



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós - Graduação em Física

Railson Pereira de Oliveira

**Estudo das propriedades físicas dos eritrócitos de portadores de
doença falciforme via Microscopia de Força Atômica**

São Luís

2020

Railson Pereira de Oliveira

Estudo das propriedades físicas dos eritrócitos de portadores de doença falciforme via Microscopia de Força Atômica



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar

São Luís

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UFMA / BIBLIOTECA CCBS

S237

Oliveira, R. P.

Estudo das propriedades físicas dos eritrócitos de portadores de doença falciforme via Microscopia de Força Atômica / Railson Pereira De Oliveira. – 91p.

91 f.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar;
Dissertação de Mestrado - Pós Graduação em Física - Universidade Federal do Maranhão.

Texto a ser informado pela biblioteca

CDU 621:528.8

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Railson Pereira de Oliveira

**Estudo das propriedades físicas dos eritrócitos de portadores de doença
falciforme via Microscopia de Força Atômica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovado em: 06 /03 / 2020

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Clenilton Costa dos Santos
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Eder Nascimento Silva
Universidade Federal do Maranhão

São Luís

2020

DEDICATÓRIA

Dedicado à minha família, especialmente a minha esposa e filho.

AGRADECIMENTO

À Professora Luciana pela orientação, apoio, paciência e amizade.

Aos meus amigos João, Wellington, Joel, Daniel Lima, Arthur pelos conselhos e força que me deram para enfrentar os desafios deste projeto.

Ao centro de hematologia e hemoterapia– HEMOMAR, e seus funcionários em especial a Aline, pelas amostras disponibilizadas. À UFMA pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste projeto. À família, especialmente a minha esposa Pollyanna.

Agradeço à Capes pela bolsa de Mestrado concedida.

*“Não diga que a vitória está perdida
se é de batalhas que se vive a vida.”*

Raul Seixas

RESUMO

O presente trabalho visa compreender as propriedades físicas dos eritrócitos de portadores de doença falciforme via Microscopia de Força Atômica. Os eritrócitos são os chamados glóbulos vermelhos e constituem a maior população de células do sangue, além de possuir grande capacidade de adaptar seu formato para que possam deslocar-se por vasos capilares de diversos tamanhos, o que indica que suas propriedades físicas desempenham um papel fundamental na realização de suas funções. Devido a mutações genéticas, eritrócitos de alguns indivíduos apresentam propriedades físicas diferentes das propriedades padrões. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar eritrócitos com diferentes mutações na hemoglobina, especificamente, mutações associadas a anemia falciforme, usando resultados de caracterização morfométrica e mecânica de Microscopia de Força Atômica. Esta técnica foi escolhida devido a sua versatilidade e precisão em medidas a nível de célula única. A Microscopia de Força Atômica é um dispositivo substancial para o estudo de mecanismos celulares, sendo capaz de fornecer informações físicas distintas sobre a célula, incluindo a adesão, que é uma característica importante dos eritrócitos. O estudo mais detalhado dos eritrócitos é fundamental para o diagnóstico de patologias relacionadas a defeito das funções eritrocitárias como anemia falciforme.

Palavras-chave: Microscopia de Força Atômica. Eritrócito . Anemia falciforme. Hemoglobina. Hemoglobinopatias . Adesão. Rugosidade.

ABSTRACT

The present work aims to understand the physical properties of erythrocytes of patients with sickle cell anemia via Atomic Force Microscopy. Erythrocytes are the so-called red blood cells and constitute the largest population blood cells, as well as having the ability to adapt their shape to that can move through capillaries of various sizes, which indicates that their physical properties play a fundamental role in the fulfillment of their function. Due to genetic mutations, erythrocytes in some individuals have different physical properties from standard properties. Thus, the objective of this work is to characterize erythrocytes with different mutations in hemoglobin, specifically mutations associated with sickle cell anemia, using results of morphometric and mechanical characterization of Atomic Force Microscopy. This technique was chosen because of its versatility and accuracy in single cell level measurements. Atomic Force Microscopy is a substantial device for studying cellular mechanisms and is able to provide distinct physical information about the cell, including adhesion, which is an important feature of erythrocytes. A more detailed study of erythrocytes is essential for the diagnosis of pathologies related to defect of erythrocyte functions such as sickle cell anemia.

Keywords: Atomic Force Microscopy. Erythrocyte. Sickle cell anemia. Hemoglobin.

LISTA DE FIGURAS

2.1	Imagem de AFM de um eritrócito de um indivíduo não portador de anemia falciforme. Fonte: Próprio autor.	23
2.2	Esquema da hematopoiese.fonte: Adaptado de (ABBAS; LICHTMAN, 2003).	25
2.3	Células da eritropoese. Fonte (HOFFBRAND; MOSS, 2013).	26
2.4	Estrutura da molécula de hemoglobina presente nos eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos). Cortesia Prof. Dr. Erivelton Façanha.	28
2.5	Imagem de microscopia de força atômica de eritrócito falciforme. Fonte: Próprio autor.	30
2.6	Representação esquemática do processo de vaso-oclusão. Fonte:(SANTOS; CHIN, 2012)	32
2.7	Máximo ângulo de abertura de uma lente. Fonte: (DARAFSHEH, 2013).	34
2.8	Diagrama esquemático do sistema de Microscopia de Força Atômica composto basicamente por: uma sonda sensora, escâner de varredura, feixe de laser, fotodetector de quatro quadrantes, caixa controladora e monitor para visualização do experimento. Cortesia Profa. Dra. Luciana Alencar.	36
2.9	Escâner tripóide. Fonte: (ZANETTE, 1997).	38
2.10	Escâner tubular. Fonte: (Bruker Corporation, 2019).	38
2.11	Cantiléver do AFM varrendo amostra de eritrócitos. Fonte: Próprio autor.	39
2.12	Relação de forças que atuam entre a ponteira e a amostra em função da distância que as separa. Fonte: (CASCUDO et al., 2018).	40
2.13	Curva da força pela distância de separação entre a ponteira e a amostra. Fonte: (CASCUDO et al., 2018).	41
2.14	Ilustração de um dipolo em uma molécula	42

2.15	Sistema ponta-amostra, D é distancia real entre ponta e amostra, Z é a distância entre a amostra e a posição de descanso do cantiléver. Que se diferem conformem equação (2.19). Adaptado de (CAPPELLA; DIETLER, 1999)	46
2.16	Curva de força. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	48
2.17	A temos a curva de força da região de contato da indentação da ponta em um material idealmente elástico, B temos a curva de força da região de contato da indentação da ponta em um material idealmente plástico, C temos a curva de força da região de contato da indentação da ponta em um material de comportamento entre o elástico e o plástico. Fonte: (CAPPELLA; DIETLER, 1999)	50
2.18	Curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra de alta adesividade. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	50
2.19	Curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra de baixa adesividade. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	51
2.20	curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra rígida. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	51
2.21	Curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra macia. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	51
2.22	Curva de força x deslocamento, podemos notar uma repulsão de longo alcance entre a ponta do AFM e amostra. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	52
2.23	Curva de força x deslocamento, podemos notar uma atração de longo alcance entre a ponta do AFM e amostra. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011) .	52
2.24	Curva de força x deslocamento indicando que houve uma deformação plástica na amostra. Fonte: (MULTIMODE. . . , 2011)	52
2.25	Linha média em medidas de rugosidade. Adaptado de (HAMMES; ROSA; WALKER, 2017).	55
2.26	Vários perfis de superfície com o mesmo valor R_a . Fonte: (BHUSHAN, 2000).	57

2.27	Tipos de irregularidade na superfície. retirado do ref (LEEDEN; FRENS, 2002)	59
2.28	Dupla camada elétrica nas interfaces polímero-metal. Fonte: (BALDAN, 2012)	61
2.29	Ilustração de uma amostra fina em um substrato rígido indentado por uma sonda esférica. Fonte: (DIMITRIADIS et al., 2002).	64
2.30	Forças de interação (por área) para os modelos Hertz, JKR e DMT, em comparação com um interação real. Fonte: (GRIERSON; FLATER; CARPICK, 2005)	65
3.1	Ilustração de um esfregaço. Fonte: (kASVI, 2019)	69
3.2	AFM da Central Multiusuário de Pesquisa em Nanomateriais e Biosistemas (CMPNB)	70
4.1	imagem 3D, $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ de eritrócito, fixado após esfregaço em uma lamínula.	73
4.2	Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de um eritrócito falcizado.	74
4.3	Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de um eritrócito de portador de anemia falciforme (célula ainda com aspecto normal).	74
4.4	Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de um eritrócito de pessoa sem anemia falciforme.	75
4.5	Adesão de eritrócitos com diferentes mutações na Hemoglobina.	76
4.6	Mapas de adesão de eritrócitos com diferentes mutações na Hemoglobina correspondentes aos do gráfico da Figura 4.5, Onde (AA) célula com hemoglobinas tipo AA, (SF) célula com hemoglobinas tipo SF, (AS) célula com hemoglobinas tipo AS, (SS) célula com hemoglobinas tipo SS.	77
4.7	Duas curvas de força gerada sobre uma célula sem anemia falciforme.	78
4.8	Curvas de força gerada sobre uma célula sem anemia falciforme	79
4.9	Duas curvas de força gerada sobre uma célula com anemia falciforme.	79
4.10	Curvas de força gerada sobre uma célula com anemia falciforme.	80
4.11	Imagem de AFM de $1 (\mu\text{m}) \times 1 (\mu\text{m}) \mu\text{m}$ sobre a superfície de um eritrócito.	81
4.12	Imagem da membrana de um eritrócito sem aplicação da ferramenta Flatten.	82

4.13	Rugosidade média das células com hemoglobinas, AA, AS, SF e SS.	82
4.14	Rugosidade média quadrática das células com hemoglobinas, AA, AS, SF e SS.	83
4.15	Imagem da membrana de um eritrócito após a aplicação da ferramenta de tratamento de imagem Flatten. É possível observar que a superfície analisada foi planificada.	84
4.16	Rugosidade media das células com hemoglobina AA, AS, SF e SS, após tratamentos de edição de imagens.	84
4.17	Rugosidade média quadrática das células com hemoglobina AA, AS, SF e SS, após tratamentos de edição de imagens.	85
4.18	Altura dos eritrócitos com hemoglobina AA, AS, SF e SS.	86
4.19	Área dos eritrócitos com hemoglobina AA, AS, SF e SS.	87
4.20	Volume dos eritrócitos com hemoglobina AA, AS, SF e SS.	88

LISTA DE TABELAS

1.1	Incidência de anemia falciforme por estados brasileiros. Fonte (SIMÕES et al., 2010)	17
1.2	Incidência do traço falciforme por estados brasileiros. Fonte (SIMÕES et al., 2010)	18
2.1	Discriminação do número anual de nascimentos com os diferentes distúrbios na hemoglobina. Fonte: (WILLIAMS; WEATHERALL, 2012).	31

LISTA DE SIGLAS

AFM	Atomic force microscopy
CFU	Colony forming unit
F_{ad}	Força de adesão
F_{cap}	Força capilar
F_{chem}	Força de ligação química
F_{el}	Forças eletrostáticas
F_{vdw}	Forças de Van der Waals
HB	Hemoglobina
HBF	Hemoglobina fetal
HBS	Hemoglobina S
JKR	Teoria Johnson-Kendall-Roberts
Nm	Nanômetro
R_a	Parâmetro de rugosidade (Rugosidade média)
R_{max}	Parâmetro de rugosidade (amplitude total do sistema)
R_p	Parâmetro de rugosidade (amplitude máxima de pico)
R_v	Parâmetro de rugosidade (amplitude máxima de vale)
R_z	Parâmetro de rugosidade (amplitude máxima de perfil por comprimento)
SPM	Scanning Probe Microscopy
STM	Scanning tunneling microscopy

SUMÁRIO

1	Introdução	16
2	Fundamentação teórica	22
2.1	Anemia Falciforme	22
2.1.1	Eritrócitos	22
2.1.2	Eritropoiese	24
2.1.3	Eritropoetina	27
2.1.4	Hemoglobina	27
2.1.5	Hemoglobinopatias	28
2.1.6	Hemoglobinopatias por deficiência de síntese	29
2.1.7	Hemoglobinopatias estruturais	29
2.1.8	Hemoglobinas variantes	31
2.1.9	Anemia Falciforme forma homozigotia	33
2.1.10	Doença da hemoglobina S-C	33
2.1.11	Traço falciforme	33
2.2	Microscopia de Força Atômica	33
2.2.1	Princípios de AFM	35
2.2.2	Aspectos gerais	36
2.2.3	Efeito Piezoelétrico	37
2.2.4	Escâneres piezoelétricos	37
2.2.5	Cantiléver	39
2.2.6	Ponta	39
2.2.7	Modos de operação do AFM	40
2.2.8	Forças de interação ponta amostra no potencial de Lennard-Jones	42
2.2.9	Modo contato	45

	15
2.2.10 Modo não-contato	53
2.2.11 Modo contato intermitente	53
2.2.12 Propriedades mecânicas e tribológicas via AFM	54
2.2.13 Rugosidade	54
2.2.14 Adesão	58
2.2.15 Modelos mecânicos	62
2.2.16 Teoria de Hertz	62
2.2.17 Teoria Johson-Kendall-Roberts (JKR)	64
2.2.18 Teoria de Derjaguin-Müller-Toporov (DMT)	64
3 Procedimento experimental	66
3.1 Ajustes do afm para medidas	66
3.1.1 Especificações do cantilever e ponta	67
3.1.2 Ajuste da ponta	67
3.1.3 Determinação da sensitivity	68
3.2 Preparo da amostra para o AFM	68
3.3 Medidas das amostra no Afm	70
3.4 Análise dos dados de Adesão, rugosidade e volume	71
4 Resultados e Discussões	72
4.1 Adesão	75
4.2 Rugosidade	81
4.3 Volume dos eritrócitos	85
5 Considerações finais e Perspectivas	89
CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
A ANEXO	98

Capítulo 1

Introdução

Anemia falciforme é uma doença genética, que foi descrita na literatura pela primeira vez em 1910 pelo médico norte-americano James Bryan Herrick (NUZZO; FONSECA, 2004), (HERRICK, 1910). Porém já era conhecida na África há muitos anos, devido o fato de ser seu local de origem há cerca de 50 a 100 mil anos (NETO; PITOMBEIRA, 2003). Surgiu devido a uma mutação no gene da beta globina, que levou à troca de um aminoácido na sexta posição da cadeia polipeptídica (B6 ácido glutâmico \mapsto valina), mutação que levou a uma mudança na hemoglobina, passando a produzir a hemoglobina S, em vez da hemoglobina A (normal). Os eritrócitos, contendo predominantemente hemoglobina S, assumem, após a desoxigenação, forma semelhante à de uma foice (daí o nome falciforme), em decorrência da polimerização intracelular da desoxi-HbS (ZAGO et al., 2013).

Teve origem nos países do centro-oeste africano, da Índia e do leste da Ásia (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010), essa mutação se espalhou pelo mundo em virtude da imigração forçada (do tráfico de escravos africanos) e dos movimentos populacionais em busca de melhores condições de vida, muito comum no Brasil devido ao fato do país ter recebido uma vasta população de africanos. Estima-se que 3 em cada 100 pessoas são portadoras do traço de Anemia Falciforme e 1 em cada 500 negros brasileiros nasce com uma forma da doença (SILVA; NOVA; LUCENA, 2012).

Devido a sua origem africana a anemia falciforme é predominante entre negros e pardos, mas em razão da miscigenação atingem de forma significativa a etnia de brancos. No Brasil, segundo dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, a cada ano nascem 3.500 crianças com anemia falciforme e 200.000 com traço falciforme. Os casos são mais

comuns no Nordeste, o estado que tem mais casos da doença é a Bahia. O Maranhão ocupa a 3ª posição em números casos, de cada 1.400 crianças nascidas, 1 tem a doença, enquanto na região Sul de cada 14.000 nascidos 1 possui a doença. Um dos vários problemas relacionados à doença é o elevado índice de morte entre bebês que nascem com a doença, podendo chegar a 10% no Brasil (ARAÚJO, 2012).

Dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal apresentam a gravidade da questão tabela 1.1.

ESTADOS	INCIDÊNCIA
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1300
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1:1400
Espírito Santo	1:1800
São Paulo	1:4000
Rio Grande do Sul	1:11000
Santa Catarina e Paraná	1:13500

Tabela 1.1: Incidência de anemia falciforme por estados brasileiros. Fonte (SIMÕES et al., 2010)

Outro caso envolvendo a mutação da hemoglobina S é o traço falciforme, que ocorre quando o indivíduo herda de um dos pais o gene da hemoglobina A e do outro o gene para a hemoglobina S, uma condição comum no Brasil e considerada clinicamente benigna; os portadores em geral não apresentam anomalia física e sua expectativa de vida é semelhante ao da população em geral (MURAO; FERRAZ, 2007).

Entretanto, apesar de ser considerada clinicamente benigna, existem numerosos relatos de anormalidade associadas ao traço falciforme, como, por exemplo, o relato de morte súbita em recrutas Norte Americanos portadores de traço falciforme, após serem submetidos a exercícios físicos extenuantes. Fato este descrito em um estudo retrospectivo sobre morte súbita durante treinamento envolvendo 2 milhões de recrutas das Forças Armadas dos Estados Unidos apresentou uma incidência de 1:3.200 entre os recrutas com traço falciforme, com um risco 28 vezes maior de morte súbita em relação aos negros que possuíam Hb AA, concluindo que os recrutas com traço falciforme em treinamento básico têm um risco substancialmente aumentado (MURAO; FERRAZ, 2007)-(KARK et al., 1987). Relatos como este indicam que o traço falciforme também necessita de maior entendimento. Por este motivo, neste trabalho, faz-se uma caracterização de eritrócitos

tanto da forma característica da anemia falciforme HB SS,HB SF , como os traços falciformes HB AS.Por ser necessário a pessoa ter herdado apenas um gene da mutação HB S, o traço falciforme é bem mais comum, como mostra o dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, tabela 1.2.

ESTADOS	INCIDÊNCIA
Bahia	1:17
Rio de Janeiro	1:20
Pernambuco, Maranhão	1:23
Goiás	1:25
Espírito Santo	1:28
Minas Gerais	1:30
São Paulo	1:35
Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina	1:65

Tabela 1.2: Incidência do traço falciforme por estados brasileiros. Fonte (SIMÕES et al., 2010)

Os dados das tabelas 1.2 e1.2 refletem a necessidade de uma maior compreensão da anemia falciforme e traço falciforme, devido a sua alta incidência e poucas formas tratamento da doença. A escolha do tema foi motivada pela possibilidade de aplicar a física para melhor compreender a doença. Optamos, neste trabalho, por utilizar a técnica de Microscopia de Força Atômica, pois apresenta grande versatilidade para o estudo de amostras biológicas e alta precisão em medidas a nível de célula, buscando com essa técnica fazer análises mais detalhadas das propriedades mecânicas e estruturais dos eritrócitos de portadores de anemia falciforme.

O estudo via AFM (*Atomic force microscopy*) tem como foco a análise das propriedades mecânicas. As propriedades mecânica de células vêm sendo estudadas por diversas técnicas. Dentre elas, encontra-se o procedimento de cell poker, onde se estuda a deformabilidade celular baseada na sua resistência à indentação com uma fibra de vidro de extremidade achatada (O. MCCONNAUGHEY W. B., 1982; I. MCCONNAUGHEY W. B., 1990). Outras técnicas incluem: a aspiração por micropipeta (YOUNG, 1989; Y., 1996), a espectroscopia flicker ((ZILKER H. ENGELHARDT, 1987; K. ENGELHARD H., 1990)), a microscopia de varredura acústica (H. HILLMANN K., 1991), pinças óticas ((ASHKIN, 1989; K. SCHMIDT C. F., 1992; M. FONTES A., 2003)) e microscopia de desfocalização (U. MONKEN C. H., 2003; J. AGERO U., 2006).

Com a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) é possível estudar as

propriedades mecânicas em níveis macro, micro e nanoscópico da estrutura celular, muito além de usar forças interatômicas para gerar imagens topográficas de amostras. Com o AFM, tem-se a possibilidade de medir forças intermoleculares bem como a distribuição espacial dessas propriedades em uma única célula.

A técnica de AFM é capaz obtenção de imagens com alta resolução de vários tipos de superfície, incluindo aquelas encontradas em células vivas e fixadas (G. STARODUBTSEVA M. N., 2007). Essa técnica faz parte de um grupo de técnicas de microscopia, denominado Scanning Probe Microscopy (SPM), pelas quais a produção de imagens e outros tipos de propriedades físicas são obtidas através da análise de interações entre uma sonda e a amostra. É uma técnica bastante versátil e tem um grande potencial tecnológico para aplicações em sistemas biológicos, mesmo sendo relativamente nova em estudos biológicos. Já é muito bem aceito, não apenas como ferramentas de imagem, mas como um instrumento versátil para medições nanomecânicas; foi desenvolvida originalmente para o estudo de substâncias inorgânicas. Mas avanços na tecnologia subjacente, como lasers, detectores, filtros e componentes, transformaram a técnica em uma ferramenta moderna e eficaz para o estudo de problemas biológicos complexas.

O desenvolvimento do Microscópio de Força Atômica (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986) se deu logo após a invenção do Microscópio de Tunelamento por Varredura (*scanning tunneling microscopy* STM) em 1981 por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer (BINNIG et al., 1982). Foi o primeiro instrumento capaz de gerar imagens reais de superfícies com resolução atômica, instrumento este que mais tarde fez de Binnig e Rohrer ganhadores do prêmio Nobel de Física de 1986.

Com a invenção do STM em 1981, o objetivo inimaginável de obter imagens de átomos individuais em superfícies foi alcançado (BINNIG et al., 1982). A técnica de STM ultrapassou o limite de difração e alcançou maior sensibilidade do que o microscópio eletrônico, utilizando menos energia. A ideia de usar o STM na biologia começa logo após a sua invenção. “No final de 1983, começamos a usar as possibilidades do STM em biologia junto com o H. Gross da ETH, Zúrique. Poderíamos seguir o DNA em torno de um filme de carbono depositado em uma superfície de silício revestida com ouro” (BINNIG; ROHRER, 1986). Mas os pioneiros confessaram que o STM era um método terrível para estudar objetos biológicos (PAROT et al., 2007).

O Microscópio de Força Atômica foi desenvolvido para superar uma desvantagem

básica com o STM, de só poder fazer imagens de superfícies condutoras ou semicondutoras. O método AFM tem a vantagem de permitir ao investigador examinar uma grande variedade de tipos de amostras, incluindo espécimes biológicos (HENDERSON, 1994). Mas a aplicação do AFM pra estudo de amostras biológicas não foi possível logo de início, pois os primeiros AFMs tinham um alcance máximo de varredura menor que $1\mu\text{m}$. Portanto, não eram úteis para imagem de célula. Mas dentro de pouco tempo evoluíram e um AFM com uma faixa de varredura de vários micrômetros foi construído em 1989. (HANSMA; HOH, 1994)

A Microscopia de Força Atômica tem, como a principal vantagem para aplicação em amostra biológica, a possibilidade de operação em condições ambiente ou solução aquosa (ambiente nativo das células) (CHANG et al., 2012). Destaca-se também como uma grande vantagem a preparação das amostras, que é relativamente simples, não requer congelamento, revestimento metálico, vácuo ou corantes, sendo possível analisar a célula ligada à lâmina de vidro sem tratamento de fixação. Temos também que o AFM (*Atomic Force Microscopy*) é uma ferramenta poderosa para obter detalhes de nanoestruturas e propriedades biomecânicas de amostras biológicas. Pode medir as alterações das propriedades mecânicas de membrana celular, rigidez, viscoelasticidade. Com a espectroscopia de força baseada em AFM, também é possível avaliar a adesão celular.

Os capítulos desse trabalho foram divididos da seguinte maneira:

- Capítulo 2, abordamos nosso objeto de estudo, os eritrócitos com mutação tipo S, em estado homozigótico Hb SS ou heterozigótico Hb S + Hb (variante ou normal), analisando a função dos eritrócitos e como ocorre o processo de produção e destruição deles. Abordamos o tópico sobre hemoglobina dando destaque à sua importante função de se ligar ao oxigênio e o transportar por todo o corpo. Discutimos, em seguida, sobre a hemoglobinopatias, que são alterações genéticas que podem ocorrer na hemoglobina. Apresentamos também um tópico sobre hemoglobinas variantes, em que discutimos sobre diferentes hemoglobinas existentes devido a mutações, terminando o capítulo discutindo a respeito da doença falciforme e seus aspectos clínicos;
- Capítulo 3, dissertamos a respeito da nossa ferramenta de estudo, o Microscópio de Força Atômica, tratando dos seus aspectos gerais e sobre a função de cada um de seus componentes. Abordamos os modos de operação do AFM, explicando sobre algumas

propriedades físicas observadas e tratamos dos modelos mecânicos utilizados para análise dos resultados de Microscopia de Força Atômica;

- Capítulo 4, explicamos o procedimento experimental da pesquisa, para obtenção dos resultados de adesividade, rugosidade e volume;
- Capítulo 5, apresentamos os resultados e discussões deste trabalho;
- Por fim, apresentamos as conclusões e perspectivas deste trabalho.

Capítulo 2

Fundamentação teórica

2.1 Anemia Falciforme

Anemia falciforme é uma doença causada por uma mutação genética que modifica a hemoglobina que é a principal proteína no interior dos eritrócitos e tem como função principal o transporte de oxigênio, neste capítulo iniciamos debatendo sobre eritrócitos, depois hemoglobina e em seguida mutações na hemoglobina para então discutirmos sobre anemia falciforme.

2.1.1 Eritrócitos

Os eritrócitos, também conhecidos como glóbulos vermelhos ou hemácias, são células presentes no sangue dos vertebrados, são anucleadas, ou seja, não possuem núcleo e, conseqüentemente, DNA. A principal função deles é o transporte de O_2 aos tecidos e o retorno de dióxido de carbono CO_2 dos tecidos aos pulmões (HOFFBRAND; MOSS, 2013), tal capacidade se deve a uma proteína, a hemoglobina. Os eritrócitos são as células mais numerosas do sangue de qualquer animal, respondendo por cerca de 40% do volume sanguíneo. Os eritrócitos dos seres humanos têm formato discoide, apresentando centros mais finos e bordas mais espessas, seu diâmetro é de aproximadamente $8 \mu m$ e a espessura é de $2 \mu m$ na região mais periférica (Fig. 2.1) (YEOW; TABOR; GARNIER, 2017). Possuem grande flexibilidade, o que permite alterações no formato para facilitar a passagem em capilares sanguíneos (DOBBE et al., 2002). Desempenham funções importantes, além do transporte de gases respiratórios por todo o corpo humano, manutenção da reologia do sangue e do fluxo sanguíneo, e são um componente importante no processo inflamatório

da fisiologia humana. A medida que os eritrócitos envelhecem, suas membranas se tornam rígidas e inflexíveis, eles são removidos da circulação por macrófagos. Quase todos os constituintes são reutilizados, em torno de 6-7 g de hemoglobina catabolizada diariamente são reutilizadas, exceto a bilirrubina que é eliminada na urina (KLINKEN, 2002).

