido ao intenso campo elétrico aplicado, limitaram muito o campo de aplicação da técnica FIM. Contudo, técnicas posteriores resolveriam o problema de preparação da amostra, das condições de análise e dos tipos possíveis de materiais por ela estudados [22].

1.4 Os Microscópios de Varredura por Sonda.

Existe uma diferença conceitual importante entre os microscópios óticos convencionais (incluindo os microscópios eletrônicos, já que eles funcionam por meio da ótica eletrônica) e os microscópios de varredura por sonda (SPM). Microscópios que utilizam

lentes (sejam elas magnéticas, elétricas ou de vidro) estão sujeitos ao limite de resolução de Rayleigh descrito anteriormente [Eq.(1.1)] causado pelo processo de difração dos raios (luminosos ou eletrônicos). No caso dos microscópios eletrônicos, seu grande poder de resolução é devido ao pequeno comprimento de onda atingido com elétrons de alta energia.

A microscopia de varredura por sonda representa uma maneira única de observar um objeto. Ao invés de colocar um detector numa dada posição distante da amostra com o objetivo de coletar a propagação de alguma quantidade física que carrega informações sobre a mesma (fótons, elétrons ou íons), o detector é colocado muito mais próximo à amostra, algumas vezes tocando-a. Microscópios convencionais utilizam lentes para magnificar a imagem da amostra, já um SPM usa uma sonda muito fina que varre a região de interesse, coletando informações ponto a ponto da superfície. Assim, o sinal gerado pela sonda localmente torna-se um pixel de uma imagem digitalizada.

1.4.1 O Microscópio de Varredura por Tunelamento.

O Microscópio de Varredura por Tunelamento (*STM - Scanning Tunneling Microscope*) foi inventado nos laboratórios da IBM por Derder Binnig e Heinrich Rohrer em 1981 [21]. Apenas em 1986 eles seriam reconhecidos para o prêmio Nobel em física por sua invenção. O STM usa os elétrons da própria amostra como geradores da informação sobre as estruturas da superfície analisada. Basicamente, ele fundamenta-se no controle de uma corrente de tunelamento I através de uma barreira de potencial entre a superfície investigada e uma sonda de metal. Se uma pequena tensão é aplicada entre a superfície da amostra e a ponta (teoricamente, o caso ideal seria uma sonda cuja ponta fosse um único átomo), uma corrente de tunelamento irá fluir entre as duas quando a distância de separação entre elas é reduzida a poucos diâmetros atômicos. A grande precisão desta técnica está associada à forte dependência (no caso exponencial) da probabilidade de tunelamento dos elétrons pela barreira de potencial, com a distância de separação sonda-amostra. Já é bem conhecido que a corrente de tunelamento I

se comporta de acordo com a expressão (a baixas tensões V_T e baixas temperaturas):

$$I = 18 \frac{V_T}{10^4 \Omega} \frac{k}{d} A_{eff} e^{-2kd}, \quad (1.21)$$

onde $2k^{-1} = 1.025\Phi^{1/2}[eV]$ e Φ é a função trabalho média, a qual se considera igual à altura média da barreira de potencial entre os dois eletrodos, $A_{eff} = \pi \times (1/2L_{eff})^2$ é a área efetiva, determinada pela resolução lateral $L_{eff} \approx 2 \times [(R_t + d)k]^{1/2}$, com R_t igual ao raio da ponta e d à separação sonda-amostra [22].

Para um metal típico ($\Phi \approx 5eV$), verificou-se que a corrente de tunelamento I muda em uma ordem de magnitude para uma variação de $\Delta d \approx 1\text{\AA}$. Se a corrente pode ser mantida constante dentro de uma margem de, por exemplo 2% (por cento), então a separação d permanece constante dentro do limite de 0.01\AA .

O STM pode operar de duas maneiras diferentes: com a corrente de tunelamento constante ou com a altura da sonda constante (Fig. 1.6). No modo de corrente constante (Fig. 1.6(a)), a sonda varre a superfície da amostra com a corrente de tunelamento mantida num valor que não se altera no tempo, previamente escolhido através da tensão de feedback V_z . No caso de uma superfície eletronicamente homogênea, uma corrente constante significa uma distância de separação d constante, logo, o perfil topográfico da amostra pode ser obtido através de uma varredura no plano (x,y) , obtendo-se a altura z da comparação dos valores V_z . A altura da sonda $z(x,y)$ é então gravada para cada ponto da superfície, processada por um computador e reconstruída num monitor. A outra maneira seria com a distância entre sonda e amostra constante. Neste caso, a sonda varre a amostra rapidamente com a tensão V_z aproximadamente constante, sendo a corrente de tunelamento monitorada durante todo o processo (Fig. 1.6(b)). As variações da corrente de tunelamento são então gravadas, processadas e então plotadas como função da posição da sonda no plano (x,y) .

Cada modo de operação tem suas vantagens e desvantagens. Quando criado, o modo de corrente constante foi principalmente empregado para ler superfícies que não eram atômicaamente planas. Assim, a altura dos caracteres da superfície poderiam ser obtidos por meio da tensão aplicada V_z e da sensibilidade (ou resposta) do elemento

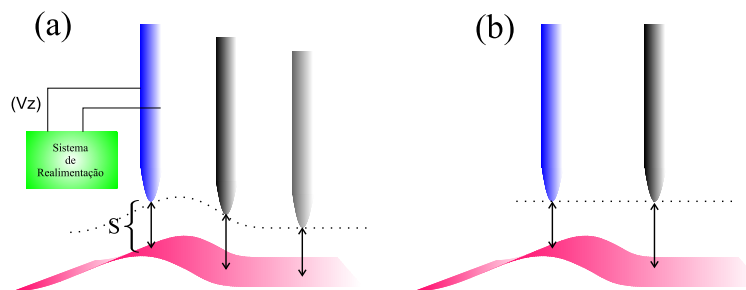


Figura 1.6: Operação do microscópio de tunelamento (a) no modo corrente constante (a distância s não muda) e (b) altura constante (s varia).

que controla o movimento da sonda sobre a superfície (scanner). A desvantagem deste modo de operação está no fato de que existe um tempo finito na resposta (feedback) do próprio sistema, o que impõe limites relativamente baixos para a velocidade de varredura. Já o modo de altura constante permite que se façam imagens de superfícies atômica e planas com grande rapidez, desde que o sistema não precisa responder à passagem de perfis com alturas discrepantes sob a sonda durante a varredura. A aquisição rápida de imagens é importante por permitir que pesquisadores estudem processos dinâmicos, bem como reduzir o tempo de aquisição de dados [22].

É patente que o desenvolvimento do microscópio de varredura por tunelamento aumentou consideravelmente a capacidade de observação de superfícies em escalas atômicas (Fig 1.7). Contudo, para o STM é imprescindível a natureza metálica da amostra para que se produza a corrente de tunelamento descrita acima. Sem dúvida, isso limita o campo de aplicação desta técnica, principalmente em ciências da vida, onde uma corrente elétrica sendo extraída da amostra certamente causaria danos irreparáveis. Tais problemas tiveram suas soluções com o aprimoramento da técnica de varredura por sonda, levando enfim à invenção do Microscópio de Força Atômica (AFM), que será discutido mais adiante.

1.4.2 O Microscópio Ótico de Varredura por Campo Próximo.

De acordo com o que foi discutido na seção 1.2, vimos que o poder de resolução do microscópio ótico é limitado a não mais que algo em torno de meio comprimento

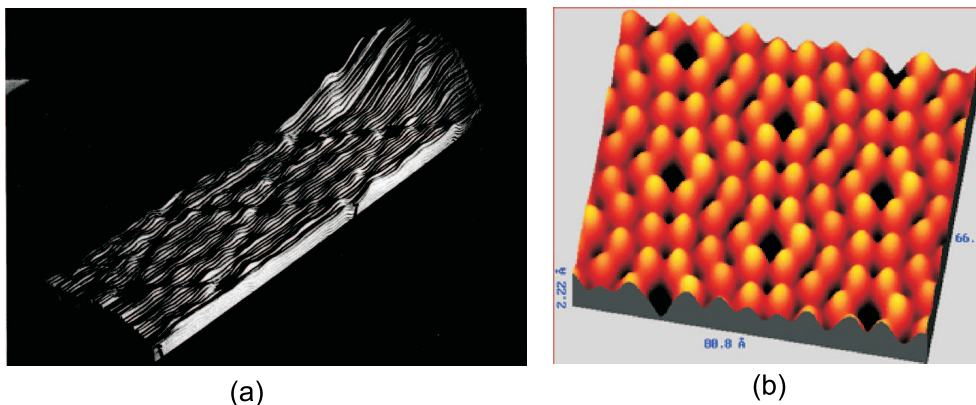


Figura 1.7: Imagens com resolução atômica do Si(111) obtidas com o STM. (a) Primeira imagem da superfície de uma amostra de Si(111) 7x7 obtida por Binnig e Rohrer, inventores do Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM) (Retirado de G. Binnig and H. Rohrer, Rev. Mod. Phys. **59**, 615 (1987)). (b) Imagem da mesma superfície obtida com uma STM moderno (Retirado de Y. Chen, K. S. Schneider, B. G. Orr, M. M. Banaszak Holl, Phys. Rev. B. **70** 85402 (2004)).

de onda da luz utilizada na observação. Paralelamente, através da análise de Fourier, verificamos que componentes de alta frequência da radiação espalhada pela amostra (que neste caso faz o papel da grade de difração) decaem exponencialmente na direção do observador. Isto que faz com que as informações carregadas por estas componentes não atinjam o detector de imagem (filme, olho humano, etc.). Desta maneira, captar estas componentes torna-se uma alternativa à melhora do poder de resolução do sistema ótico. Estas informações, antes perdidas, carregadas pelas componentes de campo próximo (*near field*) são a base de funcionamento do SNOM (*Scanning Near-field Optical Microscope*), ou Microscópio Ótico de Varredura por Campo Próximo.

Não raramente J. A. O’Keefe é citado como inventor do conceito de SNOM mas, de fato, não foi ele o primeiro a descrever um arranjo experimental capaz de aumentar a resolução do microscópio ótico. Em seu artigo de 1956 [23] O’Keefe lançou uma idéia geral de como tal arranjo experimental poderia operar, mas não contribuiu com nenhuma solução prática de como construir tal instrumento. De fato, em 1928, o irlandês E. Synge já havia descrito um esquema experimental onde o poder de resolução de um sistema ótico teria seu desempenho melhorado de uma maneira jamais vista antes, isso sem o auxílio de lentes convencionais [24]. Synge sugeriu o uso de uma

fonte de luz de grande intensidade colocada atrás de uma placa de metal com um pequeno orifício (cerca de 100nm de diâmetro) que funcionaria como uma fonte de luz pontual. Este orifício deveria então ser colocado a uma distância da amostra não maior que o diâmetro do orifício (ou seja, menor que 100nm). A imagem da amostra seria formada então pelas várias imagens obtidas por um fotodetector ponto a ponto. Assim, cada pequena imagem seria um pixel numa imagem maior. Segundo ele, a maneira de varrer esta amostra com tamanha precisão seria através de atuadores piezoelétricos [25]. Infelizmente, a tecnologia da época não era suficiente para atender às necessidades de Synge, portanto, seu trabalho caiu em completo esquecimento até que na década de 90 foi redescoberto pelo historiador D. McMullan, já após o desenvolvimento do primeiro SNOM.

Apesar da base teórica do SNOM ser conhecida desde o início do século XX, apenas na década de 70 foi realizado o primeiro experimento que confirmou as previsões de Synge. Em 1972, utilizando microondas de $\lambda = 3cm$ de comprimento de onda, Ash e Nicholas observaram pequenas linhas de alumínio depositadas sobre vidro, alcançando uma resolução de $\lambda/60$, comprovando assim a viabilidade da técnica [26].

A invenção do Microscópio de Varredura por Tunelamento na IBM em 1981 contribuiu decisivamente para o avanço de todas as técnicas de varredura por sonda. O problema até então era: como manipular com precisão nanométrica uma sonda sobre a região a ser estudada? Tal questão foi solucionado quando G. Binnig e H. Rohrer utilizaram cerâmicas piezoelétricas para construir um scanner capaz de movimentar-se com a precisão requerida. Finalmente, o SNOM passou a funcionar exatamente como Synge havia idealizado 53 anos antes. Dois grupos trabalharam paralelamente no desenvolvimento do aparelho. O primeiro, nos laboratórios da IBM em Zurique, liderado por D. W. Pohl [27], e o segundo na Universidade de Cornell em Nova York, então liderado por A. Lewis [28]. Apesar de designar o mesmo instrumento, o grupo europeu chamou-o de SNOM, enquanto o segundo chamou-o de NSNOM. Ambos utilizavam luz visível para iluminar a amostra, o que de certa maneira foi uma retomada da microscopia ótica convencional.

Atualmente o tipo de SNOM comercialmente mais comum é o que utiliza como sonda um guia de onda (fibra ótica) cuja ponta é muito pequena (Fig. 1.8), com uma abertura de ordem de tamanho menor que o comprimento de onda da luz utilizada. Esta ponta é colocada então na região de campo próximo (entre 0 e 10nm distante da superfície da amostra), onde ela coleta as ondas evanescentes da luz espalhada que carrega as informações sobre a amostra em nanoescala. Estas ondas são então conduzidas pela fibra até um detector localizado na região de campo distante, onde também fica a iluminação da amostra. Durante a varredura, a sonda mantém uma distância constante da amostra devido ao decaimento exponencial das ondas evanescentes, como já foi mostrado na seção 1.2. De outra maneira, a variação desta distância causaria efeitos de contraste que não corresponderiam aos caracteres reais da amostra.

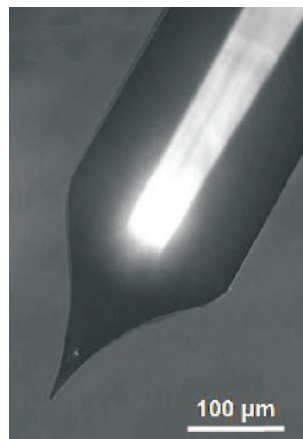


Figura 1.8: Foto de uma sonda SNOM vista com um microscópio óptico convencional. O raio da ponta é da ordem de 50nm. (Retirado de Dužan VOBORNIK's Thesis, SCANNING NEAR-FIELD INFRARED MICROSCOPY AND SPECTROMICROSCOPY APPLIED TO NANO-SYSTEMS AND CELLS (2005).

O SNOM descrito acima foi o primeiro tipo deste microscópio a ser desenvolvido na década de 80, e é conhecido como *aperture* SNOM. Uma outra variação deste instrumento foi criada na década de 90 e é conhecida como *apertureless* SNOM. A principal diferença entre os dois é que neste, a sonda, ao invés de fibra ótica, é feita de um material metálico, funcionando como uma antena que capta as ondas evanescentes do campo eletromagnético na região de campo próximo. Além desta diferença, deve-

se levar em conta que o poder de resolução do aperture SNOM está entre 20-150nm, enquanto o do *apertureless* SNOM chega a um intervalo de 5-30nm.

Nos parágrafos anteriores apresentamos algumas das técnicas mais conhecidas de microscopia de varredura por sonda. Elas tornaram-se assim famosas talvez por terem sido as primeiras a ser desenvolvidas e quebrar o limite de observação de estruturas minúsculas imposto pelo critério de Rayleigh. A tabela 1.1 reúne as técnicas discutidas até aqui, relacionando seu poder de magnificação, ambiente de operação e potenciais danos causados à amostra. Além destas, existem inúmeras outras técnicas que utilizam uma sonda como elemento sensor. Alguns exemplos são: EFM (Electron Force Microscope) capaz de mapear a estrutura eletrônica da amostra em estudo, MFM (Magnetic Force Microscope) que distingue as características magnéticas da amostra e o AFM (Atomic Force Microscope) que leva em conta as forças de interação atômica entre a sonda e amostra como princípio de operação.

Tabela 1.1: Técnicas de microscopia, meio de operação e poder de magnificação.

Microscópio	Magnificação	Ambiente de operação	Tipo de imagem	Danos causados à amostra
Ótico	$\times 10^3$	Ar, líquido	2-D	Nenhum
FIM (Field Emission Microscope)	$\times 10^5$	Vácuo	2-D	Graves
SEM (Scanning Electron Microscope)	$\times 10^6$	Vácuo	2-D	Algum
SPM (Scanning Probe Microscope)	$\times 10^9$	Ar, líquido, vácuo	3-D	Nenhum ou mínimo

1.4.3 O AFM (Atomic Force Microscope).

Inventado em meados da década de 80, o AFM tornou-se um dos instrumentos de maior importância em nanotecnologia. A possibilidade de uso em materiais diversos (orgânicos e inorgânicos) e sua grande resolução que chega a poucos nanômetros, o colocaram em evidência na pesquisa científica de inúmeras áreas que vão da biologia aos semicondutores [29].

Nesta pequena introdução, queremos apenas localizar o que será discutido mais adiante. Para tanto, a Fig. 1.9 mostra o esquema básico de um AFM. Basicamente, ele é constituído por uma sonda muito fina que varre a superfície de uma amostra guiada por um sistema mecânico, cuja base são cerâmicas piezoelétricas. Um feixe de laser incide sobre o *cantilever*, ou o braço de suporte da sonda. De acordo com a topografia acompanhada pelo cantilever durante a varredura, a deflexão do laser varia sobre um sensor denominado fotodetector. O sinal elétrico deste sensor é enviado a um sistema que interpreta estes dados e produz uma imagem tridimensional da amostra em estudo.

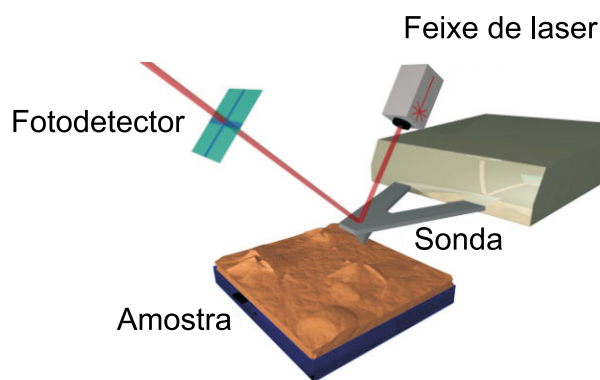


Figura 1.9: Superfície sob análise em um microscópio de força atômica.[Adaptado de Nanotechnology: A Brief Overview, www.barrett-group.mcgill.ca-teaching-nanotechnology-nano02.htm].

1.5 O AFM em Biologia.

O microscópio de força atômica, tem se tornado uma ferramenta de grande importância em ciências da vida, especialmente no que diz respeito à investigação de estruturas celulares com alta resolução [30]. Tais estudos morfológicos em escalas nanométricas, os quais eram impossíveis por meio da microscopia ótica devido à sua limitada resolução já discutida neste capítulo, agora são factíveis via AFM. As aplicações biológicas desta técnica vão desde a simples caracterização de uma superfície celular, até o monitoramento do funcionamento de sistemas vivos em tempo real

[31, 32, 33]. Uma vez que a capacidade de aumento alcançado pelo AFM pode chegar a 1.000.000.000 de vezes, moléculas de grande relevância biológica e as interações que ocorrem entre elas, podem ser observadas. Tal habilidade colocou o AFM na lista de ferramentas essenciais à pesquisa de proteínas [34, 35], monitoramento de interações do tipo receptor-ligante [36], interações moleculares de adesão celular [37] e interações do tipo antígeno-anticorpo [38, 39].

O principal fator que inseriu a microscopia de força atômica no rol de instrumentação em pesquisas biológicas foi a possibilidade de operar em meio aquoso, ou seja, num meio que mantém as características químicas e físicas próprias do ambiente nativo a que pertence o ente biológico em estudo [40]. Tais *insights* têm trazido à tona conhecimentos antes inacessíveis, tornando mais preciso o entendimento de sistemas biológicos já conhecidos.

A primeira manipulação controlada de biomoléculas foi realizada com material genético (DNA), retirado de uma cadeia cromossômica [41]. Localizado no núcleo das células eucarióticas, o DNA encontra-se agregado à proteínas estruturais, as histonas, formando as cromátides (ou braços do cromossomo), visíveis ao microscópio óptico somente durante a fase de divisão celular (mitose). O cálculo do volume de imagens topográficas de cromossomos de plantas [42], insetos [43, 44] e humanos [45, 46], adquiridas com o AFM, é útil na determinação do cariótipo destas espécies [47]. Na Fig. 1.10 vemos uma imagem AFM de um cromossomo isolado e depositado sobre uma superfície de mica. Utilizando o modo contato de varredura e aumentando a força gradativamente exercida pelo *cantilever* sobre a amostra até aproximadamente 5nN, foi possível dissecar DNA de um das cromátides, como está indicado pela seta branca (Fig. 1.11). Esta foi a primeira referência a um procedimento de dissecação em escala nanométrica [48, 49].

Medir a força que a amostra exerce sobre o *cantilever*, e vice-versa, é uma prática corrente com o AFM. Em ciências da vida, interações em nanoescala são lugar comum. Incontáveis processos biológicos como: duplicação de DNA, síntese de proteínas, interação com fármacos, dentre outros, são largamente governados por forças inter-

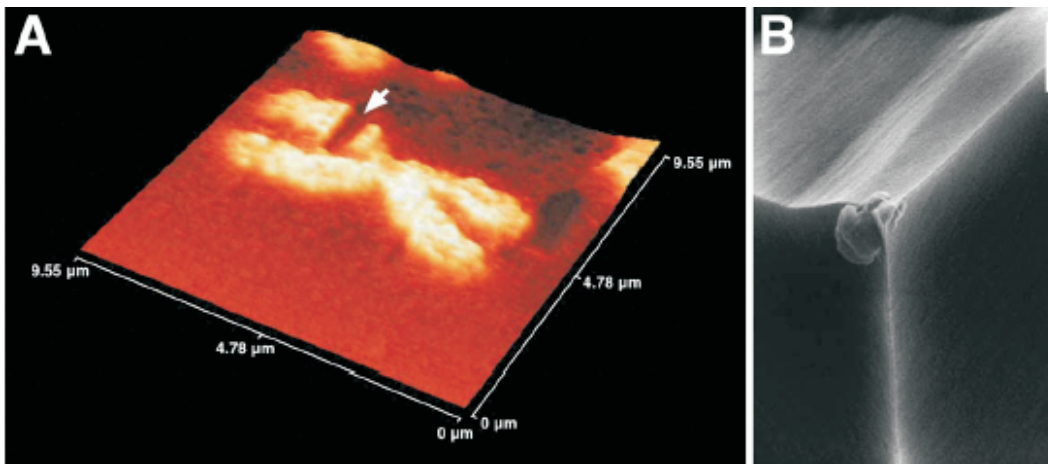


Figura 1.10: (A) Imagem topográfica de um cromossomo humano após dissecação. (B) Imagem de microscopia eletrônica da sonda utilizada na dissecação. É visível o depósito de material biológico na ponta da sonda. A barra de escala indica $1\mu\text{m}$ [Retirado de Vesenka J, Mosher C, Schaus S, Ambrosio L, Henderson E., *Biotechniques*. 1995 **19**(2) 852 (1995)].

moleculares. Com a sensibilidade que chega a dezenas de piconewtons, o AFM pode executar medidas nanomecânicas (como elasticidade, por exemplo) em espécimes biológicos. Destas medidas, pode-se obter informações a respeito de fenômenos como dinâmica celular e de proteínas. Forças entre grupos químicos específicos e interações de origem covalente entre a sonda e uma superfície já foram testados diversas vezes. Como exemplo desse tipo de medida, poderíamos citar uma aplicação direta em hematologia: o reconhecimento de proteínas específicas na superfície das hemácias.

O glicocálice, uma estrutura localizada na parte externa das células eucarióticas, é composto basicamente por carboidratos e proteínas (glicoproteínas). Este envelope externo tem várias funções interessantes. Uma delas é a repulsão entre células, evitando indesejáveis adesões [50]. São as glicoproteínas presentes no glicocálice que agem como intermediárias em processos de reconhecimento celular [51, 52, 53]. Estas interações são mediadas por uma família de proteínas receptoras chamadas lectinas. A lectina *Helix pomatia* (HPL) liga-se especificamente ao glicolípido galNAC (*N-acetylgalactosamine*), presente na superfície de células vermelhas do grupo A [58]. Na Fig. 1.11(a), vemos o esquema de uma sonda funcionalizada, cujo protocolo de funcionalização foi descrito por Grandbois [54]. Com a molécula de HPL presa à ponta da sonda, realizou-se

uma medida do ciclo de força, ou seja, aproximação-repulsão-extensão-ruptura, como mostrado na Fig. 1.11(b), sobre a membrana de uma hemácia pertencente ao grupo sanguíneo A, obtendo-se a curva de força para a interação sonda-amostra. Esta curva fornece facilmente a força de ruptura da ligação entre a sonda funcionalizada e a superfície celular.

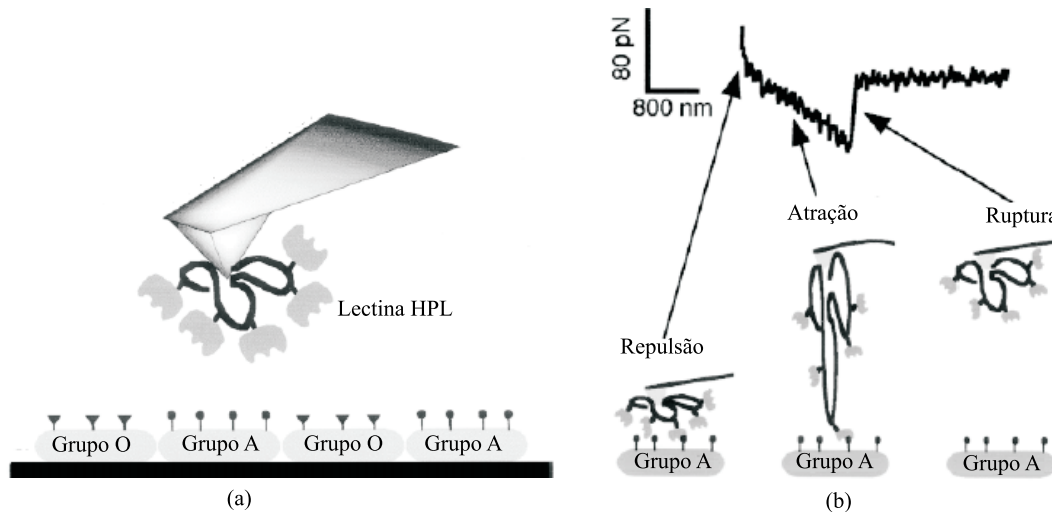


Figura 1.11: (a) Sonda funcionalizada com a lectina HPL presa à sua ponta. (b) Evento de interação entre a sonda e uma célula vermelha do grupo A. Ao entrar em contato com a amostra, a sonda é repelida. Quando o scanner retrai-se, devido à adesão da lectina com a célula (atração), o cantilever é flexionado até que a força elástica rompe a ligação entre a lectina e a superfície celular (ruptura) [Retirado de M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit and H. E. Gaub., *J. Histochem. Cytochem.* **48(5)** 719 (2000)].

A imagem da Fig. 1.12 foi obtida com o valor da força de ruptura calculada para cada ciclo de força numa matriz de 55x55 eventos de interação, sobre uma amostra onde haviam células vermelhas de dois grupos sanguíneos diferentes, A e O.

Os pontos brancos na imagem correspondem à maior adesão, enquanto os pontos pretos a nenhuma interação. Tal imagem de afinidade (entre a sonda funcionalizada e uma superfície biológica qualquer) é de grande valor para estudos de receptores existentes nas membranas celulares de tecidos.

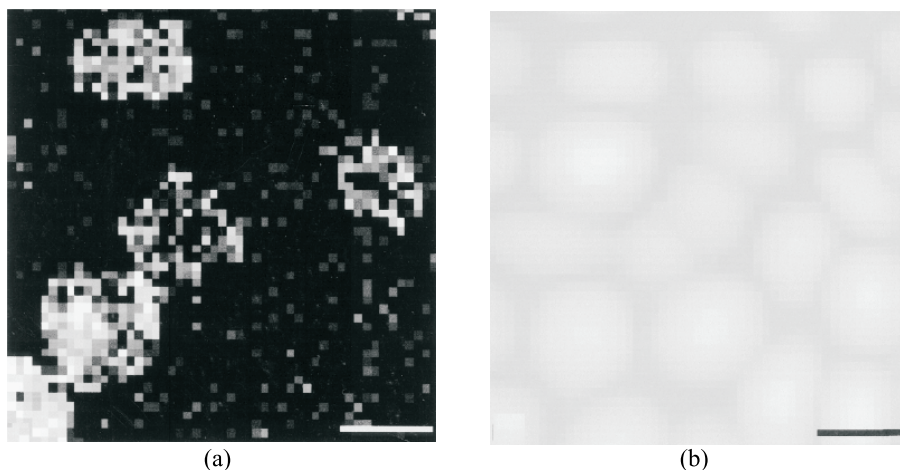


Figura 1.12: (a) Mapa de força de adesão entre a sonda e a amostra. Os pontos brancos correspondem a eventos de maior atração. Note que essas regiões demarcam a existência de células vermelhas do tipo A, como pode ser visto na imagem topográfica em (b). Barra de escala $5\mu\text{m}$. [Retirado de M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit and H. E. Gaub., J. Histochem. Cytochem. **48**(5) 719 (2000)].

