



UFAL

INSTITUTO DE FÍSICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

MICROSCOPIAS DE VARREDURA POR SONDAS APLICADAS A ESTUDOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS, VÍTREAS E CERÂMICAS

por

Samuel Teixeira de Souza

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57.072-970 – Maceió – AL.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

SAMUEL TEIXEIRA DE SOUZA

**MICROSCOPIAS DE VARREDURA POR SONDAS APLICADAS AO ESTUDO
DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS, VÍTREAS E CERÂMICAS**

Maceió
2014

SAMUEL TEIXEIRA DE SOUZA

**Microscopias de Varredura por Sondas Aplicadas ao Estudo de Amostras
Biológicas, Vítreas e Cerâmicas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

Maceió
2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S729c Souza, Samuel Teixeira de.
Microscopias de varredura por sondas aplicadas ao estudo de amostras biológicas, vítreas e cerâmicas / Samuel Teixeira de Souza. – Maceió, 2014.
131f. : il.

Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.
Tese (doutorado em Física) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 100-112.
Anexos: f. 113-131.

1. Microscopia de força atômica. 2. Microscopia ótica de campo próximo.
3. C-AFM. 4. Módulo elástico. 5. Nanoindentação. 6. Interação luz-matéria.
7. Expansão fototérmica. I. Título.

CDU: 537.533.35

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
TESE DE DOUTORADO**

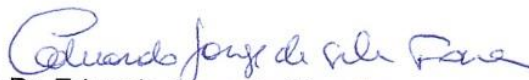
“Microscopias de Varredura por Sonda Aplicadas ao Estudo
de Amostras Biológicas, Vítreas e Cerâmicas”

por

Samuel Teixeira de Souza

A Banca Examinadora composta pelos professores Eduardo Jorge da Silva Fonseca (orientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Luis Carlos Malacarne, do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, Marcio Andre Rodrigues Cavalcanti de Alencar, do Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe, Emiliano de Oliveira Barreto, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, Fabiane Caxico de Abreu Galdino, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas consideram o candidato **aprovado** com grau “A”.

Maceió, 7 de novembro de 2014



Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca



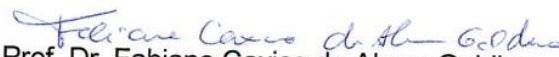
Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne



Prof. Dr. Marcio Andre Rodrigues Cavalcanti de Alencar



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto



Prof. Dr. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Aos meus pais Genair e Leonora,
esteio da minha existência, e a minha
esposa Geovana, por todo amor,
paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que consegui até hoje em minha vida, e me manter firme na caminhada;

Ao professor Eduardo Jorge da Silva Fonseca, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa sob sua orientação, por sua experiência, suas críticas e sugestões, bem vindas e necessárias, à realização deste doutorado;

À minha amada esposa pelo apoio, e incentivo durante toda esta jornada;

À minha família, pelo amor, compreensão e apoio durante toda vida acadêmica;

Aos professores e colegas do Instituto de Física da UFAL que proveram-me com ensinamentos;

Aos professores Emiliano Barreto, Fabiane Caxico, Ronaldo Santos e Luis Malacarne, pelas colaborações fundamentais para realização desse trabalho;

À CAPES e ao CNPQ pelo suporte financeiro, que tornou possível este trabalho;

À todos que, de forma direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Feliz é o homem que colhe bons frutos do seu trabalho.

Obrigado Senhor

RESUMO

Neste trabalho, microscópios de varredura multi-sondas foram utilizados para o estudo de propriedades físicas de amostras biológicas, vítreas e cerâmicas. Em especial, usamos três diferentes técnicas de microscopia de varredura por sonda no estudo destas amostras. Primeiramente, um microscópio de força atômica foi usado para avaliar os efeitos na mecânica da membrana de macrófagos, verificando a interferência da adesão celular por uma matriz extracelular. Em seguida, estudamos as mudanças de conformação de moléculas de DNA tratadas com Timol e adsorvidas sobre uma superfície de uma mica modificada por poli-L-lisina. Os resultados destes estudos implicam que as interações célula-MEC mediada pelo citoesqueleto afetam diretamente os eventos biomecânicos das membranas, modificando as propriedades físicas do citoesqueleto celular, e que a modificação da superfície da mica utilizando poli-L-Lisina proporciona uma ligação forte e firme com o DNA. Esta forte fixação do DNA, permitiu o estudo da mudança conformacional do DNA na mica quando interagindo com o timol. O microscópio de força atômica também foi usado para realizar de estudos da expansão térmica em vidros fosfatos comerciais, induzida por um laser. A capacidade desta técnica de detectar deformações superficiais em nano-escala e a boa concordância dos resultados teóricos e experimentais mostra o potencial desta técnica para o estudo da amplitude e dinâmica de efeitos térmicos em materiais sólidos. Num outro estudo, a microscopia força atômica condutora foi usada para a análise de propriedades elétricas de cerâmicas de titanato de bário semicondutor e suas correlações com características topográficas específicas da amostra. Por fim, estudamos interações entre células e nanopartículas de ouro, com o uso da microscopia de varredura em campo próximo, sem a necessidade de marcação fluorescente nas nanopartículas e com alta resolução espacial. Durante a apresentação de cada um destes estudos foi discutido os desafios e parte da instrumentação necessárias para a realização dos mesmos.

Palavras-chave: AFM. SNOM. C-AFM. Módulo elástico. Nanoindentação. Interação luz-matéria. Expansão fototérmica.

ABSTRACT

In this work, scanning multiprobes microscopes were used to study the physical properties of biological, vitreous and ceramics samples. In particular, we have used three different scanning probe microscopy techniques to study the samples. At first, an atomic force microscope was used to evaluate the mechanical properties of macrophages due to cell adhesion to an extracellular matrix and to study the changes in DNA molecules conformation treated with thymol and adsorbed onto a mica surface modified by poly-L-lysine. The results of these studies show that the cytoskeleton-mediated cell-matrix interactions directly affect biomechanical events in cells by modifying physical properties of the cytoskeleton and that the modification of mica surface using poly-L-Lysine provides a strong and firm bond with DNA. This strong fixation of DNA, allows the study of DNA conformational change on mica when interacting with thymol. The atomic force microscope was also used in studies of laser induced thermal expansion in commercial phosphate glasses. The ability of this technique to detect nanoscale surface deformations and the good agreement between theoretical and experimental results show the potential of this technique to study the amplitude and the dynamic of thermal effects in solid materials. In another study, conductive atomic force microscopy was used to analyze electrical properties of barium titanate semiconductor ceramic and their correlation with specific topographic features of the sample. Finally, using the scanning near-field optical microscopy, we studied interactions between cells and gold nanoparticles, without the need of fluorescent labeling on the nanoparticles, with high spatial resolution. During the presentation of these studies the challenges and necessary instrumentation for their realization was discussed.

Keywords: AFM. SNOM. C-AFM. Elastic modulus. Nanoindentation. Light-matter interaction. Photothermal expansion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Um cego é capaz de ler as palavras mesmo sem enxergá-las opticamente; ao invés disso, ele varre as linhas com a ponta do dedo e detecta variações no relevo que codificam (Através do método de Braille) as letras, números e outros símbolos. Abaixo é ilustrado o conceito aplicado no AFM de "sentir" os átomos usando uma ponta afiada atômicamente.	21
Figura 1.2 - Esquema ilustrativo dos sistemas de detecção de AFM, utilizados nesta tese. (a) Sistema de detecção por laser e (b) Sistema de detecção por diapasão de quartzo.	23
Figura 1.3 - Varredura tridimensional (eixos x , y e z) da amostra com a sonda. A imagem topográfica final é depois reconstruída pelas informações das linhas varridas. Cada ponto de medida tem uma posição x , y e z bem definida. As linhas azuis sobrepostas à imagem topográfica de AFM correspondem aos movimentos de ida e são geralmente chamadas de "Traço", enquanto que as linhas vermelhas correspondem aos movimentos de volta e são chamadas de Retraço.	24
Figura 1.4 – Esboço das forças de interação ponta-amostra.....	25
Figura 1.5 – Diagrama que mostra a força de interação entre a ponta e a amostra consoante o modo em que o AFM opera.....	27
Figura 1.6 – Modo de operação contato.....	28
Figura 1.7 – Modo de operação não-contato.	29
Figura 1.8 – Modo de operação contato intermitente.	30
Figura 1.9 – Exemplos de artefatos que podem ser observados nas imagens de AFM com origem na ponta	31
Figura 1.10 - Distorção de uma grelha de quadrados todos da mesma dimensão e igualmente espaçados.	32
Figura 1.11 - Exemplo do efeito drift que pode ocorrer nas imagens obtidas por AFM.	33
Figura 2.1 – Esquema da medida de C-AFM da corrente através de eletrodos de ouro.....	36
Figura 2.2 – Imagem (a) topográfica e de (b) da corrente elétrica nos eletrodos de ouro. (c) Imagem da corrente elétrica sobreposta a imagem topográfica. (d) Perfil topográfico (linha preta) e de corrente elétrica (linha vermelha), correspondente às traços em verdes nas imagens de topografia e elétricas.	37
Figura 2.3 – Imagem da (a) topografia e da (b) corrente elétrica de grãos cerâmicos de BTL:Mn. (c) Mapa da corrente elétrica sobreposto à imagem topográfica. (d) Perfil topográfico (linha preta) e da corrente elétrica (linha vermelha), tomados na região correspondente aos traços em verdes nas imagens de topografia e elétricas.....	40
Figura 2.4 – Esquema da iluminação em campo próximo proposto por Synge. Uma abertura de diâmetro $a \ll \lambda$ é feita numa placa plana. O campo evanescente através abertura decai rapidamente, iluminando apenas até um comprimento d_1 , o campo próximo. A luz de campo distante também está presente para uma distância d_2	42

Figura 2.5 – Comparação de imageamento de uma amostra em campo distante e em campo próximo. (a) No imageamento em campo distante a fonte de luz e o elemento que coleta a luz está separado da amostra por uma distância, $d \gg \lambda$, o comprimento de onda da luz usada para a iluminação. A luz é difratada, de modo que a área iluminada é muito maior do que a abertura. Detalhes de sub-comprimento de onda da imagem são perdidos. (b) No imageamento em campo próximo a óptica de iluminação ou coleção está separada da amostra por uma distância, $d \ll \lambda$. A área iluminada corresponde ao tamanho da abertura do sistema óptico.	44
Figura 2.6 – Ilustração de uma sonda de SNOM com abertura.	45
Figura 2.7 – Ilustração de uma esquema de imageamento com SNOM por transmissão. A objetiva é posicionada no campo distante, para a coleta do sinal óptico.	48
Figura 2.8 – Esquema ilustrativo dos três diferentes modos de imageamento com SNOM possíveis em nosso laboratório.	49
Figura 2.9 – Imagem de SNOM em modo de coleção de uma fibra óptica multimodo.	50
Figura 2.10 – Imagem de (a) SNOM e de (b) AFM de uma amostra comercial padrão para microscopia de varredura por sonda.	51
Figura 2.11 – Ilustração da configuração experimental de uma medida de SNOM, em modo de transmissão, numa célula com nanopartículas de ouro.	53
Figura 2.12 – Imagens (a) topográfica e (b) óptica de macrófagos peritoneais, sem tratamento com nanopartículas de ouro, coletadas simultaneamente pela medição de SNOM em modo de transmissão, com uma sonda de 100nm de abertura.	54
Figura 2.13 – Imagem (a) topográfica e (b) óptica tomada simultaneamente de células peritoneais tratadas com nanopartículas de ouro. (c) perfil topográfico e da intensidade transmitida tomadas no mesmo ponto, indicado pelas linhas verdes na parte A e B da Figura.	55
Figura 3.1 – Ilustração de uma célula e seus componentes estruturais básicos envolvidos na mecânica celular.	59
Figura 3.2 – Imagens de AFM de macrófagos em cultura por 1 hora sobre (a) vidro, (b) vidro + citocalasina, (c) fibronectina e (d) fibronectina + citocalasina.	64
Figura 3.3 – Imagem de macrófagos em cultura por 48 horas sobre (a) vidro e (b) fibronectina.	65
Figura 3.4 – Ilustração do modelo para a determinação da Indentação com base em medidas de AFM. Em células aderidas sobre a fibronectina, o comprimento da indentação é menor (devido à maior rigidez da célula), resultando em maiores deflexões do cantilever. As células mais macias manifestam uma maior capacidade de se deformar (maior comprimento de indentação) e, por conseguinte, a deflexão do cantilever é menor.	66
Figura 3.5 – (a) Curvas de força-versus-deslocamento medidas para um substrato de referência, isto é, o vidro e para a amostra (uma célula) fornece a relação entre a carga de força e o comprimento da indentação, calculado como a diferença entre estas curvas. (b) Imagem de AFM de um macrófago mostrando a área da indentação. Superpostas estão doze	

pontos pretos representando o padrão das indentações realizadas na região central da célula.....	67
Figura 3.6 – Curvas de força-versus-deslocamento medidas tanto no substrato de referência como nos macrófagos. (1) Fibronectina, (2) Vidro, (3) Fibronectina + Citocalasina e (4) Vidro + Citocalasina. A relação entre a carga de força e o comprimento de indentação foi calculada como a diferença entre cada uma destas curvas e a linha de referência.....	68
Figura 3.7 –Esquema da indentação de (a) uma esfera rígida e de (b) um cone rígido em uma superfície macia.....	70
Figura 3.8 – Histograma das distribuições dos módulos de Young calculados usando o modelo Sneddon-Hertz para as células em cultura sobre diferentes substratos por 1 e 48 horas. Ajuste da distribuição normal (curva sólida).....	71
Figura 3.9 – Módulo elástico das células em cultura por 1 e 48 horas sobre vidro, fibronectina, fibronectina e vidro tratadas com Citocalasina D. Cada coluna representa o módulo de Young médio determinado por pelo menos 60 curvas de força por grupo de substrato. A barra de escala representa o desvio padrão. Os números percentuais entre as colunas representam as variações do módulo de Young médio em comparação com o vidro ou com a Fibronectina. *p <0,01.....	72
Figura 3.10 - Estrutura esquematizada de um DNA.....	75
Figura 3.11 - Estrutura química do Timol.....	76
Figura 3.12 – (a) Conformação de moléculas de DNA adsorvido sobre a superfície de micas tratadas com poli-L-lisina. (b) Perfil de altura, da fita de DNA, representado pelo traço verde na imagem de AFM. As imagens foram obtidas com AFM operando no modo intermitente em ar.....	79
Figura 3.13 – (a) Conformação de moléculas de DNA adsorvido sobre a superfície de micas e tratadas com tratadas com timol. (b) Perfil de altura, da fita do complexo DNA-ligante, representado pelo traço verde na imagem de AFM.	80
Figura 4.1 – Ilustração esquemática da deformação termoelástica da superfície induzida por um feixe de excitação com perfil Gaussiano.....	83
Figura 4.2 – (a) Instante de tempo t_0 em que o feixe de excitação incide sobre a superfície da amostra mas ainda não há deformação da superfície. (b) Instantes de tempo $t > t_0$ em que a amostra absorveu o feixe de excitação provocando uma deformação da superfície. (c) Gráfico ilustrativo das medidas por AFM dos deslocamentos da superfície em função do tempo.	86
Figura 4.3 – Vetores de deslocamento. A linha tracejada horizontal representa a superfície da amostra antes da deformação. As setas indicam o deslocamento de um ponto da superfície após o sólido ser aquecido localmente pelo feixe de excitação.	88
Figura 4.4 – (a) Imagem dos vidros fosfatos polidos, lavados e fixos nos porta-amostras para as medições por AFM. (b) Amostra Q-98 com 6% de Nd^{3+} posicionada sobre o escâner piezoelétrico do AFM para início do imageamento.	92
Figura 4.5 – Diagrama esquemático de um aparato experimental para medidas de deslocamentos da superfície por AFM.....	93

Figura 4.6 – Imagens topográficas de AFM dos vidros Q-98, dopados com 1%, 3%, 6% e 9% de Nd^{3+} . Os círculos verdes, sobrepostos às imagens ilustram a área de incidência do feixe de excitação.....94

Figura 4.7 – As linhas sólidas representam os resultados experimentais obtidos por AFM e os pontos vermelhos representam os resultados teóricos obtidos a partir da equação (4.13). .95

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 MICROSCÓPIOS DE VARREDURA POR SONDA E O AFM	18
1.1 Microscópios de Varredura por Sonda	18
1.1.1 Um breve histórico	18
1.1.2 Como funciona.....	19
1.2 Microscópio de Força Atômica	20
1.2.1 O conceito básico	20
1.2.2 Detecção da interação ponta-amostra.....	22
1.2.3 A formação da imagem	23
1.2.4 Forças de interação a distâncias microscópicas.....	24
1.2.5 Modos de operação.....	27
1.2.6 Artefatos nas imagens de AFM.....	30
2 OUTRAS TÉCNICAS DE SPM E APLICAÇÕES	34
2.1 Microscopia de Força Atômica Condutora (C-AFM)	34
2.1.1 Princípios básicos do C-AFM.....	35
2.1.2 Realizando medidas com C-AFM	36
2.1.3 Sondagem direta de titanato de bário semicondutor por meio de C-AFM	38
2.2 Microscopia Óptica de Varredura em Campo Próximo	40
2.2.1 A história da microscopia de campo próximo	41
2.2.2 A física da microscopia de campo próximo	43
2.2.3 Microscopia de campo próximo baseada em sondas com abertura	44
2.2.4 A configuração básica e os modos de SNOM	47
2.3 SNOM em Amostras Biológicas	52
2.3.1 A absorção de nanopartículas por células e o SNOM	52
2.3.2 Configuração Experimental	53
2.3.3 Medidas de SNOM em modo de transmissão em células.....	54
3 AFM NO ESTUDO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS: DA CÉLULA AO DNA	57
3.1 Considerações Gerais	57
3.2 Microscopia de Força Atômica Aplicada à Biologia Celular	58
3.3 Componentes Estruturais Envolvidos na Mecânica Celular	59
3.3.1 Citoesqueleto.....	59
3.3.2 Matriz extracelular	60

3.3.3 Os receptores da adesão celular	60
3.3.4 Núcleo.....	61
3.3.5 Membrana celular	61
3.4 Efeitos da Adesão Celular à Fibronectina nas Propriedades Elásticas da Célula.	62
3.4.1 Introdução	62
3.4.2 Preparação do substrato e cultura das células	63
3.4.3 Imagens topográficas e a rugosidade.....	63
3.4.4 Métodos e teoria da elasticidade celular	65
3.4.5 Resultados dos testes de elasticidade.....	70
3.4.6 Discussão dos resultados dos testes de elasticidade	73
3.5 Imagens de DNA e Complexos DNA-Timol com AFM	74
3.5.1 Preparação da mica para imagem de DNA e complexos de DNA-timol	76
3.5.2 Modo de imageamento e resolução	77
3.5.3 Imagens do DNA e dos complexos de DNA-Timol.....	78
3.5.4 Discussão	81
4 NANO EXPANSÃO TÉRMICA EM SÓLIDOS INDUZIDA POR LASER E MEDIDA COM AFM	82
.....	82
4.1 Considerações Gerais	82
4.3 Medidas de AFM Resolvidas no Tempo.....	84
4.2 Modelo Teórico da Deformação na Amostra	87
4.4 Características das Amostras Estudadas.....	90
4.5 Procedimento Experimental	91
4.6 Resultados e Discussões	94
5 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	113

INTRODUÇÃO

A invenção e o desenvolvimento do microscópio óptico^{1;2}, no século XVII, nos revelou a existência de um mundo desconhecido e inimaginável ao redor e dentro de nós. Nossa vida não seria o que é hoje se a microscopia óptica nunca tivesse existido, ou se ela não tivesse nos ajudado a entender melhor como somos formados, como funcionamos e como podemos melhorar a nossa condição³ - principalmente na área da biologia e da medicina e também em muitas outras áreas^{4;5}.

Outro grande passo foi dado com a introdução das microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura na década de 1930, as quais foram inicialmente integradas à microscopia óptica, mas, posteriormente, desenvolveram a sua própria identidade e tecnologia e abriram novos horizontes no conhecimento humano⁶.

No início da década de 1980, mais avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento do microscópio de varredura por tunelamento⁷ e do microscópio de força atômica⁸. Estes microscópios deram origem a um novo ramo de microscopia conhecida como a Microscopia de Varredura por Sonda. Os microscópios de varredura por sonda são completamente diferentes dos seus antecessores, uma vez que, ao invés de se basear em lentes, fótons e elétrons, eles exploram diretamente a superfície da amostra por meio de uma sonda de varredura local, enquanto que o uso de um software dedicado permite que os resultados sejam visualizados em um monitor. Numa analogia simplificada, podemos comparar o uso de uma sonda de varredura destes microscópios, com o uso que um deficiente visual faz de uma bengala: ele percebe as elevações e depressões do terreno, bem como a proximidade de obstáculos, pelas mudanças na altura em que a bengala toca o chão e também pelo som produzido pelo impacto da bengala com o piso. A ponta da bengala é a sonda usada pelo cego, os detectores de alterações no terreno são a sua mão e os ouvidos.

Os microscópios de varredura por sonda tem um número de características especiais: alta magnificação⁹ com resolução espacial muito elevada¹⁰; preparação mínima da amostra¹¹ (nenhum dos corantes da microscopia óptica, vácuo ou metalização com ouro exigida pelas microscopias eletrônicas) dados topográficos tridimensionais reais que nos permitem obter diferentes pontos de vista das amostras de um único conjunto de dados coletados; e a

capacidade de trabalhar em líquido¹², em tempo real, tornando-se assim possível estudar até mesmo os fenômenos dinâmicos de amostras vivas no seu ambiente biológico e sob condições quase fisiológicas.

Ao longo dos anos, um número crescente de pesquisas tem sido realizadas com o uso dos mais diversos tipos de microscópios de varredura por sonda^{13; 14; 15; 16; 17}. A razão disto é muito simples: a microscopia de varredura por sonda não é, simplesmente, apenas mais outra forma de microscopia, mas deu origem a uma forma completamente nova de usar a microscopia que realizou o sonho de todos os microscopistas: sendo capaz de tocar, mover e interagir com a amostra enquanto ele está sendo examinada, tornando assim possível descobrir não apenas a morfológica, mas também a sua informação estrutural química e física.

De fato, com o advento da microscopia óptica, tornou-se possível examinar estruturas em nível de "*micro*", enquanto que as microscopias eletrônicas de transmissão e varredura e nos permitiram visualizar estruturas em nível de "*nano*", mas ainda assim, apenas em duas dimensões. No entanto, quando se fala de microscopia de varredura por sonda, em especial da microscopia de força atômica, não estamos limitados apenas a resoluções em termos "*nano*" tridimensional, mas já é possível também falar em nível de "*pico*". Juntamente com as contínuas melhorias técnicas, o alcance desta nova faixa dimensional significa que as microscopias de varredura por sondas podem proporcionar uma oportunidade de interagir com moléculas individuais, observando-as enquanto nós as tocamos e as movemos, a fim de descobrir as suas características físicas.

Tudo isso também levou ao desenvolvimento de uma "*nano-tecnologia*" associada às microscopias de varredura por sondas. Uma vez que, os microscópios de varredura por sonda tem se apresentado como "*nano-robôs*" que podem interagir de forma dinâmica e manipular amostras em "*nano-escala*". Além disso, a funcionalização das sondas deste tipo de microscopia tornou possível a obtenção de "*nano-biossensores*" que podem ser utilizados no campo de processos biomoleculares dinâmicos, de uma maneira que não podia ser nem sequer imaginada há apenas alguns anos atrás. Finalmente, a combinação das microscopias de varredura por sondas com outras técnicas microscópicas, tais como a microscopia de fluorescência confocal tem sido ativamente explorada, e um grande número de aplicações interessantes tem sido propostas.

Neste trabalho apresentamos os conceitos e discutimos a aplicabilidade de algumas técnicas de microscopias de varredura por sondas, realizadas em nosso laboratório, para o estudo de propriedades físicas de amostras biológicas, vítreas e cerâmicas. De fato, o objetivo desta tese é demonstrar o potencial da microscopia de varredura por sonda, discutir a instrumentação e desafios relacionados à execução das medidas, necessárias para o desenvolvimento destes tipos de estudos. Para a apresentação e discussão dos resultados obtidos nestes estudos, nós dividimos esta tese como descrito a seguir.

No primeiro capítulo, iniciamos com uma visão geral dos diferentes tipos de microscopias de varredura por sonda. Os princípios básicos de operação e funcionamento comuns a todas as técnicas de microscopias de varredura por sonda são estudados, através da apresentação de uma de suas principais ramificações, a microscopia de força atômica. Ao final do primeiro capítulo, mostramos a configuração do sistema de varredura multi-sondas disponível em nossos laboratórios e os desafios ainda inerentes a sua operação.

No segundo capítulo iniciamos pelo estudo das possibilidades de uso da Microscopia de Força Atômica Condutora para a análise de propriedades elétricas, em nano-escalas, de amostras condutoras ou semicondutoras, em especial, de cerâmicas de Titanato de Bário semicondutor. Mostramos também a possibilidade da correlação das medidas elétricas com as características topográficas da amostra. Em seguida, estudamos os conceitos relacionados à microscopia óptica de varredura em campo próximo e a sua aplicabilidade em diferentes materiais. Em especial, mostramos o uso da microscopia de campo próximo para o estudo das interações entre células e nanopartículas de ouro, sem necessidade de marcação fluorescente nas nanopartículas.

No terceiro capítulo estudamos o uso da microscopia de força atômica para o estudo de amostras biológicas. De fato, iniciamos mostrando como este tipo de microscopia pode ser usada para o estudo de propriedades mecânicas de células. Para isto, estudamos como o módulo elástico das células é afetado pela adesão celular a uma matriz extracelular. Em seguida, estudamos a adesão de uma molécula de DNA a superfície de uma mica modificada por poli-L-lisina e as mudanças de conformação do DNA devido ao tratamento com o timol.

No quarto capítulo estudamos as expansões térmicas em sólidos induzidas por laser aplicando, pela primeira vez, a microscopia de força atômica. Mostramos como obter medidas deslocamentos da superfície em função do tempo e os principais parâmetros que

influenciam a resolução temporal destas medidas. A boa concordância dos resultados experimentais e teóricos evidencia o potencial desta técnica para o estudo da amplitude e dinâmica de efeitos térmicos em materiais sólidos.

Por fim apresentamos uma conclusão geral a respeito dos resultados dos estudos desenvolvidos nesta tese, e apontamos algumas das aplicações futuras, em nossa opinião, promissoras e que podem ser desenvolvidas com o sistema de microscopia de varredura multi-sondas atualmente disponível em nossos laboratórios.

1 MICROSCÓPIOS DE VARREDURA POR SONDA E O AFM

Neste capítulo apresentamos as técnicas de microscopia de varredura por sonda e estudaremos os princípios básicos envolvidos no funcionamento do AFM e as condições ideais para obtenção das imagens.

1.1 Microscópios de Varredura por Sonda

1.1.1 Um breve histórico

Utilizando um microscópio óptico rudimentar, em 1665 Robert Hooke¹ examinou uma fatia de cortiça e verificou que ela era constituída por cavidades poliédricas, às quais ele nominou de células (do latim “cella” – pequena cavidade), descobrindo um mundo até então invisível e insuspeitado. Desde então, os microscópios não pararam de evoluir sendo sempre ferramentas fundamentais para o avanço das fronteiras do conhecimento¹⁸.

No início dos anos de 1980, os microscópios eletrônicos ainda não apresentavam resolução suficiente para visualizar os átomos, embora a teoria atômico-molecular da matéria estivesse bem consolidada, desde o início do século XX. Em 1982, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer criaram o Microscópio de Varredura por Tunelamento⁷ (STM, Scanning Tunneling Microscope), nos laboratórios de pesquisa da IBM em Rüschlikon, na Suíça. No STM foi possível obter, pela primeira vez, imagens de átomos e essa revolucionária inovação deu a Binnig e Rohrer o Prêmio Nobel de Física, em 1986.

Além de produzir imagens em escala atômica, o STM permitiu a manipulação de átomos individuais, realizando uma possibilidade que havia sido levantada por Richard Feynman, nos anos 1960, a da construção de estruturas através da movimentação e montagem de átomos, um a um.

O STM foi o primeiro membro de uma vasta família que cresceu rapidamente: a dos Microscópios de Varredura por Sonda (SPM, Scanning Probe Microscope). Embora forneça imagens muito impressionantes, seu uso é restrito a superfícies rígidas e eletricamente condutoras, ou semicondutoras. O passo seguinte foi a criação do Microscópio de Força Atômica⁸ (AFM, Atomic Force Microscope) por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber,

em 1986. As primeiras imagens de AFM mostravam a topografia de superfícies sólidas. Mas atualmente já incluem materiais eletricamente isolantes, como vidros, cerâmicas, polímeros e materiais de origem biológica, de tal forma que o número de artigos científicos já publicados, até 2013, usando o AFM atingia cerca de 45 mil, enquanto o número de artigos utilizando STM ainda não chegava a 20 mil^a.

O AFM transformou-se, rapidamente em uma vasta plataforma de novas microscopias, que produzem uma grande quantidade de informações sobre as propriedades físicas e físico-químicas de superfícies. Hoje, um AFM pode ser complementado com diferentes acessórios permitindo que se obtenha informações sobre as propriedades elétricas (potencial, carga, condutividade), magnéticas, mecânicas (viscoelasticidade, adesão, dureza, coeficientes de atrito), térmicas (condutividade, transições) e químicas (composição, interações) de superfícies.

A família de SPM pode ser dividida nas seguintes classes: Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM)^{7; 19; 20; 21}, Microscopia Força de Atômica (AFM)^{8; 22}, Microscopia Força Eletrostática (EFM)^{9; 10}, Microscopia de Força Magnética (MFM)²³, Microscopia Ótica de Varredura em Campo Próximo (SNOM)^{24; 25; 26}, Microscopia de Varredura por sonda Kelvin (SKPM)^{27; 28; 29}, e muitas outras^{30; 31; 32}.

1.1.2 Como funciona

Nos microscópios óticos convencionais, o observador utiliza fótons ou elétrons para ver um objeto e as suas possibilidades de observar objetos pequenos ficam limitadas pela difração da radiação³³, que ocorre sempre que as dimensões do objeto examinado são da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda utilizado. Por isso, os microscópios óticos convencionais não permitem a observação de objetos menores que ½ micron. Além disso, efeitos de aberrações comprometem a qualidade das imagens obtidas com grandes aumentos em microscópios eletrônicos, mesmo quando o limite de difração não é atingido.

As técnicas de STM e AFM não dependem da interação da matéria com luz ou elétrons. Nelas, o observador utiliza uma pequena sonda que tem a ponta muito afiada e que percorre a superfície da amostra, muito próximo desta. Em AFM, a sonda pode estar em contato com a amostra, mas, na maioria dos casos, está a uma distância muito pequena, de

^a <http://www.scopus.com/>

ordem de poucos nanômetros. Nessas condições, as forças resultantes das interações da sonda com os átomos ou moléculas da superfície, especialmente as interações intermoleculares de Van der Waals, são significativas e podem ser medidas. Em STM, o que se detecta é a corrente de tunelamento entre a sonda e a amostra condutora, que também só é significativa quando a distância entre sonda e amostra é muito pequena³⁴.

Na microscopia de varredura por sonda, a sonda interage com os átomos da superfície que estão imediatamente abaixo dela e também com vizinhos um pouco mais distantes. Por essa razão, as imagens topográficas da amostra são geradas pela convolução de muitas contribuições, dos átomos da extremidade da sonda com os da superfície da amostra durante uma varredura. Cada imagem é formada por y linhas com x pontos em cada linha. Cada ponto da imagem é determinado pelas coordenadas x , y e z , onde z é a altura. Portanto, a imagem de força atômica é tridimensional, por definição, diferente de uma micrografia ótica ou eletrônica, que é uma fotografia da projeção bidimensional da amostra.

1.2 Microscópio de Força Atômica

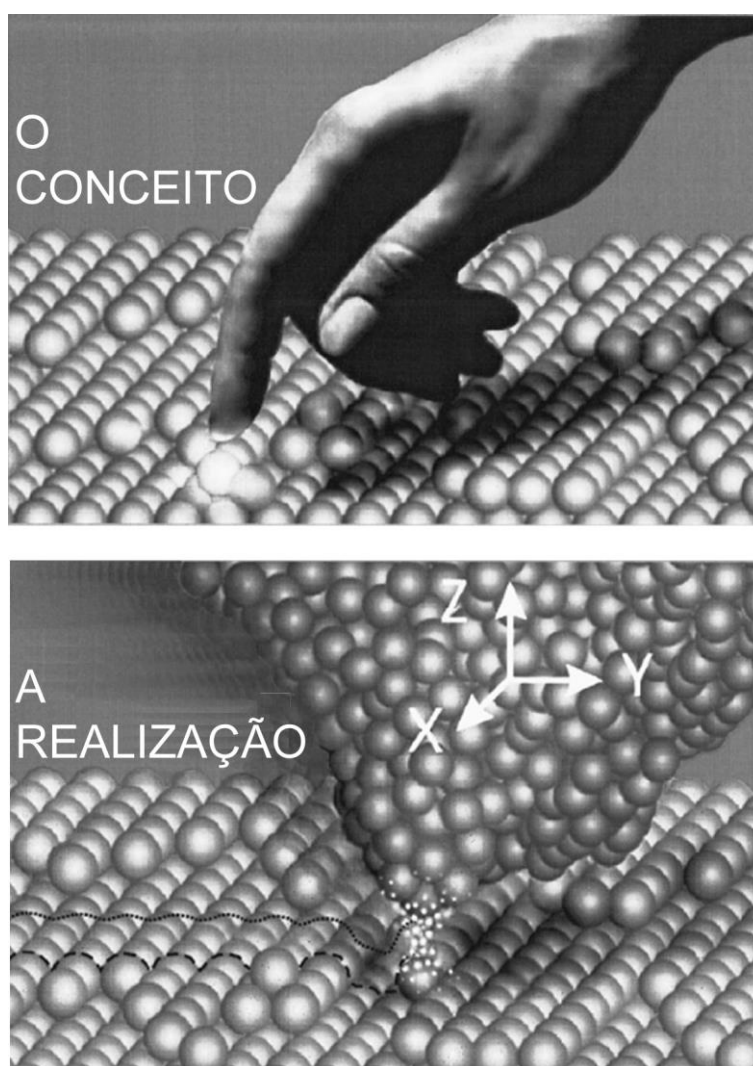
1.2.1 O conceito básico

O funcionamento de um microscópio de força atômica baseia-se no uso de uma sonda afiada, que é colocada em contato com a amostra e se movimenta varrendo toda a superfície estudada, enviando os dados a um computador que constrói então a imagem da topográfica da amostra. De fato, aqui, a topografia é determinada a partir da deflexão do cantilever flexível com uma sonda montada na sua extremidade livre. Portanto, o AFM guarda alguma semelhança com instrumentos de medida de rugosidades, chamados de perfilômetros³⁵.

Numa analogia didática, o funcionamento do AFM pode ser compreendido como uma pessoa cega utiliza o método de leitura em Braille; embora ela não capte a luz diretamente, ela é capaz de colocar seu dedo em contato com as letras (que possuem um pequeno relevo) numa folha de papel e dessa forma perceber as nuances de cada símbolo. As células nervosas dos dedos detectam o padrão de saliências sobre o papel, de maneira que seu cérebro é capaz de converter essa informação nos símbolos linguísticos.

No AFM, este princípio é reduzido para distâncias inter-atômicas (ver Figura 1.1) As saliências no papel são substituídos pelas "saliências" dos átomos que formam uma superfície, as células nervosas nas pontas dos dedos são substituídos por uma sonda em forma de agulha muito afiada, e o trabalho de tradução do cérebro é tomado por um arranjo de eletrônica e software, capaz de traduzir o sinal detectado pela sonda numa imagem da superfície sob inspeção.

Figura 1.1 - Um cego é capaz de ler as palavras mesmo sem enxergá-las opticamente; ao invés disso, ele varre as linhas com a ponta do dedo e detecta variações no relevo que codificam (Através do método de Braille) as letras, números e outros símbolos. Abaixo é ilustrado o conceito aplicado no AFM de "sentir" os átomos usando uma ponta afiada atômica.



Fonte: Imagem retirada da Ref. [36]

Se as saliências sobre a folha de papel no método de leitura em braille estiverem espaçadas numa distância menor do que a distância entre as células nervosas da ponta dos dedos, elas não poderão ser distinguidas, e duas saliências serão detectadas como uma. Se

quisermos obter resolução atômica em imagem de AFM, é absolutamente imperativo que a sonda em forma de agulha seja "atômicamente afiada", o que significa que ela é encerrada principalmente por um único átomo saliente ou um pequeno aglomerado de átomos. Esta exigência é, em certa medida obtida por micro-fabricação de pontas "atômicamente afiada", que tem conseguido atualmente sondas de AFM com ápice dos raios da ponta na faixa de 1-10 nm.

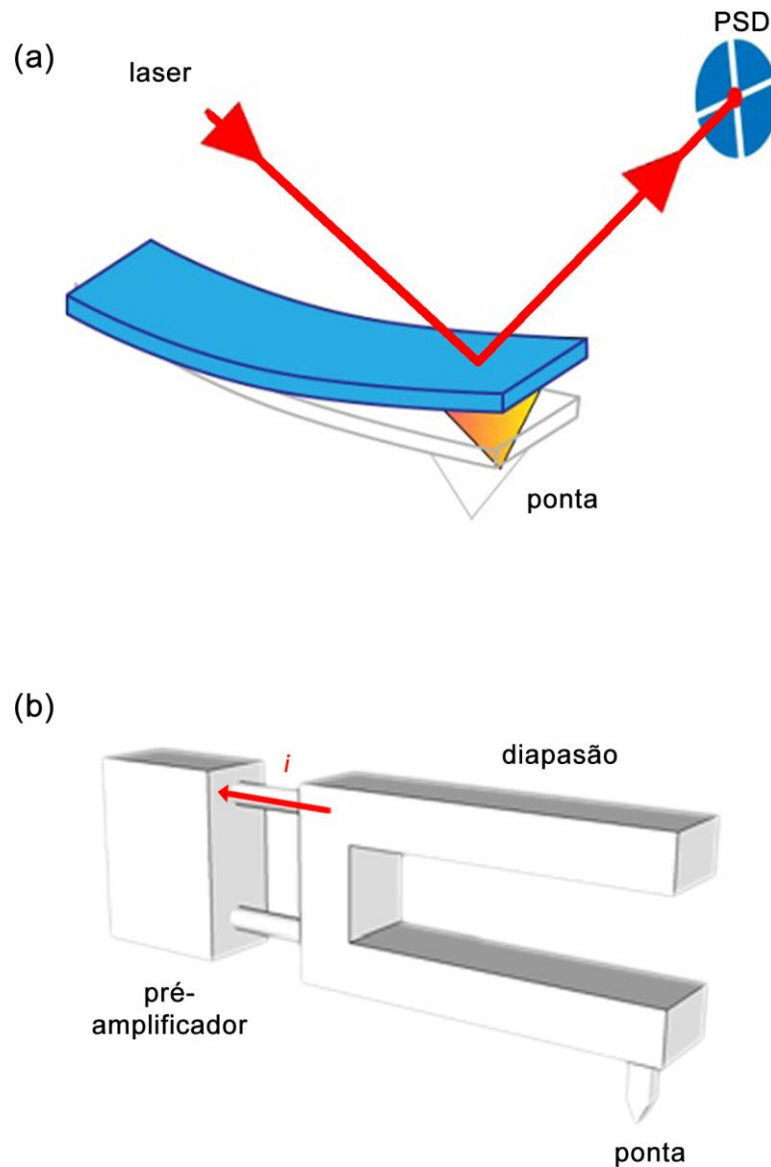
1.2.2 Detecção da interação ponta-amostra

A ponta da sonda "atômicamente afiada" é posicionada na extremidade livre de um cantilever flexível, e posta em contato com ou na proximidade da superfície a ser imageada. À medida que a ponta e a superfície se aproximam uma da outra, as forças aumentam e, dependendo se as forças são atrativas ou repulsivas a ponta vai defletir o cantilever em direção a amostra ou para longe da amostra. Nos estudos apresentados nesta tese, os movimentos do conjunto ponta-cantilever têm sido detectados por dois diferentes tipos de sistemas de detecção.

A Figura 1.2(a) ilustra o sistema de detecção por laser. Neste sistema, a força de interação ponta-amostra é medida pela leitura, por meio de um diodo foto sensível de quadrante (PSD), das alterações da posição do ponto de um laser refletido pelo cantilever, na extremidade do cantilever onde a ponta está posicionada. A Figura 1.2(b) ilustra o sistema de detecção por diapasão de quartzo. Neste sistema de detecção a força de interação ponta-amostra é transduzida para um sinal elétrico por meio do efeito piezoelectrico do quartzo, que é então detectada por um pré-amplificador.

Com o sistema de detecção para controlar a deflexão cantilever no lugar, a ponta então varre a superfície no plano xy , linha-por-linha utilizando posicionadores piezoelectricos, capazes de controlar a posição da ponta em escala atômica. As variações na deflexão do cantilever são então registradas como uma função da posição xy , tomando a imagem espacial real tridimensional ou um mapa de força da superfície sob inspeção. Uma vez que a força está intuitivamente ligada à distância de separação da ponta-amostra, o mapa força constitui uma imagem de "topográfica" da superfície. Isso é, grosso modo, o conceito básico por trás de uma imagem de AFM.

Figura 1.2 - Esquema ilustrativo dos sistemas de detecção de AFM, utilizados nesta tese. (a) Sistema de detecção por laser e (b) Sistema de detecção por diapasão de quartzo.



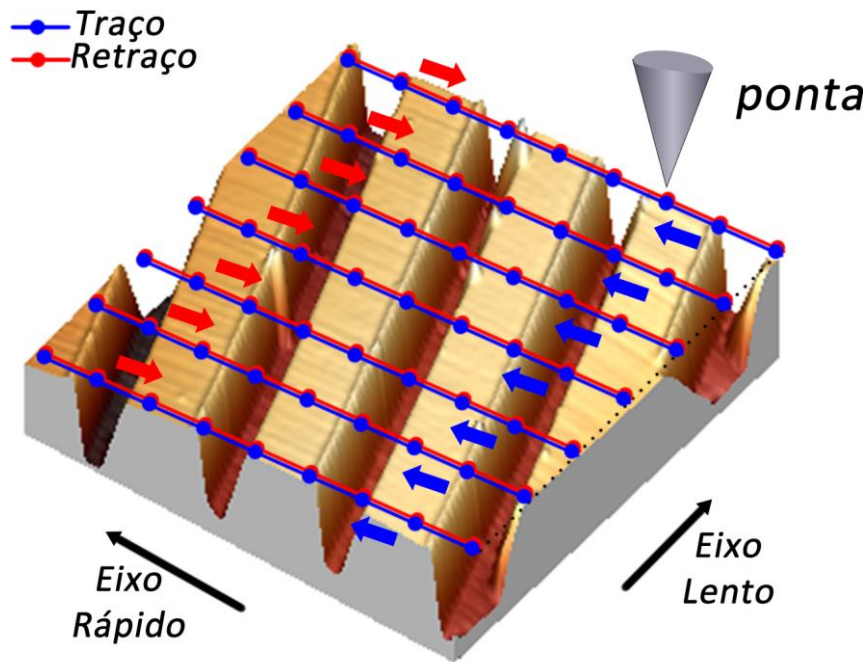
Fonte: Elaborada pelo autor

1.2.3 A formação da imagem

A amostra é analisada movendo-se a ponta sobre a sua superfície. A ponta vai ao longo da primeira linha, andando em pequenos passos e a cada passo realiza uma medida. No final de cada linha, a ponta volta sobre ela e as informações do retorno da ponta também são armazenadas. Após atingir a posição inicial da linha a ponta, então, passa para a próxima linha a ser analisada e assim sucessivamente até o fim da área pré-estabelecida para análise. Na varredura existem dois tipos de aquisição de dados, uma lenta que corresponde à varredura das linhas paralelas, e a rápida que corresponde à varredura ponto a ponto em

uma determinada linha. A Figura 1.3 ilustra o padrão de varredura ponta-amostra para a formação das imagens.