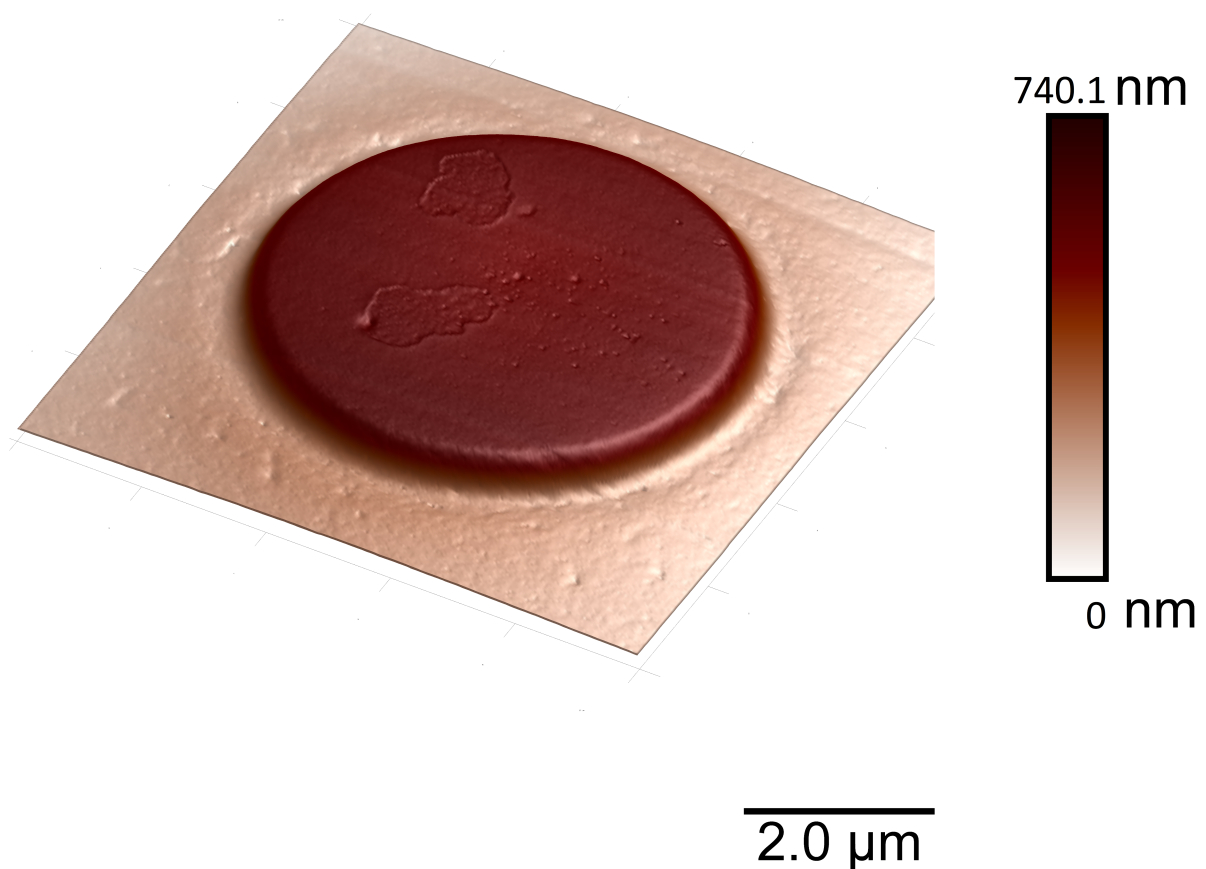


Figura 2.1: Imagem de AFM de um eritrócito de um indivíduo não portador de anemia falciforme. Fonte: Próprio autor.

Os eritrócitos são constantemente produzidos pela medula óssea dos maiores ossos do corpo. O processo de produção de eritrócitos, é denominado eritropoiese, dura 7 dias. Neste período, células-tronco multipotentes se convertem em eritrócitos maduros, que têm uma sobrevivência média de 120 dias no sangue. Em condições normais, um adulto pro-

duz cerca de 200 bilhões de hemácias por dia, substituindo número equivalente de células destruídas e, assim, mantendo estável a massa total de hemácias do organismo (ZAGO et al., 2013). A proporção de hemácias produzidas e destruídas diariamente corresponde a 0,83% do total, e, em condições normais, essa produção ocorre exclusivamente na medula óssea. São células de produtos finais diferenciadas absolutamente de uma hierarquia complexa de progenitores hematopoiéticos que se tornam gradualmente restritos à linhagem eritroide (ZAGO et al., 2013).

2.1.2 Eritropoiese

O processo de produção de eritrócitos (denominado eritropoiese) em adultos ocorre principalmente na medula óssea vermelha e é regulado pela eritropoietina, um hormônio produzido nos rins em indivíduos adultos. Entretanto, após o período embrionário e fetal, a eritropoiese pode ocorrer fora da medula óssea em duas circunstâncias: em resposta a um estímulo proliferativo intenso (como em anemias hemolíticas) ou como parte de um quadro de proliferação neoplásica do tecido mieloide.

Antes de abordar especificamente sobre eritropoiese, necessitamos falar sobre hematopoiese. As células do sangue se originam de uma população auto-renovável de célula-tronco pluripotente hematopoiéticas, as células-tronco originam *células-filhas* que seguem dois destinos diferentes: uma permanece como células-tronco, mantendo a população destas células, e outras se diferenciam em outros tipos celulares com características específicas. Esta última então prolifera e origina duas linhagens específicas: célula progenitora linfóide que dá origem aos linfócitos e célula progenitora mielóide que origina os eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas.

A Figura 2.2 apresenta de forma esquemática como ocorre a hematopoiese. Temos a célula-tronco, que é capaz de se renovar e de originar células comprometidas com determinada linhagens de células e, no final da imagem, as células CFU(*colony forming unit*) Unidade Formadora de Colônias, onde o processo que vai da CFU-e unidade formadora de colônia-eritroide até a formação dos eritrócitos, este processo é denominado eritropoiese (ZAGO et al., 2013).

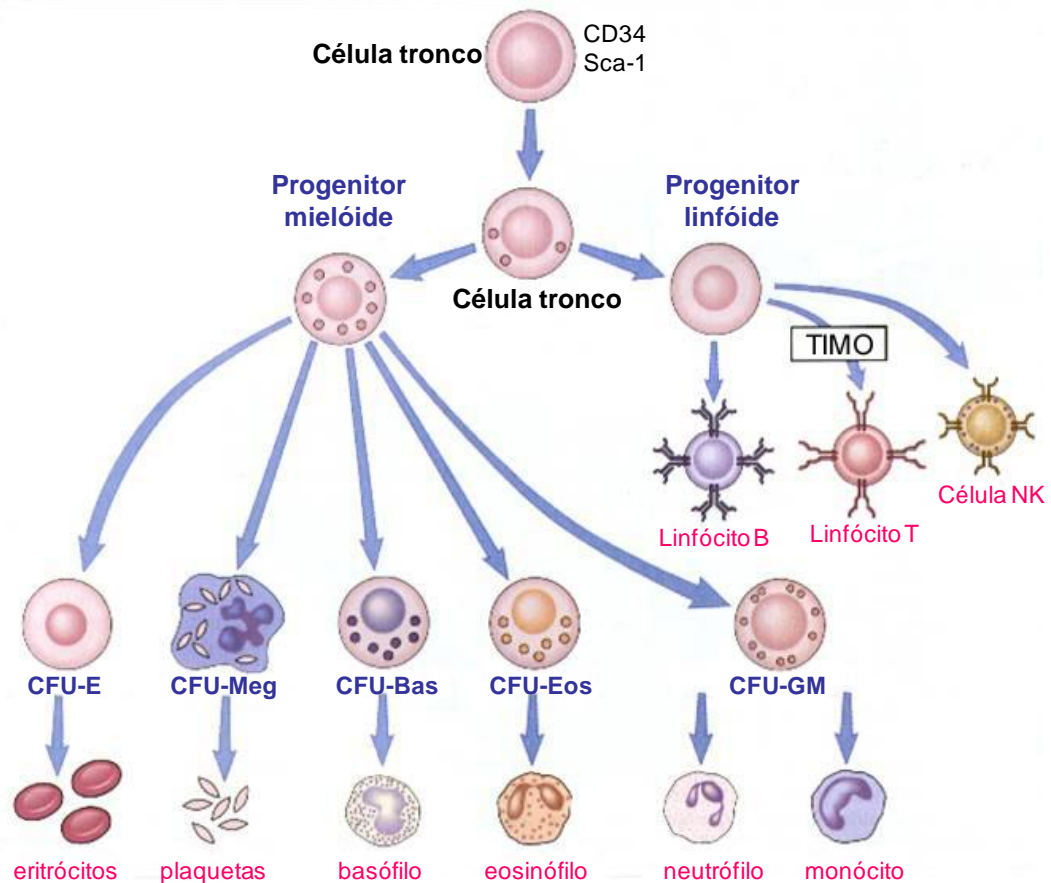


Figura 2.2: Esquema da hematopoiese. fonte: Adaptado de (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

As células da eritropoese (Fig. 2.3) podem ser identificadas como:

- **Proeritroblasto:** São células redondas ou ovais com núcleos volumosos, cromatina frouxa (coloração avermelhada), visualização de 1 (um) a 4 (quatro) nucléolos. O citoplasma é basofílico (grande quantidade de RNA), pode apresentar contorno irregular com proeminências (projeções de membrana);
- **Eritroblasto Basófilo:** O eritroblasto basófilo é menor do que o proeritroblasto. Nucléolos não são visíveis. O núcleo tem áreas mais grosseiras intercaladas com aparentes espaços mais claros (cromatina parcialmente condensada). Citoplasma basofílico, devido a grande quantidade de RNA;
- **Eritroblasto Policromático:** O eritroblasto policromático é menor do que o eritroblasto basófilo, tem citoplasma policromático (acidófilo e basófilo), azul-acinzentado. O núcleo é menor e mais corado, tem cromatina condensada (roxa) e nucléolo não visível;

- Eritroblasto Ortocromático: O eritroblasto ortocromático é uma célula que possui quase a coloração da hemácia madura. O núcleo é menor e intensamente condensado e corado de roxo, podendo ser central ou excêntrico. O núcleo é uma massa homogênea pronta para ser expulsa;
- Reticulócito: O reticulócito é a última fase antes da transformação em eritrócito, apresenta no citoplasma organelas (Golgi, ribossomos, mitocôndrias) que podem ser visualizadas como "grânulos" grosseiros, que se organizam em pequenas fileiras dando-lhe o aspecto reticulado. Depois perde as organelas e se transforma em eritrócito.

A eritropoiese ocorre na medula óssea e as ilhas eritroblásticas são nichos para a eritropoiese do CFU-E para o estado reticulocitário. O reticulócito alcança a corrente sanguínea, onde atinge sua maturação, perdendo suas organelas internas, remodelando sua membrana plasmática e, finalmente, torna-se um eritrócito (J; MURATA-HORI; LODISH, 2005) ver fig 2.3.

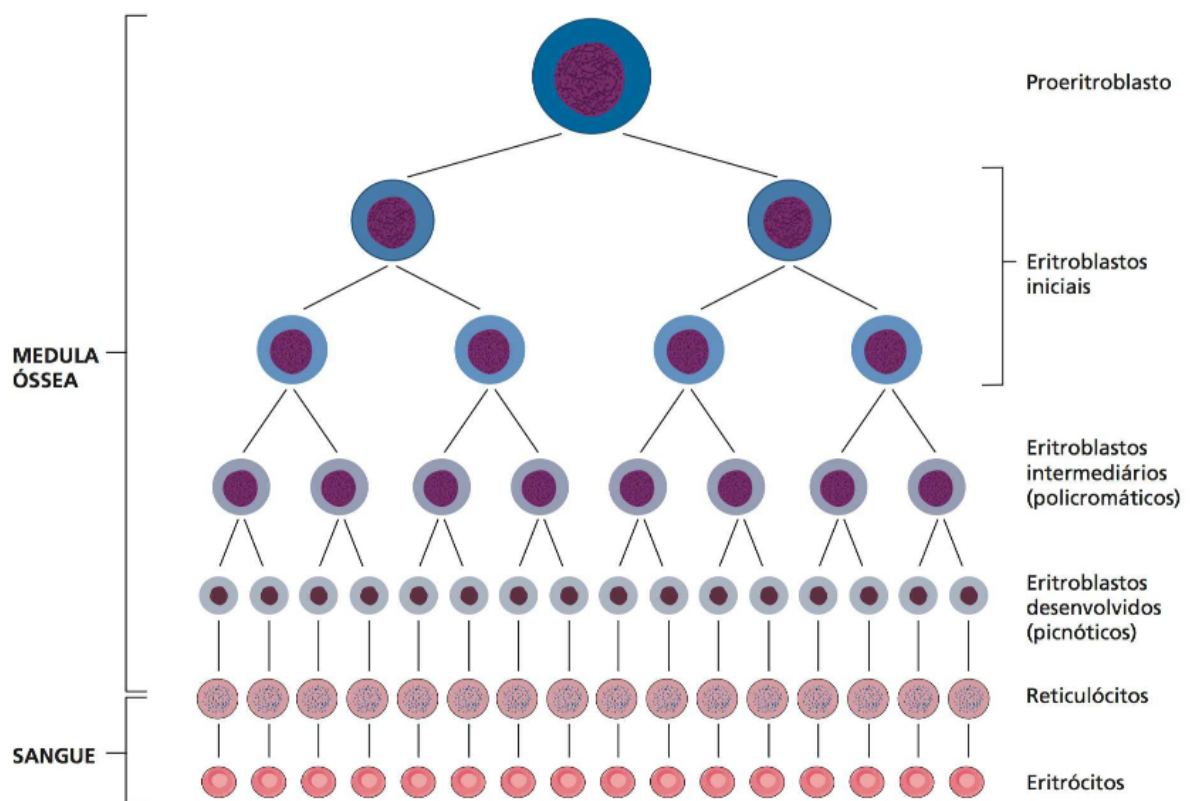


Figura 2.3: Células da eritropoiese. Fonte (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

Como observado, o processo de maturação eritroide envolve grande variedade de

células em diferentes estágios de maturação, sendo que o conjunto total de células eritroides é chamado éritron. Os precursores da linhagem eritroide constituem cerca de 1/3 das células da medula óssea.

Os eritrócitos produzidos durante a eritropoese não possuem material genético e mecanismo celular para sua replicação, pois tanto o núcleo quanto organelas citoplasmáticas importantes, tais como o retículo endoplasmático, mitocôndria e ribossomos, são expulsos do compartimento celular, para permitir maior armazenamento de hemoglobina (BENTO; DAMASCENO; NETO, 2003).

2.1.3 Eritropoetina

A produção de hemácias é controlada principalmente por fatores de crescimento que agem sobre as células precursoras e estimulam seu desenvolvimento e maturação, como a eritropoetina.

A eritropoetina (EPO) é um hormônio, cuja função é regular a eritropoese no homem e também em outros animais. Os rins apresentam função preponderante em sua síntese, uma vez que são responsáveis por secretar cerca de 90% de toda a EPO circulante. Além disso, o fígado contribui com cerca de 10% da produção total de EPO (BENTO; DAMASCENO; NETO, 2003).

2.1.4 Hemoglobina

A molécula da hemoglobina (Fig. 2.4) é uma proteína encontrada no interior dos eritrócitos, responsável pelo transporte de gases, é composta de 2 pares semelhantes de cadeias polipeptídicas globínicas associadas a grupos heme, proporcionando a molécula tal capacidade.

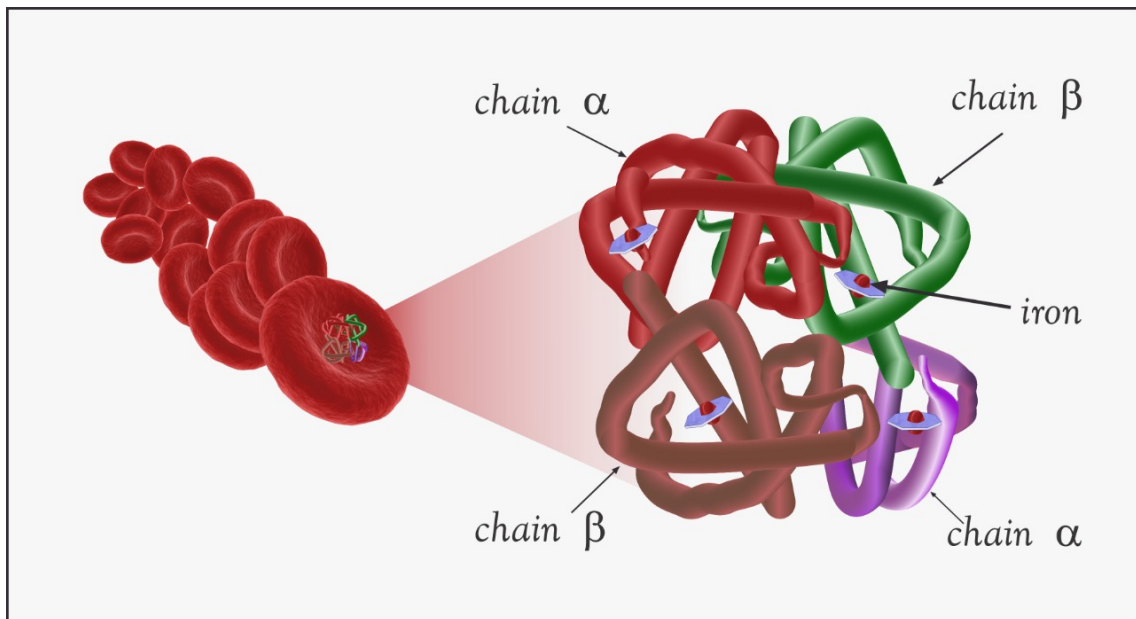


Figura 2.4: Estrutura da molécula de hemoglobina presente nos eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos). Cortesia Prof. Dr. Erivelton Façanha.

A globina tem uma conformação tal que o heme fica envolvido numa bolsa hidrofóbica, evitando assim a sua oxidação (PEREIRA; SARGENTO, 2007). Tornando possível a reversibilidade da ligação entre o ferro e o oxigênio.

A hemoglobina A é predominante, mas não é a única hemoglobina normal encontrada nos eritrócitos. Após o sexto mês de vida de uma pessoa com síntese normal para hemoglobinas, é possível identificar com clareza as Hb A e Hb A₂. Essa identificação se faz por métodos de fracionamento proteico, dos quais o mais conhecido é a eletroforese de acetato de celulose em pH alcalino. Além das Hb A e Hb A₂, pode aparecer a Hb Fetal, cuja concentração atinge no máximo 1%; na maioria das vezes está ausente. A concentração da Hb A é variável de 96 a 98% e a Hb A₂ de 2 a 4% .

A hemoglobina fetal é a principal hemoglobina do feto e do recém nascido, compreende 65 a 90% da concentração total de hemoglobina. Entretanto, esse total decresce para menos de 2% no primeiro ano de vida (MEDEIROS, 1992).

2.1.5 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são alterações hereditárias, caracterizadas por mutações dos genes das globinas humanas, levando a alterações quantitativas da sua síntese ou à formação de hemoglobinas estruturalmente anormais, comprometendo a sua vital função.

São as doenças genéticas mais comuns na espécie humana, atingindo 7% da população mundial (SANKARAN et al., 2010). Dois defeitos principais podem ocorrer: os estruturais e os de ritmo de síntese (talassemias) (SANKARAN et al., 2010).

2.1.6 Hemoglobinopatias por deficiência de síntese

Nas alterações de síntese (talassemias), ocorre uma depressão parcial ou total da síntese de um ou mais tipos de cadeias polipeptídicas da globina, levando ao acúmulo do outro tipo cuja síntese está preservada. As cadeias em excesso são instáveis e precipitam, causando alterações da membrana eritrocitária e à destruição precoce das células (SONATI; COSTA, 2008). Existem dois tipos: talassemias do tipo alfa e do tipo beta, com incidências variadas no território nacional.

2.1.7 Hemoglobinopatias estruturais

São doenças em que, devido a mutações genéticas pontuais, há a substituição de um aminoácido na hemoglobina, resultando em hemoglobinas anormais ou "variante" (THOM et al., 2013) (p.ex., Hb S, Hb Colónia).

Entre as hemoglobinopatias estruturais, a hemoglobina S é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias. Ela faz com que os eritrócitos sofram polimerização em baixas concentrações de O_2 , levando à deformidade dos eritrócitos e aumentando a viscosidade sanguínea com formação de cristais tactóides. As células passam, então, a apresentar a forma de foice (Fig. 2.5) com manifestações variáveis em seu portador, dependendo da quantidade de hemoglobina S produzida.

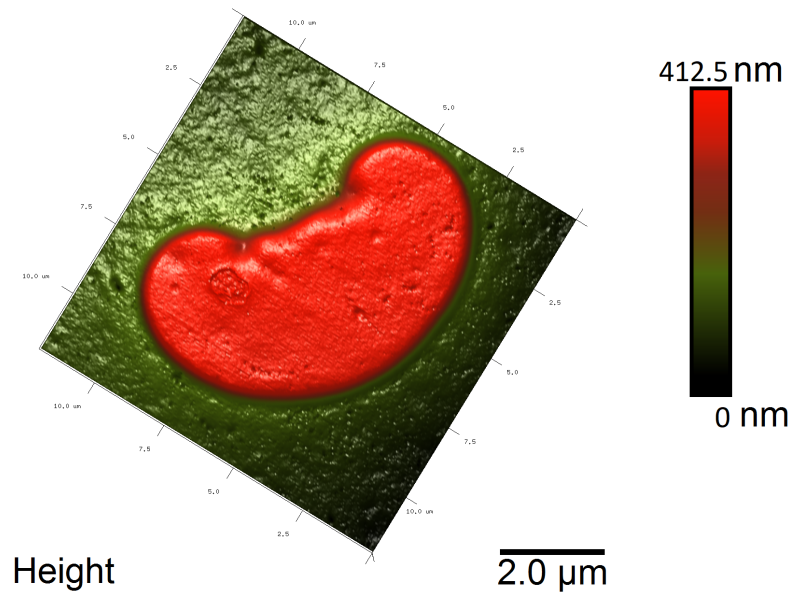


Figura 2.5: Imagem de microscopia de força atômica de eritrócito falciforme. Fonte: Próprio autor.

Alguns dos estudos mais recentes sugerem que entre 300.000 a 400.000 bebês nascem todos os anos com uma doença grave da hemoglobina, sendo que cerca de 90% (noventa por cento) destes nascimentos ocorre em países de médio e baixo rendimento (WILLIAMS; WEATHERALL, 2012).

A Tabela 2.1.7 apresenta uma estimativa dos nascimentos anuais dos importantes distúrbios da hemoglobina. Estes números são apenas uma avaliação muito aproximada e se baseiam, em muitos casos, em amostras relativamente pequenas de regiões localizadas de diferentes países (WILLIAMS; WEATHERALL, 2012).

Nascimentos anuais com principais distúrbios na hemoglobina	
Doença da SS	217,331
β -talassemia major	22,989
HbE β talassemia	19.128
Doença de HbH	9568
Hidropsia de Hb Bart (α^0 / α^0)	5183
HbS β talassemia	11,074
Doença SC	54,736

Tabela 2.1: Discriminação do número anual de nascimentos com os diferentes distúrbios na hemoglobina. Fonte: (WILLIAMS; WEATHERALL, 2012).

2.1.8 Hemoglobinas variantes

Hemoglobina variante surge devido a alterações genéticas que resultam em mudança na sequência de aminoácidos das cadeias α , β , γ ou δ dos tetrâmeros das hemoglobinas A, F e A2. As variantes são causadas por alterações nos nucleotídeos do DNA, tais como deleções, inserções e mutações de ponto em um dos genes estruturais de globina (SILVA et al., 2013).

A Hb S é a mais frequente hemoglobina variante conhecida no homem (ver tabela 2.1.7). Ocorre como resultado de uma mutação de ponto no gene da β globina, que leva à troca de um único aminoácido na sexta posição da cadeia polipeptídica ($\beta 6$ ácido glutâmico \rightarrow valina). O número de hemoglobinas variantes não se restringem a HB S, Hb C, Hb H, etc. Em consulta feita ao Globin Gene Server (<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>), tem-se elencadas 1341 (mil trezentas e quarenta e um) hemoglobinas variantes até 16 de maio de 2019. Tais HB variantes levam a consequências que podem ser anemia hemolítica, quando a alteração determina instabilidade do tetrâmero da hemoglobina; transporte de oxigênio alterado, se há aumento ou diminuição da afinidade da Hb pelo oxigênio; redução da síntese de uma cadeia da globina, dentre outros.

Doença falciforme

Doença Falciforme é um termo genérico usado para designar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio da hemoglobina S (Hb S). Essas alterações incluem a anemia falciforme (Hb SS), as duplas heterozigoses, ou seja, as associações de Hb S com outras variantes de hemoglobinas, tais como: Hb D, Hb C, e as interações com talassemias (Hb S/ β^0 talassemia, Hb S/ β^+ talassemia, Hb S/ α talassemia). As síndromes falciformes incluem ainda o traço falciforme (HbAS) e a anemia falciforme associada à persistência hereditária de hemoglobina fetal (HbS/PHHF)(ANVISA, 2002)

Fisiopatologia e aspectos clínicos das DF

As manifestações clínicas das doenças falciforme estão centralizada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada que, por sua vez, leva à hemólise crônica e a vaso-oclusão.

As manifestações clínicas da anemia falciforme, ocorrem da seguinte forma; eritrócitos contendo hemoglobina S, que sofrem polimerização em baixa concentração de O_2 , essa polimerização deforma os eritrócitos, tornando-os falciforme, após vários episódios de falcização, torna-se irreversivelmente falciforme, tendo também aumento de adesão, favorecendo a formação de coágulos e vaso-oclusão(MANFREDINI et al., 2013), conforme ilustra a figura 2.6.

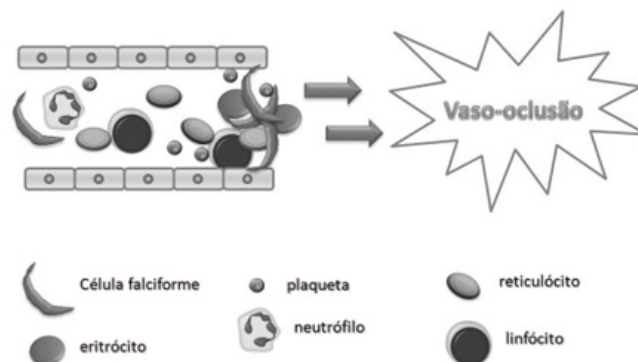


Figura 2.6: Representação esquemática do processo de vaso-oclusão. Fonte:(SANTOS; CHIN, 2012)

Vaso-oclusão reduz o fluxo sanguíneo nos capilares onde ocorre, podendo levar os tecidos a sofrer infartos com necrose e formação de fibrose, levando a crises dolorosas

agudas ou crônicas, além disso processos de vaso-oclusão levam a baixa concentração de oxigênio que podem levar a falência dos órgãos, vale lembrar que baixa concentração de oxigênio levam a falcização dos eritrócitos, agravando as manifestações clínicas das doenças falciformes.

2.1.9 Anemia Falciforme forma homozigotia

Quando uma pessoa herda dois genes com esta alteração, (um do pai e outro da mãe), é homozigotia para a hemoglobina S (Hb SS), e é portador de Anemia Falciforme.

2.1.10 Doença da hemoglobina S-C

A doença da hemoglobina S-C ocorre em pessoas que têm uma cópia do gene da anemia falciforme e uma cópia do gene da doença da hemoglobina C. A doença da hemoglobina S-C é mais comum do que a doença da hemoglobina C e os seus sintomas são similares aos da anemia falciforme, embora mais leves.