1.6 Síntese da Dissertação.

O intento deste trabalho é aplicar a microscopia de força atômica no estudo de eritrócitos humanos. Uma vez capaz de resolver caracteres em escalas nanométricas [56, 57], o AFM guarda outras qualidades que o tornam ideal para a investigação de amostras biológicas como: não ser uma técnica invasiva, isto é, possibilita a observação de amostras frágeis sem que sejam destruídas e operar em meio líquido, condição relevante à manutenção da função e estrutura dos entes biológicos em estudo. Dentro desta ótica, este estudo investiga a estrutura externa (membrana) de células vermelhas, bem como alguns parâmetros métricos da célula (área e volume) com o AFM.

O capítulo 2 é uma revisão do funcionamento do microscópio de força atômica. Nele são vistos os principais componentes que constituem o microscópio, como: o scanner, o cantilever, a ponta, o sistema de realimentação e os modos principais de operação do AFM, ou seja, contato e *tapping*. De maneira breve, um pouco da história do desenvolvimento desta técnica também é apresentada.

No capítulo 3 descreve-se a diferenciação entre os grupos sanguíneos AB+ e O+ por

meio da análise de rugosidade da membrana. Também é sugerido o estudo de estruturas antes não observadas em microscopia ótica sobre a membrana celular, parecidas com "*buracos*". Estes foram observados em células de indivíduos sadios e daqueles portadores de SMD (Síndrome Mielodisplástica). A análise do perfil transversal destas estruturas é realizada.

Já no capítulo 4 verifica-se a capacidade do AFM em fornecer informação de profundidade. Quando observada ao microscópio ótico, as hemácias são avaliadas apenas a partir de suas imagens bidimensionais. Ao microscópio eletrônico elas podem ser caracterizadas em termos de volume, mas com a desvantagem de serem destruídas durante a varredura. Por isso, mostra-se que a microscopia de varredura por força (como também é conhecido o AFM) é uma alternativa viável à análise tridimensional de células, capaz de fornecer informações confiáveis de volume com a vantagem de causar danos mínimos ou quase nenhum, às amostras analisadas. Também no capítulo 4, o parâmetro volume celular é empregado no monitoramento do envelhecimento de um eritrócito exposto ao ar por um período de 84h (3,5 dias).

O capítulo 5 apresenta as conclusões e perspectivas dos experimentos realizados.

No anexo A encontram-se as tabelas com os valores das variáveis utilizadas nos capítulos 3 e 4.

Nos anexos B e C estão relacionados os trabalhos apresentados em conferências nacionais e internacionais e os trabalhos publicados, respectivamente.

Como a pesquisa desenvolvida neste trabalho envolveu a coleta de material biológico humano, o parecer de aprovação do comitê de ética e pesquisa está registrado no anexo D.

2

O Microscópio de Força Atômica - AFM.

Neste capítulo apresentamos um histórico compacto da microscopia de força atômica. O AFM, mais que um único instrumento, deve ser encarado como um sistema do qual fazem parte elementos que têm características físicas e operacionais bem distintas. Tais características são discutidas aqui com objetivo de definir de maneira clara os processos e as grandezas envolvidas durante a caracterização de uma superfície.

2.1 O nascimento do AFM.

Não é muito afirmar que o desenvolvimento do microscópio de varredura por tunelamento (STM) por Derder Binnig e Heinrich Rohrer em 1981 foi, sem dúvida, o caminho que levou à idealização e fabricação do microscópio de força atômica.

Para entender o fenômeno de tunelamento quântico, imaginemos que na superfície de um material os elétrons comportam-se como a água de um lago contornada pela margem. Da mesma maneira que a água penetra nas paredes do lago formando uma região de solo úmido, alguns elétrons na superfície da amostra podem formar uma nuvem ao redor do material. De acordo com a mecânica clássica, nenhum elétron poderia ser encontrado fora dos limites físicos da amostra devido à reflexão com as paredes do material. Já para a mecânica quântica, um elétron comporta-se como uma onda, logo, sua posição não está concentrada num ponto, mas sim espalhada por uma certa região do espaço. Isso faz com que os elétrons próximos às paredes da superfície possam ser encontrados fora do volume que os confina. A probabilidade de se encontrar estes elétrons na região externa à amostra cai exponencialmente com a distância à superfície. Comportando-se desta maneira, os elétrons parecem estar cavando túneis nas paredes do material por onde passam, atingindo regiões onde classicamente não existiriam, por isso este fenômeno é conhecido como tunelamento [21].

A primeira verificação experimental do fenômeno do tunelamento quântico foi feita por Ivar Giaever na década de 50, trabalhando para a General Electric [60]. Uma camada muito fina de material isolante rígido foi usada para separar duas placas metálicas (os eletrodos). O *gap* entre as placas era suficientemente pequeno (da ordem de 100\AA) para que houvesse uma leve superposição das nuvens de elétrons de ambos os eletrodos. Então, aplicando-se uma diferença de potencial, observava-se o fluxo de elétrons entre as duas nuvens.

A idéia original de Binnig e Rohrer não era construir um microscópio, mas sim realizar espectroscopia local por meio do fenômeno de tunelamento numa área menor que 100\AA de diâmetro. Contudo, esta idéia só foi desenvolvida posteriormente à invenção do STM por Lang [59]. O interesse principal da pesquisa girava em torno do estudo

de inomogeneidades em superfícies de filmes finos de óxidos crescidas sobre substratos metálicos, cuja aplicação principal estava na indústria eletrônica. O desafio era estudar estes filmes localmente, mas para isso faltava uma ferramenta apropriada. Assim, Binnig e Rohrer passaram a tentar desenvolver um instrumento capaz de realizar espectroscopia de tunelamento em vácuo. Até então, várias tentativas de construção do aparato experimental de tunelamento em vácuo já haviam sido feitas, mas sem grande sucesso [60]. Após algum tempo trabalhando no projeto, eles deram-se conta de que o novo instrumento pelo qual buscavam não seria capaz de fornecer apenas imagens espectroscópicas, mas também seria capaz de gerar imagens topográficas da amostra, ou seja, ele era um novo tipo de microscópio. A maneira de operar idealizada para o STM estava muito próxima a de um profilômetro [61]. Porém, no primeiro caso, ao invés de uma sonda em contato mecânico com a amostra, mantêm-se um pequeno *gap* de poucos angstroms entre elas. Este *gap* é controlado pela corrente de tunelamento que flui entre a superfície e a sonda. Anos antes, Young reportou um tipo de microscópio de emissão por campo conhecido como topógrafo [62], provavelmente o instrumento anterior mais próximo do STM, com a diferença de que a sonda localizava-se muito mais distante da amostra, além de ser aplicada alta tensão a fim de produzir uma corrente de emissão de campo no lugar de uma corrente de tunelamento, o que levava a uma resolução lateral comparada a de um microscópio ótico. Para solucionar este problema, Young sugeriu o uso de sondas mais finas, além de discorrer sobre as possibilidades do tunelamento em vácuo como uma possível ferramenta para estudos espectroscópicos.

Em 16 de março de 1981, a primeira curva característica da corrente de tunelamento I em função da separação sonda-amostra s foi obtida com o STM. Contudo, a dependência logarítmica da corrente com a distância não era uma prova suficiente do tunelamento em vácuo. De fato, a inclinação do gráfico de $\ln I$ versus s deveria corresponder à altura da barreira de potencial, algo da ordem de $\phi \approx 5eV$, o que correspondia à função trabalho dos materiais da sonda e da amostra [21]. Com dificuldade, Binnig e Rohrer chegaram a 1 eV, indicando tunelamento através de algum material isolante, e não através do vácuo como esperado. O problema foi solucionado

quando eles atentaram para o fato de que, a calibração da sensibilidade dos cristais piezoelétricos que faziam o movimento da sonda em relação a amostra, quando submetidos a variações de tensão rápidas e pequenas (exatamente a maneira como eles estavam operando os cristais), dava valores que correspondiam à metade daqueles informados pelo fabricante. Ou seja, a sensibilidade dos piezocristais era reduzida quando operados no regime requerido pelo STM, o que foi verificado posteriormente de maneira precisa por Otto no ETH em Zurich e por Vieira da Universidade Autônoma em Madri [63].

Outro fato observado durante a varredura com o STM foi que, quando a amostra era feita de algum material de resistência mecânica mais baixa, por exemplo, grafite, o sinal da corrente de tunelamento tornava-se instável. Só havia uma explicação para este fato: a separação sonda-amostra s deveria estar variando durante a varredura. Então, descobriu-se que quando o par sonda-amostra estava separado de apenas algumas distâncias atômicas, forças eletrostáticas e de origem interatômicas passavam a agir entre eles (Fig. 2.1). Estas forças não eram capazes de deformar sondas mais robustas ou amostras de material rígido. Contudo, a resposta de amostras feitas de materiais moles certamente deveria ser considerada [64]. A partir destas observações nasceu o conceito de AFM (*Atomic Force Microscope*).

Antes de discutir o aparato experimental utilizado neste trabalho, falaremos um pouco das forças envolvidas no fenômeno descrito acima, as quais são a base de funcionamento do AFM.

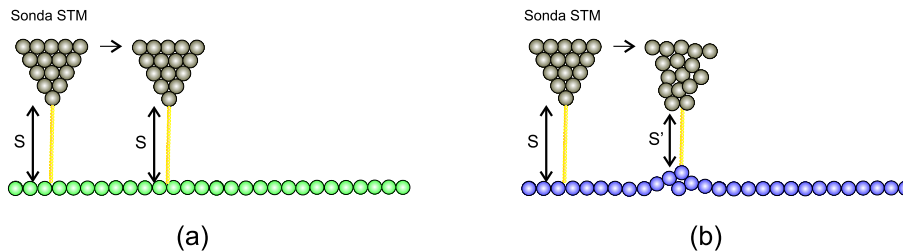


Figura 2.1: (a) Varredura STM com a distância sonda-amostra s estável em materiais rígidos. (b) Materiais de baixa resistência mecânica levavam à instabilidade de s , logo, do sinal de corrente de tunelamento.

2.1.1 Forças em Nanoescala.

A distâncias microscópicas, dentre as forças que agem entre dois corpos podemos citar:

- Forças eletrostáticas.
- Forças de polarização.
- Forças de natureza química (ligações covalentes e iônicas).
- Forças de van der Waals.
- Forças de repulsão (curta distância).
- Forças magnéticas.

O gráfico da força resultante destas interações é mostrado na figura 2.2.

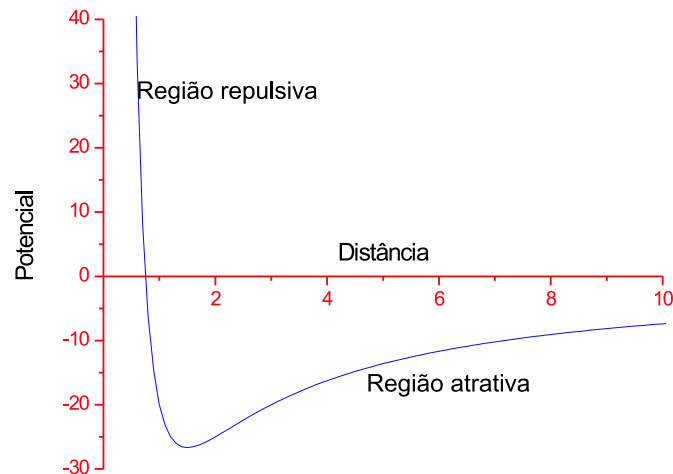


Figura 2.2: Gráfico do potencial entre dois átomos a distâncias microscópicas.

O perfil desta curva é originado por meio do potencial de interação entre dois ou mais átomos (potencial de Lennard-Jones). A medida que a distância entre os átomos diminui, a força fica cada vez mais atrativa. Se continuarmos a diminuir esta distância, cruzaremos um ponto em que, a força passa a ser repulsiva (note no gráfico que, neste ponto a distância entre os átomos ainda não é nula).

Um tipo de curva semelhante é obtido quando realizamos um ciclo de força com o AFM (Fig. 2.3(b)). Por ciclo de força, entendemos o processo de aproximação, atração,

toque, retração, atração e distanciamento (ver Fig. 2.3(a) A-E) da sonda em relação à amostra. Note que a sonda é suportada por uma haste flexível chamada de *cantilever*. Estes dois componentes são de extrema importância para o funcionamento do AFM. Sobre eles falaremos com mais detalhes adiante.

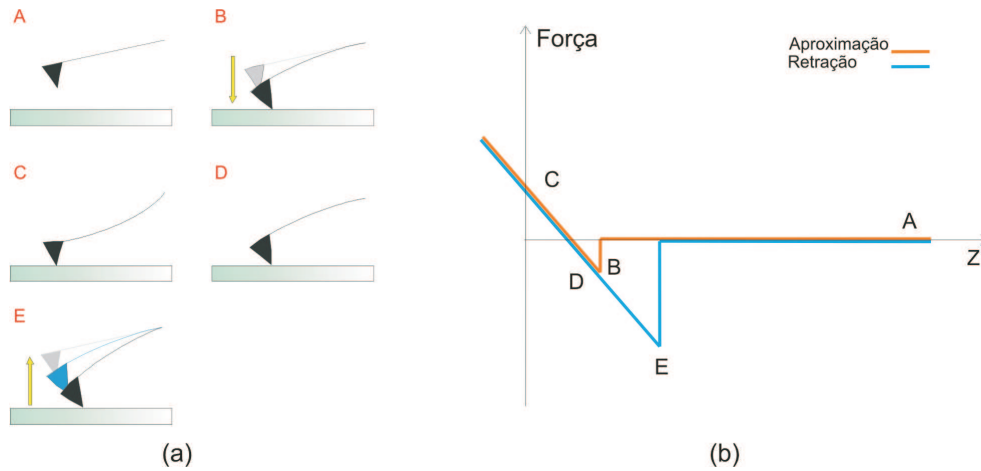


Figura 2.3: (a) Ciclo de força. (b) Gráfico de força correspondendo aos 5 pontos A-E do ciclo de força.

Ao realizar-se uma medida AFM em ar, devemos considerar a existência de uma camada de umidade sobre a amostra (Fig. 2.4). Tal camada forma uma ponte de capilaridade entre a sonda e amostra, gerando forças adesivas de grande intensidade. Essas forças causam problemas como redução da resolução da imagem, danos à amostra, à sonda e/ou introduz artefatos indesejados nas imagens [69].

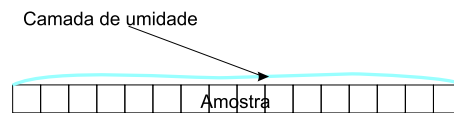


Figura 2.4: Camada de umidade contaminante sobre a amostra.

Este problema foi resolvido por Weisenhorn e Hansma da Universidade da Califórnia em Santa Bárbara(CA) [70]. Eles verificaram que a força de adesão entre uma sonda de nitreto de silício (uma das mais comuns em AFM) e uma superfície de mica, durante a varredura em ar, era da ordem de 100 nN. Contudo eles também descobriram que, uma

vez que a sonda está completamente imersa no líquido, a força de adesão é reduzida por um fator de 100 vezes, ou seja, a 1 nN.

Estas descobertas, além de aumentarem o poder de resolução do AFM, conferiram a ele a capacidade de operar em meio líquido. O teste de operação em meios fisiológicos foi então o passo natural. Assim, Butt e colaboradores verificaram que é possível controlar detalhes da interação sonda-amostra através do controle das propriedades do líquido no qual a medida é realizada [71]. Por exemplo: as forças de natureza eletrostática que atuam entre a sonda e a amostra dependem fortemente do pH ou da concentração de sal da solução, tal que o ajuste destes dois parâmetros pode anular as forças de Van der Waals por meio das forças de repulsão eletrostática (Fig 2.5). Esta possibilidade permite o ajuste, através do líquido de imersão, das forças de adesão entre o par sonda-amostra, minimizando interações indesejáveis, que em alguns casos, constitui perigo à integridade do espécime analisado.

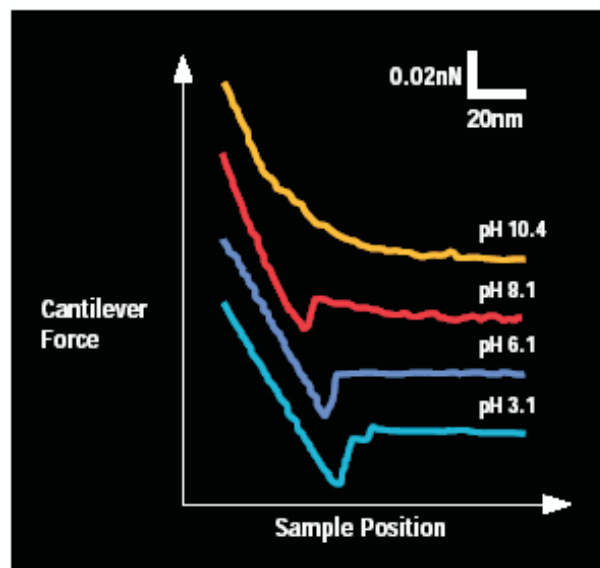


Figura 2.5: Medidas de força da interação entre uma sonda de nitreto de silício e uma superfície de mica em diferentes pHs. Note que para um pH baixo, existe uma atração forte entre a sonda e amostra. A situação é reversa para altos pHs, quando a repulsão entre íons domina. (Retirado de H. J. Butt, *Biophys J.* **60**(26), 1438 (1991)).

2.2 Aparato experimental.

A Fig.2.6 mostra o esquema do aparato experimental utilizado nas medidas deste trabalho. Poderíamos destacar quatro subsistemas do sistema principal que compõe o AFM. O primeiro deles é a sonda. Normalmente feita de óxido de silício, sua ponta tem um raio de curvatura da ordem de alguns nanômetros. Como veremos adiante, o formato da sonda tem papel fundamental na obtenção e qualidade das imagens obtidas pelo AFM. O próximo componente é o scanner. Feito de cerâmicas piezoelétricas, este componente realiza o movimento relativo, ou seja a varredura, entre a sonda e a amostra. Em alguns modelos a amostra permanece em repouso enquanto a sonda movimenta-se guiada pelo scanner, em outros ocorre o contrário, o que é o nosso caso. Também podemos citar o sistema de realimentação ou *feedback*. Composto por um feixe de laser, espelho e fotodetector, este sistema informa o deslocamento da sonda ao ser defletida devido à interação com a amostra. A quarta e última parte que compõe o sistema AFM é a unidade controladora, onde os parâmetros da medida como força aplicada, velocidade de varredura, modo de operação, dentre outros, são selecionados. Nesta unidade também processa-se as imagens com o *software* do microscópio Nanoscope 5.12r3.

À parte do AFM em si, pode-se ver na figura também o sistema de amortecimento sobre o qual está repousado o scanner. No início, quando da invenção do primeiro SPM, os problemas com vibração eram críticos e diversas soluções foram testadas a fim de bloquear os ruídos externos [64]. Aqui, utilizamos uma mesa suspensa por pistões pneumáticos alimentadas por gás nitrogênio.

2.2.1 O Scanner.

O scanner é um atuador mecânico formado por cerâmicas piezoelétricas. Mas o que são cerâmicas piezoelétricas? Materiais que apresentam piezoeletricidade são materias cristalinos capazes de produzir uma polarização elétrica, quando submetidos a um *stress*

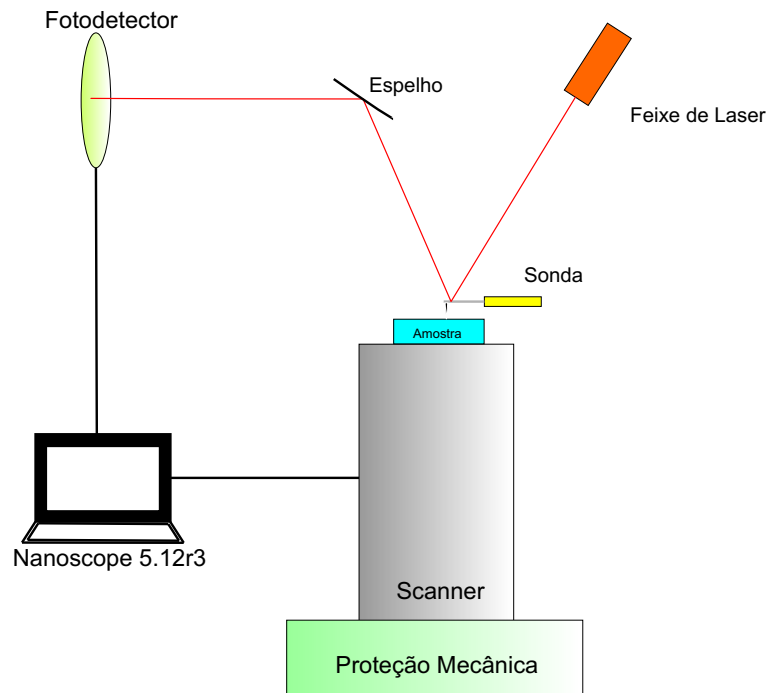


Figura 2.6: Diagrama esquemático do sistema de microscopia de Força Atômica

mecânico. O efeito inverso, denominado eletrostrição, também é observado, ou seja, aplicando uma tensão elétrica no cristal, o mesmo sofre uma deformação mecânica, mudando suas dimensões espaciais [65]. A piezoelectricidade está intimamente ligada à estrutura cristalina do material. Normalmente estes materiais não são isotrópicos, ou seja, não possuem um eixo de simetria em relação ao qual seja possível fazer a inversão de seus átomos. Devido a isso, surge uma polarização natural no material, que é uma das características principais de um cristal piezoelétrico. Materiais policristalinos originalmente isotrópicos podem receber esta polarização de maneira induzida através de um processo conhecido como *poling*, onde se aplica uma alta voltagem nas faces do cristal, suficiente para orientar seus momentos de dipólos elétricos.

Cada cerâmica piezoelétrica possui o seu próprio coeficiente de expansão. Este coeficiente nos permite calcular a deformação mecânica produzida pela aplicação de um potencial elétrico nas faces do cristal. Coeficientes típicos podem variar de 1 a 3000 $\text{\AA}/\text{V}$. Ou seja, se o coeficiente de expansão de uma cerâmica é $5\text{\AA}/\text{V}$, ao aplicarmos 10mV entre suas faces correspondentes, o material se expande 0.03\AA .

Dependendo da área a ser varrida durante a análise AFM, deve-se escolher um scanner com uma amplitude lateral apropriada. Chamamos de amplitude lateral a máxima distância que o cristal piezoelétrico pode se deslocar no plano (x, y) . Deve-se também observar a altura das estruturas que deseja-se estudar, desde que cada tipo de scanner possui também uma amplitude vertical, ou seja, uma distância máxima que o piezoelétrico é capaz de se deslocar na direção do eixo z . A tabela 2.1 mostra alguns tipos de *scanners* disponíveis comercialmente para o microscópio de força atômica e suas respectivas amplitudes.

Tabela 2.1: Modelos de *scanners* tubulares e suas respectivas amplitudes laterais.

<i>Capacidades dos Scanners para o Multimode -AFM</i>		
Modelo	Amplitude lateral	Amplitude vertical
AS-0.5 (“A”)	0.4 μm x 0.4 μm	0.4 μm
AS-12 (“E”)	10 μm x 10 μm	2.5 μm
AS-12V (“E” Vertical)	10 μm x 10 μm	2.5 μm
AS-130 (“J”)	125 μm x 125 μm	5.0 μm
AS-130V (“J” Vertical)	125 μm x 125 μm	5.0 μm
AS-200	200 μm x 200 μm	8.0 μm

Scanners com maior amplitude lateral (J por exemplo) são mais susceptíveis a ruídos causados por ondas sonoras, que aqueles com menor amplitude lateral. Isso deve-se ao fato de que os últimos possuem tamanho mais compacto e maior rigidez. Portanto, medidas atômicas devem ser realizadas com *scanners* de pequena área de varredura, já que os maiores necessitam de uma proteção extra e muitas vezes dispendiosa, contra ruídos (mecânicos e sonoros).

2.2.2 A Sonda.

A sonda é um dos componentes mais importantes do nosso sistema, pois depende principalmente dela, juntamente com o desempenho do *scanner*, a capacidade de “ver” um sistema em nanoescala. Desde agora é preciso definir duas partes básicas relacionadas à sonda utilizada no AFM. A primeira é o *cantilever* ou braço da sonda. A segunda é a ponta (ou ponteira) propriamente dita, como vemos na Fig. 2.7.

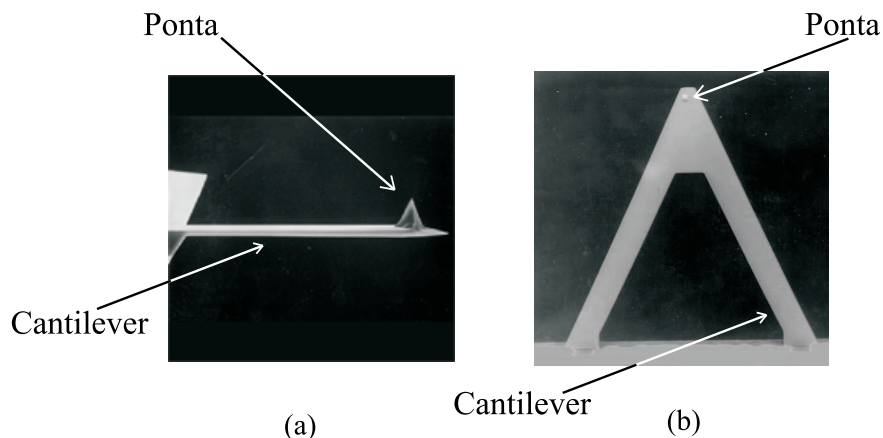


Figura 2.7: *Cantilever* (a) em forma de haste retangular e (b) em forma triangular. Nas duas figuras pode-se ver a ponta localizada na extremidade do cantilever.

O *cantilever* é uma haste (ou suporte) no qual está fixa a sonda. Os formatos mais comuns dos *cantilevers* utilizados em AFM são o triangular e em forma de haste, normalmente retangular (Fig. 2.7). Existem dois parâmetros importantes que devem ser lembrados a respeito de um cantilever. Um é a sua constante de mola e o outro é a sua frequência de ressonância.

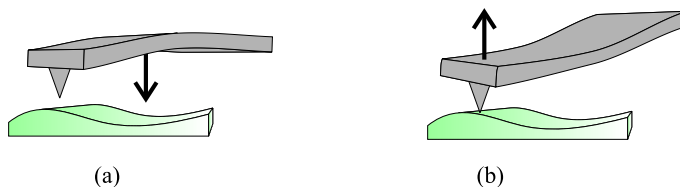


Figura 2.8: Deflexão do cantilever devido às forças de interação sonda-amostra. (a) Atração à distância entre a sonda e a amostra. (b) Repulsão devido ao contato entre a ponta e a amostra.

A Fig.2.8 ilustra a deflexão de um cantilever quando sujeito a uma força externa. Esta pode ser atrativa ou repulsiva, dependendo da distância que a sonda encontra-se da amostra e tem sua intensidade dada pela lei de *Hooke*:

$$F = kx, \quad (2.1)$$

onde x é a deflexão do cantilever e k é sua constante de mola. De maneira geral, ao fabricar-se um *cantilever* de grande sensibilidade para uso em AFM, é preciso que este

seja capaz de sofrer grandes deflexões para pequenas forças aplicadas. Isso quer dizer que a "mola" deve ser tão macia quanto possível, ou seja, sua constante k precisa ser a menor possível. Contudo, a sonda também deve ter uma certa imunidade a frequências de ressonância mecânicas (vibrações de baixa frequência como o som ambiente), logo, ela deve ter uma frequência de ressonância própria alta. Ora, da mecânica clássica sabemos que a frequência de ressonância de uma mola é dada por:

$$w = \left(\frac{k}{m}\right)^2. \quad (2.2)$$

Isto quer dizer que para um k relativamente pequeno, só conseguimos uma frequência de ressonância alta se a massa m do *cantilever* for bem pequena. Por isso, os *cantilevers* só podem ser produzidos com técnicas de microfabricação. Normalmente *cantilevers* são feitos de óxido de silício, silício puro ou nitreto de silício (Si_3N_4).