Figura 1.3 - Varredura tridimensional (eixos x , y e z) da amostra com a sonda. A imagem topográfica final é depois reconstruída pelas informações das linhas varridas. Cada ponto de medida tem uma posição x , y e z bem definida. As linhas azuis sobrepostas à imagem topográfica de AFM correspondem aos movimentos de ida e são geralmente chamadas de “Traço”, enquanto que as linhas vermelhas correspondem aos movimentos de volta e são chamadas de Retraço.

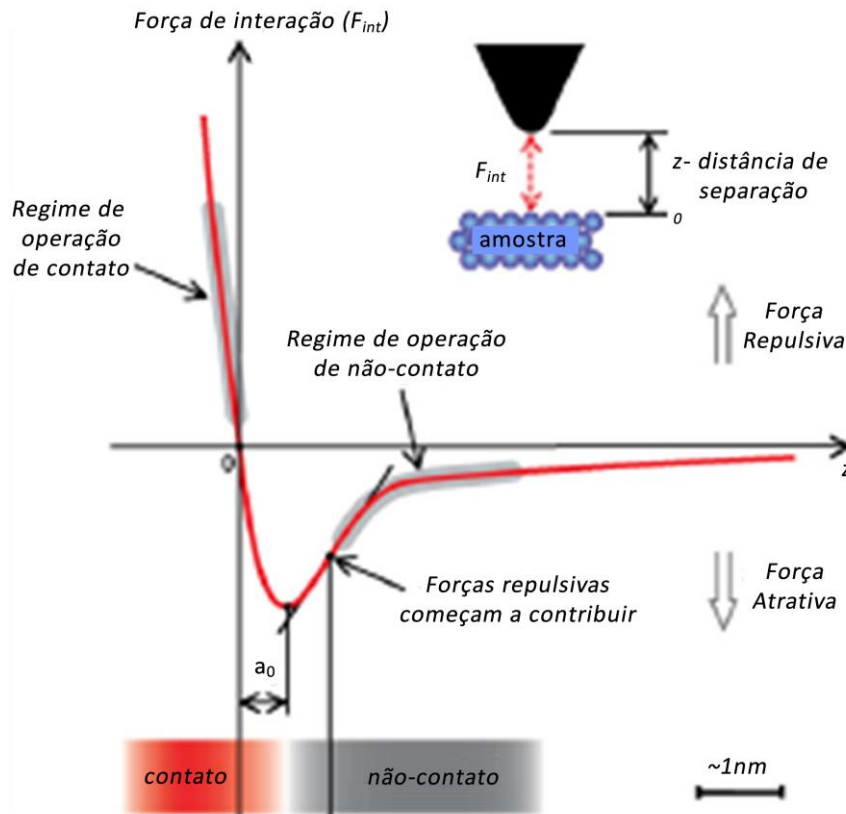


Fonte: Elaborada pelo autor

1.2.4 Forças de interação a distâncias microscópicas

Para entender o funcionamento de um AFM devemos então ter conhecimento das forças que agem entre os sistemas microscópicos a distâncias muito pequenas e cuja interação é base do funcionamento deste microscópio. A Figura 1.4, mostra uma ilustração simplificada das forças de interação, como uma função da distância de separação z entre ponta e a amostra. Uma força de interação positiva representa uma força repulsiva que empurra a ponta para longe da amostra. Isto impõe uma deflexão positiva do cantilever numa direção vertical. Uma força de interação negativa representa uma força atrativa que puxa a ponta em direção à amostra, o que leva a uma deflexão negativa do cantilever. A tentativa de classificação das forças de interação ponta-amostra é bem extensa.

Figura 1.4 – Esboço das forças de interação ponta-amostra



Fonte: Elaborada pelo autor

O potencial de Lennard-Jones está na origem das forças que se revelam dominantes nas interações entre a ponta e a superfície da amostra, determinantes para a obtenção de imagens topográficas por AFM, principal objetivo desta técnica, e é descrito pela expressão:

$$U(z) = \frac{\alpha}{z^{12}} - \frac{\beta}{z^6} \quad (1.1)$$

onde z é distância entre as moléculas ou átomos e α e β são constantes. O primeiro termo do lado direito da equação (1.1) é repulsivo e está associado à repulsão eletrostática entre duas moléculas quando as suas nuvens eletrônicas se aproximam. O segundo termo é atrativo e resulta de uma interação dipolo-dipolo, conhecida como interação de van der Waals. O termo atrativo é dominante a grandes distâncias, já a curtas distâncias é o termo repulsivo que domina o valor final do potencial³⁷.

Quando a ponta está em contato com a superfície, a resultante das forças de interação é composta por contribuições das forças de van der Waals, eletrostática e magnética, e por contribuições de forças mecânicas, como a as forças de adesão e fricção.

Em alguns casos forma-se uma fina camada de água à superfície da amostra, nestas condições, existe ainda a contribuição da força de capilaridade³⁸.

Força de repulsão entre nuvens eletrônicas

Quando dois átomos se aproximam, dá-se a interpenetração das suas nuvens eletrônicas e a, conseqüente, sobreposição de orbitais completamente preenchidos. De acordo com o princípio de exclusão de Pauli dois elétrons de um mesmo átomo não podem ter todos os números quânticos iguais. Por isto, verifica-se um aumento da energia eletrostática total do sistema que origina uma contribuição repulsiva para a força de interação total.

A força de repulsão é de curto alcance e pode ser descrita por uma função do tipo $F \propto 1/r^n$, com n superior a 8.³⁷ A maior parte das imagens topográficas obtidas com a ponta em contato com a superfície resultam do efeito repulsivo desta força e é a sua dependência forte da distância que permite a obtenção de imagens com resolução atômica. O termo repulsivo do potencial de Lennard-Jones tem origem em interações desta natureza.

Forças de Van der Waals

As forças de Van der Waals são forças de longo alcance, podendo ser sentidas a distâncias superiores a $10nm$. São compostas por três contribuições distintas: interações tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão ou forças de London. As forças de dispersão são originadas pela polarização instantânea devida às flutuações da carga eletrônica em torno do núcleo, e representam a contribuição mais relevante para a força de van der Waals total por estarem sempre presentes, contrastando com outros tipos de interação como a indução e a polarização devida a momentos multipolares permanentes que dependem das propriedades dos átomos ou moléculas³⁹. No caso de dois átomos, as diferentes interações dipolares dão origem a uma energia de atração global que varia com $1/z^6$.

Para uma ponta esférica que interage com uma superfície plana, geometria muito semelhante à do AFM, o potencial de van der Waals é dado por³⁹:

$$U = -\frac{A_H R}{6z} \quad (1.2)$$

e a força de van der Waals é igual a³⁹

$$F = \frac{A_H R}{6z^2} \quad (1.3)$$

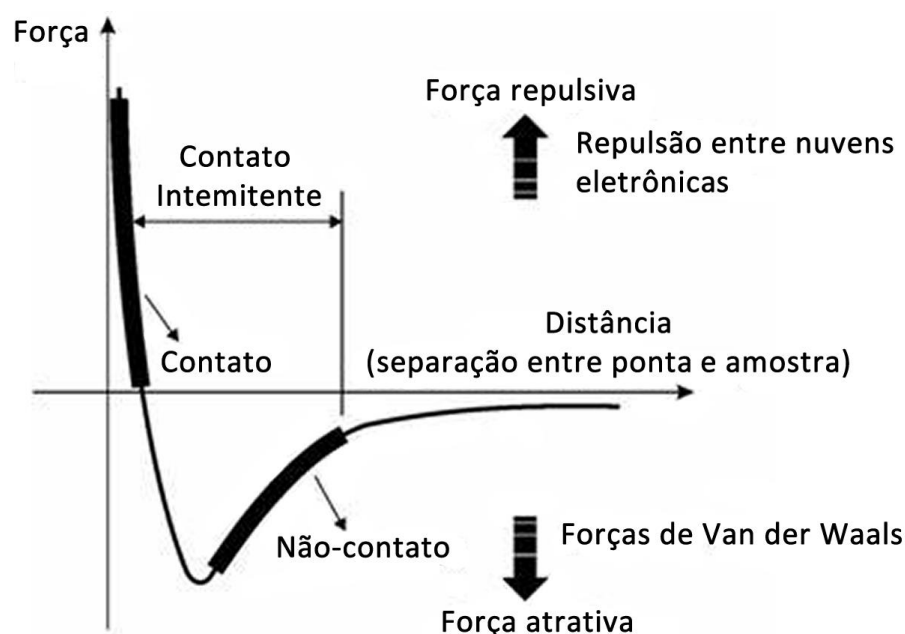
onde A_H é a constante de Hamaker, R é o raio da ponta e z é a distância entre a ponta e a superfície da amostra. A constante de Hamaker depende do tipo de material (polarização atômica e densidade) da ponta e da amostra. Para pontas piramidais ou cônicas em interação com superfícies planas, a força de van der Waals é proporcional a $1/z$.⁴⁰

Esta força foi calculada e medida para diferentes tipos de ponta e várias distâncias entre a ponta e a superfície da amostra, verificando-se que o seu valor varia com a distância bem como com o raio de curvatura da ponta^{41; 42; 43; 44; 45}. Também se verificou que a força de van der Waals é reduzida quando a ponta e a amostra estão inseridas num meio líquido⁴⁶. As interações de van der Waals constituem o termo atrativo do potencial de Lennard-Jones.

1.2.5 Modos de operação

O AFM funciona em três principais modos de operação diferentes: modo contato, modo não-contato, e modo intermitente. Naturalmente, as forças de interação entre a ponta e a superfície da amostra variam de acordo com modo de operação em uso. A Figura 1.5 representa um diagrama das forças de interação entre a ponta e a superfície da amostra para os diferentes modos de operação.

Figura 1.5 – Diagrama que mostra a força de interação entre a ponta e a amostra consoante o modo em que o AFM opera.



Fonte: Elaborada pelo autor

Embora existam outras forças de interação entre a ponta e a superfície da amostra, na obtenção de imagens topográficas, com o AFM, são as forças de Van der Waals e as forças de repulsão entre nuvens eletrônicas que se afirmam mais determinantes.

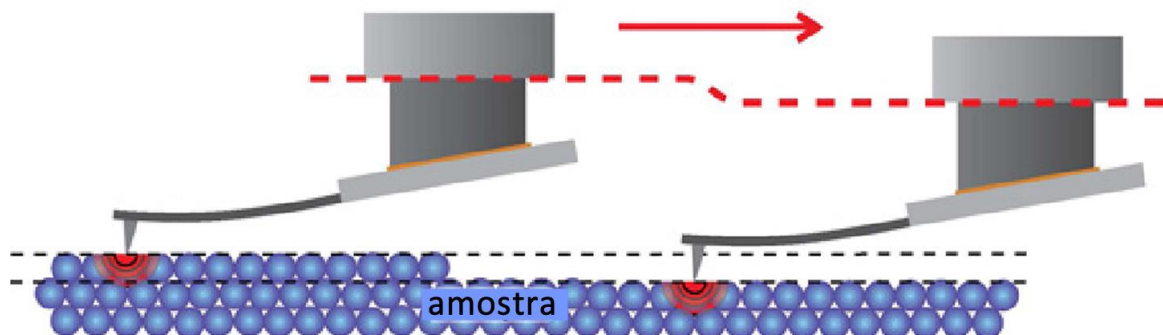
Modo Contato (Estático)

Neste modo o cantilever está sempre em contato com a superfície durante a varredura. Quando a ponta e a superfície da amostra se encontram em contato, a resultante das forças de interação responsável pela deflexão do cantilever é dada pela expressão

$$F = kz \quad (1.4)$$

onde F é a resultante das forças de interação, k é a constante elástica do cantilever e z é a deflexão. A interação é governada majoritariamente pelas forças repulsivas a curta distância, que têm valores que variam entre alguns nN e algumas dezenas de nN .

Figura 1.6 – Modo de operação contato.



Fonte: Elaborada pelo autor

No modo contato, a constante elástica do cantilever tem que ser muito menor que as constantes elásticas dos materiais que serão analisados pois, só desta maneira é possível que a sua deflexão acompanhe todas as deformações da superfície em análise. Uma vez que nos sólidos k varia entre $10N/m$ e $100N/m$, e nas amostras biológicas k é de aproximadamente $0,1N/m$, os cantileveres usados em modo contato têm k com valores que variam entre $0,01$ e $5 N/m$.

Modo Não contato (Dinâmico)

No modo de operação não-contato, a ponta é mantida afastada da superfície de maneira a que as forças de interação predominantes sejam as de longo alcance, tais como a

força magnética ou eletrostática. O cantilever é forçado a vibrar, com o auxílio de um elemento piezelétrico, com uma frequência ω_d próxima da sua frequência de ressonância ω_0 .

O movimento do cantilever pode ser descrito pelo modelo do oscilador forçado seguindo a equação movimento⁴⁷

$$m\ddot{z} + \left(\frac{m\omega_0}{Q}\right)\dot{z} + m\omega_0 z = F_0 \cos(\omega_d t) \quad (1.5)$$

cuja solução estacionária é

$$z(t) = A \cos(\omega_d t + \phi) \quad (1.6)$$

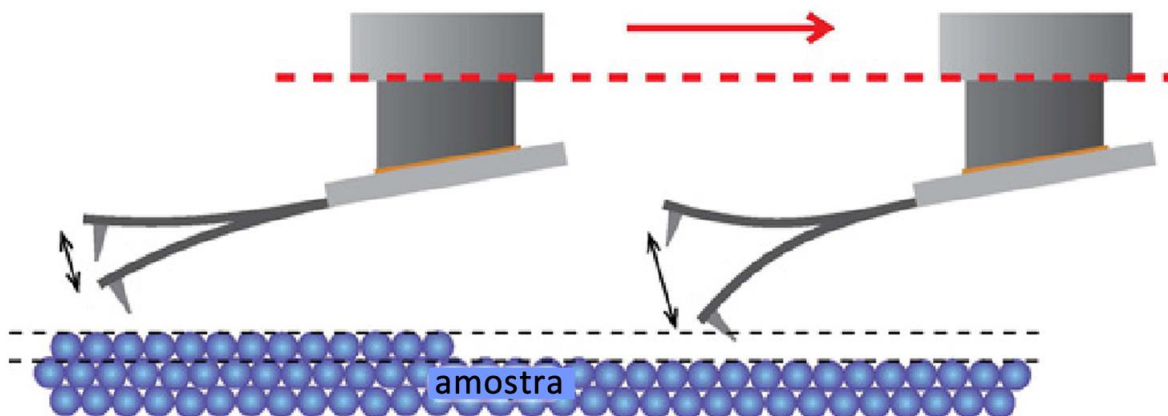
onde A é amplitude da oscilação à frequência ω_d e ϕ é a diferença de fase entre a resposta do sistema e a excitação a que está sujeito. A amplitude e fase são dadas, respectivamente pelas equações:

$$A = \frac{F_0 / m}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega_d^2)^2 + \left(\frac{\omega_0 \omega_d}{Q}\right)^2}} \quad (1.7)$$

$$\phi = \tan^{-1}\left(\frac{\omega_0 \omega_d}{Q(\omega_0^2 - \omega_d^2)}\right) \quad (1.8)$$

de onde se observa que uma variação das forças e conseqüentemente da frequência de ressonância leva a uma variação quer da amplitude quer da fase da oscilação do cantilever.

Figura 1.7 – Modo de operação não-contato.



Fonte: Elaborada pelo autor

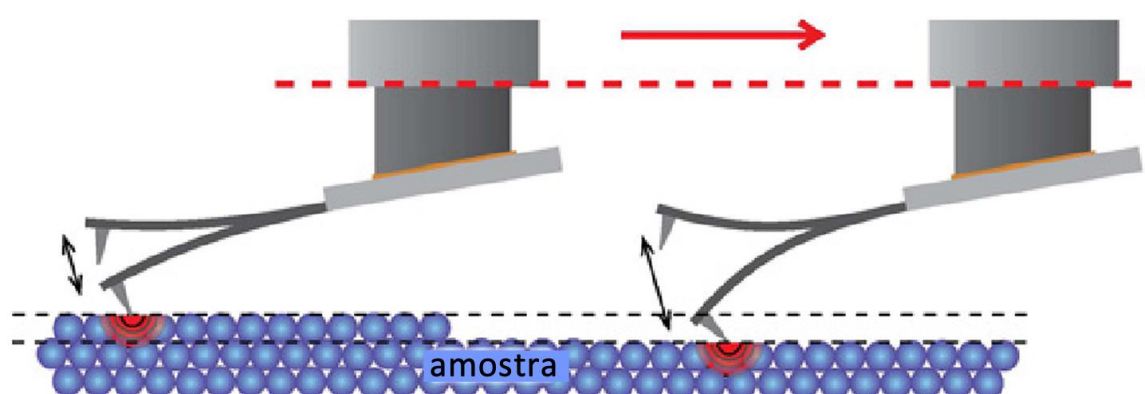
Para detectar as variações de frequência no modo não-contato são usados dois métodos. O primeiro mede as variações de amplitude (ou fase) resultantes das variações de frequência (modelação da amplitude) e o outro mede diretamente as próprias variações de frequência (modelação da frequência).

Modo contato Intermitente (Dinâmico)

No modo de contato intermitente, o cantilever é forçado a oscilar com uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, mas contrariamente ao modo não-contato, a ponta toca descontinuamente a superfície da amostra. A amplitude de vibração é mantida constante e sempre que a ponta toca a amostra, a amplitude sofre um desvio que é detectado e serve de sinal de realimentação. A descrição matemática apresentada para o modo não contato pode ser utilizada para o modo de contato intermitente.

Neste modo de funcionamento, a ponta é menos sensível às forças de capilaridade e de adesão, minimizando o efeito de torção do cantilever, e o efeito da força de fricção é extinto. Neste modo, a resolução das imagens topográficas, em particular de amostras de materiais moles, é melhorada. Este modo permite, em simultâneo com a obtenção da imagem topográfica, uma imagem de fase⁴⁸ que dá informação sobre a adesão e rigidez da superfície da amostra, e assim, permite identificar diferentes materiais presentes na mesma.

Figura 1.8 – Modo de operação contato intermitente.



Fonte: Elaborada pelo autor

1.2.6 Artefatos nas imagens de AFM

Os artefatos nas imagens de AFM podem ter diversas origens e nem sempre são identificados com facilidade. No entanto, podem-se identificar estas fontes de modo a

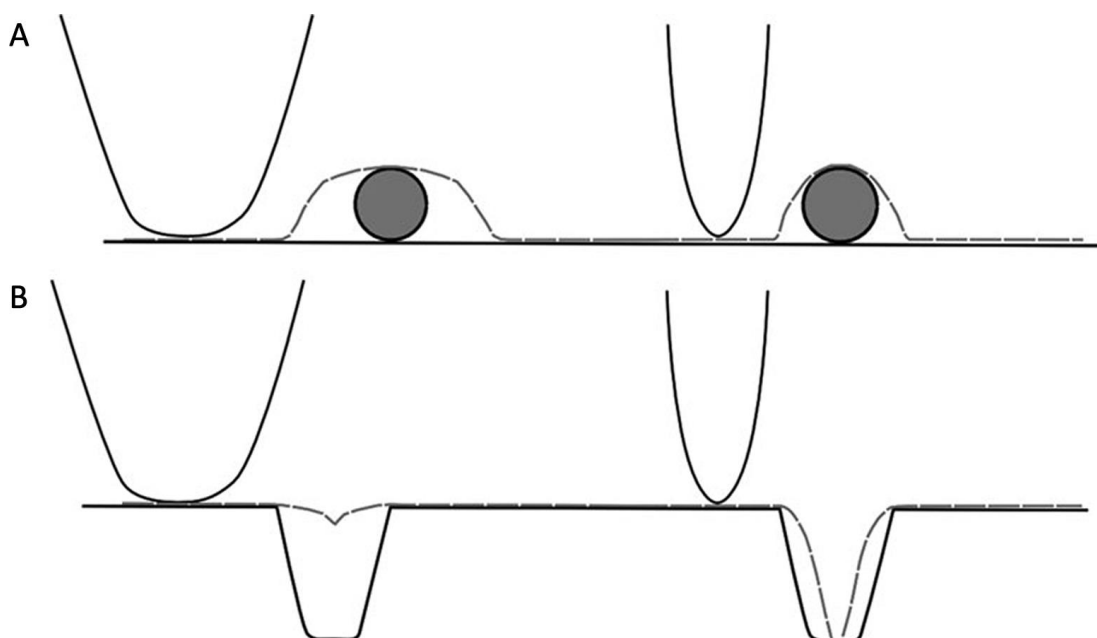
minimizar o seu efeito e ajudar o utilizador na sua identificação. As fontes de artefatos nestas imagens são a ponta, o scanner, vibrações, variações térmicas, processamento, circuito de realimentação e parâmetros da varredura.

Artefatos com origem na ponta

A forma geométrica da ponta afetará sempre a imagem obtida. Geralmente, pontas mais compridas também são mais estreitas e as imagens obtidas serão muito próximas da realidade. Normalmente, a altura dos objetos não é afetada nas imagens, mesmo com pontas padrão, já a resolução lateral evidencia estes artefatos, principalmente se existirem degraus.

A Figura 1.9(A) mostra a diferença que se obtém ao analisar o mesmo objeto com duas pontas de diferentes raios de curvatura. Note-se que em ambos os casos a altura do objeto é reproduzida com exatidão. Caso a ponta tenha que penetrar um pequeno buraco na superfície da amostra pode acontecer que esta não consiga tocar o fundo do buraco. Assim, a imagem será dominada pela geometria da ponta e não pela geometria da amostra, no entanto, é possível medir a largura do buraco com precisão (Figura 1.9(B)).

Figura 1.9 – Exemplos de artefatos que podem ser observados nas imagens de AFM com origem na ponta



Fonte: Retirado da Ref. [49]

Assim, para procurar evitar estes artefatos é necessário utilizar pontas adequadas à aplicação em questão, limpar bem as amostras para evitar que a ponta seja contaminada ou

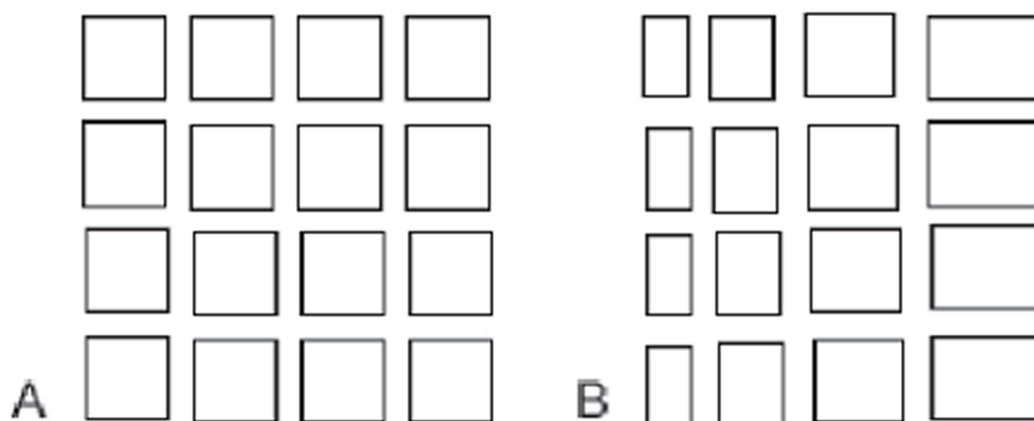
danificada e trocar a ponta assim que se desconfie que esta já não se encontre nas melhores condições. É importante salientar que além destes, existem outros artefatos relacionados à ponta e para mais detalhes, recomendamos verificar a referência [49].

Artefatos com origem na ponta

Vários artefatos advêm das propriedades físicas e mecânicas das cerâmicas piezelétricas que constituem o escâner. Note-se que a sensibilidade do material piezelétrico às tensões aplicadas varia com a sua utilização, tornando-se necessária a sua calibração periódica, de acordo com as instruções do fornecedor.

A Figura 1.10 mostra um exemplo da distorção que se pode observar numa imagem de AFM se o escâner não estiver linearizado. A linearização do escâner é feita com recurso à observação de uma amostra de calibração que consiste numa rede de cubos todos com as mesmas dimensões e igualmente espaçados. Esta amostra é medida e os parâmetros de correção são ajustados até se observar na imagem os valores de largura, altura e espaçamento conhecidos da amostra de calibração. Após este processo, as correções são guardadas e aplicadas nas medidas seguintes.

Figura 1.10 - Distorção de uma grelha de quadrados todos da mesma dimensão e igualmente espaçados.

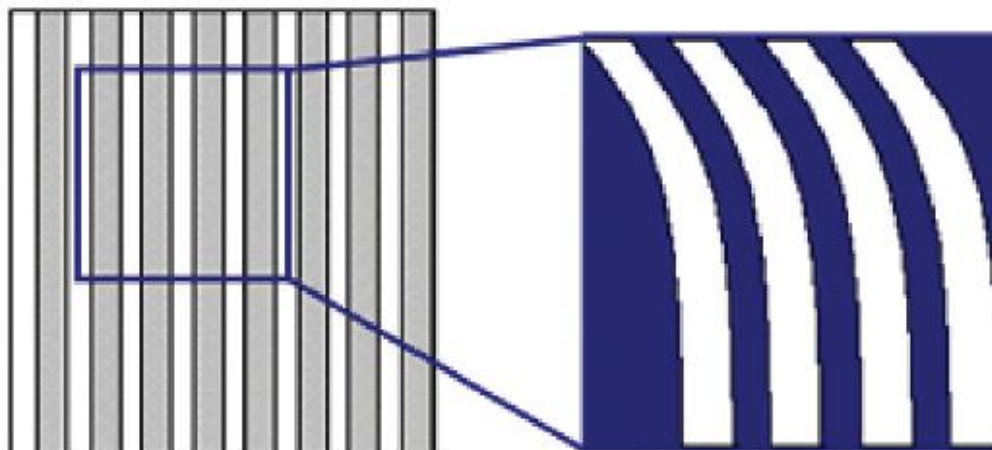


Fonte: Retirado da Ref. [49]

Quando o escâner é sujeito a uma variação acentuada da tensão aplicada, a sua resposta é afetada por um efeito de relaxação. Esta resposta lenta pode provocar vários defeitos nas imagens. Varreduras consecutivas com velocidades diferentes podem apresentar distorção, se fizermos uma varredura de pequena amplitude imediatamente a

seguir a uma varredura grande, ou vice-versa, o segundo não ficará centrado com o anterior e pode observa-se um efeito de drift, como mostra a Figura 1.11.

Figura 1.11 - Exemplo do efeito drift que pode ocorrer nas imagens obtidas por AFM.



Fonte: Retirado da Ref. [49]

É importante, salientar que uma grande variedade de outros tipos de artefatos existem e podem ser consultada, pelo leitor, com mais detalhes nas referências [49; 50] .

2 OUTRAS TÉCNICAS DE SPM E APLICAÇÕES

Neste capítulo discutiremos os princípios básicos e a aplicabilidade de algumas técnicas de SPM desenvolvidas com o uso de um sistema multi-sondas Multiview 4000TM (Nanonics) em nossos laboratórios. Inicialmente, mostraremos a aplicabilidade da Microscopia de Força Atômica Condutora para o estudo de propriedade elétricas de cerâmicas de Titanato de Bário semiconductor. Em seguida, discutiremos os conceitos básicos da microscopia óptica de varredura em campo próximo e sua aplicabilidade em diferentes materiais. Em especial, mostraremos a aplicabilidade da Microscopia de campo próximo para o estudo das interações entre células e nanopartículas de ouro.

2.1 Microscopia de Força Atômica Condutora (C-AFM)

Nas últimas décadas, tem-se desenvolvido uma nova série de microscópios de varredura por sonda baseados na técnica de AFM, mas que exploram sondas eletricamente condutoras para a realização de medidas de forças eletrostáticas, distribuições de cargas, quedas de tensão, capacitâncias ou resistências em escalas de comprimentos abaixo de 100nm.

Estas novas adaptações do AFM para, por exemplo, a microscopia de força eletrostática⁵¹, microscopia de varredura de capacitância⁵² e para a potenciometria de varredura⁵³, são grandes promessas para a caracterização elétrica de materiais, uma vez que imagens topográficas de alta resolução e medidas elétricas são obtidas simultaneamente, proporcionando uma correlação direta das propriedades elétricas com características topográficas específicas.

Nesta seção, descrevemos uma variante do AFM em que sondas condutoras são utilizadas para medir as relações tensão-corrente (I-V) e resistências (condutâncias) de materiais. Esta técnica é, geralmente, denominada de Microscopia de Força Atômica Condutora (C-AFM)⁵⁴, embora alguns utilizem a denominação de “AFM de sonda condutora”⁵⁵ ou “Microscopia de Varredura de Resistência”⁵⁶ para a mesma técnica.

2.1.1 Princípios básicos do C-AFM

De fato, a C-AFM é uma das técnicas de SPM no qual uma ponta condutora, com diâmetro de algumas dezenas de nanômetros, varre a superfície da amostra, enquanto que uma diferença de potencial é aplicada entre a ponta e a amostra. Pela ponta condutora passa uma corrente elétrica, gerando uma imagem da intensidade desta corrente nas diferentes regiões da amostra. Ao mesmo tempo, uma imagem topográfica também é gerada. Tanto a imagem da corrente elétrica quanto a imagem topográfica são tomadas simultaneamente sobre a mesma área da amostra, o que permite a identificação de características da superfície mais ou menos condutoras. Um circuito elétrico, com amplificadores de corrente e filtros, monitora a corrente, que pode variar desde alguns pico-ampères até mili-ampères.

A sonda condutora utilizada para varrer a amostra é posta para oscilar, próxima da superfície, em contato intermitente. A amplitude e a fase ou frequência de oscilação são utilizadas por um sistema de realimentação para controlar a distância entre a ponta da sonda e a superfície. Quando a ponteira se aproxima da amostra, as forças que agem entre elas diminuem a amplitude de oscilação e modificam a fase. A voltagem necessária para controlar o movimento da cerâmica piezolétrica que mantém a amplitude constante é detectada e transformada, por meio de um software, em uma imagem topográfica, da mesma forma que em um microscópio de força atômica.

Além de adquirir uma imagem da corrente associada à topografia, a sonda pode ser movida para um local específico de interesse, e então, a tensão é aumentada enquanto a corrente é medida para gerar uma curva da corrente local versus a tensão (curva-IV).

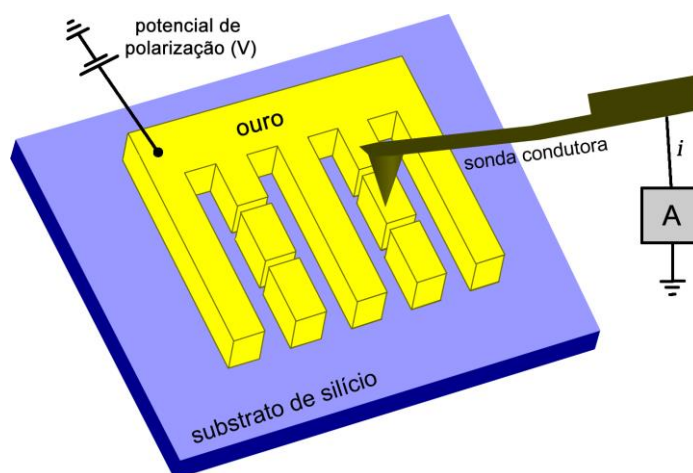
Vários tipos de sondas condutoras podem ser usadas em C-AFM, mas as de maiores sucesso são as sondas com fios de platina ou as revestidas com diamantes. Além de ter uma boa condutividade, o diamante é resistente ao aquecimento e desgaste da ponta, no entanto, apresenta o custo mais elevado entre as sondas de C-AFM. Já as sondas com fios de platina, além de apresentarem boa condutividade são mais resistentes ao aquecimento do que, por exemplo, as sondas de ouro. A principal vantagem de C-AFM em comparação com outras de técnicas de medidas elétricas padrões é a elevada resolução espacial. Por exemplo, nós temos realizado medidas de C-AFM em eletrodos de ouro e associado a corrente elétrica à topografia da amostra. Além disso, temos realizado também medidas de

C-AFM em cerâmicas de titanato de bário semicondutor e temos sido capazes de identificar diferenças na intensidade da corrente elétrica, entre as fronteiras e o interior dos grãos.

2.1.2 Realizando medidas com C-AFM

A Figura 2.1 ilustra um típico experimento de C-AFM realizado em nosso laboratório, onde uma sonda condutora varre a superfície de uma amostra composta por um conjunto de eletrodos de ouro alinhados, unidos um ao outro por uma base de ouro em uma das suas extremidades. A amostra é construída de tal maneira que temos intercaladamente, eletrodos contínuos e eletrodos separados em pequenos pedaços de tamanhos iguais desconectados um do outro. A base dos eletrodos é conectada a um potencial de polarização, enquanto a sonda varre a superfície da amostra medindo a corrente elétrica nos eletrodos de ouro. Simultaneamente às medidas de corrente elétrica, a variação topográfica da mesma região da amostra é monitorada, permitindo correlacionar às propriedades elétricas com as características topográficas.

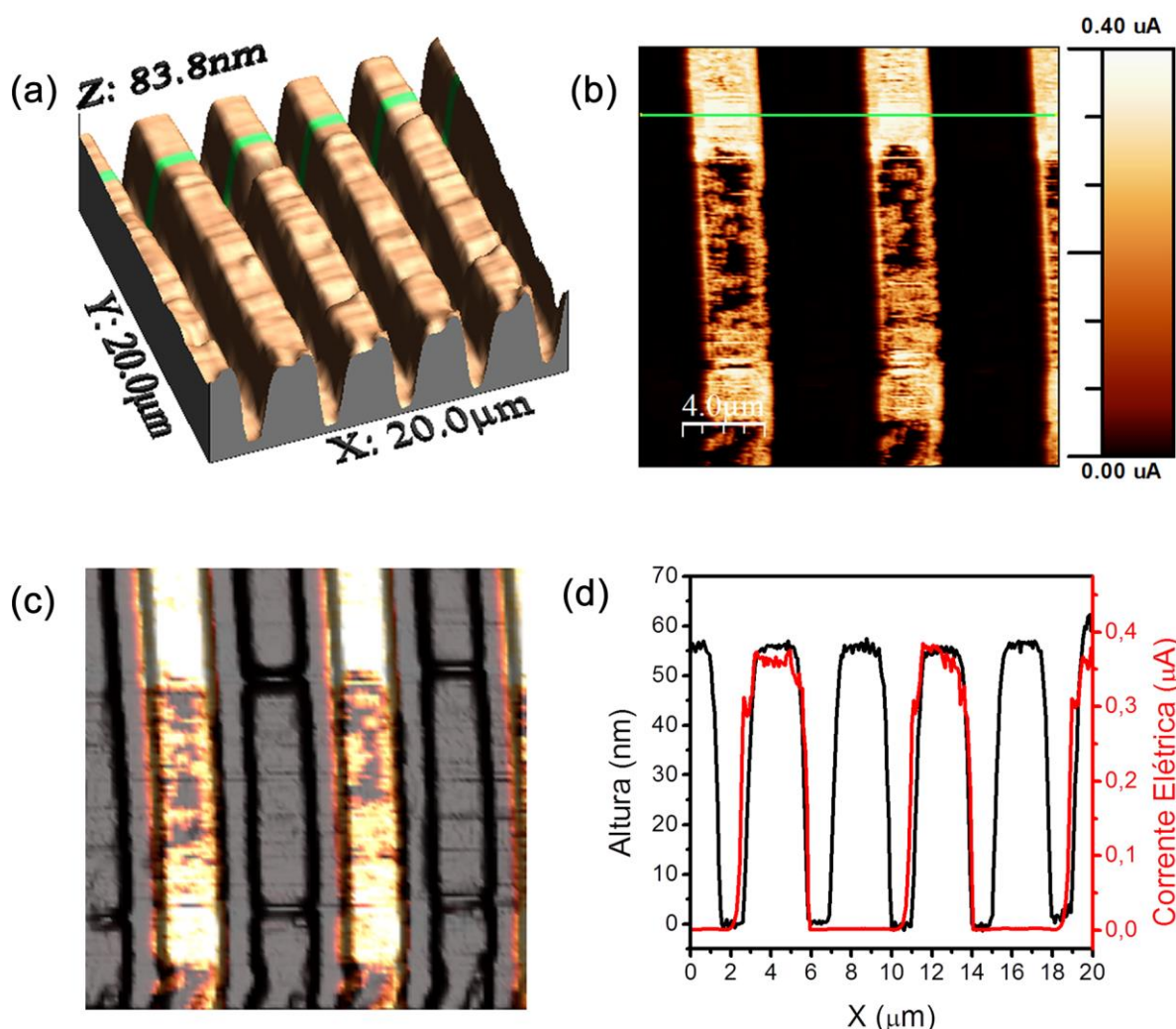
Figura 2.1 – Esquema da medida de C-AFM da corrente através de eletrodos de ouro.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 2.2(a) mostra a imagem topográfica tridimensional dos eletrodos de ouro sobre o substrato de silício. A área da medida é de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ e a altura média dos eletrodos é de 55nm . A Figura 2.2(b) mostra a intensidade da corrente elétrica nestes eletrodos. Acreditamos que os pontos onde ocorre uma queda na condução sobre os eletrodos de ouro são devido à poeira acumulada na superfície ou instabilidades no sistema de realimentação que levam a diminuição na força da interação ponta-amostra, afetando ligeiramente o contato elétrico entre a ponta e a amostra.

Figura 2.2 – Imagem (a) topográfica e de (b) da corrente elétrica nos eletrodos de ouro. (c) Imagem da corrente elétrica sobreposta a imagem topográfica. (d) Perfil topográfico (linha preta) e de corrente elétrica (linha vermelha), correspondente às traços em verdes nas imagens de topografia e elétricas.



Fonte: Elaborada pelo autor

O mapa da corrente elétrica na amostra é superposto à imagem topográfica na Figura 2.2(c). É possível notar que os eletrodos que apresentaram corrente elétrica estão intercalados por eletrodos onde nenhuma corrente elétrica foi observada. Isto se deve ao fato de que estes eletrodos são constituídos por pequenos pedaços de tamanhos iguais desconectados um do outro, de maneira que não há um potencial de polarização conectado a eles. A Figura 2.2(d) mostra o perfil topográfico (linha preta) e o da corrente elétrica (linha vermelha), tomados na mesma posição sobre a amostra. Estes perfis correspondem aos traços verdes nas imagens topográficas e da corrente elétrica na Figura 2.2(a) e (b).

As medidas da topografia e da corrente elétrica da amostra, exibidas na Figura 2.2, foram realizadas com um C-AFM (Multiview 4000TM) operando em modo intermitente, com

uma sonda de medidas elétricas com fio de platina, de diâmetro da ponta de 200nm. O potencial de polaridade (Bias) aplicado à amostra foi de +4V, enquanto que a corrente elétrica obtida sobre os eletrodos de ouro foram da ordem de $0,4\mu A$.

Os resultados mostram que o C-AFM é uma ferramenta adequada para medições da condução da corrente elétrica na superfície de amostras em nano-escalas, bem como sua correlação com as características topográficas da amostra. A seguir mostraremos os resultados da sondagem direta por C-AFM de cerâmicas de titanato de bário semiconductor. Os achados mostrarão que é possível identificar diferenças na condução da corrente elétrica, entre as fronteiras e o interior dos grãos.

2.1.3 Sondagem direta de titanato de bário semiconductor por meio de C-AFM

Materiais cerâmicos a base de titanato de bário ($BaTiO_3$ – BT) têm sido largamente estudados nos últimos anos. Este tipo de material possui uma vasta aplicação industrial principalmente como capacitores cerâmicos multicamadas (MLCC), devido a sua alta constante dielétrica e sua boa estabilidade com a variação da temperatura, e como dispositivos termistores, devido à variação de sua resistividade com a temperatura^{57; 58}.

Quando puro o BT é um isolante, mas pode adquirir um comportamento semiconductor com a introdução de dopantes, tanto trivalentes quando ocupam o sítio do Ba quanto pentavalentes no sítio do Ti. De fato, as amostras de BT dopadas, por exemplo, com Lantânio e Manganês em geral apresentaram caráter semiconductor e um salto maior da resistividade em função da temperatura.

Como as características elétricas do titanato de bário dependem fortemente das suas condições de síntese e processamento, neste trabalho realizamos medidas da condução da corrente elétrica, por meio da técnica de C-AFM, em cerâmicas de titanato de bário dopadas com lantânio e co-dopadas com manganês (BTL:Mn), obtidas pelo método de reação de estado sólido e sinterizadas a laser, visando entender melhor as características das propriedades elétricas deste material cerâmico.

Para melhor entender as mudanças na condutividade entre o interior e as bordas dos grãos cerâmicos de BTL:Mn, as cerâmicas foram polidas e os grãos revelados por ataque químico. Para isto, uma pequena pastilha cerâmica de BTL:Mn, de 5mm de diâmetro foi mergulhada em ácido por 5 minutos, em seguida lavada e mergulhada em álcool

isopropílico, num ultrassom por 10 minutos. Após secas as amostras foram fixas a um substrato de vidro com tinta de prata e um potencial de polaridade (Bias) de +10 V foi aplicado à amostra.

As medidas foram realizadas com um microscópio de força atômica condutora (Multiview 4000TM) operando em modo intermitente, com sondas de medidas elétricas com fios de platina de diâmetro da ponta de 100nm. A área medida é de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. Simultaneamente as medidas da topografia, na mesma região e com a mesma sonda, foram tomadas as medidas de corrente elétrica.

A Figura 2.3(a) mostra a imagem topográfica tridimensional da área varrida. A partir da imagem topográfica observamos que os grãos cerâmicos de BTL:Mn possuíam diâmetro médio entre 6 e $8\mu\text{m}$. As regiões de interior e bordas dos grãos foram bem evidenciadas através de imagem topográfica.