2.1.11 Traço falciforme

Ocorre em pessoas que têm uma cópia do gene da anemia falciforme e uma cópia do gene normal da hemoglobina A. Nas pessoas com traço falciforme, as hemácias não são frágeis e não se rompem facilmente. O traço falciforme não causa crises dolorosas, mas, em casos raros, as pessoas podem morrer subitamente enquanto fazem exercícios muito extenuantes que causam desidratação intensa, como durante treinamento militar ou atlético.

Pessoas com traço falciforme correm mais risco de doença renal crônica (ALLADAGBIN et al., 2018) e embolia pulmonar (NAIK et al., 2018). Em casos raros, pode-se observar sangue na urina. Pessoas com traço falciforme também correm o risco de ter uma forma extremamente rara de câncer renal.

2.2 Microscopia de Força Atômica

Cerca de 400 anos atrás, as invenções de telescópios e microscópios não apenas ampliaram nosso senso de visão, mas também revolucionaram nossa percepção do mundo.

Estendendo assim a nossa percepção mais e mais, essas invenções, desde então, têm sido importantes ferramentas para grandes desenvolvimentos científicos(WILSON et al., 2002).

A invenção do microscópio ótico revelou um novo mundo com novos seres vivos a serem estudados, com pesquisas que levaram ao entendimento de doenças e, em seguida, ao desenvolvimento de novos medicamentos, fazendo assim com que a humanidade progredisse e, com isso, cada vez a microscopia ótica se aperfeiçoava pra oferecer mais informações sobre o mundo microscópico. Entretanto, a microscopia ótica mostrou ter um fator limitante a ela: o comprimento de onda da luz. A luz visível tem um comprimento de onda de 400 a 700 nm.

Segundo o físico alemão Ernst Abbe (1840-1905), a limitação básica para a resolução em um sistema ótico, estava relacionada ao diâmetro da lente e ao comprimento de onda da luz (PADILHA, 1997) ,esse limite depende principalmente do comprimento de onda da luz com o qual se observa o objeto.

A resolução em um sistema ótico seguindo a equação de Abbe é (KÖHLER, 1981):

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\sigma} \quad (2.1)$$

Onde, d é a resolução, λ comprimento de onda da luz, n é o índice de refração do meio, σ ângulo de meia abertura em radianos fig 2.7.

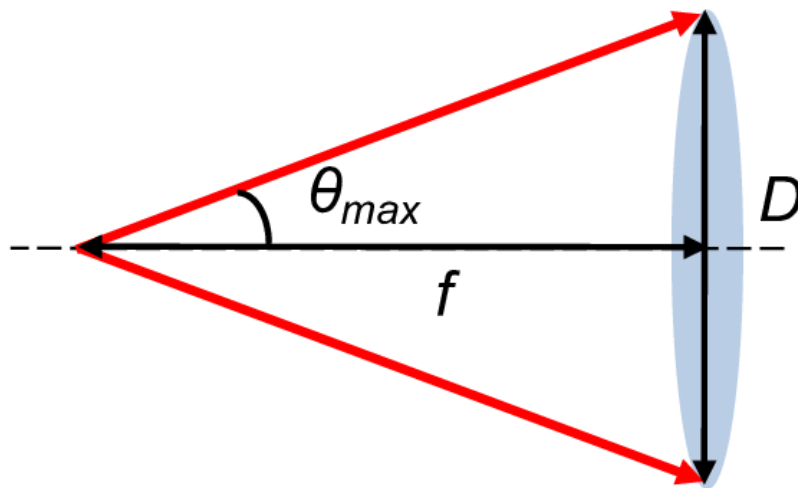


Figura 2.7: Máximo ângulo de abertura de uma lente. Fonte: (DARAFSHEH, 2013).

Segundo ele, o microscópio ótico não poderia fornecer imagens de pontos do objeto mais próximos do que 0,2 micrômetros. Esse limite fez com que muitos cientistas buscas-

sem o desenvolvimento de novas formas de ver o mundo microscópico. Em 1959, o professor Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel, dá o sinal de que “há muito espaço no fundo” em sua palestra em Caltech. Ele descreveu as perspectivas de nossa capacidade de manipular átomos individuais e/ou moléculas nos próximos períodos(FEYNMAN, 2012).

Um dos que “moveram-se” na direção sugerida por Feynman foram Gerd Binnig e Heinrich Rohrer que inventaram, em 1981(BINNIG et al., 1982), o Microscópio de Varredura por Tunelamento (*Scanning Tunneling Microscopy*-STM), o primeiro instrumento capaz de gerar imagens reais de superfícies com resolução atômica. Logo em seguida, desenvolveram o Microscópio de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* AFM) (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986) que superou uma desvantagem básica com o STM: a de só poder fazer imagens de superfícies condutoras ou semicondutoras. O método AFM tem a vantagem de permitir ao investigador examinar uma grande variedade de tipos de amostras, incluindo espécimes biológicos (HENDERSON, 1994). Como reconhecimento por tal colaboração para a ciência, Binnig e Rohrer foram ganhadores do Prêmio Nobel de Física de 1986.

As técnicas de sonda locais ampliam nosso sentido de “tocar” no micro e no nano e, dessa maneira, forneceram uma nova visão complementar desses mundos com técnicas microscópicas. Além disso, “tocar” as coisas é um prerequisite essencial para manipulá-las e a capacidade de sentir e manipular moléculas e átomos individuais. Certamente marca um passo revolucionário em nossa relação com o mundo em que vivemos(WILSON et al., 2002) .

Originalmente inventado para gerar imagens da topografia de superfícies, o AFM evoluiu para uma ferramenta multifuncional que permite caracterizar células biológicas e seus componentes com uma resolução sem precedentes. Técnicas de AFM permitem análises de molécula única e uma compreensão de várias propriedades químicas, físicas e bioquímicas e interações na célula (MÜLLER; DUFRENE, 2010).

2.2.1 Princípios de AFM

A técnica de AFM consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda a fim de obter sua imagem topográfica que com sensibilidade suficiente no sensor de deflexão do cantilever, a ponta pode revelar perfis de superfície com resolução atômica(RUGAR; HANSMA, 1990) , mapeando também certas propriedades mecânicas

e físico-químicas dos materiais que as compõem. Para isto, utiliza-se o Microscópio de Força Atômica (Fig. 2.8).

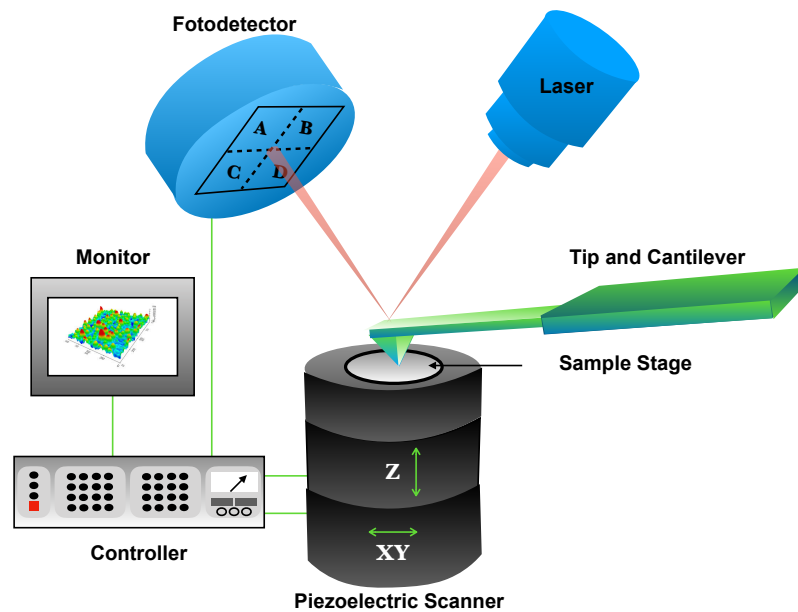


Figura 2.8: Diagrama esquemático do sistema de Microscopia de Força Atômica composto basicamente por: uma sonda sensora, escâner de varredura, feixe de laser, fotodetector de quatro quadrantes, caixa controladora e monitor para visualização do experimento. Cortesia Profa. Dra. Luciana Alencar.

2.2.2 Aspectos gerais

A chave do comportamento do AFM consiste basicamente de três componentes principais: sonda mecânica, fotodetector e de tubo piezoelétrico (Fig. 2.8) (OTHMAN et al., 2012). A sonda mecânica, em conjunto com a unidade fotodetecção, é usada para detectar a superfície da amostra e, em seguida, gerar a imagem em nanoescala da amostra. A sonda é microfabricada em um cantiléver, geralmente em forma piramidal, mas também pode ser uma esfera. Vem com uma constante de mola pré-calibrada, uma calibração mais precisa é feita em cada cantilever no momento do uso pelo método padrão fornecido pelo fabricante do AFM (FREY et al., 2007)(WANG; DISCHER, 2007). Basicamente na calibração, o cantilever é deslocado por um dispositivo piezoelétrico (ou a amostra é deslocada pelo piezoelétrico) para pressionar a ponta em uma amostra de um material rígido imobilizado, e a deflexão forçada do cantilever é medida pela reflexão de um laser na parte de trás do cantilever.

O controle de movimentos em distâncias tão pequenas, como as que aparecem no

AFM, é possível graças ao uso das cerâmicas piezelétricas (FILHO, 2015) (ZANETTE, 1997), que possibilitam a varredura nos eixos x , y e z usadas também para mover a amostra até a ponta ou a ponta até a amostra.

2.2.3 Efeito Piezoelétrico

Descoberto em 1880 pelos irmãos Pierre Curie e Jacques Curie (PEREIRA, 2010), O efeito piezoelétrico é uma propriedade de certos materiais cristalinos que quando submetidos a um estresse mecânico produzem uma polaridade elétrica, basicamente o efeito transforma energia de origem mecânica em elétrica e vice e versa (PEREIRA, 2010).

A piezoeletricidade está presente em diversos materiais cristalinos e pode ter efeito direto ou inverso. O efeito direto é quando a aplicação de um esforço mecânico sobre o material provoca uma modificação na polarização elétrica do material, isto é, uma diferença de potencial. O efeito piezoelétrico inverso é o efeito que foi fundamental para a criação da técnica de AFM e consiste na aplicação de campo elétrico que resulta em uma deformação do material, sendo por esta razão usado para mover amostra ou pontas de AFM durante varredura nos eixos x , y e z , fornecendo um posicionamento preciso em nanoescala.

2.2.4 Escâneres piezoelétricos

O escâner piezoelétrico, em alguns modelos de AFM, é acoplado sobre a ponta. Neste caso, a amostra fica parada enquanto o escâner move a ponta. Em outros modelos de AFM, o escâner piezoelétrico move a amostra enquanto a ponta da sonda permanece estacionária. Existe ainda modelos de AFM em que um escâner move a amostra nas direções X e Y e outro escâner move a ponta na direção Z . Existem diferentes tipos de escâneres de AFM/SPM, que são desenhados para diferentes amplitudes máximas de varreduras. A amplitude apropriada depende da medida do que se deseja ver. Os tipos de escâner mais comuns são os tripóides e os tubulares. Os tubulares têm forma de tubo, possuem altas frequências de ressonância e desenho mais rígido, enquanto os tripóides possuem maior alcance de varredura, entretanto são menos estáveis (ZANETTE, 1997).

Os tripóides (Fig. 2.9) consistem basicamente na montagem de três cerâmicas piezelétricas num arranjo ortogonal, onde cada cerâmica é responsável pelo deslocamento em uma direção (X , Y ou Z).

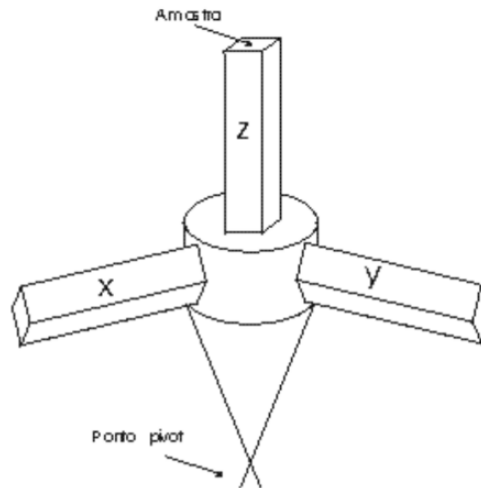


Figura 2.9: Escâner tripóide. Fonte: (ZANETTE, 1997).

Os tubulares (Fig. 2.10) têm os eixos X e Y com seções conjugadas em cada extremidade do tubo. À medida que um lado se expande, o outro lado se contrai, fazendo com que o movimento da ponta varra em uma direção perpendicular ao eixo vertical do tubo. O eixo Z é um elemento único que se expande e se contrai para mover a ponta (ou amostra) para cima e para baixo (Bruker Corporation, 2019). Cada segmento pode ser acionado de forma independente. Assim, o escâner pode manipular amostras e sondas com extrema precisão em 3 (três) dimensões.

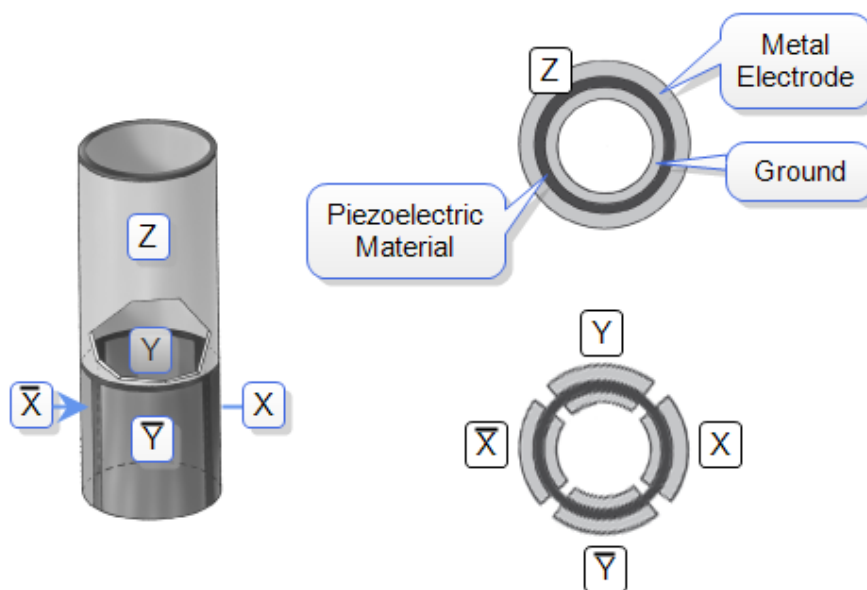


Figura 2.10: Escâner tubular. Fonte: (Bruker Corporation, 2019).

Independentemente da forma do escâner piezoelétrico, os princípios permanecem

os mesmos: para gerar imagem da superfície da amostra, a sonda deve interagir tanto quanto possível com a superfície da amostra.

2.2.5 Cantiléver

O cantiléver é a estrutura que sustenta a ponta do AFM, sendo, em geral, retangular ou em forma de V (Fig. 2.11), mas também poder ser em forma de haste. Além disso, o cantilever funciona como uma mola e, portanto, possui uma constante elástica k . O conhecimento desta constante elástica é muito importante em qualquer experimento com AFM, por exemplo amostras muito macias devem ser escaneadas com cantileveres de constante elástica baixa, para que a sonda modifique a superfície o mínimo possível durante a varredura. Outra propriedade importante é sua frequência de ressonância, que pode variar de algumas a centenas de quilohertz, determinando a velocidade de resposta e a sensibilidade a vibrações externas. Anteriormente, utilizava-se a borda do cantiléver como ponta ou se fixava manualmente fragmentos de diamantes na borda distal do cantilever (FUKUI et al., 1992), mas atualmente utiliza-se técnicas de microfabricação para produzir cantilever com ponta.

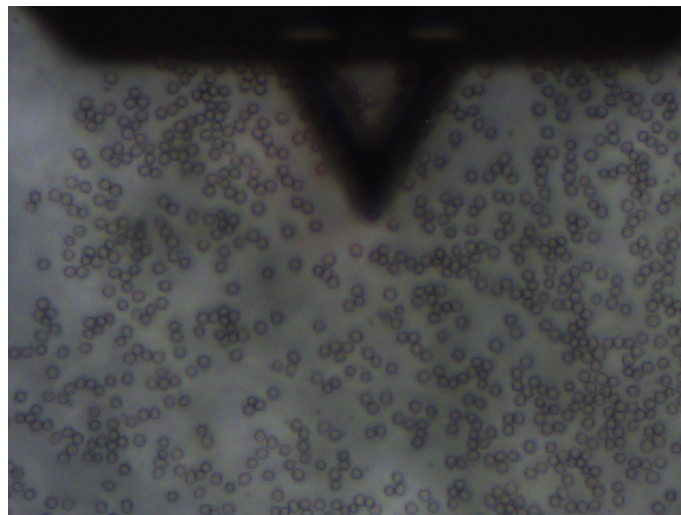


Figura 2.11: Cantiléver do AFM varrendo amostra de eritrócitos. Fonte: Próprio autor.

2.2.6 Ponta

Ela é responsável por varrer a superfície da amostra identificando mudanças em seu relevo através de variações de grandezas físicas. Conhecer a geometria da ponta

utilizada é de extrema importância para obter um entendimento adequado da interação ponta-amostra. Logo, não é apenas necessário conhecer o material do qual a amostra é feita, mas também a geometria e a composição da ponta.

2.2.7 Modos de operação do AFM

O AFM possui múltiplos modos de operação, com diferentes forças atuando em cada modo de operação, possibilitando obter diferentes informações da amostra para cada regime de operação, oferecendo uma grande variedade de opções para a construção de imagens de diferentes tipos de amostras, gerando diferentes tipos de informação (SILVA, 2016). O AFM tem três modos de operação: o modo de contato, não contato e o modo de contato intermitente. Eles são determinados de acordo com o valor da distância entre a ponta e a superfície da amostra.

Vários tipos de forças contribuem para a deflexão do cantiléver no Microscópio de Força Atômica. Na Figura 2.12, apresentamos, de forma simplificada, as forças envolvidas, de acordo com a distância que separa a ponteira da amostra.

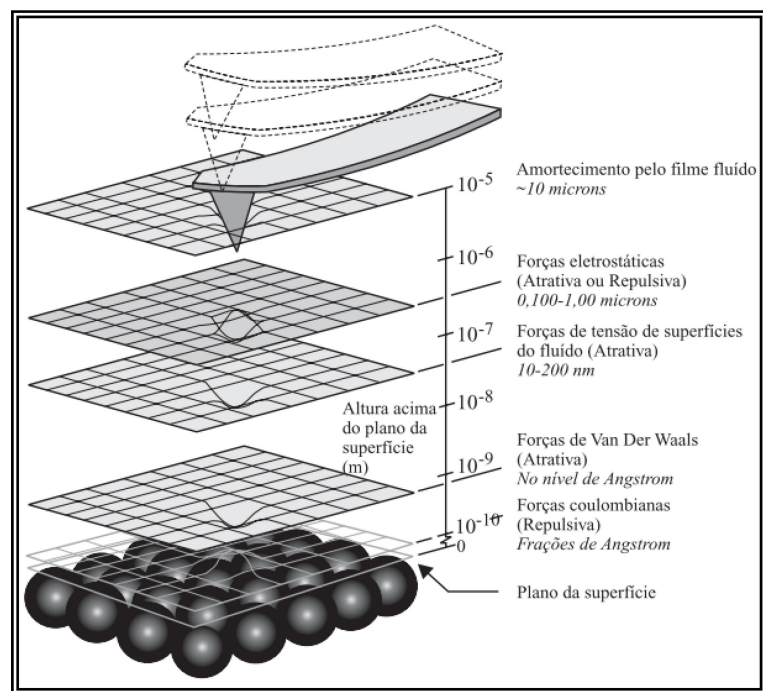


Figura 2.12: Relação de forças que atuam entre a ponteira e a amostra em função da distância que as separa. Fonte: (CASCUDO et al., 2018).

Para dois corpos eletricamente neutros e não magnéticos separados por uma ou

várias dezenas de nanômetros, pode-se dizer que as forças de Van der Waals geralmente dominam a interação entre eles. Estas forças são consideradas atrativas. Diminuindo a distância de separação entre os dois corpos, para alguns angstroms, as forças que irão dominar serão as forças repulsivas. Isto se deve principalmente à componente de força coulombiana. Dessa forma, a distância ponteira-amostra determina o modo de operação do microscópio, que pode ser: contato, não-contato e contato intermitente (Fig. 2.13).

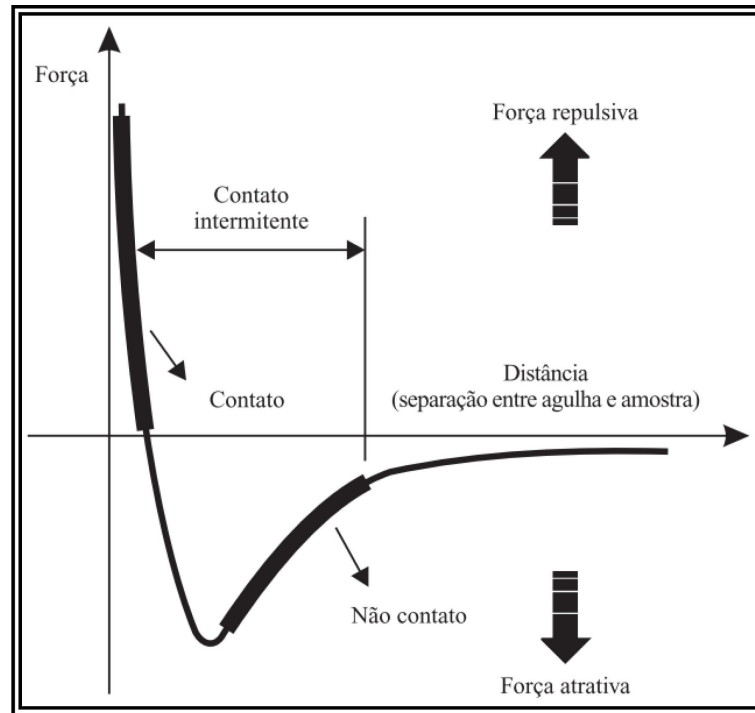


Figura 2.13: Curva da força pela distância de separação entre a ponteira e a amostra. Fonte: (CASCUDO et al., 2018).

Na área abaixo da linha de força nula, as forças são atrativas. Acima da linha do zero, as forças são repulsivas. Este tipo de força é proveniente do potencial de interação entre dois ou mais átomos que pode ser do tipo Lennard-Jones. Para o potencial de Lennard-Jones, a equação que descreve a interação entre moléculas, é considerada um modelo empírico fenomenológico simples para caracterizar a repulsividade atômica tal que (ISRAELACHVILI, 2015)(LEITE, 2002):

$$U(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (2.2)$$

onde r é a distância entre os átomos, os parâmetros ϵ e σ são ajustados de acordo com as propriedades de cada sistema .

2.2.8 Forças de interação ponta amostra no potencial de Lennard-Jones

Forças atrativas: Temos que no primeiro momento quando a ponta se aproxima da amostra, a distâncias menores que 50nm, ela é atraída e o cantilever é defletido em direção a amostra, deflexão esta que é causada por forças de Van der Waals. As forças de Van der Waals podem ser divididas em três grupos:

Dipolo-dipolo: São forças entre moléculas com um dipolo permanente. A força de Van de Wall gerada devido a interação de moléculas com dipolo permanente é a mais forte dos três tipos de forças de Van de Waals.

Dipolo-dipolo induzido: Ocorre quando uma molécula com um dipolo permanente, que tem um campo elétrico devido este dipolo, induz uma polaridade em uma molécula próxima, induzindo assim a criação de um dipolo, em resumo ocorre na interação de uma molécula polar e uma apolar.

Dipolo induzido - dipolo induzido ou Forças de dispersão ou Londron: Ocorre na interação de moléculas apolares, temos quem em um dado instante deslocamento de cargas elétricas cria um dipolo elétrico em uma das moléculas e este por sua vez induz um dipolo na molécula próxima, esta é a mais fraca interação de Van de Waals.

Vejamos agora de forma mais detalhada como um dipolo origina o termo atrativo do potencial de Lennard- Jones, vamos considerar uma molécula conforme a ilustração da fig 2.14, tendo um par de cargas de magnitude q .



Figura 2.14: Ilustração de um dipolo em uma molécula

Sabemos que o momento de dipolo neste caso é dado por:

$$\vec{p} = q\vec{D}, \quad (2.3)$$

Onde D é a distância ente os centros das duas cargas.

Agora estamos interessados em obter o valor do campo elétrico no ponto Z . Ele é resultado da sobreposição dos campos gerados por cada carga conforme mostra a equação 2.4.

$$\vec{E} = \vec{E}_- + \vec{E}_+, \quad (2.4)$$

Para facilitar os cálculos fazemos a seguinte consideração:

$$D = 2d. \quad (2.5)$$

Considerando a origem do sistema no centro do dipolo, temos:

$$E = kq \left[\frac{1}{(z-d)^2} - \frac{1}{(z+d)^2} \right], \quad (2.6)$$

Simplificando os termos entre colchetes da equação 2.6:

$$\frac{1}{(z-d)^2} = (z-d)^{-2} = \frac{1}{z^2} \left(1 - \frac{d}{z} \right)^{-2}, \quad (2.7)$$

e

$$\frac{1}{(z+d)^2} = (z+d)^{-2} = \frac{1}{z^2} \left(1 + \frac{d}{z} \right)^{-2}. \quad (2.8)$$

Substituindo as equações 2.7 e 2.7 em 2.6

$$E = \frac{kq}{z^2} \left[\left(1 - \frac{d}{z} \right)^{-2} - \left(1 + \frac{d}{z} \right)^{-2} \right]. \quad (2.9)$$

Agora usamos uma expansão em serie binomial

$$(1+x)^k = 1 + kx + \frac{k(k-1)}{2!}x^2 + \dots + \frac{k(k-1)\dots(k-n+1)}{2!}x^n \dots \quad (2.10)$$

com $|x| \ll 1$ e para todo número real k .

Agora expandido os termos da equação 2.9 até a segunda ordem da expansão equ2.10. temos:

$$\left(1 - \frac{d}{z}\right)^{-2} = 1 + \frac{2d}{z}, \quad (2.11)$$

$$\left(1 + \frac{d}{z}\right)^{-2} = 1 - \frac{2d}{z}, \quad (2.12)$$

com isso chegamos ao seguinte resultado:

$$E = \frac{kq}{z^2} \left[\frac{4d}{z} \right], \quad (2.13)$$

ou, usando equação 2.3 e equação 2.5

$$E = \frac{2kp_1}{z^3}. \quad (2.14)$$

Como mostrado o dipolo elétrico com momento de dipolo elétrico p_1 , gera um campo elétrico proporcional a $\frac{p_1}{r^3}$ na posição da molécula 2, sendo a molécula 2 apolar este campo também será o responsável pela indução de um dipolo nela proporcional ao campo elétrico da molécula 1.

$$p_2 = \alpha E \propto p_2 = \alpha \frac{p_1}{r^3}, \quad (2.15)$$

e a energia de interação entre os dois dipolos \vec{p}_1 e \vec{p}_2 é proporcional a :

$$U \propto \frac{p_1 p_2}{r^3}, \quad (2.16)$$

ou

$$U \propto \frac{\alpha p_1^2}{r^6}, \quad (2.17)$$

podemos observar que o termo que decai com $1/r^6$ tem origem nas forças de Van de Waals.