Qual *cantilever* usar numa medida depende da amostra a ser analisada e do que se quer medir. Por exemplo, para amostras biológicas moles (como células), *cantilevers* mais flexíveis são ideais, uma vez que eles podem flexionar-se sem deformar a superfície da amostra. Para amostras mais duras (concha de mexilhão, por exemplo), pode-se usar *cantilevers* com constantes k maiores. Existem também *cantilevers* especiais para medidas de mapeamento de cargas elétricas sobre a amostra ou caracterização de domínio magnéticos. Nestes casos, as técnicas SPM utilizadas seriam EFM (*Electric Force Microscope*) e MFM (*Magnetic Force Microscope*) respectivamente, ao invés de AFM.

Além do *cantilever*, a outra parte que compõe a sonda é a ponta. Ela é o que efetivamente interage com a amostra. Dela, aponta-se duas características principais: o seu formato e seu raio. A ponta da sonda AFM está localizada na extremidade do *cantilever*, como visto anteriormente na Fig. 2.7. O formato da ponta é importante porque as imagens AFM são resultados da combinação da topografia da amostra e do perfil da ponta (este processo é conhecido como convolução). Por exemplo, imaginemos uma amostra como a ilustrada na Fig. 2.9 (a). Suponhamos que primeiramente escaneamos esta amostra com a sonda **A**, cujo o perfil é mostrado na mesma figura. A

imagem resultante pode ser vista na Fig. 2.9(b). Já se utilizarmos a sonda **B**, cujo perfil é visto na Fig. 2.9(c), a imagem obtida é aquela vista na Fig. 2.9(d).

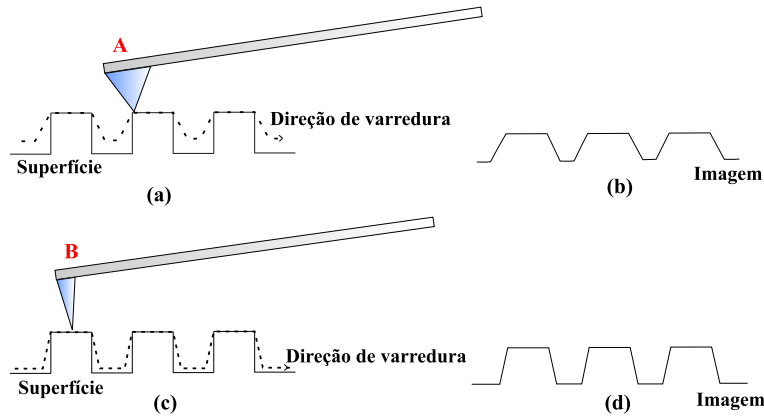


Figura 2.9: (a) Perfil caracterizado com uma ponta de baixo *aspect ratio*. (b) A imagem resultante do processo de varredura em (a) pouco tem a ver com a estrutura real. (c) O mesmo perfil agora é caracterizado com uma sonda de alto *aspect ratio*. (d) Isso resulta numa aproximação maior com o perfil real da amostra.

O perfil da sonda AFM é caracterizado por uma grandeza chamada *aspect ratio* que é determinada pela razão entre a dimensão perpendicular ao eixo da ponta e a dimensão de sua base (veja Fig. 2.10).

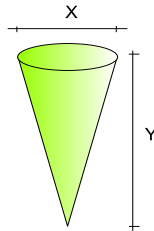


Figura 2.10: A razão entre a altura (y) e a largura da ponta (x) determinam o *aspect ratio* da sonda AFM. Esta medida nos diz quão comprida é a ponta em relação a sua base.

Do exposto no parágrafo anterior, fica claro que pontas com grande *aspect ratio* são capazes de reproduzir com mais fidelidade a topografia real da amostra. Como exemplo podemos citar dois tipos de sondas disponíveis comercialmente:

DNP-S (Veeco Probes): esta é uma das sondas mais comuns em AFM. Feita de nitreto de silício (Si_3N_4), possui formato piramidal com base quadrada com lado de

aproximadamente $4\mu\text{m}$. Sua altura pode variar entre $2.5\text{-}3.5\mu\text{m}$, o que nos deixa com um *aspect ratio* da ordem de 1:1. O raio da ponta é de 10nm (Fig 2.11(a)).

TESPA-HAR(Veeco Probes): possui formato piramidal com base triangular de lado com aproximadamente 5μ . Sua altura pode variar entre $10\text{-}15\mu$, o que nos deixa com um *aspect ratio* da ordem de 3:1. O raio da ponta é menor que 10nm (Fig. 2.11(b)).

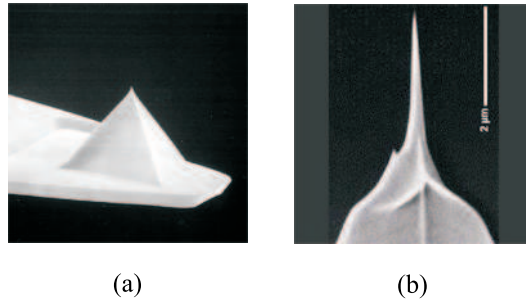


Figura 2.11: (a) Exemplo de sonda de baixo aspect ratio DNP-S (Veeco Probes). (b) Sonda de alto aspect ratio TESPA-HAR (Veeco Probes).

Quando queremos realizar imagens de sistemas com estruturas muito pequenas que vão abaixo da escala micrométrica, como por exemplo proteínas, o raio da ponta é uma variável a ser levada em conta. A Fig. 2.12 ilustra a situação de duas sondas com raios da ponta diferentes. A situação é semelhante àquela descrita acima, quando discutimos o *aspect ratio* da ponta. Portanto, *aspect ratio* e raio são características fundamentais na escolha da sonda apropriada a cada medida.

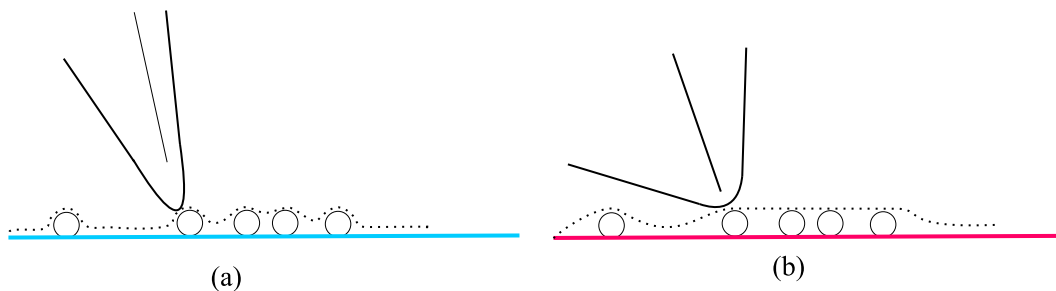


Figura 2.12: Diferença entre a imagem obtida (linha pontilhada) de pequenos perfis de uma amostra quando caracterizados com sondas de raios de curvatura da ponta diferentes. (a) Pequeno raio de curvatura da ponta. (b) Sonda de raio de curvatura da ponta maior.

2.2.3 O Sistema de Realimentação (*feedback*).

Além de controlar com precisão o movimento da sonda nos eixos x - y , o SPM deve ser capaz de controlar com grande acurácia a interação entre a sonda e amostra. Por interação entendemos a distância entre a sonda e amostra, conseqüentemente a força dividida entre elas.

Olhando para a história do desenvolvimento do sistema de controle do AFM, precisamos nos lembrar do primeiro SPM: o STM. O STM utiliza uma corrente de tunelamento para monitorar a separação sonda-amostra (z). Usualmente numa medida típica com o STM, tal separação é mantida na ordem de 10\AA durante a varredura, logo qualquer pequena variação de altura na superfície da amostra é suficiente para gerar uma resposta de corrente considerável. Isto se deve ao fato de esta corrente obedecer uma relação exponencial com z , como foi descrito no capítulo anterior [(Eq. (1.18)]. Em SPM, o STM é a técnica mais sensível, sendo a única a obter de fato resolução em escalas atômicas (ver Fig. 1.7).

Como resposta à dificuldade do STM de requerer amostras condutoras, o AFM foi desenvolvido para permitir que materiais não condutores fossem observados com um SPM. O sistema de controle do primeiro AFM utilizava um STM para monitorar o deslocamento da sonda AFM quando varrida sobre a amostra (Fig. 2.13). Neste esquema, o STM era posicionado exatamente sobre a sonda AFM, que neste caso recebia uma cobertura condutora para possibilitar o fluxo da corrente de tunelamento. Assim, o deslocamento na direção z do *cantilever* fazia variar a corrente de tunelamento, fornecendo a informação requerida para gerar a imagem e controlar a interação sonda-amostra. A principal desvantagem deste método era a dificuldade para alinhar a sonda STM exatamente sobre a sonda AFM.

Antes do STM e do AFM, alguns profilômetros já haviam utilizado sistemas de detecção óticos como sensores do movimento vertical das suas sondas. Estes mecanismos consistiam de um aparato no qual um feixe de laser era primeiramente apontado na direção da extremidade da sonda, e então refletido em direção a um fotodetector.

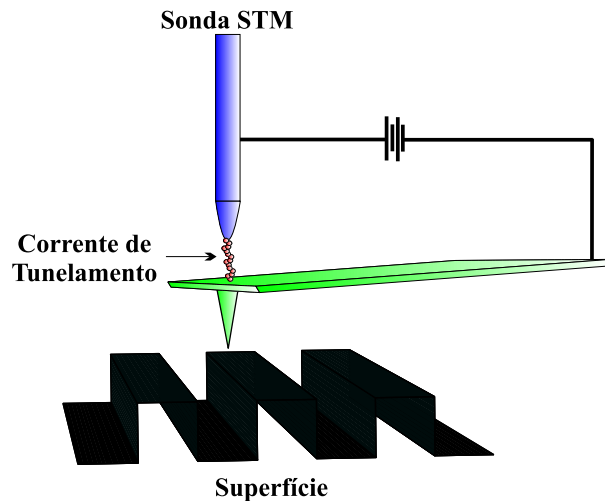


Figura 2.13: Esquema do sistema de realimentação do primeiro AFM. As duas técnicas funcionavam simultaneamente, o que experimentalmente trazia algumas dificuldades, entre elas, a de alinhamento entre a sonda AFM e a STM.

Desta maneira, atingia-se grande sensibilidade até para os mais sutis movimentos da sonda. Como mostrou-se verdadeiro depois, este sistema parecia ser a resposta para as dificuldades de controle do AFM.

O fotodetector utilizado atualmente possui quatro segmentos: 1, 2, 3 e 4, como indicado na Fig. 2.14(a). O sistema reconhece os quatro segmentos como dois grupos, dependendo da informação a ser colhida. Quando o laser se desloca sobre o fotodetector, a diferença de tensão gerada entre os campos A e B, onde A corresponde aos seguimentos 1-2 e B 3-4, informa a deflexão vertical do *cantilever* (Fig. 2.14(b)). Já a diferença de tensão entre os campos C e D, onde C corresponde aos segmentos 1-3 e D 2-4, registra a torção horizontal do *cantilever* (Fig.2.14(c)). No primeiro caso, obtem-se informação de altura das estruturas sobre a amostra. Enquanto no segundo, pode-se estudar a força lateral a que está submetido o *cantilever*, possibilitando o estudo de fenômenos de fricção na superfície analisada.

Ainda na Fig. 2.14, os passos de 1 a 5 mostram como o sistema de *feedback* controla o scanner. Digamos que, previamente, tenhamos programado o AFM para trabalhar com um valor constante de força. Isto é, a maneira que o sistema mede a força exercida pela amostra sobre o *cantilever*, e vice-versa, é através da deflexão do mesmo e da

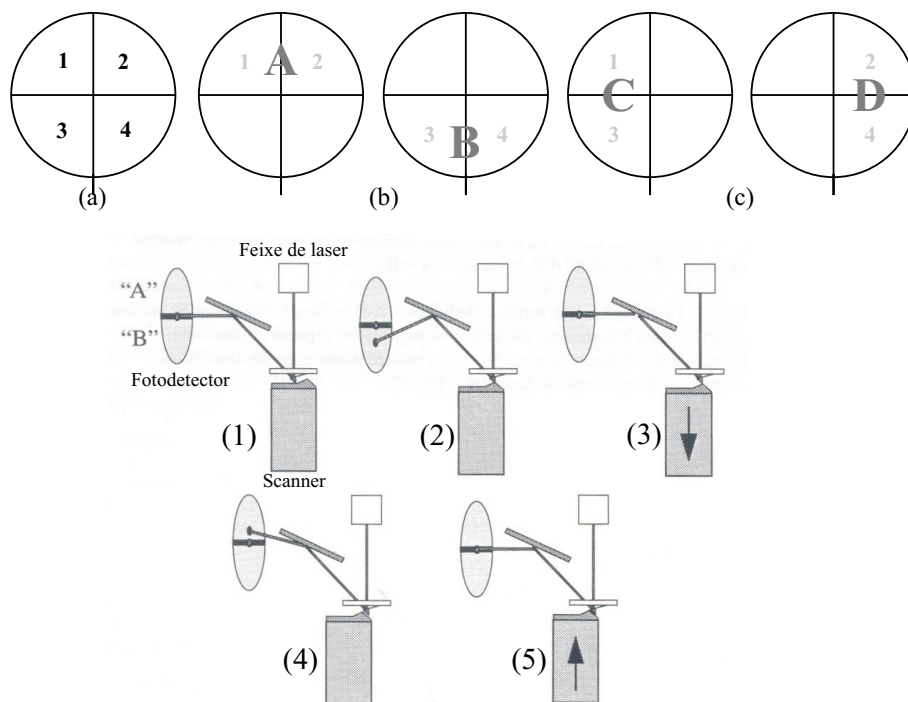


Figura 2.14: (a) Seguintos do fotodetector. (b) Campos A e B, cuja diferença de sinal fornece informação do deslocamento do cantilever na direção vertical z . (c) Campos B e C, cuja diferença no sinal fotoelétrico fornece informação de torção do cantilever na direção horizontal. (1-5) Funcionamento do sistema de *feedback* para controle do scanner na direção z .

consequente mudança de reflexão do feixe de laser sobre o fotodetector. Por isso, regulamos a deflexão do feixe de laser para o centro do fotodetector (1), fazendo com que a diferença de sinal A-B entre os campos do sensor seja nula. Iniciada a varredura (2), uma mudança na topografia da amostra (no caso uma elevação) causa a variação do ângulo de reflexão do laser sobre o fotodetector. Neste momento, a diferença A-B deixa de ser nula. O sistema entende que para restabelecer a situação inicial, a amostra deve afastar-se da sonda, portanto, deve ser feito pelo scanner um movimento na direção negativa de z (3). Continuando a varredura, a sonda agora encontra um vale e a diferença de sinal torna-se positiva (4). Então, o sistema entende que a fim de anular novamente a diferença de sinal entre os campos do fotodetector, a amostra deve ser deslocada para cima (5), restabelecendo a condição inicial.

2.2.4 Modos de Operação do Microscópio de Força Atômica.

A aquisição de imagens em AFM pode ser feita através de dois modos principais de varredura: o modo contato e o modo tapping. Estes dois modos trabalham em regiões diferentes da curva de força representada no gráfico da Fig. 2.2.

- **Modo contato.**

No modo contato de varredura, a sonda está permanentemente tocando a amostra, logo, ela está sempre experimentando uma força repulsiva (ver gráfico - Fig. 2.2). A Fig 2.14 ilustra o processo de varredura em modo contato. Veja que a sonda está, durante todo o processo, contornando o perfil da superfície. Monitorada pelo sistema de *feedback*, a deflexão do cantilever fornece então a informação de altura (z) ao sistema.

Muito embora seja possível ajustar a força exercida sobre a amostra para o seu valor mínimo, o modo contato é mais indicado para amostras com maior resistência mecânica, uma vez que se empregado em materiais moles, a sonda pode danificar a superfície da amostra durante a varredura [72].

- **Modo *Tapping*.**

No modo de varredura *Tapping* um cristal piezoelétrico faz vibrar o cantilever, de maneira que a sonda realize o movimento vertical indicado na Fig. 2.15. Uma vez refletido sobre o cantilever, e deste até o fotodetector, o ponto de laser executará também um movimento vertical devido à vibração do cantilever. A amplitude do sinal elétrico gerado pelo fotodetector é então proporcional à vibração da sonda.

Vibrando, a sonda toca a amostra intermitentemente e embora o cristal piezoelétrico mantenha constante a vibração aplicada ao cantilever, a amplitude de oscilação deste será afetada pela interação da sonda com a amostra. A variação desta amplitude é utilizada pelo sistema para gerar a informação de altura da amostra (z), ou outras características do material em estudo como elasticidade ou presença de sítios magnéticos/elétricos (quando utilizadas as técnicas EFM e MFM).

O modo tapping é especialmente aplicável no estudo de amostras biológicas. Isto deve-se ao fato de que, ao tocar a sonda apenas algumas vezes durante a varredura,

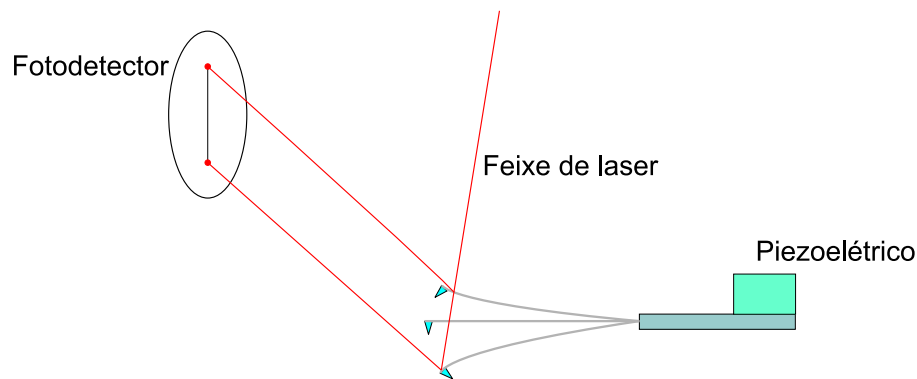


Figura 2.15: Modo tapping de varredura.

há uma redução das forças de fricção causadas pelo arraste da sonda, como ocorre no modo contato.

2.2.5 Preparação de amostras para varredura em AFM.

O microscópio de força atômica é um equipamento com aplicação nas mais diversas áreas científicas e tecnológicas, envolvendo desde a análise de semicondutores a de compostos orgânicos. Portanto, dependendo do tipo de amostra que se deseja trabalhar, em técnica diferente de preparação deve ser utilizada [73, 74].

Por exemplo, no estudo de amostras semicondutoras, que geralmente são encontradas na forma de pastilhas, deve-se realizar a clivagem da mesma para deduzir suas dimensões a tamanhos compatíveis com o porta-amostra do AFM a ser utilizado. Em seguida, realiza-se a limpeza da superfície de análise através de jato de nitrogênio e finalmente fixa-se a amostra através de uma substância adesiva. Finalmente, o porta-amostra já preparado é introduzido no microscópio.

No nosso caso as hemácias são aplicadas em fina lâmina de vidro por extensão para confecção de um esfregaço. O objetivo desta técnica é garantir a formação de uma única camada de células para que a sonda perceba uma célula por vez. As lâminas de vidro devem ter tamanho adequado para que caibam no porta-amostra do microscópio que possui 15mm de diâmetro. No capítulo 3, as metodologias de preparo de eritrócitos para a análise AFM são discutidas com maior profundidade.

3

Eritrócitos sob a "ótica" AFM.

No capítulo anterior foi discutido de maneira geral o processo de análise de superfícies com o microscópio de força atômica, sem que se levasse em conta de que material eram feitas tais superfícies. Uma vez constituídas de material inorgânico com um arranjo uniforme de átomos na sua parte superior (mica por exemplo), a análise AFM destas amostras torna-se de fácil execução. Já se estas apresentam uma topografia acidentada, elas necessitam passar por um processo de preparação antes de serem levadas ao AFM.

Células vermelhas do sangue ou eritrócitos (como também são chamadas) passam a ser o enfoque principal a partir deste ponto. Apesar de não haver grandes mudanças na maneira de proceder à realização das medidas AFM neste tipo de material, alguns cuidados devem ser levados em conta durante a preparação das amostras e varredura, como será discutido em seguida.

3.1 Análise de eritrócitos com AFM - Introdução.

A motivação inicial do projeto que deu origem a este trabalho estava direcionada no sentido de aplicar o microscópio de força atômica ao estudo de células vermelhas. Primeiramente, decidiu-se testar a viabilidade do AFM em diferenciar grupos sanguíneos distintos. Isto deveria ser feito com base na análise topográfica das imagens das membranas celulares, uma vez que a denominação de grupo sanguíneo é função da presença de antígenos na membrana celular (carboidratos) dos eritrócitos [55]. Dois grupos sanguíneos foram escolhidos para este fim: O+ e AB+. A escolha foi feita com base na hipótese de que o primeiro não possui nenhum, enquanto o segundo possui ambos os antígenos A e B (Fig. 3.1).

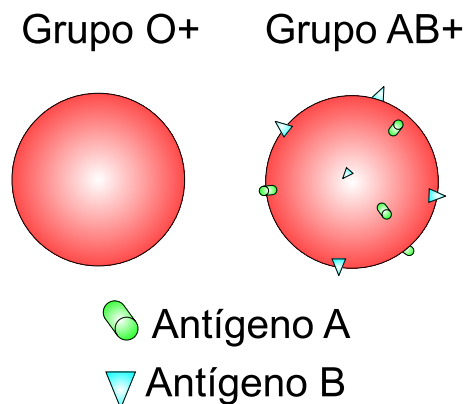


Figura 3.1: Ilustração da presença de antígenos na membrana de eritrócitos.

Paralelamente, aplicou-se a técnica na caracterização dos eritrócitos de indivíduos saudáveis e portadores de Síndromes Mielodisplásticas (SMD). Estas síndromes, são resultado de uma sequência de lesões genômicas nas células progenitoras hematopoéticas com consequente insuficiência medular por hematopoese ineficaz e potencial para progressão a leucemia aguda. Os pacientes apresentam redução em número de células e de sua capacidade funcional, com consequente aprisionamento esplênico precoce, reduzindo o tempo de vida em circulação. Na imagem da Fig. 3.2 vemos o aspecto de um eritrócito observado com o AFM.

Desenvolvendo a pesquisa nestas direções, fomos levados aos resultados mostrados

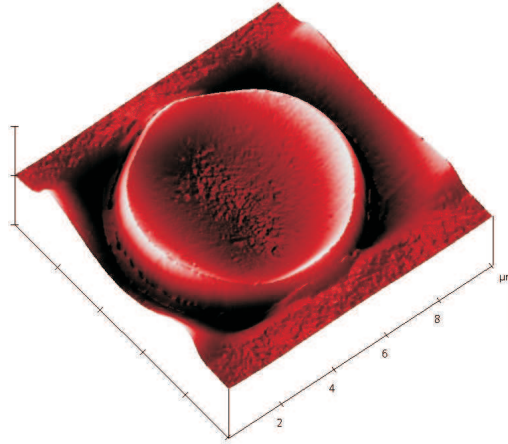


Figura 3.2: Imagem tridimensional de uma hemácia vista com o AFM.

neste capítulo. Todas as amostras utilizadas neste trabalho provieram de doadores aptos recrutados no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE, ou de pacientes tratados naquela instituição. Em todos os casos, o sangue foi acondicionado em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e utilizado para análise no mesmo dia da coleta.

3.2 Diferenciação de Grupos sanguíneos por meio de análise AFM.

Observando atentamente a imagem AFM de um eritrócito (Fig. 3.2) é possível perceber que a membrana celular apresenta certa rugosidade. Um zoom sobre a membrana revela este fato com maior clareza (Fig. 3.3).

Motivados por estas imagens e pelo fato de a maior expressão da diferença dos grupos sanguíneos estar evidente na membrana eritrocitária, como já foi comentado, passamos então a analisar a rugosidade da membrana eritrocitária com AFM.

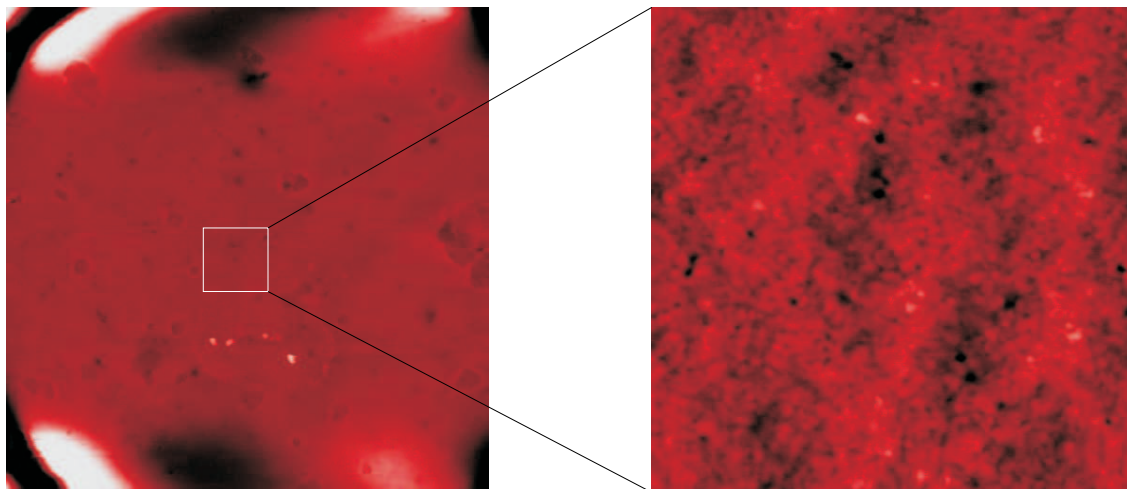


Figura 3.3: Vista superior da membrana de uma hemácia com o AFM (área $4.85 \times 4.85 \mu\text{m}$) e zoom sobre a membrana (área $1 \times 1 \mu\text{m}$).

3.2.1 Materiais e métodos.

O método seguido consistiu nos seguintes passos:

1. Uma pequena gota de sangue total foi depositada sobre uma lamínula circular de vidro com um tubo capilar (sem anticoagulante) (Fig. 3.4(a) e (b));
2. Logo após, foi feito o esfregão com um extensor (Fig. 3.4(c));
3. Esperou-se 15 min até que a lamínula secasse ao ar antes de ser levada ao AFM (Fig. 3.4(2)).

No AFM, o material utilizado, bem como os parâmetros relevantes selecionados na aquisição das imagens foram:

Modo de varredura: contato.

Sonda utilizada: OTR-8 (Veeco Probes);

Constante de mola: $0,57 \text{ N/m}$;

Raio da ponta: 15 nm ;

Área de varredura: $1 \mu\text{m}^2$;

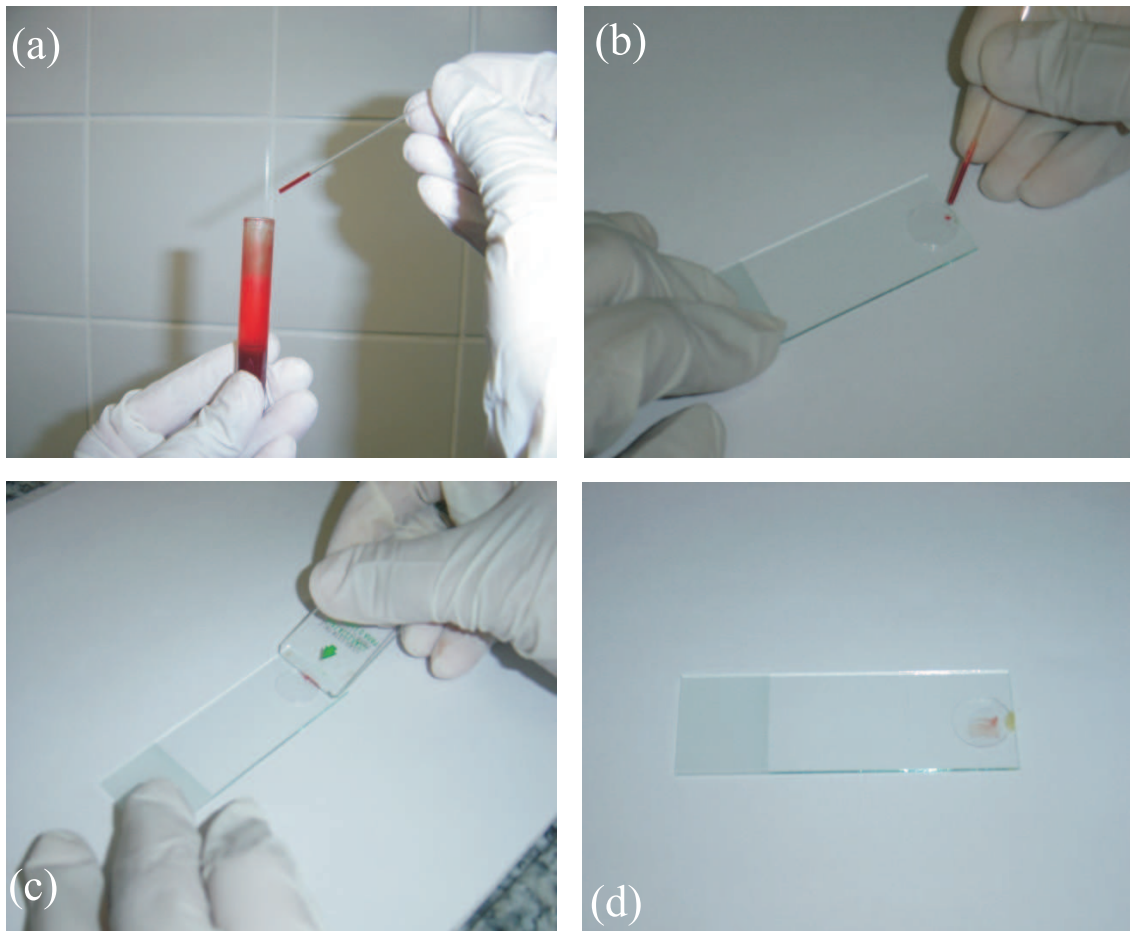


Figura 3.4: Preparação da amostra para análise AFM. (a) Coleta com capilar; (b) Deposição da gota sobre a lamínula; (c) Esfregação com extensor; (d) Secagem da amostra.