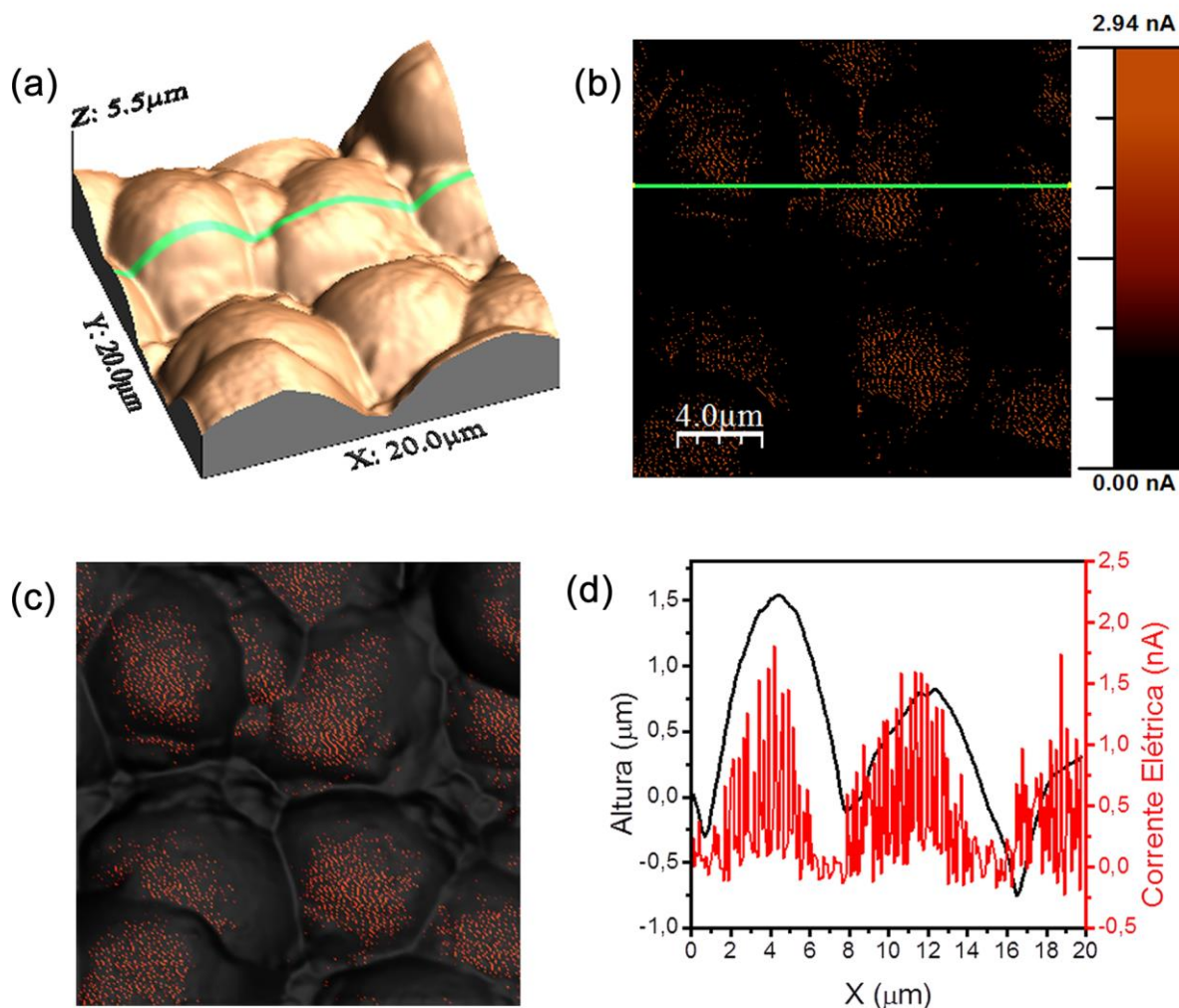
A Figura 2.3(b) mostra a imagem da corrente elétrica da área varrida e é possível identificar as regiões com maior ou menor condução de corrente elétrica, para então, correlacioná-las à topografia da amostra.

A Figura 2.3(c) mostra o mapa da corrente elétrica, sobreposto à imagem topográfica. Os pontos coloridos na imagem representam as regiões mais condutoras da amostra, onde a corrente elétrica foi mais intensa. De fato, a imagem mostra que as regiões com melhor condução da corrente elétrica estão localizadas nas regiões centrais dos grãos, enquanto que as bordas são apresentaram menor condução da corrente elétrica por apresentarem maior resistividade que o centro do grão.

A Figura 2.3(d) mostra um gráfico dos perfis topográfico e da corrente elétrica das medidas de C-AFM. As medidas são tomadas simultaneamente com a mesma sonda sobre os grãos cerâmicos de BTL:Mn. Os perfis são plotados no mesmo gráfico para fins de comparação entre a topografia e a condução da corrente elétrica.

Nossos resultados mostram que o C-AFM é uma técnica muito atraente para a realização de medições de transporte elétrico em nano-escala, bem como para a caracterização de propriedades elétricas de diversos materiais. De fato, o C-AFM tem se mostrado ideal para o estudo do transporte elétrico em dispositivos microfabricados semicondutores, conjuntos de nanopartículas e moléculas biológicas individuais.

Figura 2.3 – Imagem da (a) topografia e da (b) corrente elétrica de grãos cerâmicos de BTL:Mn. (c) Mapa da corrente elétrica sobreposto à imagem topográfica. (d) Perfil topográfico (linha preta) e da corrente elétrica (linha vermelha), tomados na região correspondente aos traços em verdes nas imagens de topografia e elétricas.



Fonte: Elaborada pelo autor

2.2 Microscopia Óptica de Varredura em Campo Próximo

O progresso na ciência e tecnologia é muitas vezes acompanhado pelo surgimento de novas técnicas e instrumentações. Nas palavras da Prêmio Nobel em medicina Rosalyn Yalow, "novas verdades se tornam evidentes quando novas ferramentas se tornam disponíveis". Temos aumentado a nossa compreensão de fenômenos físicos que vão desde a estrutura atômica dos supercondutores à estrutura e função das células vivas, especialmente, devido ao desenvolvimento e a implementação de novas técnicas de microscopia. Avanços à parte, numerosos desafios ainda permanecem.

A Microscopia Óptica de Varredura em Campo Próximo (SNOM) está na vanguarda da ciência e da tecnologia atual, porque combina as potencialidades da tecnologia da varredura por sonda com o poder da microscopia óptica. O SNOM nos fornece “olhos” para o nanomundo. Entre os principais parâmetros que podem ser de interesse em uma nanoestrutura sob investigação estão, além da forma e do tamanho, sua composição química, sua estrutura molecular, bem como suas propriedades dinâmicas. A fim de investigar tais propriedades, são necessários microscópios com alta resolução espacial, bem como alto poder de resolução espectral e temporal. O microscópio óptico clássico distingue-se no que diz respeito à seletividade espectroscópica e temporal, embora a sua resolução espacial seja restrita por difração a cerca de metade do comprimento de onda, ou seja, 0,2-0,5 micrômetros para a luz visível. A ciência e a tecnologia dos dias atuais têm, no entanto, uma necessidade crescente de ferramentas que permitam caracterizar e manipular estruturas tão pequenas quanto alguns nanômetros de tamanho. Exemplos são facilmente encontrados na Física, na microeletrônica e nas ciências biológicas.

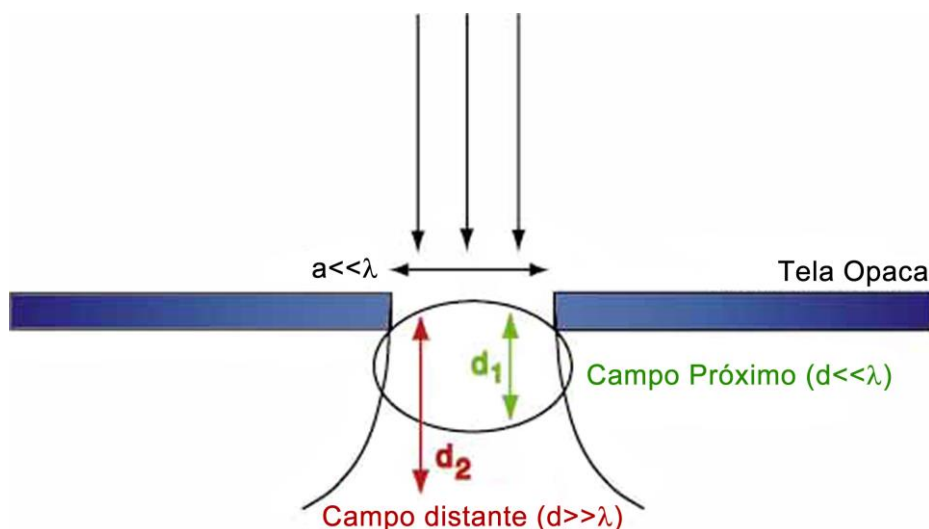
Os microscópios eletrônicos e os microscópios de força atômica alcançam facilmente resolução espacial de $10nm$ ou menos, mas eles são relativamente “pobres” em relação a propriedades espectrais e dinâmicas. Os microscópios eletrônicos têm que ser operado à vácuo e requer uma preparação especial da amostra, o que limita sua aplicação em ciências biológicas. No entanto, o SNOM combina a excelente seletividade espectroscópica e temporal da microscopia óptica clássica com uma resolução lateral que atinge facilmente o regime sub- $100nm$. A óptica de campo próximo tornou-se, portanto, um importante foco de pesquisa e desenvolvimento para campo da microscopia óptica nas últimas décadas^{59; 60; 61}. Hoje, chegamos ao ponto em que o SNOM representa uma poderosa ferramenta, para a análise de superfícies, que é técnica e teoricamente bem compreendida. O SNOM está pronto para aplicações a uma grande variedade de problemas na física, química e biologia.

2.2.1 A história da microscopia de campo próximo

Em 1928, Syngge, um cientista irlandês, descreveu um esquema experimental que permitiria a resolução óptica de estender-se para o regime de nanômetros⁶². Ele propôs o uso de uma fonte de luz bem intensa por trás de uma tela de metal fina, opaca, com um buraco de $100nm$ de diâmetro na placa, que serviria como uma fonte de luz pontual (Figura 2.4). O pequeno ponto de luz criado desta forma deveria ser usado para iluminar localmente

uma seção biológica fina. A fim de garantir a iluminação local, ele impôs a condição de que a abertura na placa de metal não deveria ficar mais longe da amostra do que o diâmetro da abertura, ou seja, inferior a 100nm . As imagens deveriam ser gravadas, ponto por ponto detectando a luz transmitida pela secção biológica por meio de um detector de foto sensível.

Figura 2.4 – Esquema da iluminação em campo próximo proposto por Syngé. Uma abertura de diâmetro $a \ll \lambda$ é feita numa placa plana. O campo evanescente através abertura decai rapidamente, iluminando apenas até um comprimento d_1 , o campo próximo. A luz de campo distante também está presente para uma distância d_2 .



Fonte: Elaborada pelo autor

Com a sua proposta, Syngé estava bem à frente de seu tempo. Infelizmente, ele nunca tentou realizar a sua ideia. Em 1932, ele, na verdade, propôs uma alternativa, descartando seu plano inicial, devido à difícil aproximação da amostra para uma tela plana⁶³. Por conseguinte, ele sugeriu a utilização da imagem de uma fonte de luz pontual como uma sonda óptica em vez de uma abertura. A imagem seria gerada por um espelho elipsoidal, que iria proporcionar, em palavras modernas, a maior abertura numérica possível. Ironicamente, este segundo esquema nunca alcançaria resolução tipo-SNOM, uma vez que ele ignorou o papel dos campos próximos que não podem ser recuperados por nenhum esquema de imagem convencional, não importa qual seja a abertura numérica.

Em 1984, logo após a invenção do STM⁷, a tecnologia de posicionamento à escala nanométrica tornou-se disponível, e um microscópio óptico semelhante ao esquema proposto e esquecido por Syngé foi reinventado e demonstrado por Pohl, juntamente com Denk e Duerig no laboratório de pesquisas da IBM em Rüschlikon^{24; 59}. Independentemente, um esquema semelhante foi proposto e desenvolvido por Aaron Lewis e seu grupo na Universidade de Cornell^{64; 65; 66}. A principal inovação foi a fabricação de uma abertura óptica

de sub comprimento de onda no ápice da extremidade de uma sonda pontiaguda transparente que foi revestida com um metal. Além disso, a realimentação em loop foi implementada para manter constante a separação ponta-amostra de apenas alguns nanômetros, durante a varredura da amostra em estreita proximidade com a sonda fixa.

2.2.2 A física da microscopia de campo próximo

No início da década de 1870, Ernst Abbe formulou um rigoroso critério que expressava a resolução espacial de um microscópio óptico limitado pela difração da luz por

$$\Delta x = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (2.1)$$

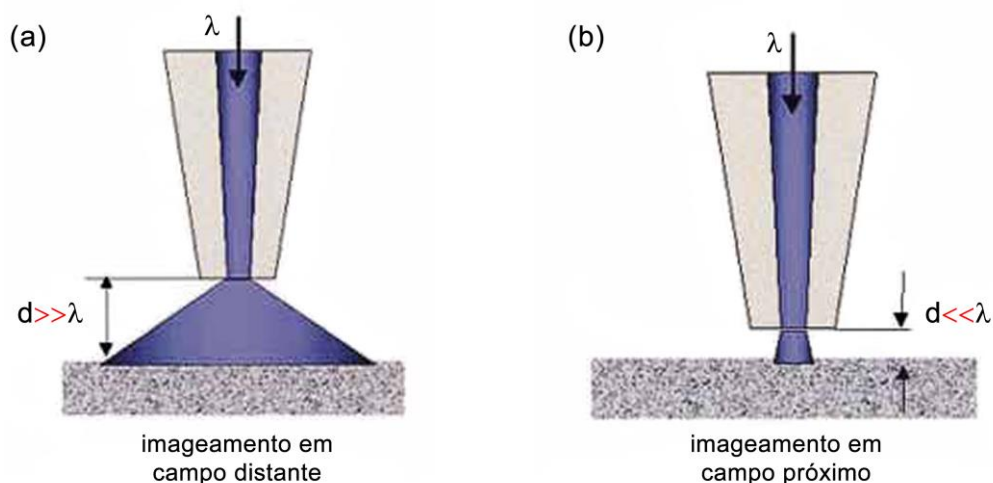
onde Δx é a distância entre os dois objetos, λ é o comprimento de onda da luz incidente, e $NA = n \sin \theta$ é a abertura numérica na lente objetiva através da qual a luz é coletada.

De acordo com a equação (2.1), a resolução espacial dos microscópios de ópticos clássicos é limitada à cerca de $200nm$ pela necessidade prática de ter a ótica de coleção, da lente objetiva ou equivalente, a uma distância do objeto observado que é várias vezes o comprimento de onda, λ , da luz incidente (Figura 2.5(a)). A esta distância, as altas frequências espaciais da imagem - as componentes que dão informações sobre as menores características do objeto - não são coletadas pelo imageamento óptico e não contribuem para a formação da imagem. É este fenômeno, ao invés da física da própria luz, que define o limite de difração $\lambda/2$.

Com a introdução do SNOM, essa limitação deixa de existir, e a resolução óptica abaixo de $50nm$ pode ser alcançada. A razão disso é que se a ótica de coleção ou de iluminação puder ser trazida para mais perto do objeto, a uma distância muito pequena ($d \ll \lambda$) de sua superfície (Figura 2.5(b)), então, as altas frequências espaciais podem ser resolvidas, ao preço de se reconstruir a imagem a partir da varredura óptica sobre toda a amostra. Uma forma eficiente de fazer isto é iluminar a amostra no campo distante e coletar a luz com uma abertura com diâmetro $a \ll \lambda$ a uma distância de alguns nanômetros da superfície do objeto. O posicionamento a esta distância permite a coleta da luz, vinda da amostra, que de outra forma seriam perdidas pela coleção em campo distante. A outra forma é iluminar a amostra com uma abertura de diâmetro $a \ll \lambda$ a uma distância de alguns nanômetros da superfície do objeto ($d \ll \lambda$) e coletar a luz espalhada no campo distante. A

iluminação através da abertura a esta distância, faz com que a luz incidente atinja a amostra e interaja com ela antes que seja difratada e perdida.

Figura 2.5 – Comparação de imageamento de uma amostra em campo distante e em campo próximo. (a) No imageamento em campo distante a fonte de luz e o elemento que coleta a luz está separado da amostra por uma distância, $d \gg \lambda$, o comprimento de onda da luz usada para a iluminação. A luz é difratada, de modo que a área iluminada é muito maior do que a abertura. Detalhes de sub-comprimento de onda da imagem são perdidos. (b) No imageamento em campo próximo a óptica de iluminação ou coleção está separada da amostra por uma distância, $d \ll \lambda$. A área iluminada corresponde ao tamanho da abertura do sistema óptico.



Fonte: Elaborada pelo autor

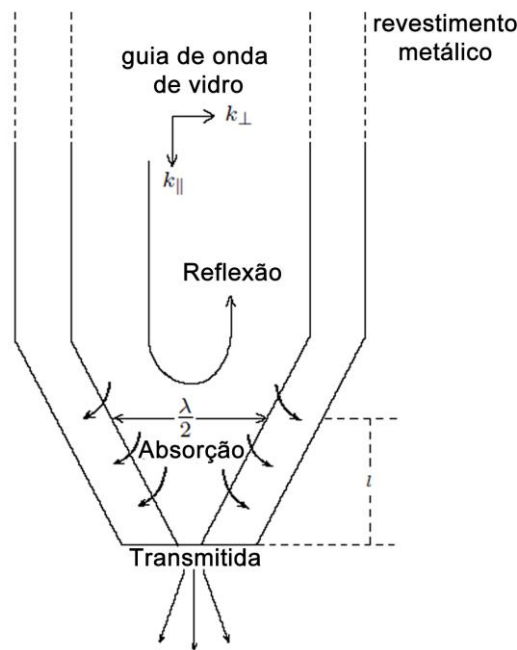
De fato, o SNOM combina a ideia de coleção do campo óptico na "zona próxima" (ver Capítulo 9 da Ref. [67]) de uma superfície de interesse com a técnica de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM).

2.2.3 Microscopia de campo próximo baseada em sondas com abertura

A primeira realização experimental da idéia de Synge para a microscopia de campo próximo só foi possível, 56 anos após sua proposta²⁴. Embora a ideia básica seja a mesma, os SNOMs comuns utilizados nos laboratórios de hoje, varrem uma pequena abertura na extremidade de uma fibra óptica afunilada em vez de uma tela opaca plana. A extremidade da fibra com a abertura é colocada muito próxima da superfície de uma amostra, enquanto que a radiação óptica é enviada através da fibra e da abertura para a superfície da amostra. Esta extremidade da ponta da fibra é geralmente revestida com metais para proteger, de forma eficaz, contra o vazamento da luz através das paredes laterais de fibra. No final do revestimento metálico da fibra um pequeno furo é aberto. A Figura 2.6 mostra um esboço de uma sonda SNOM feita de fibra de vidro com um revestimento metálico e uma abertura no seu vértice. O guia de onda de vidro é afunilado e revestido com um metal.

Como ilustrado na Figura 2.6, a maior parte do campo incidente na abertura do guia de onda é refletida de volta devido ao comprimento de onda e a dependência do diâmetro de corte do guia de onda. No vértice da região abaixo do diâmetro de corte $\lambda/2$, o campo possui um vetor de onda imaginário, o que significa uma amplitude de campo decaindo exponencial. De fato, a amplitude do campo na abertura é atenuada por um fator $e^{-k_{\parallel}l}$, onde k_{\parallel} é a componente paralela do vetor de onda e l é a distância entre a abertura e o diâmetro de corte $\lambda/2$. Além disso, nesta faixa o revestimento metálico dá origem a uma dissipação de campo significativa por causa da absorção.

Figura 2.6 – Ilustração de uma sonda de SNOM com abertura.



Fonte: Elaborada pelo autor

Para conseguir o melhor desempenho possível em SNOM baseado em sondas com abertura, a sonda óptica deve combinar duas propriedades fundamentais: (i) o tamanho do ponto de luz determinado pelo diâmetro da abertura deve ser tão pequeno quanto possível. Ao mesmo tempo, (ii) a intensidade da luz na abertura deve ser tão alta quanto possível. Finalmente, por razões práticas, a entrega da luz na vizinhança da abertura deve ser o mais fácil possível.

A resolução lateral e o coeficiente de transmissão óptico

A resolução lateral do SNOM é basicamente determinada pelo diâmetro da abertura da sonda. Os métodos mais comuns para a fabricação de sondas permitem a obtenção de

abertura de diâmetros do tamanho $100nm$. Em alguns casos extremos, o diâmetro pode ir até $50nm$ ou menos. Embora as melhorias técnicas em nano fabricação de sondas possam realmente produzir aberturas de tamanhos ainda menores, outra limitação básica é definida pela taxa de transferência da potência óptica. A radiação óptica na fibra se desloca com um vetor de onda $k = k_{\parallel} + k_{\perp}$, onde k_{\parallel} é a componente do vetor de onda ao longo do eixo da fibra e k_{\perp} é a componente do vetor de onda perpendicular ao eixo da fibra. Ao mesmo tempo, a magnitude vetor de onda é dada por

$$k^2 = \mu\epsilon\omega^2 = \frac{4\pi^2}{\lambda^2} \quad (2.2)$$

onde $\omega = 2\pi c/\lambda$ é a frequência angular e λ é o comprimento de onda com μ e ϵ denotando a permeabilidade e a constante dielétrica do meio, respectivamente. A propagação do campo na fibra óptica cessa quando

$$k_{\parallel} = 0 \quad (2.3)$$

e

$$k_{\perp} = \frac{2\pi}{\lambda}. \quad (2.4)$$

Esta condição é satisfeita quando o diâmetro da fibra determinando k_{\perp} é igual a $\lambda/2$, na posição axial r_0 , como mostrado na Figura 2.6. Nesta posição, a maior parte da energia incidente será refletida de volta pela fibra óptica. Na faixa abaixo de r_0 , onde o diâmetro é menor do que $\lambda/2$, a componente paralela do vetor de onda é imaginária uma vez que a componente perpendicular se tornará

$$k_{\perp} > \frac{2\pi}{\lambda} \Rightarrow k_{\parallel}^2 = \frac{4\pi^2}{\lambda^2} - k_{\perp}^2 < 0 \quad (2.5)$$

$$\Rightarrow k_{\parallel} = i|k_{\parallel}|. \quad (2.6)$$

O campo óptico nesta faixa mostra um comportamento evanescente decrescendo exponencialmente como

$$E = E_0 e^{-|k_{\parallel}|(r-r_0)} \quad (2.7)$$

o que significa que a amplitude do campo diminui exponencialmente em direção à abertura. Em adição a este corte geométrico resultante de um decréscimo exponencial na amplitude

do campo, o revestimento metálico em torno da fibra atenua o campo por causa da absorção. A amplitude de entrada E_0 não pode ser aumentada para valores arbitrariamente elevados, a fim de aumentar a amplitude na abertura, uma vez que a absorção pode danificar o revestimento metálico, devido à geração de calor excessivo. Os coeficientes de transmissão óptico em sondas de SNOM padrão têm sido relatados⁶⁸ como sendo em torno de 10^{-6} a 10^{-5} .

2.2.4 A configuração básica e os modos de SNOM

Como temos visto, o princípio básico do SNOM consiste em passar a luz através de uma abertura com diâmetro de sub-comprimento de onda e iluminar uma amostra que é colocado dentro da região do seu campo próximo, a uma distância muito menor do que o comprimento de onda da luz.

Desta forma, a fim de realizar experimentos com SNOM, uma fonte pontual de luz tem de ser trazida para perto (dentro de nanômetros) da superfície que será analisada. A fonte de pontual luz deve, então, varrer a superfície da amostra, e o sinal óptico através da superfície tem de ser coletado e detectado.

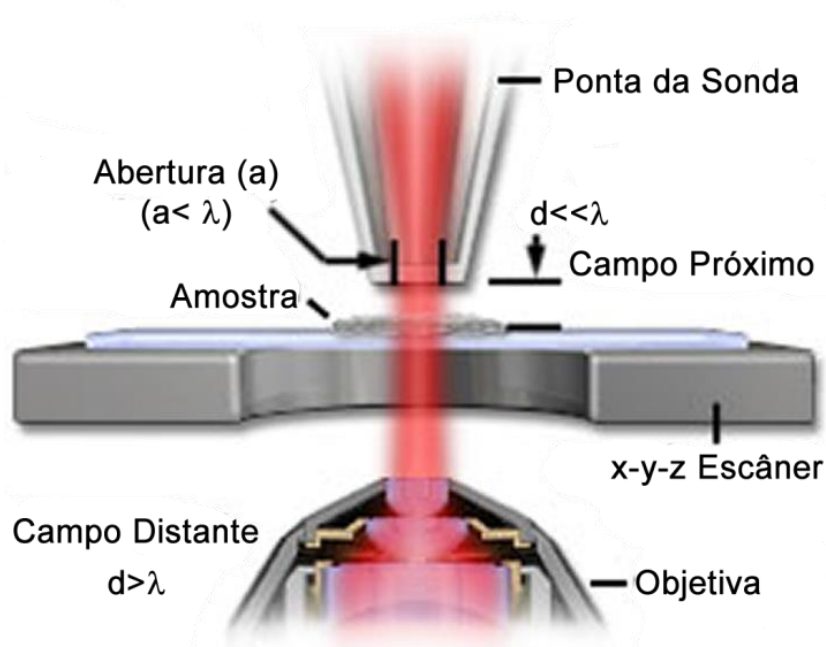
Neste trabalho utilizamos, como fonte pontual de luz, sondas fabricadas com fibras ópticas cônicas que são revestidas com um metal, exceto numa abertura na ponta da fibra. A luz é acoplada na fibra e, então, é emitida na abertura de sub-comprimento de onda (50nm ou menor) da fibra. A distância entre a fonte pontual de luz e a superfície da amostra geralmente é controlada por meio de um mecanismo de realimentação que não está relacionado com o sinal do SNOM.

Uma representação do esquema típico de imageamento por SNOM é apresentado na Figura 2.7, na qual uma sonda iluminante que tem uma abertura, com diâmetro menor do que o comprimento de onda da luz, é mantida no campo próximo da superfície da amostra. Além disso, um escâner xyz (geralmente piezoelétrico) é utilizado para controlar o movimento da sonda sobre a amostra.

Uma vez que uma separação, menor que o comprimento de onda da luz incidente, ou o contato entre a amostra e a sonda é um requisito geral para a obtenção de resolução não limitada pela difração, a grande maioria dos SPMs exigem um sistema de realimentação que controla precisamente a separação física entre a sonda e a amostra. Atualmente, a maioria

dos instrumentos utiliza um de dois tipos de realimentação: A realimentação de força normal ou de força de cisalhamento.

Figura 2.7 – Ilustração de uma esquema de imageamento com SNOM por transmissão. A objetiva é posicionada no campo distante, para a coleta do sinal óptico.



Fonte: www.olympusmicro.com (direitos autorais reservados à Olympus Corporation)

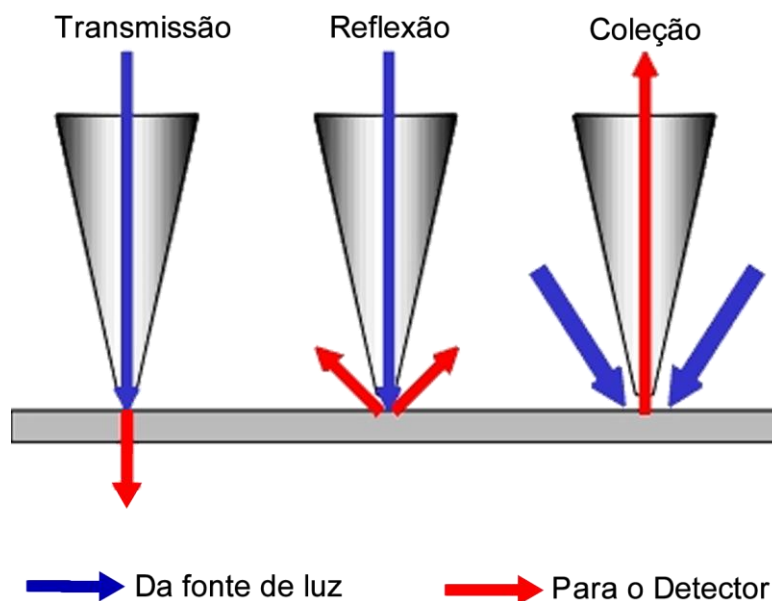
Nos dois tipos de realimentação, a ponta está montada em um diapasão, o qual é feito oscilar na sua frequência de ressonância sobre a amostra. A amplitude desta oscilação é fortemente dependente da distância ponta-superfície, e pode ser eficazmente usado como um sinal de realimentação.

A realimentação de força normal (modo de realimentação padrão utilizado no AFM) permite realizar experimentos no modo contato e no modo de contato intermitente. A realimentação de força de cisalhamento não é muito bem compreendida, e há uma grande quantidade de artefatos nas imagens topográficas que se obtém utilizando este método⁶⁹.

Modos de imageamento SNOM

Atualmente, há três possíveis modos de imageamento com SNOM no sistema multi-sondas Multiview 4000TM, utilizado em nosso laboratório. São eles os modos de imageamento por transmissão, reflexão e coleção. A Figura 2.8 ilustra os três modos de imageamento do SNOM.

Figura 2.8 – Esquema ilustrativo dos três diferentes modos de imageamento com SNOM possíveis em nosso laboratório.



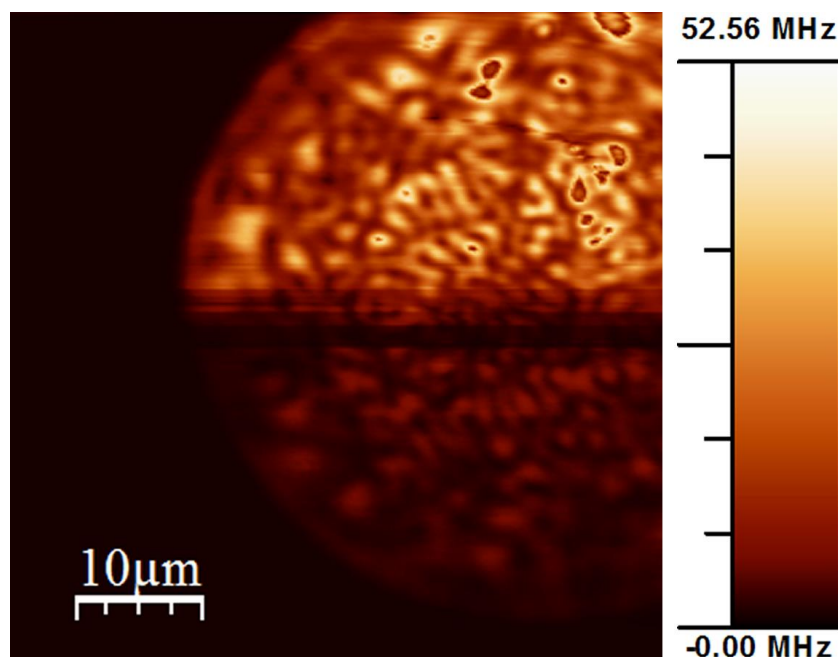
Fonte: Elaborada pelo autor

No modo de imageamento por transmissão, a amostra é iluminada pela sonda, e a luz passando através da amostra é coletada e detectada. No modo de imageamento por reflexão a amostra é iluminada pela sonda, e a luz refletida da superfície da amostra é coletada e detectada. No modo de imageamento por coleção a amostra é iluminada com uma fonte de luz macroscópica da parte superior ou inferior, e a sonda é usada para coletar a luz da superfície da amostra.

A detecção da luz captada pode ser conseguida com uma ampla variedade de instrumentos, tais como: um foto diodo avalanche (APD), um tubo fotomultiplicador (PMT), uma CCD, ou um espectrômetro. Os sinais obtidos por estes detectores são repassados para o computador, que por sua vez os transformam em uma imagem de SNOM da superfície.

A Figura 2.9 e a Figura 2.10 mostram exemplos de imagens de SNOM realizada em nosso laboratório. A Figura 2.9 mostra uma imagem de SNOM, em modo de coleção, de uma fibra óptica multimodo. Um laser de onda contínua (cw) e comprimento de onda de 532nm é acoplado a uma das extremidades de uma fibra óptica multimodo, enquanto a outra extremidade da fibra é varrida por uma sonda de SNOM com abertura de 150nm, em contato intermitente. A informação coletada no campo próximo da saída da fibra pela sonda é enviada para um APD, enquanto um software grava o sinal do APD convertendo-o numa imagem de SNOM.

Figura 2.9 – Imagem de SNOM em modo de coleção de uma fibra óptica multimodo.



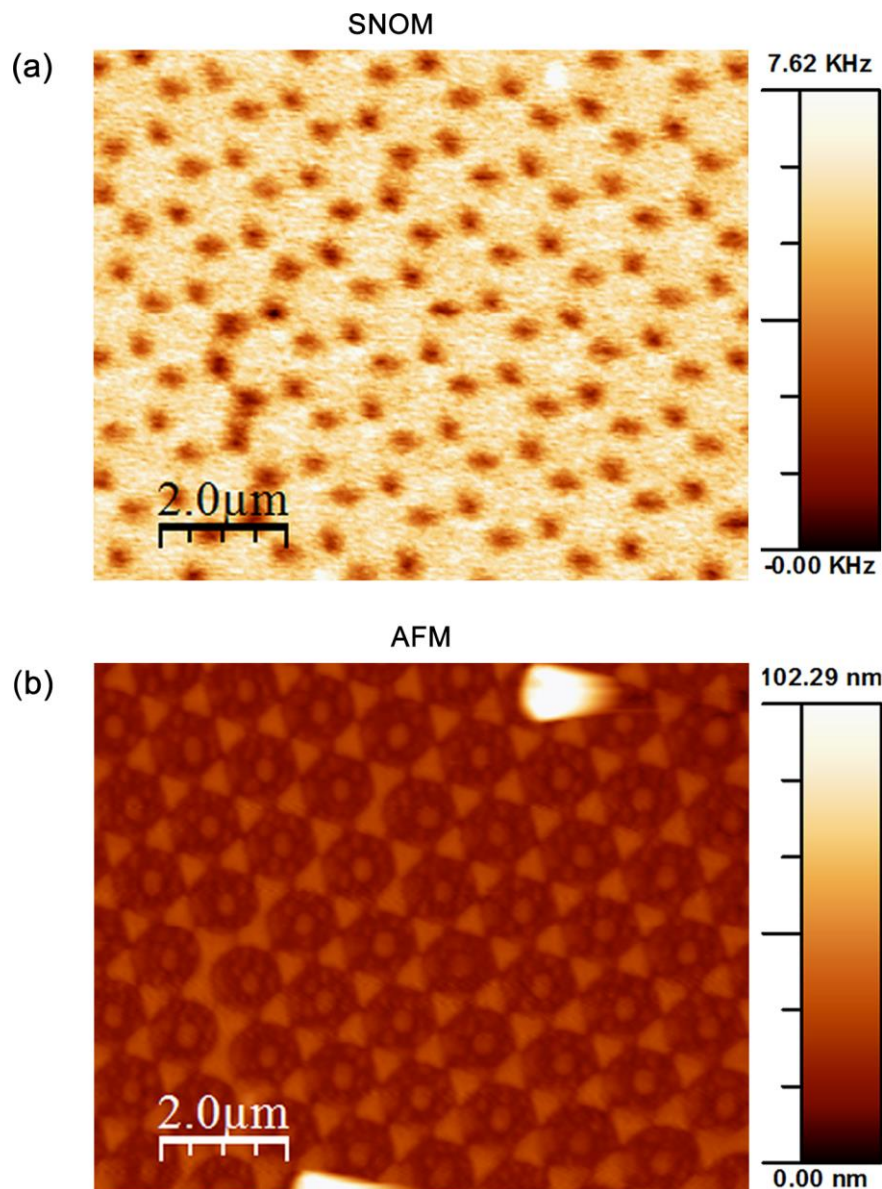
Fonte: Elaborada pelo autor

A diminuição da intensidade do campo próximo coletado na saída da fibra, na parte inferior da Figura 2.9, é devido a um aumento na distância média de separação ponta-amostra, levando assim a uma diminuição da intensidade do campo próximo coletado. As flutuações da distância média de separação ponta-amostra são provocadas por pequenas instabilidades no sistema, e podem ser minimizadas diminuindo-se a amplitude de oscilação da sonda sobre a amostra. Além disso, é possível monitorar estas flutuações em tempo real através do sinal de fase ou amplitude durante as medidas. Por meio destas informações, pode-se reajustar o set-point da força de interação ponta-amostra, reduzindo assim sua distância média.

A Figura 2.10 mostra as imagens topográficas e de SNOM, em modo de transmissão, de uma amostra comercial padrão (amostra Fischer) para microscopia de varredura por sonda, fornecida pela empresa alemã Kentax UHV (mais informações ver: <http://www.kentax.de/projection-pattern.html>). A amostra Fischer possui estruturas do tipo de nanoprismas de alumínio sobre um substrato de vidro de 0,15mm de espessura. Por causa da diferença na absorção da luz do laser entre o vidro e os nanoprismas de alumínio, um contraste entre as regiões do vidro e dos nanoprismas aparecem na imagem de SNOM. Os Nanoprismas de alumínio absorvem mais luz do laser que o vidro, e podem ser

diretamente identificados na imagem óptica de campo próximo pelas regiões mais escuras. A comparação entre as imagens de AFM e SNOM na Figura 2.10(a) e (b) permite correlacionar a medidas de SNOM com a topografia da amostra.

Figura 2.10 – Imagem de (a) SNOM e de (b) AFM de uma amostra comercial padrão para microscopia de varredura por sonda.



Fonte: Elaborada pelo autor

As informações que podem ser obtidas com um SNOM referem-se à observação de uma ampla variedade de propriedades ópticas dos materiais, como por exemplo: monitorando a intensidade de luz podem ser feitas imagens que resultem em dados do tipo transmissividade, reflexividade, polarização e índice de refração. Enquanto que o contraste

do comprimento de onda ou fluorescência, permite observar luminescência e fazer espectroscopia para, por exemplo, identificação química.

2.3 SNOM em Amostras Biológicas

2.3.1 A absorção de nanopartículas por células e o SNOM

Estudos que avaliem a identificação e a absorção de nanopartículas por células biológicas são de extrema importância para as atuais aplicações tecnológicas e biomédicas⁷⁰. Para compreender a interação entre nanopartículas e células biológicas, é crucial que sejamos capazes de detectar e localizá-las. Os métodos mais populares para a visualização de nanopartículas em células são a microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A TEM é um método popular de imageamento para o estudo das interações entre nanopartículas e células numa resolução em nano-escala. No entanto, a necessidade de que a amostra seja condutora dificulta a sua ampla utilização em amostras biológicas. Outro método popular de imageamento é a microscopia de fluorescência. De fato, ela é o principal método de imageamento em amostras biológicas. Mas para estudos intracelulares de nanopartículas, sua máxima resolução é limitada à metade do comprimento de onda da luz, pelo limite da difração⁷¹.

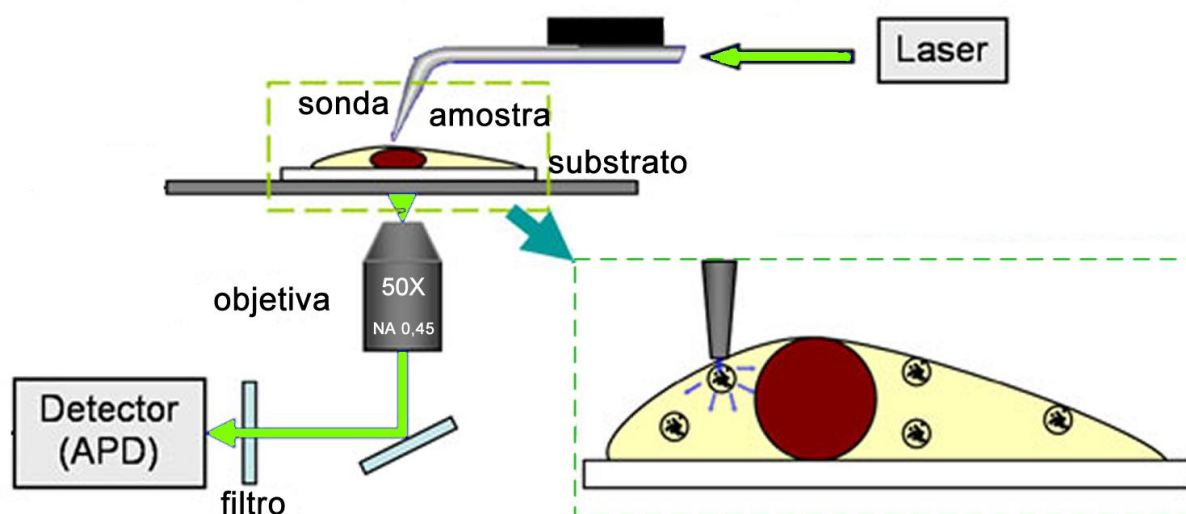
O SNOM nos fornece a capacidade de visualizar amostras biológicas em nano-escala através de ondas evanescentes^{72; 73}. Na verdade, quando aplicada em estudos de amostras biológicas, esta técnica pode trazer novas informações, as quais, em muitos casos, não poderiam ser obtidas por outras técnicas convencionais^{74; 75}. Neste estudo, sem a necessidade de marcação por fluorescência, nós caracterizamos a interação entre nanopartículas de ouro e células peritoneais de macrófagos através de medidas de SNOM em modo de transmissão. Este método nos permite gravar, simultaneamente, as informações ópticas transmitidas e as informações topográficas. As heterogeneidades que aparecem nas imagens ópticas de transmissão do campo próximo através das células podem indicar a localização espacial das nanopartículas de ouro devido às suas propriedades de absorção, significativamente diferentes das células.

2.3.2 Configuração Experimental

Neste trabalho, as células foram examinadas, sob condição ambiente, usando o sistema multi-sondas Multiview 4000™ da Nanonics. O sistema de SNOM está integrado a um sistema de microscopia óptica convencional de campo distante. Sondas de fibras ópticas com pontas com abertura de 50nm , em diapasão, foram utilizadas para imagens das nanopartícula e das células. Como temos visto nesta seção, o modo de transmissão e de reflexão em NSOM baseia-se na forma como a luz é coletada pelo detector. Para este estudo, utilizamos o NSOM em modo de transmissão para coletar a luz, depois que ela passa através da amostra. A fonte de iluminação é um laser de estado sólido bombeado por diodo (DPSS), de onda contínua (CW), no comprimento de onda $\lambda = 532\text{ nm}$. A luz transmitida foi coletada com uma objetiva de 50X, e abertura numérica (NA) de 0,45 e detectada com um APD (Perkin-Elmer). Todas as imagens foram processadas com o software de processamento de imagem WSxM⁷⁶.

A Figura 2.11 mostra uma ilustração esquemática da configuração experimental para a medida de NSOM, em modo de transmissão, a fim de investigar a endocitose de nanopartículas por células (macrófagos). A endocitose é o processo pelo qual as células vivas, ativamente absorvem materiais através da membrana das células.

Figura 2.11 – Ilustração da configuração experimental de uma medida de SNOM, em modo de transmissão, numa célula com nanopartículas de ouro.



Fonte: Elaborada pelo autor

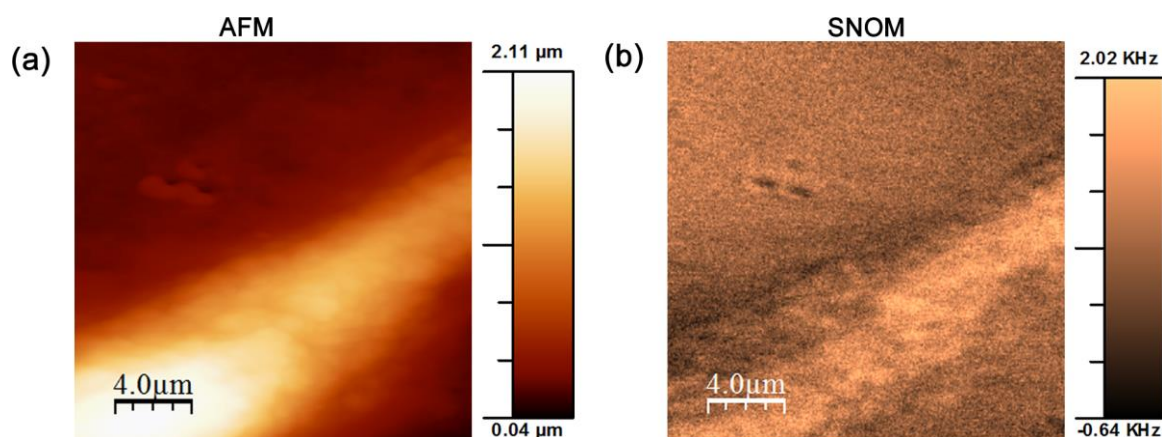
2.3.3 Medidas de SNOM em modo de transmissão em células

O modo de transmissão do SNOM é o modo preferido para investigar a endocitose de nanopartículas por células biológicas⁷⁰. A hipótese para isto é que, devido a uma diferença na absorção da luz em materiais diferentes, ocorre uma a diferença de contraste na imagem óptica de campo próximo, no modo de transmissão. Assim, este modo dará mais informações do que a imagem óptica de campo próximo no modo de reflexão.

De fato, por causa da diferença, na absorção da luz, entre as nanopartículas de ouro e as células, supõe-se que uma diferença de contraste irá aparecer na imagem óptica de campo próximo no modo de transmissão. Espera-se que as nanopartículas de ouro absorvam mais luz do laser do que as células. Assim, endocitose das nanopartículas poderiam ser visualizadas diretamente na imagem óptica de campo próximo, sem a necessidade de marcação fluorescente. Além disso, as imagens topográficas obtidas simultaneamente nos dão informações complementares.