Forças repulsivas: para a repulsiva, não há exatamente uma formulação matemática que descreva seu termo, mas fisicamente ela é resultado de 3 efeitos, a repulsão Coulombiana entre os núcleos dos átomos e entre os elétrons das camadas mais externas, 2º efeito é a repulsão *overlap*, que ocorre quando os átomos se aproximam de forma que as funções de ondas eletrônicas passam a se superpor, e o 3º efeito, o mais significativo é

o princípio de exclusão de Pauli. O princípio de exclusão de Pauli trata-se de um postulado que diz: que férmions idênticos não podem ocupar simultaneamente o mesmo estado quântico (PIZA, 2003), e os elétrons são partículas de spin $(1/2)$, férmions, ou seja os elétrons dos átomos da ponta não podem penetrar na amostra de tal forma que eles ocupem os estados eletrônicos dos átomos da amostra, pois não pode haver simultaneamente, em um átomo, mais de um elétron no mesmo estado quântico com os números quânticos n , l m e m_s iguais.

2.2.9 Modo contato

O modo contato é o mais utilizado para obtenção de imagens. Neste regime de operação a sonda varre a amostra sempre em contato com ela. O contato com a amostra faz o cantiléver sofrer deslocamentos devido à força de repulsão provocada pelos átomos da amostra. A ponta usada neste modo de operação é fabricada, preferencialmente, sobre cantiléver de formato piramidal, tendo sua constante elástica valores baixos, em geral menor do que 1 N/m , para assegurar que tenha mais flexibilidade e danifique menos as amostras, além de garantir que o cantiléver será suficientemente flexível para não quebrar(SILVA et al., 2014)(SILVA, 2016).

Curva de Força

Uma curva força AFM (Fig. 2.16) é um gráfico das forças de interação entre ponta-amostra vs distância ponta-amostra. Para obter esse gráfico, a amostra e a ponta) são aproximadas ao longo do eixo vertical (eixo Z) e a deflexão de cantiléver é adquirida. A força de interação entre a amostra e ponta é dada pela lei de Hooke (CAPPELLA; DIETLER, 1999):

$$F = -k_c \delta_c. \quad (2.18)$$

Ressaltamos que apesar de sua forma "simples" e bem conhecida, a força descrita pela lei de Hooke, trata-se de uma força restauradora, ou seja, ela é sempre direcionada para a posição de equilíbrio da mola, neste caso direcionada para a posição de equilíbrio do cantiléver, permitindo assim que o cantiléver volte a seu estado original após uma medida, possibilitando obter diversas curvas de forças durante uma varredura de AFM.

Segundo Cappella, a distância controlada durante a medição não é a distância real da amostra da ponta, mas a distância Z entre a superfície da amostra e a posição de repouso do cantiléver. Essas duas distâncias diferem por causa da deflexão do cantiléver e por causa da deformação da amostra. Estas quatro quantidades são relacionadas da seguinte forma (CAPPELLA; DIETLER, 1999):

$$D = Z - (\delta_c + \delta_s), \quad (2.19)$$

Onde δ_c é a deflexão do cantiléver e δ_s é a deformação da amostra conforme a (fig 2.15)

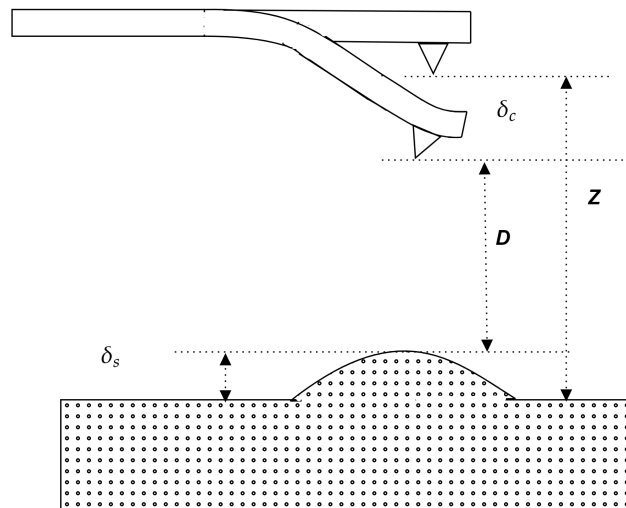


Figura 2.15: Sistema ponta-amostra, D é distancia real entre ponta e amostra, Z é a distância entre a amostra e a posição de descanso do cantiléver. Que se diferem conformem equação (2.19). Adaptado de (CAPPELLA; DIETLER, 1999)

Como não se conhece antecipadamente as deflexão do cantiléver e as deformações da amostra, a única distancia que se pode controlar é a distância Z , isto é, o deslocamento do escâner piezoelétrico, portanto a curva bruta obtida pelo AFM deve ser chamada de "curva de força-deslocamento" e não "curva de força-distância". Este último termo deve ser usado apenas para curvas nas quais a força é plotada versus a distância real da amostra da ponta (CAPPELLA; DIETLER, 1999).

Dando uma expressão analítica para as curvas força-deslocamento, o sistema amostra-

cantiléver pode ser descrito por um potencial U_{tot} , que é a soma de 3 potencias, U_{cs} , U_c , U_s , onde U_{cs} é o potencial de interação entre a ponta e a amostra, U_c é O potencial elástico de Hooke do cantiléver, U_s é o potencial que descreve deformação da amostra e é dada, em primeira aproximação, pela lei de Hooke (CAPPELLA et al., 1997).

O potencial elástico da haste e amostra são:

$$U_c(\delta_c) = \frac{1}{2}k_c(\delta_c)^2, \quad (2.20)$$

$$U_s(\delta_s) = \frac{1}{2}k_s(\delta_s)^2, \quad (2.21)$$

Onde k_c e k_s são as constantes elásticas cantiléver e de amostra. Com o potencial U_{cs} temos que geralmente a força de interação pode ser escrita como:

$$F = -\frac{\partial U_{cs}}{\partial D} = -\frac{C}{D^n}, \quad (2.22)$$

C e n dependem do tipo de força que age entre a ponta e a amostra. A equação (2.22) leva em consideração apenas a parte atrativa da interação, ou seja, somente a interação anterior à contato.

Forçando o sistema a ser estacionário, podemos obter uma relação entre Z e δ_c .

$$\frac{\partial U_{tot}}{\partial(\delta_s)} = \frac{\partial U_{tot}}{\partial(\delta_c)} = 0, \quad (2.23)$$

Na equação (2.23) temos:

$$\frac{\partial U_{tot}}{\partial(\delta_s)} = \frac{\partial(\frac{1}{2}k_c(\delta_c)^2)}{\partial(\delta_s)} + \frac{\partial(\frac{1}{2}k_s(\delta_s)^2)}{\partial(\delta_s)} + \frac{\partial U_{cs}}{\partial(\delta_s)} = 0, \quad (2.24)$$

$$k_s\delta_s = -\frac{\partial U_{cs}}{\partial(\delta_s)}. \quad (2.25)$$

Analisando o sistema de forças que agem na superfície da amostra, temos a força de interação ponta amostra eq(2.22) e a força originada do potencial elástico da amostra (2.21).

$$\frac{\partial U_{cs}}{\partial(\delta_s)} = -\frac{\partial U_{sc}}{\partial(D)}, \quad (2.26)$$

$$-k_s \delta_s = -\frac{C}{D^n}. \quad (2.27)$$

Usando a equação 2.19 e a relação $\delta_s = \frac{k_c}{k_s} \delta_c$, temos:

$$k_c \delta_c = \frac{C}{(Z - \delta_c - \delta_c)^n}, \quad (2.28)$$

ou

$$k_c \delta_c = \frac{C}{(Z - \beta \delta_c)^n}, \quad (2.29)$$

com $\beta = 1 + \frac{k_c}{k_s}$, então podemos usar a equação (2.29) para converter um gráfico força x deslocamento fig(2.16) no gráfico tipo força x distancia fig (2.13)(CAPPELLA et al., 1997).

Um gráfico força-deslocamento no AFM se apresenta da seguinte forma (figura 2.16) :

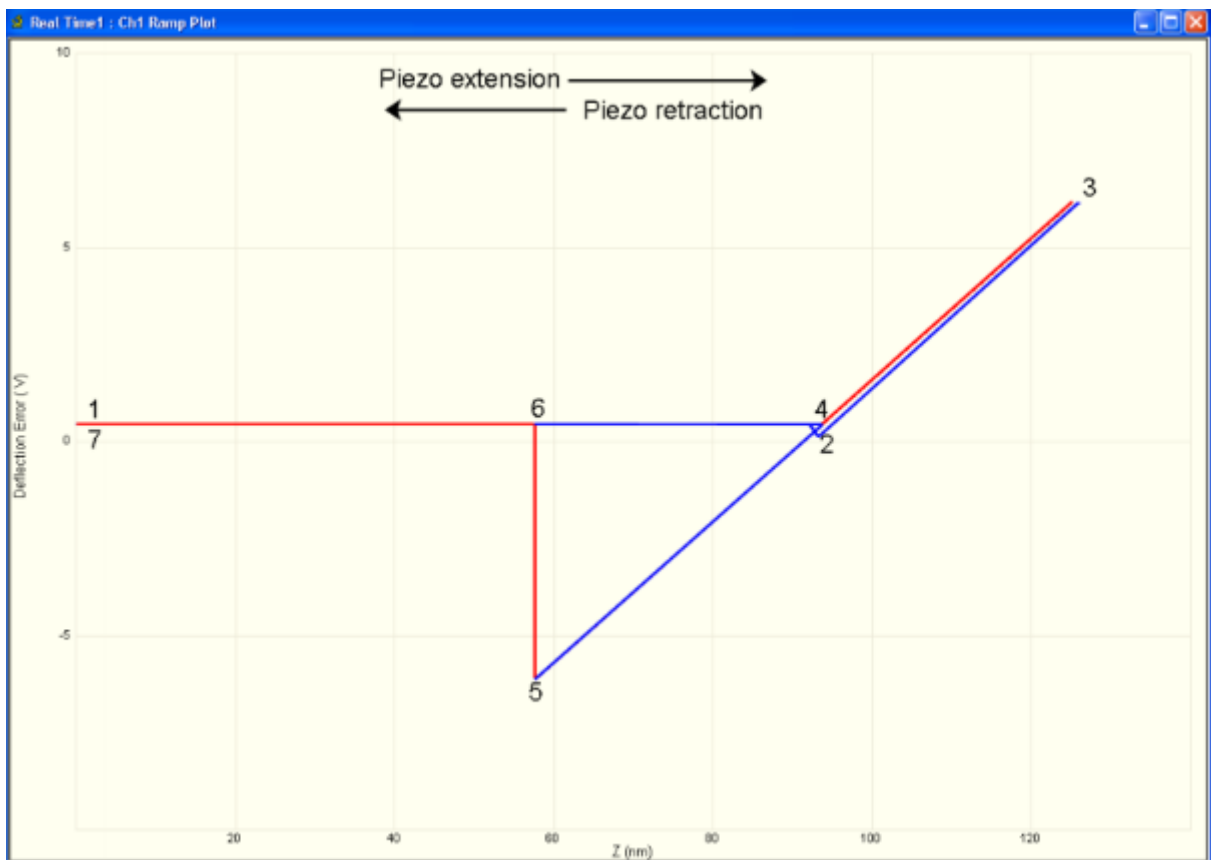


Figura 2.16: Curva de força. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

- 1-2 Ainda não há contato com a superfície, cantiléver sem deflexão. scanner piezoelétrica está se estendendo para o contato com a ponta.
- 2 Forças atrativas próximo à superfície puxam o cantiléver para baixo.
- 2-3 Região de contato a ponta pressiona a superfície da amostra, a medida que a ponta pressiona a amostra o cantiléver inclina para cima. O declive de contato parcial na curva de força pode fornecer informações sobre a elasticidade da superfície da amostra.
- 3-4 Escâner piezoelétrico retrai, ponta sobe, cantiléver relaxa para baixo passando pelo seu estado natural. Temos que a diferença entre a curva de entrada e retirada da ponta fornece informações sobre o comportamento elástico-plástico da amostra.
- 4-5 O escâner piezoelétrico continua a retração, a ponta sobe, mas o cantiléver deflexiona para baixo devido à força de adesão e de ligação com a superfície.
- 5-6 ponta finalmente fica livre da atração com a superfície da amostra. Cantiléver sobe subitamente. A força no ponto 5 é a força de adesão total entre a ponta e a amostra. Este é o ponto que nos dá a informação necessária para o estudos de adesão.
- 7 Ponta continua sua subida sem contato com a superfície e cantiléver sem deflexão

O comportamento elástico-plástico citado anteriormente obtido na comparação da curva de entrada e retirada da ponta na amostra. podendo apresentar uma das seguintes características (fig 2.17).

Considerando um material idealmente elástico, como mostrado na fig 2.17a, durante a curva de aproximação a ponta introduz na amostra uma deformação δ_s , e durante a retração a ponta volta para o ponto O e como a amostra é elástica, ela restaura sua forma inicial. Já na figura 2.17b, temos que uma amostra idealmente plástica, ela sofre uma deformação δ_s durante a curva de carga, e quando a ponta é retirada, ela não retorna à sua forma original, visto que a penetração permanece a mesma fig2.17b, ou seja, foi produzido uma deformação permanente na amostra. A maior parte das amostras possui um comportamento entre o elástico e o plástico, raramente se sobrepondo apresentando forma similar a fig2.17c

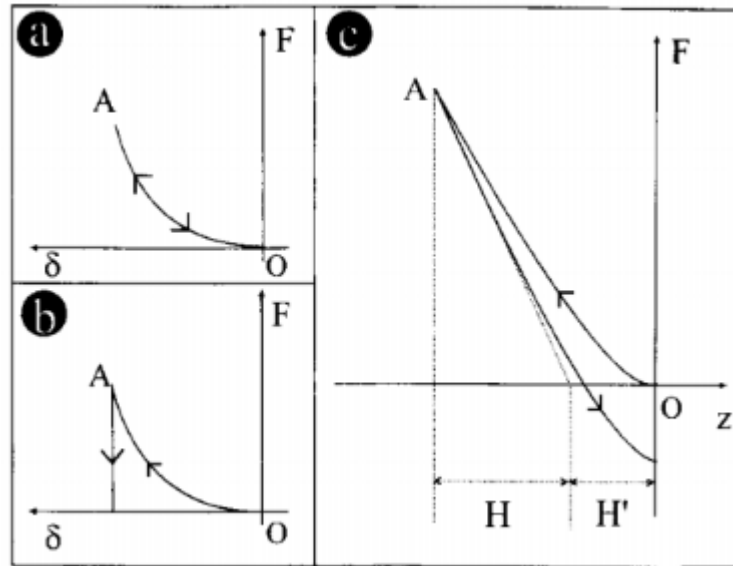


Figura 2.17: A temos a curva de força da região de contato da indentação da ponta em um material idealmente elástico, B temos a curva de força da região de contato da indentação da ponta em um material idealmente plástico, C temos a curva de força da região de contato da indentação da ponta em um material de comportamento entre o elástico e o plástico. Fonte: (CAPPELLA; DIETLER, 1999)

Tendo isso em vista, podemos observar pela curva de força- deslocamento diversas características das amostras, a seguir apresentamos algumas variações da curva de força- deslocamento, que está relacionada a características das amostras.

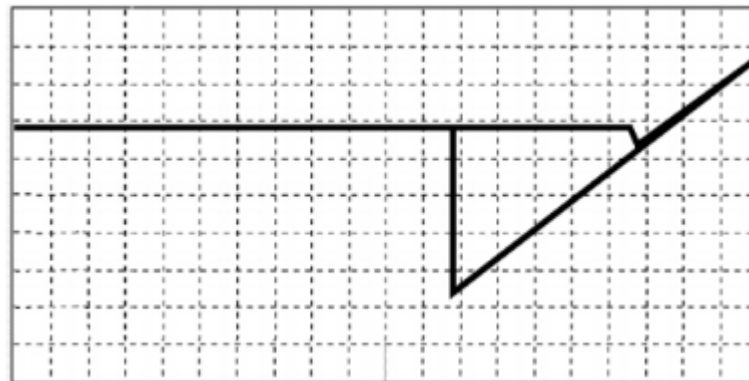


Figura 2.18: Curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra de alta adesividade. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

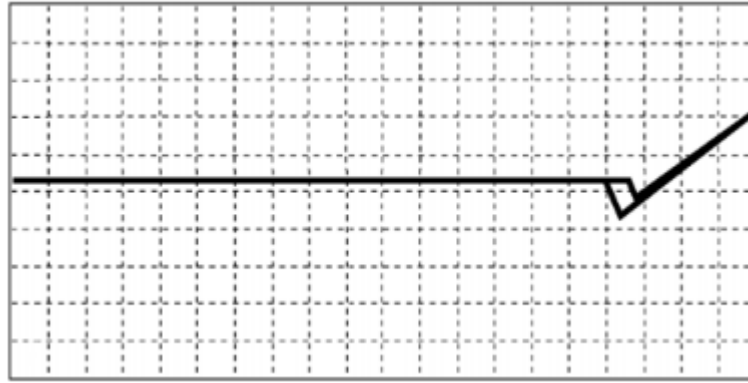


Figura 2.19: Curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra de baixa adesividade. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

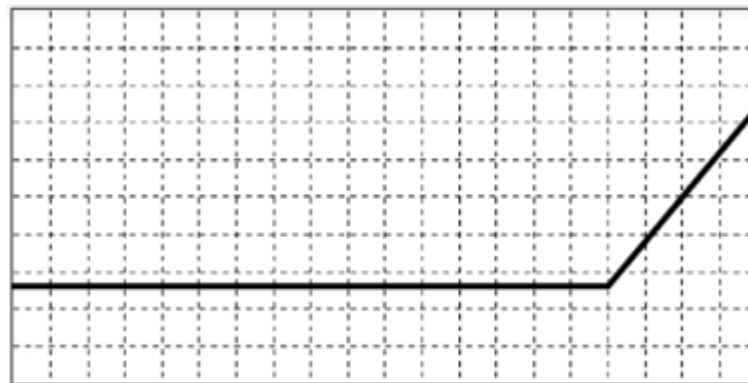


Figura 2.20: curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra rígida. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

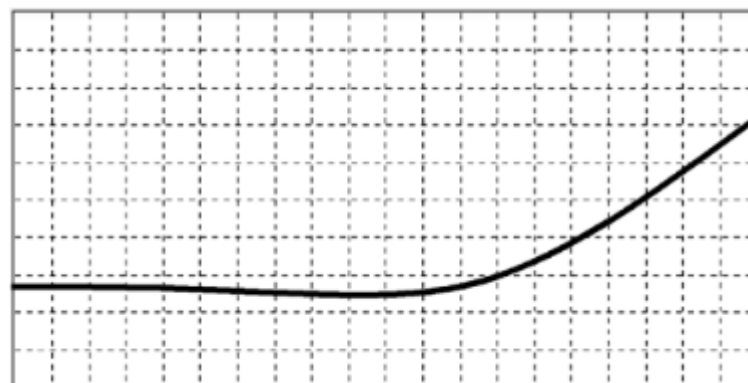


Figura 2.21: Curva de força x deslocamento, representando a interação da ponta de AFM com uma amostra macia. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

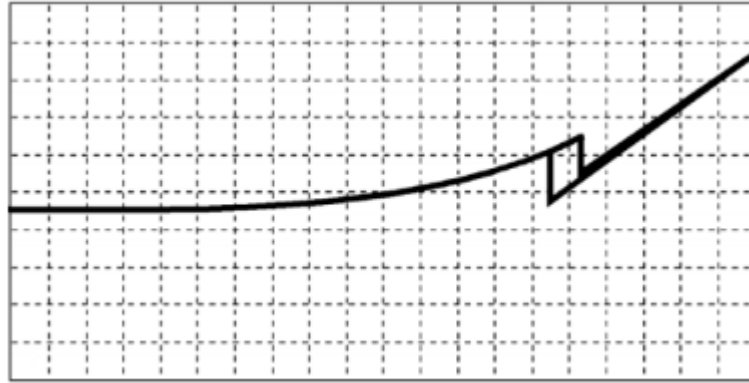


Figura 2.22: Curva de força x deslocamento, podemos notar uma repulsão de longo alcance entre a ponta do AFM e amostra. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

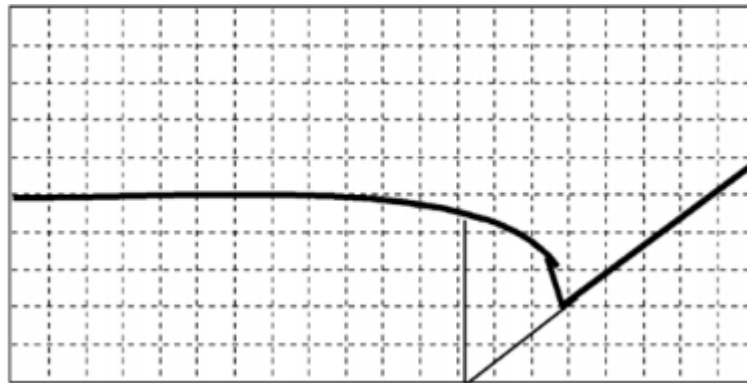


Figura 2.23: Curva de força x deslocamento, podemos notar uma atração de longo alcance entre a ponta do AFM e amostra. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

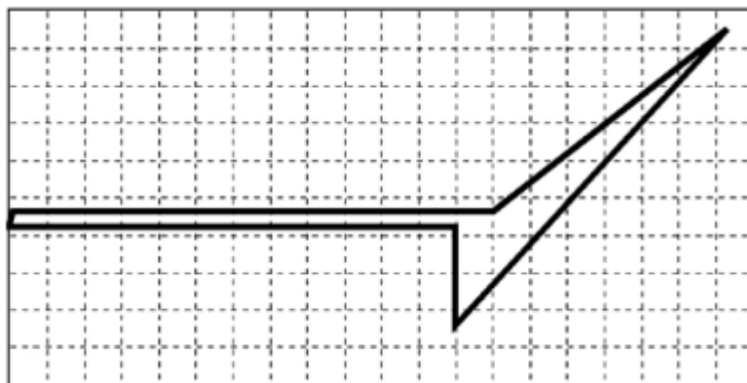


Figura 2.24: Curva de força x deslocamento indicando que houve uma deformação plástica na amostra. Fonte: (MULTIMODE..., 2011)

2.2.10 Modo não-contato

Este modo de operação do AFM foi desenvolvido por (MARTIN; WILLIAMS; WICKRAMASINGHE, 1987) baseia-se na separação da agulha em relação a amostra em torno de 10 a 100nm. Onde somente forças de interação de longo alcance interagirão, no caso, van der Waals, eletrostática e força de dipolo magnético(FERREIRA; YAMANAKA, 2006)

Como a grandeza das forças de longo alcance, para separações relativamente grandes é, em geral, bastante menor que aquela das forças interatômicas de curto alcance, a haste vibra perto de sua frequência de ressonância por meio de um piezelétrico. Em vez de medir as deflexões quase-estáticas da haste, medem-se as variações na frequência que resultam da interação das forças entre a ponta e a amostra.

Os contornos medidos pelo modo não-contato não necessariamente correspondem à topografia da superfície, mas se relacionam ao perfil da resposta da constante dielétrica. Neste caso, a amostra deve ter o mínimo possível de camada de contaminação, pois, caso contrário, corre-se o risco de obter imagens muito distorcidas ou mesmo de fazer a imagem da camada de contaminação.

2.2.11 Modo contato intermitente

No modo de operação de contato intermitente, a ponta fica oscilando em alta frequência e toca suavemente a superfície, de maneira que essa oscilação impede que a ponta fique presa à amostra. A força de atrito é quase desprezível, o que permite a análise de amostras mais moles, tais como amostras biológicas, sem as danificar. As forças são tanto atrativas quanto repulsivas: quando a ponta não está em contato com a superfície, a natureza da força é atrativa, a ponta vai se aproximando da superfície até que se inicie o contato. A partir desse momento, a natureza da força é repulsiva. Em geral, as pontas utilizadas para esse modo de imagem são montadas em cantiléveres retangulares, mas pode ser utilizado o cantiléver em formato *V*. Com relação à constante elástica do cantiléver, quanto maior for a constante elástica, mais rígido será o cantiléver e maior sua frequência de oscilação. As mudanças na amplitude e fase da haste causadas por esta interação são utilizadas para produzir a imagem(SILVA, 2016). Comparado com o modo não-contato o contato intermitente torna-se mais efetiva por realizar imagens de grandes áreas que podem incluir maiores variações na topográfica na amostra(FERREIRA; YAMANAKA,

2006).

2.2.12 Propriedades mecânicas e tribológicas via AFM

2.2.13 Rugosidade

Rugosidade é uma propriedade associada ao grau de aspereza de uma superfície, existente em todas as superfícies, mesmo as que aparentam ser lisas (bem polidas), pois as superfícies sólidas, independente da sua forma, contêm irregularidades ou desvios. Mesmo as superfícies mais lisas, como as obtidas por clivagem de alguns cristais, contêm irregularidades, cujas alturas excedem as distâncias interatômicas (BHUSHAN, 2000).

A aspereza na superfície dos materiais pode ser formada por (SILVA, 2004):

- Partículas de sujeira;
- Falhas ou estruturas que surgem durante a preparação da superfície, evaporação, polimento. A rugosidade devido a estes fatores é denominada **rugosidade topográfica**;
- Reações físico-químicas que podem ocorrer entre átomos e moléculas e que se manifestam na superfície do filme, dando origem a uma rugosidade composicional como a causada por processo de oxidação.

A avaliação da rugosidade da superfície é muito importante para muitos problemas fundamentais, como fricção, deformação de contato, condução de calor e corrente elétrica e precisão posicional. Por essa razão, a rugosidade superficial tem sido objeto de investigações experimentais e teóricas há muitas décadas (GADELMAWLA et al., 2002).

Parâmetros de Rugosidade

A rugosidade pode ser caracterizada por vários parâmetros como, por exemplo, os de amplitude, espaçamento e híbridos (GADELMAWLA et al., 2002). Em nosso trabalho para calcular a rugosidade, usamos apenas os parâmetros de amplitude que são os mais importantes para caracterizar a topografia da superfície, sendo para o nosso estudo o mais significativo.

Existem muitos parâmetros de amplitude que podem quantificar a rugosidade. A obtenção destes valores para a rugosidade depende da resolução da imagem obtida (SILVA, 2004). Quanto mais pontos ao longo de uma superfície tivermos, melhor será para os parâmetros de rugosidade, mas a geometria da superfície real é tão complicada que um número finito de parâmetros não pode fornecer uma descrição completa (GADELMAWLA et al., 2002).

Para compreender os parâmetros de amplitude, é necessário entender o sistema de linha média (Fig. 2.25). É definida como uma linha disposta paralelamente em direção geral do perfil, dentro do percurso de medição, de tal modo que a soma das áreas inferiores seja igual à soma das áreas superiores.

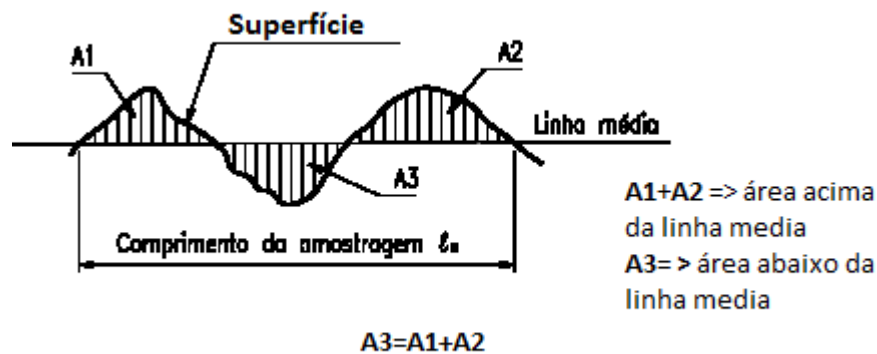


Figura 2.25: Linha média em medidas de rugosidade. Adaptado de (HAMMES; ROSA; WALKER, 2017).