Número de linhas por imagem: 512;

Velocidade de varredura: $2\mu\text{m}/\text{s}$;

Scanner: tipo "E" 10μ de amplitude lateral.

Temperatura ambiente: 22°C ;

Umidade relativa do ar: 40%.

Apesar de utilizarmos o modo contato de varredura, que como comentado anteriormente poderia danificar a amostra, a força aplicada sobre a célula foi regulada por meio do *setpoint* (valor de tensão introduzido no comando do microscópio, correspondente à força aplicada sobre a amostra) de maneira que nenhum dano à célula era visível nas

imagens. Além disso, repetidas imagens da mesma célula foram feitas utilizando estes parâmetros. Outro fator que contribuiu para a escolha foi o fato de que, a rugosidade da membrana pareceu mais aparente em imagens realizadas no modo contato, do que aquelas feitas no modo *tapping*.

Para cada célula analisada foi feita uma imagem geral da membrana a fim de determinar uma região onde a rugosidade parecesse aproximadamente uniforme, como ilustrado na Fig. 3.5. Escolhida a região, padronizou-se uma área de varredura de $1\mu\text{m}^2$. Feita a aquisição das imagens, utilizou-se uma função software do próprio microscópio denominada *Analyze/Roughness*. Nela, extraímos a informação de rugosidade das imagens colecionadas.

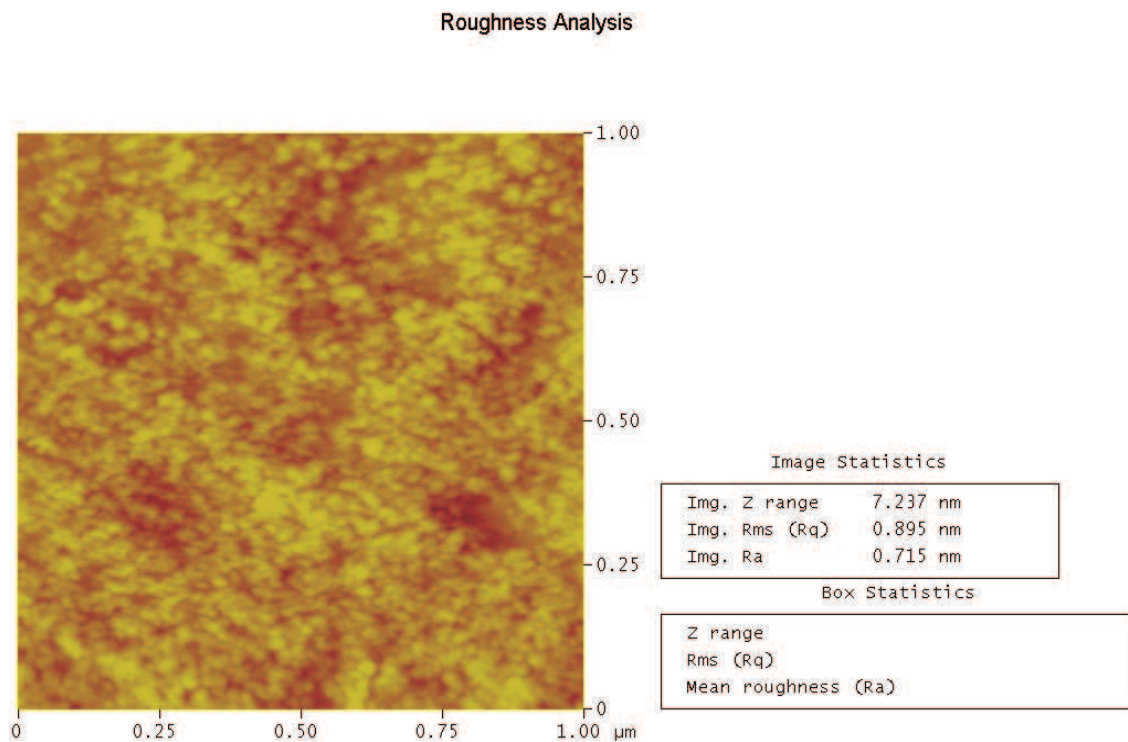


Figura 3.5: Análise de rugosidade.

3.2.2 Resultados.

Os valores das rugosidades encontrados estão listados na tabela 3.1. A escolha dos tipos sanguíneos para o estudo, apesar de apropriada, trouxe uma dificuldade relacionada à raridade do grupo AB, o que dificultou o aumento do número de amostras para a melhoria da confiabilidade dos testes estatísticos aplicados.

Tabela 3.1: Rugosidade de uma área de $1\mu\text{m}^2$ sobre a superfície de eritrócitos dos grupos AB+ e O+.

Rugosidade Média(nm)		
Amostra	AB+	O+
1	0.629	0.654
2	0.714	0.541
3	0.942	0.617
4	0.611	0.63
5	0.719	0.67
6	0.9	0.667
7	0.971	0.964
Média	0.783714286	0.677571429

A média da rugosidade foi diferente para os dois grupos, sugerindo que a presença de antígenos (A e B) ou a falta deles, influencia na topografia da membrana celular. Ambos os conjuntos de dados para as duas amostras mostraram distribuição normal, logo o *test t*, para dois grupos não relacionados, nos afirma que eles são diferentes ao nível de significância de 5%, como visto no gráfico da Fig. 3.6 (o asterisco indica que os grupos diferem significativamente a 5%). No entanto, o número de amostras deve ser aumentado para a comprovação desta análise preliminar.

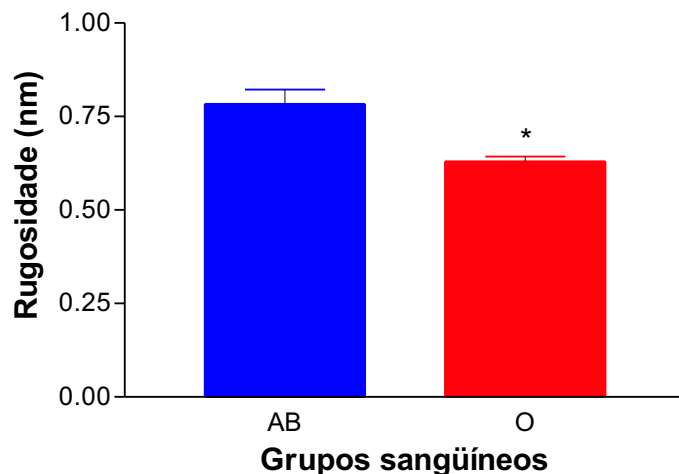


Figura 3.6: Diferença de rugosidade entre os dois grupos.

3.3 Análise topográfica da membrana de hemácias via AFM - eritrócitos sadios *versus* SMD.

Além da rugosidade superficial descrita na seção anterior, observou-se também sobre a membrana celular estruturas parecidas com "buracos", como ilustrado na Fig. 3.7.

Tais estruturas foram encontradas tanto sobre a membrana dos eritrócitos de indivíduos sadios, quanto sobre a membrana daqueles com SMD. A seguir, descreve-se o método utilizado em tal análise e os resultados encontrados.

3.3.1 Materiais e métodos.

O método utilizado neste procedimento segue a mesma linha daquele empregado na análise de rugosidade. Portanto, a preparação da lamínula foi feita exatamente como descrito nos passos 1-3 da seção 3.2.1. Tanto os doadores sadios, quanto os pacientes pertenciam ao grupo sanguíneo O+. Esta escolha foi feita para evitar a inclusão de nova variável na análise.

No que concerne ao AFM, foram utilizados os mesmos materiais já descritos no item 3.2.1.

Não foi possível estimar o número necessário de amostras para análise, por não

3.3. Análise topográfica da membrana de hemácias via AFM - eritrócitos sadios

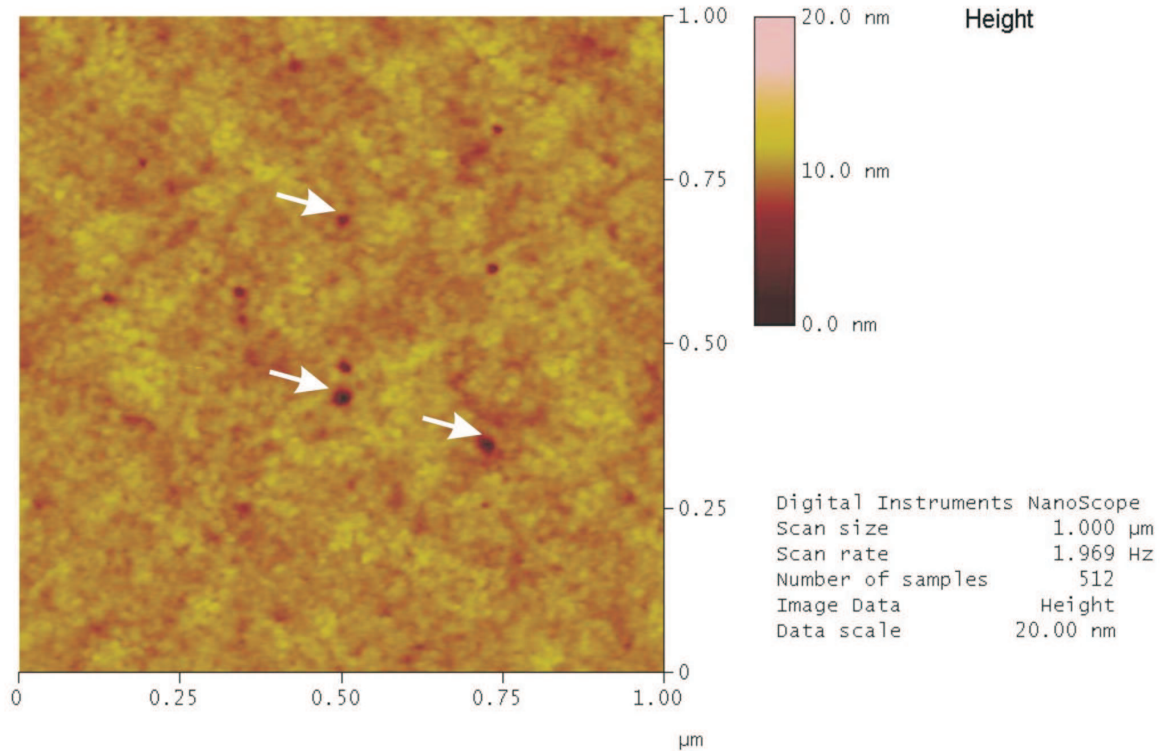


Figura 3.7: "Buracos" encontrados sobre a membrana celular.

haver estudo anterior semelhante em tal assunto. Por isso, escolhemos arbitrariamente os seguintes números:

- **Indivíduos sadios.**

10 buracos em 10 células, com cada célula de um doador distinto.

- **Indivíduos portadores de SMD.**

10 buracos em 8 células, com cada célula de um paciente distinto.

O estudo dos "buracos" foi baseado na análise do corte transversal das imagens através da rotina *Section Analysis*, função disponível no software do microscópio (Fig. 3.8). Nesta figura, a distância entre os marcadores vermelhos está indicada na caixa inferior sob o nome de *Vert distance*.

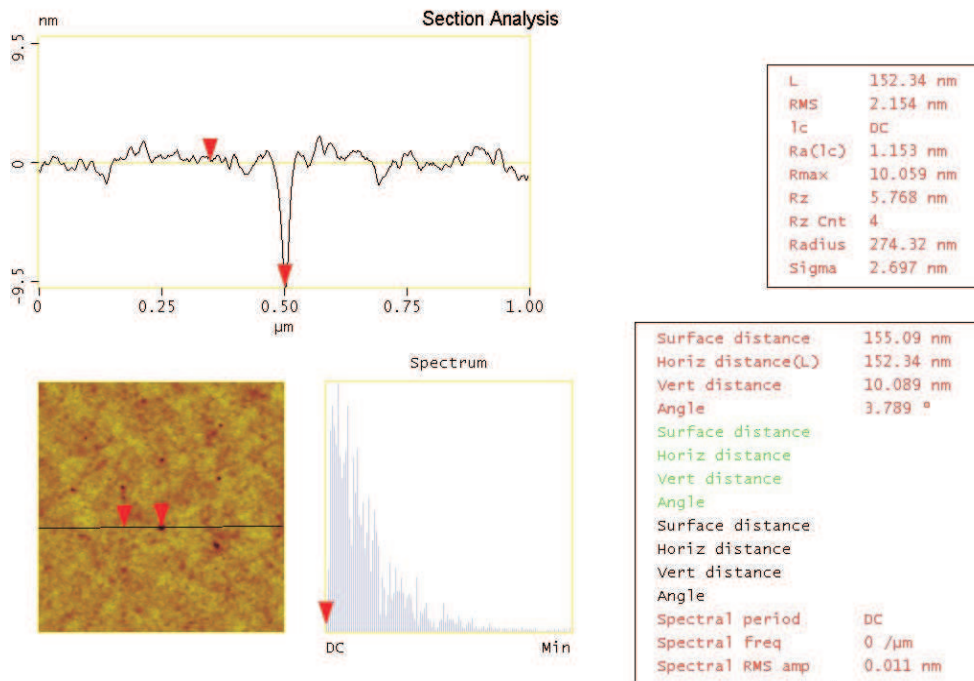


Figura 3.8: Análise da seção transversal da membrana eritrocitária.

Duas variáveis foram colhidas das imagens:

- **P**-(Profundidade do buraco): distância vertical entre a linha média dos pixels da imagem e a parte mais inferior da depressão (Fig. 3.9(a))
- **A**-(Abertura): distância entre os dois pontos interiores à depressão, onde a linha média dos pixels intercepta a superfície (Fig. 3.9(b)).

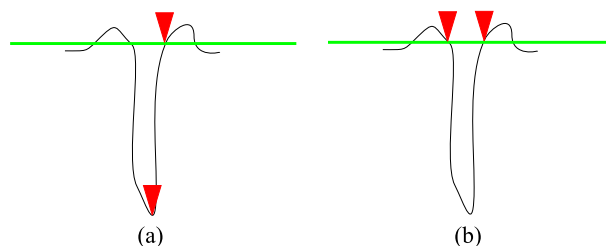


Figura 3.9: (a) Medida de profundidade (vertical) das depressões na membrana. (b) Medida do raio de abertura (horizontal) da depressão.

3.3.2 Resultados.

Os histogramas apresentados nas Figs. 3.10 e 3.11 mostram o comportamento das variáveis P e A para os indivíduos sadios e doentes, com passos de frequência de 1nm para P e 5nm para A.

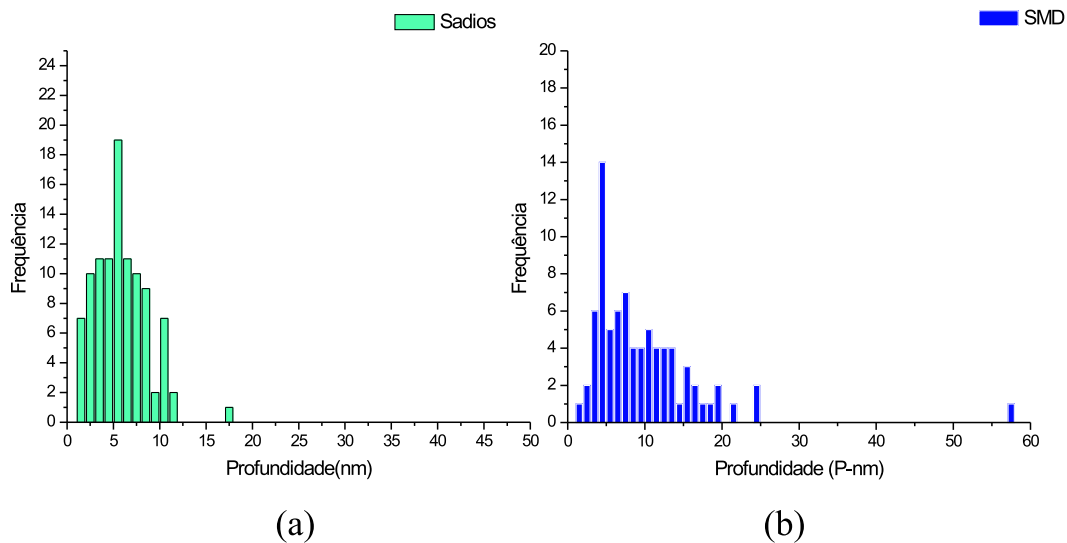


Figura 3.10: (a) Histograma com a frequência dos valores de profundidade (P) para 10 indivíduos sadios. (b) Histograma com a frequência dos valores de profundidade (P) para 8 indivíduos portadores de SMD.

Foram realizados testes de normalidade para o conjunto de dados de P e A. Contudo, apenas os dados de abertura (A) para doadores apresentou distribuição normal. Os testes de normalidade para estas variáveis, com seus respectivos resultados, estão reunidos na tabela 3.2 a seguir. No anexo B, pode-se encontrar as tabelas de dados com todas as medidas de P e A.

Desta maneira, não tendo informação sobre a natureza das distribuições de dados (além da normalidade para A dos doadores) decidiu-se utilizar o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney. O teste Mann-Whitney é usado para testar se duas amostras independentes foram retiradas de populações com médias iguais. Este método não exige nenhuma consideração sobre as distribuições populacionais e suas variâncias [75].

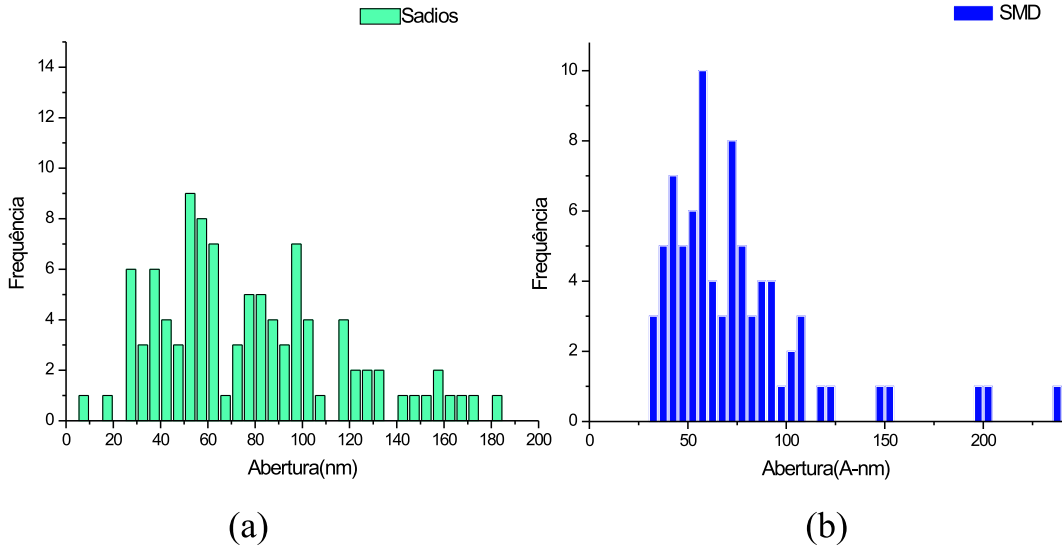


Figura 3.11: (a) Histograma com a frequência dos valores do raio de abertura abertura (A) para 10 indivíduos sadios. (b) Histograma com a frequência do raio de abertura (A) para 8 indivíduos com SMD.

A hipótese estatística utilizada foi então a seguinte: desejava-se saber se as duas amostras (indivíduos sadios e com SMD) pertenciam a populações com médias de P iguais (hipótese H_0), contra a hipótese de que estes dois grupos diferiam neste parâmetro (H_1).

H_0 : não há diferença entre os grupos;

H_1 : há diferença.

O mesmo foi feito para a variável A.

As conclusões do teste, para o nível de significância de 5%, com relação às variáveis P e A, estão relacionadas na tabela 3.3.

No que concerne à abertura das depressões (A), este teste estatístico mostrou que não há diferença entre os dois grupos. Já para a variável profundidade (P), o teste apontou diferença entre os grupos estudados. Um exame dos histogramas da Fig. 3.10 releva que as depressões em questão no grupo com SMD são mais profundas. Estes

Tabela 3.2: Testes de normalidade com resultados aplicados às variáveis P e A.

Teste	<i>Teste de Normalidade</i>			
	Abertura (A)		Profundidade (P)	
	Sadio	SMD	Sadio	SMD
Kolmogorov-Smirnov	Não	Não	Sim	Não
Cramér-von Mises	Não	Não	Sim	Não
Anderson-Darling	Não	Não	Sim	Não
Kuiper	Não	Não	Sim	Não
Lilliefors	Não	Não	Sim	Não
Shapiro-Wilk	Não	Não	Não	Não

Tabela 3.3: Teste Mann-Whitney para as variáveis P e A entre os grupos: sadios e portadores de SMD.

<i>Teste Mann-Whitney</i>			
Abertura (A)		Profundidade (P)	
Rejeita-se H_0	Considera-se H_0	Rejeita-se H_0	Considera-se H_0
	X	X	

resultado sugere a possibilidade de existir uma real diferença entre a expressão destas estruturas ("buracos") da membrana de indivíduos sadios e portadores de SMD.

Este trabalho é pioneiro na aplicação do AFM no diagnóstico da SMD. Os resultados preliminares, ele foi publicado na revista *Microscopy and Microanalysis* (Vol.11, Sup.3, 2005), sob o título: *Evaluation of Red Blood Cells of Healthy Subjects and Patients with Myelodysplastic Syndrome*.

3.4 Preparação de eritrócitos para análise AFM - Introdução.

Uma vez investigando a membrana de células vermelhas com o AFM, decidiu-se verificar de que forma apresentava-se o perfil de regiões do esfregaço onde não haviam células. O resultado desta busca foi que, parecia haver um filme fino de algum material sobre o vidro. Como utilizou-se sangue total na preparação das amostras, acredita-se que tal filme seja formado pelo plasma sanguíneo. Este filme também poderia

estar sobre as células, logo foi necessária a implementação de uma metodologia para a remoção deste filme (Fig. 3.12).

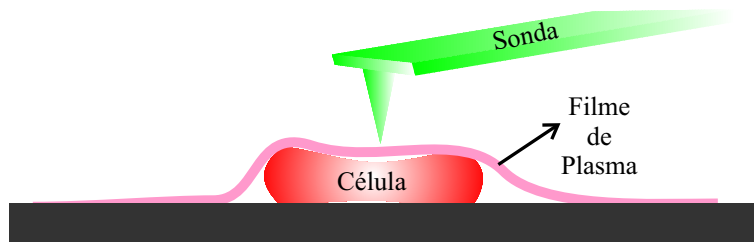


Figura 3.12: Ilustração hipotética do filme de plasma sobre a hemácia.

Por conta destes resultados, passou-se a investigar na literatura os métodos de preparação de eritrócitos para a análise em microscopia de força atômica. Dentre os que foram encontrados, achava-se o utilizado neste trabalho até aqui, o qual nomeamos **Sangue Total** [76]. Outras duas maneiras de preparação, as quais chamou-se de **PBS+ALB** (*Phosphate buffered saline solution* mais albumina)[77] e apenas **PBS** [78], foram selecionadas de publicações envolvendo hematologia e AFM. Estas consistiam em lavar os eritrócitos em diferentes soluções antes que fossem submetidos à varredura no AFM, no caso, solução salina tamponada contendo albumina e sem albumina, respectivamente. Tais processos de lavagem serão descritos em detalhe mais adiante. Além deles, testou-se a viabilidade do método de lavagem de eritrócitos empregado em laboratório de hematologia, ou seja, com NaCl 0,9%, o qual chamamos de **NaCl**.

O objetivo nesta parte do trabalho foi de verificar a melhor metodologia de preparação de eritrócitos para a investigação em AFM. Os materiais, métodos e as conclusões sobre este tópico, estão descritos nas próximas seções.

3.4.1 Materiais e métodos.

Novamente, as amostras utilizadas eram todas do mesmo grupo sanguíneo O+. Apesar de não ter aparente relevância nas medidas realizadas nesta fase do trabalho, decidiu-se novamente por esta escolha a fim de evitar uma possível introdução de nova

variável no processo.

A descrição dos quatro métodos de preparação seguirá a ordem:

I-Sangue total;

II-NaCl;

III-PBS+ALB;

IV-PBS.

I.Sangue Total.

A primeira metodologia é a mais simples. Ela corresponde exatamente ao mesmo processo utilizado nas análises anteriores de rugosidade e de *buracos* da membrana.

I.I Primeiro uma pequena gota de sangue total é depositada sobre uma lamínula de vidro circular com 13mm de diâmetro (o que corresponde à dimensão do porta-amostra do microscópio).

I.II Imediatamente em seguida, foi realizado o esfregaço com um extensor. A espessura do filme de sangue deve ser a mais fina possível, para garantir que não haverá superposição de células sobre o vidro. Após o esfregaço, a amostra foi seca ao ar por 15 minutos numa temperatura de aproximadamente 22° centígrados e umidade relativa de aproximadamente 40% (ver Fig. 3.4).

I.III Seca, a amostra foi levada ao AFM para a obtenção das imagens.

Para o AFM, podemos dizer que os seguintes parâmetros foram utilizados:

Sonda utilizada: OTR-8 (Veeco Probes);

Modo de varredura: contato;

Constante de mola: 0,57 N/m;

Raio da ponta: 15nm;

Número de linhas por imagem: 512;

Temperatura ambiente: 22°C;

Umidade relativa do ar: 40%.

Scanner: tipo "J" 125µm de amplitude lateral.

II.NaCl.

Neste método, os eritrócitos foram lavados cinco vezes em solução salina de NaCl 0,9% da seguinte maneira:

II.I - Cinco mililitros de sangue total foram centrifugados a 3000g por 5min numa centrífuga *Hettich*, modelo EBAS, à temperatura ambiente;

II.II - Então, após descartar o sobrenadante, os eritrócitos foram submetidos a cinco lavagens em NaCl 0,9%, centrifugados novamente a 3000g, à temperatura ambiente. A cada intervalo de cinco minutos, o sobrenadante era descartado e substituído por nova solução.

II.III - Após a lavagem, o concentrado de hemácias foi diluído até a concentração de 2% com mesma solução salina.

II.IV - Uma pequena gota da solução final foi depositada sobre uma lamínula de vidro. A gota foi levemente espalhada com o próprio capilar utilizado na deposição. Não foi feito o esfregão padrão com o extensor pois, a concentração de 2% da solução de hemácias já garantia um filme fino de células sobre a lamínula.

II.V - O tempo de secagem foi o mesmo que o anterior, cerca de 15 minutos, nas mesmas condições de temperatura e umidade.

II.VI - Finalmente, a amostra foi levada ao AFM para análise. Neste, foram empregados os mesmos parâmetro já descritos no item I.III.

III.PBS+ALB.

III.I - Para este protocolo de preparação, o processo foi exatamente igual ao descrito no item II. A única variante foi a solução com a qual foram lavados os eritrócitos. Desta vez utilizou-se PBS (145mM NaCl e 5mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,4) contendo albumina 6%, tanto na etapa de lavagem, como na de diluição.

III.II - Após a lavagem, foram seguidos os mesmos passos IV a VI do método anterior.

IV.PSB.

O último método também seguiu o processo executado no item II, mudando novamente a solução com a qual as células foram lavadas. De maneira mais simples, foi utilizado apenas PSB (145mM NaCl e 5mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,4) para lavar o eritrócitos.

Os resultados deste experimento estão descritos na próxima seção.

3.4.2 Resultados Método I - Sangue total.

A imagem AFM do sangue total pode ser vista na Fig. 3.13(a). Como era esperado, a forma circular e bicôncava das hemácias foi preservada apesar do processo de secagem. Isto pode ser verificado através da análise de seção reta da imagem (*Section Analysis*), vista na Fig. 3.13(b). Novamente, os buracos são avistados sobre a membrana celular (Fig. 3.13(c)), e sobre o vidro (Fig.3.13(d)).