No SNOM em modo de transmissão, por a ponta da sonda estar muito perto da amostra, ela induz o espalhamento do campo próximo evanescente na amostra. Na verdade, a onda evanescente é convertida em uma onda propagante, transportando o sinal da luz do campo próximo da amostra com uma resolução em nano-escala. Coletando o campo espalhado depois que ele passa através da amostra e enviando ao detector, uma imagem de NSOM é formada. A Figura 2.12 mostra a imagem topográfica e a imagem óptica de campo próximo por transmissão de células peritoneais sem incubação com nanopartículas de ouro.

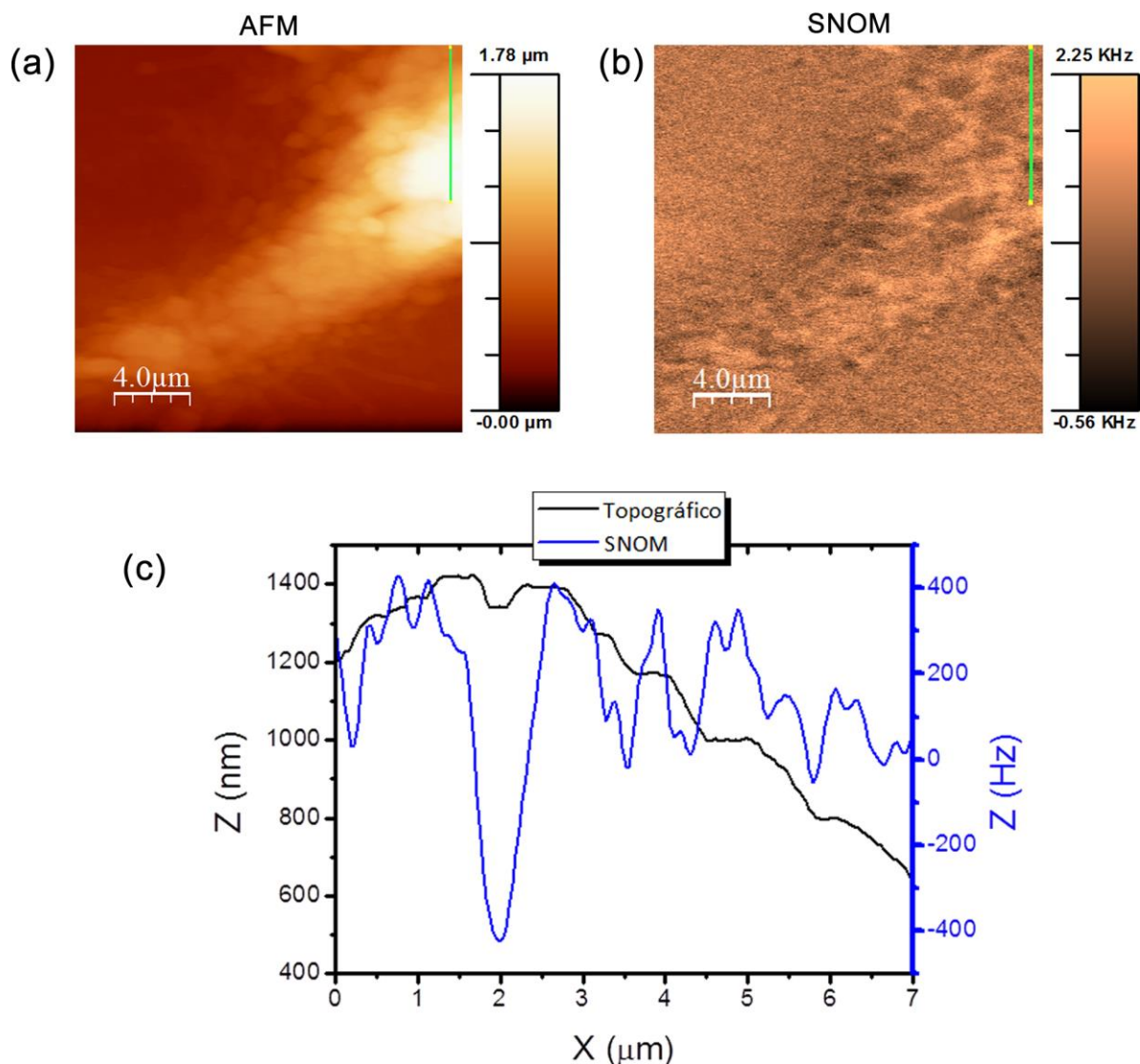
Figura 2.12 – Imagens (a) topográfica e (b) óptica de macrófagos peritoneais, sem tratamento com nanopartículas de ouro, coletadas simultaneamente pela medição de SNOM em modo de transmissão, com uma sonda de 100nm de abertura.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 2.13 mostra a imagem topográfica e a imagem óptica de campo próximo por transmissão de células peritoneais incubadas com nanopartículas de ouro. Embora as imagens topográficas das células peritoneais incubadas com nanopartículas sejam similares às imagens das células não incubadas com nanopartículas, há uma ligeira diferença nas imagens ópticas de campo próximo das células.

Figura 2.13 – Imagem (a) topográfica e (b) óptica tomada simultaneamente de células peritoneais tratadas com nanopartículas de ouro. (c) perfil topográfico e da intensidade transmitida tomadas no mesmo ponto, indicado pelas linhas verdes na parte A e B da Figura.



Fonte: Elaborada pelo autor

A imagem óptica de campo próximo por transmissão das células incubadas com nanopartículas de ouro, exibidas da Figura 2.13(b), possuem alguns pontos escuros que não são observados na imagem óptica de campo próximo por transmissão das células não incubadas com nanopartículas, exibidas na Figura 2.12. Este tipo de padrão pode indicar que

as nanopartículas de ouro foram absorvidas pelas células através da endocitose. Durante a endocitose, uma pequena porção da membrana plasmática da superfície da célula é invaginada para formar uma nova vesícula intracelular para transportar substâncias externas para dentro da célula⁷⁷.

De fato, os pontos mais escuros na imagem óptica de campo próximo da célula na Figura 2.13(b) são assinaturas padrões para vesículas carregadas de nanopartículas dentro da célula.

A Figura 2.13(c) mostra um perfil topográfico e da intensidade do sinal do campo próximo transmitido através da célula, tomadas no mesmo ponto, na região indicada pelas linhas verdes na Figura 2.13(a) e (b). Os perfis são plotados no mesmo gráfico para fins de comparação entre a topografia e a intensidade do sinal do campo próximo transmitido através da célula.

O tamanho do aglomerado das nanopartículas que identificamos nas imagens ópticas de campo próximo, não pode ser dado com precisão devido à limitação da profundidade de detecção do SNOM. A sensibilidade da detecção óptica do NSOM é determinada principalmente pelas dimensões da abertura das sondas e da profundidade de penetração do campo próximo na amostra⁷². Apesar do limite de detecção, pudemos ver que a microscopia AFM / NSOM oferece um poderoso método, sem a necessidade de marcação fluorescente, para estudar a interação entre as células e nanopartículas, e ainda com uma grande resolução em comparação com a microscopia óptica convencional.

Conclusão

Em resumo, nós examinamos macrófagos e sua interação com nanopartículas de ouro usando o sistema de SNOM por transmissão. A interação entre as células e as nanopartículas puderam ser estudadas e mapeadas sem necessidade de marcação fluorescente nas nanopartículas. O padrão óptico (pontos escuros) de assinatura para vesículas carregadas de nanopartículas dentro das células foram observadas. Além do mais, esta técnica de imageamento fornece um poderoso método livre de fluorescência para estudar a interação entre células e nanopartículas com uma resolução muito maior que a microscopia óptica convencional.

3 AFM NO ESTUDO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS: DA CÉLULA AO DNA

Neste capítulo discutiremos o uso da microscopia de força atômica para o estudo de amostras biológicas. Iniciaremos, apresentando os principais componentes estruturais envolvidos na mecânica celular, em seguida mostraremos como a adesão celular, mediada por integrinas, a uma matriz extracelular afeta o módulo elástico da célula por meio da reorganização do citoesqueleto. Por fim, estudaremos a adesão de uma molécula de DNA a superfície de uma mica modificada por poli-L-lisina e as mudanças de conformação do DNA devido ao tratamento com o timol.

3.1 Considerações Gerais

Uma das primeiras perguntas que vem à mente de um físico envolvido com estudos em amostras biológicas é se a física pode explicar a biologia. Na verdade, esta é uma pergunta difícil de responder, porque talvez não seja a pergunta correta a ser feita. A melhor pergunta seria: *Quais processos biológicos podem ser explicados pelas leis da física?* Já que a natureza parece ser regida pelas leis da física, parece óbvio que o comportamento, a estrutura e as funções das células, como parte da natureza, são limitados por e submetidos às leis da física. A física, por meio da biofísica celular, não procura explicar como as células são, mas o que podemos dizer sobre as células do ponto de vista físico.

Durante o último século, a biologia celular tem sido quase sempre avaliada do ponto de vista bioquímico: estudando como os estímulos bioquímicos modificam a composição bioquímica de células vivas. No entanto, a maioria das células que formam o nosso corpo exercem ou estão, constantemente, sujeitas a forças mecânicas. Como exemplo, podemos citar as células que exercem forças durante as contrações musculares, as células endoteliais vasculares que estão sujeitas às forças de cisalhamento devido ao fluxo contínuo de sangue e as células pulmonares que resistem às deformações cíclicas devido à respiração espontânea. Portanto, forças mecânicas estão presentes em quase todos os tipos de células e parece razoável que tais forças desempenhem um papel importante na determinação da

estrutura, composição e função da célula. O recente desenvolvimento de técnicas concebidas para manipular moléculas de DNA e células com resolução nanométrica, além de medir forças da ordem de piconewtons deu origem a novos campos de pesquisas.

O contínuo aumento de trabalhos relacionados às propriedades mecânicas de células, com funções celulares, tem demonstrado que a mecânica é tão importante quanto à bioquímica, ao nível celular. Desta forma, o principal objetivo deste capítulo é a discussão da aplicação de ferramentas físicas, tal como o microscópio de força atômica, para melhor compreender o mundo biológico.

3.2 Microscopia de Força Atômica Aplicada à Biologia Celular

Nas últimas décadas, o campo da mecânica celular tem crescido, rapidamente, devido ao surgimento de novas técnicas de micro e nanomanipulação. Estas ferramentas nos permitem imagear e manipular moléculas de DNA e células com resolução nanométrica e, simultaneamente, medir forças da ordem de pico e nanonewtons. Muitos instrumentos e técnicas especiais, tais como a Citometria de Torção Magnética⁷⁸ e Pinças Ópticas⁷⁹ têm sido usadas para estudar as propriedades viscoelásticas de células vivas e suas interações com o seu microambiente. Entre as técnicas envolvidas nestes estudos, uma das ferramentas mais útil e importante é o AFM. De fato, o AFM permite a obtenção, tanto de imagens topográficas quanto de medidas mecânicas em escalas de nanômetros e piconewton, respectivamente.

O AFM⁸ surgiu em 1986 e foi originalmente desenvolvido para a obtenção de imagens topográficas de superfícies, sem a necessidade de pré-preparações. No entanto, o AFM foi rapidamente aplicado para a medição de propriedades mecânicas de diferentes amostras. Em especial, a possibilidade de se realizar medições em amostras imersas em líquidos fez com que o AFM fosse aplicado, diretamente, ao estudo das propriedades estruturais das células^{80; 81; 82}. As primeiras aplicações do AFM para o estudo das propriedades mecânicas de amostras biológicas ocorreram a partir de 1992. Num primeiro estudo, Tao e colaboradores utilizaram o AFM como ferramenta para investigar a microelasticidade de amostras biológicas macias⁸³, enquanto que num outro estudo, Hoh e Schoenenberger utilizaram o AFM, pela primeira vez, para medir as propriedades mecânicas

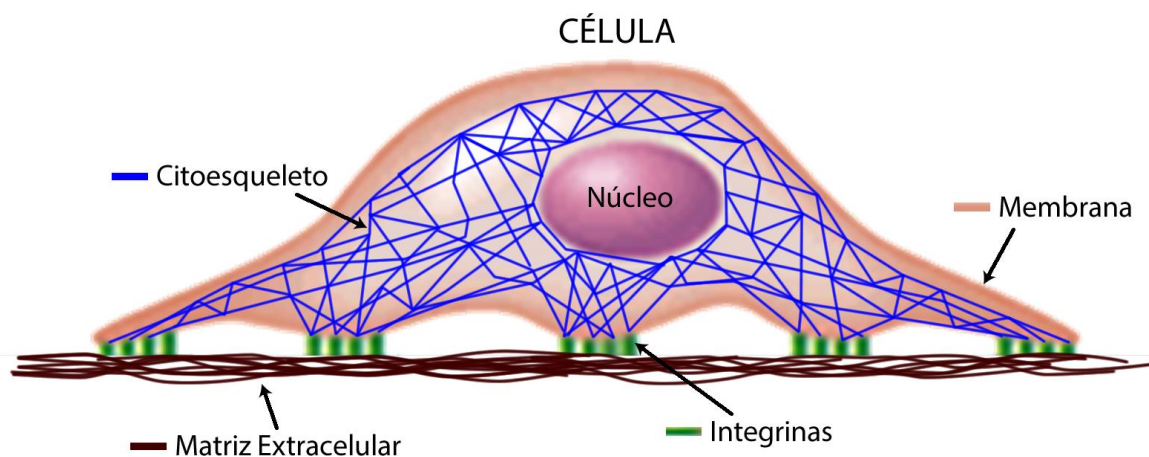
de células vivas⁸⁴. Após estes trabalhos, uma grande quantidade de estudos apareceram e continuam a aparecer a fim de estudar a morfologia e as propriedades mecânicas das células sob diferentes condições, bem como vários novos métodos e técnicas para melhorar as medições em amostras biológicas, e especialmente em células^{85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93}.

3.3 Componentes Estruturais Envolvidos na Mecânica Celular

Nesta seção descreveremos, de maneira resumida, os principais componentes estruturais das células envolvidos na determinação da mecânica celular.

Células são as unidades fundamentais de organismos complexos formados por uma enorme quantidade de diferentes moléculas e organelas. A estrutura, organização e expressão gênica desses componentes determinam os diferentes tipos de células, suas funções, sua comunicação com o meio ambiente circundante, seu ciclo de vida e, como descrito nessa seção, seu comportamento mecânico. A Figura 3.1 ilustra, grosso modo, a organização celular com alguns dos componentes estruturais básicos envolvidos na mecânica celular.

Figura 3.1 – Ilustração de uma célula e seus componentes estruturais básicos envolvidos na mecânica celular.



Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.1 Citoesqueleto

A palavra citoesqueleto tem o significado etimológico de esqueleto da célula. Como os esqueletos vertebrados, o citoesqueleto realmente desempenha um papel fundamental na manutenção e organização da morfologia da célula. Mas o citoesqueleto celular é mais do que uma estrutura inerte, estática, que suporta o corpo da célula. O citoesqueleto forma

uma rede complexa de filamentos de proteínas que se ligam às células vizinhas e ao ambiente extracelular por receptores de membrana. O citoesqueleto é considerado como sendo o principal responsável pela mecânica celular.

Filamentos de actina

Os filamentos de actina ou microfilamentos têm se mostrado como os principais determinantes da mecânica do citoesqueleto^{94; 95}. Os filamentos de actina são polímeros helicoidais longos e flexíveis (F-actina) formados pela polimerização da proteína (G-actina) monomérica de formato globular. A maior parte dos movimentos das células é controlada pela actina e os seus motores moleculares associados. Em determinadas células, os filamentos de actina podem formar feixes densos, rígidos de ligação cruzada com o motor molecular de miosina. Nesta configuração, eles são geralmente referidos como fibras de estresse e podem desenvolver forças, levando à contração celular ou à reorganização do citoesqueleto, sendo também capazes de suportar compressões⁹⁶. Além disso, a alteração da cinética de polimerização de actina por Citocalasina D provoca perturbações do citoesqueleto e a uma diminuição significativa na rigidez celular, reduzindo também a capacidade das células de se moverem e de se contraírem.

3.3.2 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma densa malha formada por vários tipos de fibras de proteínas, secretadas pela própria célula, tais como a fibronectina, o colágeno e a laminina. As células se aderem à MEC via adesão focal, que são conjuntos de receptores de membrana (integrinas) e moléculas citoplasmáticas⁹⁷. Estudos tem demonstrado que a densidade de proteínas da MEC determina fortemente o movimento, a forma e a dureza das células em cultura, e também reforça os sítios da adesão Célula-MEC^{98; 99}. Na verdade, a MEC suporta parte das forças mecânicas no citoesqueleto. O equilíbrio de forças entre as células e a MEC regula a forma, a rigidez e estabilidade estrutural da célula. Assim, a MEC parece ser crucial para o desenvolvimento e para as funções dos tecidos vivos e, por conseguinte, para a forma como as células detectam e respondem a estímulos mecânicos.

3.3.3 Os receptores da adesão celular

O comportamento, a função, os movimentos e as propriedades mecânicas das células são determinados por ligações específicas ao seu meio circundante. As células formam

tecidos, aderindo-se às células vizinhas e à MEC. Existe uma grande quantidade de receptores de adesão e de estruturas afins. As integrinas se encontram entre os sítios de adesão mais importantes.

Integrinas

As integrinas são proteínas de adesão presentes na membrana celular. Uma característica importante das integrinas é a sua capacidade de mover-se dentro da membrana e realizar mudanças de conformação como resposta à fatores extracelulares e intracelulares, levando a estados com diferentes avides e afinidade^{100; 101}. Apesar de alguns tipos de integrinas aderirem a outros receptores das células, tais como LFA-1 a ICAM-1, a principal função das integrinas está relacionada com a adesão à MEC.

3.3.4 Núcleo

O núcleo da célula é formado por uma membrana lipídica que engloba o material genético da célula densamente compactado sob a forma de cromatina. Devido à importância do núcleo na organização do citoesqueleto é difícil de isolar a sua contribuição para a mecânica celular. De fato, estudos têm mostrado que o núcleo e as outras estruturas celulares estão diretamente ligados ao citoesqueleto e indiretamente ligado à membrana celular através das integrinas¹⁰². Assim, as forças aplicadas à célula contribuem para a deformação do citoesqueleto e para a deformação indireta do núcleo da célula, o que contribui para a resposta mecânica da célula.

3.3.5 Membrana celular

A membrana das células é formada por uma bicamada lipídica com moléculas de proteínas integradas de diferentes tipos e funções. A bicamada lipídica serve como uma barreira semipermeável, entre as células e o seu microambiente. A tensão superficial suportada pela membrana contribui para todas as propriedades mecânicas das células e pode controlar funções celulares, tais como a endocitose e a exocitose. Devido à estreita ligação da membrana celular com o córtex de actina e outras moléculas, é difícil isolar o seu comportamento puramente elástico. A contribuição da membrana para a mecânica celular parece ser complexa e estudos mais aprofundados são necessários.

3.4 Efeitos da Adesão Celular à Fibronectina nas Propriedades Elásticas da Célula.

Nesta seção estudaremos os efeitos da adesão celular de macrófagos, que são células importantes do sistema imunológico, sobre uma MEC nas propriedades mecânicas da célula.

3.4.1 Introdução

As interações entre as células e as MECs regulam processos celulares importantes, incluindo a migração celular¹⁰³, a expressão gênica¹⁰⁴, a sobrevivência celular¹⁰⁵, a diferenciação e a organização de tecidos¹⁰⁶. Além disso, a adesão celular à MEC evoca uma variedade de modificações biofísicas na organização celular, incluindo modificações no citoesqueleto e na membrana plasmática. Desta forma, considerando-se que as propriedades mecânicas das células podem ser afetadas por mudanças no citoesqueleto induzidas pela adesão celular à MEC, nós investigamos a influência da MEC sobre as propriedades elásticas de macrófagos, usando o AFM.

Os macrófagos são células de altíssimo poder fagocitário e que desempenham um papel importante na resposta imune e homeostases de tecidos. A capacidade dos macrófagos para realizar a fagocitose os torna eficazes em matar os micróbios e limpar as células em apoptose e necrose^{107; 108; 109}. Os sinais da ativação dos macrófagos podem ser verificados por meio da adesão e espalhamento sobre a MEC¹¹⁰.

Entre as componentes da MEC, a Fibronectina tem sido reconhecida como o elemento chave que promove a adesão celular, entre outras funções. A adesão à fibronectina modula a secreção de ocitocina pró-inflamatória e contribui para a migração celular através de vários tecidos¹¹¹. Estas funções são mediadas pelas integrinas, que estão presentes nos macrófagos¹¹².

Atualmente, o AFM tem se mostrado como uma ferramenta apropriada para a obtenção de parâmetros biofísicos de células, o que inclui a medição do módulo elástico (Módulo de Young)^{92; 113; 114; 115}. A técnica do AFM básica para medidas da elasticidade celular é baseada na indentação de células aderidas a um substrato. Uma sonda como uma ponta muito pequena indenta a amostra, e o instrumento grava a curva de força-versus-deslocamento, que permite o cálculo do módulo elástico por meio da aplicação da teoria da indentação elástica¹¹⁶.

Neste trabalho nós usamos a técnica de nanoindentação do AFM para investigar as influências de um filme de fibronectina no módulo elástico das células. Nós também usamos células em cultura sobre um substrato recoberto com fibronectina e tratadas com Citocalasina D, para estimar até que ponto as mudanças nas propriedades elásticas das células são influenciadas pela organização do citoesqueleto.

3.4.2 Preparação do substrato e cultura das células

Para a preparação dos substratos utilizados neste trabalho, lamínulas de vidro (16mm de diâmetro) foram limpas, mergulhadas por 12 horas em etanol (70%), em seguida, lavadas com água destilada. Para a preparação dos substratos revestidos com fibronectina, 200mL de fibronectina (5µg/mL) foi dispensada sobre as lamínulas de vidro limpas e deixou-se difundir completamente durante toda a noite a 4°C. Todos os substratos foram lavados em tampão fosfato salino (PBS), seguido de incubação a 37°C com solução a 1% de BSA/PBS (soro de albumina bovino/PBS) para bloquear as ligações não específicas de proteínas.

Macrófagos murinos de linhagem J774 foram cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo soro fetal bovino (FCS) (10%), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100g/ml). Os macrófagos foram cultivados numa incubadora a 37°C numa atmosfera umidificada de CO₂ (5%). As células foram semeadas a uma densidade de 2x10⁵ células/mL em lamínulas de vidro esterilizadas inseridas em placas de cultura de 6 poços e incubadas durante 1 ou 48 h, antes de serem fixadas quimicamente (glutaraldeído a 0,5%). Após os vários tempos de incubação, o meio foi lavado para remover células não ligadas.

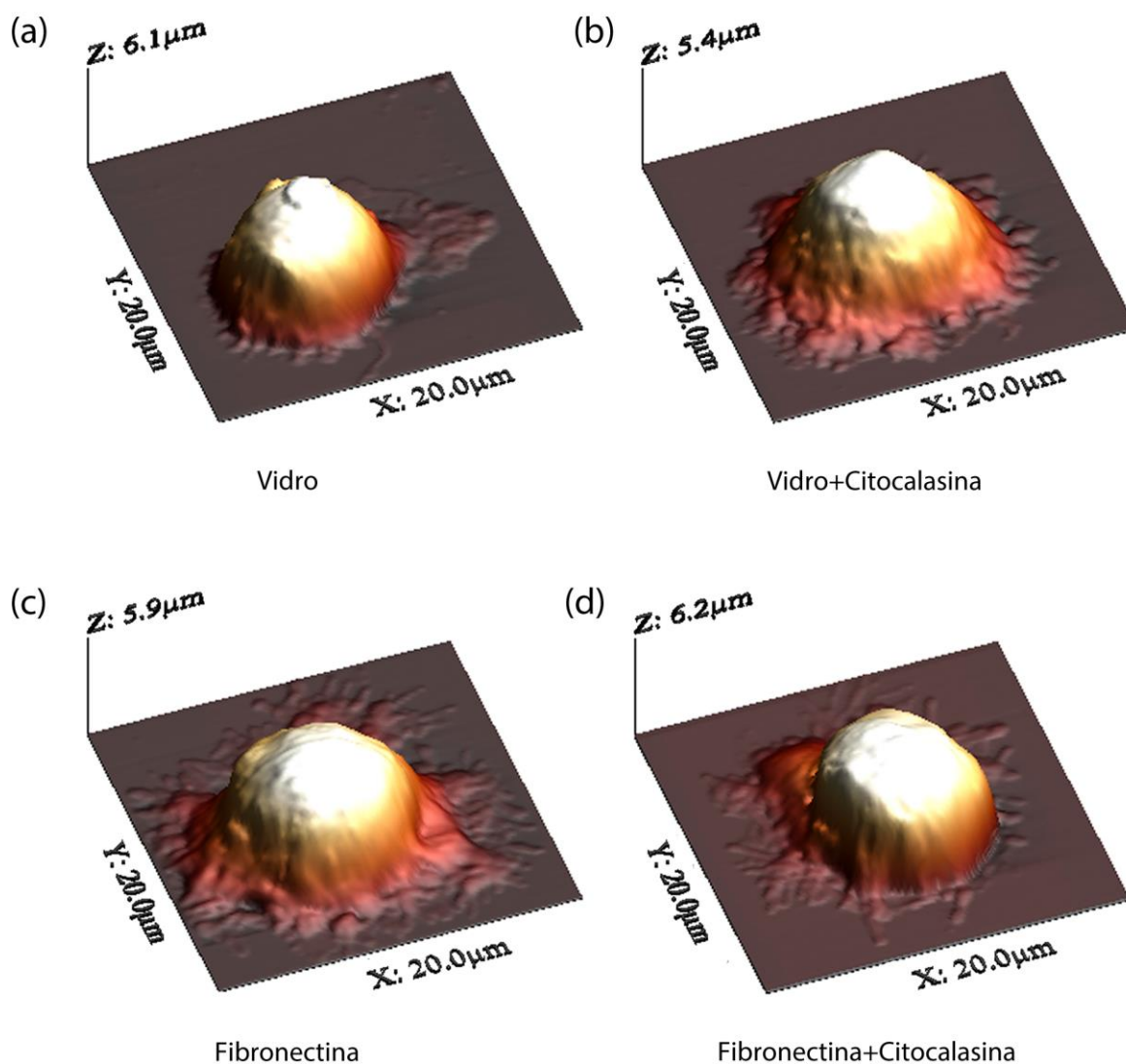
Para avaliar o envolvimento do citoesqueleto nas propriedades elásticas das células, para alguns dos experimentos, elas foram cultivadas em vidro e em fibronectina e, em seguida, tratadas com Citocalasina D por aproximadamente 15 minutos a 37°C antes da fixação.

3.4.3 Imagens topográficas e a rugosidade

Inicialmente, o AFM foi usado para observar a morfologia das células. As imagens obtidas durante o experimento mostram que as células estavam firmemente aderidas ao substrato, e exibiram uma morfologia arredondada típica dos macrófagos. A Figura 3.2 mostra imagens de AFM das células em cultura por 1 hora em diferentes substratos. Como

pode ser observado na Figura 3.2(b) e (d) o tratamento das células com Citocalasina D não produz grandes efeitos sobre a morfologia das células.

Figura 3.2 – Imagens de AFM de macrófagos em cultura por 1 hora sobre (a) vidro, (b) vidro + citocalasina, (c) fibronectina e (d) fibronectina + citocalasina.

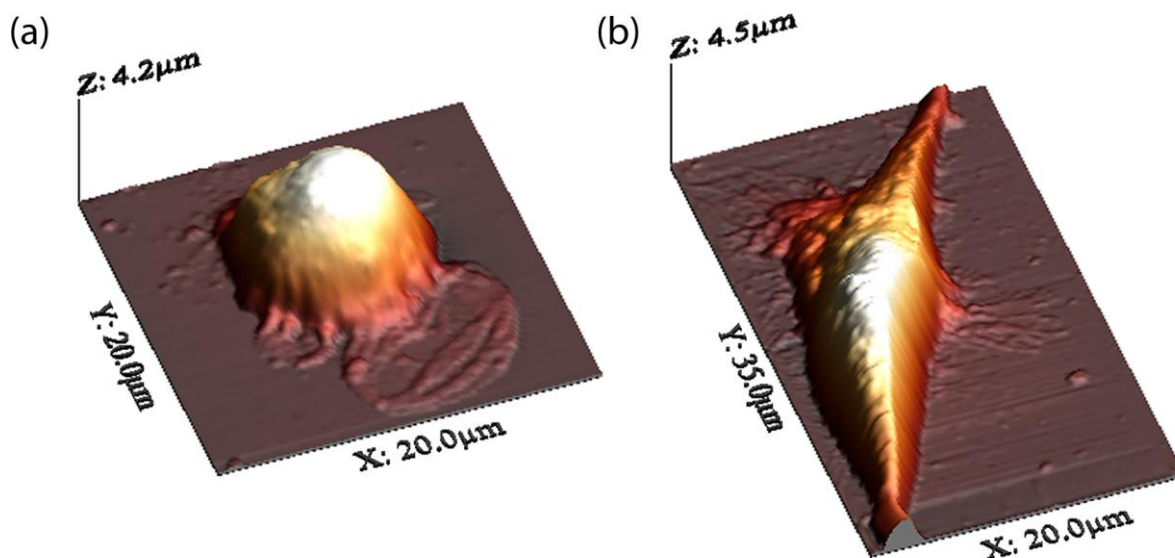


Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 3.3 mostra imagens de AFM de células em cultura por 48 horas em (a) vidro e (b) fibronectina. Como se pode observar na Figura 3.3(a), a morfologia típica dos macrófagos sobre substratos não revestidos, a célula é mais arredondada, em contraste, a Figura 3.3(b) mostra uma célula mais espalhada.

Uma forma de quantificar os efeitos da adesão na MEC à membrana das células é através da análise da rugosidade da membrana destas células.

Figura 3.3 – Imagem de macrófagos em cultura por 48 horas sobre (a) vidro e (b) fibronectina.



Fonte: Elaborada pelo autor

Para estimar a rugosidade da membrana das células, as imagens de AFM foram analisadas usando o software WSxM⁷⁶. Este software foi utilizado para calcular a raiz quadrada média (RMS) da altura média da membrana das células de cada grupo de substrato. A RMS tem sido considerada como um índice confiável da rugosidade de superfícies¹¹⁷.

A análise da rugosidade foi estimada como o valor da RMS da distribuição de altura das imagens AFM da membrana plasmática dos macrófagos cultivados sobre o vidro e sobre a fibronectina. Para as células cultivadas sobre o vidro, o valor da RMS foi de 86,5 nm, enquanto que para as células cultivadas sobre a fibronectina o valor do RMS foi de 100,2 nm. Portanto, a análise da rugosidade mostra que células cultivadas sobre a fibronectina tem uma RMS mais elevada (maior rugosidade) do que aquelas cultivadas apenas em vidro.

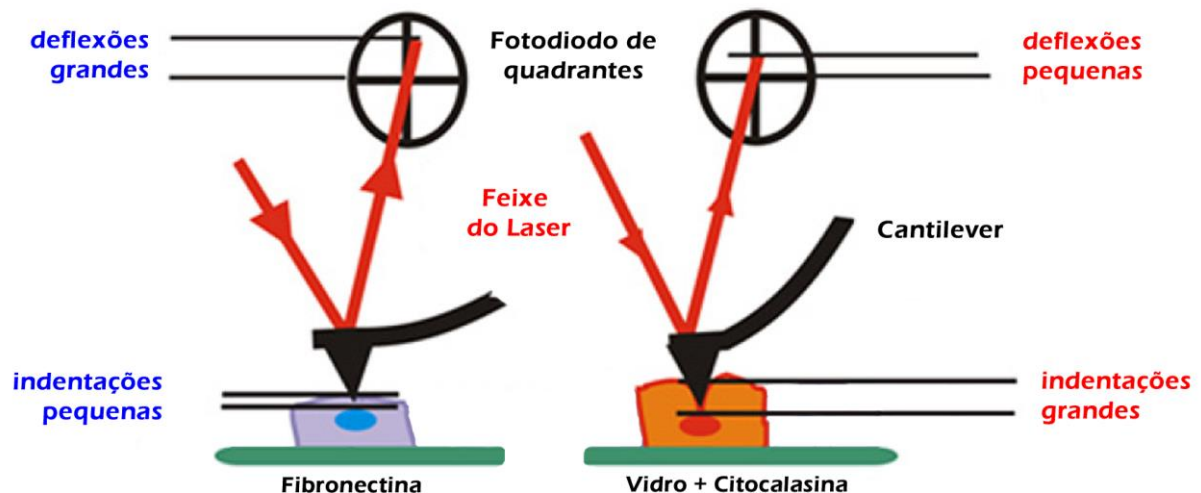
3.4.4 Métodos e teoria da elasticidade celular

Tanto as imagens de AFM quanto as medidas de elasticidade das células foram realizadas em ar usando um microscópio de força atômica Multiview 1000TM (Nanonics) montado em conjunto com um microscópio ótico BXFM (Olympus). O sistema foi convenientemente ajustado para permitir o posicionamento da ponta do AFM sobre o centro célula escolhida. Os experimentos foram conduzidos usando sondas com cantilever de 320 μm de comprimento com pontas cônicas com semiângulo de 35° e com uma

constante elástica $k = 1 \text{ N/m}$. Além disso, o equipamento foi acusticamente isolado para reduzir a interferência de ruídos ambiente durante as medidas.

A ideia inerente as medidas da elasticidade de células usando AFM é relativamente simples. Uma ponteira montada na extremidade de um cantilever delicado, indenta a célula, resultando numa deflexão do cantilever. A deflexão é medida usando o feixe de um laser, que é refletido pela extremidade do cantilever e detectado por um fotodiodo de quatro quadrantes (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Ilustração do modelo para a determinação da Indentação com base em medidas de AFM. Em células aderidas sobre a fibronectina, o comprimento da indentação é menor (devido à maior rigidez da célula), resultando em maiores deflexões do cantilever. As células mais macias manifestam uma maior capacidade de se deformar (maior comprimento de indentação) e, por conseguinte, a deflexão do cantilever é menor.



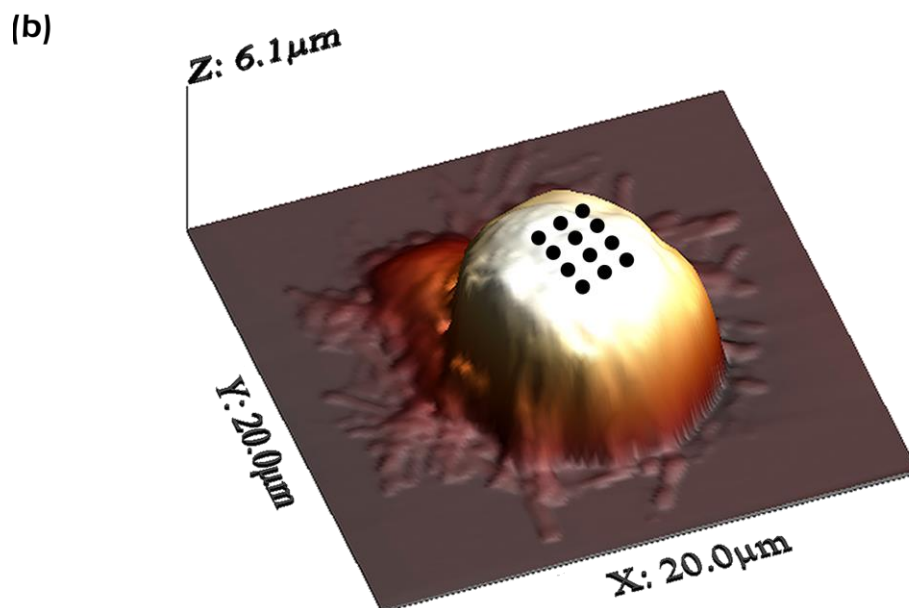
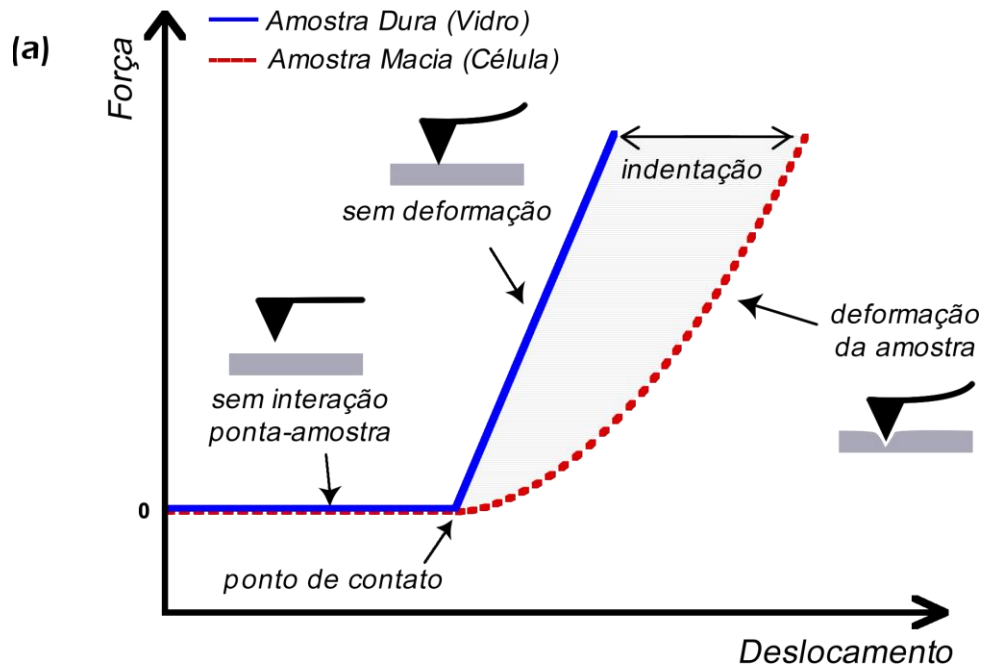
Fonte: Elaborada pelo autor

A elasticidade das células é determinada com base nas curvas de força versus deslocamento, as quais levam à indentação, que é geralmente obtida a partir da subtração das medidas das deflexões em superfícies de amostras duras e macias. Quando um material duro (não facilmente deformável, tal como o silício ou vidro) é investigado, a deflexão reflete a posição da amostra. Isto é representado por uma curva de inclinação linear e é geralmente empregada como linha de referência. Para amostras macias, como as células, as deflexões do cantilever são muito menores devido à indentação, e a curva de força resultante tem um caráter não linear, como mostrado na Figura 3.5(a).

A diferença entre as deflexões do cantilever detectadas no vidro e nas células descreve a deformação da amostra sobre a pressão imposta pela ponteira. A subtração da

curva de força no vidro da curva de força na célula fornece o comprimento da indentação. Nós ajustamos o nosso sistema de AFM para indentar as células com força máxima de 20 nN.

Figura 3.5 – (a) Curvas de força-versus-deslocamento medidas para um substrato de referência, isto é, o vidro e para a amostra (uma célula) fornece a relação entre a carga de força e o comprimento da indentação, calculado como a diferença entre estas curvas. (b) Imagem de AFM de um macrófago mostrando a área da indentação. Superpostas estão doze pontos pretos representando o padrão das indentações realizadas na região central da célula.

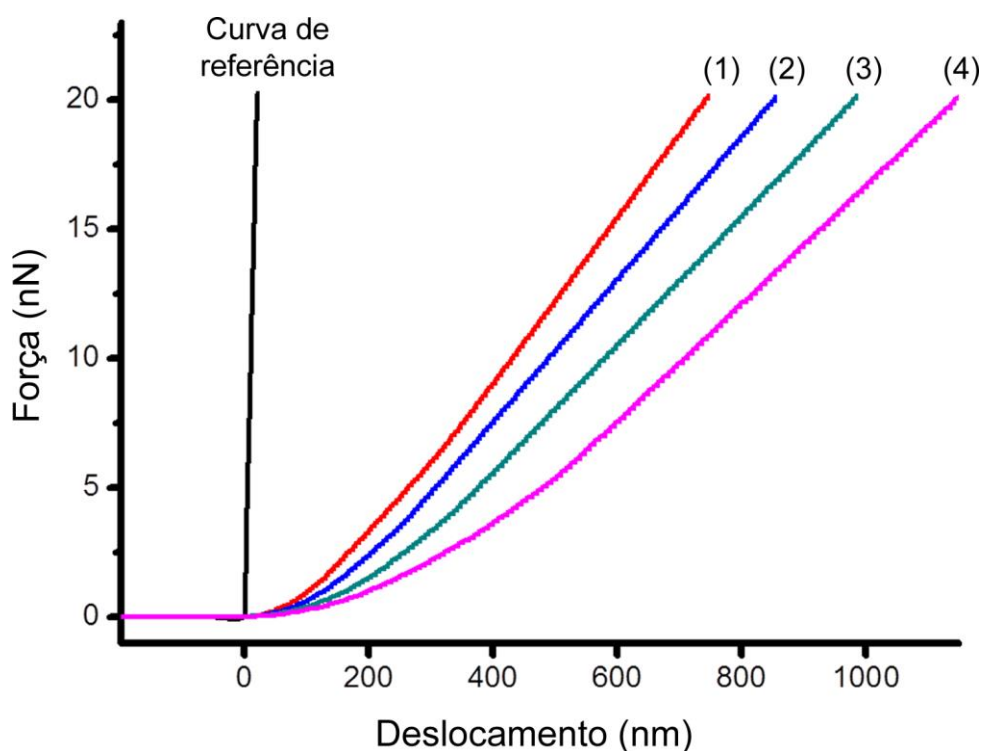


Fonte: Elaborada pelo autor

Nas células identificadas pelas imagens de AFM, 12 medidas de indentação foram realizadas na área central, como mostrada na Figura 3.5(b). É importante observar que as medidas realizadas ao redor do núcleo são menos propensas a artefatos devido à dureza do substrato^{118; 119}. Para cada grupo de substrato 5 células foram avaliadas, totalizando 60 curvas de força por substrato.

Antes da realização das indentações nas células, uma curva de força foi tomada no substrato de vidro e gravada como referência^{12; 120}. Curvas de força obtidas, durante o experimento, no substrato de vidro (amostra dura) e nas células (amostra macia) são mostradas na Figura 3.6. É importante observar que a identificação do ponto de contato é uma característica crucial para a determinação do comprimento de indentação. Neste trabalho, o ponto de contato é definido como o ponto em que a inclinação da curva de força é aproximadamente zero. A ponta do AFM foi movida em direção à célula a uma velocidade de 5 $\mu\text{m/s}$ em todas as medidas de indentação.

Figura 3.6 – Curvas de força-versus-deslocamento medidas tanto no substrato de referência como nos macrófagos. (1) Fibronectina, (2) Vidro, (3) Fibronectina + Citocalasina e (4) Vidro + Citocalasina. A relação entre a carga de força e o comprimento de indentação foi calculada como a diferença entre cada uma destas curvas e a linha de referência.



Fonte: Elaborada pelo autor

Teoria da elasticidade celular

As propriedades elásticas de amostras macias, tais com as células, são geralmente caracterizadas pelo seu módulo de Young (E). O valor de módulo de Young das células é obtido, na maioria das vezes, a partir do modelo da teoria da indentação elástica de Hertz¹²¹; ¹²². Neste modelo, se a ponta nanoscópica do AFM é aproximada por uma esfera de raio R , então a força $F(\delta)$ no cantilever é dada por

$$F(\delta) = \frac{4\sqrt{R}}{3} E^* \delta^{3/2} \quad (3.1)$$

onde δ é o comprimento de indentação, e E^* é o módulo efetivo do sistema ponta-amostra. Se o material da ponteira é muito mais duro que o da amostra, E^* é aproximado pela equação¹²³:

$$E^* = \frac{E}{1-\nu^2} \quad (3.2)$$

onde E e ν são o módulo de Young e a razão de Poisson da amostra, respetivamente. Logo, a equação (3.1) torna se

$$F(\delta) = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (3.3)$$

Para amostras incompressíveis, como as células, a razão de Poisson¹²⁴ é geralmente considerada como $\nu=0,5$.