Principais Parâmetros de Amplitude

- R_t – **Amplitude Total do Sistema**: Este parâmetro é muito sensível aos altos picos ou riscos profundos. R_{max} ou R_t é definido como a distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais baixo ao longo do comprimento de avaliação do perfil.
- R_p – **Amplitude máxima de pico**: é definido como o maior valor de altura de um pico em relação à linha média dentro do comprimento de avaliação.
- R_v – **Amplitude máxima de vale**: é definido como o maior valor de profundidade de um vale em relação à linha média dentro do comprimento de avaliação.
- R_z – **Amplitude máxima de perfil por comprimento**: o sistema internacional ISO define esse parâmetro como a diferença de altura entre a média dos cinco picos

mais altos e os cinco vales mais baixos ao longo do comprimento de avaliação do perfil.

A seguir, apresentamos os parâmetros de rugosidade utilizados em nosso trabalho: Rugosidade Média e Rugosidade Média Quadrática, que quantificaram a rugosidade das superfícies dos eritrócitos.

Rugosidade média

A rugosidade média (R_a - *Roughness Average*) é o parâmetro de rugosidade mais usado universalmente para controle de qualidade geral. É definida como a média aritmética dos desvios dos N valores absolutos de picos e vales em relação à linha média ao longo de um comprimento de amostragem:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Z_i|. \quad (2.30)$$

É uma caracterização topográfica de alturas essencialmente micrométrica. A sua popularidade pode ser atribuída ao fato de ter sido um dos primeiros parâmetros para controle de qualidade de superfícies criadas.

O parâmetro R_a pode corresponder graficamente à área de um retângulo. E pode ser descrito pela equação:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_{x=0}^{x=L} |Z(x)| dx, \quad (2.31)$$

onde L é o comprimento de amostragem do perfil (comprimento do perfil).

A Rugosidade Média é um parâmetro bem definido que pode ser facilmente medido. Apresenta uma boa variação das alturas na superfície do material e é o parâmetro mais utilizado para inspeções técnicas nas fabricações de materiais. Porém uma desvantagem é que valor de R_a não define a forma das irregularidades do perfil. Dessa forma, poderemos ter um mesmo valor de R_a para diferentes superfícies, como ilustrado na Figura 2.26:

Rugosidade Média Quadrática

Esse parâmetro também é conhecido como RMS ou R_q . Representa o desvio padrão da distribuição das alturas de superfície. Por isso, é um parâmetro importante para descrever a rugosidade superficial por métodos estatísticos.

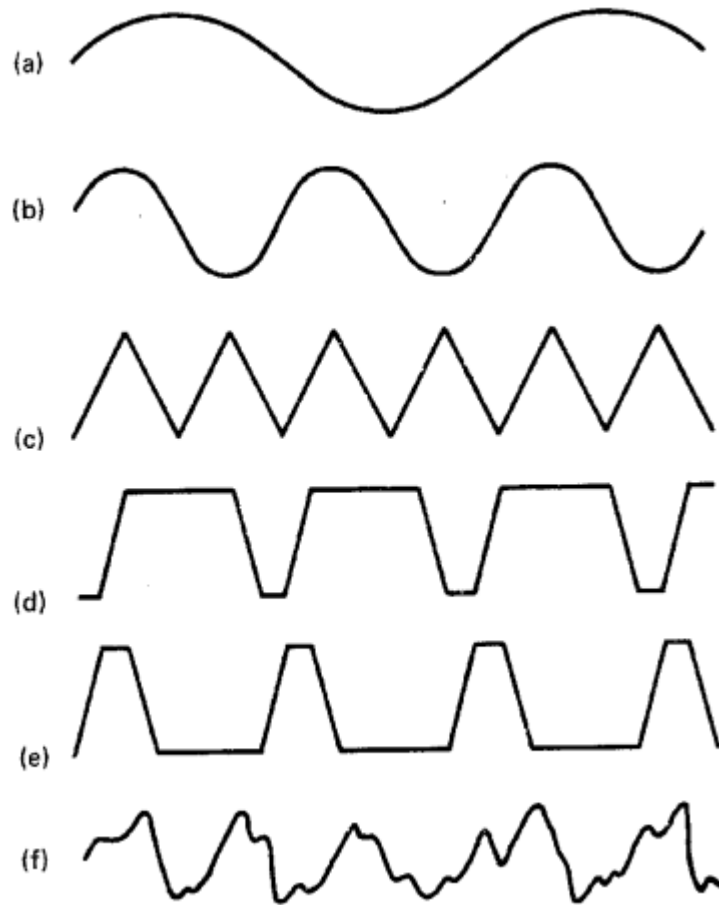


Figura 2.26: Vários perfis de superfície com o mesmo valor R_a . Fonte: (BHUSHAN, 2000).

R_q pode ser definido pelas equações:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Z_i)^2} \quad (2.32)$$

ou

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l [Z(x)]^2 dx}. \quad (2.33)$$

Este parâmetro é mais sensível que a altura média aritmética (R_a) a um grande desvio da linha média, pois a elevação ao quadrado aumenta o efeito das irregularidades que se afasta da média, entretanto também não define as formas das irregularidades.

2.2.14 Adesão

A adesão é um conceito extremamente importante em termos práticos e teóricos. Entretanto, infelizmente não existe uma definição completamente satisfatória do termo e nenhuma teoria ou modelo global único que possa explicar todos os fenômenos ou mecanismos nela envolvidos (BALDAN, 2012). Dentre as definições da literatura, ficamos com a seguinte: a adesão é um fenômeno pelo qual dois materiais em contato formam uma região de ligação adesiva que é capaz de sustentar e transmitir tensões. A força de adesão é a força que deve ser desenvolvida para superar essa ligação.

Embora o estudo dos mecanismos de adesão possa ser rastreado até a década de 1930, o campo de adesão começou a criar interesse real nos círculos científicos há apenas cerca de 60 anos (BALDAN, 2012).

Vem sendo observado, na literatura, que fenômenos de superfície podem estar relacionados às forças entre moléculas e, em particular, a uma assimetria em uma interface. Átomo e moléculas possuem reatividades significativamente diferentes daquela em estado sólido. No estado sólido, a célula unitária experimenta um campo de força uniforme devido à interação com as células unitárias vizinhas. Contudo, se a superfície é criada através de uma divisão do sólido, as forças que atuam nas células unitárias não são mais uniformes. Devido a interações perdidas, as células unitárias estão numa condição energética desfavorável, ou seja, a energia livre total do sistema aumentou. Este aumento na energia é denominado de “energia livre de superfície”, ou, mais precisamente “excesso de energia livre de superfície”. A fim de restaurar o equilíbrio, moléculas e átomos na superfície de líquidos irão experimentar uma atração no sentido do interior do material, normal à superfície com uma tensão resultante ao longo da superfície, conhecida como “tensão superficial” (COSTA, 2011).

Teorias de Adesão

Descrever o mecanismo de adesão em termos simples é difícil, devido à complexidade e multidisciplinaridade (QIN; SCHREIBER, 1999). A adesão é um tópico multidisciplinar que inclui: química de superfície, física, reologia, química de polímeros, mecânica de materiais, física de polímeros, análise de fraturas dentre outros (BALDAN, 2012).

Muitas teorias de adesão podem ser encontradas na literatura atual, vamos a seguir apresentar algumas delas.

Modelo de Intertravamento mecânico

Este modelo é uma das primeiras teorias de adesão; foi criado por Mcbain em 1925 (MCBAIN; HOPKINS, 1925) (BALDAN, 2012) Essa teoria propõe que o chaveamento mecânico, ou bloqueio do adesivo nas irregularidades da superfície do substrato é a principal fonte de adesão intrínseca(KINLOCH, 1980). Entretanto, a obtenção de boa adesão entre superfícies lisas expõe essa teoria como não sendo de aplicação geral, além disso, essa teoria não considera nenhum fator que ocorra no nível molecular (BALDAN, 2012).

Contudo em alguns casos, foi demonstrado que o intertravamento mecânico contribui significativamente para as forças de adesão intrínsecas (KINLOCH, 1980). O exemplo mais notável de um número da contribuição do intertravamento mecânico a adesão, é a adesão de polímeros aos têxteis(BORROFF; WAKE, 1950). Para Baldan, o intertravamento mecânico é apenas um meio técnico para aumentar a adsorção do adesivo nos substratos (BALDAN, 2012), e os principais fatores que afetam no intertravamento mecânico são: rugosidade, porosidade e o tipo de irregularidade (LEEDEN; FRENS, 2002) ver fig2.27.

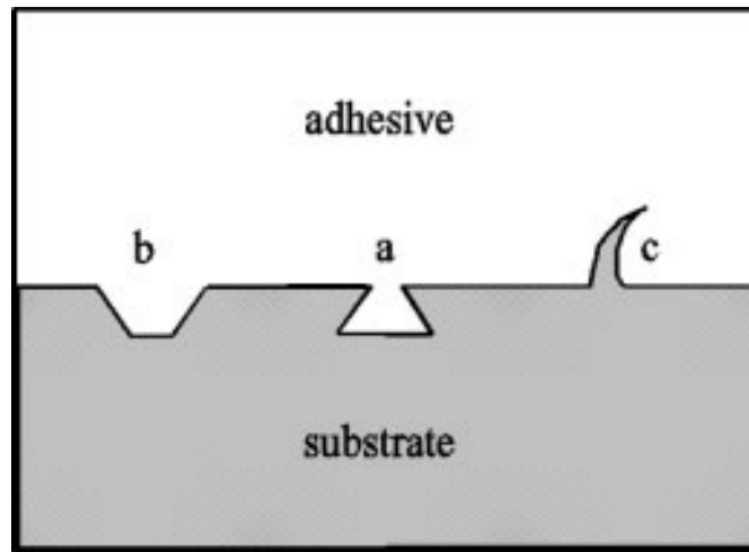


Figura 2.27: Tipos de irregularidade na superfície. retirado do ref (LEEDEN; FRENS, 2002)

Dos três tipos de irregularidades possíveis (ver Fig. 2.27), somente o tipo b pode formar um intertravamento, no caso de irregularidades superficiais dos tipos a ou c, a força adesiva depende da direção da força aplicada, pois somente o engate mecânico está presente (LEEDEN; FRENS, 2002)(BALDAN, 2012).

Teoria da Adsorção

É modelo aceito com mais frequência, foi desenvolvido por Sharpe e Schonhorn (SHARPE; SCHONHORN, 1964)(BALDAN, 2012), essa teoria afirma que a adesão intrínseca acontece devido às forças interatômicas e intermoleculares que são estabelecidas entre os átomos e moléculas nas superfícies do adesivo e do substrato após o contato (SHARPE; SCHONHORN, 1964)(BALDAN, 2012) (JIALANELLA, 2010),

A ligação intermolecular criada pode ser dividida em duas categorias: (1) formação de ligação primária e (2) formação de ligação secundária. A formação da ligação primária é o resultado de uma ligação covalente ou iônica agindo entre dois grupos funcionais na interface de ligação. A formação de ligações secundárias é resultado da interação intermolecular, como as forças de atração de van der Waals(JIALANELLA, 2010).

- Formação de ligação primária

a formação de ligações primárias na adesão é resultado da formação de ligações primárias através da interface dos materiais. A ligação primária criada é iônica ou covalente(JIALANELLA, 2010).

- Formação de ligação secundária

Se forma a partir de forças de atração intermoleculares usualmente chamadas de forças de van der Waals. Essas forças atrativas são resultado da interação de moléculas vizinhas, existem três tipos de interação: (1) interações dipolo, (2) interações de ligação de hidrogênio e (3) interações molécula-molécula (forças de dispersão de London)(JIALANELLA, 2010).

A teoria inclui vários modelos que às vezes são considerados como teorias separadas como: modelos de umedecimento, reologia e aderência química. A teoria da adsorção também é conhecida como teoria termodinâmica (também conhecida como teoria da mobilidade e da base ácido)(BALDAN, 2012).

Teoria da difusão ou inter-difusão

A teoria da difusão foi proposta por Voyutski (VOYUTSKII, 1963) , nela a adesão é explicada como sendo resultado da inter-difusão de macromoléculas dos dois materiais na interface (BALDAN, 2012)

No caso de auto-adesão de duas amostras de polímeros idênticos, adesão, sob pressão constante de montagem, é uma função da temperatura e tempo de contato se-

guindo a lei de Fick. Então, a profundidade média de interpenetração, x , de uma fase para outra é dado como (BALDAN, 2012)(YANG; GU; GIBSON, 2001):

$$x \propto \exp\left(-\frac{E}{2RT}\right)t^{\frac{1}{2}} \quad (2.34)$$

Onde E é a energia de ativação da difusão, t o tempo de contato, R o constante do gás molar e T é a temperatura. A aplicação de este modelo é limitado à adesão de polímeros compatíveis, bem como a soldagem de termoplásticos (BALDAN, 2012). Temos que mecanismo de adesão dessa teoria não tem influencia na força de adesão obtida por AFM.

Teoria da atração eletrostática

Se o adesivo e o substrato tiverem estruturas com diferentes distribuições eletrônicas, ver figura 2.28, provavelmente haverá transferência de elétrons em contato para equilibrar os níveis de Fermi que resultarão na formação de uma dupla camada de carga elétrica na interface. A teoria eletrônica da adesão se deve principalmente a Deryaguin e colaboradores (DERYAGIN, 1955)(KINLOCH, 1980), eles sugeriram que as forças eletrostáticas decorrentes de contato ou junção podem contribuir significativamente para a adesão intrínseca. A controvérsia que essa teoria causou se deve a esta afirmação final de que as forças eletrostáticas são uma causa importante, e não apenas um resultado, de alta força articular (KINLOCH, 1980).

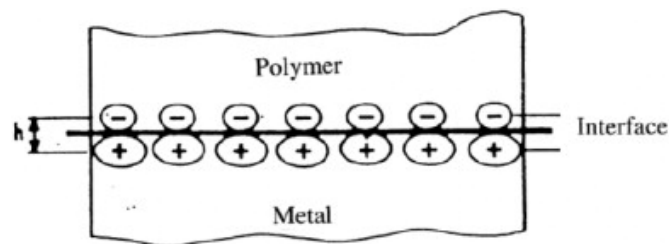


Figura 2.28: Dupla camada elétrica nas interfaces polímero-metal. Fonte: (BALDAN, 2012)

Força de adesão obtida por AFM

Em geral, a força de obtida entre a ponta de AFM e a superfície da amostra inclui a força capilar (F_{cap}), interações sólido-sólido, que consistem nas forças de Van der Waals (F_{VdW}), forças eletrostática (F_{el}) e forças de ligação química (F_{chem}) (LEITE;

HERRMANN, 2005).

Pode ser obtido pela técnica de curva de força. A força sentida pela ponta do AFM é calculada multiplicando a deflexão da haste (nm) no ponto 5 ver figura 2.16, pela sua constante elástica k (N/m).

2.2.15 Modelos mecânicos

A seguir vamos discutir alguns modelos mecânicos de teoria de contato, de grande importância para o entendimento da adesão obtida via afm, pois a adesão obtida via AFM depende da área de contato da ponta com a amostra, vamos abordar inicialmente a teoria de Hertz, ela não leva em conta forças adesivas, mas é fundamental a sua compreensão, pois as teorias de contato que consideram adesão se fundamentam na teoria de Hertz adicionando o componente da adesão que, como vamos ver a seguir, a adesão aumenta a área de contato prevista pela teoria hertz para o contato de uma esfera com um plano . Essas teorias negligenciam deformações plásticas fig: 2.17b , consideram que a ponta e a amostra são meios elásticos contínuos (CAPPELLA et al., 1997).

2.2.16 Teoria de Hertz

A teoria de Hertz data de 1881(HERTZ, 1881). Aborda o contato de uma esfera rígida indentando em um espaço elástico, teoria com aplicação em AFM. Onde a ponta é considerada uma esfera elástica lisa, enquanto a amostra é uma superfície plana e rígida(CAPPELLA et al., 1997).

Na teoria clássica de contato de Hertz, ele se concentrou principalmente no contato não adesivo,

$$F_{ad} = 0, \quad (2.35)$$

Onde forças de tensão são permitidas para ocorrer dentro da área de contato, o modelo de Hertz adota as seguintes premissas:

- Os materiais que compõem os corpos em contato são isotrópicos e homogêneos;
- A força aplicada é estática;
- O material é linearmente elástico, obedecendo a lei de Hooke;
- O raio de curvatura dos corpos em contato é muito grande comparado ao de

contato, pois cada corpo pode ser considerado um espaço elástico, ou seja, a área de contato é muito menor do que o raio característico do corpo.

- Não há atrito entre as superfícies em contato;
- Regime de pequenas deformações.

Em seu trabalho, Hertz descreve que a carga F exercida pelo indentador ocorreu dentro de uma área de contato circular com raio de contato a_H estando relacionado com a carga do indentador F , o raio de penetração esférico R_p e as propriedades elásticas dos materiais em contato (DRELICH; MITTAL, 2005).

$$a_H = \sqrt[3]{\frac{R_p F}{E^*}}, \quad (2.36)$$

onde E^* é o módulo de Young reduzido, dado por:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{4}{3} \left(\frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right) \quad (2.37)$$

onde E e ν são o módulo de Young e o coeficiente de Poisson da superfície, respectivamente, e os subscritos 1 e 2 denotam o penetrador e a amostra, respectivamente.

Se o contato é entre corpos que são esferas com raios R_1 e R_2 , então R na equação 2.36 é o raio equivalente dado por:

$$R = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}. \quad (2.38)$$

A deformação é dada por:

$$\delta_{def} = \frac{a_H^2}{R_p} = \frac{F}{E^* a_H}, \quad (2.39)$$

Ressaltando que F é a carga aplicada.

O modelo de Hertz que descreve a área de contato entre os corpos elásticos na ausência de forças adesivas, foi amplamente verificado em escala macro, entretanto em escalas suficientemente pequenas forças adesivas têm um efeito significativo no contato (MUSSER, 2009), a seguir vamos abordar a teoria (JKR) onde foi levado em conta efeito da adesão, assumindo que ela tem efeito apenas na zona de contato.

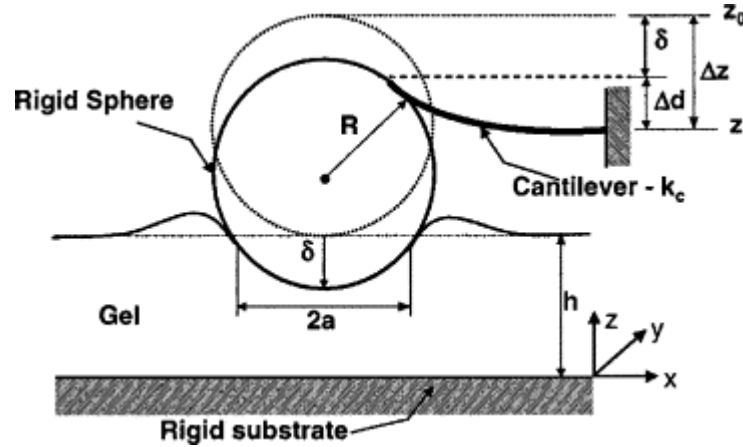


Figura 2.29: Ilustração de uma amostra fina em um substrato rígido indentado por uma sonda esférica. Fonte: (DIMITRIADIS et al., 2002).

2.2.17 Teoria Johnson-Kendall-Roberts (JKR)

Uma melhoria em relação à teoria hertziana foi fornecida por Johnson (em 1971) com a Teoria de JKR (JOHNSON; KENDALL; ROBERTS, 1971). Na teoria de JKR, o contato é considerado como adesivo.

Temos então que a força de adesão na teoria JKR é:

$$F_{ad} = \frac{2}{3}\pi R_P \varpi, \quad (2.40)$$

onde ϖ é o trabalho de adesão no contato e R_p raio de penetração esférico. As equações correspondentes à (4.2) e (4.4) são:

$$a_H = \sqrt[3]{\frac{R_P}{E^*} \left[F + 3\pi R_P \varpi + \sqrt{6\pi R_P \varpi F + (3\pi R_P \varpi)^2} \right]} \quad (2.41)$$

e

$$\delta_{def} = \frac{a_H^2}{R_P} = \frac{2}{3} \sqrt{\frac{6\pi \varpi a_H}{E^*}}. \quad (2.42)$$

A teoria JKR é adequada para sistemas altamente adesivos com baixa rigidez e grande raio de ponta. A teoria JKR negligencia forças de longo alcance fora da área de contato e considera somente forças de curto alcance dentro da região de contato.

2.2.18 Teoria de Derjaguin-Müller-Toporov (DMT)

Na teoria DMT, desenvolvida em 1975 (DERJAGUIN; MULLER; TOPOROV, 1975), a esfera elástica é deformada de acordo com a teoria de Hertz, mas com adição

da carga adicional F , logo as forças agindo entre os dois corpos fora da região de contato também são levadas em consideração como forças de Van der Waals fora do regime de contato elástico, que dão origem à carga adicional.

Temos então que a força de adesão na teoria DMT é:

$$F_{ad} = 2\pi R_P \varpi, \quad (2.43)$$

o Raio do círculo de contato a_H

$$a_H = \sqrt[3]{(F + 2\pi R_P \varpi) \frac{R_P}{E^*}}, \quad (2.44)$$

A deformação é dada por:

$$\delta_{def} = \frac{a_H^2}{R_P}. \quad (2.45)$$

A teoria de DMT é aplicável para sistemas com baixa adesão e pequeno raio da ponta.

Comparativo dos modelos de contato mecânicos fig 2.30, podemos observar que dos 3 modelos discutidos o modelo DMT é o que mais se aproxima com a interação real (entre sonda e amostra como ocorre na técnica de AFM).

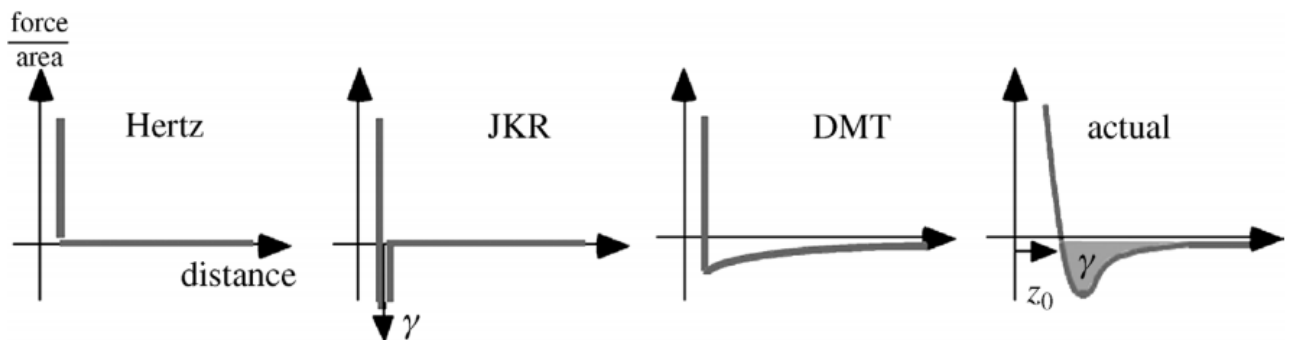


Figura 2.30: Forças de interação (por área) para os modelos Hertz, JKR e DMT, em comparação com um interação real. Fonte: (GRIERSON; FLATER; CARPICK, 2005)

Capítulo 3

Procedimento experimental

As amostras foram inicialmente solicitadas e coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão - HEMOMAR, de acordo com as normas dos Comitês de Ética daquela instituição e da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, ver anexo.

As amostras foram disponibilizadas e transportadas em caixa térmica contendo gel-pec, mantendo temperatura durante o transporte de aproximadamente 8 °C, por cerca de 1 hora, em seguida foram guardadas em geladeira com temperatura de aproximadamente 4°C e medidas no afm no menor tempo possível.

As medidas em Afm seguiram os seguintes passos:

- Ajuste do afm para medidas
- preparo da amostra para o AFM
- Medidas das amostra no Afm
- Analise dos dados de Adesão e rugosidade

3.1 Ajustes do afm para medidas

A investigação de amostras biológicas no modo contato é mais destrutivo que o modo contato intermitente, entretanto as propriedades que buscamos analisar como rugosidade e adesividade são melhor obtidas via modo contato, buscando deixar a varredura de afm menos prejudicial às células, utilizamos uma sonda bem flexível, uma ponta de constante de mola 0,4N/M (constante segundo fabricante) calibrada durante as medidas.

3.1.1 Especificações do cantilever e ponta

Cantilever

- Material: Nitreto de silício
- Geometria: triangular
- Espessura do cantilever(nom): $0,65 \mu\text{m}$
- Espessura do cantilever: $0,6 - 0,7 \mu\text{m}$
- Frequência de ressonância: 70 KHz
- Constante : $0,4\text{N/m}$
- Revestimento lado superior : Alumínio reflexivo

Ponta

- Geometria: Rodada (simétrica)
- Altura da ponta : $2,5 - 8,0 \mu\text{m}$
- Ângulo frontal : $15 \pm 2,5^\circ$
- Ângulo traseiro $25 \pm 2,5^\circ$
- Ângulo lateral $17,5 \pm 2,5^\circ$
- Raio da ponta: 2 nm
- Raio da ponta (max): 12 nm

3.1.2 Ajuste da ponta

O primeiro ajuste a ser feito antes das medidas é do laser no fotodetector, para facilitar este ajuste utiliza-se uma amostra refletora, pois esse ajuste consiste em colocar o laser sobre o cantilêver e a reflexão do laser dever ser no fotodetector como a figura.

3.1.3 Determinação da sensitivity

A determinação da sensitivity permite a conversão do sinal bruto emitido do piezoelétrico (em volts), para valores de deflexão do cantiléver (em nm). ou seja a sensitivity basicamente fornece o quanto de volts é aplicado no piezo para cada deflexão do cantiléver. É obtida no modo ramp continuous mode. Obtivemos o valor da sensitivity antes das medidas nos eritrócitos, para que dados precisos de deflexão do cantiléver possam ser determinados:

- obtemos uma boa curva de força usando uma amostra dura que não se deforme, usamos uma amostra de safira para calibrar a sensitivity.
- Após a obtenção da curva de força arrastamos os cursores verticais da borda da plotagem para a região de contato.
- Clicando em RAMP > UPDATE SENSITIVITY para calcular a sensitivity do cantiléver.

A sensitivity muda para diferentes comprimentos e estilos de cantiléver, também muda com a posição do laser no cantiléver, temos assim que calibrar os parâmetros de sensitivity a cada uso do afm. Essa etapa é fundamental para determinar valores quantitativos de adesividade na superfície dos eritrócitos.

3.2 Preparo da amostra para o AFM

Para análise, retirou-se, com um tubo capilar com heparina, uma gota de sangue do tubo de EDTA K3, depositou-se uma gota em lamínula de 13 mm e se realizou um esfregaço (similar ao que se faz em hemocentros).

- Pinga-se uma gota na extremidade de uma lamínula limpa, com a ajuda de um tubo capilar.
- Coloca-se uma lâmina sobre a lamínula, formando um ângulo de 45° .
- Retornando a lâmina cuidadosamente até tocar a gota de sangue. A gota então se espalha por toda a borda da lamina.
- De maneira precisa, segura, move-se a lâmina até a extremidade oposta da lamínula.