3.4.3 Resultados Método II - NaCl.

Para a segunda metodologia observamos que a forma das células foi afetada (Fig. 3.14(a)). Este fenômeno talvez ocorrido durante o processo de secagem da gota ao ar. Provavelmente a água ao redor das células evaporou mais rapidamente, permitindo uma elevação da concentração de sais no meio exterior à célula. Devido ao gradiente osmótico, a hemácia perde solvente, ganhando a forma margeada por espículos vista na figura. Já na Fig. 3.14(b) vemos uma região sobre o vidro. É possível identificar pequenos cristais, possivelmente formados também após o processo de secagem. Essas pequenas partículas foram encontradas não apenas espalhadas sobre a lamínula de vidro, mas também agregadas à superfície celular, como mostrado na Fig. 3.14(c).

Comparando as imagens 3.16(d) e 3.17(d), correspondentes à superfície da célula, fica claro que o processo de lavagem eliminou os "buracos" observados com o primeiro método (**Sangue total**).

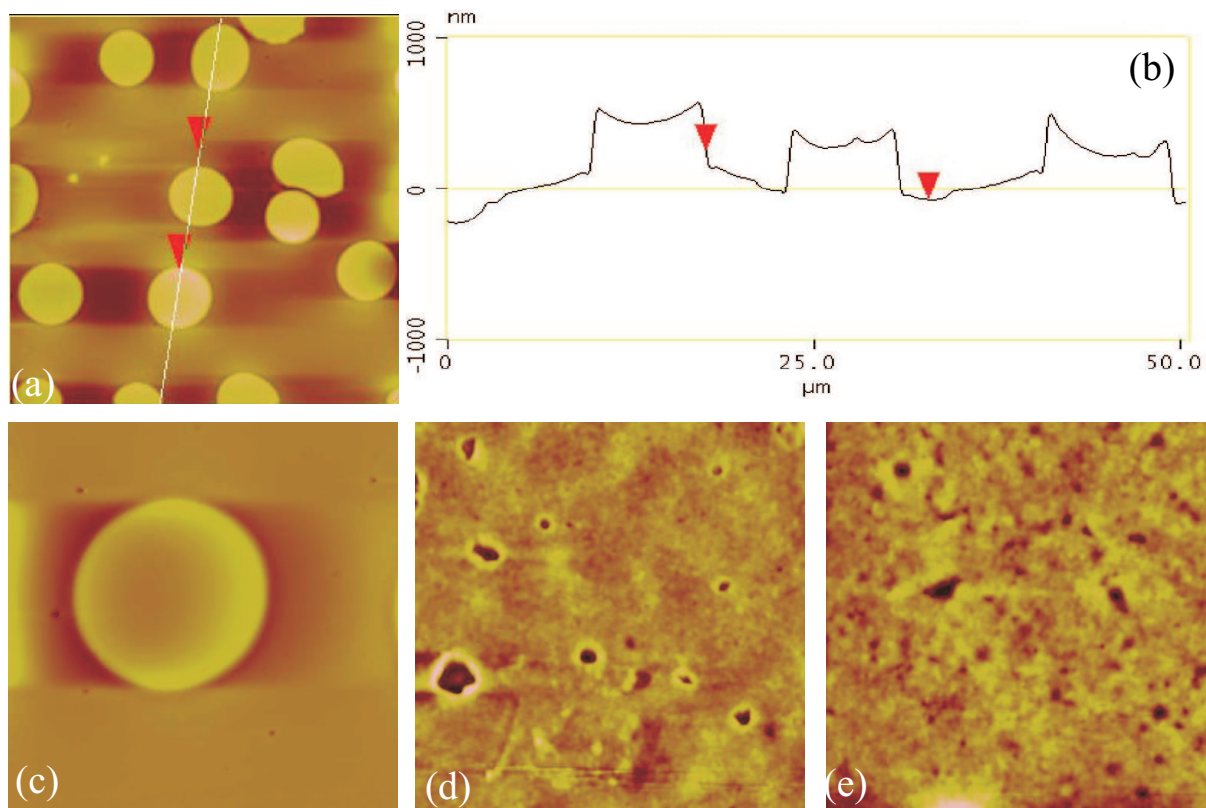


Figura 3.13: Imagens AFM de células vermelhas numa amostra de sangue total (Área de varredura- $50.2 \times 50.2 \mu\text{m}$.) (b). Seção transversal da imagem precedente. (c) Um *zoom* sobre a membrana da célula (Área de varredura- $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$.) (d) Superfície do vidro (Área de varredura- $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$.)

3.4.4 Resultados Método III - PBS+ALB.

Este método de preparo também preservou a forma circular e a biconcavidade das células, exatamente como o fez o método I, o que pode ser visto nas Figs. 3.13(a) e (b). A explicação para este efeito permanece desconhecida. Talvez a presença da albumina na solução tenha contribuído para isso. Diversas partículas se depositaram sobre a membrana plasmática, como observado através da Fig. 3.15(c). Essas partículas também foram encontradas sobre o vidro (Fig. 3.15(d)), possivelmente resultado da cristalização dos componentes da solução após o processo de secagem, como ocorreu posteriormente para o método II (NaCl).

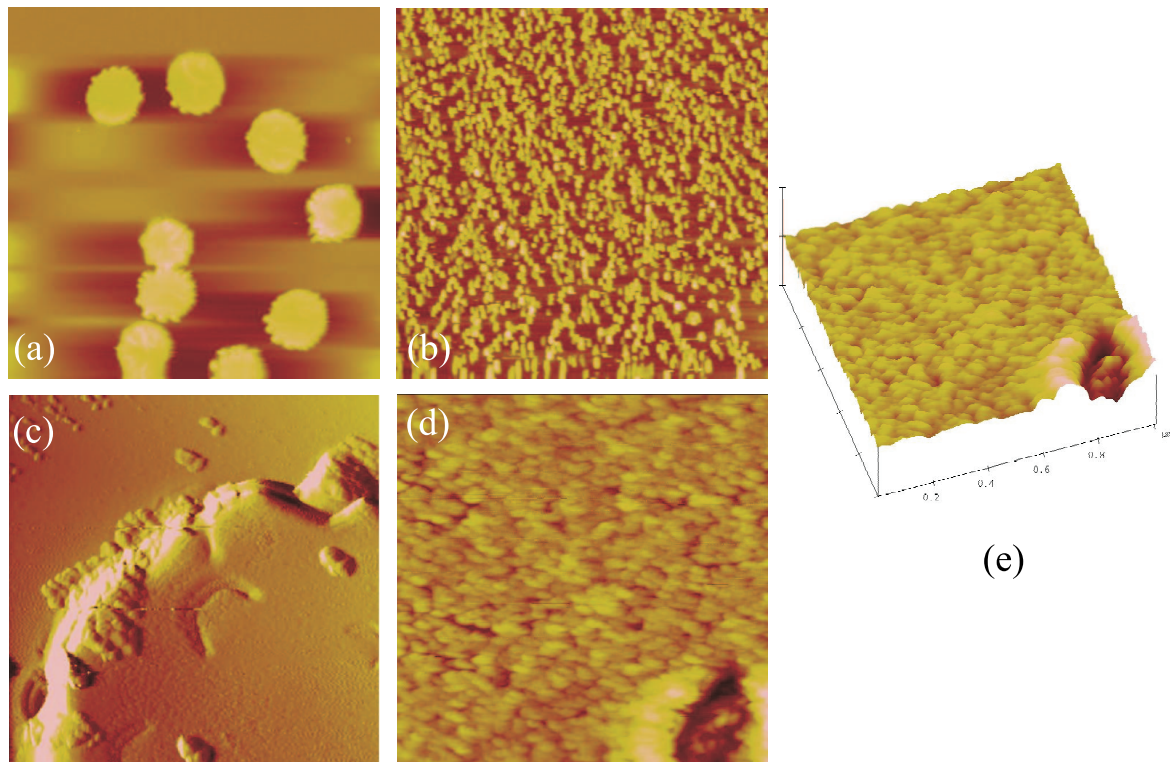


Figura 3.14: (a) Imagens AFM de células vermelhas lavadas em NaCl (Área de varredura - $50.2 \times 50.2 \mu\text{m}$). (b) Imagem feita sobre uma região do vidro, onde podemos ver pequenos cristais de sal (Área da imagem - $5 \times 5 \mu\text{m}$). (c) Cristais encontrados sobre a superfície das células (Área da imagem - $5 \times 5 \mu\text{m}$.) (d) Superfície celular livre do filme de plasma (Área da imagem - $1 \times 1 \mu\text{m}$). (e) Reconstituição tridimensional da imagem anterior.

3.4.5 Resultados Método IV - PBS.

É possível ver na imagem AFM da Fig. 3.16(a) que a forma das hemácias foi novamente afetada, exatamente como ocorrido para o método II(*NaCl*). Todavia, não encontramos partículas sobre a superfície das células (Fig 3.16 (b)) como com o uso dos métodos II(*NaCl*) e III(*PBS+ALB*). A imagem do detalhe da superfície de uma região plana sobre a célula revela a rugosidade da membrana (Fig 3.16 (c)). Provavelmente, esta é uma imagem do glicocálice, que é a parte mais externa da membrana citoplasmática. Sobre o vidro, foram encontradas estrutura ramificadas, possivelmente relacionadas à organização cristalina do soluto da solução de PBS (Fig 3.16 (d)).

Com base nestas observações, é razoável afirmar que o processo de lavagem dos eritrócitos é suficiente para retirar a cobertura do filme de plasma, observado quando

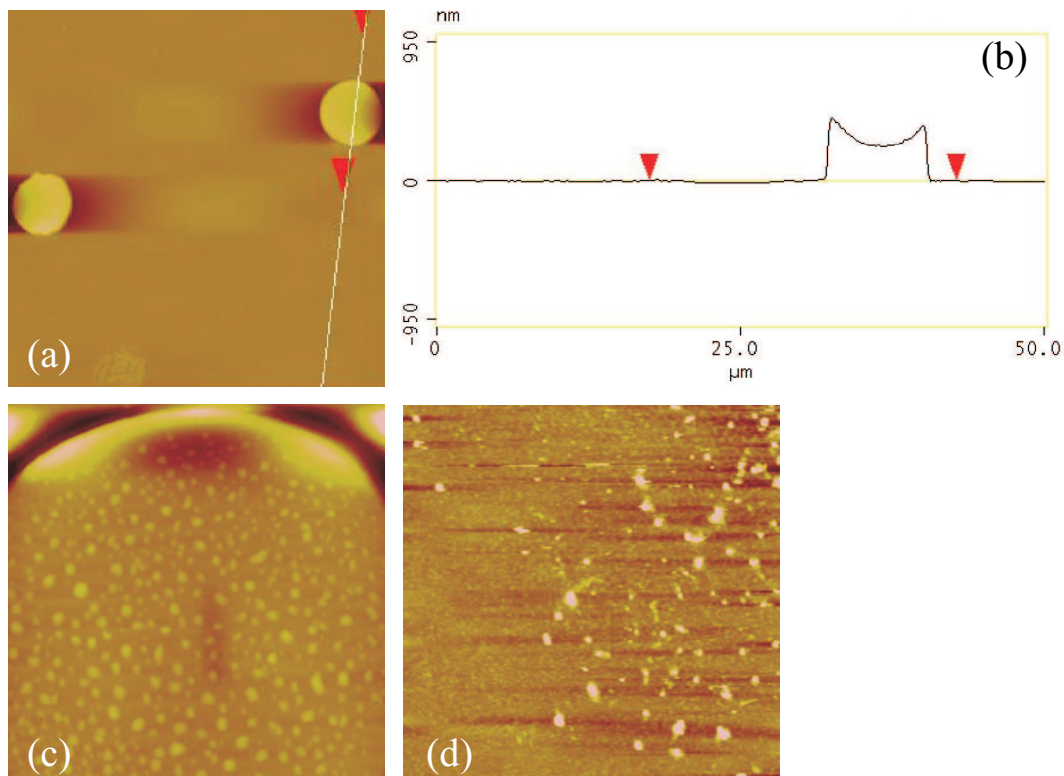


Figura 3.15: (a) Imagens AFM de células vermelhas lavadas em solução tampão de PBS contendo albumina 6% (Área de varredura - $50.2 \times 50.2 \mu\text{m}$). (b) A forma circular e bicôncava foi preservada. (c) Partículas sobre a membrana celular (Área de varredura - $5 \times 5 \mu\text{m}$). (d) Partículas sobre o vidro (Área de varredura - $5 \times 5 \mu\text{m}$).

se realiza o esfregaço com sangue total. Contudo, estes protocolos podem inserir alguns artefatos nas imagens, como: crenagem das células (**NaCl e PBS**) e deposição de partículas sobre a membrana (**NaCl e PBS+ALB**). No entanto, o último processo (**PBS**) mostrou-se o mais satisfatório no que diz respeito à exposição da membrana plasmática à investigação AFM. Estes resultados estão reunidos na tabela 3.4.

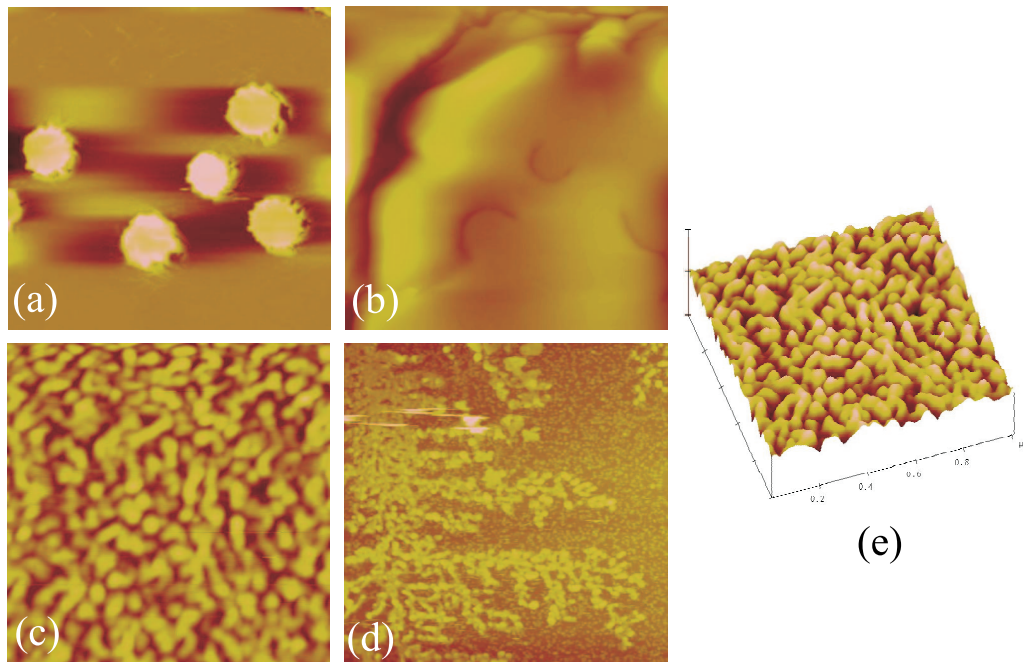


Figura 3.16: (a) Imagens AFM de células vermelhas lavadas em solução tampão de PBS (Área da imagem - $50.2 \times 50.2 \mu\text{m}$). A forma das células foi novamente afetada. (b) Contudo, sobre a membrana não houve deposição de cristais (Área da imagem - $5 \times 5 \mu\text{m}$). (c) Rugosidade característica da membrana celular (Área da imagem - $1 \times 1 \mu\text{m}$). (e) Reconstituição tridimensional da imagem anterior.

Tabela 3.4: Vantagens e desvantagens dos métodos de preparação de eritrócitos o AFM.

Preparação de hemácias para AFM.		
Método	Vantagens	Desvantagens
Sangue total	Forma das células preservada.	Artefatos: buracos.
NaCl	Remoção do filme de plasma.	Alteração da forma das células + precipitação de sais.
PBS+ALB	Forma das células preservada.	Deposição de cristais sobre a célula.
PBS	Melhor remoção do filme de plasma.	Forma das células alterada.

4

Análise volumétrica de eritrócitos com o AFM.

Neste capítulo, a análise volumétrica das imagens AFM de eritrócitos é discutida. Para tanto, utilizou-se uma ferramenta disponível no próprio software do microscópio, a ferramenta Particle Analysis. Desta maneira, cada eritrócito foi tratado separadamente e suas dimensões foram analisadas para a obtenção de um índice volumétrico o qual denominamos VPM(AF M) ou volume particular médio obtido com o AFM. Este parâmetro foi então comparado com o índice hematimétrico que consta no hemograma, exame comumente realizado em laboratório de hematologia, o volume corpuscular médio (VCM).

4.1 O VCM - Volume corpuscular médio.

A análise dos glóbulos vermelhos do sangue periférico é realizada pelo laboratório clínico em uma forma padronizada denominada hemograma completo. Este exame avalia quantitativamente e qualitativamente as células do sangue que são: células vermelhas (ou eritrócitos), células brancas (ou leucócitos) e plaquetas (ou trombócitos), respectivamente [55].

Tabela 4.1: Formas anormais de eritrócitos e suas ocorrências [Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática **Ed. Atheneu** p.79 (2001)].

<i>Eritrócitos de formato Anormal</i>	
Denominação	Ocorrência
Micrócitos hipocrômicos	Eritrócitos de formato arredondado Anemias ferroprivas, talassemias, sangue em crianças
Micrócitos hiperocrômicos (esferócitos)	Anemias hemolíticas esferocíticas congênicas e imunes
Macrócitos policromáticos	Reticulocitose, eritropoese hiperplástica ou displástica
Macrócitos hiperocrômicos	Anti-retrovirais, hepatopatias, Anemias megaloblásticas
Estomatócitos	Poiquilócitos Estomacitose hereditária, álcool, anemias hemolíticas, artefato
Hemácia em alvo	Talasseмии maior e menor Hemoglobinopatias S, C, E Pós-esplenectomia, hematopatias
Ovalócitos	Sangue normal, ovalocitose congênita, anemia ferropriva, megaloblástica
Eliptócitos	Eliptocitose hereditária, mielodisplasias, anemia ferropriva, talassemias
Hemácias piriformes, em lágrima, dacriócitos	Talassemias, mielofibrose, megaloblástica, anemias mielotísicas, mielodisplasias
Hemácias falciformes (depranócitos)	Anemia falciforme
Contendo Cristais	Hemoglobinopatia C
Hemácias espiculadas, acantócitos (<i>spurr cells</i>)	Pós-esplenectomia, hematopatia, congênito, insuficiência renal

O hemograma completo contém o eritrograma, o leucograma, a contagem de plaquetas e uma descrição da observação da lâmina ou esfregaço sanguíneo. Assim, ele é determinado por um processo com duas fases, uma manual e outra automatizada. No primeiro momento, uma pequena quantidade do sangue total é utilizada pelo analisador automático que conta o número de plaquetas, hemácias e leucócitos, faz a estimativa de volume dos eritrócitos e da quantidade de hemoglobina presente na amostra. Num segundo momento realiza-se o esfregaço padrão com uma pequena gota do sangue total

sobre uma lamínula de vidro. Esta é então corada com *Leishman* ou *Giemsa* e levada ao microscópio ótico para a análise com objetiva cujo aumento é de 100X. O profissional de laboratório então avalia alterações morfológicas tais como: forma e tamanho das hemácias. O número de plaquetas e de glóbulos brancos também é estimado.

Quando observados ao microscópio ótico, os glóbulos vermelhos recebem diversas denominações de acordo com a sua aparência, como vemos nas Figs. 4.1 e 4.2. Desta análise morfológica, colhem-se informações que contribuem para o diagnóstico de algumas patologias, como: anemia falciforme (Fig. 4.2(a)), anemias ferroprivas (Fig. 4.1(b)) e anemias hemolíticas (Fig. 4.2(e)). A Tabela 4.1 relaciona as formas anormais de eritrócitos com suas respectivas ocorrências.

Tabela 4.2: Parâmetros fornecidos pelo hemograma (Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática **Ed. Atheneu** p.83 (2001)).

<i>Hemograma Completo com Valores de Referência para Adultos</i>			
Medidas ou contagem	Valores normais		
Glóbulos Vermelhos	Masculino	Feminino	Unidades
Eritrócitos	4,2-6,3	3,8-5,5	Milhões/ μ l
Hemoglobina	14-18	12-16	g/100ml
Hematócrito	40-52	37-47	%
Índices hematimétricos (para ambos os sexos)			
VCM	80-102	fl	
HbCM	27-32	pg	
CHbCM	30-35	g/dl	
Glóbulos brancos ou Leucócitos (para ambos os sexos)	Relativa	Absoluta	
Contagem Global		4.000-11.000/ μ l	
Neutrófilos	40-75%	2.000-7.500/ μ l	
Mielócitos	0%		
Metamielócitos	0-1%		
Bastonetes	0-10%		
Segmentados	35-72%		
Eosinófilos	1-6%	40-400/ μ l	
Basófilos	0-1%	0-100/ml	
Linfócitos	20-45%	1.200-3.500/ μ l	
Monócitos	2-10%	100-800/ μ l	
Plasmócitos	0-1%	0-100/ μ l	
Plaquetas		125.000-450.000/ μ l	

Os parâmetros fornecidos pelo hemograma estão listados na Tabela 4.2. Dentre eles, deseja-se destacar o índice hematimétrico VCM (volume corpuscular médio), impor-

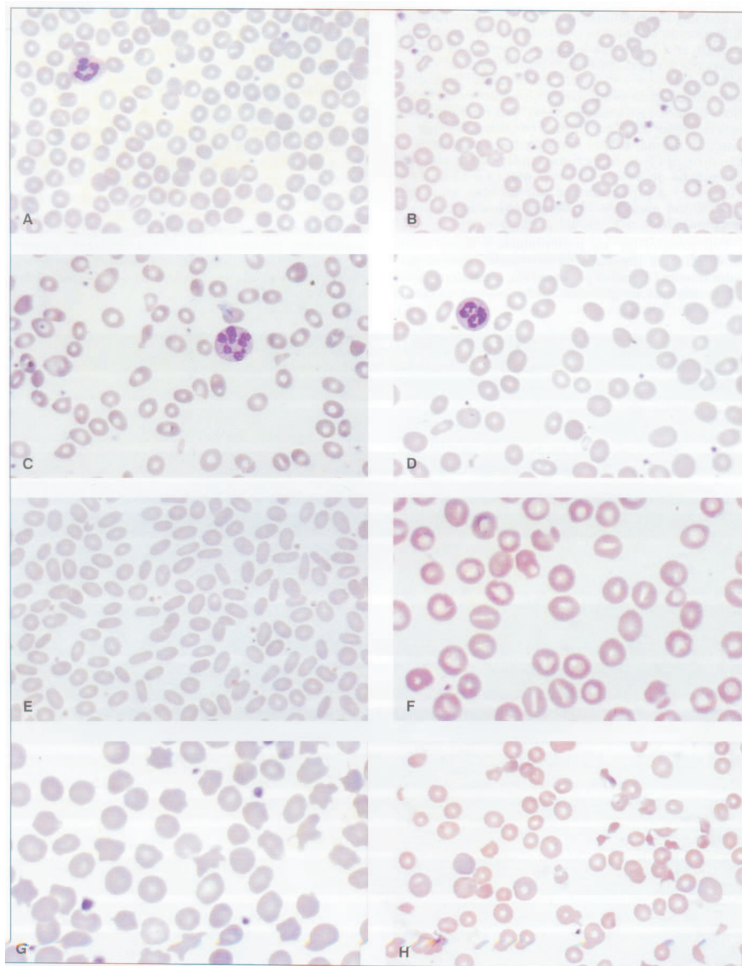


Figura 4.1: (a) Normais, (b) hemácias microcíticas, (c) macrocitose e pleocarióticos, (d) macrocitose, (e) eliptocitose, (f) estomatócitos, (g) acantócitos (*spurr cells*), (h) esquistócitos [Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática Ed. Atheneu p.80 (2001)].

tante parâmetro na classificação das anemias. Neste capítulo, utiliza-se o AFM para estimar o índice VCM através do cálculo do volume de cada eritrócito separadamente. Segundo a tabela 4.2 o índice VCM considerado normal está entre o intervalo de 76-96 fl. Hemácias com volume abaixo de 76 fl são consideradas microcíticas, enquanto aquelas com volume superior a 96fl são consideradas macrocíticas. Assim, define-se:

- **Microcitose:** VCM abaixo do limite inferior de 76fl.
- **Macrocitose:** VCM acima do limite superior de 96fl.

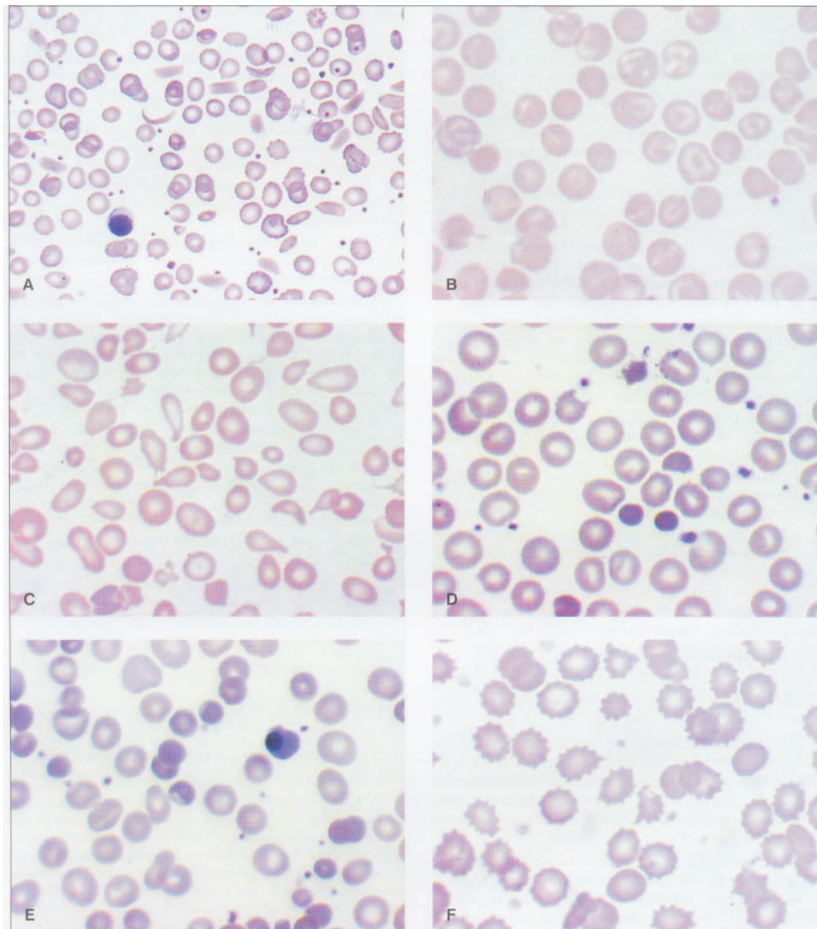


Figura 4.2: (a) Hemácias falciformes, (b) hemácias em alvo, (c) hemácias piriformes, (d) hemácias semilunares ou em capacete, (e) esferócitos, (f) hemácias crenadas (Retirado de M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, Hematologia - Fundamentos e Prática Ed. Atheneu p.82 (2001)).

O objetivo nesta etapa do trabalho é verificar a versatilidade do AFM em determinar o volume das células vermelhas. Para isso, compara-se o valor do VCM fornecido pelo contador automático de células, com aquele fornecido pelas imagens AFM.

4.2 Determinação do volume de partículas com o AFM.

Antes de continuar no estudo do VCM através das imagens AFM, cabe discorrer um pouco a respeito de como é medido o volume de uma partícula com o *software* utilizado [Nanoscope (R)III-Digital Instruments, Version 5.12r5(2003)]. Neste estudo a medida

é realizada através de uma rotina de análise denominada *Particle Analysis*.

O parâmetro utilizado pela rotina *Particle Analysis* para definir uma partícula sobre uma superfície é a altura (medida em z) dos pixels da imagem. Logo, *partícula*, neste contexto, é um grupo de pixels reunidos em regiões acima ou abaixo de um certo plano. Chama-se esse plano de referência de *Threshold*. A Fig. 4.3 ilustra como pode ser isolada uma partícula numa imagem AFM 3D de acordo com a altura dos pixels. Esta ferramenta é desenhada para trabalhar com partículas bem isoladas, que podem ser analisadas separadamente ou em quantidade. No nosso caso, utilizou-se os dados fornecidos para cada partícula individualmente.