Quando a forma da ponteira do AFM é aproximada por um cone, o modelo de Hertz modificado por Sneddon¹²⁵ é usado para caracterizar as curvas de força e obter a indentação elástica das células. Neste modelo a força $F(\delta)$ no cantilever é dada por

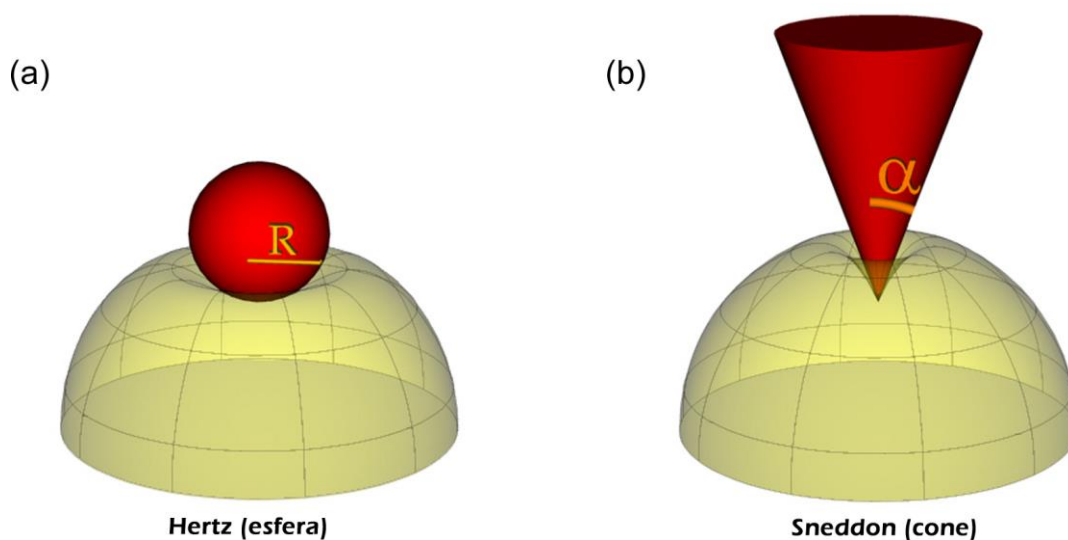
$$F(\delta) = \frac{2}{\pi} \frac{E \tan \alpha}{1-\nu^2} \delta^{3/2} \quad (3.4)$$

onde α é o ângulo de meio cone da ponteira do AFM. No conjunto de experimentos desenvolvidos neste trabalho, as ponteiras utilizadas possuíam uma forma cônica.

A Figura 3.7 ilustra o esquema das indentações elásticas modeladas por uma esfera e por um cone. O primeiro modelo, conhecido como o modelo de Hertz, é o de uma esfera rígida em uma superfície macia (Figura 3.7(a)). O outro modelo derivado por Sneddon assume um cone rígido, indentando uma superfície macia (Figura 3.7(b)). Ambos os modelos não incluem a adesão e a viscoelasticidade. O modelo de Hertz é válido para indentações

significativamente menores do que o raio da esfera. Para o modelo de Sneddon o comprimento da indentação, deve ser na faixa de algumas centenas de nanômetros.

Figura 3.7 –Esquema da indentação de (a) uma esfera rígida e de (b) um cone rígido em uma superfície macia.



Fonte: Elaborada pelo autor

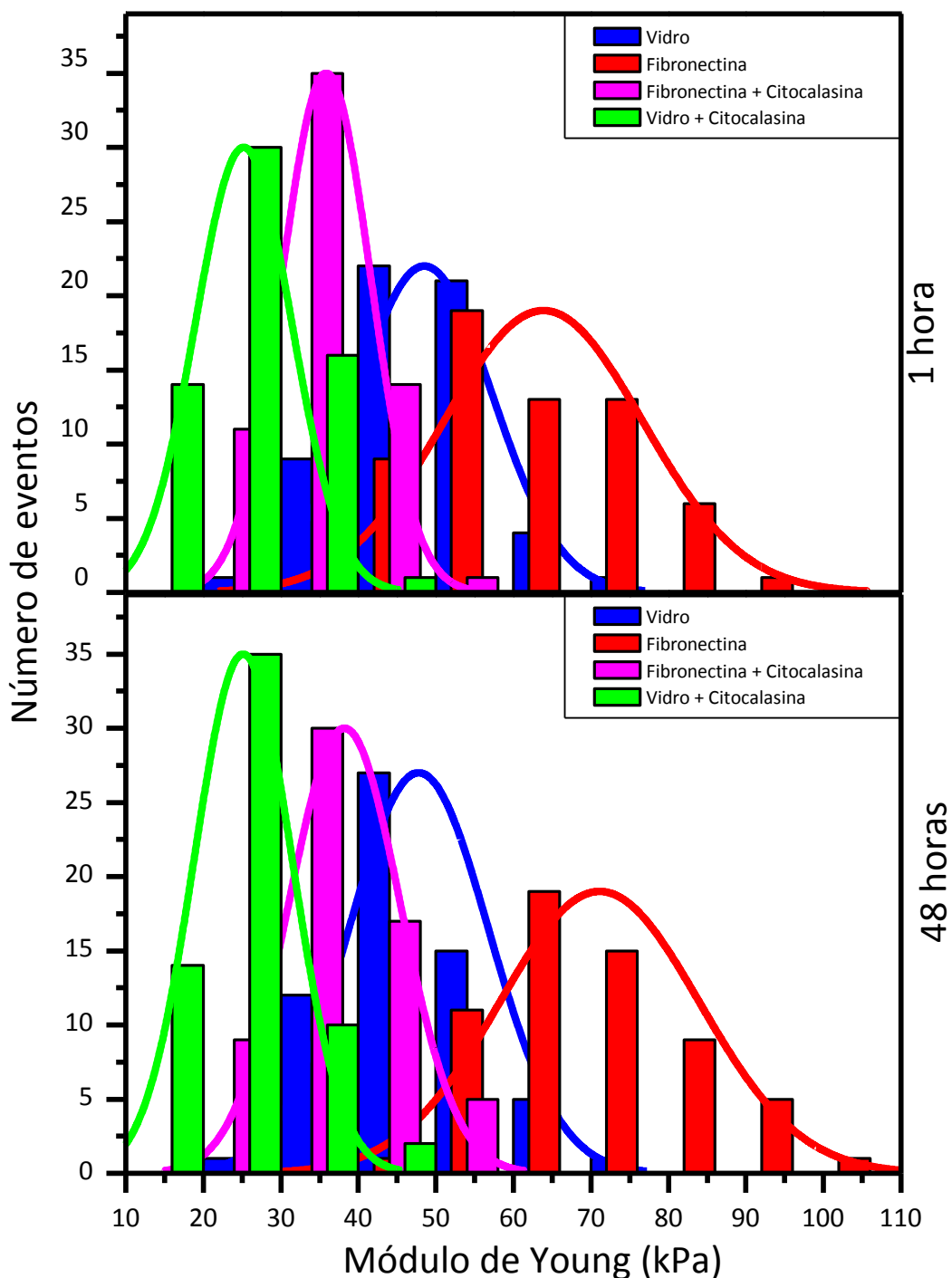
Análise estatística

Todos os dados neste capítulo são apresentados como média \pm desvio padrão (média \pm DP). Para mostrar que os dados são normalmente distribuídos, o teste Kolmogorov-Smirnov foi usado. Diferenças no módulo de elasticidade entre diferentes grupos foram avaliadas pelo ANOVA com análise de Turkey para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos quando $p < 0,05$. A diferença no módulo de elasticidade entre dois grupos de substrato foram avaliados pelo teste t de Student para identificar diferenças estatísticas quando $p < 0,05$.

3.4.5 Resultados dos testes de elasticidade

A nanoindentação das células por AFM revela características biofísicas do citoesqueleto e da membrana em nanoescala. Estas características desempenham um papel dominante nas medidas da deformação celular, geralmente conduzindo a uma ampla distribuição do módulo de Young. A Figura 3.8 mostra os histogramas das distribuições dos módulos de Young medidos, para diferentes períodos de tempo de cultura, para as células aderidas sobre o vidro, a fibronectina e para as células aderidas sobre os mesmos substratos anteriores, porém, tratadas com Citocalasina D.

Figura 3.8 – Histograma das distribuições dos módulos de Young calculados usando o modelo Sneddon-Hertz para as células em cultura sobre diferentes substratos por 1 e 48 horas. Ajuste da distribuição normal (curva sólida).

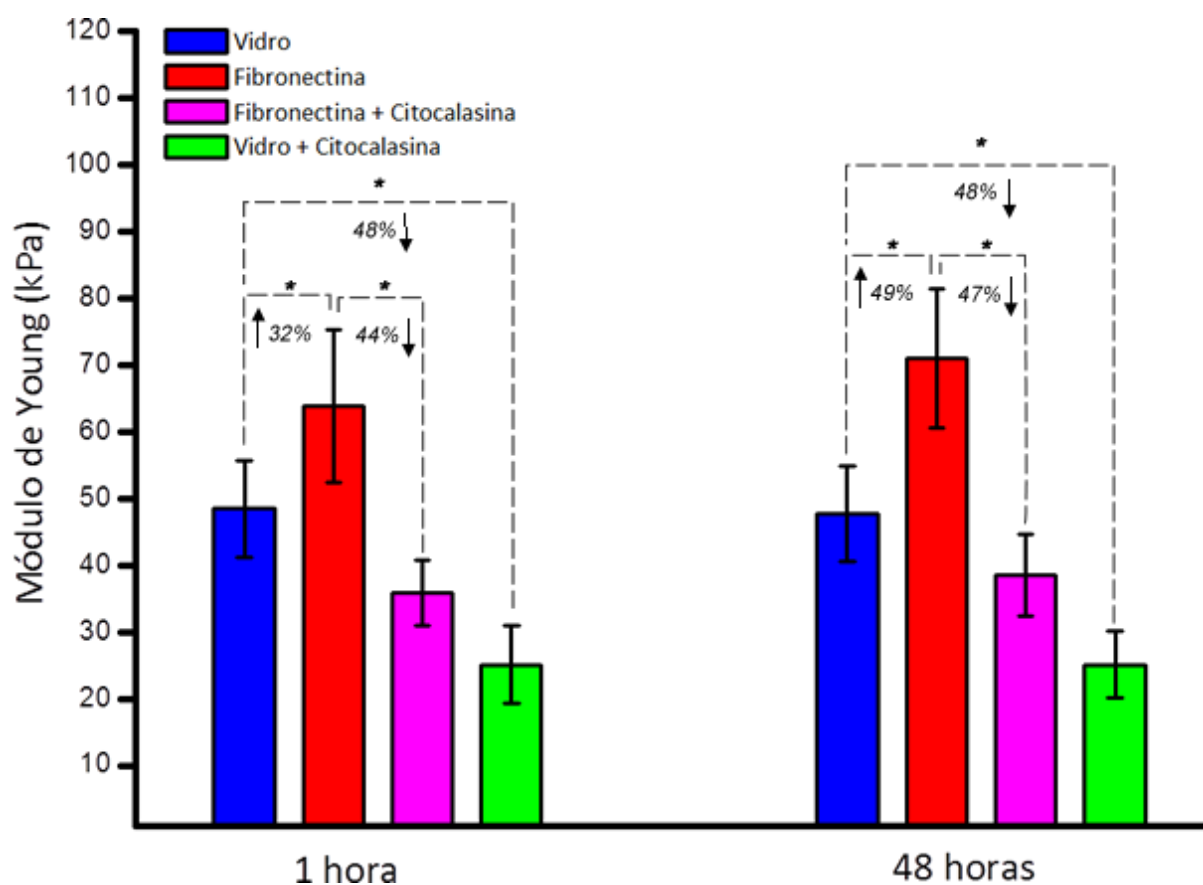


Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 3.9, mostra o gráfico dos valores médios dos módulos de Young para as células aderidas sobre os diferentes substratos. Para as células aderidas apenas em vidro (controle), os módulos de Young médios foram $48,5 \pm 7,3$ kPa e $47,7 \pm 7,2$ kPa, após 1 hora e

48 horas de incubação, respectivamente. Embora, as células cultivadas em vidro por uma hora pareçam um pouco mais duras do que aquelas cultivadas em vidro por 48 horas, não há diferença estatística significativa ($p = 0,6$). Por outro lado, as células cultivadas sobre a fibronectina apresentaram variação considerável na sua elasticidade. Os módulos de Young médios das células aderidas a fibronectina foram de $63,9 \pm 11,3$ kPa e $71,1 \pm 10,4$ kPa, após 1 hora e 48 horas de incubação, respectivamente. O teste t de Student mostrou diferenças estatísticas significativas ao nível de $p \leq 0,01$ entre as médias das células aderidas em vidro e em fibronectina. A fibronectina afetou a elasticidade das células, provocando um aumento no módulo de Young médio de 32% após 1 hora e 49% após 48 horas de incubação, em comparação com as células aderidas ao vidro.

Figura 3.9 – Módulo elástico das células em cultura por 1 e 48 horas sobre vidro, fibronectina, fibronectina e vidro tratadas com Citocalasina D. Cada coluna representa o módulo de Young médio determinado por pelo menos 60 curvas de força por grupo de substrato. A barra de escala representa o desvio padrão. Os números percentuais entre as colunas representam as variações do módulo de Young médio em comparação com o vidro ou com a Fibronectina. * $p < 0,01$.



Fonte: Elaborada pelo autor

Para avaliarmos o envolvimento do citoesqueleto na resposta elástica das células aderidas à fibronectina, nós degradamos os filamentos de actina das células utilizando Citocalasina D. A Figura 3.9 mostra que Citocalasina D afetou a elasticidade das células, promovendo uma redução no módulo de elasticidade de 44% após 1 hora e de 47% após 48 horas de incubação, em comparação com as células aderidas à fibronectina e sem tratamento Citocalasina D. Estes resultados mostram que a rigidez das células foi afetada pela adesão à MEC, e este efeito foi mediado principalmente através da organização dos filamentos de actina. Os valores calculados para o módulo de Young médio das células aderidas à fibronectina e tratadas com Citocalasina D foram de $35,8 \pm 4,9$ kPa e $38,2 \pm 6,1$ kPa após 1 e 48 horas de incubação, respectivamente. O módulo elástico médio das células aderidas à fibronectina e tratadas com Citocalasina D foi significativamente menor ($p < 0,01$) do que o daquelas sobre a fibronectina e sem tratamento com Citocalasina D.

Para as células aderidas sobre o vidro e tratadas com Citocalasina D, os módulos de Young médios foram de $25,2 \pm 5,8$ kPa e $25,1 \pm 5,0$ kPa após 1 e 48 horas de incubação, respectivamente. Não foi observada diferença estatística significativa ($p = 0,5$) entre estes dois tempos de cultura. No entanto, a avaliação usando o teste t de Student mostrou que as diferenças observadas, entre células cultivadas sobre o vidro, com e sem tratamento com Citocalasina D, foram estatisticamente significativas ($p < 0,01$). A Citocalasina D afetou a elasticidade das células, promovendo uma redução no módulo elástico médio de 48% após 1 hora e 48 horas de incubação, em comparação com aquelas sem tratamento com Citocalasina D.

3.4.6 Discussão dos resultados dos testes de elasticidade

Neste estudo, o módulo elástico médio das células foram medidos, calculados e comparados entre células aderidas a diferentes substratos e tratadas ou não com Citocalasina D. A elasticidade das células aderidas apenas ao vidro não apresentaram diferenças estatísticas ($p=0,6$) mesmo se medidas após 1 hora ou 48 horas de cultura. No entanto, quando as células foram aderidas à fibronectina, observamos um aumento no módulo de Young médio de até 49% quando comparados com aquelas aderidas apenas em vidro. Os nossos resultados demonstram que o módulo de elasticidade médio das células é significativamente alterado pela adesão à fibronectina ($p < 0,01$).

A fim de compreender até que ponto as alterações nas propriedades elásticas foram devido à remodelação do citoesqueleto de actina em razão da adesão à fibronectina, a Citocalasina D foi usada. Observamos uma redução significativa de até 48% no módulo de Young médio das células tratadas com Citocalasina D durante 15 minutos, sem alterações na morfologia característica da célula. As alterações nas propriedades elásticas das células devido a adesão à fibronectina são atribuídas a reorganização do citoesqueleto^{92; 126}. É importante observar que os decréscimos percentuais no módulo de elasticidade das células aderidas ao vidro e tratadas com Citocalasina D estão no mesmo nível daquelas aderidas à fibronectina e tratadas com Citocalasina D. Estes resultados mostram que o citoesqueleto de actina desempenha um papel dominante no módulo de elasticidade das células.

Em resumo, utilizamos o AFM como uma ferramenta para investigar a influência da MEC nas propriedades biomecânicas do citoesqueleto e da membrana através da medida do módulo elástico em macrófagos aderidos a substratos revestidos por fibronectina. Além disso, observamos uma participação dominante do citoesqueleto de actina nas propriedades elásticas das células, por meio do tratamento com Citocalasina D. Assim, demonstramos que a adesão celular à MEC influencia as propriedades elásticas das células por meio dos filamentos de actina. Tomados em conjunto, nossos dados implicam que as interações célula-MEC, mediada pelo citoesqueleto afetam diretamente os eventos biomecânicos das células, modificando as propriedades físicas do citoesqueleto celular.

3.5 Imagens de DNA e Complexos DNA-Timol com AFM

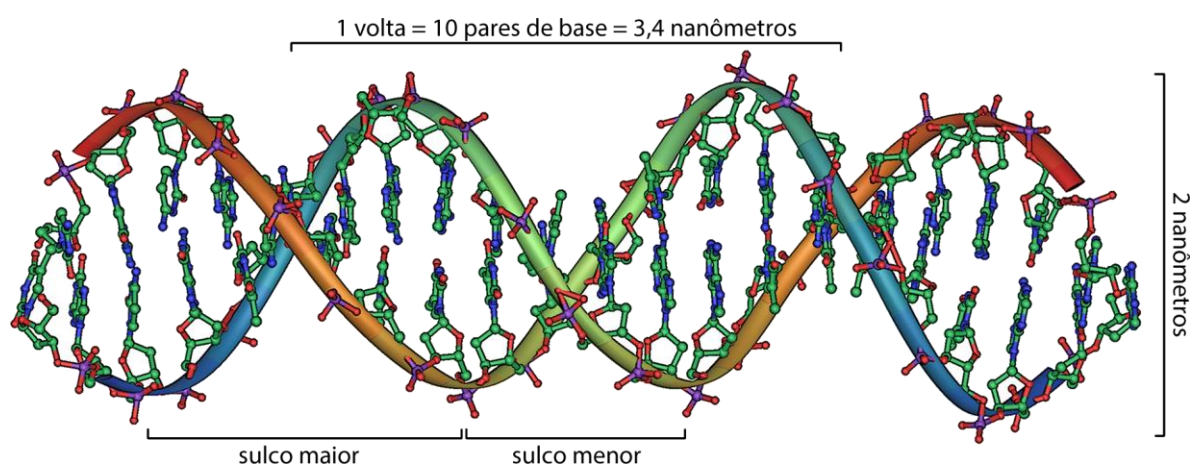
Nesta seção apresentamos os materiais e métodos para estudar a interação entre o ácido desoxirribonucleico (DNA) (em inglês: deoxyribonucleic acid) e pequenas moléculas do terpeno timol por AFM. Imagens de AFM detalhadas do DNA, antes e após incubação com timol são mostradas. A imobilização dos fragmentos de DNA na superfície de uma mica desempenha um papel importante para a imageologia bem sucedida do DNA ou dos complexos de DNA-ligante.

O DNA é uma cadeia de polímero biológico que armazena informações hereditárias de organismos vivos e é uma das moléculas biológicas mais extensivamente estudadas nos

últimos anos. A relação função-estrutura do DNA é perfeitamente explicada pela sua estrutura de dupla hélice (Figura 3.10) montada a partir de quatro bases complementares.

A estrutura da molécula do DNA foi determinada, primeiramente, por meio da difração de raios-X há mais de 60 anos¹²⁷. Atualmente, sua estrutura, suas propriedades mecânicas, suas propriedades bioquímicas e biofísicas e sua atividade biológica ainda continuam sob estudo.

Figura 3.10 - Estrutura esquematizada de um DNA



Fonte: Wikipédia

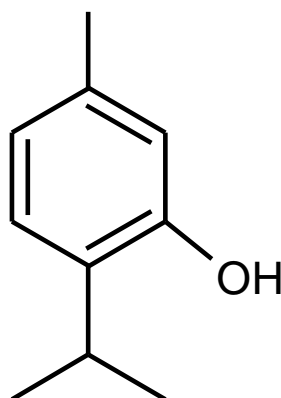
A estrutura e a conformação das moléculas de DNA são importantes para as suas funções, pois a sua mudança pode causar a perda de funções biológicas do DNA. Muitos fatores podem induzir a alteração de conformação e estrutura do DNA. Por exemplo, muitas moléculas pequenas, tais como fármacos, são capazes de reconhecer e ligar-se a cadeias únicas ou duplas de DNA com alta afinidade e seletividade, o que poderia induzir alterações estruturais do DNA^{128; 129}.

O timol (Figura 3.11) é um composto fenólico conhecido por suas propriedades antioxidantes¹³⁰, antimicrobianas¹³¹ e atividades anti-inflamatórias¹³². O Timol, também foi classificado como agente anticancerígeno¹³³, mas seu mecanismo anticancerígeno ainda não foi totalmente elucidado. Neste trabalho, este fármaco é considerada para ligar-se a fragmentos de DNA provocando a quebra e a alteração da conformação do DNA.

A conformação do DNA e suas interações com proteínas podem ser observadas diretamente por técnicas nanoimageamento. Na última década, o AFM tem se mostrado como uma das técnicas imageamento mais importantes para os estudos do DNA^{134; 135; 136}. O

AFM pode fornecer resultados simples, diretos e de alta resolução, especialmente, para avaliar os efeitos de pequenas moléculas na estrutura do DNA^{137; 138; 139}. Mais importante ainda, é que o AFM é ímpar na possibilidade de estudar processos bioquímicos ao nível molecular.

Figura 3.11 - Estrutura química do Timol



Fonte: Wikipédia

3.5.1 Preparação da mica para imagem de DNA e complexos de DNA-timol

A preparação da amostra é um passo fundamental para a obtenção de qualquer imagem, e o AFM não é exceção. Um fator complicante, na preparação de amostras para investigar a interação DNA-ligante por meio do AFM, é a necessidade de se imobilizar as moléculas do DNA sobre um substrato muito plano, para ser capaz de identificá-las. A mica tem sido amplamente utilizada como um substrato para imagens AFM, porque a superfície da mica é atômica e plana sobre microns de área. No entanto, a superfície da mica está carregada negativamente e não é capaz de ligar-se às moléculas de DNA, que têm as mesmas cargas superficiais negativas. Portanto, a superfície da mica tem que ser modificada para a imobilização das moléculas do DNA ou de complexos de DNA-ligante para a imageologia por AFM. No entanto, é conhecido que o DNA pode ligar-se a superfícies de mica recobertas com Poli-L-Lisina, de maneira que a sua estrutura possa ser estudada por meio do AFM¹³⁷. De fato, embora a imobilização de DNA em mica tenha sido extensivamente estudada, a imobilização reprodutível do DNA é difícil de alcançar na prática.

Solução do DNA e modificação da superfície da mica usando poli-L-lisina

Para o nosso estudo, o DNA foi diluído em 0,5 ng/μl em tampão contendo 10 mM de HEPES, pH 7, e 1 mM de NiCl₂. A superfície da mica foi preparada para a imageologia por meio de tratamento com poli-L-lisina. Uma gota de solução de 0,02% de poli-L-lisina foi

aplicada sobre a superfície da mica. A mica foi incubada durante 15 minutos e, em seguida, enxaguada suavemente com 2ml de água deionizada. Finalmente, a mica foi seca por um sopro suave de gás argônio para minimizar a contaminação da superfície.

Adesão do DNA

Para aderir moléculas de DNA no substrato preparado, 10 μ l da solução de DNA foi depositada na mica tratada, na região central do substrato durante 10 minutos e, em seguida, lavada com 3ml de água deionizada, para remover todos os componentes do tampão e seca sob um fluxo de argônio gasoso limpo. A mica foi armazenada numa câmara de vácuo sob atmosfera de argônio durante uma hora para permitir a ótima secagem da amostra. Após este processo, a vida útil da amostra é de mais de um mês.

Adesão do Timol

Para as micas com DNA tratados com timol, este foi diluído para $8,0 \times 10^{-6}$ g/L em tampão contendo 10 mM de HEPES, pH 7. 20 μ l da solução de timol foram adicionadas a mica com DNA aderido e incubadas durante 10 minutos, em seguida lavada com 3 ml de água deionizada e seca sob um fluxo contínuo de gás argônio. Finalmente, a mica foi armazenada numa câmara de vácuo por uma hora para promover a secagem da amostra.

3.5.2 Modo de imageamento e resolução

As imagens de AFM foram realizadas em ar com um microscópio de força atômica Multiview 1000TM (Nanonics) operando em modo intermitente. O surgimento do modo intermitente do AFM, em que o cantilever oscila continuamente e em que o contato com a amostra ocorre apenas de forma intermitente, certamente representou um grande avanço para as imagens de AFM de DNA¹⁴⁰.

O movimento lateral da sonda ocorre, quase que, totalmente quando a sonda não está em contato com a amostra, de modo que as forças de cisalhamento são praticamente eliminadas. Com este modo de operação, o controle de umidade do ambiente é ainda necessário, porém, não é normalmente obrigatório para produzir imagens de alta qualidade. As amostras podem ser varridas repetidamente em ar sem qualquer dano apreciável. Os instrumentos que operam em modo intermitente são geralmente muito estáveis, e a obtenção de imagens tornou-se mais fácil e mais rápida.

Além disso, durante os experimentos, usamos cantileveres de silício AppNano ACT-SS com constantes elásticas nominais entre 36 e 75 N/m. A frequência de oscilação típica da ponteira foi de 270-300 KHz, a taxa nominal de varredura foi tipicamente de 1,5 Hz por linha e a modulação de amplitude de oscilação da ponteira foi de alguns poucos nanômetros. Todas as imagens apresentadas nesta seção derivam dos dados originais, exceto que as imagens foram processadas para remover as inclinações do substrato. Além disso, o conjunto completo acima foi isolado acusticamente, de modo a reduzir a interferência do ruído ambiente durante as medições.

A resolução perpendicular à superfície da amostra depende, principalmente, da sensibilidade do cantilever e do piezo e é da ordem de 0,1 nm. A resolução lateral é mais difícil de precisar, e é determinada principalmente pela convolução geométrica ponta-amostra. O tamanho aparente de um objeto numa imagem AFM pode ser obtido por um cálculo simples, como aproximadamente \sqrt{rR} , em que r é o raio efetivo da amostra e R o raio efetivo da ponta. O tamanho das pontas de Si_3N_4 microfabricadas não é bem definido e varia um pouco entre um lote e outro. Geralmente a extremidade das pontas tem um raio entre 10-50 nm. Logo, com as moléculas de DNA com um diâmetro de ~ 2 nm, a largura aparente do DNA é de ~ 10 nm.

3.5.3 Imagens do DNA e dos complexos de DNA-Timol

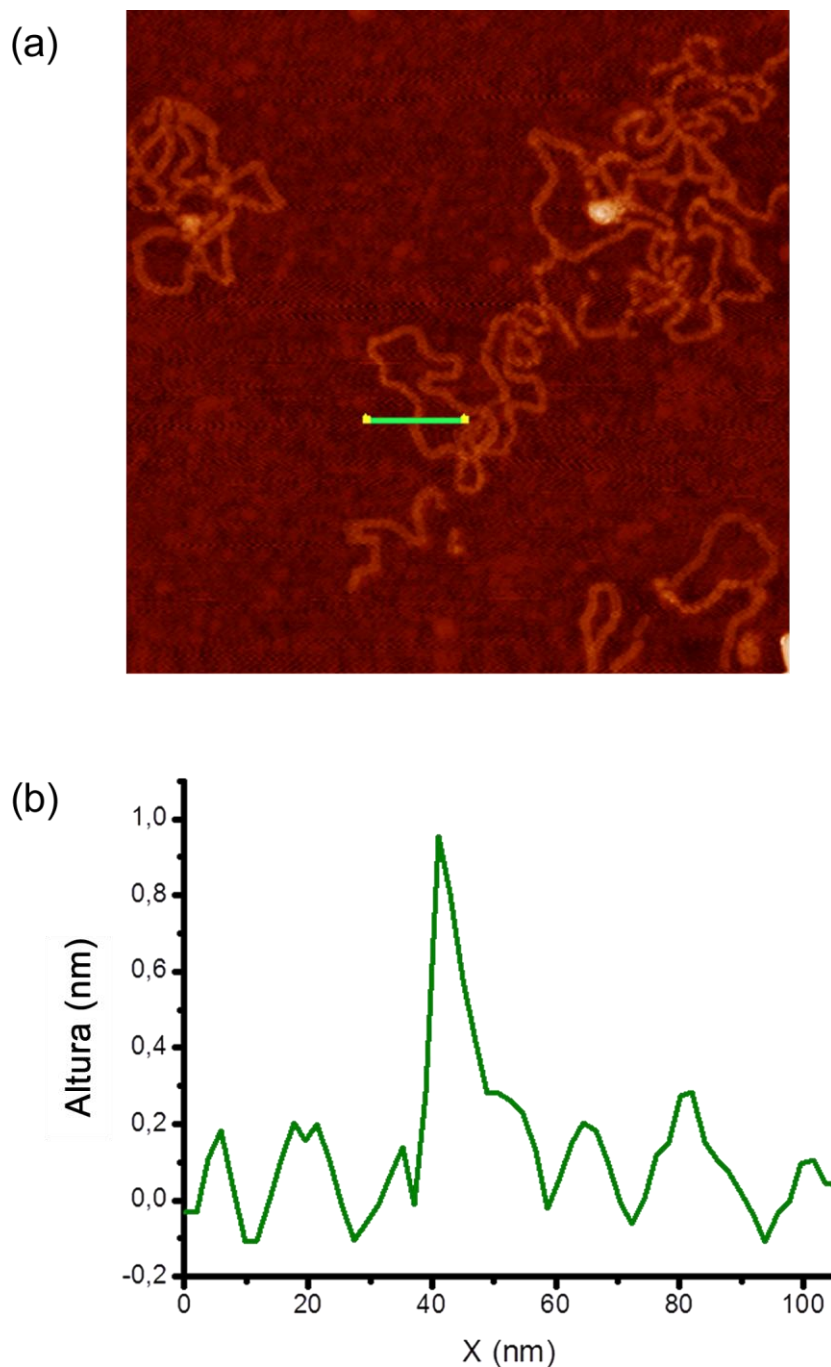
A Figura 3.12 mostra imagens topográficas de AFM de moléculas de DNA imobilizada sobre a superfície de uma mica por poli-L-lisina. Como pode ser visto na Figura 3.12(a), com área varrida de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, as moléculas do DNA são visíveis e bem definidas. A imagem mostram um bom contraste das moléculas de DNA.

As manchas brilhantes na imagem podem representar complexos de DNA agregados. Estudos anteriores têm mostrado que biopolímeros fracamente ligados à superfície do substrato podem ser transformados em glóbulos durante o processo de secagem¹⁴¹, tal qual a imagem indica ter ocorrido com o DNA fracamente ligado a mica, neste caso.

Como pode ser visto na Figura 3.12(b), as alturas das cadeias visíveis das moléculas de DNA na superfície plana da mica foram medidas, com AFM operando no modo intermitente, como sendo de 1,0 nm. Isto é menos do que o valor teórico ~ 2 nm. Uma possível razão para tal fato é que as moléculas do DNA se achatam quando adsorvidas numa

superfície de mica, diminuindo a altura do DNA. Outra razão é que a ponta do AFM pode indentar as moléculas de DNA depois de penetrar a camada de líquido na superfície do DNA.

Figura 3.12 – (a) Conformação de moléculas de DNA adsorvido sobre a superfície de micas tratadas com poli-L-lisina. (b) Perfil de altura, da fita de DNA, representado pelo traço verde na imagem de AFM. As imagens foram obtidas com AFM operando no modo intermitente em ar.

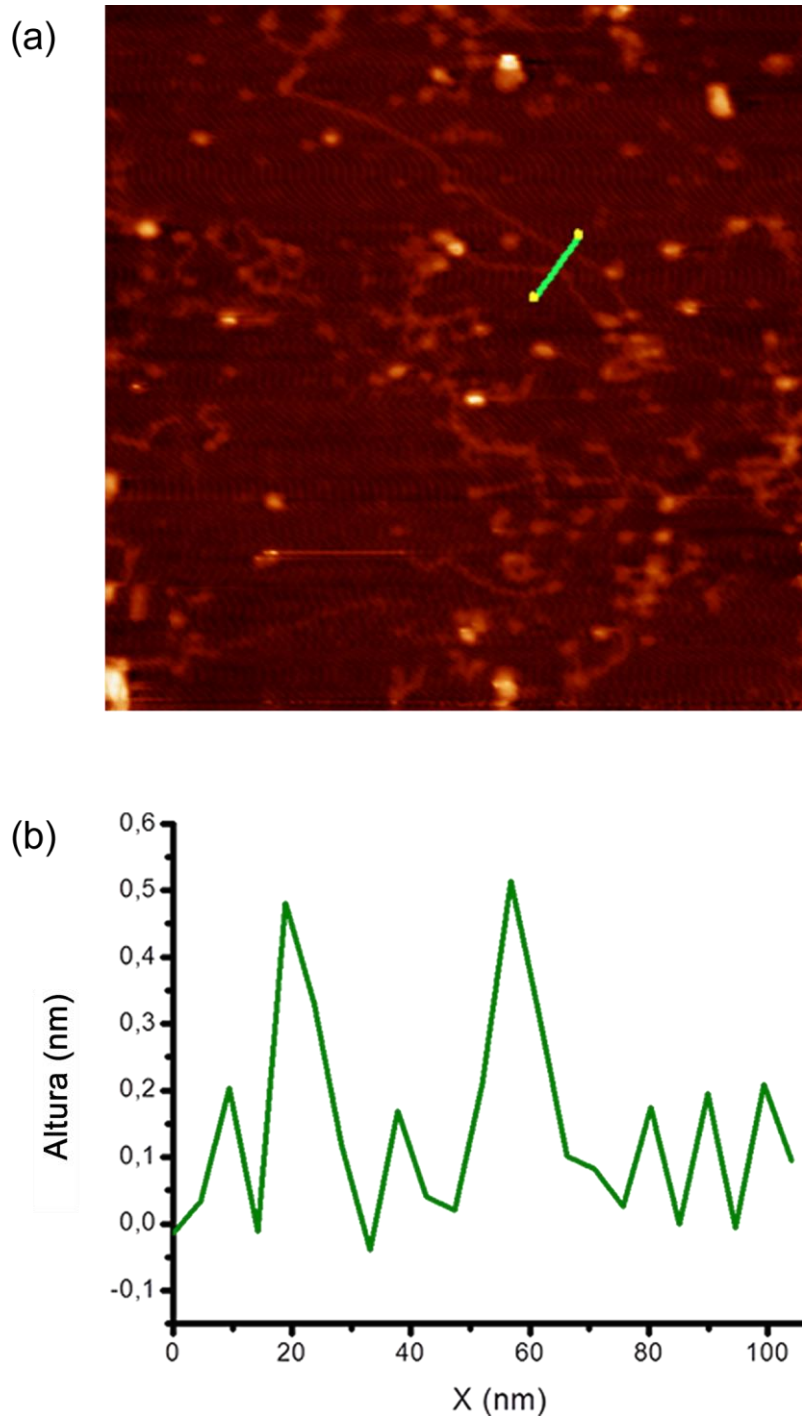


Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 3.13 mostra as imagens de AFM de moléculas de DNA imobilizada sobre a superfície de uma mica por poli-L-lisina e tratadas com timol. As alturas das cadeias visíveis

das moléculas de DNA na superfície plana da mica e tratadas com Timol foram medidas como sendo de 0,5 nm.

Figura 3.13 – (a) Conformação de moléculas de DNA adsorvido sobre a superfície de micas e tratadas com timol. (b) Perfil de altura, da fita do complexo DNA-ligante, representado pelo traço verde na imagem de AFM.



Fonte: Elaborada pelo autor

Comparando a Figura 3.12 com a Figura 3.13, vemos que a conformação das moléculas do DNA foi consideravelmente alterada devido ao tratamento com o timol. As imagens indicam que o timol ligou-se as moléculas de DNA provocando a quebra e a alteração da conformação das moléculas do DNA.

Há algumas pesquisas onde a toxicidade do timol foram medidas por várias técnicas, e mostram que concentrações abaixo de 0,5 mM não são tóxicos^{142; 143}. No entanto, neste estudo, nós trabalhamos com 0,05 mM de timol para avaliar sua genotoxicidade, e encontramos informações relevantes da toxicidade com DNA, apesar do baixo nível de timol. Pode concluir-se que o potencial genotóxico do timol no DNA é muito forte, embora tenhamos trabalhado com nível menor de timol

Alguns dados úteis podem ser obtidos a partir de uma imagem quantitativa bem sucedida das moléculas de DNA. O comprimento do contorno de cada molécula de DNA pode ser determinado a partir de seus esqueletos em imagens de AFM. Se as moléculas de DNA foram quebradas por fármacos, é fácil de ser claramente distinguidas a partir de fragmentos de DNA não danificadas com base em seus contornos de comprimentos.

3.5.4 Discussão

Nossos resultados mostram que o imageamento de DNA por AFM, em ar, é uma alternativa conveniente à microscopia eletrônica de varredura, para determinar as conformações do DNA e dos complexos de DNA-ligante. A modificação da superfície da mica utilizando poli-L-Lisina proporciona uma ligação forte e firme com o DNA. Esta forte fixação do DNA, permite o estudo da mudança conformacional do DNA na mica quando interagindo com o timol. As imagens do complexo de DNA-timol na mica mostra informações de modificações ou alterações conformacionais nas cadeias de DNA.

4 NANO EXPANSÃO TÉRMICA EM SÓLIDOS INDUZIDA POR LASER E MEDIDA COM AFM

Neste capítulo estudaremos a aplicabilidade do AFM no estudo da nano expansão térmica em sólidos, induzida por laser. Utilizaremos um modelo teórico já bem estabelecido, para a descrição da deformação termoelástica induzida por um feixe de excitação, com perfil Gaussiano, na superfície da amostra estudada. Os resultados dos deslocamentos da superfície em função do tempo, obtidos pela técnica de AFM, são comparados com os valores obtidos a partir do modelo teórico apresentado. Os resultados obtidos estão em boa concordância dentro do erro experimental, evidenciando o potencial da técnica de AFM para o estudo, de forma direta, da amplitude e dinâmica de efeitos térmicos em materiais sólidos, induzidas por luz laser.

4.1 Considerações Gerais

A interação da luz com a matéria induz um grande número de efeitos que são de interesse fundamental para o desenvolvimento e a caracterização de novos materiais. Uma destas classes de efeitos é o efeito fototérmico, que consiste na mudança do estado térmico da amostra induzida por radiação eletromagnética. A energia absorvida de um feixe luminoso e não reemitida resulta em um aumento da energia interna na amostra e, conseqüentemente, na elevação da temperatura na amostra. A variação de temperatura induz mudanças em algumas das propriedades relacionadas à temperatura da amostra, como densidade (ρ), índice de refração (n), condutividade térmica (k), calor específico (c), coeficiente de expansão térmico linear (α_T), razão de Poisson (ν), dentre outras.

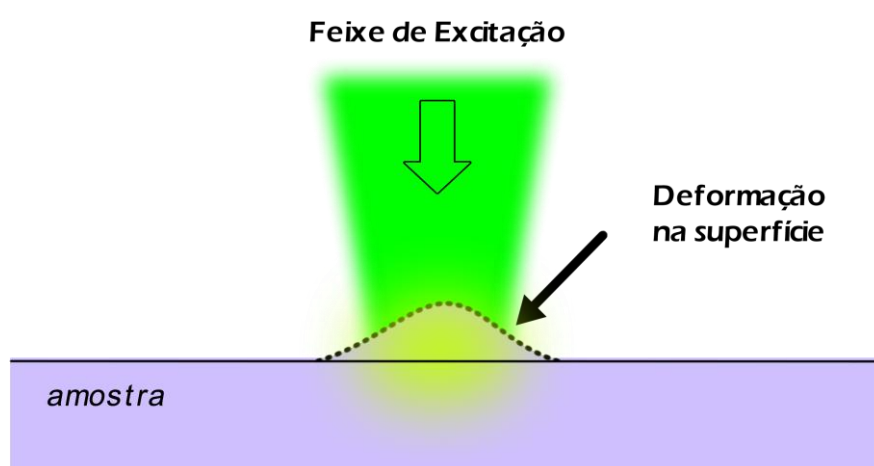
Durante a formação de um fenômeno fototérmico em material sólido, quando um feixe luminoso incide em sua superfície, é possível causar uma deformação superficial. Isto porque parte da energia absorvida é convertida em calor, resultando em uma expansão local no material. Dependendo do gradiente de temperatura local, o deslocamento térmico, devido a expansão, pode ser: (i) termoelástico, no caso em que não ocorre deformação permanente na superfície da amostra após o gradiente de temperatura desaparecer, e (ii)

termoplástico, no caso em que a deformação chega bem acima do limite da elasticidade, o que por sua vez leva a uma deformação permanente na região da superfície.

As primeiras investigações teóricas e experimentais de aquecimento a laser de materiais remontam a 1960^{144; 145}. No entanto, nas últimas décadas, estudos das deformações termoelásticas de superfícies, induzida por laser, tem se tornado de grande interesse para aplicação em diversas áreas^{146; 147}. A expansão térmica em sólidos discutida neste trabalho baseia-se na criação de deformações termoelásticas de superfície por um laser de onda contínua, cuja energia da luz é absorvida na superfície de um corpo sólido. Estas deformações dependem da distribuição da fonte térmica sobre a superfície e das características termoelásticas do material. Vale salientar que estudos anteriores tem mostrado que, monitorar o deslocamento térmico da superfície permite determinar a temperatura da superfície do material¹⁴⁸.

O princípio da deformação termoelástica da superfície é muito simples e é ilustrado na Figura 4.1. O feixe de excitação ao incidir na amostra é absorvido, resultando em uma deformação na superfície devido ao aquecimento. A deformação depende das propriedades óticas e termomecânicas da amostra.

Figura 4.1 – Ilustração esquemática da deformação termoelástica da superfície induzida por um feixe de excitação com perfil Gaussiano.



Fonte: Elaborada pelo autor

De fato, depois da invenção do laser, diversas técnicas que exploram os efeitos fototérmicos surgiram e estão sendo constantemente melhoradas¹⁴⁹. Medidas de variação de temperatura, pressão ou densidade que ocorrem devido à absorção da radiação

eletromagnética são à base dos métodos fototérmicos^{150; 151; 152}. Alguns dos exemplos de métodos fototérmicos utilizados para detectar a deformação de superfícies induzida por um feixe de excitação são: a deflexão fototérmica¹⁴⁹ e o espelho térmico^{153; 154}. As técnicas fototérmicas baseadas na deformação superficial de materiais sólidos são amplamente empregadas para estudo quantitativo e qualitativo das propriedades térmicas e ópticas destes materiais.

As características e o modo de funcionamento do AFM faz com que ele seja uma ferramenta adequada para medições da deformação de superfícies em nano-escala. De fato, o AFM é uma das principais técnicas para medições não destrutivas de alta resolução, da topografia de superfícies, para a manipulação e para o estudo das propriedades de material em escala nano.