- Deixa-se secar ao ar.

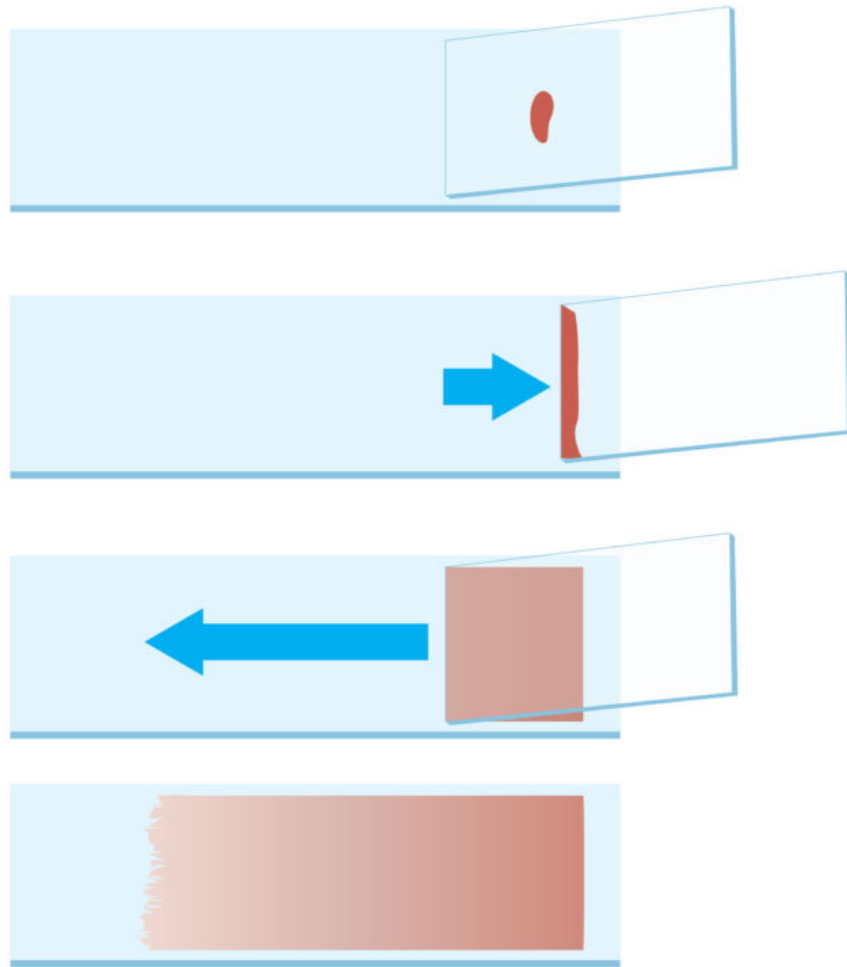


Figura 3.1: Ilustração de um esfregão. Fonte: (kASVI, 2019)

- Feito o esfregão nas lamínulas, foram aderidas no disco magnético do AFM usando fita dupla face e então levadas para análise com o AFM. Duas propriedades foram analisadas com maior detalhes: adesividade e rugosidade.

As amostras foram inicialmente coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão - HEMOMAR e as medidas de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizadas na Central Multiusuário de Pesquisa em Nanomateriais e Biosistemas (CMPNB) do Departamento de Física da UFMA.

3.3 Medidas das amostra no Afm

Os eritrócitos foram analisados no ar à temperatura ambiente, aproximadamente 20°C e umidade de aproximadamente 47 % , com o Microscópio de Força Atômica Multimode Nanoscope 8 (Bruker), figura 3.2 , operando em modo Mechanical properties Quantitative nanomechanical mapping peakForce Qnm in air, usando sondas com uma constante de mola nominal de $0,4\text{ N/m}$. Para a análise da adesividade das hemácias, foi realizada uma varredura de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, sobre cada célula, analisando a célula por completo com uma frequência de varredura vertical de 1 Hz, e uma resolução de 256×256 pixels. Para a análise da rugosidade, realizou-se uma varredura de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ próximo ao centro da hemácia com uma frequência de varredura vertical de 1 Hz, e uma resolução de 256×256 pixels. A rugosidade média (Ra) e (Rq) foi padronizada em uma área de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ e calculada pelo software NanoScope.

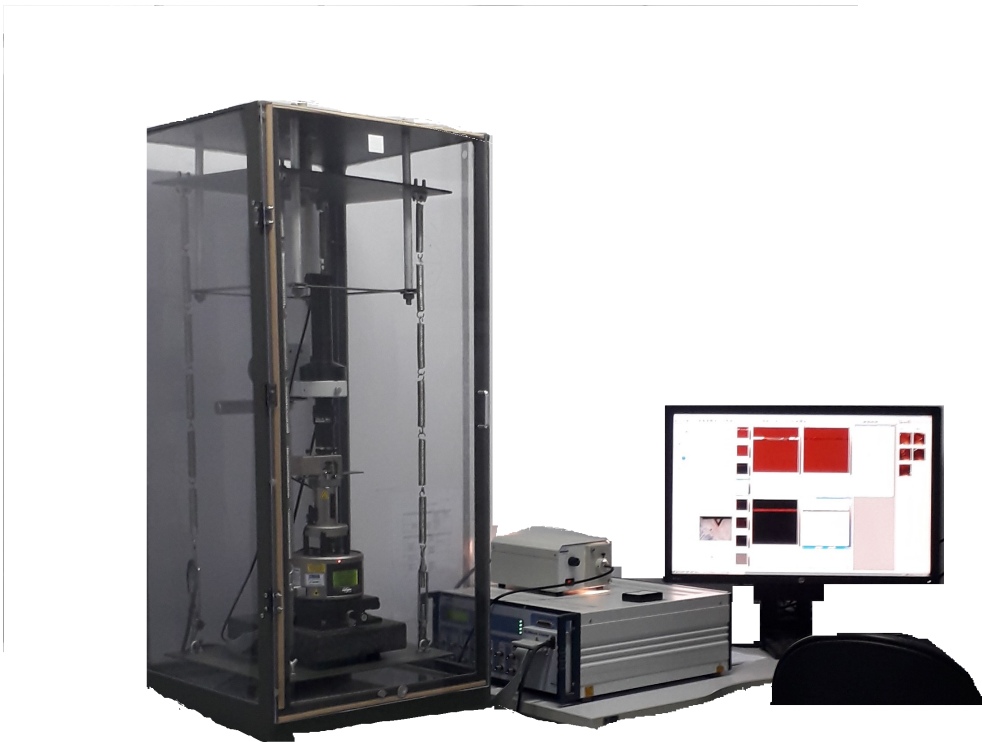


Figura 3.2: AFM da Central Multiusuário de Pesquisa em Nanomateriais e Biosistemas (CMPNB)

Em cada amostra, foram analisadas 5 (cinco) células e, para cada célula, foram

feitas varreduras de lateral de 1 (um) micrometro. As análises dos dados de topografia, rugosidade, adesão e propriedades mecânicas, em geral, foram feitas utilizando os softwares NanoScope Analysis e Gwyddion.

3.4 Análise dos dados de Adesão, rugosidade e volume

Para a análise gráfica em formato de chart box, as imagens foram exportadas pelo software NanoScope Analysis em arquivos no formato ASCII. Esses arquivos contêm uma matriz M com os dados de altura, adesão de cada pixel da imagem possibilitando a manipulação desses dados.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Alterações na forma dos eritrócitos são bastante comuns e são visíveis nos esfregaços sanguíneos e estão frequentemente presentes nas anemias, principalmente na falciforme, que apresentam células em formato de foice. Durante a realização dos esfregaços para a nossa análise em AFM, foram encontradas diversas células falciformes nas amostras de anemia falciforme. Entretanto, durante a análise dos eritrócitos com hemoglobinopatias, selecionamos apenas células com perfil aparentemente normal.

Dos resultados obtidos sobre os eritrócitos analisadas, podemos antecipar que as larguras estão no tamanho descrito na literatura entre 8 μm e 10 μm . Para a altura, a literatura descreve uma altura de aproximadamente 2 μm . As células analisadas têm uma altura de aproximadamente 0,5 μm , como mostra a figura 4.1. Tal diferença está no modo como a análise foi feita, a altura de 2 μm corresponde ao eritrócito em líquido. Nossas medidas foram feitas em células fixadas por esfregaço fig 4.1, logo tal diferença se dá pela perda de líquido. Utilizamos o método de esfregaço por ser a técnica de fixação de eritrócitos mais usada em laboratórios, clínicas hospitalares, hemocentro e etc, buscando que os resultados deste trabalho estejam de fácil reprodução para a comunidade em geral.

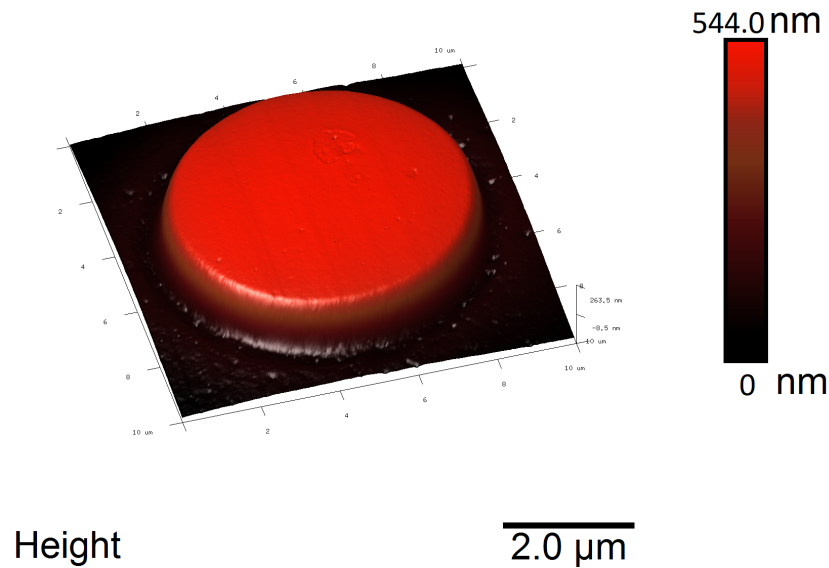


Figura 4.1: imagem 3D, $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ de eritrócito, fixado após esfregaço em uma lamínula.

Visando compreender as propriedades físicas dos eritrócitos de portadores de anemia falciforme, utilizamos Microscopia de Força Atômica. Com essa técnica, é possível estudar as propriedades mecânicas em níveis macro, micro e nanoscópico da estrutura celular, muito além de usar forças interatômicas para gerar imagens topográficas de amostras. Com o AFM, há possibilidade de medir forças intermoleculares e a distribuição espacial dessas propriedades em uma única célula.

As imagens apresentadas nas Fig.4.2, 4.3 e 4.4 foram obtidas com o Microscópio de Força Atômica (AFM). A imagem mostrada na Fig.4.2 revela a deformação que a célula (com Hb SS) apresenta quando sofre desoxigenação, assumindo forma de foice (motivo do nome falciforme). A imagem na Fig. 4.3 é de uma amostra de anemia falciforme, porém ainda não sofreu desoxigenação tendo, assim, forma semelhante à das células normais, como a da Figura 4.4. Apesar de as células da Figura 4.3 terem aspecto visual aparentemente normal, há diversas características diferentes das células normais que foram reveladas pelas varreduras com AFM.

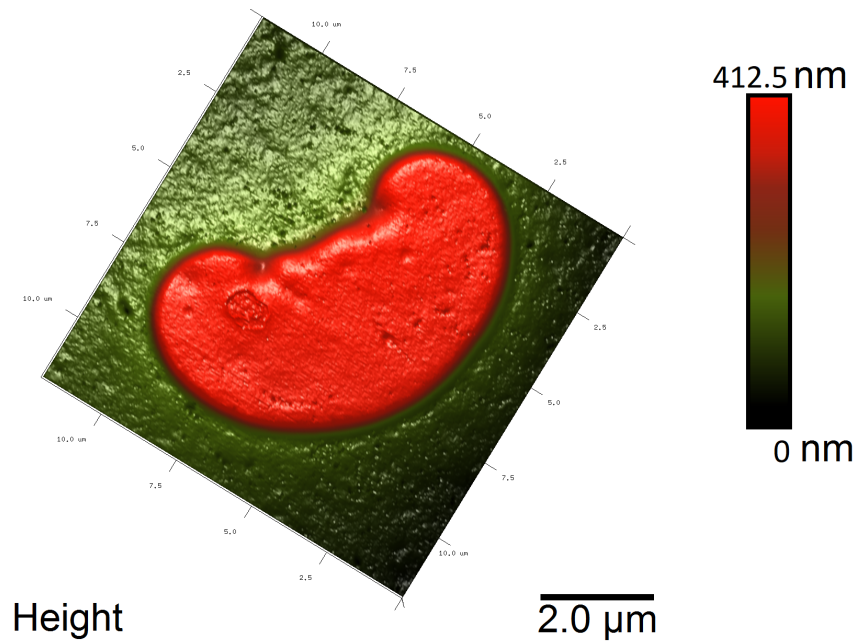


Figura 4.2: Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de um eritrócito falcizado.

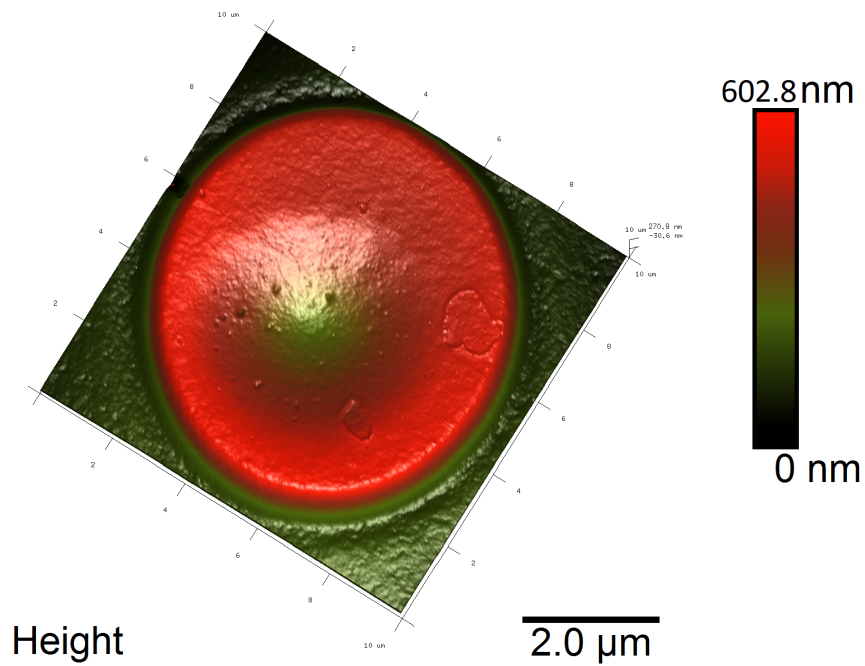


Figura 4.3: Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de um eritrócito de portador de anemia falciforme (célula ainda com aspecto normal).

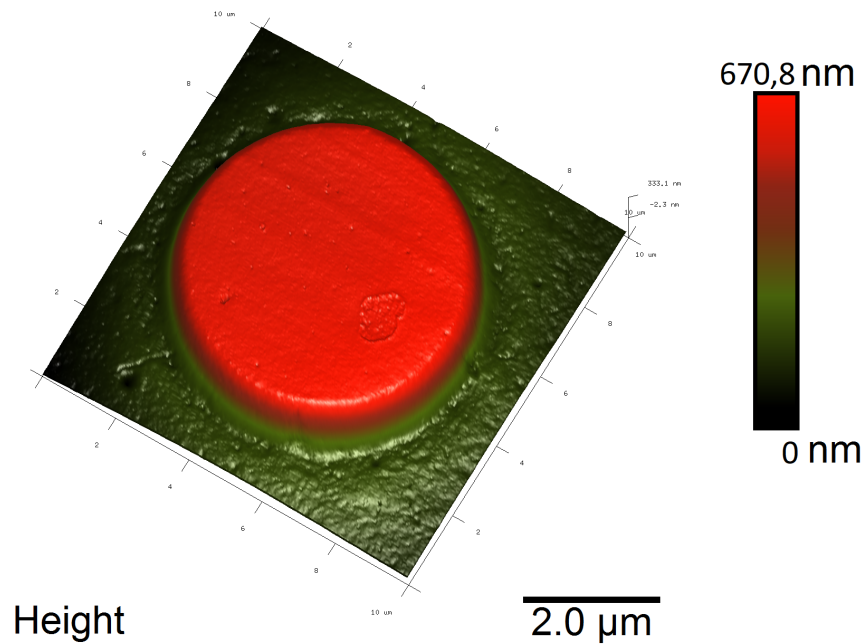


Figura 4.4: Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) de um eritrócito de pessoa sem anemia falciforme.

4.1 Adesão

Com a Microscopia de Força Atômica, analisamos os diferentes grupos de amostras (eritrócitos com Hg AA, Hg AS e Hg SS). Nos casos de anemia falciforme, analisamos células com formato normal como a da Figura 4.3, sem estarem na forma característica da doença (Figura 4.2). Após varredura de 10 (dez) $\mu\text{m} \times 10$ (dez) μm sobre a célula, analisamos então a força de adesão que a célula exercia sobre a ponta e depois comparamos à adesão das hemácias com diferentes hemoglobinas, como mostrado na Fig. 4.5.

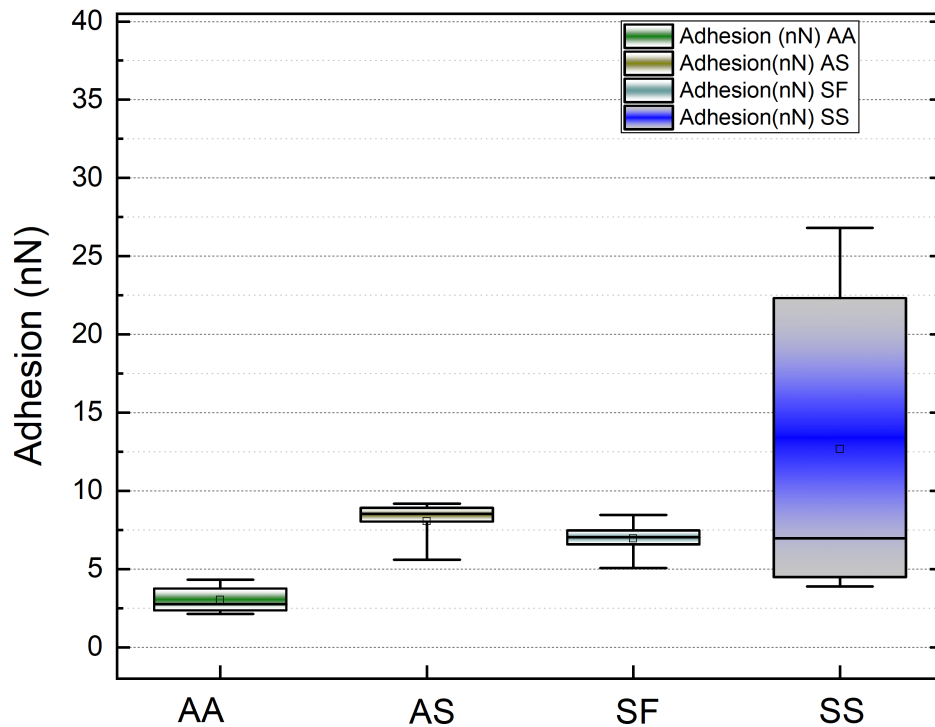


Figura 4.5: Adesão de eritrócitos com diferentes mutações na Hemoglobina.

O gráfico da Figura 4.5 mostra a adesão de eritrócitos com diferentes mutações na hemoglobina. As siglas AA correspondem à adesão dos eritrócitos padrão, sem mutação nos genes que dão origem à hemoglobina; AS corresponde à adesão dos eritrócitos com traço falciforme, em que um dos genes que dá origem à hemoglobina é o gene padrão e o outro é um gene variante característico da anemia falciforme ;SF corresponde à adesão dos eritrócitos de em que os genes que dá origem a hemoglobina A são variantes tipo S, entretanto há um aumento da hemoglobina tipo F ;SS corresponde à adesão dos eritrócitos de portadores de anemia falciforme, cujos 2 genes são variantes tipo S, que, no estado homocigótico (como neste caso) causam a anemia falciforme.

No gráfico da adesão, observa-se que as células com hemoglobina AA apresentam menor adesividade, as células com hemoglobina SF e AS apresentam adesividade média próxima uma da outra e mais elevada que as células com hemoglobinas AA. As células com hemoglobina SS, cujos portadores possuem anemia falciforme, apresentam uma adesividade muito mais elevada que as demais células.

A seguir figura 4.6, temos mapas de adesão sobre células com diferentes mutações na hemoglobina.

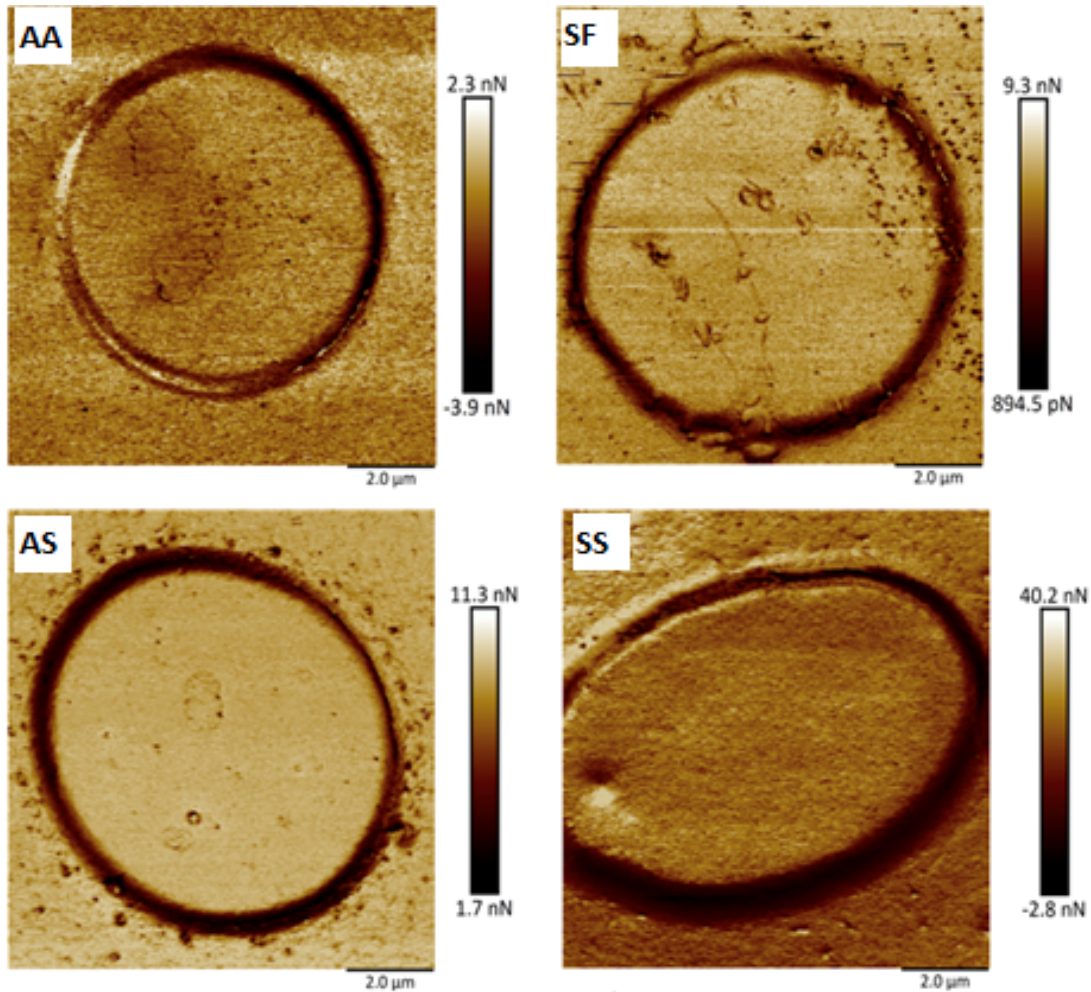


Figura 4.6: Mapas de adesão de eritrócitos com diferentes mutações na Hemoglobina correspondentes aos do gráfico da Figura 4.5, Onde (AA) célula com hemoglobinas tipo AA,,(SF) célula com hemoglobinas tipo SF, (AS) célula com hemoglobinas tipo AS, (SS) célula com hemoglobinas tipo SS.

Complementando os dados de adesão, apresentamos imagens das curvas de forças gerada sobre 2 (duas) células, um eritrócito normal (sem anemia falciforme), fig 4.7 e 4.8, as figuras são da mesma célula, e depois um eritrócito com anemia falciforme, fig 4.9 e 4.10, as figuras são da mesma célula. Para cada caso inicialmente temos a imagem com apenas duas curvas de forças, e os pontos onde as curvas foram geradas estão sinalizados com uma seta na cor da curva produzida naquele ponto, em seguida apresentamos a imagem com diversas curvas de forças geradas sobre a célula, onde podemos notar que a deflexão do cantiléver foi bem maior para a célula com anemia falciforme. Inclusive, é

possível notar que o desvio da deflexão do cantiléver é maior no eritrócito de um portador de anemia falciforme.

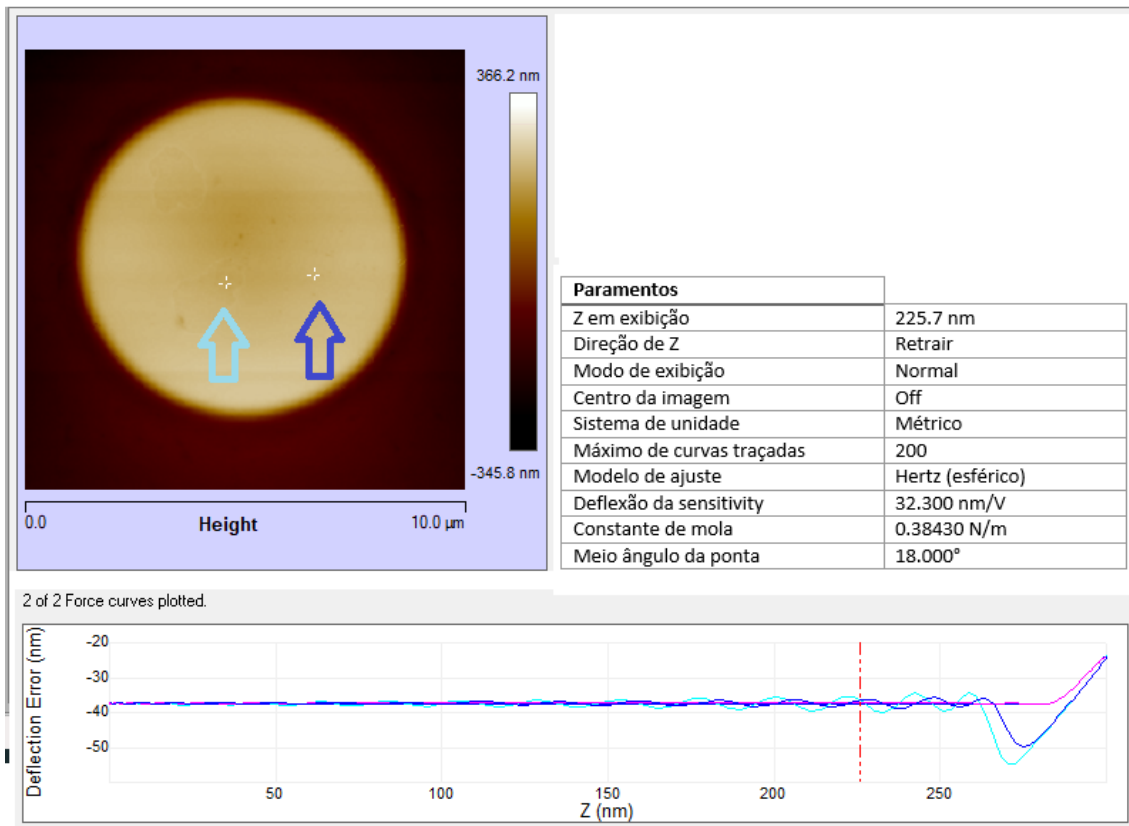


Figura 4.7: Duas curvas de força gerada sobre uma célula sem anemia falciforme.