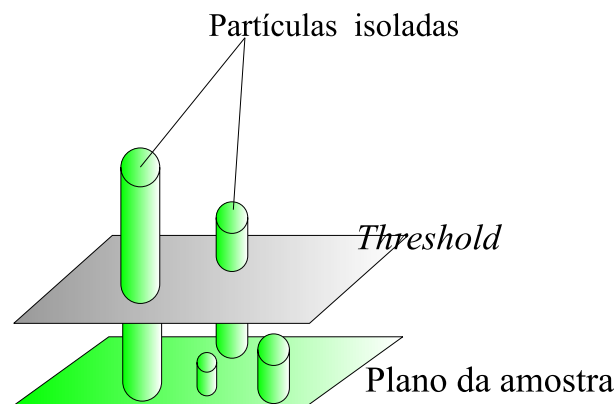


Figura 4.3: Partículas isoladas pelo plano *Threshold* de acordo com a altura dos pixels da imagem.

Como pode ser visto na Fig. 4.4, o software fornece duas informações relevantes sobre as partículas analisadas:

- *Mean Area-MA*;
- *Mean Hight-MH*.

Dispondo destas duas informações, considerou-se a maneira mais simples de estimar o volume dos eritrócitos. Para cada partícula (hemácia), multiplicou-se a altura média dos pixels correspondentes àquela partícula pela área média ocupada pelos mesmos pixels, a fim de obter o volume da figura 3D (Fig. 4.5).

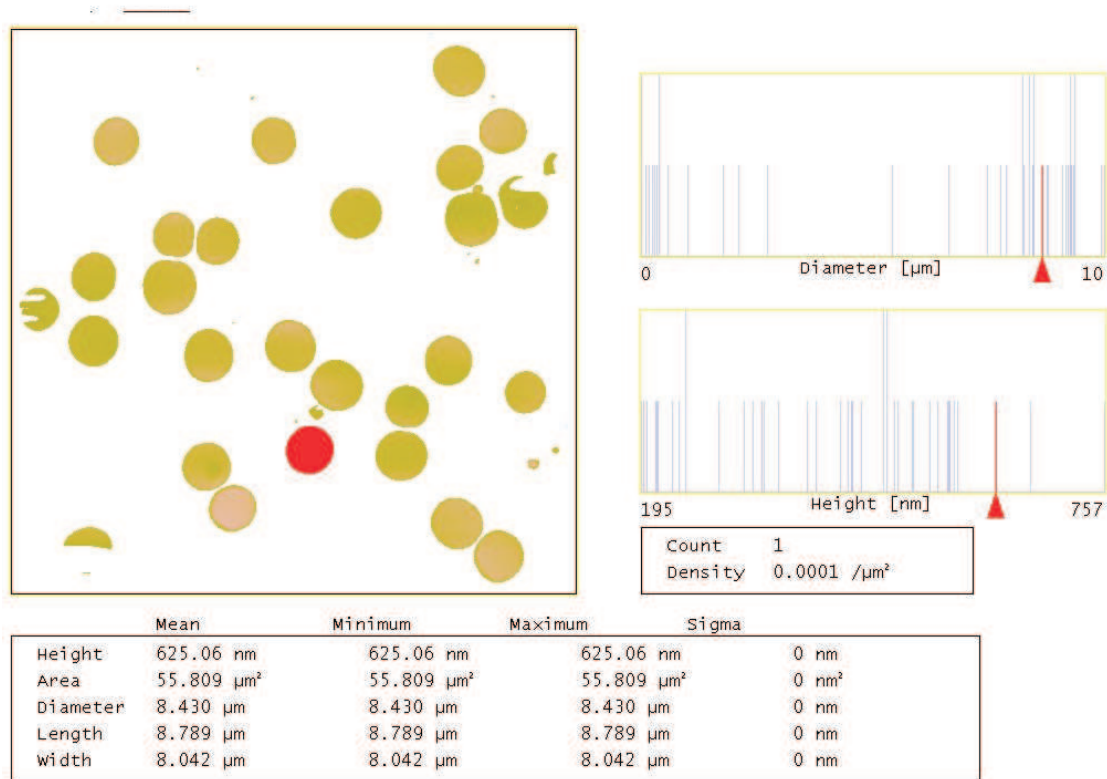


Figura 4.4: *Particle Analysis*. Os parâmetros métricos de cada partícula foram coletados individualmente (hemácia marcada em vermelho). No quadro inferior, pode-se ver os valores de altura (*Height*) e área (*Area*) dos pixels selecionados.

Considerando que o volume calculado por meio do AFM não é igual ao volume determinado pelos analisadores no laboratório clínico, é preciso definir dois tipos de volumes neste trabalho. Eles são:

- **VCM** - Volume corpuscular médio: definido como o volume eritrocitário obtido por meio do hemograma realizado pelo contador automático de células no laboratório clínico.
- **VPM(AFM)** - Volume Particular Médio (AFM): definido como o volume celular encontrado através da análise das imagens AFM.

É interessante frisar que o VPM(AFM) é o volume médio, obtido com os valores de volume calculados através das imagens AFM de cada partícula. O volume individual

das partícula será denominado $VP(AF\!M)$ ou volume particular AFM, dado por:

$$VP(AF\!M) = MA.MH, \quad (4.1)$$

o qual ainda não é igual ao $VPM(AF\!M)$. Este será determinado pelo valor médio dos volumes $VP(AF\!M)$ de cada eritrócito.

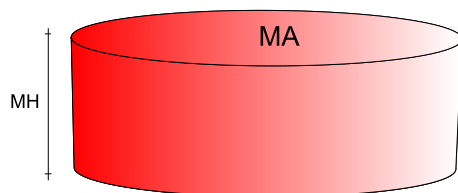


Figura 4.5: Dimensões consideradas no cálculo do volume dos eritrócitos com o AFM: MH (Mean Hight) e MA (Mean area).

4.3 Materiais e métodos.

Para determinar o volume dos glóbulos vermelhos seguiu-se os passos:

1. Preparação da amostra;
2. Análise no microscópio de força atômica;
3. Análise das imagens com o software especializado.

4.3.1 Preparação da Amostra.

Neste experimento, a maneira mais simples de preparar as células para a análise AFM e que introduz o mínimo de artefatos é a que utiliza o sangue total e o esfregaço padrão. Apesar de o filme de plasma cobrir todos os eritrócitos, como foi visto anteriormente, aqui não nos interessa acessar a membrana e suas estruturas, mas sim, apenas colher informações métricas da célula como altura e área transversal. Portanto, na preparação da amostra, seguiu-se exatamente os passos mencionados anteriormente no capítulo 3, seção 3.2.1 e 3.4.1-I (**Sangue total**).

4.3.2 Análise no Microscópio de Força Atômica.

No AFM, o material e parâmetros utilizados para o experimento foram:

Sonda: OTR-8 (Veeco Probes);

Modo de varredura: contato;

Constante de mola: 0,57 N/m;

Raio da ponta: 15nm;

Número de linhas por imagem: 512;

Temperatura ambiente: 22°C;

Umidade relativa do ar: 40%.

Scanner: tipo "J" 125 μ m de amplitude lateral.

Área das imagens: 100x100 μ m.

Para cada amostra foram feitas cerca de 7 imagens em diferentes áreas do esfregaço a fim de conseguir o número suficiente de eritrócitos para o estudo, que no caso foi 100 para cada amostra [76].

4.3.3 Análise quantitativa das imagens AFM.

Foi analisado o volume dos glóbulos vermelhos de cinco indivíduos: dois indivíduos apresentando microcitose (amostras A e B), três com volume corpuscular médio considerado normal (amostras C, D e E), porém, com valores médios diferentes e um apresentado macrocitose (amostra F). Na Fig. 4.6 reunimos 3 imagens AFM das três classes morfológicas de eritrócitos: microcíticas, normocíticas e macrocíticas.

Adquiridas as imagens, utilizamos o software do microscópio a fim de calcular o volume das hemácias ($VP(\text{AFM})$) da maneira descrita acima (seção 4.2). Os volumes calculados constam nas tabelas do anexo A, e os resultados da análise destes dados estão descritos na próxima seção.

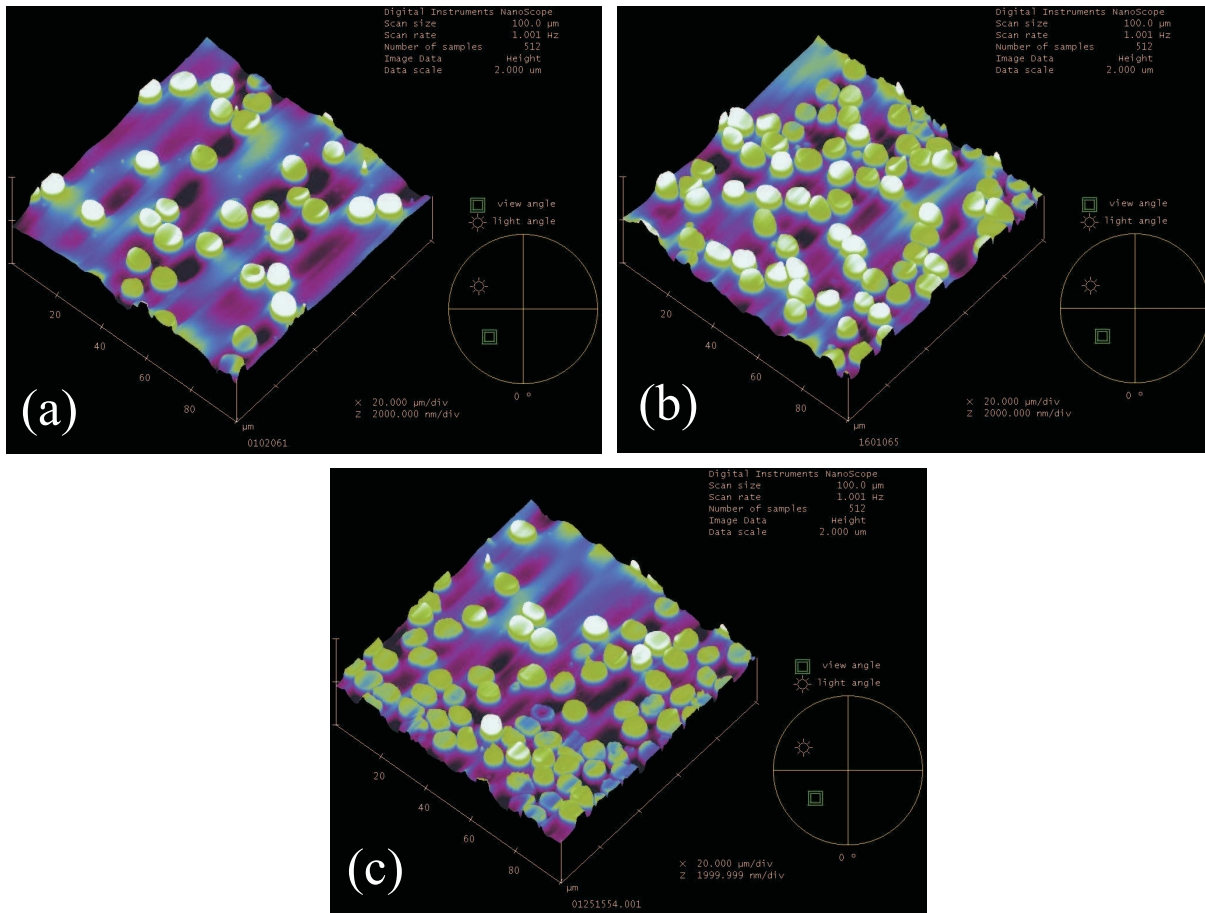


Figura 4.6: Imagens AFM de células vermelhas. (a) Hemácias macrocíticas, VCM = 105 fl. (b) Hemácias normocíticas, VCM = 88 fl. (c) Hemácias microcíticas, VCM = 67 fl.

4.3.4 Resultados.

No anexo B é possível encontrar as tabelas com todos os valores de **MH**, **MA** e **VP(AFM)** para todas as amostras, a saber, A, B, C, D, E e F. Com os valores de **VP(AFM)** plotaram-se os histogramas que podem ser vistos na Fig. 4.7. A contagem das frequências foi feita considerando-se um passo de 2 fl em volume.

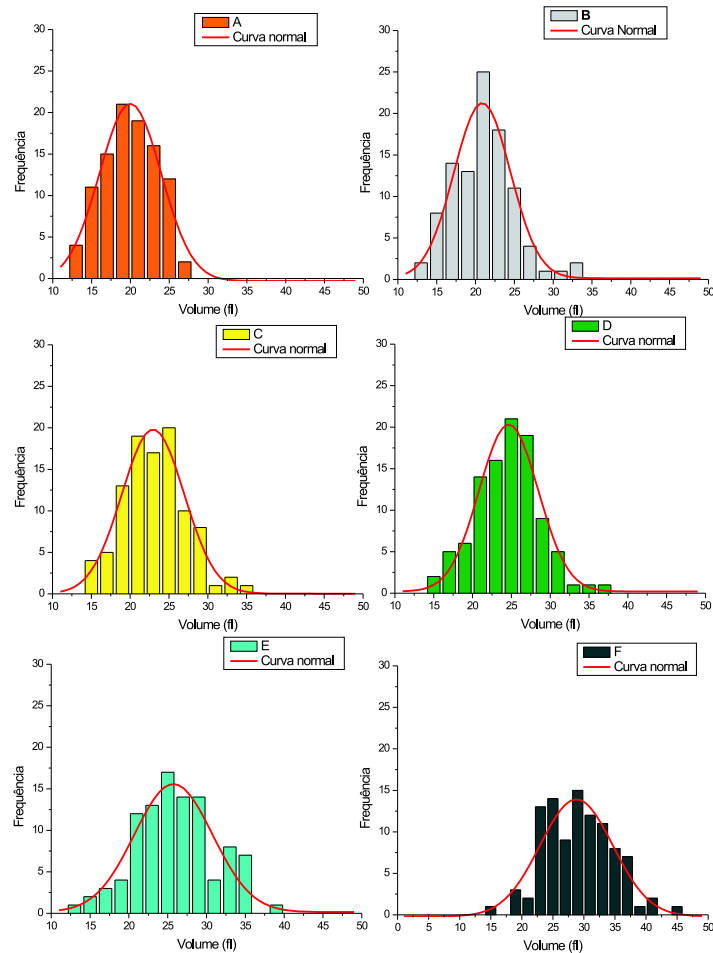


Figura 4.7: Histogramas de frequência dos volumes para as amostras A[$VPM(AMF) = 19.98fl$], B[$VPM(AMF) = 20.86fl$], C[$VPM(AMF) = 22.94fl$], D[$VPM(AMF) = 24.65fl$], E[$VPM(AMF) = 25.73fl$] e F[$VPM(AMF) = 28.78fl$].

A fim de verificar se as distribuições de dados para os volumes obtidos eram curvas normais, aplicou-se os testes de normalidade a estes dados (como fizemos no capítulo 3 para as variáveis de altura e profundidade dos buracos - seção 3.4). Em todos os casos, as distribuições de frequência revelaram curvas normais.

Utilizando um programa de edição de gráficos, aplicou-se um *fit* gaussiano sobre os histogramas de frequência (Fig. 4.7). O valor do pico da gaussiana foi tomado então como o valor $VPM(AMF)$ para a respectiva amostra (Tab. 4.3).

Com estes valores construiu-se o gráfico visto na Fig. 4.8. Este gráfico traduz a

Tabela 4.3: Comparação entre os valores de **VCM** e **VPM(AFM)**.

Comparação do volume obtido com o AFM [VPM(AFM)] com o dado pelo contador de células (VCM)		
Amostra	VPM(AFM) (fl)	VCM(fl)
A	19.98	67
B	20.86	78.9
C	22.94	83
D	24.65	88
E	25.73	93
F	28.78	105

relação entre o volume determinado pelo contador automático de células e o volume estimado via imagens AFM.

Deste gráfico é possível extrair a seguinte relação:

$$VPM(AFM) = 0.24681VCM. \quad (4.2)$$

A pergunta natural é a seguinte. Qual a causa do volume lido pelo AFM ser menor que o volume determinado pelos contadores automáticos? Uma provável explicação está no fato de que, uma vez feito o esfregaço, as células estão submetidas à condições ambientais completamente diferentes àquelas *in vitro*. Após o processo de secagem, a célula perde líquido e, portanto, diminui de volume. Além disto, existe um erro inserido na estimativa de volume dos eritrócitos quando utilizamos as variáveis **MA** e **MH** no cálculo. Tal erro pode ser diminuído se utilizarmos na análise de imagens um programa mais poderoso, no qual o volume possa ser calculado por meio da integração volumétrica dos pixels que formam a imagem.

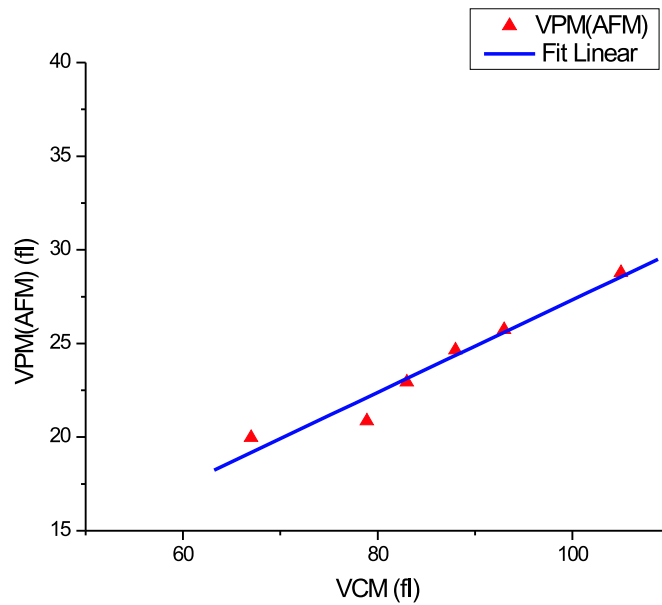


Figura 4.8: Relação entre o volume calculado via AFM (VPM-AFM) e o volume fornecido pelo contador de células vermelhas (VCM).

4.4 Envelhecimento de eritrócitos ao ar - Introdução.

Nesta seção, apresentamos os resultados de um experimento desenvolvido em nosso laboratório, não enviado ainda para publicação. Contudo, recentemente constatou-se que o mesmo processo foi repetido e publicado por Yong [84]. O processo consistiu na observação com o AFM do envelhecimento (ou morte) de uma célula vermelha exposta ao ar. A análise deste fenômeno poderia ser útil, por exemplo, na estimativa do tempo *post-mortem* através da datação de uma mancha de sangue no local de um crime, acidente, etc.

A metodologia utilizada por Yong foi a seguinte: um eritrócito colocado sobre mica foi exposto ao ar por um período de 4.5 dias, tendo a morfologia da sua superfície monitorada pelo AFM através da execução de uma varredura a cada 12h. Em seu experimento, Yong manteve a temperatura ambiente constante em 25°C e umidade relativa do ar em 75%. Segundo ele, a umidade foi extremamente controlada por dois desumidificadores, enquanto era monitorada através de um higrômetro. Não dispondo

destes equipamentos, realizou-se o mesmo experimento sem o controle das variáveis umidade e temperatura. Contudo, considera-se que os resultados obtidos vêm de alguma maneira complementar a análise já feita por Yong. Além disso, nas primeiras 24h, realizou-se uma varredura a cada hora, o que possibilitou a verificação das modificações ocorridas na célula num intervalo mais curto de tempo.

O método e resultados deste procedimento estão descritos nas próximas seções.

4.4.1 Materiais e métodos.

Os passos seguidos na preparação da amostra foram:

1. Vinte mililitros de sangue total, previamente armazenado em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA, foram diluídos em 50ml de solução salina tamponada PBS (145mM NaCl e 5mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,4);
2. Dez microlitros desta solução foi depositada sobre mica fresca. A gota secou ao ar por um período de 15min;
3. Após a secagem, as hemácias foram levadas ao AFM com o qual realizou-se uma varredura para a obtenção de uma imagem a cada hora num período de 24h;
4. Após as primeiras 24h, capturou-se uma imagem a cada 12h até que se completassem 84h (3,5 dias) para o tempo total do experimento;

No AFM, utilizou-se o seguinte material e parâmetros de varredura:

Modo de operação: *tapping*;

Sonda: TESP (Veeco Probes);

Constante de mola: 42 N/m;

Raio da ponta: 15nm;

Número de linhas por imagem: 512;

Scanner: tipo "J" 125 μ m de amplitude lateral.

Área das imagens: 13x13 μ m.

Como citado anteriormente, a umidade e a temperatura do ambiente não foram controladas. No entanto, estas variáveis puderam ser monitoradas através de um termômetro e um higrômetro instalados na sala do microscópio. Desta maneira, verificou-se que os intervalos de variação foram de 35-48% para a umidade e 18-35°C para a temperatura durante a aquisição das imagens.

Os resultados deste experimento estão descritos na próxima seção.

4.4.2 Resultados.

Na Fig. 4.9(a) e (b) vêem-se as imagens tridimensionais da hemácia no início e no final do experimento (0h e 84h de exposição ao ar, respectivamente). Visualmente, constata-se que as mudanças não foram tão drásticas. Nenhuma fissura sobre a membrana ou outro sinal mais drástico de degradação foi identificado, como reportado por Yong. Contudo, é ainda visível um certo encolhimento da parte central da célula. Isto pode ser notado pelo tom mais escuro da parte esquerda superior e direita inferior da célula.

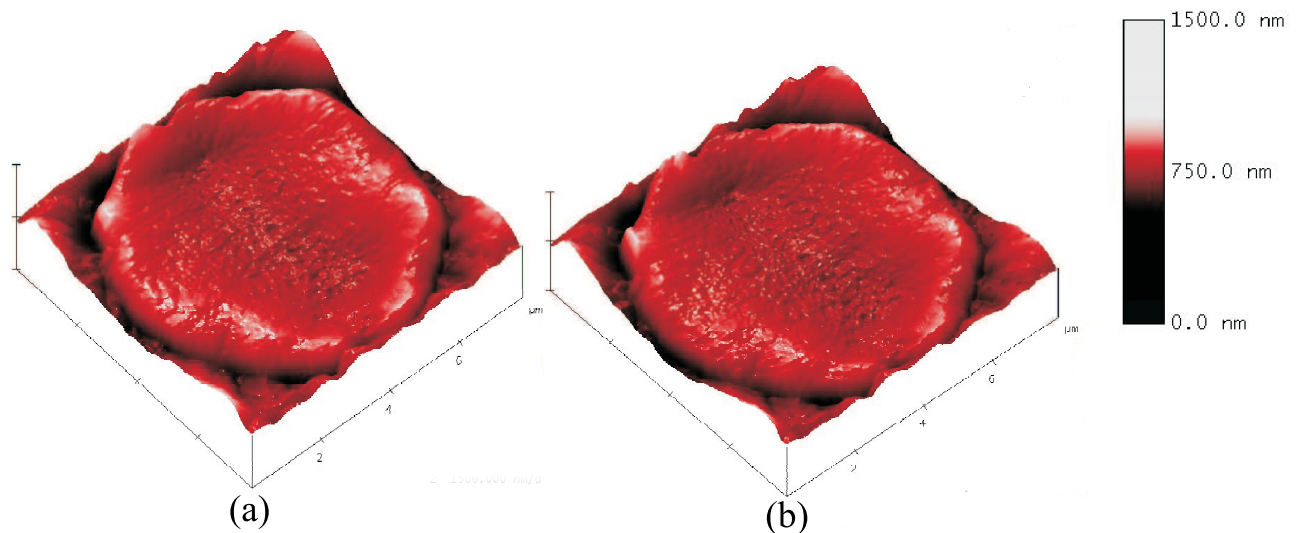


Figura 4.9: (a) Hemácia exposta ao ar - 0h. (b) Hemácia após 84h de exposição ao ar.

A análise do volume do eritrócito executada novamente através da rotina *Particle Analysis* revelou uma certa dinâmica na morfologia da célula durante o evento de

degradação. O gráfico da Fig. 4.10 mostra como comportou-se o volume da célula com o passar do tempo. Este gráfico revela que, considerados apenas os valores de volume coletados a cada 12h, a célula tende à diminuição de suas dimensões. Uma vez que não foram identificadas aberturas sobre a membrana por onde ocorresse a perda de material celular, sugere-se que este processo tenha ocorrido através da própria membrana, e que o material perdido tenha sido em sua maioria solvente intracelular.

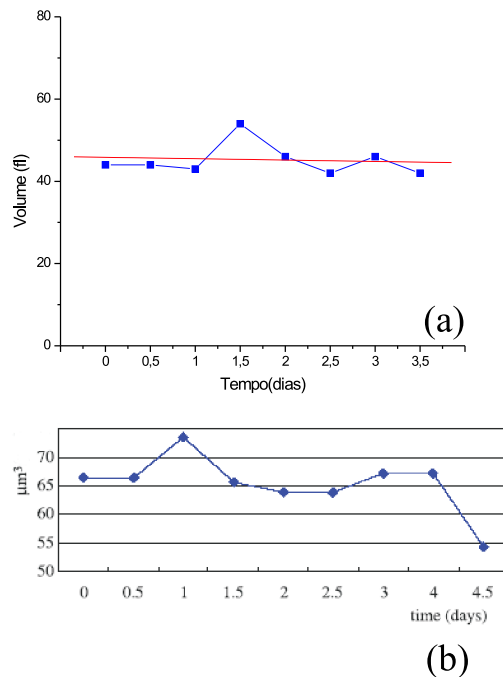


Figura 4.10: (a) Comportamento do volume do eritrócito exposto ao ar por 3.5 dias. (b) Primeira curva reportada deste mesmo experimento [Retirado de Y. Chen, J. Cai, *Micron* **37** 339 (2006)].

Não se pode deixar de comentar a semelhança entre o gráfico para a variação do volume encontrado por Yong (Fig. 4.12(b)) e o obtido neste trabalho (Fig. 4.12(a)). As seqüências de aumento e redução de volume discordam apenas de algumas horas, contudo, a correspondência entre a ordem dos eventos nos dois experimentos é claramente identificável. Tal comportamento deve ser comum à degradação do eritrócito ao ar, porém, com a dependência de alguma variável desconhecida. Talvez as variáveis temperatura e umidade tenham um papel fundamental neste processo, mas que ainda

é indeterminado.

Mais curioso é o que se observa no gráfico da Fig. 4.11. No intervalo de tempo entre 0 e 24h, o comportamento do volume da célula é completamente aleatório, inconstante. Contudo, ainda segue a tendência à diminuição (destacada pelo *fit* linear aplicado aos pontos, cujo coeficiente angular é negativo).

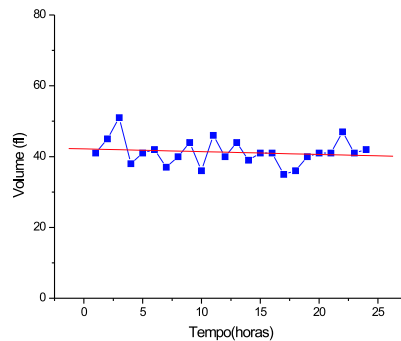


Figura 4.11: Comportamento do volume do eritrócito em 24h de exposição ao ar.

Estes resultados apontam a forte dependência do processo de degradação com as condições ambientais no qual a célula está inserida. Vale lembrar também que a hemácia foi colocada sobre um substrato de mica. Portanto, realizar o mesmo experimento em diferentes substratos e em diferentes condições de temperatura e umidade serviria como base para a criação de um padrão de comparação para o processo de envelhecimento do eritrócito ao ar.

5

Conclusões e Perspectivas

O advento da microscopia eletrônica (EM), na década de 30 do século passado, trouxe uma mudança significativa na maneira como estruturas microscópicas eram observadas e compreendidas. Em especial para a biologia, foi a primeira vez que subsistemas celulares foram observados diretamente com tamanha resolução. Tal mudança aumentou consideravelmente a compreensão da organização e função de tecidos animais e vegetais. De maneira semelhante, o desenvolvimento da microscopia de força atômica (AFM) trouxe nova compreensão destes sistemas em pequena escala. Antes, era possível apenas ver o espécime em estudo. Hoje, mais que isso, tornou-se factível a interação entre um objeto cujas características são bem conhecidas (a sonda) e o sistema analisado, de maneira que a resposta deste sistema a tal estímulo possa ser medida.

A principal vantagem que a técnica AFM possui sobre as demais técnicas de microscopia, especialmente no que concerne à visualização e manipulação de células, é a possibilidade de realizar medidas em meio líquido sob o controle de parâmetros como pH e força iônica, permitindo o monitoramento de processos de dinâmica celular em tempo real e em meio natural [79]. Por exemplo, após infectadas com vírus, células do fígado apresentaram várias protuberâncias em sua superfície, que depois de algum tempo desaparecerem deixando marcas sobre a membrana, indicando o processo de liberação dos vírus pelas mesmas [80]. Cargas da ordem de 10nN aplicadas à superfície da membrana plasmática foram capazes de resolver grânulos com dimensões de até

10nm, viabilizando a identificação de complexos de proteínas individuais [81]. Mais que isso, organelas intracelulares puderam ser localizadas através de imagens do exterior da membrana celular [82]. Dentro desta perspectiva, propõe-se neste trabalho a aplicação do microscópio de força atômica para a investigação de alguns fenômenos biofísicos relacionados às células vermelhas.