Por varrer a ponta afiada sobre a superfície da amostra e registrar o seu deslocamento, o AFM fornece resolução em escala atômica¹⁵⁵, e pode ser utilizado numa variedade de ambientes, como o ar¹², vácuo¹⁵⁵ e líquidos¹⁵⁶ nas mais amplas faixas de temperaturas^{157; 158}. A alta resolução em conjunto com tal versatilidade faz com que esta técnica de microscopia seja aplicável em uma ampla gama de problemas, em várias disciplinas, desde a biologia até a ciência dos materiais.

Neste trabalho, mantendo a ponta nanoscópica do AFM fixa no centro da região de incidência do feixe de excitação, realizamos pela primeira vez, medidas diretas das deformações termoelásticas de superfícies, induzidas pela incidência de um laser. A boa concordância dos resultados experimentais e teóricos mostra uma importante linha de aplicação para o uso do AFM, evidenciando o potencial desta técnica no estudo de efeitos térmicos em materiais sólidos.

4.3 Medidas de AFM Resolvidas no Tempo

Como visto anteriormente, quando a superfície de um material sólido é sujeita a irradiação de um feixe de laser, ocorre uma expansão térmica da região irradiada, e que a deformação da superfície, causada pela expansão térmica, pode ser elástica ou plástica. No caso de deformação elástica, o campo de tensão gerado na vizinhança da superfície não excede a tensão elástica do material. Além disso, a tensão desenvolvida ao longo do eixo do

feixe de laser é de tração, enquanto a sua contraparte normal em relação ao eixo do feixe de laser é de compressão. Vimos também que o AFM é uma ferramenta apropriada e versátil para medidas de deslocamentos de superfícies. No entanto, até o momento, os deslocamentos medidos em estudos anteriores refletem apenas a variação topográfica da superfície da amostra em função da posição da ponta do AFM num plano horizontal bidimensional (xy).

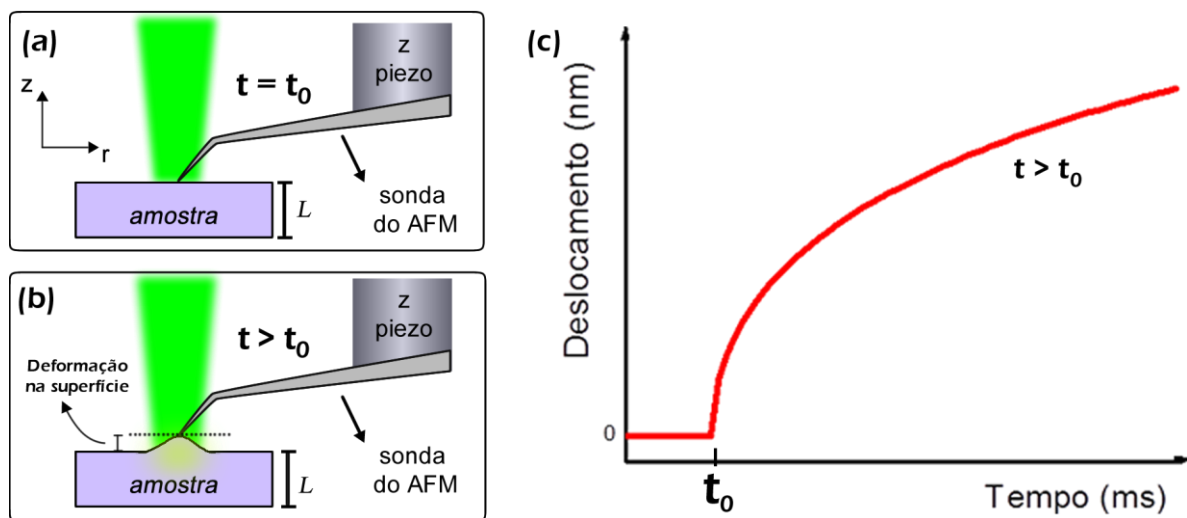
Medidas de AFM resolvidas no tempo têm sido propostas como um sensor da resposta mecânica de materiais por meio das medições das forças de interação ponta-amostra¹⁵⁹. No entanto, neste trabalho estamos particularmente interessados em medir o deslocamento da superfície de um sólido, em função do tempo, devido à expansão térmica induzida por um feixe de excitação. Para obtenção de tal medida, nós usamos um AFM operando em modo intermitente, modulando a frequência de oscilação da sonda por meio da realimentação de fase. No primeiro capítulo desta tese temos visto que o modo intermitente¹⁶⁰ é um modo dinâmico, na qual a sonda oscila próximo da sua frequência de ressonância e os contatos com a amostra ocorrem num curto intervalo de tempo, uma vez em cada oscilação. Além disso, a modulação da frequência faz com que a amplitude de oscilação do cantilever seja mantida constante pelo sistema de realimentação em loop, enquanto o sinal de realimentação do transdutor piezoeletrico é gravado como um deslocamento da superfície.

Para as medidas dos deslocamentos da superfície em função do tempo nós, primeiramente, levamos a ponta nanoscópica do AFM em contato intermitente com a superfície da amostra, posicionando-a no centro da região de incidência do laser sobre a amostra. Uma vez, posicionada sobre a região de interesse, os escâneres de movimento lateral da ponta foram desativados, mantendo assim a ponta fixa na mesma posição durante a medida. Em seguida passamos a monitorar os deslocamentos superficiais da amostra através do sinal de realimentação do escâner piezoeletrico vertical do AFM em função do tempo enquanto o feixe de excitação incide sobre a superfície da amostra.

Como mostrado na Figura 4.2, o feixe excitação incidente ao longo da direção z e é absorvido por uma amostra de espessura L . O tempo t_0 representa o instante em que o feixe de excitação incide na amostra, não ocorrendo, portanto, a deformação da superfície

(Figura 4.2(a)). Para um tempo t maior que t_0 a energia absorvida pela amostra é convertida em calor, resultando em uma expansão térmica local da amostra (Figura 4.2(b)). Durante a expansão local da amostra a frequência de ressonância muda devido a uma diminuição na distância de separação ponta-amostra, de forma que a amplitude de oscilação muda e o sistema de realimentação reage quase que instantaneamente a mudança na frequência de ressonância, reajustando a distância ponta-amostra de forma que a amplitude de oscilação seja constante. O sinal de realimentação do transdutor piezelétrico é gravado como o deslocamento da superfície da amostra induzida pelo feixe de excitação. A informação do deslocamento da superfície, no ponto de contato entre a ponta do AFM e a amostra, é exibida em tempo real no software de controle das medidas como um gráfico do deslocamento em função do tempo (Figura 4.2(c)).

Figura 4.2 – (a) Instante de tempo t_0 em que o feixe de excitação incide sobre a superfície da amostra mas ainda não há deformação da superfície. (b) Instantes de tempo $t > t_0$ em que a amostra absorveu o feixe de excitação provocando uma deformação da superfície. (c) Gráfico ilustrativo das medidas por AFM dos deslocamentos da superfície em função do tempo.



Fonte: Elaborada pelo autor

De fato, a resolução temporal das medidas da deformação superficial por AFM depende da frequência de ressonância fundamental do cantilever. Estudos tem mostrado que para um AFM operando em modo intermitente, com frequência de oscilação modulada por meio da realimentação de fase, fornece resolução temporal na ordem do inverso da frequência de ressonância da sonda do AFM¹⁶¹ ($\Delta t \approx 1/\omega_{res}$).

4.2 Modelo Teórico da Deformação na Amostra

Nesta seção é apresentado o modelo teórico para o cálculo da deformação na amostra induzida pelo laser de excitação.

A deformação que a superfície da amostra sofre é resultado do aumento da temperatura, distribuída de maneira não uniforme, numa região próxima da superfície devido à incidência do feixe de excitação. A teoria da elasticidade¹⁶² pode ser utilizada para obter o deslocamento superficial na amostra. Com base nesta teoria, na aproximação quase-estática, a deformação na amostra induzida pelo laser é obtida resolvendo a equação termoelástica^{162; 163; 164} dada por

$$(1 - 2\nu)\nabla^2 \bar{u}(r, z, t) + \nabla[\nabla \bar{u}(r, z, t)] = 2(1 + \nu)\alpha_T \nabla T(r, z, t) \quad (4.1)$$

onde $\bar{u}(r, z, t)$ é o vetor deslocamento (Figura 4.3), ν a razão de Poisson, α_T o coeficiente de expansão térmico linear e $T(r, z, t)$ é o valor da temperatura acima da ambiente. O termo do lado direito da equação diz respeito ao termo de fonte, o que gera o deslocamento do material, neste caso, o gradiente da variação da temperatura. De fato, a variação da temperatura $T(r, z, t)$ dentro da amostra é dada pela solução da equação de condução de calor

$$\frac{\partial T(r, z, t)}{\partial t} - D \nabla^2 T(r, z, t) = Q_0 e^{-A_e z} e^{-2r^2/\omega_{0e}^2} \quad (4.2)$$

onde $D = k/c\rho$ é a difusividade térmica da amostra, k , c e ρ são a condutividade térmica, o calor específico e a densidade de massa, respectivamente. A mudança da temperatura inicial é assumida sendo uniforme ou $T(r, z, 0) = 0$. $Q_0 = P_0 A_e (1 - R) \phi / c \rho \pi \omega_{0e}^2$, onde P_0 é a potência do laser, A_e é o coeficiente de absorção no comprimento de onda do feixe de excitação, R é a refletividade, ω_{0e} é o raio do feixe de excitação e ϕ é a quantidade de energia absorvida convertida em calor (carga térmica).

Levando em consideração que deformação da superfície tem simetria axial tal qual sua fonte geradora, podemos expressar a solução da equação (4.1), na aproximação quase-estática, em coordenadas cilíndricas introduzindo o potencial de deslocamento termoelástico Ψ e a função de Love¹⁶² ψ , sendo Ψ a solução da equação de Poisson (solução particular).

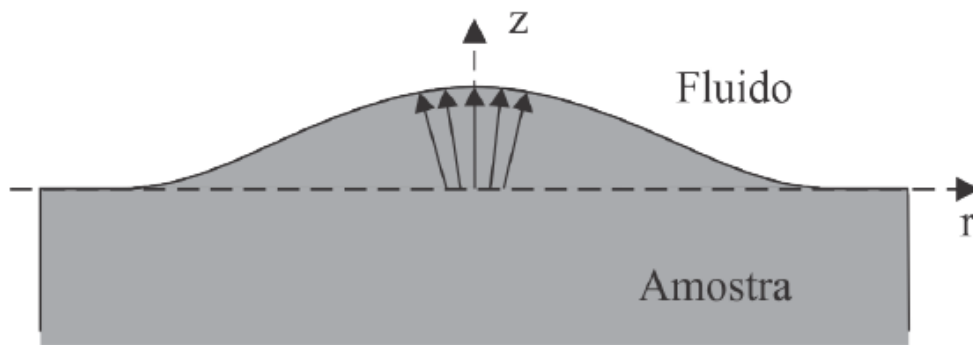
$$\nabla^2 \Psi(r, z, t) = \frac{(1+\nu)}{(1-\nu)} \alpha_T T(r, z, t) \quad (4.3)$$

e a função Love ψ é a solução da equação bi-harmônica (solução homogênea)

$$\nabla^2 \nabla^2 \psi(r, z, t) = 0 \quad (4.4)$$

r é a coordenada radial e t é o tempo.

Figura 4.3 – Vetores de deslocamento. A linha tracejada horizontal representa a superfície da amostra antes da deformação. As setas indicam o deslocamento de um ponto da superfície após o sólido ser aquecido localmente pelo feixe de excitação.



Fonte: retirada da Ref. [163]

Utilizando as soluções das equações (4.3) e (4.4), as componentes r e z do vetor deslocamento (u_r e u_z) e as componentes de tensão normal (σ_{zz} e σ_{rz}) são obtidas de $\Psi(r, z, t)$ e $\psi(r, z, t)$ por meio das seguintes relações

$$u_i(r, z, t) = \partial_i \Psi(r, z, t) + \frac{1}{1-2\nu} [2(1-\nu)\delta_{zi}\nabla^2 - \partial_{zi}] \psi(r, z, t) \quad (4.5)$$

$$\begin{aligned} \sigma_{ij} = & \frac{E}{(1+\nu)} [\partial_{ij} - \delta_{ij}\nabla^2] \Psi(r, z, t) + \\ & + \frac{E}{(1+\nu)(1-2\nu)} [\partial_z (\nu\delta_{ij}\nabla^2 - \partial_{ij}) + (1-\nu)\nabla^2 (\delta_{iz}\partial_j - \delta_{jz}\partial_i)] \psi(r, z, t) \end{aligned} \quad (4.6)$$

onde E é o módulo de Young, ∂_{ij} representa as derivadas em relação a $i = r, z$ e $j = r, z$, e δ_{ij} é a função delta de Kronecker.

A solução da equação de Poisson pode ser escrita em termos da transformada de Hankel-Fourier da distribuição de temperatura

$$T(r, z, t) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} T(\alpha, \lambda, t) \cos(\lambda z) J_0(\alpha r) \alpha d\alpha d\lambda \quad (4.7)$$

sendo, $T(\alpha, \lambda, t)$ escrito como¹⁶³

$$T(\alpha, \lambda, t) = \int_0^t Q(\alpha, \lambda) e^{-\frac{k}{\rho c}(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} d\tau \quad (4.8)$$

de maneira que

$$\Psi(r, z, t) = -\frac{(1+\nu)}{(1-\nu)} \alpha_T \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} \frac{T(\alpha, \lambda, t)}{\alpha^2 + \lambda^2} \cos(\lambda z) J_0(\alpha r) \alpha d\alpha d\lambda \quad (4.9)$$

Pode-se verificar a solução $\Psi(r, z, t)$ aplicando o laplaciano em coordenadas cilíndricas, na equação (4.9), ou seja:

$$\nabla^2 \Psi(r, z, t) = \frac{(1+\nu)}{(1-\nu)} \alpha_T \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} T(\alpha, \lambda, t) [-(\alpha^2 + \lambda^2) \cos(\lambda z) J_0(\alpha r)] \alpha d\alpha d\lambda \quad (4.10)$$

onde $J_n(x)$ representa a função de Bessel de primeira espécie. Assim, para que a igualdade da equação (4.3) seja verdadeira a sua solução deve ser da forma da equação (4.9).

O próximo passo é tratar a equação bi-harmônica descrita pela equação (4.4). Sua solução geral é dada pela função de Love e pode ser escrita como

$$\psi(r, z, t) = \int_0^{\infty} [(A + \alpha z B) e^{-\alpha z} + (F + \alpha z G) e^{\alpha z}] \alpha^{-2} J_0(\alpha r) d\alpha \quad (4.11)$$

onde em que A , B , F e G são constantes definidas pelas condições de contorno. Supondo que a amostra esteja livre de tensão em suas superfícies, as condições de contorno são

$$\sigma_{rz}|_{z=0,L} = 0 \quad \text{e} \quad \sigma_{zz}|_{z=0,L} = 0 \quad (4.12)$$

sendo σ_{rz} e σ_{zz} as componentes de tensões perpendiculares à superfície da amostra. Os demais componentes de tensão não são nulos. Como exemplo, considere-se a componente de tensão $\sigma_{zr}|_{z=0}$, localizada na superfície da amostra em uma posição radial qualquer e apontando na direção r , onde também há amostra, ou seja, esse ponto não está livre para movimentar-se nessa direção.

Substituindo Ψ e ψ nas equações (4.5) e (4.6) e aplicando as condições de contorno (4.12), obtém-se¹⁶³

$$u_z(r, z=0, t) = \int_0^\infty \frac{2\alpha_T(1+\nu)\alpha^2 \mathcal{G}(\alpha, t) J_0(\alpha r)}{1 + 2L^2\alpha^2 - \cosh(2L\alpha)} d\alpha \quad (4.13)$$

com

$$\mathcal{G}(\alpha, t) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty \frac{T(\alpha, \lambda, t)}{(\alpha^2 + \lambda^2)} \left\{ [2L\alpha + \sinh(2L\alpha)] - [2L\sinh(L\alpha)]\lambda \sin(L\lambda) \right\} d\lambda \quad (4.14)$$

em que $T(\alpha, \lambda, t)$ é a temperatura da amostra no espaço dos cossenos de Hankel-Fourier e L é a espessura da amostra.

Na aproximação de amostra semi-infinita, as constantes F e G são zero, caso contrário, a função ψ diverge para $z \rightarrow \infty$. Nesse caso, as duas condições de contorno para as tensões em $z=0$ são suficientes para determinar as constantes A e B . Na aproximação semi-infinita, a deformação superficial é dada por

$$u_z(r, z=0, t) = -2(1+\nu)\alpha_T \int_0^\infty \alpha^2 f(\alpha, t) J_0(\alpha r) d\alpha \quad (4.15)$$

com

$$f(\alpha, t) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty \frac{T(\alpha, \lambda, t)}{(\alpha^2 + \lambda^2)} d\lambda \quad (4.16)$$

Usamos a aproximação de amostra semi-infinita para obter a temperatura do sistema e, conseqüentemente, a deformação induzida na amostra.

4.4 Características das Amostras Estudadas

Nesta seção apresentaremos algumas características das amostras utilizadas, neste trabalho, para as medidas das deformações termoelásticas induzidas pelo feixe de excitação.

Os experimentos das medidas dos deslocamentos termoelásticos induzidos pelo laser foram realizados em vidros fosfatos Q-98 fornecidos pela empresa americana Kigre Inc. Vidros de fosfato têm sido identificados como um das matrizes vítreas mais promissoras para várias aplicações. Quando dopados com neodímio (Nd^{3+}), os vidros de fosfato apresentam alta eficiência quântica de fluorescência¹⁶⁵. Esta característica, aliada a excelentes propriedades térmicas e mecânica, torna estes vidros os maiores e mais comuns vidros de laser em volume total produzido nos dias atuais¹⁶⁶. Os vidros fosfatos Q-98

estudados neste trabalho são dopados com Nd^{3+} a concentrações de 1, 3, 6 e 9 wt% (peso percentual).

Tabela 4.1 – Propriedades ópticas, térmicas e físicas das amostras analisadas.

Amostra	Propriedades Ópticas		Propriedades térmicas			Propriedades Físicas			
	n	β (m^{-1})	α_T (10^{-6}K^{-1})	k_T (W/m.K)	c_p (J/kg K)	ρ (kg/m^3)	E (Kg/m^2)	ν	L (mm)
1% de Nd^{3+}	1,555	86	99	0,82	800	3099	72,1	0,24	1,96
3% de Nd^{3+}	1,555	103	99	0,82	800	3099	72,1	0,24	1,51
6% de Nd^{3+}	1,555	277	99	0,82	800	3099	72,1	0,24	1,29
9% de Nd^{3+}	1,572	547	96	0,82	800	3204	71,5	0,24	1,05

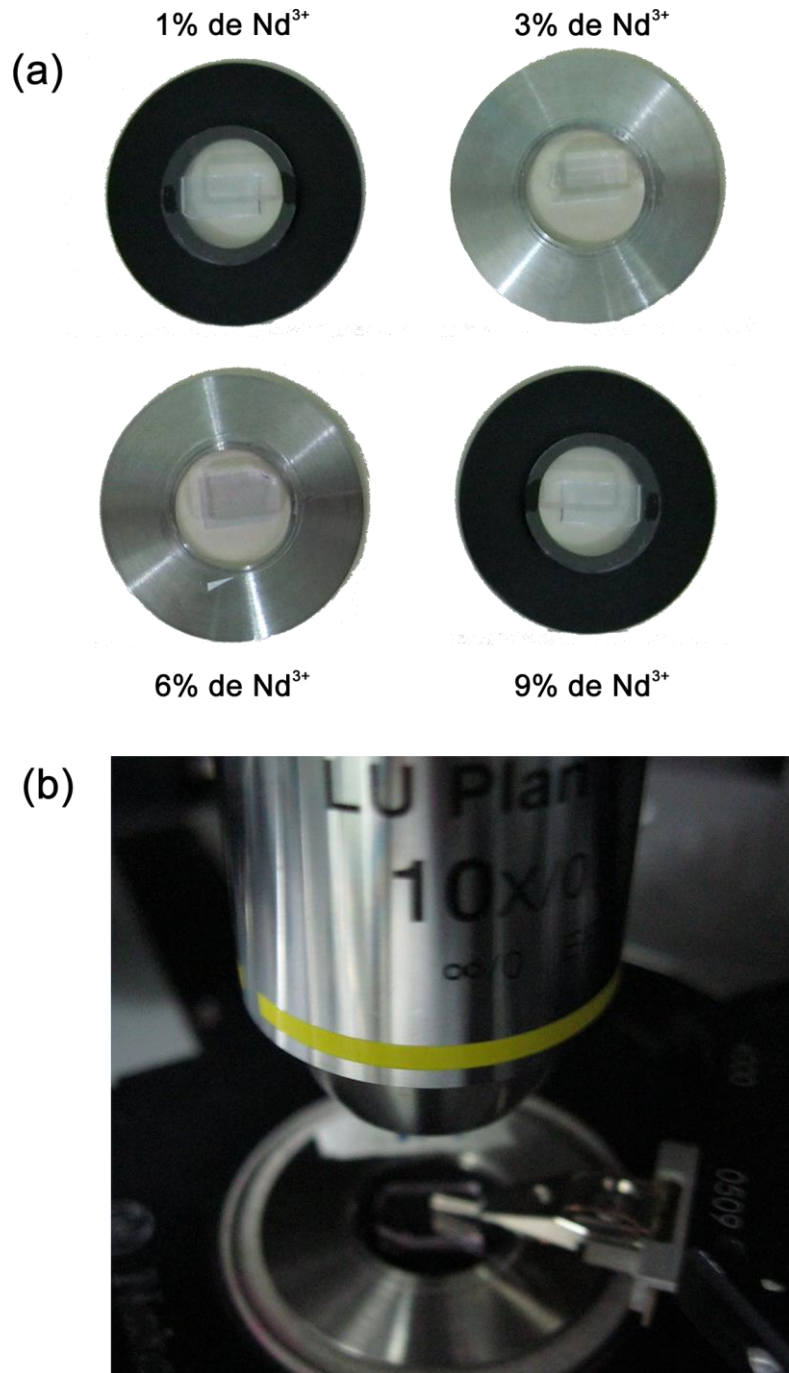
A Tabela 4.1 resume algumas das propriedades ópticas, térmicas e físicas dos vidros fosfatos estudados. Quanto às propriedades ópticas, n é o índice de refração, dn/dT é o coeficiente de temperatura do índice de refração e β é o coeficiente de absorção óptica. Quanto às propriedades térmicas, α_T é o coeficiente de expansão térmica entre 20°C–40°C, k_T é a condutividade e c_p é o calor específico. Quanto às propriedades físicas, ρ é a densidade, E é o módulo de Young, ν é a razão de Poisson e L é a espessura da amostra.

4.5 Procedimento Experimental

Nesta seção apresentamos os procedimentos experimentais utilizados para a realização deste estudo.

Antes da realização das imagens de AFM e das medidas por AFM dos deslocamentos termoelásticos induzidos pelo laser de excitação, as amostras receberam um polimento óptico a fim de minimizar as rugosidades das superfícies e em seguida elas foram lavadas, imersas em álcool isopropílico, num ultrassom por 10 minutos. Após secas, as amostras foram fixadas à porta-amostras e levadas ao AFM para a realização das medidas. A Figura 4.4(a) mostra as amostras já preparadas para as medições por AFM, enquanto que a Figura 4.4(b) mostra uma das amostras posicionadas no AFM para o início do imageamento da região escolhida. Durante as medições de uma das amostras as outras ficaram guardadas num dissecador a vácuo para evitar acúmulo de poeira.

Figura 4.4 – (a) Imagem dos vidros fosfatos polidos, lavados e fixos nos porta-amostras para as medições por AFM. (b) Amostra Q-98 com 6% de Nd^{3+} posicionada sobre o escâner piezoelétrico do AFM para início do imageamento.

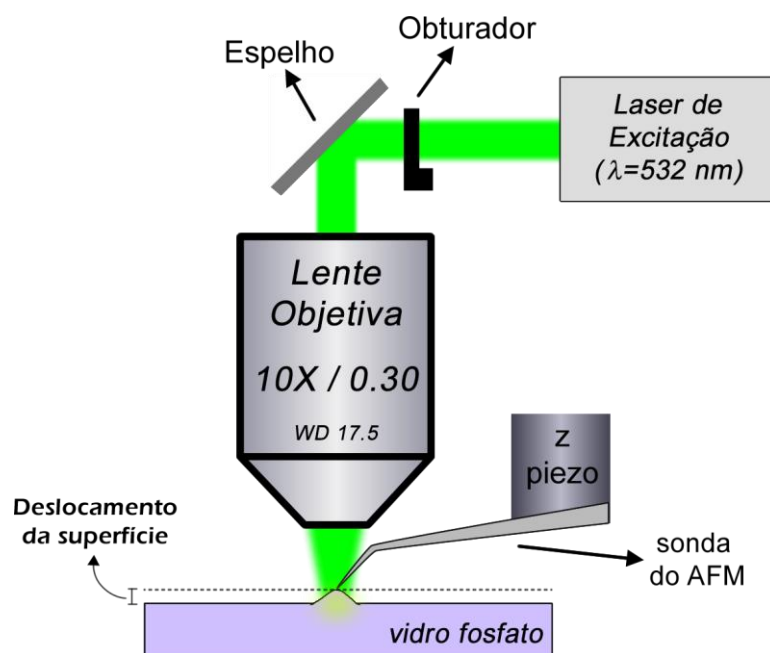


Fonte: Elaborada pelo autor

Um diagrama esquemático do aparato experimental usado para as medições dos deslocamentos das superfícies das amostras por AFM é mostrado na Figura 4.5. A fonte de excitação é um laser de estado sólido bombeado por diodo (DPSS), de onda contínua (CW), no comprimento de onda $\lambda = 532 \text{ nm}$. O feixe de excitação passa por um obturador óptico

que controla o tempo de incidência do laser sobre a amostra. O feixe de excitação foi focado na superfície da amostra com uma lente objetiva de distância focal de 17,5 mm. O diâmetro do ponto de foco do feixe de excitação na superfície da amostra é de 10 μm e as amostras foram excitadas com 20mW por 300 ms.

Figura 4.5 – Diagrama esquemático de um aparato experimental para medidas de deslocamentos da superfície por AFM.



Fonte: Elaborada pelo autor

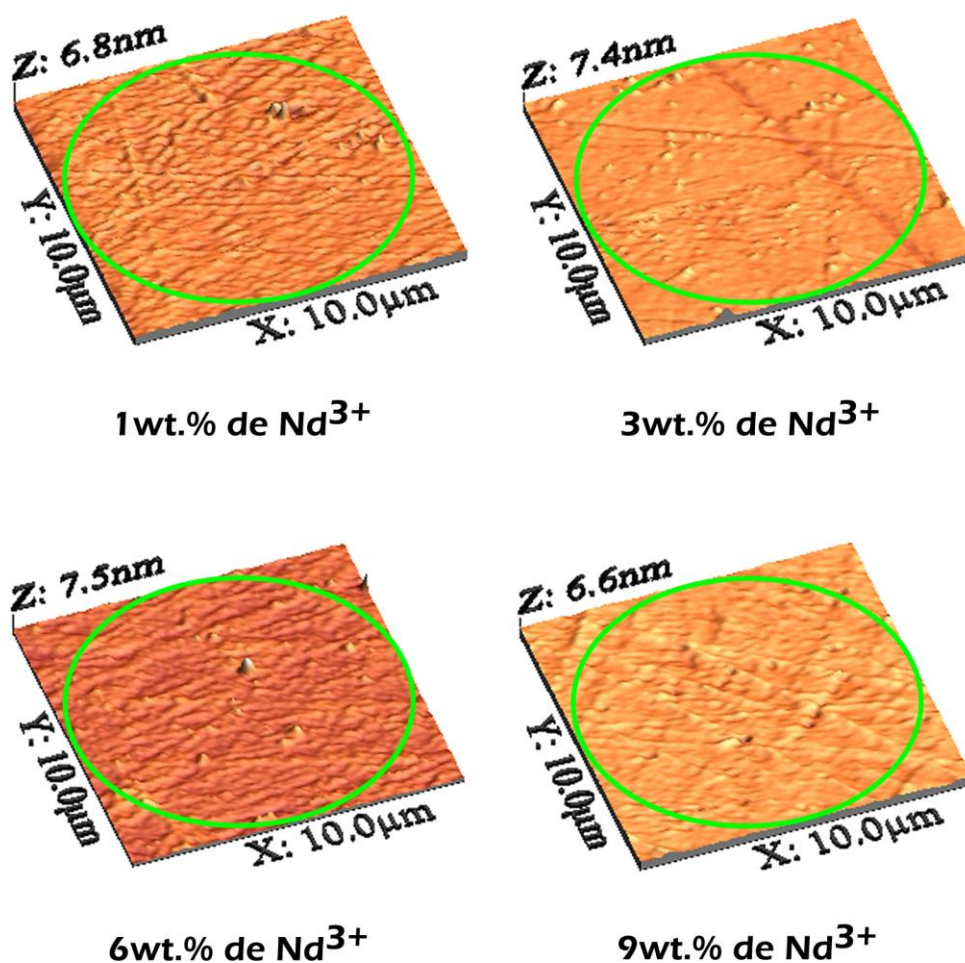
As imagens de AFM e as medições dos deslocamentos de superfície das amostras foram realizadas utilizando um AFM (Multiview 4000TM), operando com realimentação de fase em modo intermitente utilizando sondas de vidro em diapasão com um diâmetro de ponta de 10nm, com uma frequência de ressonância de 37–42 kHz. A frequência de ressonância das sondas utilizadas confere ao sistema um tempo de resposta à deformação superficial de ordem de até 25 μs . A ponta é posicionada entre a lente do microscópio e a amostra, sem obstruir qualquer aspecto do feixe de excitação. A ponta é iluminada e exposta pela lente do microscópio, permitindo-nos visualizar a região exata onde a informação do deslocamento da superfície está sendo coletada. Na região central de cada uma das amostras foram realizadas, pelo menos, 12 medições. Todos os experimentos foram realizados em condição ambiente com temperatura entre 23°C- 25°C e umidade relativa variando dentro de uma faixa de 35% - 45%.

4.6 Resultados e Discussões

Nesta seção, apresentamos as imagens de AFM e as medições das deformações superficiais induzidas por um feixe de excitação em vidros fosfatos Q-98, dopados com Nd^{3+} à concentrações de 1, 3, 6 e 9wt% (peso percentual).

A Figura 4.6 mostra as imagens topográficas de AFM realizadas nas amostras analisadas. Podemos observar que devido ao polimento ótico, as superfícies das amostras apresentaram rugosidade em escala nanométrica. De fato a análise da rugosidade das amostras, usando o software WSxM⁷⁶, mostra que as rugosidades médias são 0,95 nm, 0,84 nm, 0,77 nm e 0,93 nm para as amostras com 1%, 3%, 6% e 9% de Nd^{3+} , respectivamente.

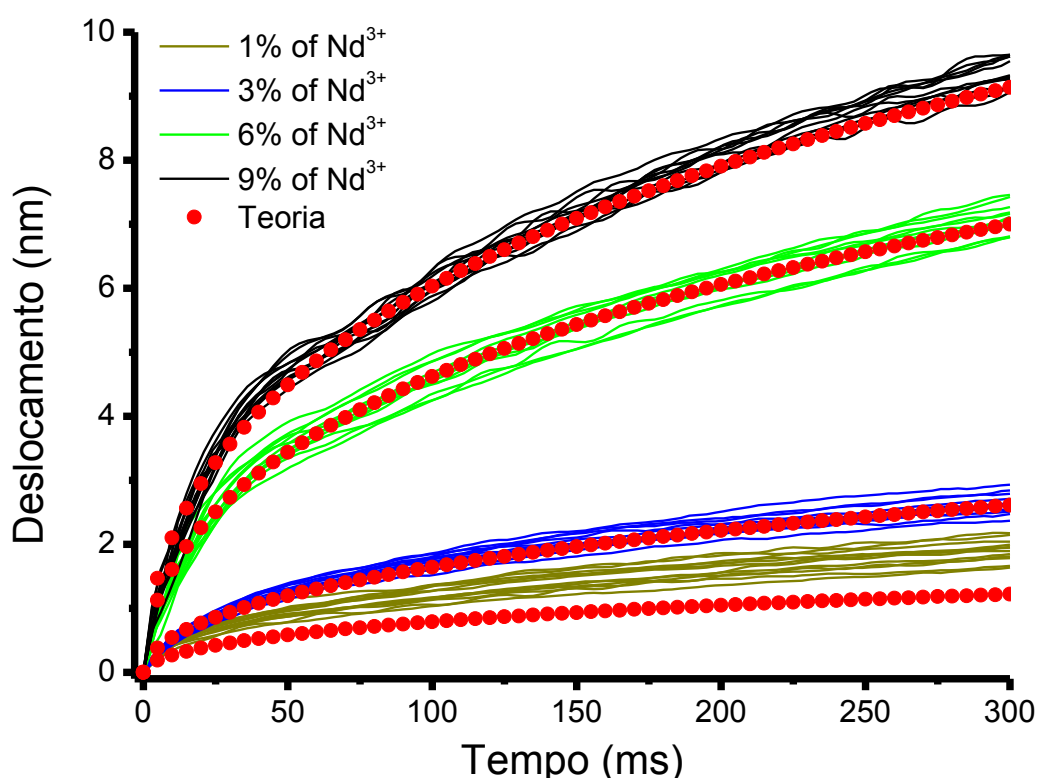
Figura 4.6 – Imagens topográficas de AFM dos vidros Q-98, dopados com 1%, 3%, 6% e 9% de Nd^{3+} . Os círculos verdes, sobrepostos às imagens ilustram a área de incidência do feixe de excitação.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 4.7 mostra os resultados experimentais dos deslocamentos da superfície no centro da região de incidência do feixe de excitação medidos por AFM em função do tempo. Usando a expressão analítica para $u_z(r,t)$ dada pela equação (4.13), os parâmetros das amostras e do laser usado, podemos estimar também o deslocamento superficial induzido pelo feixe de excitação. Como pode ser visto, há uma excelente concordância entre os resultados experimentais e teóricos, com algum desacordo apenas para a baixa concentração Nd^{3+} . Esta diferença para a baixa concentração é atribuída ao pequeno coeficiente de absorção linear dos íons de Nd^{3+} no comprimento de onda do laser de excitação. Além disso, o deslocamento total é de cerca de 1 nanômetro e qualquer instabilidade ou ruído do sistema pode afetar fortemente estas medidas, uma vez que este foi o nível mais próximo do limite de resolução do AFM, e algumas discrepâncias são esperados.

Figura 4.7 – As linhas sólidas representam os resultados experimentais obtidos por AFM e os pontos vermelhos representam os resultados teóricos obtidos a partir da equação (4.13).



Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar das amostras conterem alguma rugosidade e da deformação induzida pelo feixe de excitação ser da ordem de algumas das estruturas em sua superfície, vemos que, em

geral, as deformações não são consideravelmente afetadas por elas. Medidas prévias da topografia da amostra nos indicam as melhores regiões para a realização das medidas do deslocamento superficial induzida pelo feixe de excitação, evitando áreas com maior rugosidades ou estruturas que possam influenciar nos resultados.

Apesar das amostras conterem alguma rugosidade e da deformação induzida pelo feixe de excitação ser da ordem de algumas das estruturas em sua superfície, vemos que, em geral, as deformações não são consideravelmente afetadas por elas. Medidas prévias da topografia da amostra nos indicam as melhores regiões para a realização das medidas do deslocamento superficial induzida pelo feixe de excitação, evitando áreas com maior rugosidades ou estruturas que possam influenciar nos resultados.

Os resultados apresentados acima demonstram o potencial do AFM para estimar o deslocamento da superfície induzido pelo laser. A técnica é capaz de detectar deformações superficiais em nano-escala. Os resultados teóricos e experimentais estão em excelente concordância.

5 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em conclusão, neste trabalho o AFM foi utilizado como ferramenta para investigar a influência de uma MEC nas propriedades biomecânicas do citoesqueleto e da membrana através da medida do módulo elástico em macrófagos aderidos a substratos revestidos por fibronectina. Foi observada a participação dominante do citoesqueleto de actina nas propriedades elásticas das células, por meio tratamento com Citocalasina D. Assim, demonstramos que a adesão celular à MEC influencia as propriedades elásticas das células por meio dos filamentos de actina. Tomados em conjunto, nossos dados implicam que as interações célula-MEC mediada pelo citoesqueleto afetam diretamente os eventos biomecânicos das células, modificando as propriedades físicas do citoesqueleto celular.

Usamos ainda o AFM para observação direta de mudanças na conformação de moléculas de DNA devido suas interações com timol. Nossos resultados mostram que o nanoimagem do DNA, por AFM, é uma alternativa à microscopia eletrônica de varredura, para determinar as conformações do DNA e dos complexos de DNA-ligante. A modificação da superfície de uma mica utilizando poli-L-Lisina proporciona uma ligação forte e firme com o DNA. Esta forte fixação do DNA, permite o estudo da mudança conformacional do DNA na mica quando interagindo com o timol.

De fato, embora a imobilização de DNA em mica tenha sido extensivamente estudada, a imobilização reprodutível do DNA é difícil de alcançar na prática e os ajustes dos parâmetros referentes ao controle da sonda e de extrema importância na redução de ruídos a fim de obter contraste suficiente para a visualização das moléculas de DNA sobre a superfície das micas. Um artigo com os resultados da investigação sobre a imobilização de moléculas de DNA sobre a superfície da mica e as mudanças de conformação do DNA e dos complexos de DNA-ligante, está em fase elaboração e, tão logo esteja finalizado, será submetido à apreciação para publicação.

É um fato que a maioria das novas aplicações e técnicas desenvolvidas em microscópios de varredura de sonda nos últimos anos estão relacionados com as ciências da vida. No entanto, ainda há muito espaço para aperfeiçoamento técnico, como por exemplo, na eletrônica, escâneres, e sondas que estão melhorando constantemente. Apesar da

existência de diversos estudos em amostras biológicas em meio líquido, este continua sendo um dos maiores desafios para operação de um AFM devido as dificuldades da varredura da sonda em meio líquido, sujeitas as forças viscosas. Além disso, as amostras biológicas são muito mais frágeis que as amostras comumente estudadas em AFM, por isso, um bom controle da força de interação ponta-amostra e a escolha correta das sondas, pra este tipo de estudo, é fundamental.

Na verdade, temos preparado e ajustado nossos sistemas de AFM e SNOM para a realização de medidas de amostras em ambientes líquido. Desta forma, como perspectivas de trabalhos futuros, está o estudo de propriedades elásticas e viscoelásticas em células. Além disso, temos adquirido sondas especiais para o desenvolvimento de estudos da força de adesão células-proteína através receptores específicos nas células. A capacidade de medidas de AFM em meio líquido nos dará a possibilidade de estudar as interações, em tempo real, de moléculas e complexos de DNA-ligante.

Outro estudo desenvolvido nesta tese, em amostra biológicas, foi avaliação da interações de nanopartículas de ouro com células usando o sistema de SNOM por transmissão. A interação entre as células e as nanopartículas puderam ser facilmente estudadas e mapeadas sem necessidade de marcação fluorescente nas nanopartículas. O padrão óptico (pontos escuros) de assinatura para vesículas carregadas de nanopartículas dentro das células foram observadas. Além do mais, este técnica de imageamento fornece um poderoso método livre de fluorescência para estudar a interação entre células e nanopartículas com uma resolução muito maior que a microscopia ótica convencional.

Como o objetivo de aplicações desta técnica em trabalhos futuros, estamos implementando alguns ajustes na configuração experimental do equipamento disponível em nosso laboratório. Esta implementação nos permitirá utilizar o SNOM com fluorescência para o estudo, de amostras, em nanoescala.

O estudo da sondagem direta por C-AFM de grãos cerâmicos de titanato de bário semicondutor, tem mostrado que é possível identificar diferenças na condução da corrente elétrica, entre as fronteiras e o interior dos grãos. Os resultados mostram que esta técnica é muito atraente para a realização de medições de transporte elétrico em nano-escala, bem como para a caracterização de propriedades elétricas de diversos materiais. De fato, o C-AFM tem se mostrado ideal para o estudo do transporte elétrico em dispositivos

microfabricados semicondutores, conjuntos de nanopartículas e moléculas biológicas individuais.

Por fim, deslocamento da superfície induzido pelo laser com o uso do AFM, através de medições dos deslocamentos em função do tempo. A técnica é capaz de detectar deformações superficiais em nano-escala. Os resultados teóricos e experimentais estão em excelente concordância

Além disso, uma vez que a frequência de ressonância da sonda utilizada, é fundamental para a resolução temporal das medidas da deformação da superfície. Pretendemos avaliar o uso de sonda com altas frequências de ressonância na diminuição do erro da medida e a reprodutibilidade das medidas

REFERÊNCIAS

- 1 HOOKE, R. **Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses. With observations and inquiries thereupon.** London, : Printed by J. Martyn and J. Allestry, 1665. 18 p. l., 246, 10 p.
- 2 Milestones in light microscopy. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 10, p. 1165-1165, 2009. ISSN 1465-7392.
- 3 PISTON, D. W. The impact of technology on light microscopy. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. S23-S24 2009.
- 4 Colouring in cells. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 11, p. 1233-1233, 2008. ISSN 1465-7392.
- 5 CONCHELLO, J.-A.; LICHTMAN, J. W. Optical sectioning microscopy. **Nat Meth**, v. 2, n. 12, p. 920-931, 2005. ISSN 1548-7091.
- 6 FREUNDLICH, M. M. Origin of the Electron Microscope. **Science**, v. 142, n. 3589, p. 185-188, October 11, 1963 1963.
- 7 BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning Tunneling Microscopy. **Helvetica Physica Acta**, v. 55, n. 6, p. 726-735, 1982. ISSN 0018-0238.
- 8 BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930-933, Mar 3 1986. ISSN 0031-9007.
- 9 WEISENHORN, A. L. et al. Imaging single-stranded DNA, antigen-antibody reaction and polymerized Langmuir-Blodgett films with an atomic force microscope. **Scanning microscopy**, v. 4, n. 3, p. 511-516, 1990. ISSN 0891-7035.
- 10 HAPALA, P. et al. Mechanism of high-resolution STM/AFM imaging with functionalized tips. **Physical Review B**, v. 90, n. 8, p. 085421, 2014.
- 11 RADMACHER, M. et al. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. **Science**, v. 257, n. 5078, p. 1900-1905, September 25, 1992 1992.
- 12 WEISENHORN, A. L. et al. Forces in Atomic Force Microscopy in Air and Water. **Applied Physics Letters**, v. 54, n. 26, p. 2651-2653, Jun 26 1989. ISSN 0003-6951.
- 13 SUGIMOTO, Y. et al. Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 64-67, 2007. ISSN 0028-0836.
- 14 GUCCIARDI, P. G. et al. Versatile scanning near-field optical microscope for material science applications. **Review of Scientific Instruments**, v. 68, n. 8, p. 3088-3092, 1997.

- 15 SUBRAMANIAM, V.; KIRSCH, A. K.; JOVIN, T. M. Cell biological applications of scanning near-field optical microscopy (SNOM). **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 44, n. 5, p. 689-700, 1998. ISSN 0145-5680.
- 16 FESTY, F.; DEMMING, A.; RICHARDS, D. Resonant excitation of tip plasmons for tip-enhanced Raman SNOM. **Ultramicroscopy**, v. 100, n. 3-4, p. 437-441, 2004. ISSN 0304-3991.
- 17 OLBRICH, A.; EBERSBERGER, B.; BOIT, C. Conducting atomic force microscopy for nanoscale electrical characterization of thin SiO₂. **Applied Physics Letters**, v. 73, n. 21, p. 3114-3116, 1998.
- 18 GALEMBECK, F. et al. Microscopia de sondas: uma caixa de ferramentas da nanotecnologia. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 37-43, 2013. ISSN 0009-6725.
- 19 BINNING, G. et al. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. **Physical Review Letters**, v. 49, n. 1, p. 57-61, 1982. ISSN 0031-9007.
- 20 SARID, D.; ELINGS, V. Review of Scanning Force Microscopy. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 9, n. 2, p. 431-437, Mar-Apr 1991. ISSN 1071-1023.
- 21 HANSMA, P. K.; TERSOFF, J. Scanning Tunneling Microscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 61, n. 2, p. R1-R23, Jan 15 1987. ISSN 0021-8979.
- 22 BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence. **Reviews of Modern Physics**, v. 59, n. 3, p. 615-625, 1987.
- 23 MARTIN, Y.; WICKRAMASINGHE, H. K. Magnetic Imaging by Force Microscopy with 1000-Å Resolution. **Applied Physics Letters**, v. 50, n. 20, p. 1455-1457, May 18 1987. ISSN 0003-6951.
- 24 POHL, D. W.; DENK, W.; LANZ, M. Optical Stethoscopy - Image Recording with Resolution $\lambda/20$. **Applied Physics Letters**, v. 44, n. 7, p. 651-653, 1984. ISSN 0003-6951.
- 25 BETZIG, E.; FINN, P. L.; WEINER, J. S. Combined Shear Force and near-Field Scanning Optical Microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 60, n. 20, p. 2484-2486, May 18 1992. ISSN 0003-6951.
- 26 BETZIG, E. et al. Breaking the Diffraction Barrier - Optical Microscopy on a Nanometric Scale. **Science**, v. 251, n. 5000, p. 1468-1470, Mar 22 1991. ISSN 0036-8075.
- 27 NONNENMACHER, M.; OBOYLE, M. P.; WICKRAMASINGHE, H. K. Kelvin Probe Force Microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 58, n. 25, p. 2921-2923, Jun 24 1991. ISSN 0003-6951.

- 28 DEVECCHIO, D.; BHUSHAN, B. Use of a nanoscale Kelvin probe for detecting wear precursors. **Review of Scientific Instruments**, v. 69, n. 10, p. 3618-3624, 1998.
- 29 WEAVER, J. M. R.; ABRAHAM, D. W. High-Resolution Atomic Force Microscopy Potentiometry. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 9, n. 3, p. 1559-1561, May-Jun 1991. ISSN 1071-1023.
- 30 WILLIAMS, C. C.; WICKRAMASINGHE, H. K. Microscopy of chemical-potential variations on an atomic scale. **Nature**, v. 344, n. 6264, p. 317-319, 1990.
- 31 RUGAR, D. et al. Magnetic Force Microscopy - General-Principles and Application to Longitudinal Recording Media. **Journal of Applied Physics**, v. 68, n. 3, p. 1169-1183, Aug 1 1990. ISSN 0021-8979.
- 32 HANSMA, P. et al. The scanning ion-conductance microscope. **Science**, v. 243, n. 4891, p. 641-643, February 3, 1989 1989.
- 33 ABBÉ, E. Die optischen Hilfsmittel der Mikroskopie. **Vieweg & Shon, Bruanschweig**, v. Germany, p. 411, 1878.
- 34 BRAY, M. T.; COHEN, S. H.; LIGHTBODY, M. L. **Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy**. Springer, 1994. ISBN 9781475793222.
- 35 SHMALZ, G. Glatte und Ebenheit als physikalisches und physiologisches Problem. **Verein Deutscher Ingenieure**, p. 1461-1467, 1929.
- 36 BINNIG, G.; ROHRER, H. In touch with atoms. **Reviews of Modern Physics**, v. 71, n. 2, p. S324-S330, Mar 1999. ISSN 0034-6861.
- 37 KITTEL, C. **Introduction to solid state physics**. 8th. Hoboken, NJ: Wiley, 2005. xix, 680 p. ISBN 047141526X (acid-free paper).
- 38 WANG, Z. **DEVELOPPEMENT D'UN MICROSCOPE A FORCE ATOMIQUE MULTIFONCTIONNEL ASSOCIE A UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE**. 1997.
- 39 ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. 3rd. Burlington, MA: Academic Press, 2011. xxx, 674 p. ISBN 9780123751829.
- 40 GIESSIBL, F. J. Forces and frequency shifts in atomic-resolution dynamic-force microscopy. **Physical Review B**, v. 56, n. 24, p. 16010-16015, 1997.
- 41 GIRARD, C.; VAN LABEKE, D.; VIGOUREUX, J. M. van der Waals force between a spherical tip and a solid surface. **Physical Review B**, v. 40, n. 18, p. 12133-12139, 1989.
- 42 HARTMANN, U. van der Waals interactions between sharp probes and flat sample surfaces. **Physical Review B**, v. 43, n. 3, p. 2404-2407, 1991.

- 43 BLACKMAN, G. S.; MATE, C. M.; PHILPOTT, M. R. Interaction forces of a sharp tungsten tip with molecular films on silicon surfaces. **Physical Review Letters**, v. 65, n. 18, p. 2270-2273, 1990.
- 44 EASTMAN, T.; ZHU, D.-M. Adhesion Forces between Surface-Modified AFM Tips and a Mica Surface. **Langmuir**, v. 12, n. 11, p. 2859-2862, 1996/01/01 1996. ISSN 0743-7463.
- 45 BURNHAM, N. A. et al. Probing the surface forces of monolayer films with an atomic-force microscope. **Physical Review Letters**, v. 64, n. 16, p. 1931-1934, 1990.
- 46 BUTT, H. J.; GUCKENBERGER, R.; RABE, J. P. Quantitative scanning tunneling microscopy and scanning force microscopy of organic materials. **Ultramicroscopy**, v. 46, n. 1-4, p. 375-393, 1992. ISSN 0304-3991.
- 47 ALBRECHT, T. R. et al. Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. **Journal of Applied Physics**, v. 69, n. 2, p. 668-673, 1991.
- 48 SCHMITZ, I. et al. Phase imaging as an extension to tapping mode AFM for the identification of material properties on humidity-sensitive surfaces. **Applied Surface Science**, v. 115, n. 2, p. 190-198, 1997. ISSN 0169-4332.
- 49 EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. Oxford University Press, 2010.
- 50 RICCI, D.; BRAGA, P. Recognizing and Avoiding Artifacts in AFM Imaging. In: BRAGA, P. e RICCI, D. (Ed.). **Atomic Force Microscopy**: Humana Press, v.242, 2004. cap. 3, p.25-37. (Methods in Molecular Biology™). ISBN 978-1-58829-094-6.
- 51 BLUHM, H. et al. Electrostatic force microscopy on ferroelectric crystals in inert gas atmosphere. **Physical Review B**, v. 55, n. 1, p. 4-7, Jan 1 1997. ISSN 0163-1829.
- 52 MARTIN, Y.; ABRAHAM, D. W.; WICKRAMASINGHE, H. K. High-Resolution Capacitance Measurement and Potentiometry by Force Microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 52, n. 13, p. 1103-1105, Mar 28 1988. ISSN 0003-6951.
- 53 HERSAM, M. C. et al. Potentiometry and repair of electrically stressed nanowires using atomic force microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 72, n. 8, p. 915-917, Feb 23 1998. ISSN 0003-6951.
- 54 LOIACONO, M. J.; GRANSTROM, E. L.; FRISBIE, C. D. Investigation of charge transport in thin, doped sexithiophene crystals by conducting probe atomic force microscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 10, p. 1679-1688, Mar 5 1998. ISSN 1089-5647.

- 55 KELLEY, T. W.; GRANSTROM, E.; FRISBIE, C. D. Conducting Probe Atomic Force Microscopy: A Characterization Tool for Molecular Electronics. **Advanced Materials**, v. 11, n. 3, p. 261-264, 1999. ISSN 1521-4095.
- 56 NXUMALO, J. N.; SHIMIZU, D. T.; THOMSON, D. J. Cross-sectional imaging of semiconductor device structures by scanning resistance microscopy. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 14, n. 1, p. 386-389, Jan-Feb 1996. ISSN 1071-1023.
- 57 YANG, G. Y. et al. Oxygen nonstoichiometry and dielectric evolution of BaTiO₃. Part II - insulation resistance degradation under applied dc bias. **Journal of Applied Physics**, v. 96, n. 12, p. 7500-7508, Dec 15 2004. ISSN 0021-8979.
- 58 HEYWANG, W. Semiconducting Barium Titanate. **Journal of Materials Science**, v. 6, n. 9, p. 1214-&, 1971. ISSN 0022-2461.
- 59 POHL, D. W. Scanning Near-field Optical Microscopy (SNOM). In: T, M. e C.J.R, S. (Ed.). **Advances in Optical and Electron Microscopy**: Elsevier, v. Volume 12, 1991. p.243-312. ISBN 0065-3012.
- 60 HEINZELMANN, H.; POHL, D. W. Scanning near-field optical microscopy. **Applied Physics A**, v. 59, n. 2, p. 89-101, 1994. ISSN 0947-8396.
- 61 GIRARD, C.; DEREUX, A. Near-field optics theories. **Reports on Progress in Physics**, v. 59, n. 5, p. 657, 1996. ISSN 0034-4885.
- 62 SYNGE, E. H. XXXVIII. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 6, n. 35, p. 356-362, 1928. ISSN 1941-5982.
- 63 _____. III. A microscopic method. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 11, n. 68, p. 65-80, 1931. ISSN 1941-5982.
- 64 LEWIS, A. et al. Development of a 500-Å Spatial-Resolution Light-Microscope .1. Light Is Efficiently Transmitted through Gamma-16 Diameter Apertures. **Ultramicroscopy**, v. 13, n. 3, p. 227-231, 1984. ISSN 0304-3991.
- 65 HAROOTUNIAN, A. et al. Superresolution Fluorescence near-Field Scanning Optical Microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 49, n. 11, p. 674-676, Sep 15 1986. ISSN 0003-6951.
- 66 BETZIG, E.; ISAACSON, M.; LEWIS, A. Collection mode near-field scanning optical microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 51, n. 25, p. 2088-2090, 1987.
- 67 JACKSON, J. D. **Classical electrodynamics**. 3rd. New York: Wiley, 1999. xxi, 808 p. ISBN 047130932X (cloth acid-free paper).

- 68 NOVOTNY, L.; POHL, D. W.; HECHT, B. Scanning near-Field Optical Probe with Ultrasmall Spot Size. **Optics Letters**, v. 20, n. 9, p. 970-972, May 1 1995. ISSN 0146-9592.
- 69 NOVOTNY, L.; HECHT, B. **Principles of nano-optics**. 2nd. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. xvii, 564 p. ISBN 9781107005464 (hardback).
- 70 ZHANG, Y. et al. Transmission Near-Field Scanning Optical Microscopy Investigation on Cellular Uptake Behavior of Iron Oxide Nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 2, n. 3, p. 135-143, 2012. ISSN 2191-1630.
- 71 PAWLEY, J. B. **Handbook of biological confocal microscopy**. 3rd. New York, NY: Springer, 2006. xxviii, 985 p. ISBN 9780387259215.
- 72 BETZIG, E.; TRAUTMAN, J. K. Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit. **Science**, v. 257, n. 5067, p. 189-195, July 10, 1992 1992.
- 73 DE LANGE, F. et al. Cell biology beyond the diffraction limit: near-field scanning optical microscopy. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. Pt 23, p. 4153-60, Dec 2001. ISSN 0021-9533.
- 74 LONGO, G. et al. An inverted/scanning near-field optical microscope for applications in materials science and biology. **physica status solidi (b)**, v. 247, n. 8, p. 2051-2055, 2010. ISSN 1521-3951.
- 75 BERDYEVA, T.; WOODWORTH, C. D.; SOKOLOV, I. Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope. **Ultramicroscopy**, v. 102, n. 3, p. 189-98, Feb 2005. ISSN 0304-3991.
- 76 HORCAS, I. et al. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of Scientific Instruments**, v. 78, n. 1, Jan 2007. ISSN 0034-6748.
- 77 COOPER, G. M. **The cell : a molecular approach**. 2nd. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. xxiv, 689 p. ISBN 0878931198.
- 78 FABRY, B. et al. Scaling the microrheology of living cells. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 14, Oct 1 2001. ISSN 0031-9007.
- 79 HENON, S. et al. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 2, p. 1145-1151, Feb 1999. ISSN 0006-3495.
- 80 HABERLE, W.; HORBER, J. K. H.; BINNIG, G. Force Microscopy on Living Cells. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 9, n. 2, p. 1210-1213, Mar-Apr 1991. ISSN 1071-1023.

- 81 HENDERSON, E.; HAYDON, P. G.; SAKAGUCHI, D. S. Actin Filament Dynamics in Living Glial-Cells Imaged by Atomic Force Microscopy. **Science**, v. 257, n. 5078, p. 1944-1946, Sep 25 1992. ISSN 0036-8075.
- 82 BUTT, H. J. et al. Imaging Cells with the Atomic Force Microscope. **Journal of Structural Biology**, v. 105, n. 1-3, p. 54-61, Oct-Dec 1990. ISSN 1047-8477.
- 83 TAO, N. J.; LINDSAY, S. M.; LEES, S. Measuring the Microelastic Properties of Biological-Material. **Biophysical Journal**, v. 63, n. 4, p. 1165-1169, Oct 1992. ISSN 0006-3495.
- 84 HOH, J. H.; SCHOENENBERGER, C. A. Surface-Morphology and Mechanical-Properties of MdcK Monolayers by Atomic-Force Microscopy. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 1105-1114, May 1994. ISSN 0021-9533.
- 85 DIMITRIADIS, E. K. et al. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 5, p. 2798-2810, May 2002. ISSN 0006-3495.
- 86 DOMKE, J. et al. Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 19, n. 4, p. 367-379, Dec 30 2000. ISSN 0927-7765.
- 87 ROTSCH, C.; RADMACHER, M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 1, p. 520-535, Jan 2000. ISSN 0006-3495.
- 88 MAHAFFY, R. E. et al. Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. **Physical Review Letters**, v. 85, n. 4, p. 880-883, Jul 24 2000. ISSN 0031-9007.
- 89 WOJCIKIEWICZ, E. P. et al. Contributions of molecular binding events and cellular compliance to the modulation of leukocyte adhesion. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 12, p. 2531-2539, Jun 15 2003. ISSN 0021-9533.
- 90 ZHANG, X. H. et al. Atomic force microscopy measurement of leukocyte-endothelial interaction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 1, p. H359-H367, Jan 1 2004. ISSN 0363-6135.
- 91 A-HASSAN, E. et al. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 3, p. 1564-1578, Mar 1998. ISSN 0006-3495.
- 92 WU, H. W.; KUHN, T.; MOY, V. T. Mechanical properties of I929 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. **Scanning**, v. 20, n. 5, p. 389-397, Aug 1998. ISSN 0161-0457.

- 93 CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. **Surface Science Reports**, v. 34, n. 1-3, p. 1-+, 1999. ISSN 0167-5729.
- 94 ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 5th. New York: Garland Science, 2008. ISBN 9780815341055.
- 95 BRAY, D. **Cell movements : from molecules to motility**. 2nd. New York: Garland Pub., 2001. xiv, 372 p. ISBN 0815332823.
- 96 STAMENOVIC, D.; INGBER, D. E. Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 1, n. 1, p. 95-108, Jun 2002. ISSN 1617-7959.
- 97 HORWITZ, A. F. Integrins and health. **Scientific American**, v. 276, n. 5, p. 68-75, May 1997. ISSN 0036-8733.
- 98 BHADRIRAJU, K.; HANSEN, L. K. Extracellular matrix- and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness. **Experimental Cell Research**, v. 278, n. 1, p. 92-100, Aug 1 2002. ISSN 0014-4827.
- 99 CHOQUET, D.; FELSENFELD, D. P.; SHEETZ, M. P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 39-48, Jan 10 1997. ISSN 0092-8674.
- 100 JULIANO, R. L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 283-323, 2002. ISSN 0362-1642.
- 101 VAN KOOYK, Y.; FIGDOR, C. G. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 5, p. 542-7, Oct 2000. ISSN 0955-0674.
- 102 MANIOTIS, A. J.; CHEN, C. S.; INGBER, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 3, p. 849-854, Feb 4 1997. ISSN 0027-8424.
- 103 CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Cell interactions with three-dimensional matrices. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 5, p. 633-639, Oct 2002. ISSN 0955-0674.
- 104 BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How Does the Extracellular-Matrix Direct Gene-Expression. **Journal of Theoretical Biology**, v. 99, n. 1, p. 31-68, 1982. ISSN 0022-5193.
- 105 DAMSKY, C. H.; ILIC, D. Integrin signaling: it's where the action is. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 5, p. 594-602, Oct 2002. ISSN 0955-0674.

- 106 ADAMS, J. C.; WATT, F. M. Regulation of Development and Differentiation by the Extracellular-Matrix. **Development**, v. 117, n. 4, p. 1183-1198, Apr 1993. ISSN 0950-1991.
- 107 GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733.
- 108 KREIDER, T. et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 448-453, Aug 2007. ISSN 0952-7915.
- 109 GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 28 2010. ISSN 1074-7613.
- 110 COLLINS, S. J. The HI-60 Promyelocytic Leukemia-Cell Line - Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression. **Blood**, v. 70, n. 5, p. 1233-1244, Nov 1987. ISSN 0006-4971.
- 111 VESEY, D. A. et al. Interleukin-1 beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. **Kidney International**, v. 62, n. 1, p. 31-40, Jul 2002. ISSN 0085-2538.
- 112 HEMLER, M. E. V α Proteins in the Integrin Family - Structures, Functions, and Their Role on Leukocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 365-400, 1990. ISSN 0732-0582.
- 113 RADMACHER, M. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. **Ieee Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 16, n. 2, p. 47-57, Mar-Apr 1997. ISSN 0739-5175.
- 114 ROTSCH, C. et al. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. **Cell Biology International**, v. 21, n. 11, p. 685-696, Nov 1997. ISSN 1065-6995.
- 115 SVALDO-LANERO, T. et al. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. **Ultramicroscopy**, v. 107, n. 10-11, p. 913-921, Oct 2007. ISSN 0304-3991.
- 116 FISCHER-CRIPPS, A. C. **Nanoindentation**. 3rd. New York: Springer, 2011. xxii, 279 p. ISBN 9781441998712.
- 117 KAKABOURA, A. et al. Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 18, n. 1, p. 155-163, Jan 2007. ISSN 0957-4530.

- 118 CODAN, B. et al. Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: An investigation of cell elasticity changes due to fixation. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 6, p. 3303-3308, Aug 1 2013. ISSN 0928-4931.
- 119 SIRGHI, L. et al. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 37, n. 6, p. 935-945, Jul 2008. ISSN 0175-7571.
- 120 CAPPELLA, B. et al. Force-distance curves by AFM. A powerful technique for studying surface interactions. **IEEE Eng Med Biol Mag**, v. 16, n. 2, p. 58-65, Mar-Apr 1997. ISSN 0739-5175.
- 121 HERTZ, H. Ueber den kontakt elastischer koerper. **J. fuer die Reine Angewandte Mathematik**, v. 92, p. 156-171, 1881.
- 122 JOHNSON, K. L. **Contact mechanics**. Cambridge Cambridgeshire ; New York: Cambridge University Press, 1985. xi, 452 p. ISBN 0521255767.
- 123 VINCKIER, A.; SEMENZA, G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. **Febs Letters**, v. 430, n. 1-2, p. 12-16, Jun 23 1998. ISSN 0014-5793.
- 124 RADMACHER, M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. **Methods Cell Biol**, v. 68, p. 67-90, 2002. ISSN 0091-679X.
- 125 SNEDDON, I. N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. **International Journal of Engineering Science**, v. 3, n. 1, p. 47-57, 1965. ISSN 00207225.
- 126 BUSHELL, G. R. et al. Imaging and force-distance analysis of human fibroblasts in vitro by atomic force microscopy. **Cytometry**, v. 36, n. 3, p. 254-264, Jul 1 1999. ISSN 0196-4763.
- 127 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953. ISSN 0028-0836.
- 128 KRASNOSLOBODTSEV, A. V.; SHLYAKHTENKO, L. S.; LYUBCHENKO, Y. L. Probing interactions within the synaptic DNA-Sfil complex by AFM force spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 365, n. 5, p. 1407-1416, Feb 2 2007. ISSN 0022-2836.
- 129 SOREL, I. et al. The EcoRI-DNA complex as a model for investigating protein-DNA interactions by atomic force microscopy. **Biochemistry**, v. 45, n. 49, p. 14675-14682, Dec 12 2006. ISSN 0006-2960.
- 130 BRAGA, P. C. et al. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. **Pharmacology**, v. 76, n. 2, p. 61-68, 2006. ISSN 0031-7012.

- 131 LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sep 2001. ISSN 1364-5072.
- 132 BRAGA, P. C. et al. Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. **Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 130-136, 2006. ISSN 0031-7012.
- 133 DEB, D. D. et al. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 97-106, Aug 15 2011. ISSN 0009-2797.
- 134 BOICHOT, S. et al. Investigation of radiation damage in DNA by using atomic force microscopy. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 99, n. 1-4, p. 143-145, 2002. ISSN 0144-8420.
- 135 LYSETSKA, M. et al. UV light-damaged DNA and its interaction with human replication protein A: an atomic force microscopy study. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 12, p. 2686-2691, Jun 15 2002. ISSN 0305-1048.
- 136 KE, C. et al. Nanoscale detection of ionizing radiation damage to DNA by atomic force microscopy. **Small**, v. 4, n. 2, p. 288-294, Feb 2008. ISSN 1613-6810.
- 137 BUSSIEK, M.; MUCKE, N.; LANGOWSKI, J. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 22, Nov 15 2003. ISSN 0305-1048.
- 138 TSENG, Y. D. et al. Atomic force microscopy study of the structural effects induced by echinomycin binding to DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, n. 4, p. 745-758, Jan 28 2005. ISSN 0022-2836.
- 139 ZHU, Y. et al. Atomic force microscopy studies on DNA structural changes induced by vincristine sulfate and aspirin. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, n. 2, p. 286-290, Apr 2004. ISSN 1431-9276.
- 140 HANSMA, H. G. et al. Applications for Atomic-Force Microscopy of DNA. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 5, p. 1672-1677, May 1995. ISSN 0006-3495.
- 141 PASTRE, D. et al. Anionic polyelectrolyte adsorption on mica mediated by multivalent cations: A solution to DNA imaging by atomic force microscopy under high ionic strengths. **Langmuir**, v. 22, n. 15, p. 6651-6660, Jul 18 2006. ISSN 0743-7463.
- 142 UNDEGER, U. et al. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 2037-2043, Aug 2009. ISSN 0278-6915.

- 143 AYDIN, S.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 581, n. 1-2, p. 43-53, Mar 7 2005. ISSN 1383-5718.
- 144 MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960.
- 145 GOLDMAN, L. et al. Pathology of the Effect of the Laser Beam on the Skin. **Nature**, v. 197, n. 4870, p. 912-914, 1963.
- 146 TANKOVSKY, N.; IVANOV, D.; BUROV, J. Surface Thermoelastic Deformations Caused by a Laser. **Revue De Physique Appliquee**, v. 19, n. 8, p. 631-634, 1984. ISSN 0035-1687.
- 147 ASH, E. A.; DIEULESAINT, E.; RAKOUTH, H. Generation of Surface Acoustic-Waves by Means of a Cw Laser. **Electronics Letters**, v. 16, n. 12, p. 470-472, 1980. ISSN 0013-5194.
- 148 SHUJA, S. Z.; YILBAS, B. S.; ARIF, A. F. M. Investigation into thermoelastic displacement of surfaces subjected to gas assisted laser repetitive pulse heating. **Surface Engineering**, v. 18, n. 1, p. 37-45, 2002. ISSN 0267-0844.
- 149 ALMOND, D.; PATEL, P. **Photothermal science and techniques**. 1st. London ; New York: Chapman & Hall, 1996. xiii, 241 p. ISBN 0412578808 (pbk).
- 150 BIALKOWSKI, S. **Photothermal spectroscopy methods for chemical analysis**. New York: Wiley, 1996. xxix, 584 p. ISBN 0471574678.
- 151 MANDELIS, A. **Principles and perspectives of photothermal and photoacoustic phenomena**. New York: Elsevier, 1992. xviii, 542 p. ISBN 0444016414 (alk. paper).
- 152 VARGAS, H.; MIRANDA, L. C. M. Photoacoustic and Related Photothermal Techniques. **Physics Reports-Review Section of Physics Letters**, v. 161, n. 2, p. 43-101, Apr 1988. ISSN 0370-1573.
- 153 ASTRATH, N. G. C. et al. Time-resolved thermal mirror for nanoscale surface displacement detection in low absorbing solids Time-resolved thermal mirror for nanoscale surface displacement detection in low absorbing solids. **Applied Physics Letters**, v. 91, n. 19, Nov 5 2007. ISSN 0003-6951.
- 154 MALACARNE, L. C. et al. Nanoscale surface displacement detection in high absorbing solids by time-resolved thermal mirror. **Applied Physics Letters**, v. 92, n. 13, Mar 31 2008. ISSN 0003-6951.

- 155 GIESSIBL, F. J. et al. Subatomic features on the silicon (111)-(7x7) surface observed by atomic force microscopy. **Science**, v. 289, n. 5478, p. 422-425, Jul 21 2000. ISSN 0036-8075.
- 156 PUTMAN, C. A. J. et al. Tapping mode atomic force microscopy in liquid. **Applied Physics Letters**, v. 64, n. 18, p. 2454-2456, 1994.
- 157 BROEKMAAT, J. et al. High temperature surface imaging using atomic force microscopy. **Applied Physics Letters**, v. 92, n. 4, p. -, 2008.
- 158 HEMBACHER, S. et al. Revealing the hidden atom in graphite by low-temperature atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 12539-12542, October 28, 2003 2003.
- 159 SARIOGLU, A.; SOLGAARD, O. Time-Resolved Tapping-Mode Atomic Force Microscopy. In: BHUSHAN, B. (Ed.). **Scanning Probe Microscopy in Nanoscience and Nanotechnology 2**: Springer Berlin Heidelberg, 2011. cap. 1, p.3-37. (NanoScience and Technology). ISBN 978-3-642-10496-1.
- 160 ZHONG, Q. et al. Fractured Polymer Silica Fiber Surface Studied by Tapping Mode Atomic-Force Microscopy. **Surface Science**, v. 290, n. 1-2, p. L688-L692, Jun 10 1993. ISSN 0039-6028.
- 161 ENEVOLDSEN, G. H. **Scanning Probe Microscopy Studies of a Metal Oxide Surface: A Detailed Study of the TiO₂(110) Surface**. Interdisciplinary Nanoscience Center (iNano) and Department of Physics and Astronomy, University of Aarhus, 2007.
- 162 NOWACKI, W. **Thermoelasticity**. 2nd. Oxford ; New York: Pergamon Press, 1986. xi, 566 p. ISBN 0080247679.
- 163 LUKASIEWICZ, G. V. B. **Efeitos de acoplamento térmico nas técnicas de lente térmica e espelho térmico**. 2014. 102 fl. (Doutorado). Centro de Ciências Exatas, Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR.
- 164 LI, B. C. 3-Dimensional Theory of Pulsed Photothermal Deformation. **Journal of Applied Physics**, v. 68, n. 2, p. 482-487, Jul 15 1990. ISSN 0021-8979.
- 165 ANDRADE, A. A. et al. Thermal lens measurements of fluorescence quantum efficiency in Nd³⁺-doped fluoride glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 284, n. 1-3, p. 255-260, May 2001. ISSN 0022-3093.
- 166 CAMPBELL, J. H.; SURATWALA, T. I. Nd-doped phosphate glasses for high-energy/high-peak-power lasers. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 263, n. 1-4, p. 318-341, Mar 2000. ISSN 0022-3093.

ANEXOS

Trabalhos Publicados:

- Causality-induced pulse steepening and shock-like waves in superluminal media. **Europhysics Letters**, v. 97, p. 44009, 2012. (Mestrado)
- Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study. **European Biophysics Journal**, v. 43, n. 12, p. 573-579, 2014. (Doutorado)

Trabalhos em preparação (2014):

- Direct Measurement of Photo-Induced Nanoscale Surface Displacement in Solids Using Atomic Force Microscopy.
- Mica Functionalization for Imaging of TymoI-DNA Complex with Atomic Force Microscopy.
- Direct probing of semiconductor barium titanate via conductive atomic force microscopy.

Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study

Samuel T. Souza · Laís C. Agra · Cássio E. A. Santos ·
Emiliano Barreto · Jandir M. Hickmann ·
Eduardo J. S. Fonseca

Received: 12 March 2014 / Revised: 31 August 2014 / Accepted: 8 September 2014
© European Biophysical Societies' Association 2014

Abstract Interactions between cells and microenvironments are essential to cellular functions such as survival, exocytosis and differentiation. Cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) evokes a variety of biophysical changes in cellular organization, including modification of the cytoskeleton and plasma membrane. In fact, the cytoskeleton and plasma membrane are structures that mediate adherent contacts with the ECM; therefore, they are closely correlated. Considering that the mechanical properties of the cell could be affected by cell adhesion-induced changes in the cytoskeleton, the purpose of this study was to investigate the influence of the ECM on the elastic properties of fixed macrophage cells using atomic force microscopy. The results showed that there was an increase (~50 %) in the Young's modulus of macrophages adhered to an ECM-coated substrate as compared with an uncoated glass substrate. In addition, cytochalasin D-treated cells had a 1.8-fold reduction of the Young's modulus of the cells, indicating the contribution of the

actin cytoskeleton to the elastic properties of the cell. Our findings show that cell adhesion influences the mechanical properties of the plasma membrane, providing new information toward understanding the influence of the ECM on elastic alterations of macrophage cell membranes.

Keywords Atomic force microscopy · Elastic modulus · Nanoindentation · Extracellular matrix · Cytoskeleton · Fibronectin

Introduction

Macrophages play an important role in immune response and tissue homeostasis. The ability of macrophages to perform phagocytosis renders them effective at killing microbes and clearing apoptotic and necrotic cells (Gordon 2003; Gordon and Martinez 2010; Kreider et al. 2007). The hallmarks of macrophage activation can be verified by cell adhesion and spreading on the extracellular matrix (ECM) (Collins 1987). Among the ECM components, fibronectin (Fn) has been recognized as the key element promoting cell adhesion, among its other functions. Adhesion to Fn modulates the secretion of proinflammatory cytokines and contributes to cell migration through various tissues (Vesey et al. 2002). These functions are mediated by surface receptors, called integrins, which are present on macrophages (Hemler 1990). The migratory process involves a repeated, dynamic deformation and recovery of the plasma membrane; however, it is not yet fully understood whether this capacity for deformation is influenced by cell adhesion to the ECM. It has been hypothesized that one pathway by which mechanical stress regulates intracellular activity is via a direct physical connection of the ECM across the

S. T. Souza · E. J. S. Fonseca (✉)
Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Caixa
Postal 2051, Maceió, AL 57061-970, Brazil
e-mail: eduardo@fis.ufal.br

L. C. Agra · E. Barreto
Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas
e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió,
AL 57072-970, Brazil

C. E. A. Santos · J. M. Hickmann · E. J. S. Fonseca
Centro de Tecnologia-CTEC, Universidade Federal de Alagoas,
Maceió, AL 57072-970, Brazil

J. M. Hickmann
Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Caixa Postal 15051, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

plasma membrane to the nucleus (Ingber et al. 1994; Maniotis et al. 1997).

The cytoskeleton plays an essential role in detection, transduction and regulation of the interaction forces between a cell and its ECM (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka 1996; Janmey 1998). The tension in the plasma membrane generates inward forces that influence all the cellular processes involving membrane deformations (Gauthier et al. 2012; Keren 2011; Morris and Homann 2001; Sheetz and Dai 1996). The apparent membrane tension in cells is a sum of the in-plane tension in the bilayer and the adhesion energy between the membrane and the cytoskeleton (Dai and Sheetz 1999; Hochmuth et al. 1996). Thus, there is great interest in investigating the membrane-cytoskeleton adhesion, which can vary among different cell types. However, even though there is a close association between the cell membrane and the cytoskeleton, there is still a lack for information about the impact of the ECM on the elastic modulus of the plasma membrane.

Currently, atomic force microscopy (AFM) (Binnig et al. 1986) is being shown to be an appropriate tool to evaluate the biophysical parameters of the cell, including measuring the elastic modulus (Young's modulus) (Radmacher 1997; Rotsch et al. 1997; Svaldo-Lanero et al. 2007; Wu et al. 1998). The basic AFM technique for measuring cell elasticity is based on the indentation of cells attached to a substrate. A very small tip indents the sample, and the instrument records a force-displacement curve that allows the computation of the elastic modulus by applying the indentation theory (Fischer-Cripps 2011). Moreover, this AFM-based nanoindentation technique has become even more powerful when used as a micro-rheological tool (Lee et al. 2011).

In this article, we used the AFM nanoindentation technique to investigate the influence of an Fn film on the elastic modulus of the cytoskeleton and plasma membranes of murine macrophages. We also cultured macrophages on an Fn-coated substrate and treated them with cytochalasin D to estimate the extent to which the changes in elastic properties are influenced by the organization of the cytoskeleton.

Materials and methods

Substrate preparation and cell culture

Glass coverslips (16 mm diameter) were cleaned by an overnight soak in ethanol (70 %), then a thorough rinse with distilled water. To prepare an Fn-coated substrate, 200 μ l of fibronectin (5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) was dispensed and allowed to spread thoroughly on a cleaned glass coverslip overnight at 4 °C. This preparation is a standardized procedure from previous studies (Segat et al. 1994).

All substrates were washed in phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich), followed by incubation at 37 °C with 1 % BSA/PBS (bovine serum albumin/PBS; Sigma-Aldrich) solution to block non-specific binding of proteins.

J774 murine macrophages were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) containing fetal calf serum (FCS) (10 %) (Sigma-Aldrich), penicillin (100 UI/ml) (Sigma-Aldrich) and streptomycin (100 g/ml) (Sigma-Aldrich). Macrophages were cultured in an incubator at 37 °C in a humidified CO₂ (5 %) atmosphere. Cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/ml on sterilized glass coverslips inserted into six-well culture dishes and incubated for either 1 or 48 h before being chemically fixed (glutaraldehyde, 0.5 %). After various incubation times, the medium was washed to remove unattached cells.

To assess the involvement of the cytoskeleton on the elastic properties of cells, for some of the experiments, cells were cultured on an Fn-coated substrate and then treated with cytochalasin D (Sigma-Aldrich) for approximately 15 min at 37 °C prior to fixation.

SEM measurements

Scanning electron microscopy (SEM) imaging of the cultured macrophages was conducted on a Superscan SSX-550 (Shimadzu) electron microscope. To acquire the SEM images, the cells were fixed with a glutaraldehyde solution (3 %), counterstained with osmium tetroxide and sequentially dehydrated with a series of solutions of increasing ethanol concentrations. Images were collected in low-vacuum mode with a large field secondary electron detector. Directly prior to analysis, the samples were sputtered for 10 s with gold. Image acquisition used an accelerating voltage of 15 kV.

AFM measurements

AFM images and elasticity measurements of cells were performed in air using a standard AFM setup, Multiview 1000™ atomic force microscope from Nanonics (Israel), mounted on a BAXFM dual-light microscope (Olympus). The system was conveniently adjusted to enable positioning of the AFM tip on top of a chosen cell. Experiments were conducted with a conical tip with a 35° half-angle in a 320- μ m-long cantilever with a spring constant k , which was calibrated to be 1 N/m. In addition, the equipment was acoustically isolated to reduce the interference of ambient noise during the measurements.

The idea of elasticity measurements using AFM is relatively straightforward. A probing tip mounted at the end of a delicate cantilever indents the cell, resulting in a cantilever deflection. The deflection is measured using a laser

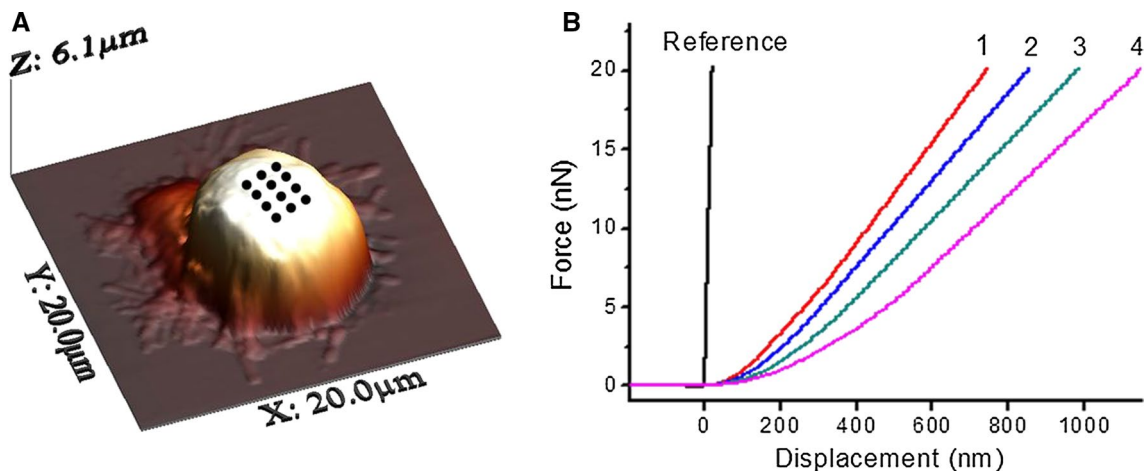


Fig. 1 **a** An AFM image of a macrophage showing the indentation area. *Twelve black dots* represent the indentations performed on the central area of the cell. **b** Force-versus-displacement curves are measured in both the reference substrate and macrophages. (1) Fibronectin,

(2) glass, (3) fibronectin + cytochalasin and (4) glass+ cytochalasin. The relation between load force and the indentation depth was calculated as the difference between these *curves*

beam, which is reflected by the end of the cantilever and detected by a four-quadrant photodiode.

Cell elasticity is determined on the basis of the force-displacement curves that lead to indentation, which are usually obtained from the subtraction of deflections measured on stiff and compliant surfaces at a given relative sample position. When a stiff material (not easily deformable, such as silicon or glass) is investigated, the deflection reflects the position of the sample. This is represented by a straight-sloped line and is usually employed as a reference line that is needed for the force calibration. For compliant samples, such as cells, cantilever deflections are much smaller because of indentation, and the resulting force curve has a non-linear character. The difference between the deflections of the cantilever detected on glass and on the cell membrane describes the deformation of the sample under the pressure imposed by the tip. Subtracting the force curve on the glass from the force curve on the cell yields the indentation depth. We adjusted the AFM system in a linearized close loop scanner to indent the cells with a maximum force of 20 nN.

Indentation measurements were taken in the central area of selected cells, which permitted the evaluation of the overall mechanical properties of the cytoplasm using optimized conditions. In cells identified by AFM imaging, 12 indentation measurements were carried out on the central area, as shown in Fig. 1a. It is important to note that the measurements performed around the nucleus, where the cells were thicker (more than 4 μm), were less prone to artifacts because of the hardness of the substrate (Codan et al. 2013; Sirghi et al. 2008). For each substrate group, five cells were indented. Twelve indentation measurements per

cell were carried out on the nuclear area. In total, 60 force curves were collected per substrate group.

Prior to performing the indentations on the cell membrane, one force curve was taken on the glass substrate surrounding the cell of interest and recorded as reference (Cappella et al. 1997; Weisenhorn et al. 1989). Force curves on a glass substrate (hard sample) and on the cell (soft sample) are shown in Fig. 1b. It is important to point out that identifying the contact points is a crucial feature for determining the indentation depth. In this work, the contact point is defined as the point at which the slope of the force curve is approximately zero. The AFM tip was moved toward the cell at a speed of 5 $\mu\text{m/s}$ in all indentation measurements.

Modeling and analysis

The Sneddon's modification of the Hertzian model was used to characterize the force curve to obtain the elastic indentation of cells (Hertz 1881; Johnson 1985; Sneddon 1965). This model predicts a relation between the force and indentation depth of a soft sample; by fitting the Hertz model to the data, we calculated the local average Young's modulus of the sample. The analysis of the force curves and the applicability of this model were reported in great details in previous works (Lekka et al. 2012; Mahaffy et al. 2004; Radmacher 1997; Radmacher et al. 1995).

Statistical analysis

All data in this article are presented as the mean \pm standard deviation of the mean (mean \pm SD). To show that all data were normally distributed, the Kolmogorov-Smirnov test

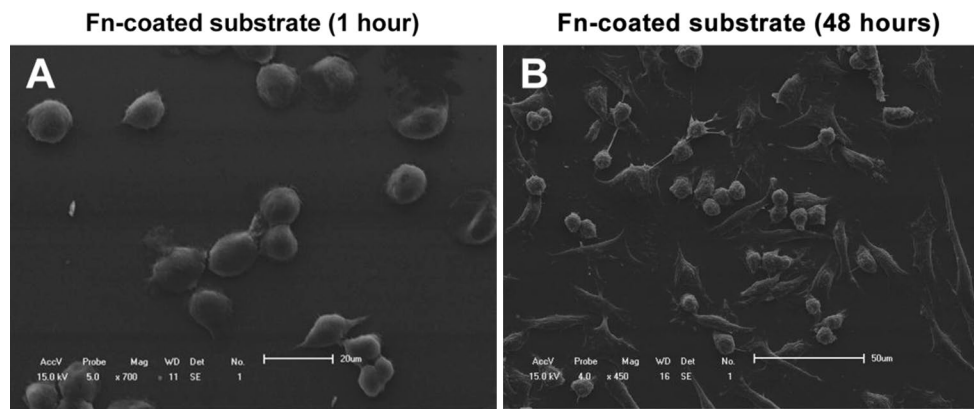


Fig. 2 SEM images of macrophages cultured for **a** 1 h and **b** 48 h on the Fn-coated substrate

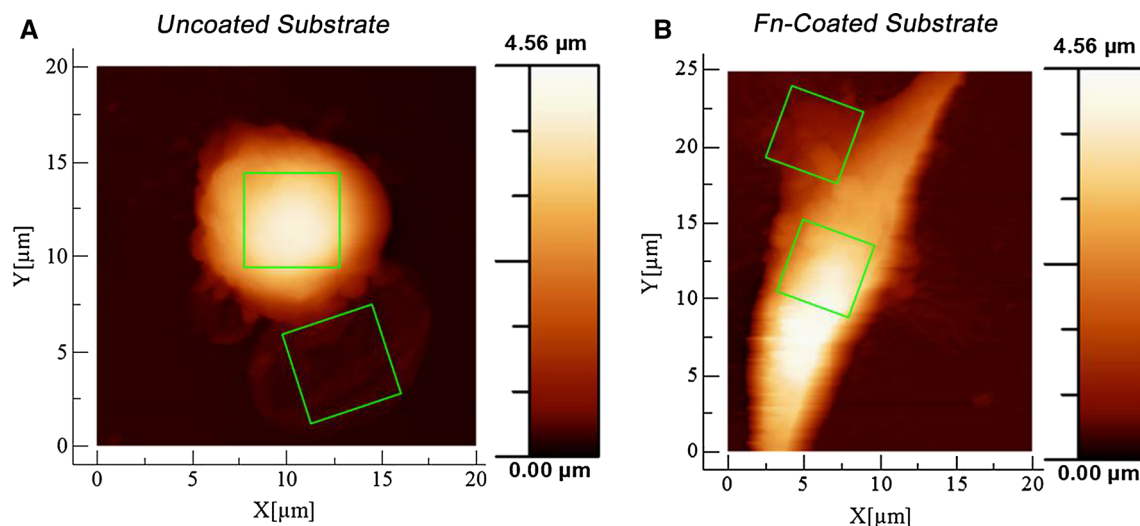


Fig. 3 AFM images of macrophage cells cultured on **a** uncoated and **b** Fn-Coated glass coverslips for 48 h. The *selected areas* were used to evaluate the RMS

was used. Differences in the modulus of elasticity among substrate groups were assessed by ANOVA with Tukey's analysis to identify statistical differences among three or more substrate groups when p was at least less than 0.05. Differences in the modulus of elasticity between the two substrate groups were assessed by Student's t test to identify statistical differences when p was at least less than 0.05.

Results

Initially, the SEM was used to observe the surface morphology of the J774 macrophage cells. The cells were tightly adhered to the substrate and exhibited a typical macrophage-like morphology, as indicated by the presence of surface ruffles and a rounded morphology in the marginal

area. Figure 2 shows the SEM images of macrophages cultured for 1 and 48 h on Fn-Coated substrate.

Figure 3 shows the AFM images of macrophages cultured for 48 h on (a) uncoated and (b) Fn-coated substrates. As observed in Fig. 3a, the typical cell morphology of the macrophages on uncoated substrates was more rounded, with less spreading and an absence of ruffles. In contrast, Fig. 3b shows spread cells with ruffled structures; these were particularly evident in the periphery of the cell. One way to quantify the presence of ruffled structures is through the membrane roughness analyses of these cells.

AFM images were analyzed using WSxM software (Horcas et al. 2007). This software was used to calculate root mean square (RMS) of the average height of every specimen, which can be assumed as a reliable index of the surface roughness (Kakaboura et al. 2007).

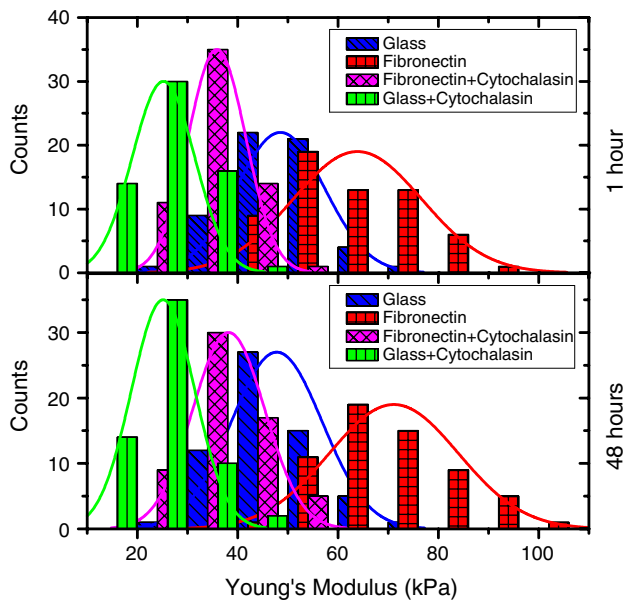


Fig. 4 Histograms of the distributions of the Young's modulus calculated using the Hertz model for macrophage cells cultured on different substrates for 1 and 48 h. Normal distribution fits (*solid curves*)

The roughness analysis was based on calculating the height distribution of AFM images of the plasma membrane of macrophages cultured on uncoated and Fn-coated substrates. Since the height follows a Gaussian distribution, the roughness was estimated as the RMS value of the distribution. For cells cultured on an uncoated substrate, the RMS value was 86.5 nm, whereas for cells cultured on an Fn-coated substrate, it was 100.2 nm. Therefore, the roughness analysis showed that cells cultured on coated substrates have a higher RMS (higher roughness) than those cultured on uncoated substrates.

To quantify how ECM affected the elastic modulus and the organization of the cytoskeleton of cells, macrophages were cultured on uncoated control substrates and on Fn-coated substrates. Using AFM nanoindentation measurements, the elastic modulus values were determined by fitting the Hertz model to force-displacement curves.

AFM probing of macrophages reveals nanoscale biophysical characteristics of the cytoskeleton and membrane. These characteristics play a dominant role in the cellular deformation measurement, usually leading to broadening of the Young's modulus distribution. Figure 4 shows histograms of the distributions of the Young's modulus measured for macrophages on uncoated control substrates and on Fn-coated substrates as well as macrophages treated with cytochalasin D for different amounts of time.

In Fig. 5, the average values of Young's modulus for macrophages plated on different substrates were obtained from normal distribution fits of the total histogram composed of all values determined for all cells (normal

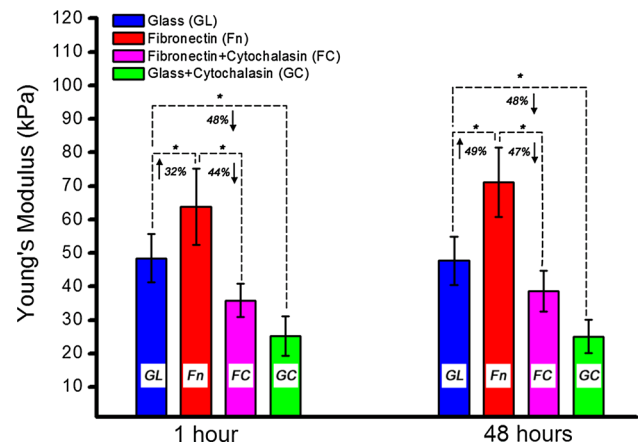


Fig. 5 Elastic moduli of macrophage cells cultured for 1 and 48 h on an uncoated glass substrate (*GL*), Fn-coated substrate (*Fn*), Fn-coated substrate treated with cytochalasin D (*FC*) and uncoated glass substrate treated with cytochalasin D (*GC*). Each column denotes the average Young's modulus determined for at least 60 force curves per substrate group. *Scale bar* represents the standard deviation. Percentage numbers on columns show the changes of the average Young's modulus in comparison with glass (*GL*) or fibronectin (*Fn*). $*p < 0.01$

distribution curves shown in Fig. 4). In macrophages plated on an uncoated substrate (control), the average Young's moduli were 48.5 ± 7.3 and 47.7 ± 7.2 kPa (mean \pm SD) after 1 and 48 h of incubation, respectively. Although macrophages cultured on uncoated substrates for 1 h appeared slightly stiffer than those cultured on uncoated substrates for 48 h, the difference was not significant ($p = 0.6$). On the other hand, macrophages cultured on Fn-coated substrates had considerable changes in their elasticity. The average Young's moduli of macrophages adhered to Fn-coated substrates were 63.9 ± 11.3 kPa and 71.1 ± 10.4 kPa (mean \pm SD) after 1 and 48 h of incubation, respectively. The Student's *t* test showed significant differences between means of macrophages plated on uncoated (*GL*) and Fn-coated (*Fn*) substrates at the level of $p \leq 0.01$. The Fn affected the elasticity of macrophages, causing a 32 % increase in the average Young's modulus after 1 h and 49 % after 48 h as compared with uncoated control substrates.

To evaluate the involvement of the cytoskeleton on the elastic response of macrophages on Fn-coated substrates, we degraded actin filaments using cytochalasin D. Figure 5 also shows that cytochalasin D affected the cell elasticity, promoting a 44 % decrease in the elastic modulus after 1 h and 47 % after 48 h, as compared with Fn-coated substrate without cytochalasin D treatment. These results show that macrophage stiffness was affected by the ECM, and this effect was primarily mediated through actin filament organization. The calculated values for the average Young's modulus of macrophages plated on Fn-coated substrates and treated with cytochalasin D were 35.8 ± 4.9 and

38.2 ± 6.1 kPa (mean \pm SD) for 1 and 48 h of incubation, respectively. Macrophages plated on Fn-coated substrates and treated with cytochalasin D (FC) were significantly smaller ($p < 0.01$, Fig. 5) than those on Fn-coated substrates and those without treatment with cytochalasin D (Fn).

In macrophages plated on uncoated substrates and treated with cytochalasin D (GC), the average Young's moduli were 25.2 ± 5.8 and 25.1 ± 5.0 kPa (mean \pm SD) for 1 and 48 h of incubation, respectively. No significant difference ($p = 0.5$) was observed between these two culture times. However, evaluation using a Student's *t* test showed that the differences observed between macrophages cultured on uncoated substrates and treated with (GC) and without (GL) cytochalasin D, were statistically significant ($p < 0.01$). Cytochalasin D affected the cell elasticity, promoting a 48 % decrease in the elastic modulus after 1 and 48 h, as compared with those without treatment with cytochalasin D.

Discussion and conclusion

In the present study, we assessed the elastic properties of fixed, adherent macrophages using an AFM nanoindentation technique. It is important to point out that probing cells is challenging because of cell softness, which is higher than that of any other materials typically in use in biology, especially for living cells. There are already interesting studies using AFM to probe living cells (Mackay and Kumar 2013; Raman et al. 2011; Spedden et al. 2012), and it is well known that Young's modulus increases considerably with fixed as compared to living cells (Bukharaev et al. 2003; Codan et al. 2013; Shroff et al. 1995). However, nowadays there is a great interest in quantifying the coefficient in relation to the Young's modulus for living and fixed cells (Codan et al. 2013).

Mechanical properties of the central area of fixed macrophages were recorded and compared between different cells. The elasticity of macrophages adhered to uncoated control substrates showed no statistical differences ($p = 0.6$) measured after 1 or 48 h of culture. However, when the macrophages were adhered to Fn-coated substrates, we observed an increase in the average Young's modulus of cells of up to 49 % when compared with those adhered on uncoated control substrates. Our findings demonstrate that the average elastic modulus of macrophages is significantly altered by adhesion to Fn ($p < 0.01$).

To understand to what extent the changes in the elastic properties were due to remodeling of the actin cytoskeleton upon adhesion to Fn, cytochalasin D was used. We observed a significant, up to 1.8-fold reduction (47 %) in the average Young's modulus of macrophages treated with cytochalasin D for 15 min, without any accompanying

alterations in cell morphology. The changes in the elastic properties are attributed to a difference in the organization of the cytoskeleton (Bushell et al. 1999; Wu et al. 1998). It is important to note that the percentage decrease of the elastic modulus of cells on uncoated glass substrates and treated with cytochalasin D is at the same level as those cultured on Fn-coated glass substrates and treated with cytochalasin D. These results show that the actin cytoskeleton plays a dominant role in the elastic modulus of cells.

Taken together, this study reinforces the involvement of cellular adhesion in cytoskeleton and membrane softness and its many influences on cell function, including phagocytosis. This concept is echoed in previous reports that showed changes in macrophage elasticity (elastic modulus) exert a dominant influence on macrophage motility (Patel et al. 2012). In addition, Lee and colleagues showed that a lower elastic modulus in the leading edge of a cell was more favorable for the elastic fluctuation of actin filaments, leading to active protrusion during the immune response (Lee et al. 2011).

In summary, we used AFM as a tool to investigate the influence of ECM on the biomechanical properties of the cytoskeleton and membrane by measuring the elastic modulus in macrophages adhered to ECM-coated substrates. Furthermore, we noted a dominant involvement of the actin cytoskeleton in cell elastic properties using cytochalasin D treatment. Thus, we demonstrated that cellular adhesion to ECM influences the elastic properties of the cell via actin microfilaments. Taken together, our data imply that cytoskeleton-mediated cell-matrix interactions directly affect biomechanical events in cells by modifying the physical properties of the cell cytoskeleton.

Acknowledgments This research was supported by CAPES/Nanobiotecnologia, Pró-equipamentos/PROCAD, Pronex/FAPEAL, CNPq and FINEP.

References

- Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56:930–933
- Bukharaev AA, Mozhanova AA, Nurgazizov NI, Ovchinnikov DV (2003) Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by atomic force microscopy. *Phys Low-Dimens Str* 3–4:31–37
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Bi* 12:463–518
- Bushell GR, Cahill C, Clarke FM, Gibson CT, Myhra S, Watson GS (1999) Imaging and force-distance analysis of human fibroblasts in vitro by atomic force microscopy. *Cytometry* 36:254–264
- Cappella B, Baschieri P, Frediani C, Miccoli P, Ascoli C (1997) Force-distance curves by AFM. A powerful technique for studying surface interactions. *IEEE Eng Med Biol Mag* 16:58–65
- Codan B, Martinelli V, Mestroni L, Sbaizero O (2013) Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation. *Mat Sci Eng C-Mater* 33:3303–3308

- Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia-cell line—proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70:1233–1244
- Dai JW, Sheetz MP (1999) Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys J* 77:3363–3370
- Fischer-Cripps AC (2011) *Nanoindentation*, 3rd edn. Springer, New York
- Gauthier NC, Masters TA, Sheetz MP (2012) Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol* 22:527–535
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23–35
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593–604
- Hemler ME (1990) V α 1 proteins in the integrin family—structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8:365–400
- Hertz H (1881) Ueber den kontakt elastischer koerper. *J Reine Angew Math* 92:156–171
- Hochmuth RM, Shao JY, Dai JW, Sheetz MP (1996) Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys J* 70:358–369
- Horcas I, Fernandez R, Gomez-Rodriguez JM, Colchero J, Gomez-Herrero J, Baro AM (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* 78
- Ingber DE, Dike L, Hansen L, Karp S, Liley H, Maniotis A, McNamee H, Mooney D, Plopper G, Sims J, Wang N (1994) Cellular tensegrity—exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell-growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int Rev Cytol* 150:173–224
- Janmey PA (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78:763–781
- Johnson KL (1985) *Contact mechanics*. Cambridge University Press, Cambridge
- Kakaboura A, Fragouli M, Rahiotis C, Silikas N (2007) Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. *J Mater Sci-Mater M* 18:155–163
- Keren K (2011) Cell motility: the integrating role of the plasma membrane. *Eur Biophys J Biophys* 40:1013–1027
- Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Gause WC (2007) Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol* 19:448–453
- Lee YJ, Patel D, Park S (2011) Local rheology of human neutrophils investigated using atomic force microscopy. *Int J Biol Sci* 7:102–111
- Lekka M, Gil D, Pogoda K, Dulinska-Litewka J, Jach R, Gostek J, Klymenko O, Prauzner-Bechcicki S, Stachura Z, Wiltowska-Zuber J, Okon K, Laidler P (2012) Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch Biochem Biophys* 518:151–156
- Mackay JL, Kumar S (2013) Measuring the elastic properties of living cells with atomic force microscopy indentation. *Methods Mol Biol* 931:313–329
- Mahaffy RE, Park S, Gerde E, Kas J, Shih CK (2004) Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. *Biophys J* 86:1777–1793
- Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:849–854
- Morris CE, Homann U (2001) Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membrane Biol* 179:79–102
- Mozhanova AA, Nurgazizov NI, Bukharaev AA (2003) Local elastic properties of biological materials studied by SFM. SPM-2003 In: Proceedings, Nizhni Novgorod, pp 266–267
- Patel NR, Bole M, Chen C, Hardin CC, Kho AT, Mih J, Deng LH, Butler J, Tschumperlin D, Fredberg JJ, Krishnan R, Koziel H (2012) Cell elasticity determines macrophage function. *PLoS One* 7(9):e41024
- Radmacher M (1997) Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *Ieee Eng Med Biol* 16:47–57
- Radmacher M, Fritz M, Hansma PK (1995) Imaging soft samples with the atomic-force microscope—gelatin in water and propanol. *Biophys J* 69:264–270
- Raman A, Trigueros S, Cartagena A, Stevenson APZ, Susilo M, Nauman E, Contera SA (2011) Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol* 6:809–814
- Rotsch C, Braet F, Wisse E, Radmacher M (1997) AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell Biol Int* 21:685–696
- Segat D, Pucillo C, Marotta G, Perris R, Colombatti A (1994) Differential attachment of human neoplastic B-cells to purified extracellular-matrix molecules. *Blood* 83:1586–1594
- Sheetz MP, Dai JW (1996) Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol* 6:85–89
- Shroff SG, Saner DR, Lal R (1995) Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic-force microscopy. *Am J Physiol* 269:C286–C292
- Sirghi L, Ponti J, Broggi F, Rossi F (2008) Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur Biophys J* 37:935–945
- Sneddon IN (1965) The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Eng Sci* 3:47–57
- Spedden E, White JD, Naumova EN, Kaplan DL, Staii C (2012) Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophys J* 103:868–877
- Svaldo-Lanero T, Krol S, Magrassi R, Diaspro A, Rolandi R, Gliozzi A, Cavalleri O (2007) Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. *Ultramicroscopy* 107:913–921
- Vesey DA, Cheung CWY, Cuttle L, Endre ZA, Gobe G, Johnson DW (2002) Interleukin-1 beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int* 62:31–40
- Weisenhorn AL, Hansma PK, Albrecht TR, Quate CF (1989) Forces in atomic force microscopy in air and water. *Appl Phys Lett* 54:2651–2653
- Wu HW, Kuhn T, Moy VT (1998) Mechanical properties of 1929 cells measured by atomic force microscopy: effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning* 20:389–397

Direct Measurement of Photo-Induced Nanoscale Surface Displacement in Solids Using Atomic Force Microscopy

S. T. Souza,¹ E. J. S. Fonseca,¹ C. Jacinto,² N. G. C. Astrath,³ T. P. Rodrigues,³ and L. C. Malacarne³

¹ *Grupo de Óptica e Nanoscopia (GON), Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 57072-900, Brazil*

² *Grupo de Fotônica e Fluidos Complexos (GFFC), Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 57072-900, Brazil*

³ *Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 87020-900, Brazil*

ABSTRACT

The interaction between light and solid matter causes localized heating and surface displacement in the nanometer scale. The deformed surface can be analyzed by probing the time-dependent intensity of a laser reflected off of the surface using the thermal mirror (TM) method. This method provides quantitative measurements of thermal, optical and mechanical properties of a variety of materials. Here, we propose an alternative method to measure laser-induced surface deformation using atomic force microscopy (AFM). AFM is employed to determine the time evolution of the surface deformation and a theoretical model is proposed to determine physical properties of semi-transparent materials. The results are found to be in excellent agreement compared to those obtained using TM.

PACS number(s): 42.50.Ct, 78.20.nb, 68.37.Ps, 65.40.De

I. INTRODUCTION

Light-matter interaction is the fundamental principle behind many advanced characterization tools. These tools are widely employed for direct quantitative measurements of thermal, optical and mechanical properties of a variety of materials [1]. The methods employ coherent or incoherent light sources to heat up a material. From changes in the thermal state of the absorbing sample or its adjacent fluid, several effects can be monitored individually by measuring infrared emission, temperature change, acoustic waves, refractive index change, and surface displacement [2-12]. A laser-induced surface displacement, for instance, can be analyzed by probing the time-dependent intensity of a laser reflected off of the surface using the thermal mirror (TM) technique. TM has been used to investigate transparent and opaque materials, and is sensitive to deformation on the order of a few nanometers [11-13]. In addition, the pump-probe remote characteristics of this technique allow temperature scanning during measurements [14].

The TM effect is induced when a focused excitation laser beam shines on a solid material, and the absorbed energy is converted into heat, resulting in a time-dependent surface expansion/contraction. The local surface deformation depends on the optical and thermo-mechanical properties of the sample and can be probed by measuring the intensity variation of the center of a second laser beam reflected off of its surface. This produces a transient signal that can be used to retrieve information on the thermo-physical properties of the sample. The theoretical model describing the TM effect comprises the solutions of the heat conduction and thermoelastic equations and phase shift induced by this deformation on the propagation of the probe laser beam. In fact, TM can be regarded as an indirect method for measuring laser-induced surface displacement.

Direct assessment of nanoscale surface irregularities and topography can be obtained using atomic force microscopy (AFM). AFM has been used to investigate laser-induced thermal expansion of a scanning tunneling microscope tip by monitoring the time-resolved deflection of a cantilever [15], and to study volume changes in conjugated polymer films [16]. There are also several AFM-based techniques developed for localized measurements such as nanoindentation [17] of different samples, from biomaterials [18-19] to solid surfaces and thin films [20]. Here, we propose an alternative method to measure laser-induced surface deformation using AFM.

Atomic force microscopy is employed to determine the time evolution of laser-induced surface deformation of solids and a theoretical model is proposed to determine physical properties of semi-transparent materials. The results are found to be in excellent agreement compared to those obtained using TM.

II. THEORY

The laser induced deformation is described by the following thermoelastic equation [21]

$$(1-2\nu)\nabla^2\mathbf{u}(r,z,t)+\nabla[\nabla\cdot\mathbf{u}(r,z,t)]=\frac{2(1+\nu)(1-2\nu)\rho}{E}\frac{\partial^2\mathbf{u}(r,z,t)}{\partial t^2}+2(1+\nu)\alpha_T\nabla T(r,z,t), \quad (1)$$

with free stress boundary conditions at the surfaces. α_T is the linear thermal expansion coefficient, ν is the Poisson's ratio, and E is the Young's modulus. The temperature change $T(r,z,t)$ within the sample is given by the solution of the heat conduction equation

$$\frac{\partial T(r,z,t)}{\partial t}-D\nabla^2T(r,z,t)=Q_0e^{-A_ez}e^{-2r^2/\omega_{0e}^2}. \quad (2)$$

$D = k/c\rho$ is the thermal diffusivity of the sample, k , c and ρ are the thermal conductivity, specific heat, and mass density, respectively. The initial temperature change is assumed to be uniform or $T(r,z,0)=0$. $Q_0 = P_0A_e(1-R)\phi/c\rho\pi\omega_{0e}^2$, where P_0 is the laser power, A_e is the optical absorption coefficient at the excitation beam wavelength, R is the surface reflectivity, ω_{0e} is the excitation beam radius, and ϕ is the amount of absorbed energy converted into heat (thermal load).

Analytical solutions of these two coupled equations are difficult to be obtained using realistic boundary conditions. Under the experimental conditions, where the radius of the area affected by the thermoelastic perturbation is smaller than the sample radius, the assumption of radial infinite sample, $T(\infty,z,t)=0$, can be applied. Once the local temperature change during the experiments reaches only few tenths of degrees Celsius, and the induced deformation is only a few nanometers, the assumptions that the temperature change is not affected by expansion and that there is no heat conduction from the sample to the surrounding air

$\left[\frac{\partial T(r,z,t)}{\partial z}\Big|_{\text{surface}}=0\right]$ are fulfilled.

The solution of the thermoelastic equation, Eq. (1), neglecting the first term on the right side, which is known as the inertia term, is referred to as the quasistatic approximation or Duhamel's assumption. For most materials, the elastic response is faster than the characteristic thermal time, and the quasistatic approximation can be applied. The problem is treated in cylindrical coordinates due to the axially symmetric radial nature of the Gaussian pump laser beam. Introducing the scalar displacement potential and the Love function [21], the displacement z-component at the sample surface for an arbitrary temperature profile is [12]:

$$u_z(r, z=0, t) = \int_0^\infty \frac{2(1+\nu)\alpha_T\alpha^2\mathcal{G}(\alpha, t)J_0(\alpha r)}{1+2L^2\alpha^2 - \cosh(2L\alpha)} d\alpha, \quad (3)$$

with

$$\mathcal{G}(\alpha, t) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty \frac{T(\alpha, \lambda, t)}{(\alpha^2 + \lambda^2)} \left\{ \begin{array}{l} [2L\alpha + \sinh(2L\alpha)] \\ -2[L\alpha \cosh(L\alpha) + \sinh(L\alpha)] \cos(L\lambda) \\ -[2L \sinh(L\alpha)] \lambda \sin(L\lambda) \end{array} \right\} d\lambda, \quad (4)$$

in which $T(\alpha, \lambda, t)$ is the temperature in the Hankel-Fourier cosine space, L is the sample thickness, and $J_n(x)$ represents the Bessel function of the first kind.

Applying the temperature in the Hankel-Fourier cosine space and performing the integral over λ , the z-component of the displacement at the sample surface is given, in a good approximation to moderate optical absorbing material, by [12]:

$$u_z(r, z=0, t) = -\frac{\theta \lambda_p}{\pi} \int_0^\infty e^{-\frac{1}{8}\alpha^2 \omega_0^2 t} \frac{1 - e^{-D\alpha^2 t}}{\alpha^2} \left(\frac{\cosh(L_{eff}\alpha) - 1}{L_{eff}\alpha + \sinh(L_{eff}\alpha)} \right) J_0(\alpha r) d\alpha, \quad (5)$$

where $L_{eff} = (1 - e^{-A_e L}) / A_e$, $\theta = (1 - R)P_0 A_e \alpha_T (1 + \nu) \phi / k \lambda_p$, and λ_p is the probe beam wavelength. The analytical solution presented in Eq. (5) was validated by all numerical solutions using Finite Elemental Analysis.

In the TM technique, the deformation at the sample surface produces a phase shift on the reflected part of probe beam as $\Phi_{TM}(r, t) = (4\pi / \lambda_p) [u_z(r, 0, t) - u_z(0, 0, t)]$. The relative far-field intensity at the detector plane, $I(t)$, of the center of the probe beam spot is given by [11,12]

$$I(t) = \frac{\left| \int_0^\infty \exp[-(1+iV)g - i\Phi_{TM}(g,t)] dg \right|^2}{\left| \int_0^\infty \exp[-(1+iV)g] dg \right|^2}, \quad (6)$$

where $g = (r/\omega_{1p})^2$, $m = (\omega_{1p}/\omega_{0e})^2$, $V = Z_1/Z_c + (Z_c/Z_2)[(Z_1/Z_c)^2 + 1]$, ω_{1p} is the probe beam radius on the sample surface, Z_c is the confocal distance of the probe beam, Z_1 and Z_2 are the distances from the probe beam waist to the sample and from the sample to the detector plane, respectively.

III. EXPERIMENTAL

A. Atomic force microscopy

A schematic diagram of the experimental apparatus for AFM measurements is presented in Fig. 1(a). The excitation source was a continuous wave (cw) diode-pumped solid-state (DPSS) laser at $\lambda=532$ nm. A mechanical shutter controlled the exposure of the excitation beam power on the sample. The excitation beam was focused on the sample surface using an objective with focal distance of 17.5 mm. The diameter of the excitation beam on the sample surface was 10 μm and the samples were excited with 20 mW for 300 ms. The surface displacement measurements were carried out using an AFM (Nanonics, Multiview 4000TM) in tapped-mode working in phase feedback, using a glass tuning fork probe, from Nanonics, with a tip diameter of 10 nm and resonance frequency of 37.5kHz. In this mode the probe oscillated close to its resonance frequency and contacted briefly with the sample once in every oscillation. We used a tuning fork detection system instead of the conventional laser-PSD detection scheme. The cantilever oscillation amplitude was kept constant by the feedback loop and fixed at the center of the excitation laser beam. In order to make sure that the measured displacement is not caused, e.g., by thermally induced bending of the cantilever, we have used glass tips which do not absorb light at 532 nm. The tip was held between the microscope lens and the sample without obstructing the excitation beam. The tip was exposed and illuminated by the lens of the microscope, allowing us to view the exact region where surface displacement information was being collected. Once the tip was placed at the region of interest, the lateral scanners were turned off.

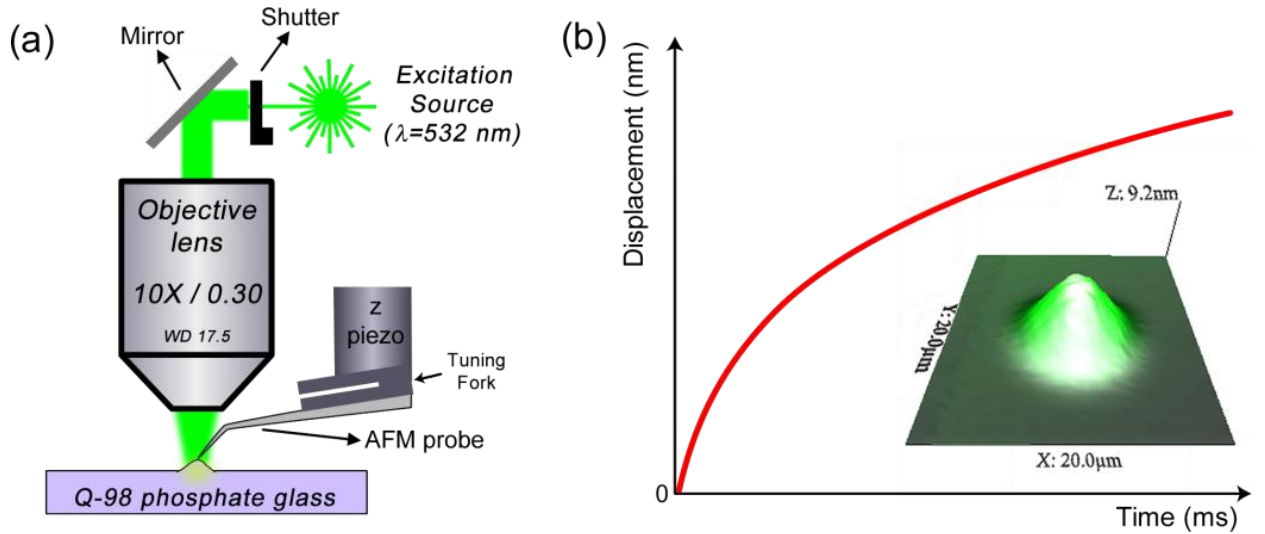


FIG. 1. (a) Schematic diagram of AFM measurements, and (b) the time-dependence of AFM measurements of the surface displacement. Inset: 3-D AFM measurement of the surface displacement.

During the experiments, the excitation laser beam is absorbed by the sample resulting in a time-dependent deformation of the surface. This local displacement implies in an oscillation amplitude variation of the tip because the distance between tip and sample surface is reduced. The dependency between oscillation amplitude and oscillation frequency on the distance between tip and surface makes the electronic feedback loop system to promptly react in order to keep a constant working distance between tip and sample. The information of the surface displacement at the contact point between AFM tip and sample is monitored with time, as illustrated in Fig. 1(b). Inset of Fig. 1(b) shows a three-dimensional AFM measurement of entire laser profile over the sample. The maximum amplitude was approximately of 9 nm, showing the region of interest for the measurements.

B. Thermal mirror

A time-resolved TM experimental apparatus has been used to investigate the samples. Fig. 2 illustrates the experimental apparatus used for the TM experiment. A cw TEM₀₀ solid state laser (Verdi G2) operating at 532 nm was used as the excitation source. The excitation beam was focused on the sample using a 30 cm focal length lens. A 10 mW cw TEM₀₀ He-Ne laser at 632.8 nm (JDS Uniphase, Model 1108P), almost collinear to the excitation beam ($\gamma < 1.5^\circ$), focused by a lens ($f = 20$ cm), was used to probe the surface displacement. The intensity variation of the probe beam center after reflection was detected by a pinhole-laser line filter-photodetector (ThorLabs DET10A/M) assembly at the far-field. A digital oscilloscope (Tektronix, Model TDS 2022B) recorded the data. The following experimental and geometric

parameters for the excitation and probe beams were measured: $\omega_e = 54.5\mu\text{m}$, $\omega_p = 364\mu\text{m}$, $Z_c = 1.8\text{cm}$, $Z_1 = 11.7\text{cm}$, $Z_2 = 3.2\text{m}$, $m = 46.6$, and $V = 6.89$. The excitation and probe beam radii were measured at different positions z with a beam profile camera (Ophir, Beamstar-FX-50), and used to calculate the confocal distance $Z_c = \pi\omega_{0p}^2 / \lambda_p$, m and V .

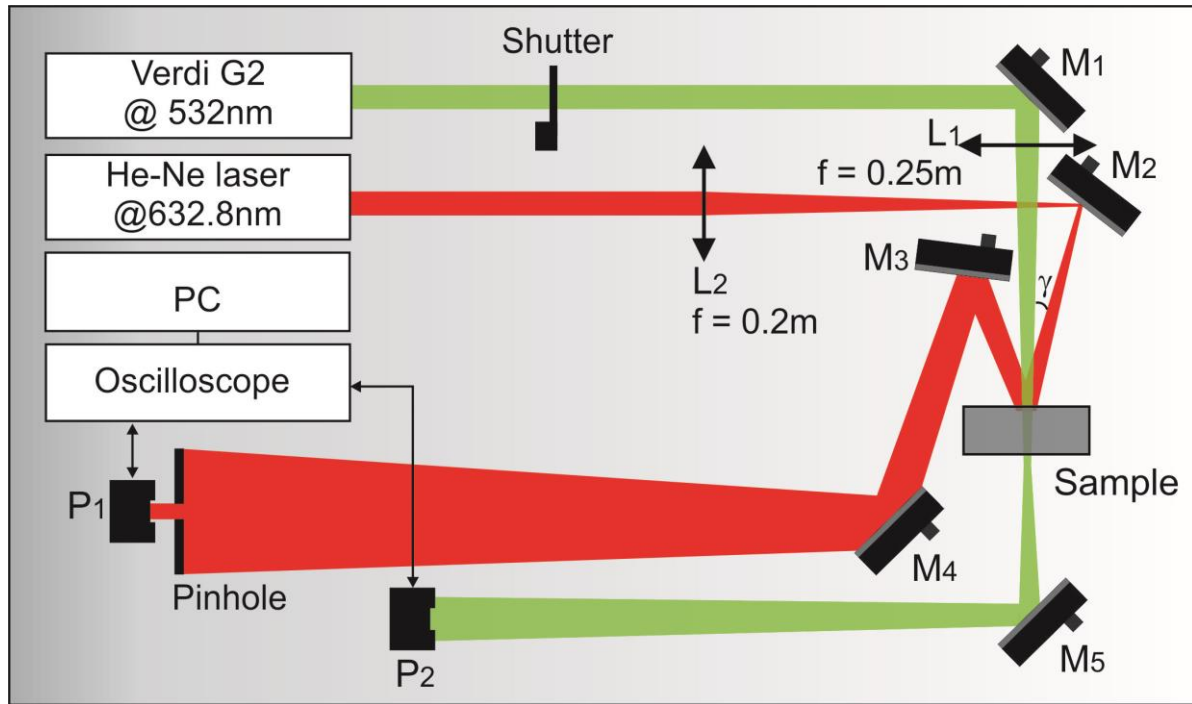


FIG. 2. Schematic diagram of an apparatus for time-resolved TM experiment. L_i and M_i stand for lenses and mirrors, respectively. P stand for photodetector.

IV. RESULTS AND DISCUSSION

AFM and TM measurements were performed in Nd^{3+} doped Q-98 phosphate commercial glasses (Kigre Inc.). The Nd_2O_3 concentrations used were: 1, 3, 6, and 9 wt.%. Several TM transients were recorded for each sample with different excitation powers. Inset of Fig. 3 shows the TM transients and the corresponding theoretical fits for 6 wt.% Nd:Q-98 sample. From the data regression analysis, the parameters θ and D are retrieved. Fig. 3 displays the values of θ/P as a function of the Nd^{3+} concentration.

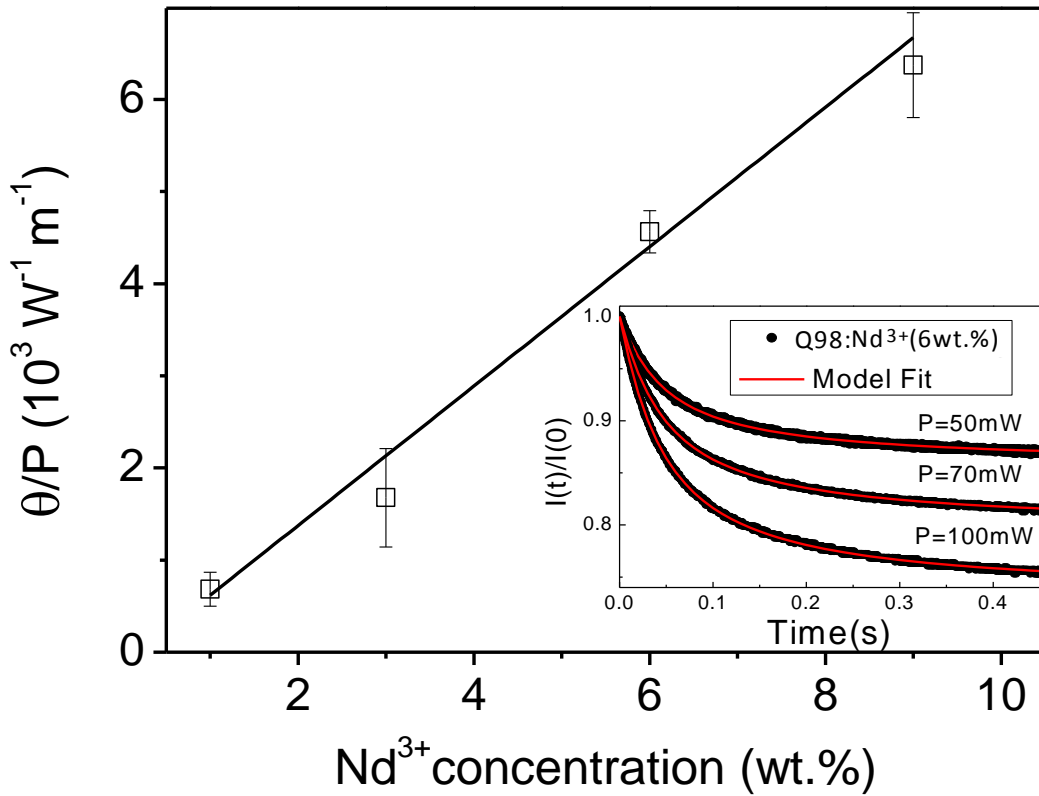


FIG. 3. θ/P as a function of Nd^{3+} concentration. Inset: TM transients for 6wt.%Nd:Q98 sample.

From the parameters θ/P and D obtained from TM data and the analytical expression for $u_z(r,t)$ given by Eq. (5), we can calculate the corresponding induced displacement and compared directly with the results from AFM measurements. Several AFM measurements were carried out and averaged. Fig. 4 displays the averaged AFM surface deformation together with the calculated displacement using Eq. (5) as a function of time. The open symbols represent the average of twelve AFM measurements for each sample and the error bars represent the standard deviation of the AFM measurements. The continuum curves represent the surface displacement calculated using TM results for each sample. All AFM and TM measurements were performed at the same experimental conditions. The results show an excellent agreement between AFM measurements and the calculated using TM theory. The difference observed between measured and calculated displacements for the lowest Nd^{3+} concentration could be associated with the low absorption coefficient of this sample, which reduces directly the surface bulging. The samples used have thickness of $L = 1.96, 1.51, 1.29, 1.05 \text{ nm}$ for 1, 3, 6 and 9wt.% of Nd_2O_3 , respectively.

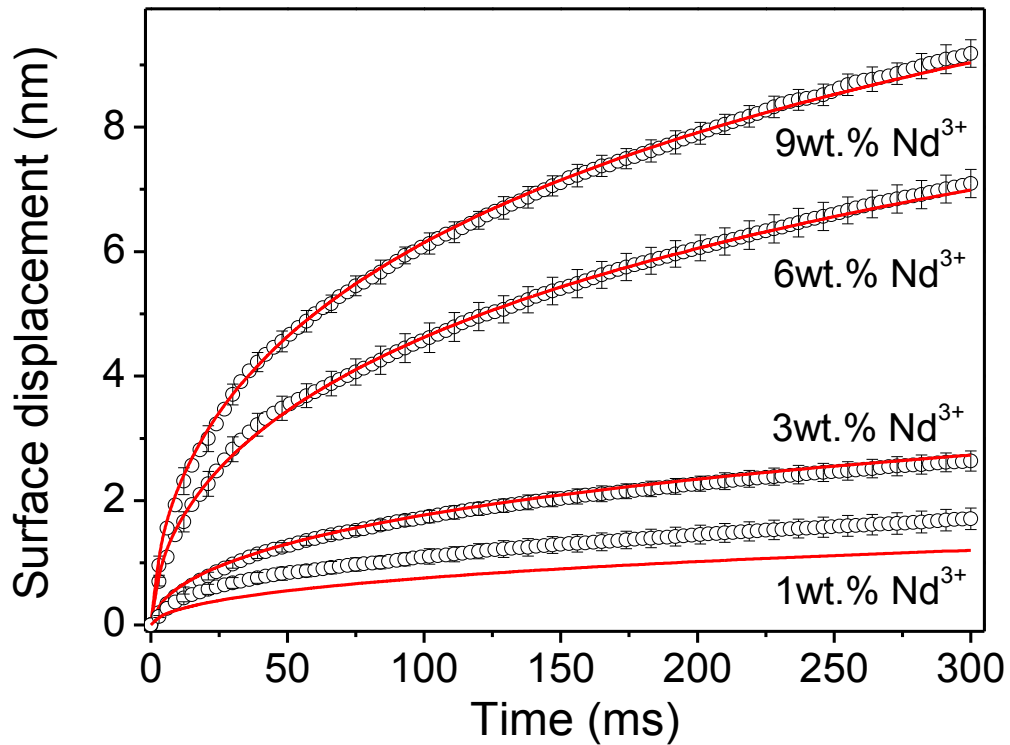


FIG. 4. Displacement obtained from AFM measurements (open symbols) and calculated using TM results (continuous red lines) for Nd³⁺ doped Q-98 phosphate glasses.

V. CONCLUSION

In conclusion, we presented a direct way to measure photo-induced nanometer-scale surface displacement in solids using an AFM tip. The AFM results were compared and presented excellent agreement with theoretical and experimental analysis using the time-resolved TM method. TM technique is a powerful tool for characterization of homogeneous linear elastic materials in general, and the results of this work show an alternative and concurrent method for measuring surface displacement using AFM. This method could be applied on to scattering surfaces or biological material, in which TM method is not appropriated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to CAPES, CNPq, FAPCAL (through PRONEX projects), and Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

- [1] D. Almond and P. Patel, *Photothermal science and techniques* (Chapman & Hall, London ; New York, 1996), 1st edn., Physics and its applications, 10.
- [2] N. G. C. Astrath, L. C. Malacarne, G. V. B. Lukasiewicz, H. S. Bernabe, J. H. Rohling, M. L. Baesso, J. Shen, and S. E. Bialkowski, *Appl Phys Lett* **100** (2012).
- [3] H. Vargas and L. C. M. Miranda, *Phys Rep* **161**, 43 (1988).
- [4] A. Salnick, A. Mandelis, and C. Jean, *Appl Phys Lett* **71**, 2671 (1997).
- [5] J. c. Cheng and S. y. Zhang, *Journal of Applied Physics* **70**, 7007 (1991).
- [6] C. L. Wong, G. C. K. Chen, B. K. Ng, S. Agarwal, N. Fanani, Z. P. Lin, S. Vasudevan, and P. Chen, *Opt Eng* **50** (2011).
- [7] L. Gao, A. Garcia-Uribe, Y. Liu, C. Y. Li, and L. H. V. Wang, *J Cell Sci* **127**, 288 (2014).
- [8] S. Jun, R. D. Lowe, and R. D. Snook, *Chem Phys* **165**, 385 (1992).
- [9] M. L. Baesso, J. Shen, and R. D. Snook, *Journal of Applied Physics* **75**, 3732 (1994).
- [10] T. P. Rodrigues, V. S. Zanuto, R. A. Cruz, T. Catunda, M. L. Baesso, N. G. C. Astrath, and L. C. Malacarne, *Opt Lett* **39**, 4013 (2014).
- [11] L. C. Malacarne, F. Sato, P. R. B. Pedreira, A. C. Bento, R. S. Mendes, M. L. Baesso, N. G. C. Astrath, and J. Shen, *Appl Phys Lett* **92** (2008).
- [12] N. G. C. Astrath, L. C. Malacarne, V. S. Zanuto, M. P. Belancon, R. S. Mendes, M. L. Baesso, and C. Jacinto, *J Opt Soc Am B* **28**, 1735 (2011).
- [13] N. G. C. Astrath, L. C. Malacarne, M. L. Baesso, G. V. B. Lukasiewicz, and S. E. Bialkowski, *Nat Commun* **5** (2014).
- [14] R. R. Pezarini, H. S. Bernabé, F. Sato, L. C. Malacarne, N. G. C. Astrath, J. H. Rohling, A. N. Medina, R. D. d. Reis, and F. C. G. Gandra, *Materials Research Express* **1**, 026502 (2014).
- [15] R. Huber, M. Koch, and J. Feldmann, *Appl Phys Lett* **73**, 2521 (1998).
- [16] E. Smela and N. Gadegaard, *The Journal of Physical Chemistry B* **105**, 9395 (2001).
- [17] N. A. Burnham and R. J. Colton, *J Vac Sci Technol A* **7**, 2906 (1989).
- [18] M. Radmacher, *Ieee Eng Med Biol* **16**, 47 (1997).
- [19] S. T. Souza, L. C. Agra, C. E. A. Santos, E. Barreto, J. M. Hickmann, and E. J. S. Fonseca, *Eur Biophys J Biophys* **43**, 573 (2014).
- [20] B. Bhushan and X. D. Li, *Int Mater Rev* **48**, 125 (2003).
- [21] W. Nowacki, *Thermoelasticity* (Pergamon Press, Oxford ; New York, 1986), 2nd edn