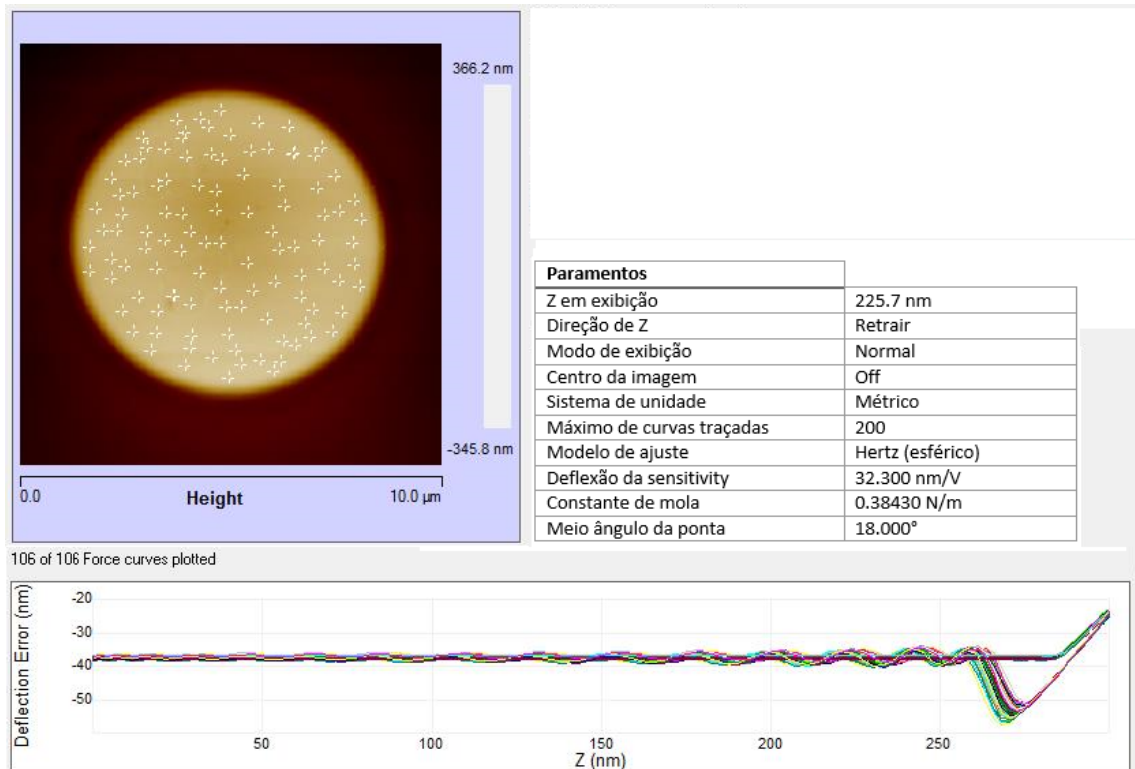


Figura 4.8: Curvas de força gerada sobre uma célula sem anemia falciforme

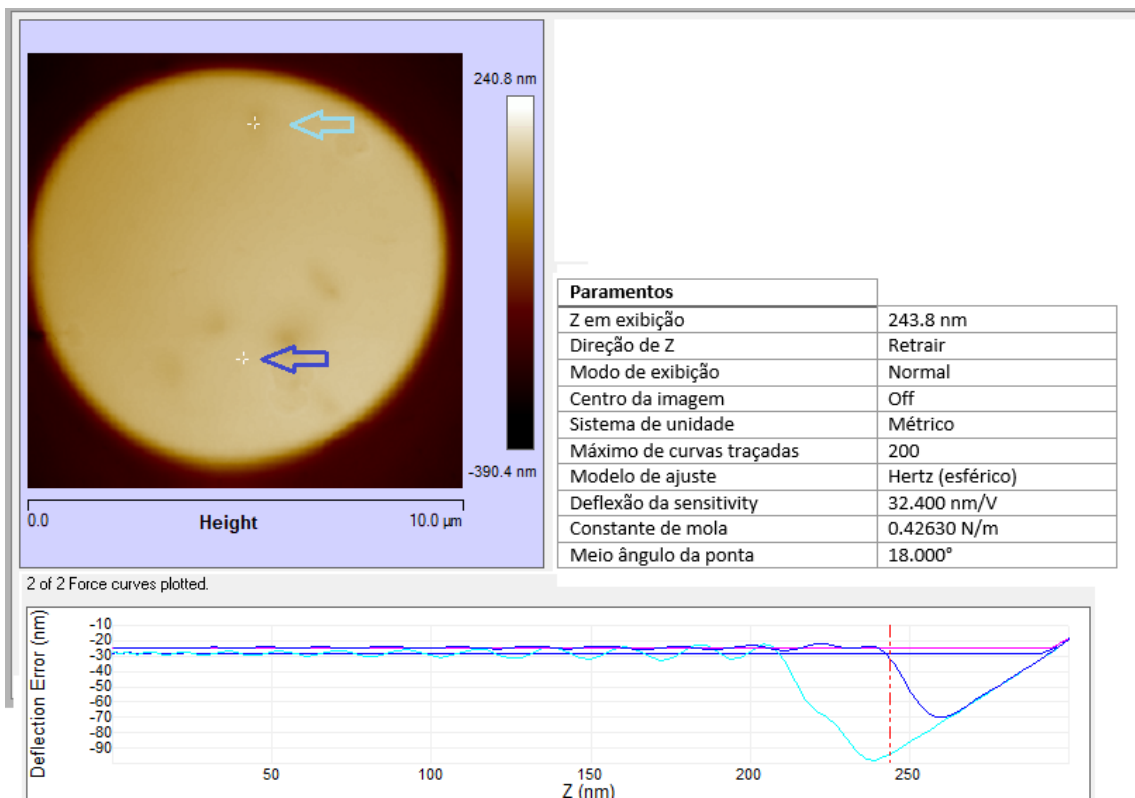


Figura 4.9: Duas curvas de força gerada sobre uma célula com anemia falciforme.

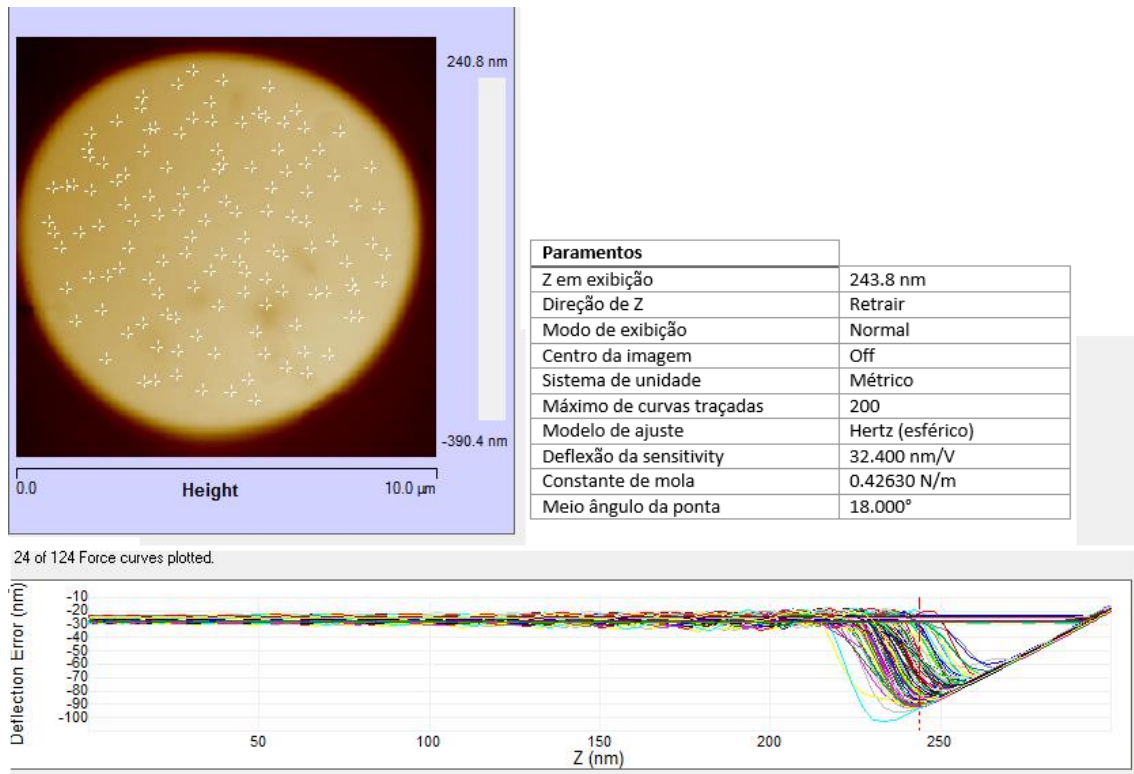


Figura 4.10: Curvas de força gerada sobre uma célula com anemia falciforme.

A adesividade das células maior que o normal deve estar diretamente relacionada com casos de acidente vascular cerebral (AVC), trombose, dentre outras, que são doenças causadas por coágulos no sangue, no qual uma adesividade mais elevada dos eritrócitos deve implicar também em uma maior probabilidade de formação destes coágulos (junção de células). A anemia falciforme Hb SS, Onde temos a adesividade maior que as demais células, representa um risco maior, não somente pela alta adesividade da celular, mas por, em baixa concentração de oxigênio, essas células assumirem formato de foice (4.2) que, além de seu formato se alterar nessa situação, a distribuição de cargas elétricas também muda. Normalmente, os eritrócitos se repelem, pois apresentam cargas elétricas negativas. Devido à mudança de suas cargas elétricas por baixa disponibilidade de oxigênio, os eritrócitos deixam de se repelir e se unem um ao outro (devido à alta adesividade), juntando-se dentro de capilares ou vasos sanguíneos mais facilmente, gerando, assim, os diversos problemas associados a anemia falciforme como a crise de dor (sintoma mais frequente da doença falciforme causado pela obstrução de pequenos vasos sanguíneos pelos eritrócitos muito adesivos e falcizados), ocasionando maior probabilidade de ocorrer trombose ou AVC, dentre outros problemas que devem se relacionar com o aumento da

adesão dos eritrócitos.

4.2 Rugosidade

Após a varredura $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, como citado na metodologia, foi então realizada varredura de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ sobre a superfície da célula (como exemplo, a fig.4.11), a fim de analisarmos a rugosidade da membrana externa das células e compararmos a rugosidade das hemácias com diferentes hemoglobinas como mostrado nas Figuras. fig 4.13, fig 4.14, 4.16 e fig 4.17.

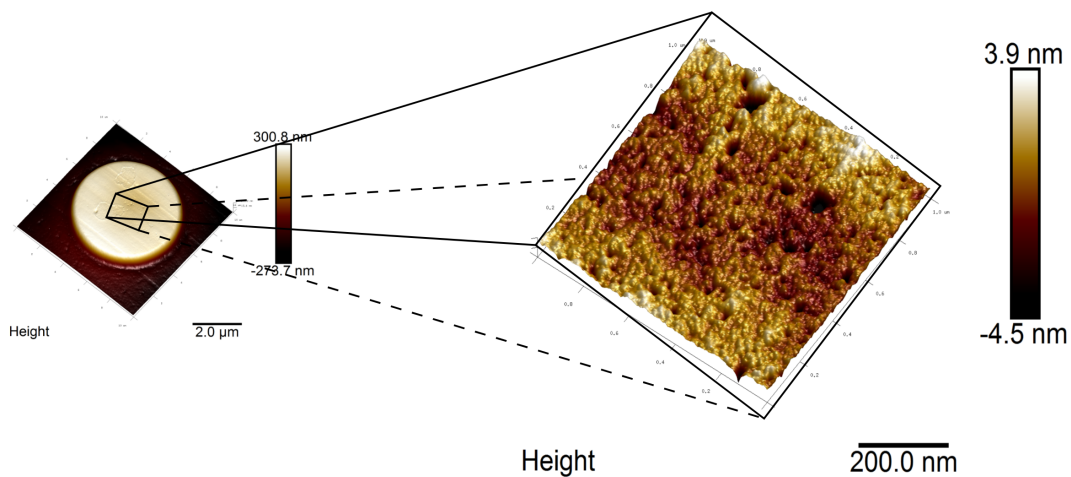


Figura 4.11: Imagem de AFM de $1\ (\mu\text{m})\ \mu\text{m} \times 1\ (\mu\text{m})\ \mu\text{m}$ sobre a superfície de um eritrócito.

Após as varreduras de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ sobre a superfície dos eritrócito, a rugosidade foi analisada com as imagens sem tratamento de imagem ver fig 4.12, com isso obtivemos valores que estão representados nos gráficos das figuras: fig 4.13 e fig 4.14, em seguida analisamos as mesmas imagens, entretanto desta vez aplicamos a ferramenta flatten do software NanoScope Analysis 1.5, essa ferramenta planifica a imagem conforme mostra a figura 4.15, que é a figura 4.12 após aplicarmos a ferramenta flatten.

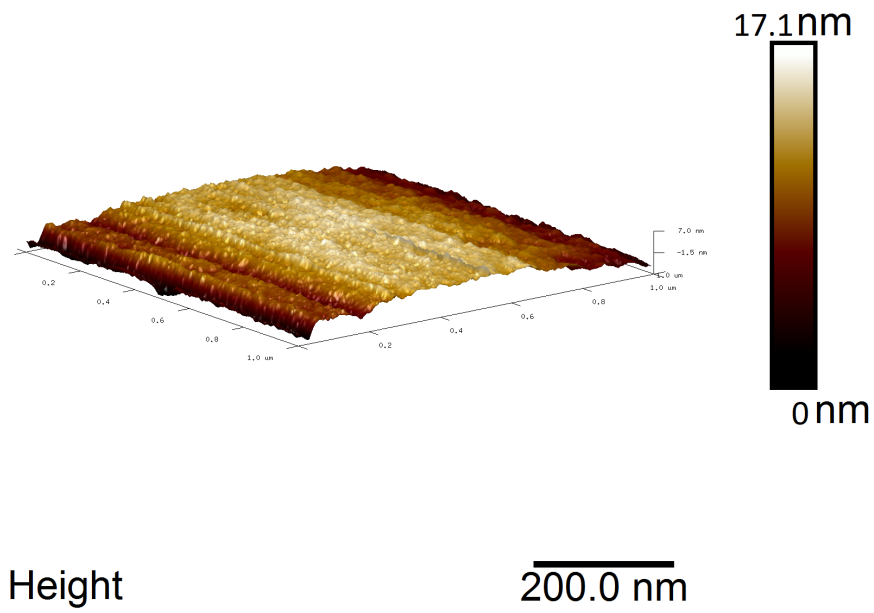


Figura 4.12: Imagem da membrana de um eritrócito sem aplicação da ferramenta Flatten.

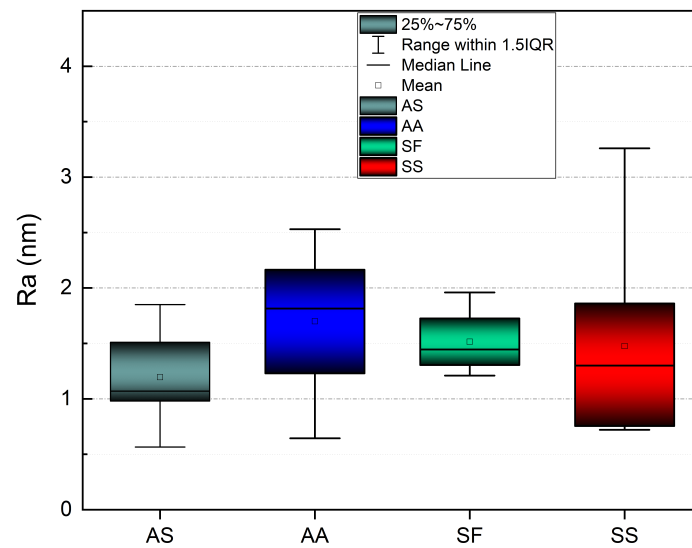


Figura 4.13: Rugosidade média das células com hemoglobinas, AA, AS, SF e SS.

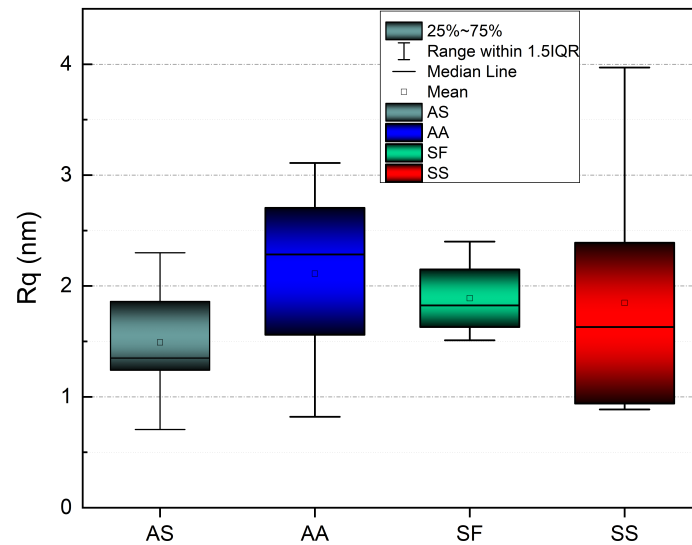


Figura 4.14: Rugosidade média quadrática das células com hemoglobinas, AA, AS, SF e SS.

Os gráficos das figuras 4.13 e 4.14, mostram que os valores médios de R_a e R_q dos tipos AA, AS, SF e SS são próximos, mas tendo nas amostras AS, SF e SS valores médios um pouco abaixo do valor médio das amostras controle, mostrando que a média dos valores de rugosidade (R_a e R_q) das células de doadores não portadores de anemia é mais elevada que a das células que têm hemoglobinas variantes, seguindo características observadas em outros trabalhos que estudaram anomalias em hemácias (YEOW; TABOR; GARNIER, 2017). A rugosidade da superfície da membrana tem se mostrado um importante parâmetro morfológico das hemácias, observando que a integridade do citoesqueleto da membrana celular, medida como rugosidade da superfície, é associada ao estado funcional da célula, tendo em células de amostras patológicas diminuição da rugosidade da membrana.

Ressaltamos que as células foram analisadas sobre esfregaço, onde elas se encontram desidratadas tendo seu volume real diminuído e conseqüentemente reduzindo o perfil de rugosidade, talvez por este motivo não apresentaram grandes diferenças na rugosidade média relacionadas as amostras tipo AA, AS, SF e SS, ficando como perspectivas futuras a análise da rugosidade destas amostras em meio líquido.

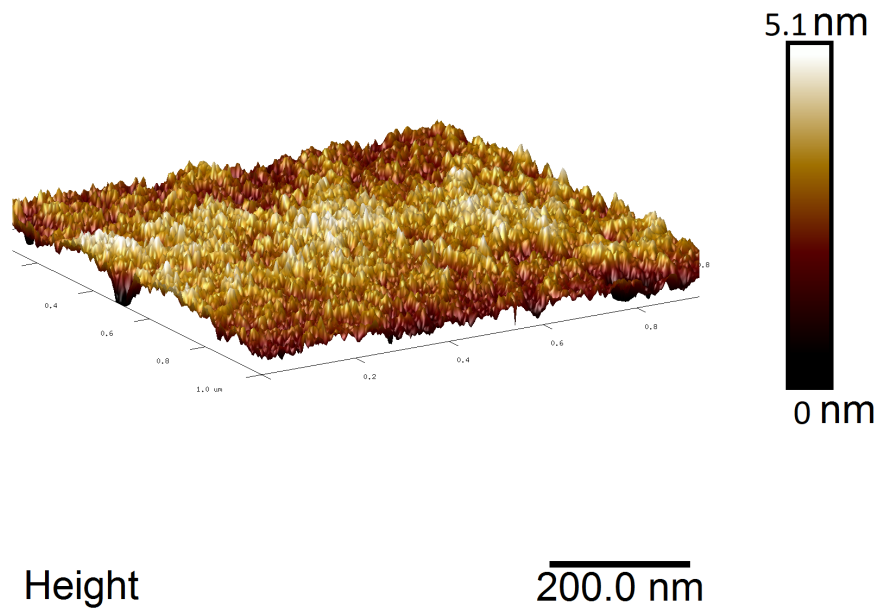


Figura 4.15: Imagem da membrana de um eritrócito após a aplicação da ferramenta de tratamento de imagem Flatten. É possível observar que a superfície analisada foi planificada.

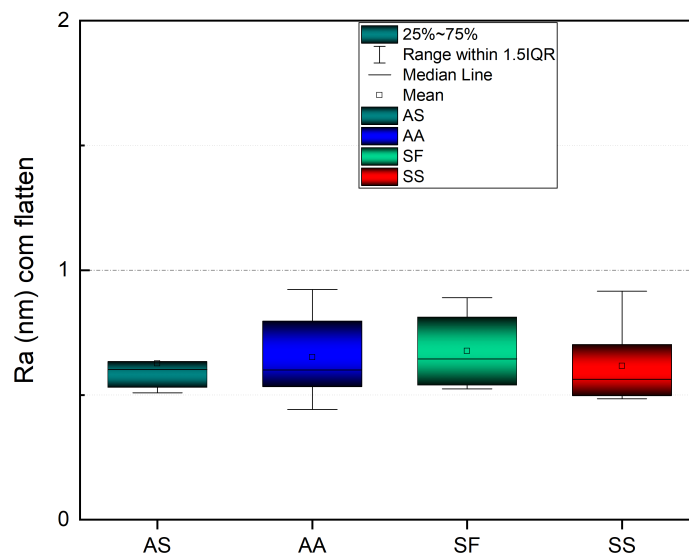


Figura 4.16: Rugosidade media das células com hemoglobina AA, AS, SF e SS, após tratamentos de edição de imagens.

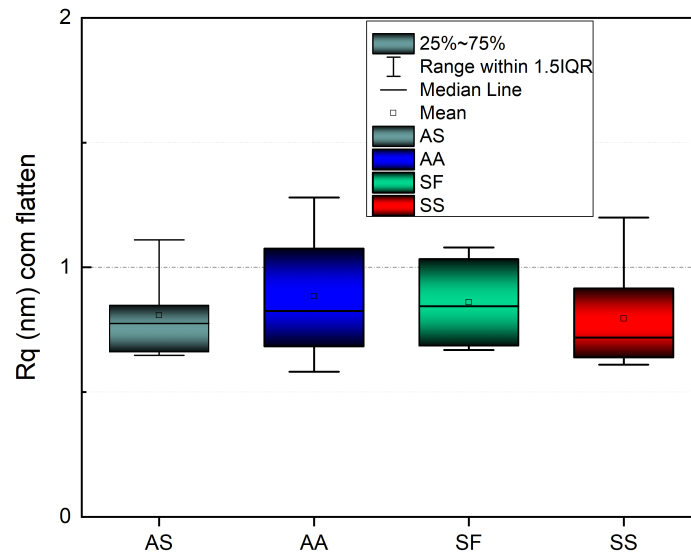


Figura 4.17: Rugosidade média quadrática das células com hemoglobina AA, AS, SF e SS, após tratamentos de edição de imagens.

Com os gráficos das rugosidade (fig 4.16 e fig 4.17) Ra e Rq após tratamentos de edição de imagens realizados no NanoScope Analysis1.5, podemos notar que a edição de imagem interfere nas variações da rugosidade da membrana dos eritrócitos, tendo em vista que a ferramenta flatten corrige as inclinações da imagem.

4.3 Volume dos eritrócitos

O volume do eritrócito foi calculado a partir da imagem de AFM, considerando o eritrócito como um grão. Grão neste contexto é um conjunto de pixels concentrado em uma determinada região acima de um certo valor de altura (valor em Z), lembrando que as imagens obtidas neste estudo são 256×256 , resultando em 65.536 pixels, ou seja, para uma imagem tridimensional de AFM, podemos considerar 1 pixel como um elemento infinitesimal de volume, somando todos estes elementos infinitesimais de volume que compõem o grão(eritrócito) temos o volume do eritrócito com um boa precisão. Sabendo-se disso, calculamos o volume do eritrócito multiplicando a altura média dos pixels que formam o eritrócito pela área ocupada por esses pixels nessa região.

Com o objetivo de definir o eritrócito das imagens de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ como 1 grão,

fixamos a base zero no menor valor de altura da imagem de AFM, após isso definimos que o grão deveria ter altura mínima de 300 nanômetros, selecionando assim o eritrócito como o único grão da imagem, com isso obtivemos valores médios de altura fig 4.18, valores de área fig 2.18 e valores de volume fig4.20.

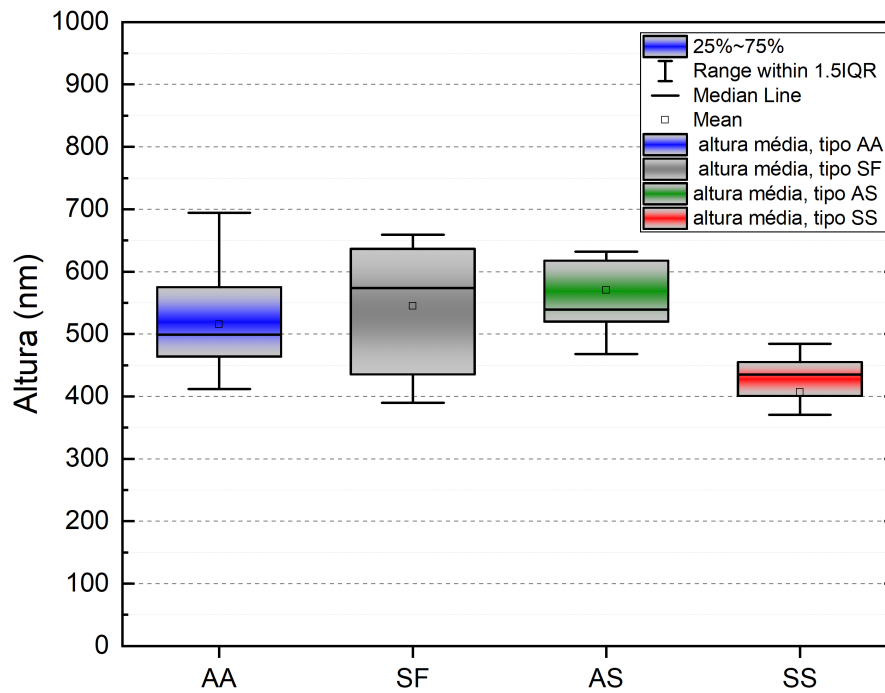


Figura 4.18: Altura dos eritrócitos com hemoglobina AA, AS, SF e SS.

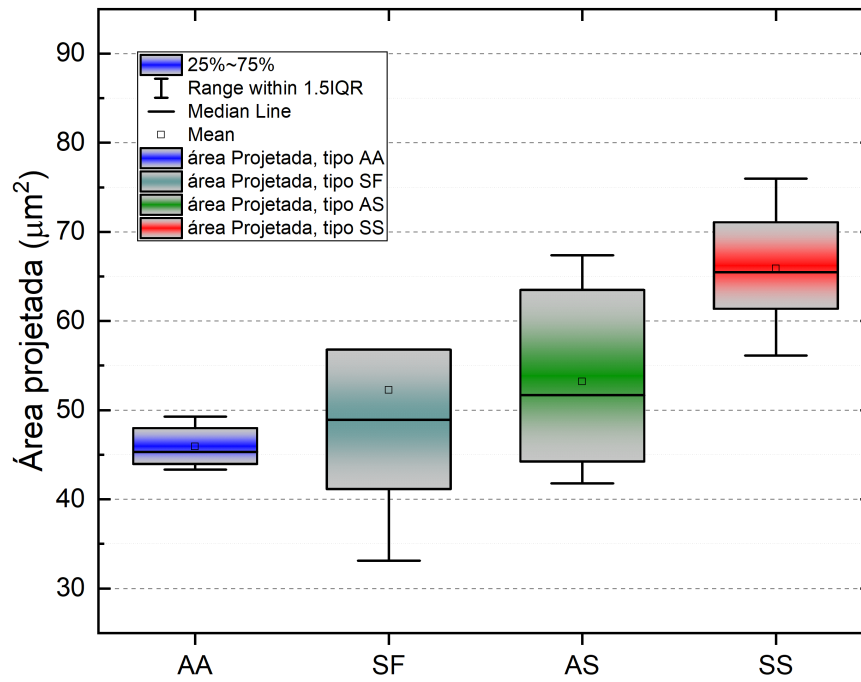


Figura 4.19: Área dos eritrócitos com hemoglobina AA, AS, SF e SS.

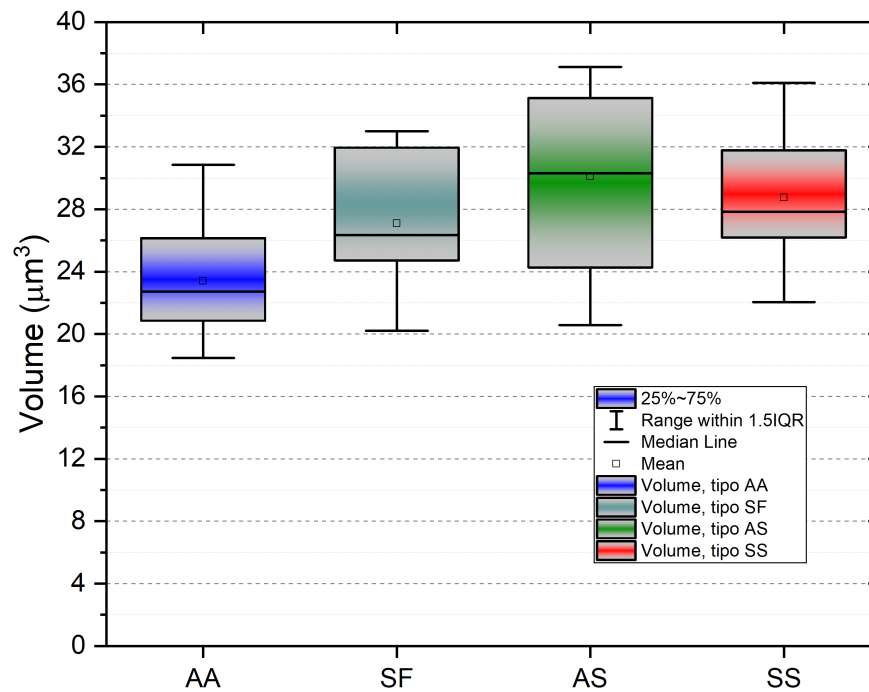


Figura 4.20: Volume dos eritrócitos com hemoglobina AA, AS, SF e SS.

Como conhecido, as células com hemoglobina S são mais rígidas que as células normais, por isso os portadores eritrócitos com hemoglobina S são imunes à malária, pois o protozoário não consegue penetrar neles, provavelmente essa rigidez também impede que os eritrócitos em esfregaço percam líquido tanto quanto os normais, resultando assim em eritrócitos sobre esfregaço de volume maior que os normais, volume maior dos eritrócitos com hemoglobinopatias poder ser um mecanismo que ajuda as células a transportar mais oxigênio.

Capítulo 5

Considerações finais e Perspectivas

Tendo em vista o grande número de questões ainda não respondidas relacionadas às doenças falciformes, cujas técnicas de AFM e afins podem colaborar de forma significativa, é necessário realizar um estudo mais focado. Seguem abaixo algumas propostas.

- Fazer o mesmo estudo feito neste trabalho com as células em meio líquido e observar se as características de adesão e rugosidade observadas neste trabalho permanecem as mesmas, (por ser em meio líquido espera-se que a adesão seja maior, e por as células estarem infladas por estarem no meio líquido é esperado que os picos e vale do perfil de rugosidade estejam mais claros quando comparados com as medidas feitas em esfregaço, obtendo assim valores mais elevados de rugosidade).
- Para grupo de hemoglobinopatias analisados, fazer a análise de adesão e rugosidade das demais células do sangue e analisar se as demais células também apresentam padrões relacionados a mutações genéticas no gene da hemoglobina (trabalho na literatura feito por outras técnicas indicam que há mudança na adesão)
- Fazer a análise via EFM para os mesmos grupos de eritrócitos analisados neste trabalho, espera-se observar via EFM diferenças elétricas para cada grupo de eritrócitos, pois a mutação na hemoglobina altera 1 aminoácido na cadeia β da hemoglobina, resultando em uma mudança na distribuição de carga elétrica dos eritrócitos.

Conclusão

Uma das contribuições deste trabalho foi a análise comparativa da adesão dos eritrócitos com diferentes combinações de hemoglobina envolvendo HB S, apesar de já haver trabalhos na literatura relacionando adesão dos eritrócitos com hemoglobinopatia tipo HB SS e tipo padrão (HB A), este foi o primeiro trabalho a relacionar os genótipos (HB SS, HB SF, HB AS e HB A), sendo possível observar diferentes padrões para cada genótipo da hemoglobina.

A análise da adesão foi precisa devido ao fato da pré calibração da sensyvetete, garantindo que os valores da adesão sejam quantitativos, refletindo o valor real, com os dados de adesão obtidos pelo AFM foi possível analisar a adesão em cada ponto da imagem (resolução 256x256, 65.536 valores de adesão por imagem), assim como gerar mapas de adesão para cada medida feita, obtivemos os arquivos (ASCI) e usamos o software origin para gerar gráficos chat box relacionando as diferentes mutações da hemoglobina.

A Microscopia de Força atômica mostrou-se uma ferramenta de grande utilidade na análise dos biosistemas em foco. Dois foram os parâmetros investigados com esta técnica: adesão e rugosidade. A análise da adesão, medida por AFM, de células normais e com variações na hemoglobina (HB SS, HB SF e HB AS) revelou expressivas diferenças entre os grupos estudados, ainda que as imagens topográficas das células apresentassem aspecto padrão. O parâmetro de rugosidade da membrana, coletada sobre as mesmas células que serviram de amostra para a adesão, indicou distinta identidade entre as células normais e as de portadores de doença falciforme (HB SS, HB SF, HB AS e HB A). Indicando que a rugosidade da membrana também pode ser parâmetro da patologia. Tais diferenças, de adesão e rugosidade, podem estar associadas a diversas características relacionadas a alterações causadas pelas hemoglobinopatias. O entendimento do papel destas características pode levar a novas formas de tratamentos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. Cells and Tissues of the Immune System. in: Cellular and molecular immunology. ed. saunders, v. 5th, p. 16 – 39, 2003.

HOFFBRAND, A.; MOSS, P. Eritropoese e aspectos gerais da anemia. *Fundamentos em Hematologia. 6a Edição. Artmed*, p. 15–32, 2013.

SANTOS, J. L. d.; CHIN, C. M. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. *Química Nova*, v. 35, n. 4, p. 783–790, 2012.

DARAFSHEH, A. *Optical super-resolution and periodical focusing effects by dielectric microspheres*. Tese (Doutorado) — The University of North Carolina at Charlotte, 2013.

ZANETTE, S. Funcionamento de um microscópio de força atômica. *Notas do curso ministrado no CBPF*, 1997.

Bruker Corporation. *Piezoelectric Scanners*. 2019. Disponível em: ([http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/fast-scan/bruker-help/DIcon_webhelp.htm#SPM%\\$%\\$20Training%\\$%\\$20Guide/Piezoelectric%\\$%\\$20Scanners/Piezoelectric%\\$%\\$20Scanners.htm0](http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/fast-scan/bruker-help/DIcon_webhelp.htm#SPM%$%$20Training%$%$20Guide/Piezoelectric%$%$20Scanners/Piezoelectric%$%$20Scanners.htm0)). Acesso em: 25 de junho de 2019.

CASCUDO, O. et al. Contribuição à caracterização nanoestrutural de pastas de cimento por meio da técnica de microscopia de força atômica. *Matéria (Rio de Janeiro)*, scielo, v. 23, 2018. ISSN 1517-7076.

CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface science reports*, Elsevier, v. 34, n. 1-3, p. 1–104, 1999.

MULTIMODE V8-SPM intruction Manual RevB. [S.l.]: Bruker, 2011. 1–438 p.

HAMMES, J. M.; ROSA, A. F. P.; WALKER, E. Otimização do acabamento superficial no torneamento cilíndrico externo de um aço sae 1045. *Revista GEPROS*, v. 12, n. 2, p. 138, 2017.

BHUSHAN, B. Surface roughness analysis and measurement techniques. CRC press, p. 79–150, 2000.

LEEDEN, M. C. van der; FRENS, G. Surface properties of plastic materials in relation to their adhering performance. *Advanced engineering materials*, Wiley Online Library, v. 4, n. 5, p. 280–289, 2002.

BALDAN, A. Adhesion phenomena in bonded joints. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, Elsevier, v. 38, p. 95–116, 2012.

- DIMITRIADIS, E. K. et al. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 82, n. 5, p. 2798–2810, 2002.
- GRIERSON, D.; FLATER, E.; CARPICK, R. Accounting for the jkr–dmt transition in adhesion and friction measurements with atomic force microscopy. *Journal of adhesion science and technology*, Taylor & Francis, v. 19, n. 3-5, p. 291–311, 2005.
- kASVI. *Hematologia: Como é realizada a técnica de esfregaço de sangue?* 2019. Disponível em: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>. Acesso em: 15 de novembro de 2019.
- SIMÕES, B. P. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter*, SciELO Brasil, v. 32, n. Supl 1, p. 46–53, 2010.
- WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 9, 2012. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/9/a011692.abstract>.
- NUZZO, D. V. P. D.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. *Journal de Pediatria*, scielo, v. 80, p. 347 – 354, 00 2004. ISSN 0021-7557.
- HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Archives of Internal Medicine*, American Medical Association, v. 6, n. 5, p. 517–521, 1910.
- NETO, G. C. d. G.; PITOMBEIRA, M. d. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, scielo, v. 39, p. 51 – 56, 2003.
- ZAGO, M. A. et al. *Tratado de Hematologia*. Athenes, v. 1, p. 01 – 925, 1 2013.
- FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, scielo, v. 32, p. 203 – 208, 2010.
- SILVA, L. P. A. d.; NOVA, C. V.; LUCENA, R. Anemia falciforme e surdez infanto-juvenil: revisão da literatura. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, scielo, v. 78, p. 126 – 131, 02 2012.
- ARAÚJO, J. A. de Jesus. Paulo Ivo Cortez de. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento / Sickle cell disease: basic management for treatment. Série B. Textos Básicos de Saúde, v. 1, p. 01 – 64, 1 2012.
- MURAO, M.; FERRAZ, M. H. C. Traço falciforme - heterozigose para hemoglobina S . *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, scielo, v. 29, p. 223 – 225, 09 2007.
- KARK, J. A. et al. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. *New England Journal of Medicine*, v. 317, n. 13, p. 781–787, 1987.
- O. MCCONNAUGHEY W. B., E. E. L. P. N. Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin b. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 79, p. 5327–5331, 1982.

- I. MCCONNAUGHEY W. B., E. E. L. Z. G. Determination of cellular mechanical properties by cell poking, with an application to leukocytes. *J Biomech Eng.*, v. 112, p. 283–294, 1990.
- YOUNG, E. E. A. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophys J.*, v. 56, p. 139–149, 1989.
- Y., H. R. M. S. J. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. *Biophysical Journal.*, v. 71, p. 2892–2901, 1996.
- ZILKER H. ENGELHARDT, E. S. A. Dynamic reflection interference contract (ric) microscopy: a new method to study surface excitations of cells and to measure membrane bending elastic moduli. *Journal de Physique*, v. 48, p. 2139–2139, 1987.
- K. ENGELHARD H., S. E. Z. Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membrane: effect of cell shape and membrane organization. *Eur Biophys J.*, v. 18, p. 203–219, 1990.
- H. HILLMANN K., L. J. B.-H. J. L. Acoustic microscopy of cul- tured cells: distribution of forces and cytoskeletal elements. *Cell Biophys.*, v. 18, p. 279–293, 1991.
- ASHKIN, J. M. D. A. Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 86, p. 7914–7918, 1989.
- K. SCHMIDT C. F., B. D.-B. S. M. S. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys J.*, v. 63, p. 784–793, 1992.
- M. FONTES A., B.-C. M. L. B. L. C. C. F. F. C. C. L. S. S. T. B. M. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to study of drug response in sickle cell disease. *Eur J Haematol.*, v. 70, p. 207–211, 2003.
- U. MONKEN C. H., R. C. G. R. T. M. O. N. A. Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy. *Physical Review E.*, v. 67, 2003.
- J. AGERO U., G. R. T. M. O. N. C. N. Measuring optical and mechanical properties of a living cell with defocusing microscopy. *Biophysical Journal.*, v. 91, p. 1108–1115, 2006.
- G. STARODUBTSEVA M. N., Y. N. I. C. S. A. Z. R. I. K. T. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, v. 38, p. 824–833, 2007.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. *Physical review letters*, APS, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.
- BINNIG, G. et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters*, APS, v. 49, n. 1, p. 57, 1982.
- BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence. *reviews of modern physics*, APS, v. 59, n. 3, p. 615, 1986.
- PAROT, P. et al. Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *Journal of molecular recognition : JMR*, v. 20, n. 6, p. 418–431, 2007.

HENDERSON, E. Imaging of living cells by atomic force microscopy. *Progress in Surface Science*, v. 46, n. 1, p. 39 – 60, 1994.

HANSMA, H.; HOH, J. Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, v. 23, p. 115—139, 1994.

CHANG, K.-C. et al. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, v. 24, n. 4, p. 162 – 169, 2012.

YEOW, N.; TABOR, R. F.; GARNIER, G. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 249, p. 149 – 162, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868617300763>.

DOBBE, J. et al. Analyzing red blood cell-deformability distributions. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Elsevier, v. 28, n. 3, p. 373–384, 2002.

KLINKEN, S. P. Red blood cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, Elsevier, v. 34, n. 12, p. 1513–1518, 2002.

J, P.; MURATA-HORI, M.; LODISH, H. F. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends in Cell Biology*, v. 21, 07 2005.

BENTO, R.; DAMASCENO, L.; NETO, F. Radler de A. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. *Rev Bras Med Esporte*, v. 9, p. 169–180, 01 2003.

PEREIRA, F.; SARGENTO, L. Hemoglobinas normais e anormais—drepanocitose. *Actas de Bioquímica*, v. 8, p. 125–131, 2007.

MEDEIROS, T. M. D. Níveis de hemoglobinas a₂ e f em indivíduos normais, portadores dos genótipos as, ss, s/beta-talassemia e estigma beta talassemico. *Rev. bras. anal. clin.*, v. 24, n. 3, p. 65–7, 1992.

SANKARAN, V. G. et al. Modifier genes in mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1214, n. 1, p. 47–56, 2010. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2010.05821.x>.

SONATI, M. de F.; COSTA, F. F. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *Jornal de Pediatria*, Sociedade Brasileira de Pediatria, v. 84, n. 4, p. S40–S51, 2008.

THOM, C. S. et al. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, n. 3, p. a011858, 2013.

SILVA, M. R. et al. Alpha chain hemoglobins with electrophoretic mobility similar to that of hemoglobin S in a newborn screening program. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, scielo, v. 35, p. 109 – 114, 00 2013.

ANVISA. *Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes*. [S.l.]: Ministério da Saúde Brasília, 2002.

- MANFREDINI, V. et al. A fisiopatologia da anemia falciforme. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, v. 19, n. 1/2, p. 3–6, 2013.
- ALLADAGBIN, D. J. et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in salvador, brazil. *PloS one*, Public Library of Science, v. 13, n. 12, p. e0209036, 2018.
- NAIK, R. P. et al. Clinical outcomes associated with sickle cell trait: a systematic review. *Annals of internal medicine*, Am Coll Physicians, v. 169, n. 9, p. 619–627, 2018.
- WILSON, L. et al. *Atomic force microscopy in cell biology*. [S.l.]: Academic Press, 2002.
- PADILHA, A. F. Microestrutura e propriedades. *São Paulo: Hemus*, 1997.
- KÖHLER, H. On abbe's theory of image formation in the microscope. *Optica Acta: International Journal of Optics*, Taylor & Francis, v. 28, n. 12, p. 1691–1701, 1981.
- FEYNMAN, R. P. Há mais espaços lá embaixo. *Parcerias Estratégicas*, v. 9, n. 18, p. 137–156, 2012.
- MÜLLER, D. J.; DUFRENE, Y. F. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. In: *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*. [S.l.]: World Scientific, 2010. p. 269–277.
- RUGAR, D.; HANSMA, P. Atomic force microscopy. *Physics today*, American Institute of Physics, v. 43, n. 10, p. 23–30, 1990.
- OTHMAN, Y. et al. Artificial neural network based hysteresis compensation for piezoelectric tube scanner in atomic force microscopy. p. 1–5, 2012.
- FREY, M. T. et al. Microscopic methods for measuring the elasticity of gel substrates for cell culture: microspheres, microindenters, and atomic force microscopy. *Methods in cell biology*, Elsevier, v. 83, p. 47–65, 2007.
- WANG, Y.-l.; DISCHER, D. E. *Cell mechanics*. [S.l.]: Academic press, 2007.
- FILHO, E. P. e Glenda Ramos e Henrique da F. O microscópio de força atômica (afm): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 3, n. 2, 2015.
- PEREIRA, A. H. A. Cerâmicas piezoelétricas: funcionamento e propriedades. *São Carlos: ATCP Engenharia Física*, 2010.
- FUKUI, M. et al. *Técnicas de microscopia de tunelamento de elétrons (MTE) e microscopia de força atômica (MFA) aplicadas ao estudo de superfícies de grafite e diamante*. Tese (Doutorado) — Universidade estadual de campinas, 1992.
- SILVA, G. R. d. *Microscopia de força atômica na análise de rugosidade e da dimensão fractal de membranas celulares*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Alagoas, 2016.
- ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and surface forces*. [S.l.]: Academic press, 2015.
- LEITE, F. d. L. *Caracterização de forças de adesão em materiais utilizando a microscopia de força atômica*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2002.

- PIZA, A. F. R. D. T. Mecânica quântica vol. 51. Edusp, 2003.
- SILVA, A. C. N. d. et al. Estudo de superfícies inteligentes para desenvolvimento de nanobiossensores. Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- CAPPELLA, B. et al. Force-distance curves by afm. *IEEE engineering in medicine and biology magazine*, IEEE, v. 16, n. 2, p. 58–65, 1997.
- MARTIN, Y.; WILLIAMS, C. C.; WICKRAMASINGHE, H. K. Atomic force microscope–force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *Journal of Applied physics*, AIP, v. 61, n. 10, p. 4723–4729, 1987.
- FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. *Química Nova*, SciELO Brasil, p. 137–142, 2006.
- SILVA, A. A. d. *Efeitos topográficos em espectros RBS*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2004.
- GADELMAWLA, E. et al. Roughness parameters. *Journal of materials processing Technology*, Elsevier, v. 123, n. 1, p. 133–145, 2002.
- COSTA, E. F. da. *Estudo das propriedades mecânicas de ligantes asfálticos por Microscopia de Força Atômica*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Ceará, 2011.
- QIN, R.-Y.; SCHREIBER, H. Adhesion at partially restructured polymer surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 156, n. 1-3, p. 85–93, 1999.
- MCBAIN, J.; HOPKINS, D. On adhesives and adhesive action. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 29, n. 2, p. 188–204, 1925.
- KINLOCH, A. The science of adhesion. *Journal of materials science*, Springer, v. 15, n. 9, p. 2141–2166, 1980.
- BORROFF, E.; WAKE, W. Adhesion of rubber and textiles. ii. factors influencing the load required to strip rubber from fabric and foil surfaces. *Rubber Chemistry and Technology*, v. 23, n. 2, p. 482–490, 1950.
- SHARPE, L. H.; SCHONHORN, H. Surface energetics, adhesion, and adhesive joints. *Contact angle, wettability, and adhesion*, v. 43, p. 189–201, 1964.
- JIALANELLA, G. Advances in bonding plastics. Elsevier, p. 237–264, 2010.
- VOYUTSKII, S. Autohesion and adhesion of high polymers. *Interscience*, NY, 1963.
- YANG, S.; GU, L.; GIBSON, R. F. Nondestructive detection of weak joints in adhesively bonded composite structures. *Composite structures*, Elsevier, v. 51, n. 1, p. 63–71, 2001.
- DERYAGIN, B. Problems of adhesion. *Research (London)*, v. 8, p. 70–74, 1955.
- LEITE, F.; HERRMANN, P. Application of atomic force spectroscopy (afs) to studies of adhesion phenomena: a review. *Journal of adhesion science and technology*, Taylor & Francis, v. 19, n. 3-5, p. 365–405, 2005.

HERTZ, H. On the contact of elastic solids. *Z. Reine Angew. Mathematik*, v. 92, p. 156–171, 1881.

DRELICH, J.; MITTAL, K. L. *Atomic force microscopy in adhesion studies*. [S.l.]: CRC Press, 2005.

MUSSER, A. Friction on the nanoscale and the breakdown of continuum mechanics. *Continuum*, p. 1–25, 2009.

JOHNSON, K. L.; KENDALL, K.; ROBERTS, A. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the royal society of London. A. mathematical and physical sciences*, The Royal Society London, v. 324, n. 1558, p. 301–313, 1971.

DERJAGUIN, B. V.; MULLER, V. M.; TOPOROV, Y. P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, Elsevier, v. 53, n. 2, p. 314–326, 1975.

Apêndice A

ANEXO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Viscoelasticidade de Células do Tecido Sanguíneo por Microscopia de Força Atômica

Pesquisador: LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89646518.5.0000.5087

Instituição Proponente: Universidade Federal do Maranhão

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.683.032

Apresentação do Projeto:

As propriedades mecânicas de células vivas são de grande importância para um bom funcionamento fisiológico dos sistemas biológicos em geral, porém o conhecimento acerca das mesmas ainda é considerado limitado. Como a estrutura das células determina, muitas vezes, as suas funções, estas também podem estar associadas à mecânica celular. Assim, qualquer tipo de anormalidade em processos fisiológicos, ocasionada por uma patologia pode vir a ser relacionada com alguma alteração nas propriedades mecânicas da célula. Através da utilização de várias técnicas, em especial da Microscopia de Força Atômica, torna-se possível obter mais informações a respeito dessas propriedades e investigar os distúrbios causados por processos patológicos na micromecânica celular. Comparadas a outras células, as hemácias ou eritrócitos apresentam uma simplicidade estrutural que torna menos complexo o estudo de suas propriedades mecânicas. Além disso, a micromecânica desta célula está altamente associada a doenças como as anemias hemolíticas. Nesse projeto, propomos o uso da Microscopia de Força Atômica para a investigação das propriedades mecânicas de eritrócitos de pacientes portadores das anemias falciforme, esferocitose hereditária e da eliptocitose hereditária. Visa-se propor um parâmetro físico que, ao mesmo tempo, possa ser utilizado para a investigação laboratorial de anormalidades estruturais de eritrócitos em portadores dessas anemias hemolíticas e que possa ser utilizado para a avaliação da evolução de estados anêmicos.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 2.683.032

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Propor um parâmetro físico que possa ser utilizado para a investigação de anormalidades estruturais de eritrócitos em portadores de Anemia Falciforme e para a avaliação da evolução de seus estados anêmicos. Tal investigação será realizada, majoritariamente, utilizando a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), por meio da exploração de propriedades físicas das células, como a elasticidade e a viscoelasticidade, com a finalidade de caracterizar estrutural e mecanicamente eritrócitos de doadores sadios e portadores de Anemia Falciforme.

Objetivo Secundário:

- 1 - Caracterizar topograficamente os eritrócitos de doadores sadios e portadores de Anemia Falciforme;
- 2 - Obter um conjunto de curvas de força sobre os eritrócitos afim de construir mapas de elasticidade das células controle (doadores) e daquelas de portadores de Anemia Falciforme;
- 3 Variar a frequência do processo de indentação e a força aplicada afim de obter informações viscoelásticas das células;
- 4 - Realizar experimentos de indentação com a utilização de beads fixadas às pontas de AFM para sondar as propriedades mecânicas coletivas das RBCs;
- 5 - Utilizar as curvas de força obtidas para fomentar modelos mecânicos hertzianos, de onde se pode estimar parâmetros elásticos;
- 6 - Correlacionar os dados de propriedades mecânicas dos eritrócitos obtidos por AFM com aqueles originados de análises complementares tais como de reologia, eletroforese, Raman e MEV;
- 7 - Desenvolver uma linha de pesquisa na área de Biofísica no Departamento de Física da UFMA;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto de pesquisa não oferece riscos para os indivíduos estudados pois a amostra de sangue que será analisada será proveniente de doadores do HEMOMAR (grupo controle), cuja sorologia se encontra apta para este grupo, sendo utilizado o sangue descartado no "macarrão", não necessitando nenhuma coleta adicional de sangue, e amostras de pacientes portadores de anemias hemolíticas (grupo de estudo) também identificados por meio de sorologia no HEMOMAR.

Benefícios:

O estudo da caracterização estrutural e mecânica de alta resolução via AFM de células do tecido sanguíneo podem trazer à luz mecanismos da patologia que, combinados com ensaios clínicos, podem proporcionar um parâmetro físico que, ao mesmo tempo, possa ser utilizado para a

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 2.683.032

investigação laboratorial de anormalidades estruturais de eritrócitos em portadores dessas anemias hemolíticas e que possa ser utilizado para a avaliação da evolução de estados anêmicos e proposição de novas terapias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta todos os elementos necessários ao seu pleno desenvolvimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórios foram entregues e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Não existem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1130146.pdf	07/05/2018 19:44:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SES.pdf	07/05/2018 17:39:21	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_luciana.PDF	07/05/2018 17:37:17	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infra_Lu.pdf	07/05/2018 14:56:39	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_HEMOMAR_luciana.pdf	07/05/2018 14:50:17	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	HEMOMAR.pdf	07/05/2018 14:47:10	LUCIANA MAGALHAES REBELO ALENCAR	Aceito

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 2.683.032

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 29 de Maio de 2018

Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br