O primeiro deles foi a diferenciação de grupos sanguíneos através de imagens tridimensionais da membrana eritrocitária. Apesar da distinção observada por meio da análise da rugosidade da membrana entre os dois grupos AB+ e O+, os resultados sugerem que uma investigação mais abrangente deve ser realizada com o objetivo de melhorar o número amostral e portanto, a confiabilidade do resultado obtido com o método estatístico empregado. As mesmas medidas deveriam ser feitas em meio líquido, uma vez que assim, a resolução atingida é consideravelmente melhor [83].

No segundo experimento foram encontradas depressões sobre a membrana das hemácias parecidas com "buracos". Estes buracos estavam presentes tanto sobre células oriundas de doadores, como de indivíduos com SMD. Contudo, neste segundo grupo a profundidade desses buracos parecia, em alguns casos, maior. Tal fato motivou o desenvolvimento de um estudo que comparava o perfil destes caracteres entre os dois grupos de indivíduos. A análise dos resultados foi feita por meio de teste estatístico não paramétrico (Mann-Whitney) por causa da não normalidade das curvas encontradas. Tal fato pode pôr em cheque a hipótese final de que existe diferença entre os dois grupos, decisão do teste. Porém, este resultado indica a necessidade de se entender o motivo da existência de um padrão de acomodação do plasma sobre a membrana de células doentes, diferente daquele observado em hemácias saídas.

Ao mesmo tempo em que os "*buracos*" eram encontrados sobre as hemácias, eles também estavam presentes sobre o vidro (substrato dos eritrócitos) em regiões onde não haviam células, mas ainda sobre o esfregaço. Daí, surgiu a idéia de testar alguns métodos de preparação de eritrócitos para análise AFM. Este foi o objetivo do terceiro experimento. Os quatro métodos testados (Sangue Total, NaCl, PBS+ALB e PBS) apresentaram vantagens e desvantagens. Logo, a principal conclusão deste estudo foi

a de que, dependendo do que se quer analisar, ou tocar sobre a membrana da célula, deve-se escolher o método mais apropriado. Por exemplo: uma vez querendo apenas colher informações de volume das células, o primeiro método (Sangue Total) mostrou-se satisfatório, como foi verificado no experimento do capítulo 4. No entanto, quando se quer estudar pequenos sistemas sobre a membrana, como sítios de proteínas, receptores de determinados ligantes, etc; é provável que o último método (PBS) traga melhores resultados. Isso por que este método foi o que removeu melhor a camada de plasma, expondo uma estrutura que provavelmente por ser o glicocálice da célula, que corresponde à parte mais externa da membrana plasmática. Assim, os testes de adesão entre uma sonda funcionalizada e diferentes grupos sanguíneos, como foi feito por Grandbois [54], poderiam ser refeitos com o objetivo de se verificar uma possível melhoria no contraste das imagens, o que efetivamente está ligado à força de atração dividida pelo par sonda-amostra.

No quarto momento, verificou-se a versatilidade do AFM em realizar medidas de volume em escalas, neste caso, micrométricas. Para tanto, realizou-se a varredura de 100 células vermelhas colhidas de seis indivíduos diferentes: dois apresentando hemácias microcíticas, três normocíticas, e um macrocíticas. A relação encontrada Eq. (4.2) entre o volume medido pelo AFM e o volume determinado pelos contadores de células automáticos sugere que, houve perda de água pelos eritrócitos devido à sua exposição ao ar, causando assim, a redução do seu volume. Contudo, a linearidade da relação entre os dois volumes foi verificada com sucesso. Parece muito pouco empregar o AFM para realizar medidas em comprimentos da ordem de microns, porém, este tipo de medida comprova uma das principais vantagens da técnica AFM em relação às demais: fornecimento de informação de altura, possibilitando o cálculo de volumes por meio das imagens obtidas. Como já foi citado anteriormente, esta é uma ferramenta poderosa na determinação do cariótipo de espécies animais e vegetais, o que aponta o AFM como via alternativa nos estudos de citogenética.

Já no quinto experimento, tentou-se ratificar os resultados obtidos por Yong em sua proposta de utilizar o AFM para investigar o processo de envelhecimento de uma

célula vermelha ao ar [84]. Segundo ele, a aplicação desta técnica encontraria espaço na ciência forense, quando um padrão de referência sobre as mudanças ocorridas na membrana da célula devido à exposição ao ar com o tempo fosse montado. Nossos resultados concordaram em parte com aqueles obtidos por Yong. A diferença encontrada na evolução do processo de envelhecimento pode estar relacionada a única discordância entre as metodologias dos dois experimentos: a umidade relativa do ar no primeiro caso, tanto quanto a temperatura ambiente, foram controladas e mantiveram-se em 75% e 25°C, respectivamente. Na segunda ocasião, contudo, a umidade relativa e a temperatura (que não foram controladas) oscilavam entre 35-48% e 18-25°C, respectivamente. Deve-se enfatizar que, na cena de um crime, é pouco provável que se tenham as mesmas condições ideais conseguidas em laboratório com o controle das variáveis físicas do ambiente. Por isso, o segundo experimento aproxima-me mais da realidade encontrada na exposição de uma célula ao ar, que a primeira. Isto sugere que a análise de uma prova criminal desta natureza deve basear-se na comparação entre o perfil da célula no momento da coleta da prova (sangue sobre vidro, tecido, papel, etc.) e o perfil apresentado por uma célula de mesmo grupo sanguíneo submetida às mesmas condições ambientais experimentadas pela prova. Por isso, é necessário testar-se com maior acurácia a aplicação do AFM à análise de glóbulos vermelhos sobre diferentes substratos e sob diferentes condições climáticas.

Poderíamos então sumarizar as perspectivas nos seguintes tópicos:

- Aplicação da técnica AFM operando em líquido na caracterização da parte exterior de eritrócitos atingidos pelas SMDs. Uma vez que a resolução do AFM aumenta neste meio, novas características da membrana celular podem ser determinadas. Além disso, a exposição do citoesqueleto destas células e subsequente avaliação com a microscopia de força atômica, mostra-se mais uma alternativa viável de caracterização da membrana eritrocitária, metodologia já testada por Liu e colaboradores [78].
- Aplicação do cálculo de volumes das imagens obtidas com o AFM para a determinação do cariótipo humano em estudos de citogenética, como reportado por

Rasch e Fritzsche [45, 46].

- Formulação de um protocolo de envelhecimento de células vermelhas ao ar observadas com o AFM, com possível aplicação em ciência forense.

Referências

- [1] E. Hecht e A. Zajac, *Optics*, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, p. 3 (1974).
- [2] Aristóteles, CAs Nuvens , Phys. Rev. **45**, 3494 (1980).
- [3] A. H. Wilson, Proc. Roy. Soc. A. **134**, 279 (1931).
- [4] J. B. *Magia Naturalis: Natural Magick*, London (1658) em www.homepages.tscnet.com/omard1/jportab1.html.
- [5] R. Descartes 1596-1650, *Discourse on the Method of Rightly Conducting One's Reason and of Seeking Truth in the Sciences(1637)*em <http://www.gutenberg.org/etext/59>.
- [6] R. Hooke. "*Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*", London: J. Martyn and J. Allestry, (1665-primeira edição).
- [7] M. Espinasse, *Robert Hooke* 2nd ed., University of California Press, Berkeley and Los Angeles, (1962).
- [8] J. A. Moore, *Science as a Way of Knowing*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, (1993).
- [9] C. Dobell, *Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals."*, Dover Publications, New York, (1960).

-
- [10] B. J. Ford, *The Leeuwenhoek Legacy*, Biopress, Bristol, and Farrand Press, London, (1991).
- [11] L. Rayleigh, *Philos. Mag.* **8**, 261 (1879).
- [12] J. Bardeen and W. H. Brattain, *Phys. Rev.* **74**, 230 (1948).
- [13] E. Abbe, *Archiv. Mikroskop. Anat.* **9**, 413 (1873).
- [14] E. Abbe, *J. Roy. Micr. Soc.* **2**, 300 and 460 (1882).
- [15] E. Hecht e A. Zajac, *Optics*, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, p. 465 (1974).
- [16] M. Born, E. Wolf, *Principles of Optics*, Pergamon, Oxford (1987).
- [17] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, Mc Graw-Hill, New York (1968)
- [18] G. A. Massey, *Appl. Opt.* **23**, 658-660 (1984).
- [19] De Broglie, Maurice. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **172**, 274 (1921).
- [20] E. W. Müller., *Z. Phys.* **131**, 136 (1951).
- [21] G. Binnig and H. Rohrer, *Sci. Ame.* **253**, 50 (1985).
- [22] C. Bai, *Scanning Tunneling Microscopy and its Application*, Shangai Scientific and Technical Publishers and Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1995).
- [23] J. A. OŠKeefe, *J. Opt. Soc. Am.* **46**, 359 (1956).
- [24] E.H. Synge, *Phil. Mag.* **6**, 356 (1928).
- [25] E. H. Synge, *Philos. Mag.* **13(83)**, 297(1932).
- [26] E. A. Ash, G. Nichols, *Nature* **237**, 510 (1972).
- [27] D. W. Pohl, W. Denk, M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **44(7)**, 651 (1984).

- [28] A. Lewis, M. Isaacson, A. Harootunian, A. Muray, *Ultramicroscopy* **13**, 227 (1984).
- [29] B.V. Torres , Smith DF., *Anal. Biochem.* **170(1)** 209 (1988).
- [30] P. Jena, Heninrich Hörber, J. K., *Atomic Force microscopy in Cell Biology, Methods in Cell Biology*, Vol. 68, Academic Press, p.33 (2002).
- [31] Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, H.G., Zhu, X., Guthold, M., Bustamante, C., Kool, E.T., Kashlev, M., Hansma, P.K., *Biochemistry* **36**, 461 (1997).
- [32] M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann and H. Gaub, *Biophys. J.* **74(5)**, 2398 (1998).
- [33] M. B. Viani, T. E. Schäffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Hansma, P. K., *J. Appl. Phys.* **86** 2258 (1999).
- [34] Lyubchenko Y. L., Jacobs B. L., Lindsay S. M., Stasiak A., *Scanning. Microsc.* **9** 705 (1995).
- [35] S. J. van Noort, K. O. van der Werf, A. P. Eker, C. Wyman, B. G. de Grooth, N. F. van Hulst and J. Greve, *Biophys. J.* June; **74(6)** 2840 (1998).
- [36] E. L. Florin , V. T. Moy , H. E. Gaub , *Science.* **264** 415 (1994).
- [37] U. Dammer , O. Popescu , P. Wagner , D. Anselmetti , H. J. Guntherodt , G. N. Misevic , *Science* **267** 1173 (1995).
- [38] U .Dammer , M. Hegner , D. Anselmetti , P. Wagner , M. Dreier , W. Huber , H. J. Guntherodt , *Biophys. J.* **70(5)** 2437 (1996).
- [39] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher and H. Schindler, *Biophysics* **93(8)** 3477 (1996).
- [40] 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., *Science* **243** 1586 (1989).

- [41] H. G. Hansma , J. Vesenka , C. Siegerist , G. Kelderman , H. Morrett , R. L. Sinsheimer , V. Elings , C. Bustamante , P.K. Hansma , *Science* **256** 1180 (1992).
- [42] M. Winfield , T.J. McMaster , A. Karp , M.J. Miles , *Chromosome Res.***3(2)** 128 (1995).
- [43] D.M. Jondle , L. Ambrosio , J. Vesenka , E. Henderson , *Chromosome Res.* **3(4)** 239 (1995).
- [44] Vesenka J., Mosher C., Schaus S., Ambrosio L., Henderson E., *Biotechniques*. 1995 **19(2)** 852 (1995).
- [45] P. Rasch, U. Wiedemann, J. Wienberg and W. M. Heckl, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 2509 (1993).
- [46] W. Fritzsche, E. Henderson , *Scanning Microsc.* **10(1)** 108 (1996).
- [47] T. J. McMaster, M. O. Winfield, A. A. Baker, A. Karp, M. J. Miles, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **14(2)** 22 (1996).
- [48] E. Henderson, *Nucleic Acids Res.*, **90** 445 (1992).
- [49] J. Vesenka , M. Guthold , C. L. Tang , D. Keller, E. Delaine, C. Bustamante, *Ultramicroscopy* **42** 1243 (1992).
- [50] P. Bongrand, P.M. Claesson , A. S. G. Curtis, *Studying Cell Adhesion*, Springer-Verlag, Berlin (1994).
- [51] R.M. Weis , H. M. McConnell , *Prog. Clin. Biol. Res.* **102** 31 (1982).
- [52] W.I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **65** 441 (1996).
- [53] T. Feizi, *Adv. Exp. Med. Biol.* **435** 51 (1998).
- [54] M. Grandbois, W. Dettmann, M. Benoit, H. E. Gaub., *J. Histochem. Cytochem.* **48(5)** 719 (2000).

- [55] M. C. Zago, R. P. Falcão, R. Pasquini, *Hematologia - Fundamentos e Prática* Ed. Atheneu, São Paulo, p.953 (2001).
- [56] J. Mou, J. Yang, Z. Shao, *J. Mol. Biol.* **248**, 507 (1995).
- [57] T. Walz, P. Tittmann, K. H. Fuchs, D.J. Muller, B.L. Smith, P. Agre, H. Gross, A. Engel, *J. Mol. Biol.* **264**, 907 (1996).
- [58] J. Torres, T. J. Stevens, M. Samsó, *Trends Biochem. Sci.* **28**, 137 (2003).
- [59] N. D. Lang, *Phys. Rev. Lett.* **58**, 45 (1987).
- [60] I. Giaever, *Rev. Mod. Phys.* **46**, 245 (1974).
- [61] H. H. Guenther, P. G. Wierer and J. M. Bennett, *Appl. Opt.* **23**, 3820 (1984).
- [62] R. Young, J. Ward and F. Scire, *Rev. Sci. Instrum.* **43**, 999 (1972).
- [63] S. Vieira, *IBM J. Res. Dev.* **30**, 553 (1986).
- [64] G. Binnig and H. Rohrer, *Rev. Mod. Phys.* **59**, 615 (1987).
- [65] Newton C., *Eletrônica Fácil - EDITORA SABER* (2002).
- [66] Digital Instruments, Reference Manual, Version 5.12r3 (2000).
- [67] Y. Chen, K. S. Schneider, B. G. Orr, M. M. Banaszak Holl, *Phys. Rev. B.* **70** 85402 (2004).
- [68] Dužan VOBORNIK's Thesis, SCANNING NEAR-FIELD INFRARED MICROSCOPY AND SPECTROMICROSCOPY APPLIED TO NANO-SYSTEMS AND CELLS (2005).
- [69] C.B. Prater, P.G. Maivald, K.J. Kjoller, M.G.Heaton, Technical Notes: Probing Nano-scale forces with an Atomic Force Microscope(1995).
- [70] A. L. Weisenhorn, P. K. Hansma, T. R. Albrecht, C. F. Quate, *Appl. Phys. Lett.* **54(26)**, 2651 (1989).

- [71] H. J. Butt, *Biophys J.* **60**(26), 1438 (1991).
- [72] H. X. You, J. M. Lau, S. Zhang, L. Yu, *Ultramicroscopy* **82**, 297 (2000).
- [73] Alvin W. Czanderna, Cedric J. Powell, Theodore E. Madey, *Specimen Handling, Preparation, and Treatment in Surface Characterization*, KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBLISHERS - New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- [74] V. J. Morris, A. R. Kirby, A. P. Gunning, *Atomic Force Microscopy for Biologists*, Institute of Food Research, Norwich, UK, (1999).
- [75] J. S. Fonseca, G. A. Martins, *Curso de Estatística Ed. Atlas*, São Paulo, p.240 (1996).
- [76] M. O'Reilly, L. McDonnell, J. O'Mullane, *Ultramicroscopy* **86** 107 (2001).
- [77] M. Girasole, A. Cricenti, R. Generosi, A. Congiu-Castellano, G. Boumis, G. Amiconi, *J. Microsc.* **204** 46 (2001).
- [78] F. Liu, H. Mizukami, S. Sarnaik, A. Ostafin, *J. Struct. Biol.* **150** 200 (2005).
- [79] N. C. Santos, M. A. R. B. Castanho, *Biophys. Chem.* **107** 133 (2004).
- [80] W. Harbele, J. K. H. Horber, F. M. Ohnesorge, D. E. Smith, G. Binnig, *Ultramicroscopy* **42** 1161 (1992).
- [81] C. Le Grimellec, M. C. Giocondi, E. Finot, V. Vié, J. P. Goudonnet, *Biophys. J.* **75** 695 (1998).
- [82] P. G. Haydon, E. Henderson, E. F. Satnley, *Neuron* **13** 1275 (1994).
- [83] E. Meyer, *Progres. Surfac. Science* **41** 3 (1992).
- [84] Y. Chen, J. Cai, *Micron* **37** 339 (2006).

Glossário

AFM Sigla para *Atomic Force Microscopy*, ou Microscopia de Força Atômica. Técnica de microscopia que utiliza a força de atração entre átomos como coletor de informações a respeito de uma superfície em nanoescala.

AFM Sigla para *Atomic Force Microscope*, ou Microscópio de Força Atômica. Equipamento de microscopia capaz de aumentos de até 1.000.000.000 X. Ele é hoje uma das principais ferramentas em nanotecnologia.

Amplitude lateral Máxima dimensão que o scanner de um AFM é capaz de deslocar-se no plano (x,y) (plano da amostra).

Amplitude vertical Máxima dimensão que o scanner de um AFM é capaz de deslocar-se na direção do eixo z (em relação ao plano da amostra).

Cantilever Haste que suporta a sonda AFM, normalmente feita de nitreto de silício. Poder ter formato piramidal (para *contact mode*) ou formato retangular (para *tapping mode*).

Convolução Processo de formação da imagem a partir do formato dos caracteres da amostra e do formato da sonda.

Cristal Piezoelétrico Material que, se submetido a um *stress* mecânico, responde a este estímulo gerando uma diferença de potencial. Também é possível o processo inverso, ou seja, submetido a uma tensão elétrica, ele muda suas dimensões espaciais, comprimindo-se ou distendendo-se.

Curva de força Gráfico de interação (forças) entre a sonda e a amostra *versus* a distância de separação entre as duas.

Célula líquida Componente do AFM com o qual realiza-se medidas de força em meio líquido.

Comprimento de onda Distância entre dois máximos de uma onda eletromagnética, sonora, etc.

Difração da luz Desvio da trajetória de uma onda eletromagnética ao encontrar um obstáculo, cujas dimensões sejam comparáveis ao seu comprimento de onda.

EFM Sigla para *Electron Force Microscopy*. Variação do microscópio de varredura por sonda, no qual as forças envolvidas na medida são de natureza elétrica.

Eritrócito Célula vermelha do sangue, hemácia.

Forças de Van der Waals Forças de origem molecular, atrativas na aproximação e repulsivas no contato entre duas superfícies.

Feedback Sistema fechado através do qual o AFM lê as informações sobre a amostra varrida e se autoregula para manter os parâmetros do sistema estáveis.

Gap Espaço entre a sonda STM e uma superfície condutora, por onde flui a corrente de tunelamento.

Modo Contato Modo de varredura em que a sonda toca a superfície da amostra.

Modo Tapping Modo de varredura em que a sonda oscila sobre a amostra, tocando-a intermitentemente.

MFM Sigla para *Magnetic Force Microscopy*, ou Microscopia de Força Magnética. Variação do microscópio de varredura por sonda em que as forças envolvidas na medida são de natureza magnética.

PBS Solução salina tamponada contendo 145nM NaCl e 5nM KH₂PO₄/K₂HPO₄, com pH = 7,4.

Sonda Componente do sistema AFM formado pelo *cantilever* e a ponta.

Ponta Elemento sensor da sonda, feita normalmente de nitreto de silício. Pode também ser feita de materiais magnéticos e condutores, no caso de medidas de força elétrica ou magnética.

Sobrenadante Qualquer fase líquida de uma solução que fica na parte superior do tubo de ensaio após centrifugação. No nosso caso, líquido semitransparente rico em plaquetas e leucócitos, que surge sobre o concentrado de hemácias quando a amostra de sangue é centrifugada.

SMD Sigla para Síndrome Mielodisplástica. Doença do sangue que atinge na sua grande maioria pessoas idosas, com potencial de progressão à leucemia aguda.

SPM Sigla para *Scanning Probe Microscopy*, ou Microscopia de Varredura por Sonda. Técnica de microscopia em que não é utilizada luz, mas sim uma sonda que interage com a amostra pontualmente.

STM Sigla para *Scanning Tunneling Microscopy*, ou Microscopia de Varredura por Tunelamento. Técnica de microscopia baseada no fluxo de corrente de tunelamento entre duas superfícies no vácuo.

Tunelamento Fenômeno de natureza quântica em que um elétron atravessa uma barreira de potencial numa região classicamente proibida.

Varredura Processo em que a sonda percorre uma área sobre a amostra, linha por linha, formando uma imagem tridimensional a partir da junção destas linhas.

A

Tabelas de dados.

As tabelas deste anexo correspondem a todos os valores das variáveis trabalhadas no capítulo 3 e 4, mais especificamente nas seções 3.4, 4.3 e 4.4.

Estas tabelas estão organizadas da seguinte maneira:

TABELA A.1 - Valores de profundidade dos buracos encontrados sobre a membrana celular, utilizados na seção 3.4.

TABELA A.2 - Valores de abertura dos buracos encontrados sobre a membrana celular, utilizados na seção 3.4.

TABELA A.3 - Valores de volume para a amostra A, utilizados na seção 4.3.

TABELA A.4 - Valores de volume para a amostra B, utilizados na seção 4.3.

TABELA A.5 - Valores de volume para a amostra C, utilizados na seção 4.3.

TABELA A.6 - Valores de volume para a amostra D, utilizados na seção 4.3.

TABELA A.7 - Valores de volume para a amostra E, utilizados na seção 4.3.

TABELA A.8 - Valores de volume para a amostra F, utilizados na seção 4.3.

TABELA A.9 - Valores de volume encontrados para o envelhecimento de uma eritrócito ao ar durante 24h, com intervalo entre as medidas de 1h.

TABELA A.10 - Valores de volume encontrados para o envelhecimento de uma eritrócito ao ar durante 84h, com intervalo entre as medidas de 12h.

É interessante lembrar que, nas tabelas B.3 a B.8 a primeira coluna, cujo nome é *Imagem*, indica a ordem das imagens carregadas em regiões diferentes do esfregaço. Note que esta quantidade pode variar de amostra para amostra. Isto se deve ao fato de que foi preciso realizar tantas varreduras quanto necessárias para que se atingisse o número suficiente de eritrócitos à análise, no caso 100.

O nome da amostra está indicado na primeira célula do lado esquerdo superior, por exemplo: A-18/01/06, onde A é ordem da amostra (como aparece nos histogramas do capítulo 4) seguida pela data da análise. Exatamente ao lado desta célula, pode ser vista a altura do plano de *Threshold* utilizada para isolar as partículas no comando *Partical Analysis*.

Tabela A.1: Valores das profundidades (P) dos buracos encontrados sobre a membrana de doadores e pacientes com SMD.

TABELA A1							
Profundidade (nm)							
Doador /Paciente	Ordem	Sadio	SMD	Doador /Paciente	Ordem	Sadio	SMD
1	1	3.069	54	6	51	7.140	5.523
	2	3.026	4.561		52	8.915	11.447
	3	2.373	4.048		53	5.389	13.033
	4	1.771	13.672		54	8.380	3.834
	5	4.542	5.251		55	7.355	6.412
	6	2.547	8.258		56	4.244	8.691
	7	4.548	16.255		57	4.966	4.501
	8	3.272	4.670		58	5.629	4.910
	9	6.262	4.096		59	8.149	7.783
	10	4.982	7.100		60	3.399	4.581
2	11	11.252	7.684	7	61	5.254	3.912
	12	9.148	6.839		62	5.979	4.462
	13	7.719	6.292		63	5.847	5.515
	14	17.557	8.466		64	7.426	7.154
	15	5.588	9.210		65	7.001	4.901
	16	10.200	2.600		66	11.047	4.196
	17	10.967	10.290		67	10.511	6.207
	18	6.272	9.845		68	4.481	4.102
	19	8.244	12.578		69	6.810	2.639
	20	7.823	6.362		70	9.161	4.156
3	21	3.609	16.145	8	71	4.653	1.624
	22	3.871	19.62		72	4.512	3.797
	23	3.885	21.535		73	5.691	3.838
	24	8.939	10.207		74	8.501	5.657
	25	3.542	9.193		75	5.898	4.24
	26	1.775	18.574		76	4.661	3.607
	27	3.085	7.513		77	3.852	6.487
	28	2.376	12.862		78	10.331	5.388
	29	2.335	7.016		79	5.077	4.604
	30	2.754	24.125		80	6.434	3.82
4	31	2.769	13.782	9	81	7.791	
	32	1.956	10.777		82	5.150	
	33	2.205	15.547		83	3.977	
	34	2.067	8.371		84	5.147	
	35	1.8	12.246		85	5.737	
	36	1.878	11.252		86	5.107	
	37	2.134	15.896		87	8.339	
	38	1.658	24.885		88	8.499	
	39	1.045	13.532		89	5.945	
	40	2.798	12.131		90	5.544	
5	41	6.947	17.473	10	91	10.943	
	42	6.582	14.798		92	4.767	
	43	7.679	10.399		93	6.275	
	44	10.144	11.274		94	5.217	
	45	7.337	7.558		95	6.133	
	46	8.882	10.982		96	7.291	
	47	10.651	9.619		97	4.155	
	48	6.815	19.279		98	5.977	
	49	6.230	15.810		99	5.773	
	50	5.302	11.426		100	6.947	

Tabela A.2: Valores das aberturas (A) dos buracos encontrados sobre a membrana de doadores e pacientes com SMD.

TABELA A2							
Abertura (nm)							
Doador /Paciente	Ordem	Sadio	SMD	Doador /Paciente	Ordem	Sadio	SMD
1	1	75.373	154.11	6	51	95.401	47.013
	2	84.241	45.254		52	166.950	72.086
	3	62.072	36.769		53	159.000	119.100
	4	57.638	93.337		54	174.900	43.879
	5	53.205	59.396		55	182.850	50.147
	6	70.939	61.155		56	87.451	62.684
	7	88.647	103.96		57	119.250	43.879
	8	75.373	42.808		58	103.350	56.415
	9	97.542	48.924		59	159.000	53.281
	10	88.674	42.808		60	127.200	59.549
2	11	117.190	87.781	7	61	37.109	54.688
	12	99.609	105.340		62	39.063	50.781
	13	82.031	79.003		63	52.734	44.922
	14	140.630	70.225		64	58.594	75.456
	15	87.891	87.781		65	56.641	49.046
	16	93.750	61.447		66	62.500	52.819
	17	164.060	87.781		67	56.641	71.683
	18	128.910	61.447		68	31.250	56.592
	19	99.109	87.781		69	52.734	52.819
	20	123.050	79.003		70	50.781	30.182
3	21	52.734	72.820	8	71	55.727	35.156
	22	62.500	84.957		72	61.919	31.250
	23	76.172	72.100		73	61.867	33.203
	24	78.125	78.889		74	148.610	68.359
	25	66.406	58.594		75	154.800	39.063
	26	42.969	92.773		76	92.878	44.922
	27	58.594	58.594		77	92.878	42.969
	28	33.203	78.125		78	99.070	46.875
	29	44.922	58.594		79	99.070	39.063
	30	29.297	122.070		80	117.650	39.063
4	31	29.795	198.750	9	81	53.510	
	32	43.152	84.088		82	57.330	
	33	35.96	202.570		83	103.200	
	34	27.74	98.799		84	61.155	
	35	32.877	109.390		85	84.088	
	36	26.713	93.184		86	95.554	
	37	25.686	84.088		87	103.200	
	38	27.74	236.970		88	117.190	
	39	7.466	145.240		89	78.125	
	40	52.399	103.200		90	70.313	
5	41	108.120	74.991	10	91	46.875	
	42	101.760	58.326		92	70.313	
	43	120.840	66.659		93	56.641	
	44	133.560	66.549		94	48.828	
	45	132.500	74.991		95	50.781	
	46	82.681	91.656		96	62.500	
	47	82.851	58.326		97	35.156	
	48	39.063	74.121		98	37.109	
	49	42.969	108.320		99	15.625	
	50	50.781	58.326		100	46.875	

Tabela A.3: Valores de volume para a amostra A.

TABELA A3									
Amostra A-27/01/06					Threshold: 200nm				
Imagem	Hemácia	Altura média(nm)	Área (um ²)	Volume (fl)	Imagem	Hemácia	Altura média(nm)	Área (um ²)	Volume (fl)
1	1	456.80	35.67	16.2926856	5	53	348.69	45.7	15.935133
	2	379.87	39.139	14.8677319		54	522.9	44.098	23.058844
	3	386.75	34.599	13.3811633		55	490.53	48.752	23.914319
	4	350.54	51.155	17.9318737		56	355.23	39.063	13.876349
	5	529.73	40.131	21.2585946		57	348.69	45.7	15.935133
	6	398.68	44.632	17.7938858		58	408.87	58.517	23.925846
	7	431.69	51.918	22.4124814		59	387.97	47.951	18.603549
	8	392.85	52.528	20.6356248		60	418.54	46.425	19.43072
	9	406.97	49.477	20.1356547		61	325.6	41.962	13.662827
2	10	457.83	53.749	24.6079047	62	416.77	49.744	20.731807	
	11	443.24	39.978	17.7198487	63	437.09	47.264	20.658622	
	12	409.24	40.321	16.500966	64	396.51	48.447	19.20972	
	13	390.5	47.836	18.679958	65	431.71	49.362	21.310069	
	14	336.88	52.223	17.5928842	66	389.88	52.757	20.568899	
	15	320.91	46.387	14.8860522	67	368.9	38.223	14.100465	
	16	493.82	51.994	25.6756771	68	400.33	58.02	23.227147	
	17	485.01	50.545	24.5148305	69	368.68	63.248	23.318273	
	18	508.9	47.34	24.091326	70	440.32	44.746	19.702559	
	19	454.55	46.921	21.3279406	71	416.96	51.721	21.565588	
3	20	469.19	54.359	25.5046992	72	388.66	47.035	18.280623	
	21	463.69	51.88	24.0562372	73	418.95	52.452	21.974765	
	22	506.19	40.512	20.5067693	74	451.79	47.722	21.560322	
	23	526.91	46.945	24.73579	75	388.23	58.289	22.629538	
	24	433.67	52.528	22.7798178	76	400.17	59.662	23.874943	
	25	435.85	48.18	20.999253	77	400.87	46.806	18.763121	
	26	506.44	47.951	24.2843044	78	373.26	50.201	18.738025	
	27	377.82	46.234	17.4681299	79	411.8	52.299	21.536728	
	28	517.63	45.09	23.3399367	80	396.61	47.417	18.806056	
	29	582.4	33.531	19.5284544	81	446.02	47.02	20.97186	
	30	469.07	52.528	24.639309	82	342.84	41.733	14.307742	
	31	358.09	48.981	17.5396063	83	490.59	51.346	25.189834	
4	32	402.08	49.286	19.8169149	84	524.28	42.114	22.079528	
	33	426.97	44.746	19.1051996	85	366.66	51.765	18.980155	
	34	417.38	55.58	23.1979804	86	292.46	44.403	12.986101	
	35	413.42	40.207	16.6223779	87	368.82	41.428	15.279475	
	36	427.48	40.588	17.3505582	88	486.61	39	18.929129	
	37	458.73	43.526	19.966682	89	379.02	44.022	16.685218	
	38	462.3	48.79	22.555617	90	401.5	58.861	23.632692	
	39	497.3	54.321	27.0138333	91	383.92	49.019	18.819374	
	40	466.84	49.057	22.9017699	92	363.41	45.853	16.663439	
	41	449.47	48.828	21.9467212	93	346.7	49.248	17.074282	
	42	482.26	29.945	14.4412757	94	393.37	48.027	18.892381	
43	408.8	47.302	19.3370576	95	333.94	50.354	16.815215		
44	429.77	53.864	23.1491313	96	306.13	48.981	14.994554		
45	433.82	55.771	24.1945752	97	342.68	42.191	14.458012		
46	437.71	45.013	19.7026402	98	328.77	42.915	14.109165		
47	458.16	59.776	27.3869722	99	344.31	53.558	18.440555		
48	465.51	46.387	21.5936124	100	395.26	41.008	16.208822		
49	397.35	53.94	21.433059						
50	404.57	53.749	21.7452329						
51	396.02	65.041	25.7575368						
52	398.91	49.973	19.9347294				média	20.86236	

Tabela A.4: Valores de volume para a amostra B.

TABELA A4									
Amostra B-25/01/06					Threshold 200nm				
Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (μm^2)	Volume (Π)	Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (μm^2)	Volume (Π)
1	1	499.23	61.87	30.889357	4	51	440.19	52.071	22.921133
	2	409.89	39.177	16.0582605		52	397.38	38.033	15.113554
	3	476.95	47.569	22.6880346		53	443.76	45.738	20.296695
	4	426.33	49.515	21.10973		54	447.67	49.629	22.217414
	5	379.79	42.152	16.0089081		55	296	54.703	16.192088
	6	377.09	42.381	15.9814513		56	501.87	44.823	22.495319
	7	364.52	46.158	16.8255142		57	475.85	45.395	21.601211
	8	597.96	39.825	23.813757		58	376.27	50.507	19.004269
	9	440.35	54.169	23.8533192		59	367.6	51.994	19.112994
	10	406.22	52.795	21.4463849		60	352.2	41.351	14.563822
	11	428.61	49.133	21.0588951		61	343.6	42.305	14.535998
	12	362.1	46.12	16.700052		62	469.28	35.362	16.594679
	13	406.22	52.795	21.4463849		63	424.37	46.883	19.895739
	14	348.75	57.716	20.128455		64	439.15	50.659	22.2469
	15	421.35	54.092	22.7916642		65	554.68	58.975	32.712253
	16	373.84	53.558	20.0221227		66	555.51	41.237	22.907566
	17	423.84	53.52	22.6839168		67	386.01	41.695	16.094687
	18	460.49	54.321	25.0142773		68	407.48	50.507	20.580592
	19	463.89	57.564	26.703364		69	426.74	48.79	20.820645
	20	443.16	55.962	24.8001199		70	429.44	48.599	20.870355
	21	459.84	43.411	19.9621142		71	576	51.88	29.88288
2	22	385.59	54.398	20.9753248	72	438.54	47.607	20.877574	
	23	475.2	48.79	23.185008	73	543.84	50.278	27.343188	
	24	464.24	49.019	22.7565806	74	352.12	42.114	14.829182	
	25	399.27	42.725	17.0588108	75	469.72	50.125	23.544715	
	26	471.24	51.117	24.0883751	76	512.66	48.79	25.012681	
	27	413.19	57.831	23.8951909	77	439.31	45.891	20.160375	
	28	353.72	42.191	14.9238005	78	690.4	47.226	32.60483	
	29	424.66	39.52	16.7825632	79	399.41	48.447	19.350216	
	30	465.34	42.152	19.6150117	80	530.81	48.599	25.796835	
	31	432.59	44.479	19.2411706	81	469.63	50.163	23.55805	
	32	432.39	48.18	20.8325502	82	428.99	46.921	20.12864	
	33	396.24	50.812	20.1337469	83	443.25	45.776	20.290212	
	3	34	371.27	53.177	19.7430248	84	396.91	42.458	16.852005
35		463.17	54.626	25.3011244	85	315.08	39.864	12.560349	
36		410.22	52.452	21.5168594	86	352.94	43.221	15.25442	
37		506.87	47.646	24.150328	87	435.83	50.125	21.845979	
38		443.05	48.714	21.5827377	88	589.44	48	28.552474	
39		413.26	47.798	19.7530015	89	477.46	52.414	25.025588	
40		513.36	47.226	24.2439394	90	473.25	46.844	22.168923	
41		381.66	55.275	21.0962565	91	485.2	46.997	22.802944	
42		453.69	39.558	17.947069	92	500.05	43.446	21.725172	
43		303.36	43.983	13.3426829	93	438.63	49.858	21.869215	
44		457.27	59.853	27.3689813	94	478.99	55.161	26.421567	
45		470.58	52.795	24.8442711	95	428.54	59.586	25.534984	
46		404.1	48.256	19.5002496	96	390.19	56.038	21.865467	
47		408	46.844	19.112352	97	363.95	63.362	23.0606	
48		352.26	54.054	19.041062	98	393.7	44.632	17.571618	
49		371.27	53.177	19.7430248	99	336.47	42.076	14.157312	
50		359.35	47.226	16.9706631	100	401.3	43.64	17.512732	
								média	20.974637

Tabela A.5: Valores de volume para a amostra C.

TABELA A5									
Amostra C -19/01/06					Threshold 200nm				
Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (um ²)	Volume (fl)	Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (um ²)	Volume (fl)
1	1	413.48	46.50	19.227233	6	51	504.95	48.18	24.328491
	2	406	43.449	17.640294		52	592.9	43.602	25.851626
	3	463.7	52.299	24.251046		53	482.41	56.648	27.327562
	4	536.18	47.76	25.607957		54	487.38	42.839	20.878872
	5	528.43	44.365	23.443797		55	358.84	44.632	16.015747
	6	559.96	45.586	25.526337		56	549.02	50.278	27.603628
	7	587.97	43.411	25.524366		57	540.37	45.166	24.406351
	8	542.96	44.098	23.94345		58	452.09	39.024	17.64236
2	9	489.97	51.308	25.139381	59	628.89	39.024	24.541803	
	10	494.25	45.7	22.587225	60	524.81	49.171	25.805433	
	11	496.27	47.302	23.474564	61	484.01	50.125	24.261001	
	12	514.7	53.864	27.723801	62	506.33	39.749	20.126111	
	13	478.96	50.43	24.153953	63	543.86	48.904	26.596929	
	14	444.09	46.539	20.667505	64	439.53	47.913	21.059201	
	15	559.66	46.425	25.982216	65	523.36	46.463	24.316876	
3	16	433.18	50.964	22.076586	66	573.83	51.689	29.660699	
	17	375.6	46.043	17.293751	67	491.85	48.866	24.034742	
	18	410.02	53.215	21.819214	68	519.83	45.7	23.756231	
	19	408.08	50.354	20.54846	69	635.29	52.643	33.443571	
	20	389.98	44.746	17.450045	70	662.7	53.024	35.139005	
4	21	439.11	41.122	18.057081	71	571.49	56.61	32.352049	
	22	421.49	51.956	21.898934	72	587.5	51.842	30.457175	
	23	412.82	44.479	18.361821	73	467.41	50.774	23.732275	
	24	477.93	47.226	22.570722	74	463.42	42.038	19.48125	
	25	480.02	45.319	21.754026	75	482.43	53.024	25.580368	
	26	437.75	49.515	21.675191	76	559.9	50.507	28.278869	
5	27	506.71	41.962	21.262565	77	560.92	51.92	29.122966	
	28	361.06	42.61	15.384767	78	453.93	41.962	19.047811	
	29	424.02	54.588	23.146404	79	502.31	40.092	20.138613	
	30	487	38.147	18.577589	80	485.68	47.913	23.270386	
	31	447.94	47.188	21.137393	81	478.74	53.635	25.67722	
	32	466.05	49.706	23.165481	82	581.52	47.874	27.839688	
	33	473.19	40.55	19.187855	83	456.26	50.926	23.235497	
	34	444.03	43.793	19.445406	84	507.61	39.52	20.060747	
	35	493.26	41.122	20.283838	85	427.5	47.379	20.254523	
	36	409.63	48.18	19.735973	86	478.89	43.945	21.044821	
	37	484.79	51.155	24.799432	87	356.16	42.648	15.189512	
	38	366.39	43.106	15.793607	88	452.62	45	20.563884	
	39	448.31	47.569	21.325658	89	386.87	40.512	15.672877	
	40	546.56	40.855	22.329709	90	401.39	45.013	18.067768	
6	41	552.86	42.839	23.68397	91	562.23	50.278	28.2678	
	42	551.49	47.569	26.233828	92	455.77	45.357	20.67236	
	43	561.23	48.826	27.402616	93	642.43	45.357	29.138698	
	44	609.12	46.73	28.464178	94	526.1	45.09	23.721849	
	45	636.9	38.28	24.380532	95	570.98	46.577	26.594535	
	46	417.67	47.493	19.836401	96	549.05	54.626	29.992405	
	47	419.82	47.607	19.986371	97	531.44	42.381	22.522959	
	48	451.9	50.43	22.789317	98	516.31	52.834	27.278723	
	49	526.58	53.825	28.343169	99	585.29	43.983	25.74281	
	50	509.67	53.482	27.258171	100	442.19	41.122	18.183737	
								média	22.247064

Tabela A.6: Valores de volume para a amostra D.

TABELA A6									
Amostra D-16/01/06					Threshold 200nm				
Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (µm ²)	Volume (fl)	Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (µm ²)	Volume (fl)
1	1	537.07	50.70	20.90972	2	51	461.8	41.504	22.5243
	2	492.58	46.158	30.51716		52	443.44	41.008	24.47423
	3	462.63	46.082	22.33651		53	651.86	47.264	27.16943
	4	497.6	49.438	22.43921		54	442.37	51.117	24.43785
	5	498.34	47.646	23.08964		55	355.61	45.738	25.34946
	6	461.81	38.528	18.50531		56	481.54	49.973	20.99816
	7	531.2	47.646	30.79348		57	573.25	58.022	26.81686
	8	506.96	48.637	23.03575		58	661.16	46.463	22.28659
	9	559.94	45.662	18		59	537.55	54.359	27.2735
	10	542.13	40.97	24.45166		60	501.01	46.501	25.68907
	11	497.64	51.613	31.09859		61	528.79	52.185	28.59337
	12	498.47	49.477	16.71791		62	549.11	55.542	26.7897
	13	449.8	46.272	22.40389		63	585.42	52.185	26.02387
	14	524.32	54.665	26.59381		64	409.02	43.983	28.79381
	15	464.95	52.91	20.67572		65	431.51	40.169	28.15845
	16	442.07	50.125	29.55558		66	499.46	42.305	25.59768
	17	443	49.553	26.55199		67	504.15	54.398	25.61747
	18	411.86	50.354	21.87104		68	515.44	52.185	26.71158
	19	579.2	55.084	19.52539		69	621.89	43.411	26.03793
	20	579.78	56.076	26.11576		70	642.79	52.91	23.97567
	21	577.61	56.114	25.95104		71	461.45	40.855	26.00516
	22	505.88	54.283	32.48857		72	579.36	50.049	23.10287
	23	429.88	44.67	16.55691		73	473.79	48.943	30.00085
	24	577.57	48.79	21.60076		74	539.17	56.19	21.20201
	25	597.8	43.602	16.71044		75	558.82	49.82	27.8261
	26	686.84	43.716	21.24203		76	539.65	44.136	37.31732
	27	669.44	53.329	24.95736		77	554.56	47.531	34.64106
	28	662.73	39.711	26.68001		78	552.9	56.305	27.04652
	29	461.33	54.779	28.85631		79	477.69	48.141	26.94968
2	30	556.32	54.588	24.21652	3	80	553.53	46.73	24.19178
	31	591.17	48.37	24.02591		81	518.88	48.294	31.77027
	32	474.55	45.509	27.92434		82	547.63	53.749	23.41745
	33	496.87	48.943	22.83471		83	405.94	45.776	19.95862
	34	645.72	45.319	23.18464		84	489.7	39.864	25.09804
	35	536.11	46.387	25.44206		85	510.56	46.082	21.53753
	36	687.54	62.981	24.0266		86	493.38	43.64	20.53163
	37	557.79	52.261	25.41107		87	467.15	56.572	22.11015
	38	525.96	46.768	29.012		88	483.81	45.319	15.18928
	39	551.44	45.395	24.31603		89	447.27	48.294	24.27456
	40	514.86	50.011	24.48936		90	462.07	40.169	18.96895
	41	526.99	52.643	26.95816		91	479	44.136	28.07328
	42	513.24	46.043	16.03006		92	633.24	53.596	20.17394
	43	566.76	55.084	19.59459		93	513.68	53.787	20.3906
	44	521.62	54.55	20.94427		94	485.56	44.289	29.88102
	45	554.63	54.054	22.39616		95	523.51	46.272	15.9291
	46	527.75	53.596	23.9132		96	540.01	44.927	22.46888
	47	608.82	47.34	24.42314		97	608.21	42.839	16.43793
	48	561.12	49.171	27.42174		98	493.7	48.141	28.11193
	49	586	42.458	24.80221		99	517.6	46.196	26.20344
	50	563.47	52.948	21.83234		100	528.17	54.436	20.86827
								média	23.871153

Tabela A.7: Valores de volume para a amostra E.

TABELA A7									
Amostra E-20/01/06					Threshold 200nm				
Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (µm ²)	Volume (fl)	Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (µm ²)	Volume (fl)
1	1	530.35	35.32	18.734083	3	51	638.04	54.741	34.926948
	2	543.28	48.294	26.237164		52	536.98	53.177	28.554985
	3	502.15	49.362	24.787128		53	612.42	45.853	28.081294
	4	478.94	42.839	20.517311		54	554.39	51.613	28.613731
	5	552.1	42	23.1882		55	511.99	42.305	21.659737
	6	519.85	49.629	25.799636		56	621.78	46.387	28.842509
	7	501.26	44.975	22.544169		57	616.61	47.493	29.284659
	8	550.68	50.354	27.728941		58	470.22	35.362	16.62792
	9	473.26	50.049	23.68619		59	538.08	51.804	27.874696
	10	598.94	44.975	26.937327		60	841.12	42.458	35.712273
	11	619.53	49.629	30.746654	61	514.74	50.278	25.880098	
	12	622.37	55.046	34.258979	62	485.86	47.836	23.241599	
	13	589.89	42.152	24.865043	63	553.29	43.297	23.955797	
	14	554.72	46.082	25.562607	64	465.13	55.389	25.763086	
	15	518.76	47.989	24.894774	65	607.72	45.815	27.842692	
	16	597.55	35.21	21.039736	66	541.7	43.144	23.371105	
	17	595.64	45.471	27.084346	67	529.78	54.665	28.960424	
	18	816.52	41.809	34.137885	68	511.19	54.741	27.983052	
	19	746.88	42.152	31.482486	69	501.99	47.531	23.860087	
	20	395.57	40.321	15.949778	70	521.67	40.359	21.05408	
2	21	495.4	48.256	23.906022	71	493	46.501	22.924993	
	22	483.69	53.846	26.044772	72	526	44.899	23.616874	
	23	515.91	48.103	24.816819	73	563.12	50.888	28.656051	
	24	347.1	45.013	15.624012	74	549.54	46.463	25.533277	
	25	478.34	54.283	25.96573	75	502.67	47.989	24.122631	
	26	502.62	46.883	23.564333	76	578.29	46.349	26.803163	
	27	433.38	47.226	20.466804	77	449.36	48.676	21.873047	
	28	343.17	39.749	13.640664	78	449.86	45.242	20.352566	
	29	425.92	47.92	20.410086	79	471.58	42.458	20.022344	
	30	452.67	37.308	16.888212	80	546.66	48.37	26.441944	
	31	330.07	50.392	16.632887	81	561.25	48.18	27.041025	
	32	502.59	50.85	25.556702	82	723.37	46.654	33.748104	
	33	524.79	48.294	25.344208	83	523.74	36.964	19.359525	
	34	553.11	40.817	22.576291	84	562.21	45.624	25.650269	
	35	604.24	51.994	31.416855	85	573.9	47.989	27.540887	
	36	425.13	46.196	19.639305	86	648.03	52.147	33.79282	
	37	518.44	48.485	25.136563	87	747.48	46.616	34.844528	
	38	365.79	52.872	19.340049	88	744.21	45	33.669549	
3	39	657.94	58.395	38.420406	89	580.4	60.501	35.11478	
	40	556.95	44.823	24.96417	90	684.92	50.011	34.253534	
	41	579.02	39.101	22.640261	91	720.77	45.166	32.554298	
	42	441.32	47.112	20.791468	92	571.58	52.91	30.242298	
	43	540.3	51.918	28.051295	93	603.21	46.768	28.210925	
	44	610.96	54.588	33.351084	94	623.5	46.196	28.803206	
	45	567.57	44.632	25.331784	95	620.01	46.387	28.760404	
	46	479.06	41.962	20.102316	96	638.04	50.621	32.298223	
	47	662.64	45.204	29.953979	97	569.28	49.477	28.166267	
	48	497.82	42.992	21.402277	98	595.76	44.785	26.681112	
	49	622.09	45.433	28.263415	99	573.45	58.136	33.338089	
	50	681.74	48.409	33.002352	100	557.67	49.362	27.527707	
								média	24.668551

Tabela A.8: Valores de volume para a amostra F.

TABELA A8									
Amostra F-10/02/06					Threshold 200nm				
Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (μm^2)	Volume (fl)	Imagem	Hemácia	Altura média (nm)	Área (μm^2)	Volume (fl)
1	1	666.92	53.06	35.388109	3	51	558.82	54.283	30.334426
	2	523.42	64.049	33.524528		52	477.95	49.973	23.884595
	3	574.74	62.027	35.649398		53	812.19	56.19	45.636956
	4	462.22	41.733	19.289827		54	488.21	62.675	30.598562
	5	488.73	56.648	27.685577		55	560.83	50.659	28.411087
	6	450.19	43.64	19.646292		56	540.79	52.299	28.282776
	7	449.79	63.477	28.55132		57	527.72	59.013	31.14234
	8	625.06	55.58	34.740835		58	528.45	64.125	33.886856
	9	488.54	64.659	31.588508		59	587.1	51.918	30.481058
	10	566.11	64.507	36.518058		60	581.24	47.684	27.715848
	11	625.06	55.58	34.740835		61	528.84	52.109	27.557324
	12	436.19	62.828	27.404945		62	501.91	63.438	31.840167
	13	577.79	71.64	41.392876	63	428.86	66.071	28.335209	
	14	445.52	51.994	23.164367	64	500.62	59.013	29.543088	
	15	544.65	52.071	28.36047	65	538.65	63.019	33.945184	
	16	492.72	63.591	31.332558	66	426.32	61.951	26.41095	
	17	501.16	50.735	25.426353	67	402.97	58.098	23.411751	
	18	568.67	53.101	30.196946	68	555.06	65.269	36.228211	
	19	554.29	46.158	25.584918	69	595.87	56.686	33.777487	
	20	492.72	50.316	24.7917	70	465.13	49.667	23.101612	
	21	505.81	72.327	36.58372	71	440.62	53.444	23.548495	
	22	407.01	52.948	21.550365	72	495.3	51.918	25.714985	
	23	340.75	61.15	20.836863	73	576.34	51.231	29.526475	
	24	524.08	63.515	33.286941	74	559.76	52.223	29.232346	
2	25	525.16	63.019	33.095058	75	543.96	52.643	28.635686	
	26	414.84	60.844	25.240525	76	636.02	53.444	33.991453	
	27	594.77	63.629	37.84462	77	423.88	56.953	24.141238	
	28	533.32	65.727	35.053524	78	455.4	52.948	24.112519	
	29	438.07	57.03	24.983132	79	429.47	62.866	26.999061	
	30	462.79	62.18	28.776282	80	578.92	64.087	37.101246	
	31	527.13	60.654	31.972543	81	407.58	58.136	23.695071	
	32	567.16	57.945	32.864086	82	427.56	54.245	23.192992	
	33	567.58	62.523	35.486804	83	435.01	54.245	23.597117	
	34	492.56	58.479	28.804416	84	417.18	59.738	24.921499	
	35	468.68	57.449	26.925197	85	526.8	50.545	26.627106	
	36	472.87	53.368	25.236126	86	405.43	58.327	23.647516	
	37	605.15	61.607	37.281476	87	456.93	51.422	23.496254	
	38	577.54	59.509	34.368828	88	537.1	57	30.528227	
	39	521.93	56.267	29.367435	89	515.72	59.7	30.788484	
	40	418.72	52.795	22.106322	90	578.06	55.656	32.172507	
	41	597.46	54.245	32.409218	91	392.49	48.218	18.925083	
	3	42	519.54	53.215	27.647321	92	414.63	60.768	25.196236
		43	445.35	56.496	25.160494	93	531.29	46.692	24.806993
		44	655.36	53.101	34.800271	94	417.61	36.85	15.388929
45		458.13	48.904	22.40439	95	436.19	64.926	28.320072	
46		621.29	58.861	36.569751	96	412.15	55.847	23.017341	
47		463.17	65.46	30.319108	97	626.99	63.591	39.870921	
48		525.71	77.515	40.750411	98	453.69	64.964	29.473517	
49		473.61	60.463	28.635881	99	556.32	65	36.338266	
50		500.63	51.003	25.533632	100	516.22	62.408	32.216258	
								média	30.017463

Tabela A.9: Valores de volume em 24h de envelhecimento.

TABELA A9			
Horas	Volume (fl)	Horas	Volume (fl)
0	44.86266348	13	39.83244125
1	45.541056	14	41.10237068
2	51.162447	15	41.887179
3	15.0358122	16	35.96994036
4	41.994288	17	36.91240588
5	42.745032	18	40.24635225
6	37.66290948	19	41.309454
7	40.80530428	20	41.01815012
8	44.500638	21	47.3407
9	36.1113984	22	41.82806585
10	46.260884	23	42.341994
11	40.2897594	24	43.047148
12	44.365838		

Tabela A.10: Valores de volume em 84h de envelhecimento, com intervalos de 12h entre medidas.

TABELA A10	
Dias	Volume (fl)
0	44.86266348
0.5	44.365838
1	43.047148
1.5	54.648924
2	46.440112
2.5	42.125157
3	46.44513
3.5	42.245892

B

Apresentações em Conferências.

Foram apresentados os seguintes trabalhos em conferências nacionais e internacionais:

- **Third Latin American Symposium on Scanning Probe Microscopy - LASPM. 2005, Ouro Preto - MG.**

Título: EVALUATION OF RED BLOOD CELLS OF HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME.

Autores: COSTA, Erivelton Façanha da; PITOMBEIRA, Maria da Silva; FREIRE, José Alexander de King; REBELO, Luciana Magalhães; FREIRE, Valder Nogueira; FARIAS, Gil de Aquino.

- **9TH CONGRESS OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION, 2004, Geneva.**

Título: RED BLOOD CELL AGING PATTERNS: IN VITRO OBSERVATIONS USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY.

Autores: MAGALHÃES, Silvia Maria Meira; ROCHA FILHO, Francisco Dário; FREIRE, José Alexander de King; FREIRE, Valder Nogueira; FARIAS, Gil de Aquino; COSTA, Erivelton Façanha da; SILVA JUNIOR, Eronides Felisberto da; REBELO, Luciana Magalhães.

- **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2004, São Paulo.**

Título: AVALIAÇÃO DO PERFIL ERITROCITÁRIO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM INDIVÍDUOS SADIOS.

Autores: MAGALHÃES, Silvia Maria Meira; COSTA, Erivelton Façanha da; FREIRE, José Alexander de King; PITOMBEIRA, Maria da Silva; FREIRE, Valder Nogueira; FARIAS, Gil de Aquino.

- **XXI ENCONTRO DE FÍSICOS DO NORTE E NORDESTE, 2004**

Título: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ERITROCITÁRIO EM INDIVÍDUOS SADIOS E PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

Autores: COSTA, Erivelton Façanha da; MAGALHÃES, Silvia Maria Meira; PITOMBEIRA, Maria da Silva; FREIRE, José Alexander de King.

- **XXIII ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 2004**

Título: MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS DE IDADE DE CÉLULAS VERMELHAS UTILIZANDO O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.

Autores: COSTA, Erivelton Façanha da; FREIRE, José Alexander de King; FREIRE, Valder Nogueira; MAGALHÃES, Silvia Maria Meira.

C

Artigos Publicados.

- **Periódico:** Microscopy and Microanalysis, v. 11, n. 03, p. 66-69, 2005.

Título: Evaluation of Red Blood Cells of Healthy Subjects and Patients with Myelodysplastic Syndrome.

Autores: COSTA, Erivelton Façanha da; MAGALHÃES, Silvia Maria Meira; PITOMBEIRA, Maria da Silva; FREIRE, José Alexander de King; FREIRE, Valder Nogueira; BARRETO, Marjorie; REBELO, Luciana Magalhães; FARIAS, Gil de Aquino; SANTOS, Ricardo Pires dos.

- **Periódico:** Journal of Histochemistry and Cytochemistry, submetido.

Título: Red Blood Cells for Atomic Force Microscopy investigation: a Comparative Analysis.

Autores: E. F. Costa, S. M. M. Magalhães, B. S. Cavada, R. G. Benevides, J. A. K. Freire

D

Aprovação do Comitê de Ética

Documento comprovando a aprovação do comitê de ética e pesquisa para o trabalho desenvolvido com material humano.



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 521/03

Fortaleza, 19 de dezembro de 2003

Protocolo COMEPE nº 229/03

Pesquisador responsável: Sílvia Maria Meira Magalhães

Dept./Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: "Caracterização do perfil eritrocitário em indivíduos saudáveis e portadores de síndrome mielodisplásica através de microscopia de força atômica"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 18 de dezembro de 2003.

Atenciosamente,

Dra. Miriam Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC