

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

GIVANILDO RODRIGUES DA SILVA

**MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA NA ANÁLISE DE RUGOSIDADE E DA
DIMENSÃO FRACTAL DE MEMBRANAS CELULARES**

Maceió
2016

GIVANILDO RODRIGUES DA SILVA

Microscopia de Força Atômica na Análise de Rugosidade e da Dimensão Fractal de Membranas Celulares

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

Maceió
2016

Catlogação na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

S586m	<p>Silva, Givanildo Rodrigues da. Microscopia de força atômica na análise de rugosidade e da dimensão fractal de membranas celulares / Givanildo Rodrigues da Silva. – 2016. 79 f. : il., tabs e gráfs.</p> <p>Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. Maceió, 2016.</p> <p>Bibliografia: f. 72-79.</p> <p>1. Microscopia de força atômica (AFM). 2. Macrófagos. 3. Matriz extracelular. 4. Morfologia. 5. Citoesqueleto. 6. Rugosidade. 7. Dimensão fractal. I. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU: 539.25</p>
-------	--



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Física
Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL. Brasil
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***“Microscopia de força atômica na análise de rugosidade e
da dimensão fractal de membranas celulares”***

por

Givanildo Rodrigues da Silva

A Banca Examinadora composta pelos professores Eduardo Jorge da Silva Fonseca (orientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Samuel Teixeira de Souza, pós-doutorando da Universidade Federal de Alagoas e Wagner Ferreira da Silva, do Campus Arapiraca da Universidade Federal de Alagoas consideram o candidato aprovado com grau “A”.

Maceió, 4 de março de 2016

Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

Dr. Samuel Teixeira de Souza

Prof. Dr. Wagner Ferreira da Silva

Em memória do meu avô Valeriano e do meu pai Severino. Dedico esse trabalho em especial a minha mãe Viliane, e ao meu irmão Givanaldo, por tudo que fizeram e fazem por mim e pelo que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelas forças diárias, pelo dom da minha vida, pelas bênçãos concedidas, por me acalmar nos momentos difíceis e sempre ser meu porto seguro.
- Aos meus pais, Severino e Viliane, por todo amor e dedicação. Pelos pilares que representam na pessoa que sou. Ao apoio incondicional e incentivo em todos os quesitos de minha vida. A representação, carinho, amor, dedicação que sempre tiveram comigo, só prova que tudo que eu faça não se compara ao que fizeram e fazem por minha pessoa. Vocês são meus guerreiros!
- Ao meu irmão, Givanaldo, por todo o apoio nas necessidades, pela parceria de sempre, por ser meu irmão, te amo!
- A todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo, em especial à tia Ariam, que é uma segunda mãe pra mim, sou muito grato por tudo que representa em minha vida.
- A Ananda que sempre foi uma pessoa muito importante e presente independente da distância.
- A todos os meus amigos, agradeço pelos sorrisos, pelo carinho e apoio de todos. Larissa, Grazy top, Bruno, Otávio, Pulinha, Lucas, Luana e Mayanne obrigado por estarem presentes em minha vida mesmo que indiretamente.
- Aos meus grandes amigos, desde os tempos de Picos, Leonan, Obedio, Josiel, Nazareno, Franswilker e a toda galera da casa do sal.
- Ao companheirismo da Rafaela, sempre me incentivando com sua alegria e confiança, você e seu apoio são muito importantes pra mim. Obrigado.
- A vocês pela amizade e por serem minhas irmãs: Thamásia e Fabiana vocês não existem.
- A Verônica que em todo decorrer da escrita sempre esteve ao meu lado, me propiciando forças para superar todas as dificuldades.
- Aos meus amigos Cristiano e Camylla do Pará que além de dividirmos despesas, também compartilhamos muitos sorrisos e bons momentos.
- Aos meus amigos cearenses “cabras da peste”, João Paulo e Job, vocês são feras.

- Aos amigos que o Instituto de Física me proporcionou, Rubens, Samuel, Elpidio, Rafa e toda galera do racha.
- A todos os colegas e amigos que fiz na UFAL, agradeço pela força e carinho, em especial a Tainã que sempre me acolheu nos bons e maus momentos. Sua ajuda foi imprescindível. Obrigado!
- A todos meus amigos de Presidente Dutra, Picos e Maceió em geral que eu deixei de citar.
- Ao Professor Eduardo Fonseca, pela orientação e por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço pela paciência, conselhos e grandes ensinamentos. Obrigado!
- Ao Samuel, pelo trabalho que desenvolvemos, por toda ajuda e ensinamentos nas incontáveis horas de laboratório.
- A todos os colegas do Grupo de Óptica e Nanoscopia: Ana, Henrique, Jennifer, Elaine pela disponibilidade e grande ajuda no laboratório.
- A todos os professores do Instituto de Física, técnicos e demais funcionários.
- A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.
- A CAPES, pelo suporte financeiro.

“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade”.

Raul Seixas

RESUMO

Um sistema de microscopia de varredura multi-sondas foi utilizado para o estudo de propriedades morfológicas de células. Inicialmente, um microscópio de força atômica foi usado para caracterizar e mapear a superfície da membrana celular de macrófagos. No presente trabalho investigamos o comportamento de macrófagos murinos em diferentes situações e observamos alguns dos parâmetros que são capazes de atribuir valor quantitativo, as alterações sofridas pela membrana da célula. As células foram aderidas a filmes de fibronectina, e também tratadas com citocalasina D, para compararmos com amostras sem tratamento e aderidas apenas ao vidro. Com este procedimento é possível quantificar a interferência da adesão celular a uma matriz extracelular, através dos parâmetros de rugosidade (rugosidade média e rugosidade média quadrática) e dimensão fractal. Os resultados destes estudos mostram que as interações entre a célula e a matriz extracelular mediadas pelo citoesqueleto, podem afetar diretamente a morfologia da membrana das células, modificando as propriedades físicas do citoesqueleto celular. Em particular, analisamos os parâmetros de rugosidade e da dimensão fractal de células, que são importantes quantificadores de possíveis mudanças na estrutura da membrana celular. Por fim, percebemos que a técnica de microscopia de força atômica é extremamente útil para a caracterização morfológica de amostras biológicas, que a adesão da célula a matriz extracelular interfere nas mudanças na morfologia da célula e que em nossas amostras a rugosidade se mostrou um parâmetro mais confiável para quantificar essas alterações do que a dimensão fractal.

Palavras-chave: Microscopia de força atômica. Macrófagos. Matriz extracelular. Morfologia. Citoesqueleto. Rugosidade. Dimensão fractal.

ABSTRACT

A multi-probe scanning microscopy system was used to study the morphological properties of cells. Initially, an atomic force microscope was used to characterize and map the surface of the cell membrane of macrophages. In the present work we investigated the behavior of murine macrophages in different situations and observed some of the parameters that are capable of assigning quantitative value, the alterations suffered by the cell membrane. Cells were adhered to fibronectin films, and also treated with cytochalasin D, to compare with untreated samples and adhered only to glass. With this procedure it is possible to quantify the interference of the cellular adhesion to an extracellular matrix, through the parameters of roughness (mean roughness and quadratic mean roughness) and fractal dimension. The results of these studies show that cytoskeletal interactions between the cell and the extracellular matrix can directly affect cell membrane morphology by modifying the cellular cytoskeletal physical properties. In particular, we analyzed the roughness parameters and fractal dimension of cells, which are important quantifiers of possible changes in the cell membrane structure. Finally, we noticed that the technique of atomic force microscopy is extremely useful for the morphological characterization of biological samples, that the adhesion of the cell to the extracellular matrix interferes in the changes in the cell morphology and that in our samples the roughness was a parameter more to quantify these changes than the fractal dimension.

Keywords: Atomic force microscopy. Macrophages. Extracellular matrix. Morphology. Cytoskeleton. Roughness. Fractal dimension.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	16
2.1 Origem do AFM	16
2.2 Princípio de Funcionamento do AFM.....	19
2.2.1 Conceito básico.....	19
2.2.2 Formação da imagem de AFM.....	20
2.2.3 Detecção da interação ponta-amostra.....	21
2.3 Forças de Interação Ponta-Amostra	23
2.3.1 Força de Van der Waals.....	25
2.3.2 Forças eletrostáticas.....	26
2.4 Modos Básicos de Funcionamento do AFM	27
2.4.1 Modo contato.....	27
2.4.2 Modo não contato.....	29
2.4.3 Modo de contato intermitente	31
2.5 Cantilever	32
2.6 Ponta.....	33
2.7 Scanner e Sistema de Realimentação (<i>feedback</i>)	34
2.8 Artefatos nas Imagens de AFM.....	34
2.8.1 Artefatos com origem na ponta	35
2.8.2 Artefatos com origem nas vibrações.....	36
2.9 Microscópio de Força Atômica do GON	38
3 RUGOSIDADE	40
3.1 Introdução.....	40
3.2 Propriedades Geométricas da Rugosidade.....	42
3.3 Parâmetros de Rugosidade	46
3.3.1 Parâmetros de amplitude ou altura	46
3.3.2 Rugosidade média	48
3.3.3 Rugosidade média quadrática	50
3.4 Dimensão Fractal como Análise Complementar.....	50
3.4.1 Dimensão fractal.....	51

3.4.2 Método da variância.....	52
3.4.3 Método da potência espectral	52
4 AFM NO ESTUDO DE CÉLULAS	54
4.1 Microscopia de Força Atômica Aplicada à Biologia Celular	54
4.2 Principais Componentes da Célula no Estudo de sua Morfologia	55
4.2.1 Membrana Celular.....	56
4.2.2 Núcleo.....	56
4.2.3 Citoesqueleto.....	56
4.2.4 Matriz extracelular	57
4.3 Efeitos da Adesão Celular à Fibronectina	57
4.4 Preparação do Substrato e Cultura das Células	58
4.5 Topografia das Amostras	59
4.5.1 Medidas de Ra e RMS	62
4.5.2 Discussão dos resultados das medidas de rugosidade.....	66
4.6 Medidas de Dimensão Fractal	67
4.6.1 Discussão dos resultados das medidas de dimensão fractal	69
5 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Entender a estrutura da matéria através da observação de seus detalhes em escala cada vez menor se fez necessário para a descoberta de um mundo invisível ao olho nu. Neste contexto, os microscópios representam um marco para história e para o desenvolvimento da ciência.

Desde sua invenção, os microscópios passaram por constantes desenvolvimentos até chegar às ferramentas atuais que detém de um alto poder de qualidade e resolução em suas imagens. A evolução dos microscópios contribuiu muito para os estudos biológicos desde seus primeiros relatos, como o de Robert Hooke¹, que utilizando um microscópio óptico rudimentar em 1665, descobriu a célula observando a cortiça, como também os estudos de Leeuwenhoek que foi o primeiro a observar e descrever os glóbulos vermelhos e os espermatozoides usando uma lente quase esférica entre placas de cobre. Ele criou seu microscópio simples e conseguiu aumentar seu campo de visão em 300 vezes².

De fato, a microscopia sempre desempenhou um papel importante no estudo de amostras biológicas e no entendimento de fenômenos do corpo humano, e a necessidade pelo desenvolvimento de microscópios mais potentes era constante. Na escala histórica de evolução dos microscópios, logo após a microscopia ótica, se destacou a microscopia eletrônica³, com os microscópios de varredura e de transmissão que não utilizavam fótons, e sim feixes de elétrons para geração de imagens, os quais possibilitaram aumentos surpreendentes que jamais seriam vistos por microscópios ópticos.

Anos depois, em 1982, com a invenção do microscópio de varredura por tunelamento⁴, emergiu junto com este o grupo de microscopia de varredura por sonda⁵. Neste grupo todos os microscópios utilizam uma sonda para varrer a superfície da amostra, e nesta varredura as interações entre ponta e amostra são monitoradas. Esse grupo modificou a forma de estudos das amostras permitindo, além da visualização da imagem, interagir e modifica-la enquanto está sendo examinada, quebrando barreiras que antes eram impostas no ramo da microscopia.

Uma importante técnica desse grupo é a microscopia de força atômica, que é a técnica de caracterização usada em nosso estudo. Com seu sistema de posicionamento refinado,

integrado a cerâmicas piezoelétricas, o AFM (Atomic Force Microscope) controla a forma com que sua sonda toca a amostra, com forças da ordem de piconewtons, sendo capaz de interagir com qualquer amostra em qualquer meio, e essa interação pode ser interpretada para a obtenção das imagens.

O AFM em nossa pesquisa foi utilizado para a caracterização de macrófagos murinos, que são células importantes do sistema imunológico. Sua morfologia pode ser facilmente mapeada com a utilização desse equipamento, e alguns parâmetros podem ser quantificadores das alterações na morfologia da membrana, como a rugosidade e a dimensão fractal.

A rugosidade é um parâmetro relevante já muito usado na indústria, como para a qualificação de componentes mecânicos, que utilizam a rugosidade como controle da superfície de peças de determinadas funções. Em uma dessas experiências eles quantificam a variação de rugosidade quanto à resposta da peça a elevação de temperatura⁶. Por outro lado, a rugosidade de superfícies também desempenha um papel importante na natureza viva. Por exemplo, folhas da planta Lotus tem uma rugosidade superficial muito especial, que desempenha um papel importante na proteção da planta contra contaminantes. O tipo certo de rugosidade em sua superfície permite à planta a capacidade de auto limpar sua superfície. Esta característica da superfície desta planta tem sido usada como um modelo em ciência dos materiais, no desenvolvimento de novos materiais para revestimento de superfície. Além disso, na boca humana a rugosidade da superfície também é importante, uma vez que a placa bacteriana se acumula mais facilmente em superfícies mais rugosas do que nas mais suaves. Por outro lado, nos implantes ósseos superfícies mais rugosas melhoraram a capacidade do implante de se anexar ao tecido ósseo.

Outro parâmetro quantificador das alterações sofridas pela célula é o da geometria fractal que se baseia na rugosidade do material, ou seja, nos defeitos que a superfície apresenta, seu principal componente quantitativo é o da dimensão fractal que já foi usado em alguns trabalhos para quantificar as formas irregulares de algumas superfícies^{7; 8; 9}.

Nesta dissertação apresentamos os conceitos e discutimos a aplicabilidade da técnica de AFM, realizadas em nosso laboratório, para o estudo das propriedades morfológicas da membrana plasmática de células aderidas a matrizes extracelulares. O objetivo de nosso trabalho é demonstrar o potencial da microscopia de força atômica no estudo de amostras

biológicas, discutir a aplicação de parâmetros quantitativos úteis para descrever as mudanças morfológicas de nossas amostras. Para a apresentação e discussão dos resultados obtidos nestes estudos, nós dividimos esta dissertação como descrito a seguir.

No segundo capítulo, detalhamos uma visão geral da técnica de AFM. Sua linha histórica, os princípios básicos de seu funcionamento e seus principais componentes, além dos modos de operação, forças existente durante a varredura, artefatos que prejudicam as imagens e um breve comentário sobre o AFM utilizado em nosso laboratório.

No terceiro capítulo, apresentamos os aspectos teóricos sobre o principal parâmetro utilizado para quantificar as alterações morfológicas das células usadas em nosso experimento, o da rugosidade. Além disto, distinguimos e caracterizamos as propriedades das superfícies, além de descrever os modelos matemáticos dos parâmetros utilizados. Também discorremos sobre um parâmetro alternativo, o da dimensão fractal, detalhando suas características e os métodos que utilizamos para calcular este parâmetro.

No quarto capítulo, estudamos o uso do AFM para o estudo de amostras biológicas. Iniciamos mostrando como este tipo de microscopia pode ser usada para o estudo das propriedades morfológicas de células. Para isto, estudamos como a estrutura topográfica é alterada pela adesão celular a uma matriz extracelular, discutiremos os resultados obtidos através das medidas de AFM e dos valores de rugosidade e dimensão fractal que foram calculados nos softwares adequados. Por fim, no capítulo cinco apresentamos uma conclusão geral dos resultados obtidos neste trabalho.

2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Neste capítulo abordaremos, de forma geral, aspectos básicos do microscópio de força atômica (AFM), detalhando os primeiros conceitos e sua concepção histórica, princípio de funcionamento, componentes básicos, modos de operação e as condições ótimas para a obtenção de imagens.

2.1 Origem do AFM

O surgimento do microscópio foi um grande passo para a observação do “mundo pequeno”. Neste contexto, no século XIV, o surgimento do microscópio óptico (LUPA) utilizando apenas uma lente deu início a um grande campo de pesquisa. Desde então com o desenvolvimento da ciência e a necessidade de novos e mais sofisticados equipamentos de observação a escalas cada vez menores, os microscópios não pararam de evoluir¹⁰.

Na busca de novas tecnologias para o desenvolvimento do sistema de microscopia, Knoll¹¹ em 1935 descreve os primeiros conceitos do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e em 1942 o primeiro MEV é construído. O MEV trouxe uma comodidade na preparação das amostras e a possibilidade de observação de imagens com uma resolução muito maior que a dos microscópios óticos. Em 1938 Von Ardenne¹² criou o microscópio eletrônico de transmissão, capazes de atingir um aumento útil de até um milhão de vezes tendo papel importante na análise do interior de amostras.

Só em 1981 Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, da IBM de Zurich desenvolveram o Microscópio de Tunelamento (STM, do inglês Scanning Tunneling Microscope)⁴, que foi o primeiro instrumento capaz de produzir imagens tridimensionais reais de superfícies com resolução atômica e ainda a possibilidade de manipulação dos átomos individualmente. O impacto da inovação foi tão notório que cinco anos depois seus inventores ganharam o Prêmio Nobel de Física pela descoberta. No entanto, o STM apresentava a desvantagem de a amostra ter que ser condutora.

Então em 1986 os mesmos criadores do STM juntos com Quate criaram o AFM¹³, que além de alcançar resolução atômica corrigia uma lacuna que o STM deixava, ou seja, o AFM

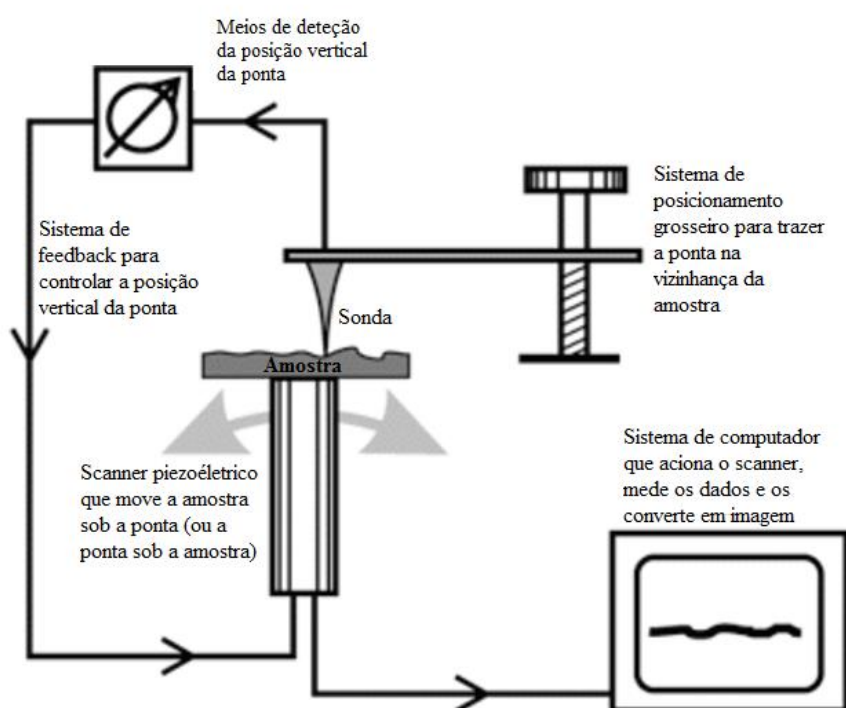
fornecia a vantagem de se poder analisar qualquer amostra, fosse ela condutora ou não, desde materiais duros como cerâmicas a materiais sensíveis como células biológicas.

O AFM não utiliza a medida da corrente de tunelamento para a geração da imagem, ao invés disso, ele mede as forças de ordem intermolecular entre a sonda e a amostra para identificar as variações da topografia da amostra. A invenção do STM e do AFM estimulou o processo de desenvolvimento de uma nova família de microscópios, chamados de Microscópios de Varredura por Sonda (SPM, do inglês Scanning Probe Microscope)¹⁰.

Diferentemente dos microscópios óticos, os microscópios da família dos SPM, não utilizam lentes e nem ondas de luz para obtenção das imagens, ao invés disso uma sonda que tem uma forma de agulha, interage com uma amostra a distâncias muito pequenas.

Na figura 2.1 apresentamos um esquema de um SPM e seus principais componentes. No SPM uma sonda com ordem de grandeza nanométrica varre o espaço amostral, o scanner piezoelétrico posiciona a amostra de acordo com os sinais emitidos pelo computador, e o sistema de posicionamento preliminar controla a posição vertical da sonda, quando essa varredura acontece, sonda e amostra interagem e essa interação pode ser interpretada e convertida em imagem pelo computador.

Figura 2.1: Representação esquemática dos principais componentes que formam os SPM's.



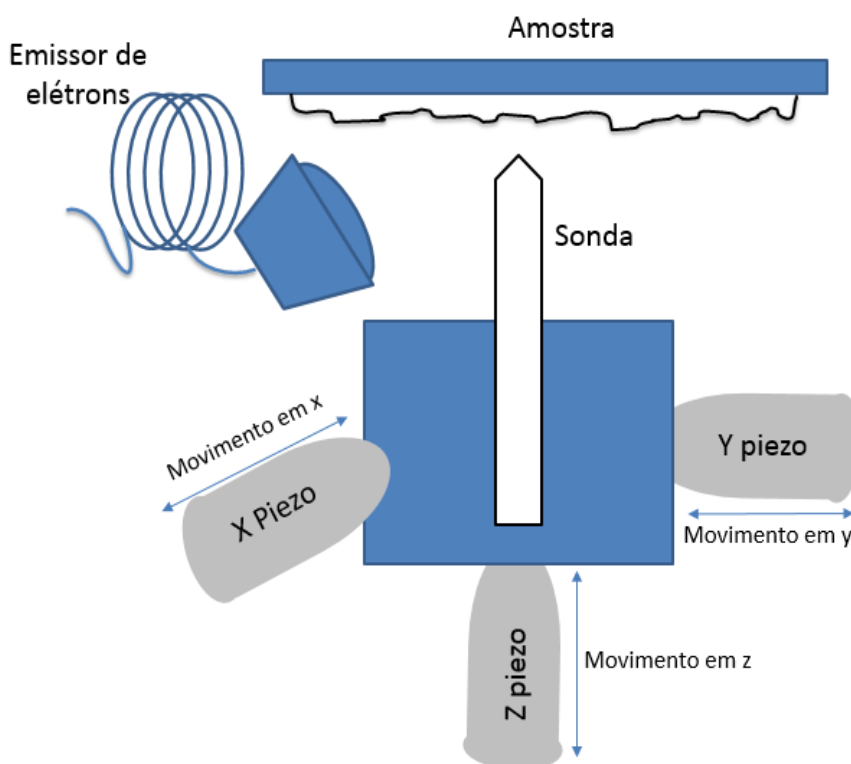
Fonte: Retirado da Ref.¹⁴

A invenção do STM e do AFM^{13; 15; 16} teve como consequência o desenvolvimento de novas técnicas de varredura por sonda tais como: Microscopia Ótica de Varredura em Campo Próximo (SNOM)¹⁷, Microscopia de Força Magnética (MFM)¹⁸, Microscopia de Força Eletrostática (EFM)¹⁹ e outros^{20; 21; 22} que permitem a medida de diferentes parâmetros com aplicações nos mais variados campos da ciência.

Apesar de ter sido criado a partir do STM, as ideias iniciais para o advento do AFM, vêm desde 1929 com Shmalz²³ e o seu perfilômetro (equipamento usado para medir a rugosidade de matérias em escala microscópica), nele a sonda sempre estava em contato com amostra e por não haver um controle da força aplicada os dois se chocavam muito e ambos apresentavam danos, apesar disso alcançava uma ampliação superior a 1000 vezes.

Muitos estudos como o de Becker²⁴ foram feitos pra contornar esse problema, mas só em 1971, Russel Young²⁵ desenvolveu seu perfilômetro Stylus o “topographiner” onde a interação entre ponta e amostra ocorria sem contato, e tinha um funcionamento muito parecido com o STM, mas incapaz de conseguir uma resolução atômica como o AFM atual. Na figura 2.2 podemos observar um modelo esquemático do perfilômetro de Young.

Figura 2.2: Esquema do perfilômetro Stylus de Young.



Fonte: adaptado da ref.²⁶

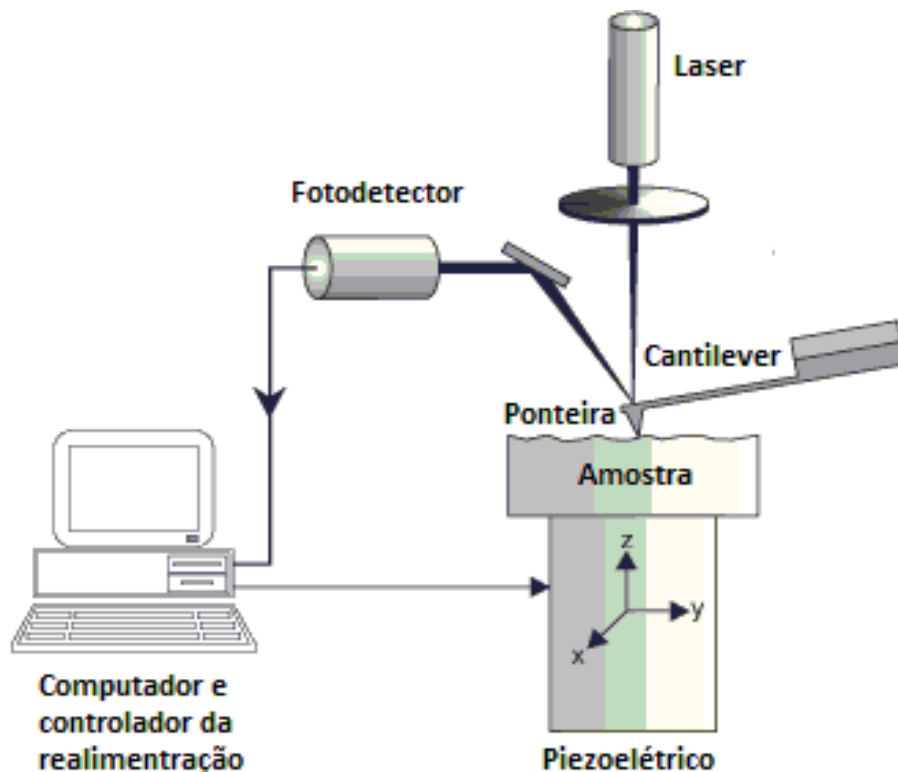
No perfilômetro a sonda foi montada sobre uma cerâmica piezoelétrica, que se move na direção z acima da superfície. Outros piezos movem a ponta nos outros eixos em relação à amostra. O circuito de realimentação eletrônico monitora a emissão de elétrons e foi usado para conduzir o elemento piezoelétrico do eixo z, e assim manter a distância entre sonda e amostra com um valor constante²⁶.

2.2 Princípio de Funcionamento do AFM

2.2.1 Conceito básico

O AFM se baseia nos princípios do STM e do perfilômetro Stylus, e tem a capacidade de trabalhar em qualquer amostra sem causar danos¹³. Uma alusão simples ao movimento da sonda do AFM é a forma que um toca disco de vinil funciona. A agulha “lê” a superfície do disco e consegue converter em áudio as informações obtidas. Na figura 2.3 temos um modelo esquemático de um AFM.

Figura 2.3: Esquema de um microscópio de força atômica e seus componentes principais.



Fonte: Retirado da ref.²⁷

Os principais componentes que formam um AFM são: a ponta, o sistema de posição preliminar da sonda sobre a amostra, cantilever, posicionador piezoelétrico, sistema de monitoramento sonda/amostra e computador para controle do sistema.

De modo resumido o papel desses componentes pode ser descrito da seguinte forma. A sonda do AFM é uma ponta afiada que se localiza na extremidade do cantilever fixa a ele. Essa ponta é colocada em contato ou muito próximo da superfície que se deseja verificar. A partir disso ocorrem interações altamente localizadas entre a ponta e a amostra.

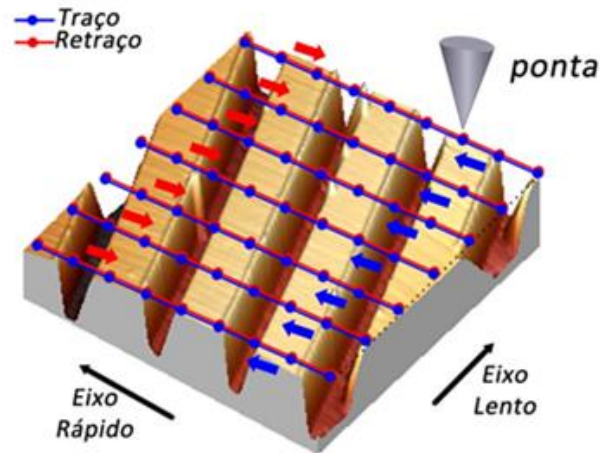
O scanner piezoelétrico provê a movimentação lateral da amostra em relação à ponta descrevendo um padrão de varredura. Durante essa varredura o mecanismo de monitoração detecta as deflexões do cantilever que se flexiona com as de forças interação entre ponta e amostra. Todo esse processo é controlado por um computador que movimenta o scanner, recebe todos os dados e os converte, fornecendo imagens topográficas da amostra²⁸.

2.2.2 Formação da imagem de AFM

Para a formação da imagem de AFM, a ponta varre a amostra conforme um padrão predefinido de leitura. Essa leitura é feita linha por linha da superfície, em cada linha a ponta descreve passos e em cada passo uma medida é realizada e gravada. No término da linha a ponta transcorre o caminho de volta, passo a passo e também armazena os dados do trajeto, depois de concluído a sonda segue para a próxima linha avançando um passo na direção acima ou abaixo do passo anterior.

Esse processo se repete no decorrer de toda a superfície analisada escolhida primordialmente, no final temos o mapeamento da topologia da amostra em questão. Durante o procedimento de formação da imagem, há dois tipos de aquisição de dados, a do eixo rápido que correspondente à varredura ponto a ponto de uma linha qualquer da superfície e a do eixo lento que diz respeito à varredura total dos passos na direção perpendicular²⁹. A figura 2.4 ilustra o padrão de varredura ponta-amostra para a formação das imagens.

Figura 2.4: Movimento tridimensional (eixos x, y e z) da ponta sobre a amostra. A imagem topográfica obtida é construída pelas informações das linhas varridas. 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. Cada ponto de medida tem uma posição x, y e z bem definida o que permite a reconstrução fiel da estrutura lida pela ponta²⁹.

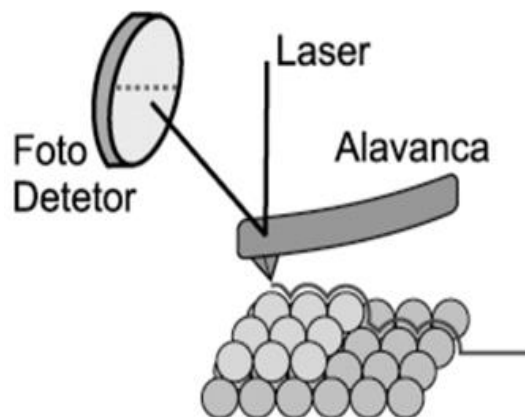


Fonte: Retirado da ref.²⁹

2.2.3 Detecção da interação ponta-amostra

Para a formação das imagens é essencial à interação da ponta com a amostra e essa interação é monitorada por um sistema de detecção que capta as forças existentes entre a ponta e amostra e as “traduz” para que a leitura da estrutura varrida seja interpretada. Em nossos estudos os movimentos do conjunto ponta/cantilever têm sido detectados por dois diferentes tipos de sistemas de detecção, o sistema de laser e o sistema de diapasão de quartzo (tuning-fork). A figura 2.5 mostra uma representação do sistema de detecção por laser.

Figura 2.5: Diagrama do sistema de detecção de AFM por laser.

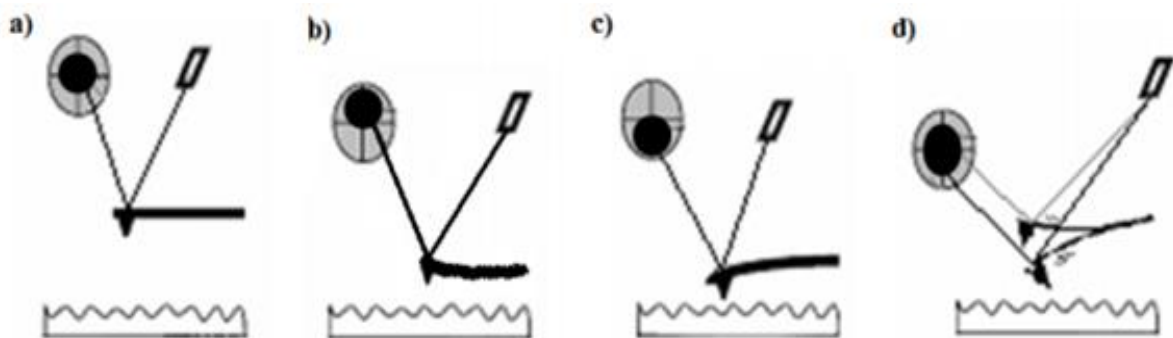


Fonte: Retirado da ref.³⁰

As imagens obtidas através do AFM são geradas devido à varredura da ponta sobre a amostra. Nesta varredura existem forças que interagem com a ponta, essa interação muda com as diferentes variações topográficas e podem ser verificadas graças às deflexões do cantilever. Esta deflexão é detectada por meio da reflexão de um ponto de laser em um diodo foto-sensível de quadrante (PSD) que registra as variações na posição do laser no decorrer da varredura (que é devidamente posicionado no centro do PSD antes de começar a varredura). Portanto, enquanto a ponta varre a amostra, o laser ocupa diferentes posições sobre o PSD, devido às deflexões que o cantilever sofre. Estas diferentes posições são registradas pelo programa Nano Workshop (NWS) (produzido pela própria Nanonics Imaging Ltd) que converte essas diferentes posições em variações na altura.

No sistema de detecção por laser, quando a ponta se aproxima da superfície, as forças aumentam, podendo ser forças atrativas ou repulsivas com isso a ponta vai defletir o cantilever em direção à amostra ou para longe da amostra como na figura 2.6.

Figura 2.6: Diferentes etapas de uma varredura com detecção a laser. a) laser devidamente posicionado; b) ponta afastada pelas forças tem o laser detectado acima da posição central pelo PSD; c) ponta atraída pelas forças tem forças detectadas abaixo da posição central do PSD; d) ponta oscilando, ora atraída ora repulsiva, também oscila no PSD.



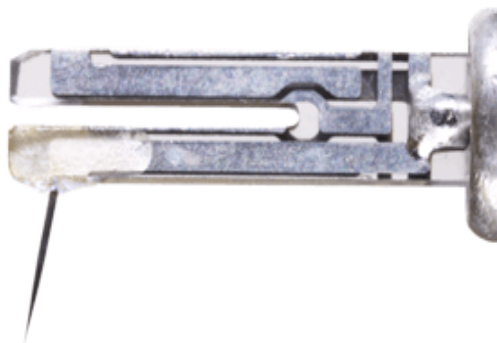
Fonte: Retirado da ref.³¹

Outro sistema de detecção é o sistema de diapasão de quartzo onde as interações ponta-amostra são transduzidas para um sinal elétrico por meio do efeito piezelétrico do quartzo, que é então detectada por um pré-amplificador.

A ponta em um dos braços do diapasão vibra na frequência de oscilação natural do diapasão e as forças de interação entre a ponta e amostra fazem com que o diapasão altere essa frequência natural de ressonância, e essa variação de fase ou amplitude é captada e tem

seu sinal amplificado e traduzida em uma variação de altura, que possibilita ao sistema a formação da imagem³². Na figura 2.7 observamos um diapásio de quartzo.

Figura 2.7: Diapasão de quartzo com a ponteira em um dos braços.

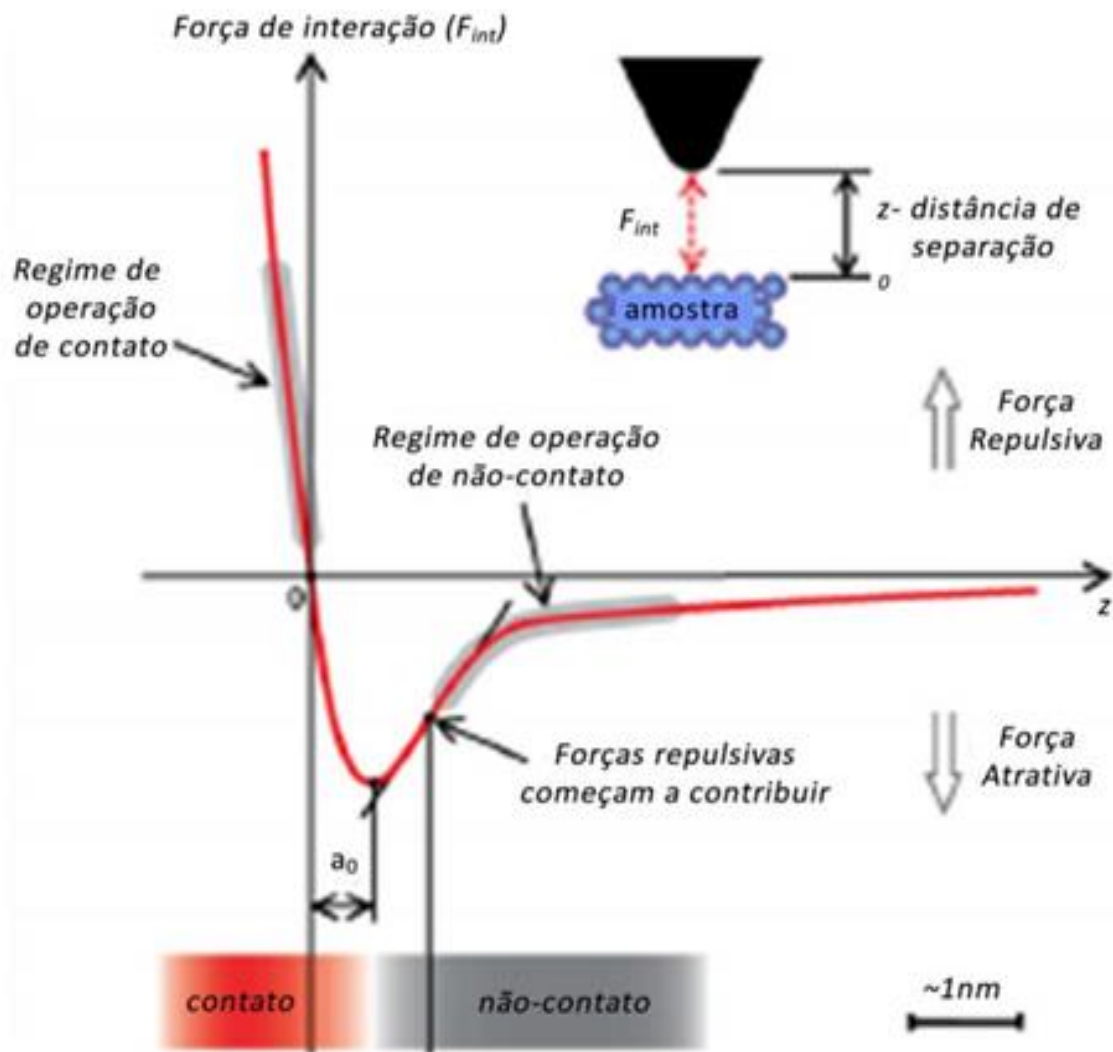


Fonte: www.madcitylabs.com (direitos autorais reservados à Mad City Labs Inc.)

2.3 Forças de Interação Ponta-Amostra

O próprio nome do instrumento faz referência ao seu princípio de funcionamento que atua através da medição das forças de interação atômica entre a ponteira e a amostra, essas forças dependem de alguns parâmetros, um deles é a distância que separa as duas. No primeiro momento quando a ponta se aproxima da amostra (distâncias menores que 50nm) ela é atraída e o cantilever é defletido em direção a amostra, causada por forças de Van der Waals. A medida que a ponta se aproxima ainda mais da superfície da amostra a força entre elas aumenta até o momento em que os átomos da sonda e da superfície da amostra estão tão próximos (0,5nm) que a força atrativa vai ficando mais fraca e as nuvens eletrônicas dos átomos de ambas começam a se sobrepor, repelindo-se e gerando uma força repulsiva que acaba por dominar e deflete o cantilever em direção contrária à amostra^{32; 33}. Na figura 2.8 podemos observar uma ilustração gráfica das forças de interação em função da distância z que separa a ponta da amostra.

Figura 2.8: Gráfico das forças de interação entre ponta e amostra em função da distância entre elas.



Fonte: Retirado da ref.²⁹

Tanto as forças atrativas de Van der Waals quanto as eletrostáticas de repulsão de, são descritos pelo potencial de Lennard-Jones³⁴, que descreve a interação entre os átomos da ponta e da amostra e pode ser descrito pela expressão a seguir:

$$U(z) = \left(\frac{\alpha}{z^{12}} - \frac{\beta}{z^6} \right) \quad (2.1)$$

Na equação 2.1 o potencial de Lennard-Jones tem uma dependência em z que é a distância entre o centro dos átomos da ponta e da amostra, onde α e β são constantes.

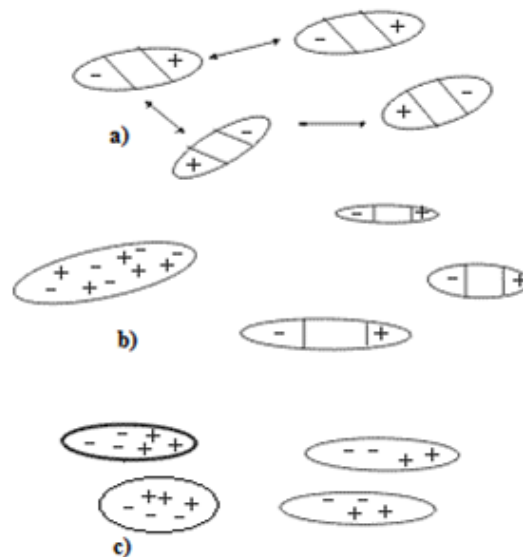
O primeiro termo proporcional a $1/z^{12}$ corresponde à repulsão entre dois átomos e predominam a curtas distâncias ($<0,5\text{nm}$), quando há certo grau de superposição de suas nuvens eletrônica. Ela tem esse comportamento devido ao princípio de exclusão de Pauli. O segundo termo $1/z^6$ está associado às forças atrativas de Van der Waals³⁵.

2.3.1 Força de Van der Walls

O potencial energético de um par de átomos muito distantes uns dos outros é zero, e apesar das forças de Van der Walls serem forças de longo alcance ocorrem em distâncias entre 10 e 50 nanômetros, distância em que essa energia já pode ser captada. As forças de Van der Walls podem ser subdivididas em três grupos³⁶:

- *Dipolo-dipolo*: São forças que se originam da interação de moléculas de dipolo permanente e são chamadas de forças de orientação (ver figura 2.9a).
- *Dipolo-dipolo induzido*: Se dão pela interação de uma molécula polar e uma apolar, o campo de um dipolo permanente induz uma polaridade na vizinhança da molécula apolar, essas são as chamadas forças de indução (ver figura 2.9b).
- *Forças de dispersão ou de London*: Devido a variações de carga dos átomos existe um deslocamento instantâneo do centro de carga positiva em relação ao centro de carga negativa. Assim, em um determinado momento em que um dipolo existe ele induz um dipolo de um outro átomo. Portanto átomos apolares possuem dipolos flutuantes finitos e momentos multipolares grandes em intervalos de tempo pequenos, os quais interagem, dando lugar a forças de dispersão entre eles (ver figura 2.9c).

Figura 2.9: Forças de van der Waals. a) Forças de orientação; b) Forças de indução; c) Forças de dispersão.



Fonte: Retirado da ref.³²

O potencial e as forças de interações de van der Waals de uma molécula, variam de acordo com alguns parâmetros como, por exemplo, o meio em que ponta e amostra se encontram e as formas geométricas que a ponta apresenta, essas forças representam o termo atrativo do potencial de Lennard-Jones.

2.3.2 Forças eletrostáticas

Uma molécula carregada tem um campo elétrico definido a certa distância, quando esse campo atua sobre outra molécula carregada dá origem a uma força, chamada de força eletrostática³⁶, gerada pela interação entre ponta e amostra. Quando a ponta e a amostra são ambos condutores existe uma diferença de potencial eletrostático não nulo, ou mesmo quando o aparato aplica um potencial externo e essa força é dada pela Lei de Coulomb descrita como:

$$F_e(r) = K \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (2.2)$$

que depende da distância r que as separa e K é a constante eletrostática que depende da permissividade elétrica do meio e essas forças podem ser atrativas ou repulsivas.

A energia livre para a interação de Coulomb entre duas cargas q_1 e q_2 é dada por:

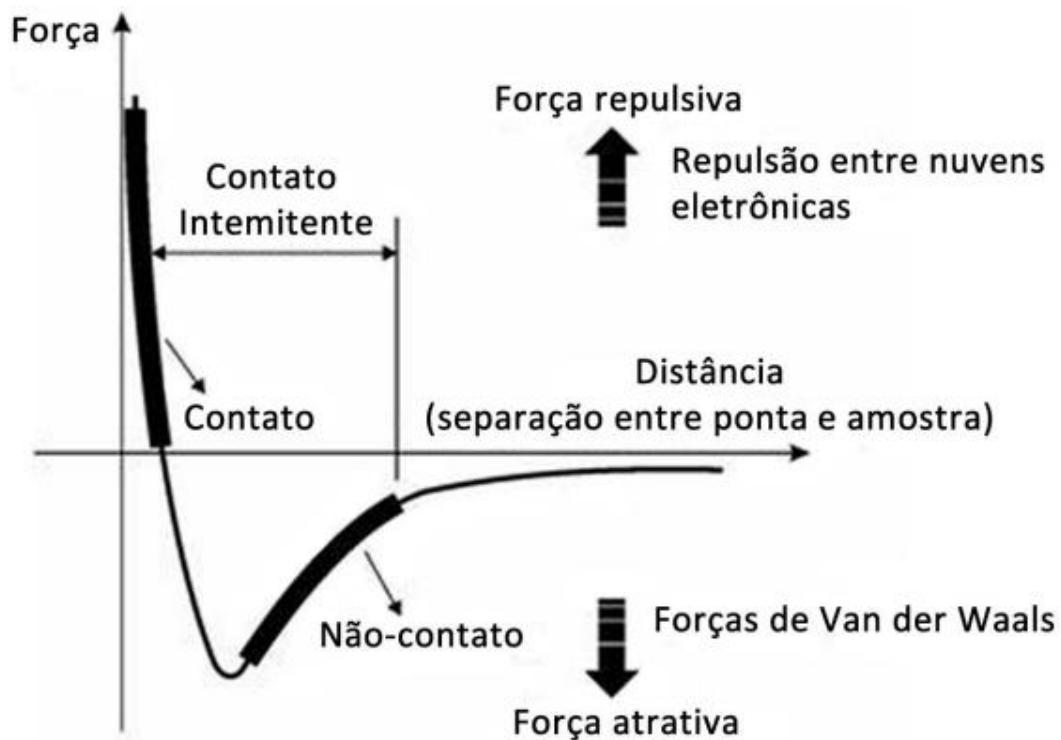
$$E_{el} = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r} \quad (2.3)$$

onde ε é a constante dielétrica do meio, ε_0 é a permissividade no vácuo, e r a distância que separa as cargas pontuais.

2.4 Modos Básicos de Funcionamento do AFM

O funcionamento do microscópio de força atômica varia de acordo com o modo de operação em que o microscópio está agindo. Se o regime de operação é alterado conseqüentemente as forças de interação sonda-amostra também se alterarão. O AFM tem três modos de operação, o modo de contato, não contato e o modo de contato intermitente. A figura 2.10 ilustra a relação entre os diferentes modos de operação e as forças de interação entre a ponta e a superfície amostra.

Figura 2.10: Esquema do comportamento das forças entre amostra e sonda em função da distância, de acordo com os diferentes modos do microscópio de força atômica.



Fonte: Retirado da ref.³⁰

2.4.1 Modo contato

Neste modo de operação a sonda varre a amostra sempre em contato com ela, por isso aqui predominam as forças de curto alcance, a fim de aproveitar as forças de repulsão

íon-íon, que diminui com o aumento da separação ponteira-amostra, a ponta sofre uma força de repulsão da ordem de 10^{-9} a 10^{-7} N³⁷.

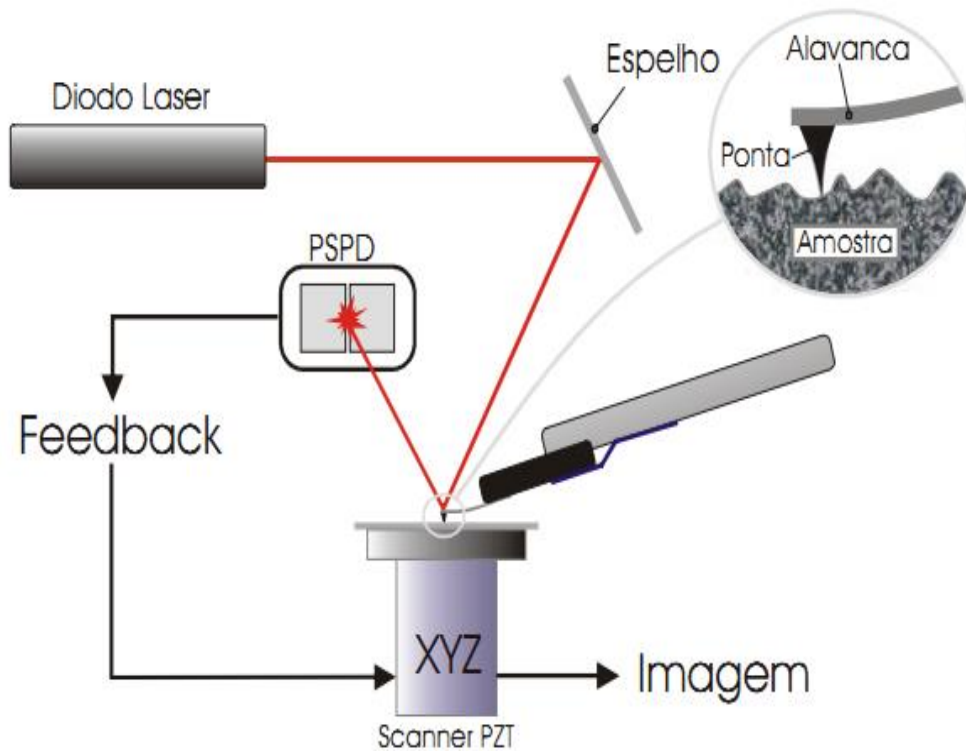
A dependência dessa distância das forças repulsivas íon-íon, garante um dos principais benefícios da técnica de contato a grande resolução espacial atingida. Neste método o cantilever sofre deslocamentos graças à força de repulsão provocada pelos átomos da amostra, essa força provoca a deflexão do cantilever que é calculado segundo a lei de Hooke como:

$$F = k_c \Delta z_c \quad (2.4)$$

onde F é a força (N), k_c é a constante elástica do cantilever (N/m) e Δz_c (m) é a deflexão do cantilever.

O cantilever atua na região repulsiva das forças por isso a constante elástica do mesmo deve ser baixa para que o cantilever tenha mais flexibilidade e danifique menos as amostras. De fato por estarem sempre em contato, tanto a amostra como a ponta correm o risco de danificação, principalmente quando se trabalha com amostras moles ou fracamente adsorvidas, elas são deformadas com certa facilidade, e isso pode causar problemas de distorção na amostra, ou mesmo remoção do substrato^{38; 39}, por isso esse modo de operação é indicado para amostras vigorosamente aderentes à superfície como o trabalho de Murphy⁴⁰. Na figura 2.11 podemos observar o esquema do modo de operação em contato.

Figura 2.11: Esquema de funcionamento do modo de operação em contato.



Fonte: Retirado da ref.⁴¹

2.4.2 Modo não contato

No modo de operação de não contato prevalecem as chamadas forças de longo alcance, onde a ponta é mantida "distante" da superfície da amostra cerca de centenas de ângstrons, essas forças atrativas de longo alcance implicam em mudanças de fase, amplitude e frequência do cantilever que são utilizadas para manter a distância entre a ponta e amostra constante⁴².

No caso do modo não contato o cantilever oscila em sua frequência de ressonância ou bem próximo dela, a força de que tratamos aqui é de ordem 10^{-12} N bem menor do que as envolvidas no modo contato, que são da ordem de 10^{-9} N. Isso dificulta a detecção do sinal, mas mesmo assim é possível imagear uma amostra sensível sem danos. Neste modo por estarem a uma distância maior ponta e amostra a imagem tende a ter resolução menor do que no modo contato^{43; 44; 45}.

As imagens são geradas graças ao movimento vibracional do cantilever que com ajuda do elemento piezolétrico, que vibra com uma frequência ω_d , bem próximo da frequência de

ressonância ω_0 . Essa oscilação do cantilever é descrita como a de um oscilador amortecido forçado³⁷, que tem o movimento representado pela equação:

$$m \frac{d^2z}{dt^2} + \left(\frac{m\omega_0}{Q} \right) \frac{dz}{dt} + m\omega_0^2 z = F_0 \cos(\omega_0 t) \quad (2.5)$$

onde, $\frac{m\omega_0}{Q}$ é o termo que indica a intensidade do amortecimento do movimento, e da qual a solução estacionária é :

$$z(t) = A_0 \cos(\omega_d t + \emptyset) \quad (2.6)$$

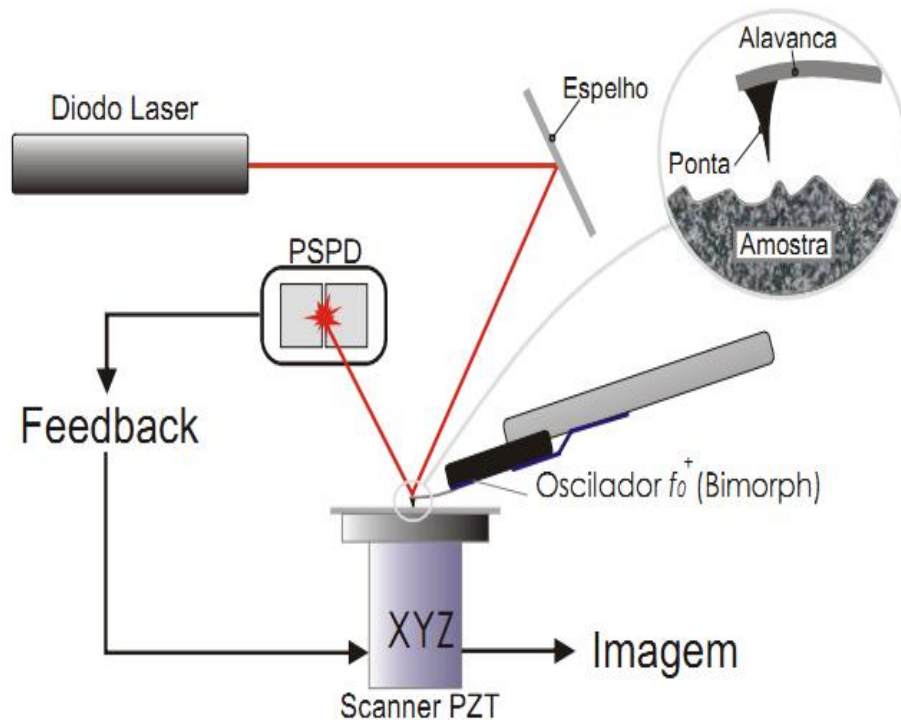
onde A_0 onde é amplitude da oscilação à frequência ω_d e \emptyset é a diferença de fase entre a resposta do sistema e a excitação a que está sujeito e tem suas respectivas soluções:

$$A_0 = \frac{F_0/m}{\sqrt{Q(\omega_0^2 - \omega_d^2) + \left(\frac{\omega_0\omega_d}{Q}\right)^2}} \quad (2.7)$$

$$\emptyset = \tan^{-1} \left(\frac{\omega_0\omega_d}{Q(\omega_0^2 - \omega_d^2)} \right) \quad (2.8)$$

Q é o fator de qualidade do cantilever que depende do meio em que ele está operando, e podemos observar que quando tivermos um sistema ressonante temos $\omega_0 = \omega_d$ teremos amplitude máxima. Na figura 2.12 podemos observar o esquema do modo de operação não contato.

Figura 2.12: Esquema de funcionamento do modo de operação em não contato.



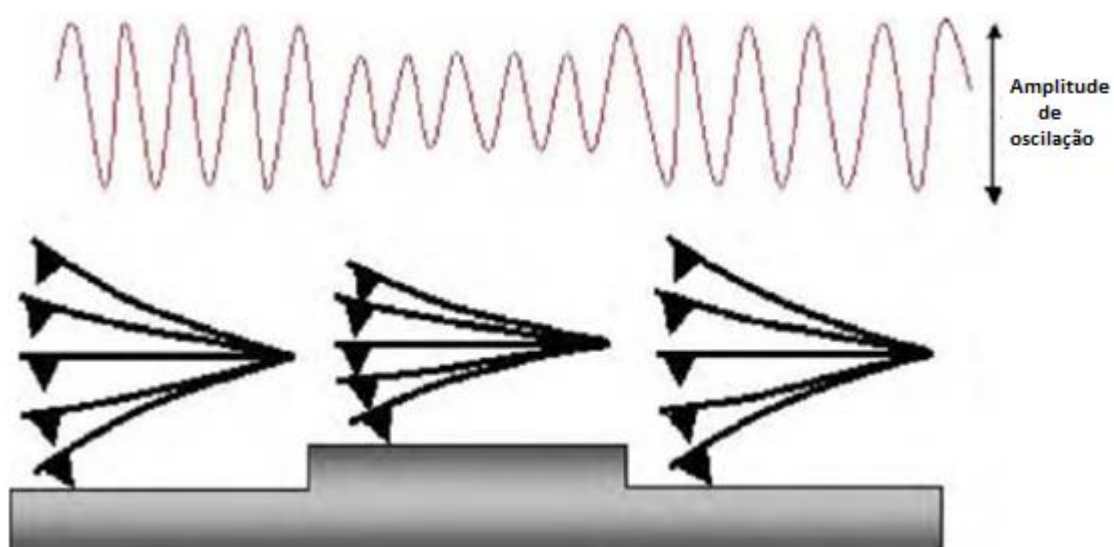
Fonte: Retirado da ref.⁴¹

2.4.3 Modo de contato intermitente

As equações matemáticas que descrevem o modo de não contato são as mesmas para o modo de contato intermitente, se diferenciam pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra. Neste modo de operação a ponta está em contato intermitente com a superfície ao mesmo tempo em que varre a superfície da amostra.

Neste modo o cantilever é posto a oscilar bem próximo da sua frequência de ressonância atuando tanto no regime das forças atrativas quanto repulsivas e dependendo da distância entre a ponta e a amostra, a amplitude de oscilação é ligeiramente diminuída e sofre um desvio que é detectado e serve de sinal de realimentação⁴⁶. Na figura 2.13 podemos observar o esquema do modo de operação de contato intermitente.

Figura 2.13: Esquema de funcionamento do modo de operação de contato intermitente.



Fonte: Retirado da ref.⁴⁷

As imagens são geradas pelo mapeamento que dos deslocamentos verticais do scanner para manter a amplitude constante durante a varredura. Diferente do modo de contato, o controle da força no contato intermitente entre a ponta e a amostra permite que a sonda varra materiais macios como, por exemplo, amostras biológicas macias, sem que haja danificações na amostra ou quebra na ponta⁴⁸.

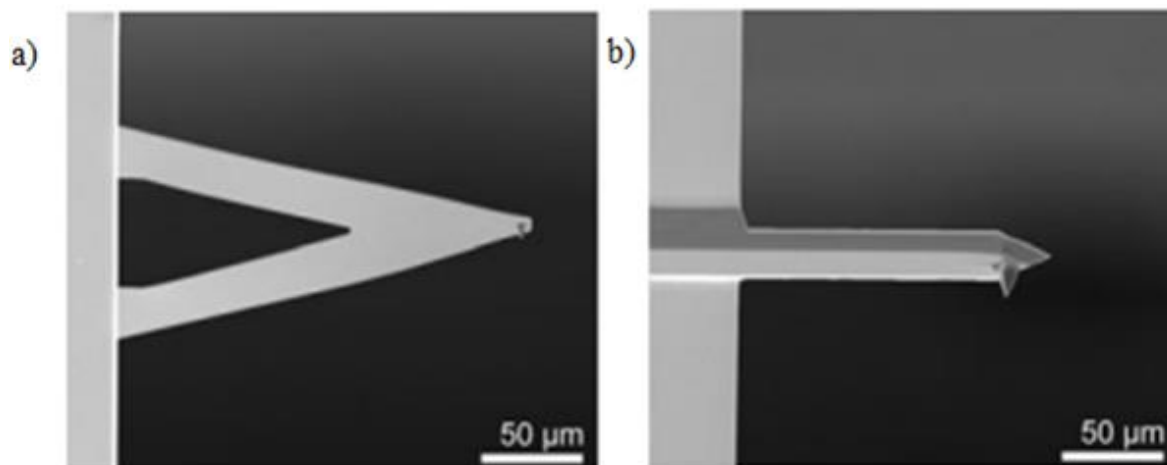
2.5 Cantilever

O cantilever é o componente mais importante do AFM por possuir duas propriedades determinantes. Uma delas é a constante de mola, que se altera dependendo da geometria de sua forma, dimensão, e o material utilizado na construção do cantilever. De fato a constante de mola irá determinar as forças entre a ponteira e a amostra se deformando quando elas se encontram próximas. A outra propriedade importante é sua frequência de ressonância, que pode variar de alguns quilohertz a centenas de quilohertz, determinando a velocidade de resposta e a sensibilidade a vibrações externas¹⁴.

Também comumente chamado de alavanca, o *cantilever* é a estrutura que sustenta a ponta do microscópio de força atômica (AFM), podendo assumir duas principais formas que

são as mais utilizadas em experiências com AFM: a forma retangular, sendo esta a mais comum, e a forma de “V”. A Figura 2.14 apresenta duas imagens obtidas por um microscópio eletrônico de varredura de microcantilevers de dois tipos de cantilevers mais utilizados.

Figura 2.14: Imagens obtidas por um SEM de microcantilevers. (a) cantilever em forma de “V”. (b) cantilever em forma retangular.



Fonte: Retirado da ref.²⁶

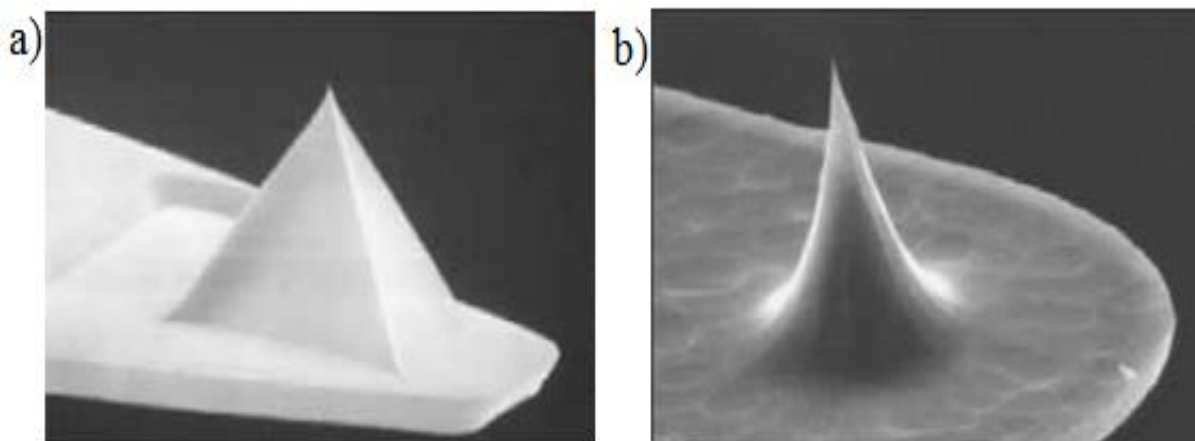
Os materiais normalmente utilizados para alavancas de AFM são: o nitreto de silício (Si_3N_4) e silício (Si), o cantilever da esquerda na imagem acima em formato de “V” é típico para a utilização no modo de contato feito de nitreto de silício e o da direita é feito de silício e projetado para os modos de oscilação.

2.6 Ponta

A ponta é um dos componentes essenciais da família de microscópios de varredura por sonda ou SPM que inclui o Microscópio de Tunelamento ou STM e o Microscópio de Força Atômica ou AFM. Ela é responsável por varrer a superfície da amostra identificando mudanças em seu relevo através de variações de grandezas físicas que dependem da variante do SPM escolhida.

A Identificação do material do qual a amostra é feita bem como os materiais que compõem a ponta e, além disso, conhecer a geometria da ponta utilizada é de extrema importância para obter um entendimento adequado da interação ponta-amostra. Elas podem ser de formato cônico ou piramidal (como na figura 2.15), e fabricado com diversos tipos de materiais, podendo ser revertidas por elementos condutores por exemplo.

Figura 2.15: Formas das pontas a) ponta piramidal. b) ponta cônica.



Fonte: Retirado da ref.⁴⁹

2.7 Scanner e Sistema de Realimentação (*feedback*)

Existem diferentes tipos de **scanners** que se diferem tanto em sua forma quanto nas suas propriedades: há os que têm forma de tubo, com altas frequências de ressonância e desenho mais rígido e os em forma de tripóide que possuem maior alcance de varredura, mas são menos estáveis. Altas frequências de ressonância são requeridas com o objetivo de aumentar a velocidade de varredura sem o risco de aparição de vibrações espúrias, contribuindo assim para uma reprodução sonora sem distorções. O sistema de realimentação, também conhecido como *feedback*, é a reação a um estímulo que serve para avaliar os resultados da transmissão utilizado para acompanhar a topografia da superfície geral ou baixa frequência associado com inclinação entre o scanner e a amostra⁵⁰.

2.8 Artefatos nas Imagens de AFM

Os instrumentos utilizados na pesquisa para medições no desenvolvimento da ciência e aplicação nas mais variadas áreas do conhecimento podem apresentar erros. Com o AFM não é diferente, erros podem ter diferentes origens que acabam refletindo e prejudicando a qualidade final da imagem desejada. Esses erros são chamados de artefatos, eles ocorrem com limitações impostas por alguns dos componentes que formam o aparelho de medida no caso do AFM, o scanner, a ponta, ruídos externos, entre outros.

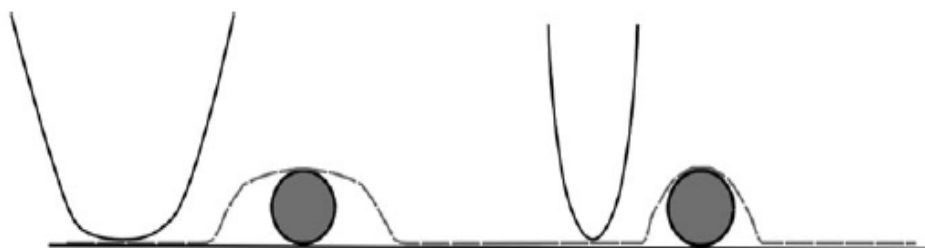
Reconhecer a origem dos artefatos é importante para a obtenção de imagens de maior qualidade, sobretudo pela possibilidade de correção para contorná-lo, de acordo com a origem do artefato.

2.8.1 Artefatos com origem na ponta

As imagens obtidas pelo AFM sempre estarão relacionadas com a forma espacial da ponta e a maioria dos artefatos de imagem em uma imagem de SPM surge a partir das convoluções da ponta com a superfície.

Na figura 2.16 temos a comparação entre pontas de formatos diferentes varrendo uma superfície de determinada altura, a linha determina o perfil obtido ao final da varredura.

Figura 2.16: Artefatos com origem na ponta. Comparação entre pontas de geometrias diferentes.



Fonte: Imagem retirada da Ref.²⁶

Apesar dos artefatos apresentados com as pontas diferentes e suas convoluções com a superfície, as sondas conseguem reproduzir com exatidão os dados topográficos de altura da amostra.

Na figura 2.17 temos outra comparação entre pontas de formatos diferentes atuando, só que agora em uma superfície com um buraco, a linha à direita de cada ponta determina o perfil obtido ao final da varredura.

Figura 2.17: Comparação das linhas de varredura e obtidas com uma ponta de raio de curvatura maior (Esquerda) e uma sonda afiada de raio de curvatura menor (Direita) em uma amostra comum (buraco).



Fonte: Imagem retirada da Ref.⁵⁰

Se a ponta não atinge a parte inferior de uma determinada superfície da amostra, a imagem não será obtida corretamente como na ponta da esquerda (figura 2.17), com a sonda afiada conseguimos mostrar o fundo da vala, mas incapaz de atingir os cantos inferiores, enquanto que a sonda de raio de curvatura maior não pode atingir a parte inferior da trincheira. A escolha da ponta correta é um fator determinante para a obtenção de imagens mais próximas da realidade.

Em muitos casos, devido ao uso contínuo ou má utilização, alguns problemas podem surgir, como a degradação da ponta ou sua contaminação, tornando a sonda inutilizável. E para que isso seja evitado, cuidados como: limpeza minuciosa das amostras; utilização de pontas adequadas a cada aplicação; e troca das mesmas assim que derem indícios de não se encontrarem nas melhores condições devem ser tomados para que melhores resultados sejam obtidos²⁶.

2.8.2 Artefatos com origem nas vibrações

Vibrações ambientais na sala onde o AFM está situado pode fazer com que a sonda no microscópio vibre, modificando sua ação natural gerando artefatos em uma imagem. Assim, os artefatos aparecerão como oscilações na imagem. Portanto, o controle das vibrações é muito importante.

Vibrações de um andar

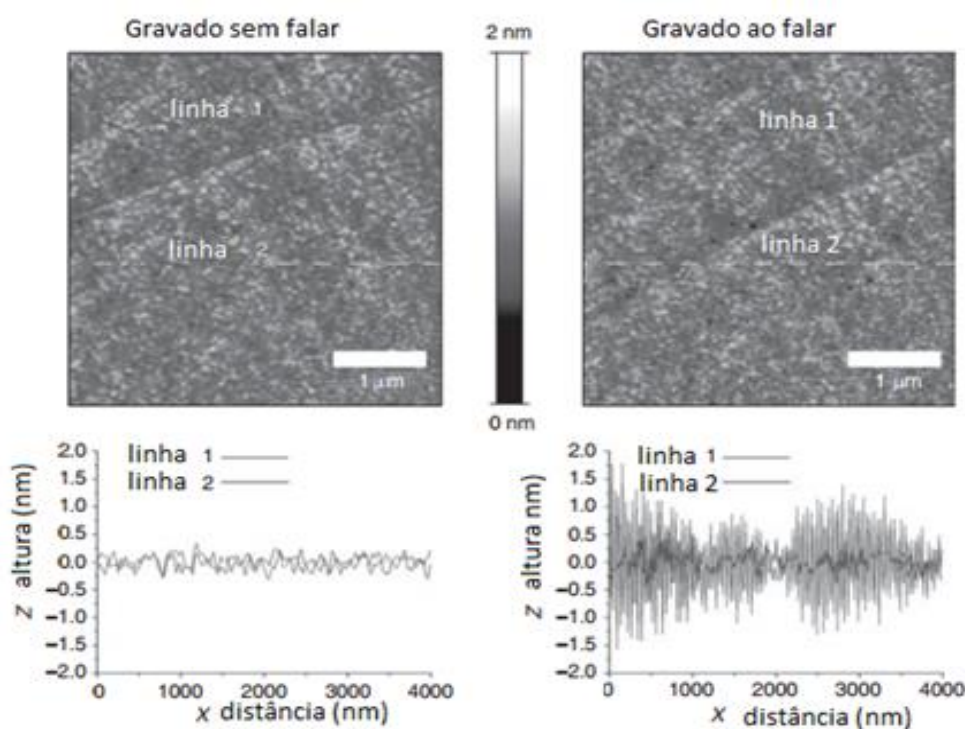
Essas vibrações podem ocorrer no andar de um prédio, que pode vibrar para cima e para baixo com frequência abaixo de 5Hz, e podem interferir nas medidas. Também, podem ser iniciadas por um evento externo, como um elevador em movimento, um trem passando, ou mesmo pessoas andando em fora do laboratório AFM. Em suma, as vibrações devem ser controladas onde o AFM está instalado, caso contrário, estas podem causar estrutura periódica em uma imagem.

Vibrações acústicas

Vibrações acústicas podem causar artefatos em imagens de AFM. O som pode ser causado por um avião passando por cima de um edifício ou até mesmo os tons de voz de uma pessoa. O ruído de ventiladores de resfriamento de outros instrumentos também pode causar artefatos em imagens de AFM.

Detectar este tipo de interferência é bastante simples; o usuário deve isolar o AFM a partir das fontes de ruído ou removê-los, e olhar para uma mudança nos sinais registrados. A solução para que as imagens de AFM não apresentem esses erros é, em alguns casos, o isolamento da fonte de ruído. A figura 2.18 mostra a comparação entre uma imagem obtida com a presença de ruído acústico e sem a presença dele.

Figura 2.18: Efeito de ruído acústico em uma imagem. Direita: imagem e linha de perfis medidos enquanto o ruído acústico estava presente na sala; Esquerda: Imagem que foi medido sem a presença de ruído acústico.



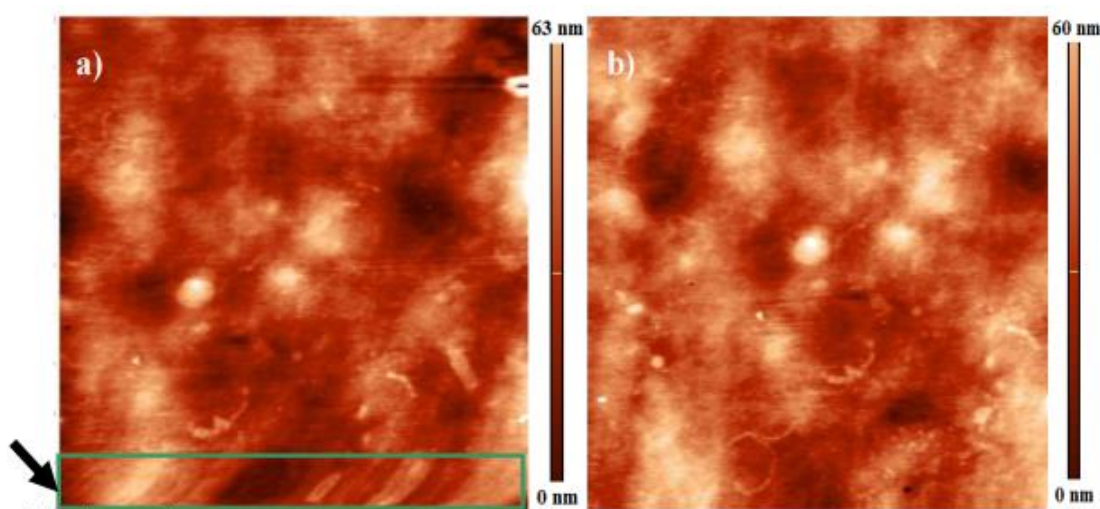
Fonte: Retirado da ref.²⁶

2.8.3 Artefatos com origem no scanner

Artefatos com origem no scanner faz parte de uma das principais fontes de artefatos em imagens medidas com microscópios de força atômica. Scanners que movem a sonda em um microscópio de força atômica são feitas, basicamente, a partir de cerâmica piezolétrica. Como transdutores eletromecânicos, cerâmicas piezolétricas são capazes de mover uma sonda a distâncias muito pequenas. No entanto, quando uma tensão linear é aplicada à cerâmica piezolétrica, a cerâmica pode mover-se num movimento não linear. Além disso, as cerâmicas piezolétricas apresentam histerese efeitos causados por auto aquecimento. Artefatos também podem ser introduzidos em imagens por causa da geometria do scanner⁵⁰.

O movimento dos scanners deve também ser de cadeia linear, de modo que as distâncias medidas a partir das imagens apresentem o menor grau de erro. Sem correção, as características trarão algumas imperfeições, como dar a ideia de que são menores de um lado e maiores do outro lado da imagem. Isso acontece quando há mudança drástica na região de varredura e o scanner não consegue responder automaticamente acontecendo um atraso na resposta como na figura 2.19. Para contornar essa situação basta reiniciar a varredura e aguardar que o scanner normalize seu movimento.

Figura 2.19: Imagens de AFM. a) imagem distorcida no início da varredura. b) imagem subsequente sem distorção. No retângulo verde podemos ver a distorção delimitada.

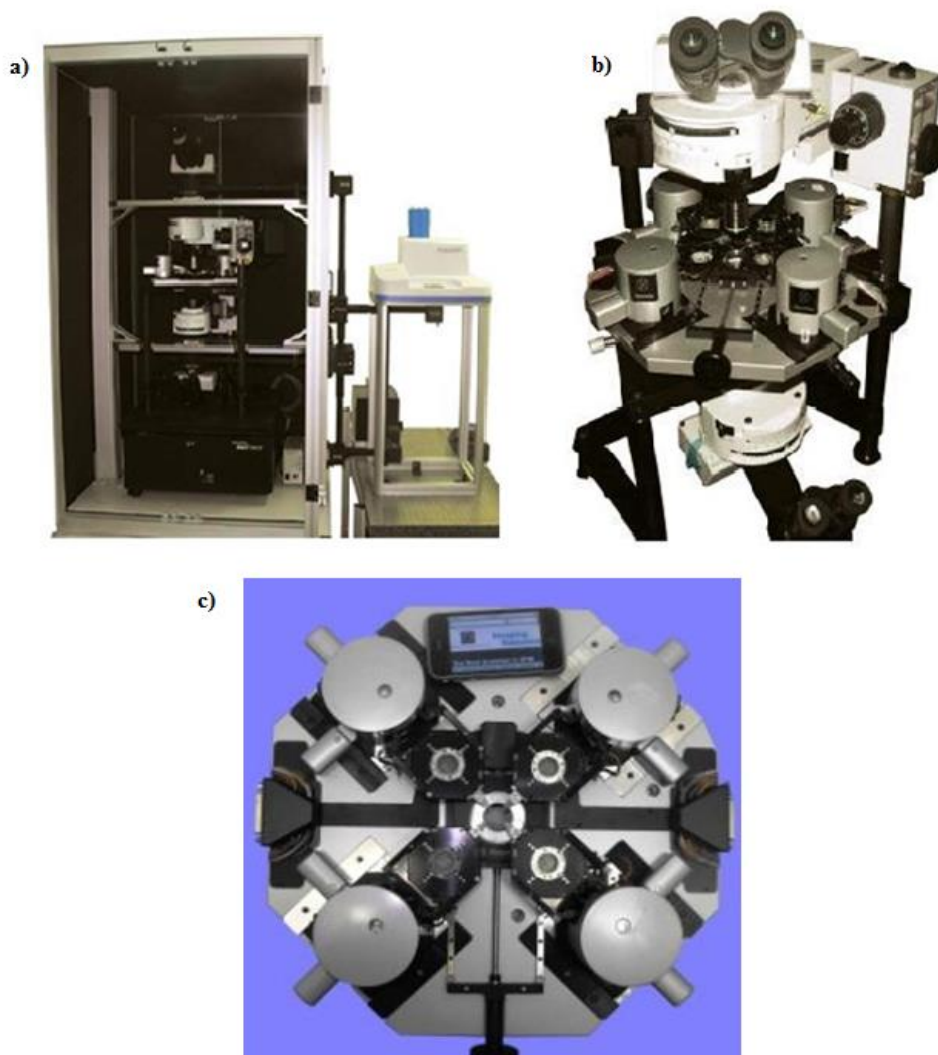


Fonte: Retirado da ref.³¹

2.9 Microscópio de Força Atômica do GON

O sistema de Microscopia de Varredura por Sonda disponível no laboratório no Instituto de Física-UFAL é um sistema customizado da Nanonics Multiview 4000 composto de dois microscópios confocais Olympus (sistema 4π), um direto e um invertido, montado sobre uma plataforma isolada, a qual é montada sobre uma mesa ótica classe interferométrica como na figura 2.20.

Figura 2.20: Sistema SPM do GON. (a) Visão externa do sistema SPM do GON. (b) Visão interna mostrando o microscópio invertido Olympus 4 π e o Nanonics Multiview 4000TM. (c) Nanonics Multiview 4000TM.



Fonte: www.nanonics.co.il (direitos autorais reservados à Nanonics Imaging Ltd.)

O Multiview 4000 da Nanonics utiliza o sistema de tuning-fork para obtenção das imagens que não necessita de alinhamento e por isso apresenta vantagens com relação ao sistema de laser. Na figura 2.20 temos uma imagem do sistema multi sondas do MV4000.

Com as diferentes configurações do sistema multi-sondas, o MV 4000 tornou possível muitas medições em um único aparato tais como: medições de resistividade de superfície, medições ópticas com várias sondas NSOM nos modos transmissão, reflexão e coleção, nanolitografia, nanoindentação entre outras.

3 RUGOSIDADE

Neste capítulo discutiremos a rugosidade e seus principais parâmetros utilizados para entender a superfície de uma amostra. Definiremos o que é rugosidade, as propriedades geométricas da superfície e abordaremos os principais modelos matemáticos usados para quantificar os parâmetros de rugosidade usados em nosso trabalho. Também discorreremos sobre um parâmetro complementar utilizado, o da dimensão fractal. Estes parâmetros serão usados a fim de avaliar e comparar as mudanças na morfologia das células trabalhadas.

3.1 Introdução

A rugosidade existe em todas as superfícies. Mesmo superfícies que aparentam ser lisas (bem polidas), apresentam irregularidades na sua estrutura morfológica quando analisadas microscopicamente.

A rugosidade é o conjunto de irregularidades do material, e está ligada a aspereza da superfície, isto é, são as pequenas saliências e reentrâncias que caracterizam uma superfície⁵¹.

Inicialmente a percepção de irregularidades se dá pela utilização do tato e da visão, esses erros são os chamados de erros macro geométricos que apresentam defeitos na forma e na posição do objeto (distorções drásticas, cortes profundos) e podem ser percebidos até com os sentidos ou medidos por objetos de usos convencionais como paquímetros.

Porém erros micro geométricos, também chamados de rugosidade são imperceptíveis ao olho humano e precisam de aparelhos especiais para serem detectadas, como através de microscópios. Porém, os microscópios apresentavam limitações: apesar de possibilitarem a medida da largura e espaçamento entre as saliências e reentrâncias não fornecem informações sobre suas alturas e profundidades. Atualmente, com o progresso das técnicas de SPM, aparelhos como o AFM fornecem informações completas e precisas sobre o perfil de superfícies analisadas.

Defeitos podem ocorrer tanto em superfícies de materiais durante a sua fabricação como pelo seu uso rotineiro. A análise desses defeitos é muitas vezes essencial para fornecer as informações que podem melhorar a eficiência e durabilidade de certos materiais.

Sobretudo porque permite o estudo e a avaliação de características das superfícies tais como: o desgaste da superfície, a qualidade do escorregamento, a qualidade de aderência que a estrutura oferece às camadas protetoras, resistência à corrosão, a aparência delas, entre outras⁵².

Estas irregularidades da superfície dos materiais podem estar ligadas a alguns fatores que alteram a superfície do material tais como⁵³:

- Partículas de sujeira
- Rugosidades topográficas (falhas nas estruturas que surgem na confecção ou preparação da superfície)
- Rugosidade composicional (oriundas de reações físico-químicas que podem ocorrer entre átomos e moléculas e acontecem na superfície do filme).

Na figura 3.1 podemos observar alguns tipos de características de rugosidade de superfície.

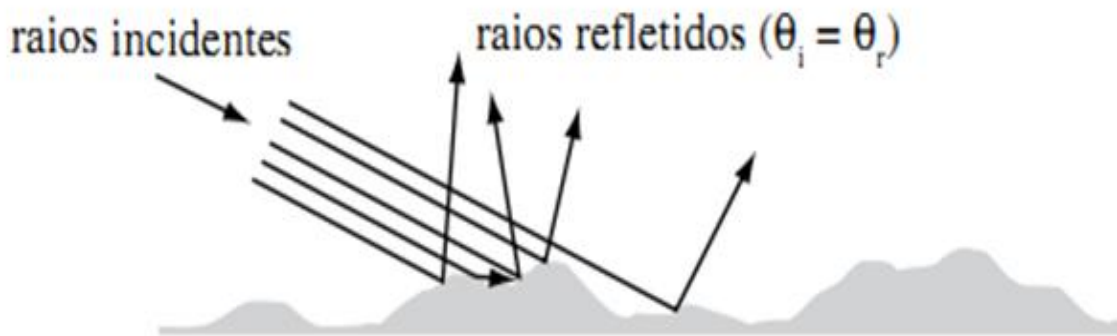
Figura 3.1: Representação de alguns fatores que podem contribuir para a rugosidade da superfície.



Fonte: Retirado da ref.⁵³

Além do mais a rugosidade afeta diretamente o estudo de algumas propriedades das superfícies tais como as propriedades óticas, a durabilidade química, a resistência ao desgaste, a facilidade de limpeza, a retenção de sujeira e a resistência ao escorregamento⁵⁴. Na figura 3.2 temos um exemplo de como a rugosidade pode atuar no espalhamento da luz refletida na superfície.

Figura 3.2: Representação da luz sendo espalhada na superfície ao incidir numa superfície rugosa.



Fonte: Retirado da ref.⁵⁴

Por isso determinar a rugosidade de uma superfície é um recurso extremamente importante, pois traz melhorias no desenvolvimento de materiais usados na mecânica, na metalurgia, na geologia, na mineração e na biologia dentre outras áreas.

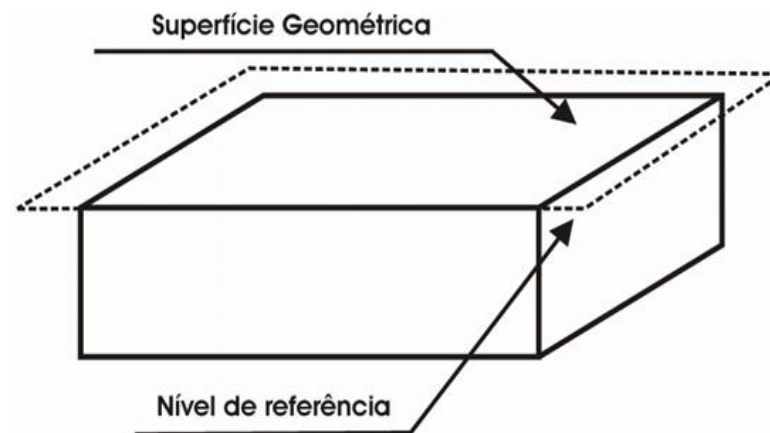
3.2 Propriedades Geométricas da Rugosidade

Para compreender a caracterização da rugosidade de uma determinada superfície é necessário entender alguns conceitos básicos das superfícies, que são definidos pela Norma Brasileira Regulamentadora 6405 (1988) e aprovados pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) que define os termos para especificação da rugosidade em nosso país.

Superfície geométrica

Uma superfície geométrica corresponde a uma superfície ideal, onde por definição não existem erros rugosidades. É uma superfície que não existe, mas suas dimensões são importantes porque surgem como referência. Podemos observar isso na figura 3.3.

Figura 3.3: Modelo de uma superfície geométrica e os níveis de referência.

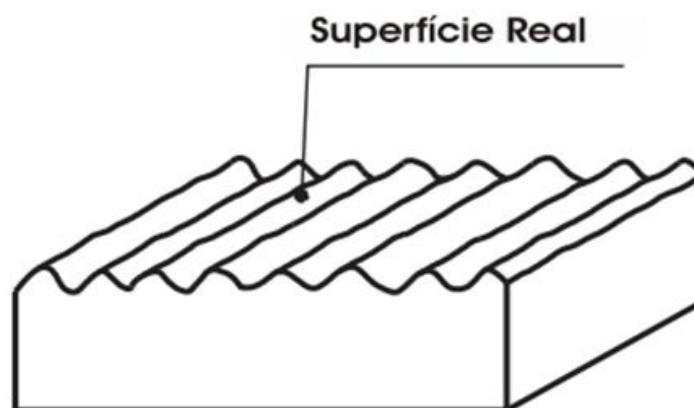


Fonte: Retirado da ref.⁵³

Superfície real

Os desvios da superfície que limitam o corpo em relação à superfície geométrica caracterizada pelos picos e vales, é uma rugosidade idealizada, chamada de superfície real. Na figura 3.4 temos uma representação dessa superfície.

Figura 3.4: Modelo de uma superfície real.

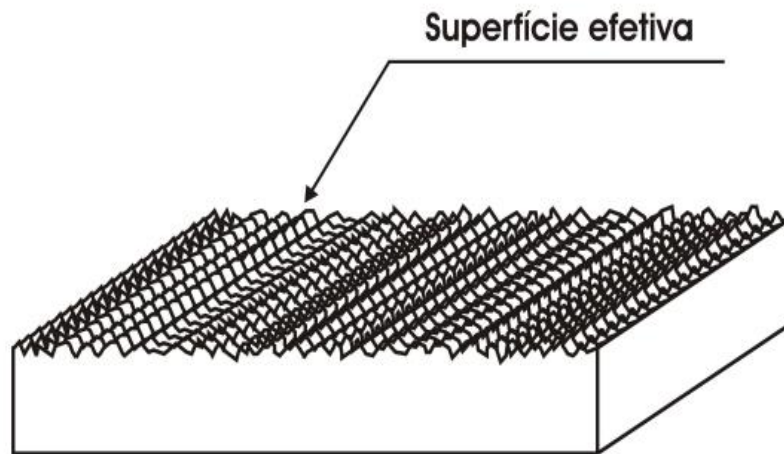


Fonte: Retirado da ref.⁵³

Superfície efetiva

A superfície efetiva é aquela medida por uma determinada técnica. Tem forma bem próxima da superfície real, quanto mais precisa for a medida da rugosidade mais a superfície efetiva será igual a real. Na figura 3.5 temos o desenho de uma superfície efetiva.

Figura 3.5: Modelo de uma superfície efetiva.

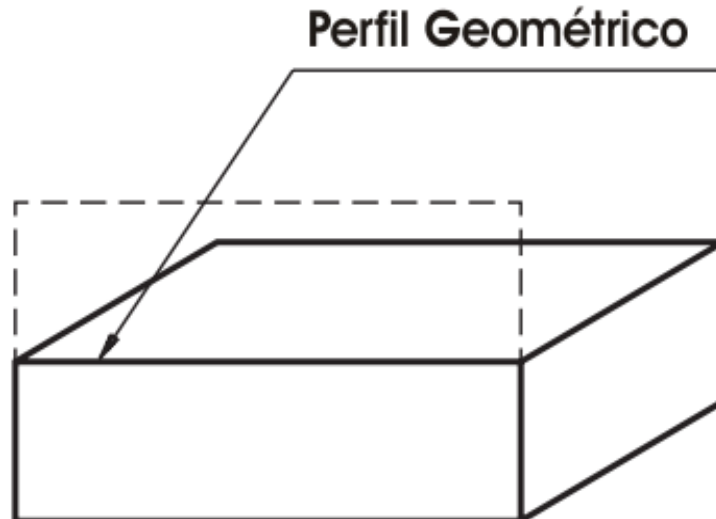


Fonte: Retirado da ref.⁵³

Perfil geométrico

O perfil geométrico corresponde à intersecção de um plano perpendicular com a superfície geométrica, por definição esse perfil é uma reta perfeita, como na figura 3.6.

Figura 3.6: Perfil geométrico de uma superfície.

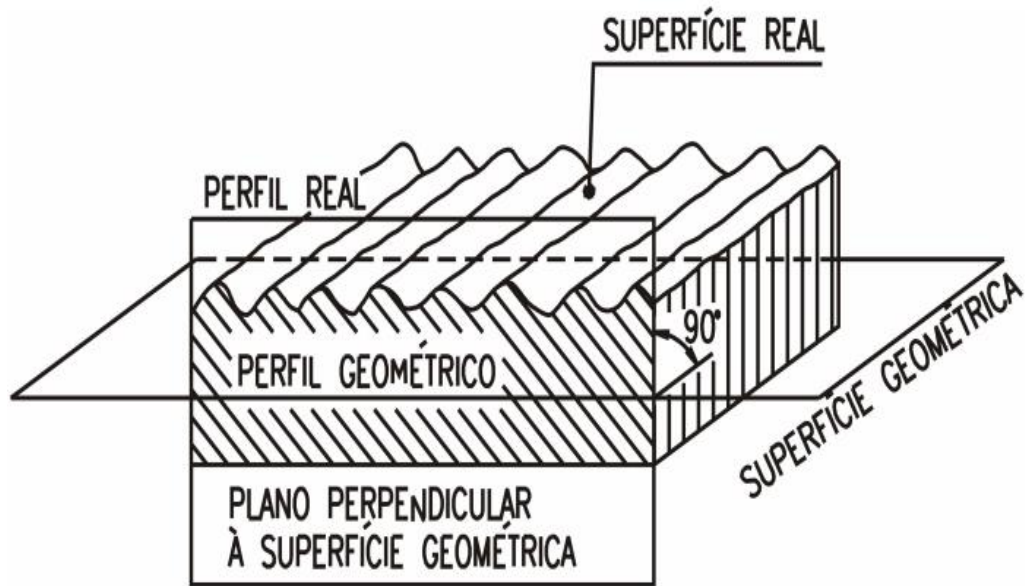


Fonte: Retirado da ref.⁵³

Perfil real

Corresponde ao perfil real a intersecção de um plano perpendicular com a superfície real, esse perfil nos mostrará uma linha irregular, como na figura 3.7.

Figura 3.7: Perfil real de uma superfície.

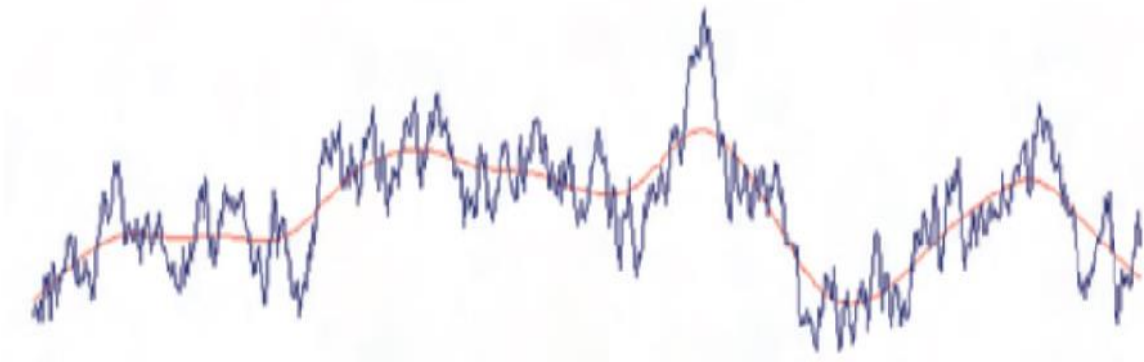


Fonte: Retirado da ref.⁵³

Perfil efetivo

O perfil efetivo é o perfil obtido após a medição do perfil real, nele estão presentes as ondulações da superfície e o perfil de rugosidade. Como mostra a figura 3.8, a linha em vermelho mostra a ondulação da superfície sobreposta a rugosidade

Figura 3.8: Perfil efetivo de uma superfície.

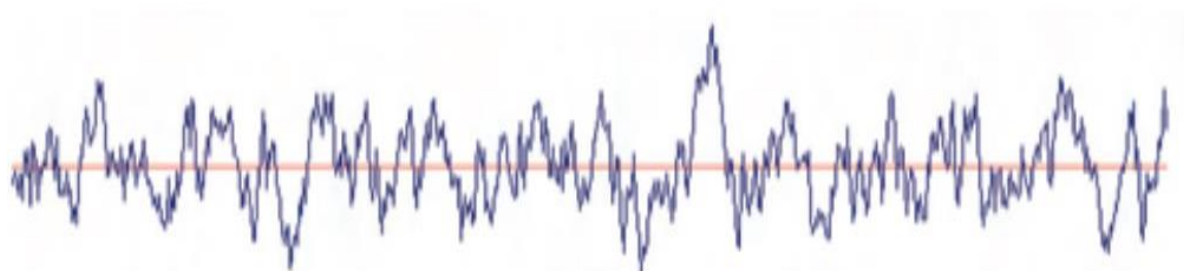


Fonte:www.mitutoyo.com (direitos autorais reservados à Mitutoyo America Corporation)

Perfil de rugosidade

O perfil de rugosidade é obtido a partir das medidas adquiridas no perfil efetivo e consegue mostrar os desvios da superfície a partir da linha média. Na figura 3.9 podemos observar um perfil de rugosidade.

Figura 3.9: Perfil de rugosidade de uma superfície.



Fonte:www.mitutoyo.com (direitos autorais reservados à Mitutoyo America Corporation)

3.3 Parâmetros de Rugosidade

A rugosidade pode ser caracterizada por vários parâmetros como, por exemplo, os de amplitude, espaçamento e híbridos⁵⁵. Em nosso trabalho para calcular a rugosidade usamos apenas os parâmetros de amplitude que para o nosso estudo é o mais significativo.

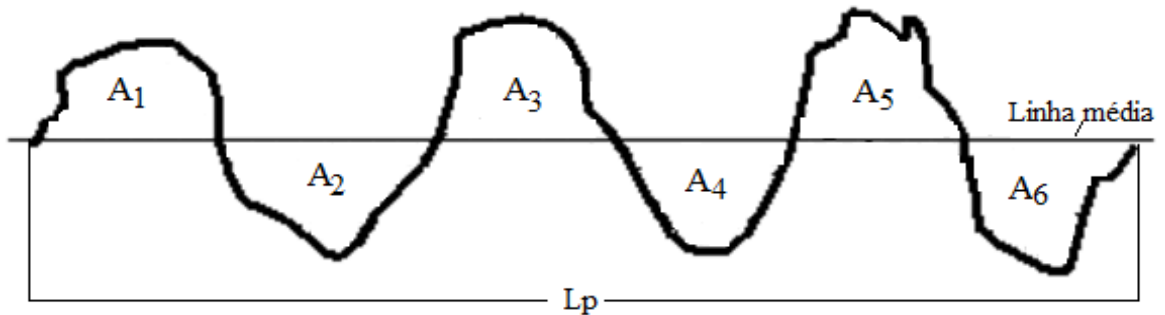
3.3.1 Parâmetros de amplitude ou altura

Os parâmetros de amplitude são indicadores das diferentes profundezas dos vales ou tamanho dos picos do perfil de rugosidade superficial, ou seja, as variações das reentrâncias e saliências com que estamos trabalhando.

Existem muitos parâmetros de altura ou amplitude que podem quantificar a rugosidade, a obtenção destes valores para a rugosidade depende da resolução da imagem obtida⁵³.

Para compreender esses parâmetros é necessário entender o sistema de linha média, em que esse parâmetro se baseia. Na figura 3.10 temos um perfil de uma superfície rugosa com áreas acima e abaixo da linha média.

Figura 3.10: Perfil de rugosidade com áreas ($A_1, A_2, A_3, A_4, A_5, A_6$) separados pela linha média.



Fonte: Elaborada pelo autor.

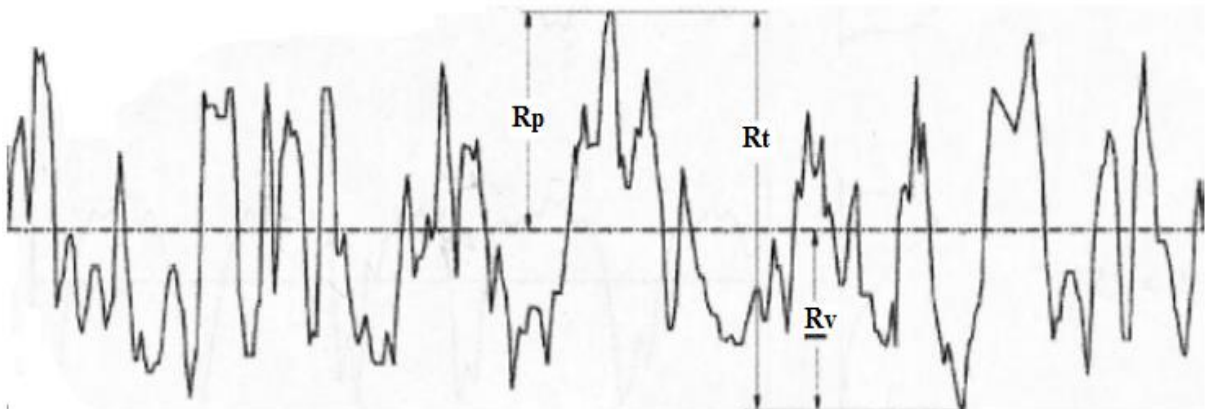
A linha média é uma linha compreendida paralelamente ao comprimento do perfil (L_p), que serve de referência e divide o perfil da rugosidade, de modo que a soma das áreas inferiores (A_2, A_4 e A_6) seja igual à soma das áreas superiores (A_1, A_3 e A_5).

Principais Parâmetros de Amplitude

- **R_t – Amplitude Total do Sistema**, corresponde ao somatório do mais alto pico com o mais profundo vale, dentro do comprimento que está sendo avaliado.
- **R_p – Amplitude máxima de pico** corresponde ao maior valor da altura de um pico com relação à linha média.
- **R_v – Amplitude máxima de vale** corresponde ao maior valor da profundidade de um vale com relação à linha média.

Na figura 3.11 podemos observar a representação da definição destes três parâmetros de amplitude⁵⁶.

Figura 3.11: Parâmetros de amplitude: R_t, R_p, R_v .



Fonte: Retirado da ref.⁵⁶

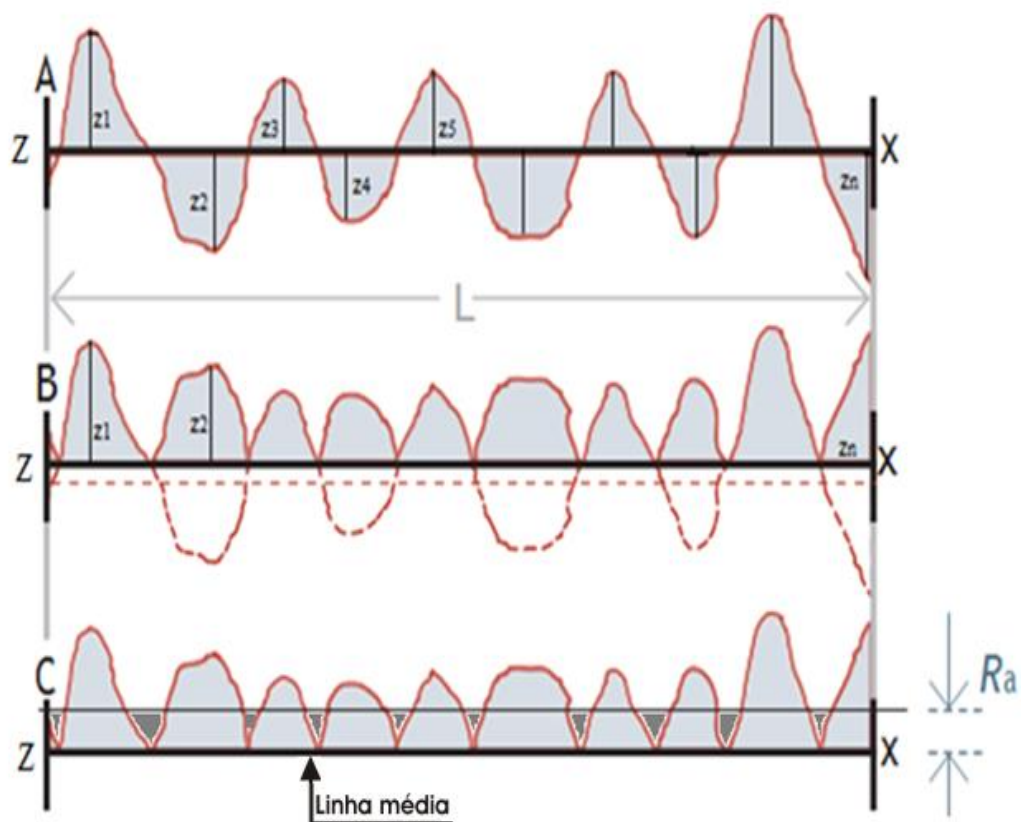
- **Rz – Amplitude máxima de perfil por comprimento** corresponde à média de altura entre os cinco picos mais altos e aos cinco vales mais profundos.

A seguir sobre os parâmetros de Rugosidade Média e Rugosidade Média Quadrática que quantificaram a rugosidade das superfícies da célula foram utilizados como parâmetros em nosso trabalho.

3.3.2 Rugosidade média

A rugosidade média (R_a - Roughness Average) é definida como a média aritmética dos desvios dos N valores absolutos de picos e vales do perfil a partir da linha média, dentro do comprimento do perfil medido. Uma aproximação da rugosidade média é obtida pela soma dos valores das alturas Z , dividido pelo número de alturas tomadas⁵⁷. Na figura 3.12 ilustramos a medição da rugosidade média de uma superfície.

Figura 3.12: Princípio de medição para obtenção da R_a nas etapas A, B e C. A, temos as alturas dos picos e vales traçadas ($z_1, z_2 \dots z_n$, obtidos a partir da linha média). B, transposição dos vales para o eixo. C, obtenção do parâmetro rugosidade média absoluto.



Fonte: Retirado da ref.⁵⁸

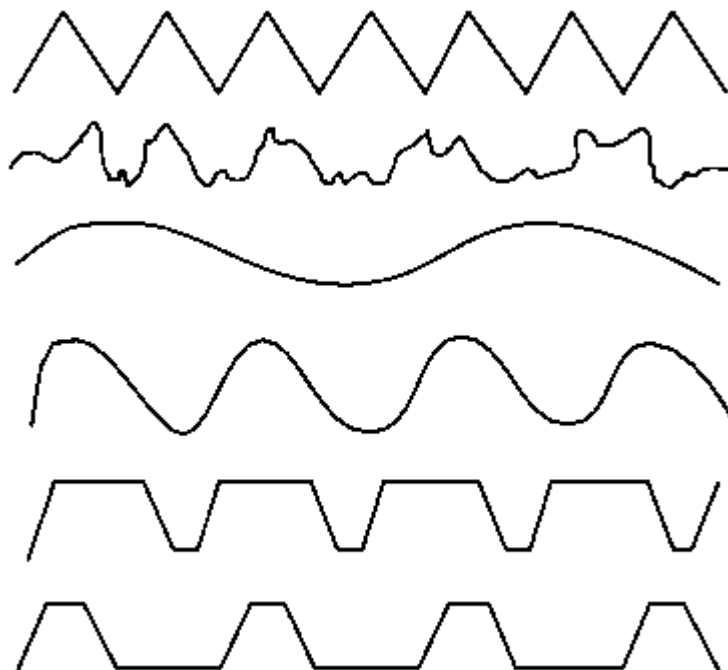
O parâmetro Ra pode corresponder graficamente à área de um retângulo. E pode ser descrito pela equação 3.1:

$$Ra = \frac{1}{L} \int_{x=0}^{x=L} |z(x)| dx \quad (3.1)$$

A rugosidade média, Ra, é uma integral do valor absoluto do perfil de rugosidade. Ela é a área delimitada pelo perfil de rugosidade e pela linha média, dividido pelo comprimento de avaliação (L), z (x) é a da altura para cada ponto da linha do perfil utilizado na medida.

A rugosidade média é um parâmetro bem definido que pode ser facilmente medido, e apresenta uma boa variação das alturas na superfície do material e é o parâmetro mais utilizado para inspeções técnicas nas fabricações de materiais. Porém valores muito distantes da média podem ser ocultados e com isso os defeitos podem ser escondidos. As formas locais das irregularidades dos materiais não são definidas e perfis distintos podem apresentar o mesmo valor de Ra⁵⁷. Na figura 3.13 temos diferentes perfis de rugosidade que apresentam o mesmo valor de rugosidade média.

Figura 3.13: Diferentes perfis de superfície com mesmo valor Ra.

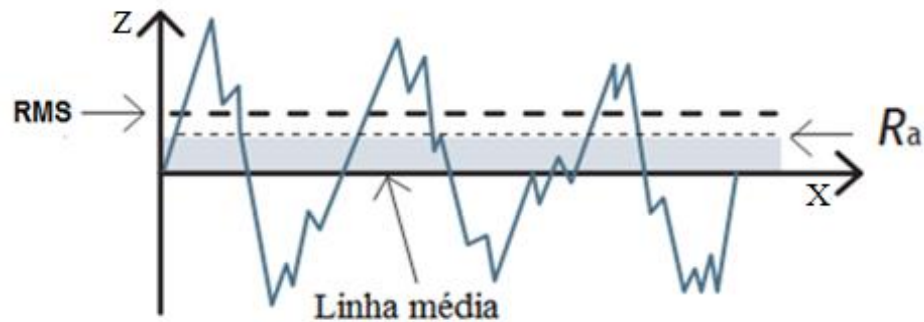


Fonte: Retirado da ref.⁵⁹

3.3.3 Rugosidade média quadrática

RMS (do inglês, Root Mean Square) representa o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície. Este parâmetro é mais sensível que o da altura média (R_a) para grandes desvios da linha média⁵⁵. Na figura 3.14 temos um gráfico do comprimento do perfil por sua altura z , identificando a RMS do perfil.

Figura 3.14: Parâmetro RMS de um perfil de rugosidade.



Fonte: Retirado da ref.⁵⁸

A definição matemática deste parâmetro é descrito pela abaixo^{55; 57}:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L |z^2(x)| dx} \quad (3.2)$$

RMS é uma medida mais sensível aos picos e vales que se afastam da média do que R_a , isso porque tem as medidas de altura elevadas ao quadrado o que aumenta o efeito das irregularidades melhorando a sua determinação, porém também não define as formas das irregularidades⁶⁰.

3.4 Dimensão Fractal como Análise Complementar

A dimensão fractal representa um parâmetro importante no estudo das morfologias, sendo uma análise baseada na rugosidade da superfície trabalhada. Dois métodos importantes neste estudo são: o da variância e o da potência espectral, que no nosso trabalho foram utilizadas para avaliar as imagens produzidas por AFM.

3.4.1 Dimensão fractal

Benoit B. Mandelbrot⁶¹ foi quem introduziu o conceito de fractal, e em suas obras ele define o fractal como sendo algo que possua auto similaridade, isto é, cada parte dele é semelhante ao todo. Esta definição dos fractais tem sido aplicado nos mais variados campos de estudo, como na biologia, na neurociência, na acústica, na economia, na química, dentre outras. Na figura 3.15 temos alguns fractais na natureza.

Figura 3.15: Propriedades fractais na natureza em diferentes vegetações.



Fonte: Retirado da ref.⁶²

No entanto a auto similaridade não é a única característica necessária para se definir um fractal. Mais duas características são necessárias para se definir formalmente um fractal, estas são a auto complexidade e a dimensão fractal. Tais características diferenciam a geometria fractal da geometria convencional.

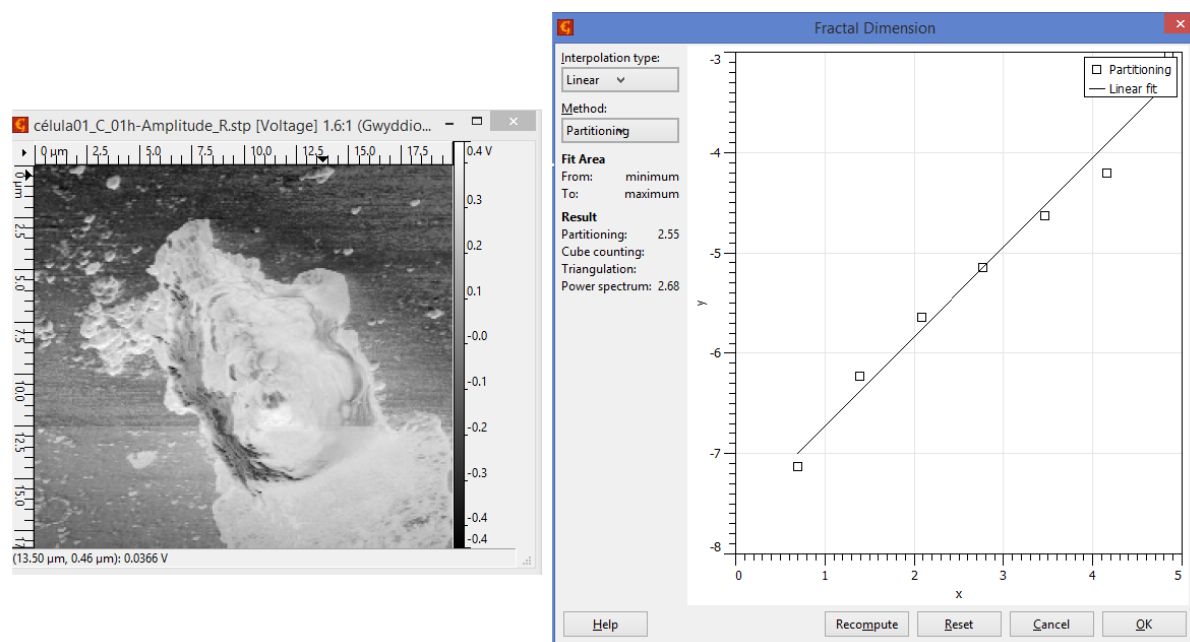
A auto complexidade, também chamada de estrutura fina, refere-se ao fato que uma pequena parte de um fractal tem os mesmos detalhes que o todo, isto é, não existe a perda de complexidade entre qualquer uma das partes e o todo. A dimensão fractal está associada a dimensões fracionárias, já a geometria euclidiana, a dimensões inteiras^{63; 64}.

Existem alguns métodos de se calcular a dimensão fractal de um dado objeto. Os métodos aqui empregados foram os métodos da variância e o da potência espectral, muito embora haja outras maneiras de se calcular a dimensão fractal, a saber, os métodos da contagem de cubos, dimensão de informação e dimensão de Higuchi, que também são modos bastante tradicionais de se medir a dimensão fractal.

3.4.2 Método da variância

O método da variância consiste em avaliar a dependência de escala da variância do movimento browniano fracional⁶⁴. Na figura 3.17 temos a análise da dimensão fractal pelo método da variância de uma célula macrófaga e o gráfico deste método.

Figura 3.17: célula de macrófaga e sua análise quantitativa e gráfica da dimensão fractal pelo método da variância.



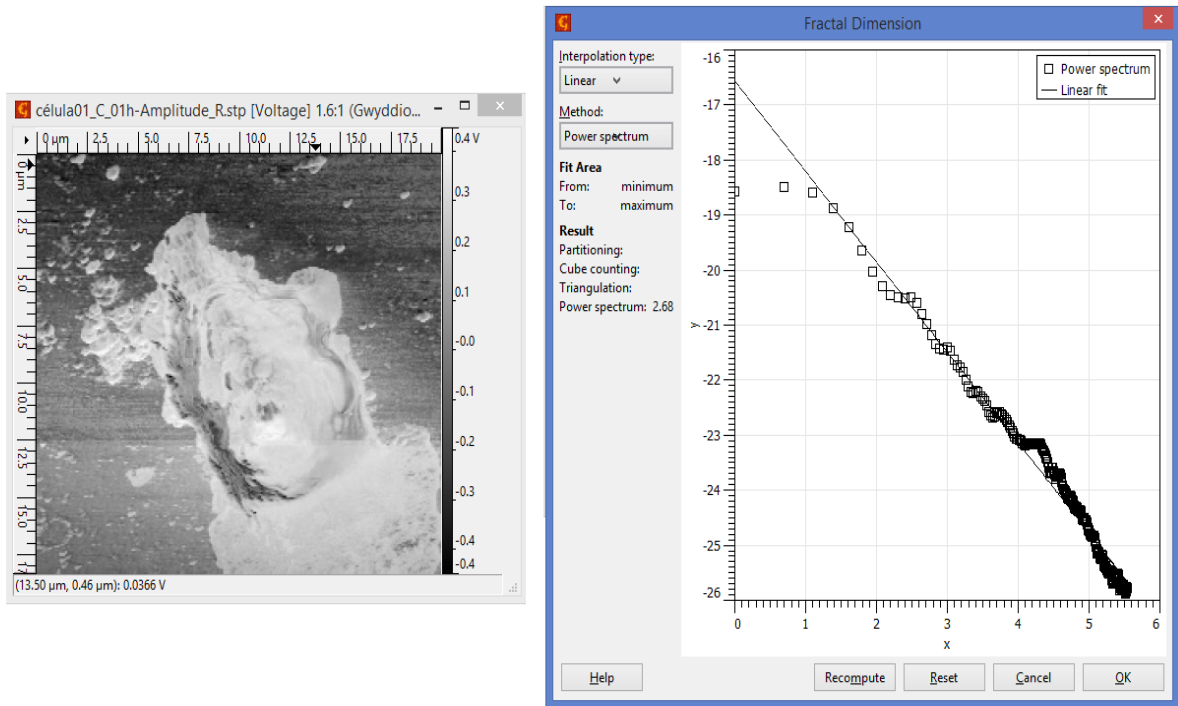
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tal mensuração é feita através da divisão da superfície em caixas quadradas de igual tamanho, e a variância é calculada para uma dada caixa em particular. A dimensão fractal é desta forma, calculada pela expressão $D = 3 - \beta/2$, sendo β a inclinação da linha de ajuste com os dados, quando plotados em um gráfico log-log.

3.4.3 Método da potência espectral

O método da potência espectral baseia-se na dependência da potência espectral do movimento browniano fracional. Neste método, a altura de cada linha que forma a imagem é submetida a uma transformada de Fourier e a potência espectral é então avaliada, em seguida a média destes valores é tomada. Na figura 3.18 temos a análise da dimensão fractal pelo método da potência espectral de uma célula macrófaga e o gráfico deste método.

Figura 3.18: célula de macrófago e sua análise quantitativa e gráfica da dimensão fractal pelo método da potência espectral.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como no método da variância, a dimensão fractal está relacionada à inclinação β , plotada em um gráfico log-log, da linha de ajuste dos dados. A expressão da dimensão fractal neste método é dada por $D = 7/2 - \beta/2$.

4 AFM NO ESTUDO DE CÉLULAS

Neste capítulo abordaremos o uso da microscopia de força atômica para o estudo de amostras biológicas. Apresentaremos os principais componentes da célula envolvidos em nosso estudo, em seguida mostraremos como a adesão celular, a uma matriz extracelular afeta a rugosidade e a dimensão fractal da membrana plasmática.

4.1 Microscopia de Força Atômica Aplicada à Biologia Celular

Nas últimas décadas o AFM¹³ tem emergido como uma ferramenta poderosa para obter detalhes nanoestruturais e propriedades biomecânicas de amostras biológicas^{29; 65}. O AFM é capaz de mapear e medir diversas alterações na membrana celular, como por exemplo, a morfologia, as propriedades mecânicas, a rigidez, a viscoelasticidade celular entre outras.

O AFM teve seu surgimento em 1986 e surgiu com a proposta inicial para a obtenção de imagens topográficas de superfícies, o que ainda é muito utilizado, até os dias atuais, porque é capaz de descrever de forma quantitativa os detalhes morfológicos sem a necessidade de preparações preliminares, permitindo a observação em tempo real e com alta resolução de alterações morfológicas causadas por diversos estímulos^{66; 67; 68}.

A vantagem mais importante do AFM na biologia está na aplicabilidade em qualquer tipo de amostra, ele tem a capacidade de aquisição de imagens de alta resolução. Deste modo sob condições fisiológicas ou não fisiológicas (por exemplo, secas ou fixadas quimicamente), o AFM consegue proporcionar bons trabalhos sem prejudicar as amostras envolvidas⁶⁹.

Para termos uma ideia, células cancerígenas, por exemplo, diferem de células normais em seu crescimento, na morfologia, na organização do citoesqueleto e nas interações com a matriz extracelular^{70; 71} e a microscopia de força atômica é uma ferramenta muito útil para detectar e compreender essas diferenças.

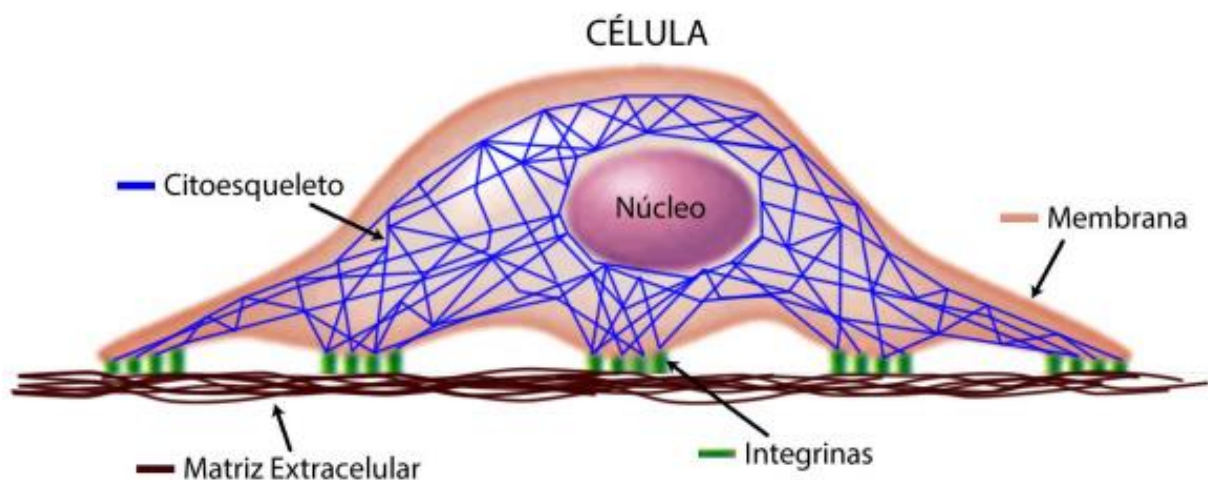
Com isso desde os primeiros trabalhos em 1992 com Tao⁷² estudando a microelasticidade de amostras biológicas macias e Hoh e Schoenenberger⁷³ medindo as propriedades mecânicas de células vivas, a utilização do AFM como ferramenta no estudo das propriedades mecânicas e morfológicas de células teve um aumento significativo^{74; 75}.

4.2 Principais Componentes da Célula no Estudo de sua Morfologia

Uma única célula pode constituir um organismo e por isso a célula é a unidade estrutural mínima que define um ser vivo e é formada por uma enorme quantidade de diferentes moléculas e organelas e são capazes de exercer as funções básicas da vida. A expressão gênica, estrutural e organizacional, desses componentes determinam os diferentes tipos de células (desde organismos unicelulares a organizações complexas como tecidos e mamíferos multicelulares), suas funções, sua comunicação com o meio ambiente circundante, seu ciclo de vida⁷⁶.

Descreveremos, de maneira resumida, os principais componentes estruturais das células que são determinantes para o estudo da morfologia celular em nosso trabalho. A Figura 4.1 ilustra, basicamente, a estrutura celular com alguns dos componentes básicos envolvidos na mecânica celular.

Figura 4.1: Representação esquemática dos componentes estruturais básicos



Fonte: Retirado da ref.²⁹

As interações de células com a matriz extracelular e com seus vizinhos (tecidos, meio) têm uma grande influência sobre uma vasta variedade de processos biológicos, incluindo a adesão e migração celular⁷⁷ e a topografia das amostras pode ser um fator regulador biológico importante para poder caracteriza-las^{78; 79}.

4.2.1 Membrana Celular

As células tem sua superfície recoberta pela membrana plasmática que separa o conteúdo de seu interior do ambiente exterior, atuando como microambiente delimitando os meios intracelular e extracelular.

A membrana plasmática permite a comunicação entre esses meios, traduzindo informações para o interior da célula e permitindo que ela responda a estímulos externos que podem influenciar nas suas funções biológicas, participando diretamente das interações célula/célula e célula/matriz extracelular. Molecularmente a membrana das células é formada por uma dupla camada fluída de fosfolipídios e colesterol⁸⁰.

A complexidade da membrana celular impõe algumas dificuldades para quantificar suas alterações e para isso utilizamos os parâmetros de rugosidade e dimensão fractal para acompanhar as mudanças produzidas na membrana em diferentes situações.

4.2.2 Núcleo

O núcleo da célula geralmente é localizado em seu centro apesar de que em algumas células ele apresenta formatos bem distintos. O núcleo é a maior organela da célula e contém quase todo o material genético (DNA) da célula. O núcleo é delimitado por duas membranas lipídicas perfuradas por poros nucleares (que mantém a comunicação entre o núcleo e o citoplasma) e concentra nessa delimitação os seus principais componentes como a cromatina o nucléolo e o nucleoplasma⁸¹. Estudos mostram que os componentes da estrutura celular estão diretamente ligados ao citoesqueleto e indiretamente ligado à membrana celular através das integrinas⁸². Deste modo fatores que modificam o citoesqueleto podem significar possíveis alterações na estrutura e em modificações na morfologia da célula.

4.2.3 Citoesqueleto

É uma rede emaranhada tridimensional de filamentos de proteínas que se estende por todo o citoplasma é responsável pela movimentação e direcionamento das estruturas internas além de peça importantíssima na manutenção e organização da morfologia celular. Os seus principais componentes são os filamentos intermediários os microtúbulos e os filamentos de actina⁸¹.

Os filamentos de actina (F-actina) são formados pela actina-G polimerizada uma proteína globular monomérica. Ela tem o controle da maioria dos movimentos como, por

exemplo, na fagocitose das células e tem se mostrado como um fator importante na mecânica do citoesqueleto⁸³. Com isso alterações provocadas ao citoesqueleto podem significar alterações em sua rigidez celular e em sua morfologia.

4.2.4 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma densa malha e a sua composição envolve processos dinâmicos de degradação e produção de proteínas da matriz. É formada principalmente pelas fibras colágenas, as glicoproteínas e os proteoglicanos, tais como a fibronectina, o calágeno e a laminina²⁹. A MEC e suas proteínas estão envolvidas nas interações que ocorrem entre células, e célula substrato de adesão, na emissão e recepção de sinais moleculares que controlam a migração, a adesão e a diferenciação celular⁸⁴. As células se aderem via adesão focal a MEC, por meio de um conjunto de receptores de membrana (integrinas) e moléculas citoplasmáticas⁸⁵.

Alguns estudos mostram que a densidade de proteínas da MEC é um fator importante para explicar o movimento, a forma e a dureza das células em cultura, e também reforça os sítios da adesão Célula-MEC^{86; 87}. A MEC suporta parte das forças mecânicas no citoesqueleto e o equilíbrio de forças entre as células e a MEC regula a forma, a rigidez e estabilidade estrutural da célula, podendo desempenhar um papel importante na morfologia das células.

Integrinas

As integrinas são proteínas de adesão que mediam sinais por meio da membrana plasmática respondendo a fatores internos e externos, estabelecem assim uma forma de comunicação com o citoesqueleto⁸⁸. Quando os sinais são transmitidos para o interior da célula podem resultar em uma reorganização do citoesqueleto. E quando os sinais são originados do interior podem se mover pelas integrinas determinando a adesão celular e regulando a união da integrina ao ligante^{89; 90}.

4.3 Efeitos da Adesão Celular à Fibronectina

A adesão da célula a matriz extracelular (MEC), influenciam em muitos fatores celulares naturais, tais como: estruturação dos tecidos, cicatrização, migração celular e embriogênese entre outros. Neste sentido o citoesqueleto desempenha um papel crucial para adesão e para a morfologia da célula, os filamentos de actina de sua composição que

impulsionam seus movimentos podem sofrer modificações causadas pela adesão celular a MEC ou por tratamentos a que seja submetida, pensando nisso estudamos a influência da MEC nas características das superfícies de macrófagos através do AFM.

Os macrófagos são células imunológicas com alto fator fagocitário e tem formação envolvida com a resposta a células mortas e infecções. Apresentam-se como os elementos de defesa imediata contra objetos desconhecidos ao organismo. Os macrófagos derivam indiretamente de células da medula óssea (depois entram na circulação sanguínea como monócitos) e a sua principal função é: alertar o sistema imunológico, apresentando antígenos a organismos nocivos e fagocitando agentes infecciosos⁹⁰. A ativação dos sinais dos macrófagos pode ser verificada por meio da adesão e espalhamento sobre a MEC⁹¹.

As fibras da matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno entre outras) são reconhecidas pelas integrinas presentes nos macrófagos que estão ligadas ao citoesqueleto⁹². A fibronectina é uma glicoproteína mediadora de diversas interações celulares com a MEC e tem papel importante no desenvolvimento dos vertebrados⁹³.

A fibronectina se adere à membrana através das integrinas que ligam a MEC com o citoesqueleto intracelular, essa adesão é importante na regulação do crescimento celular, diferenciação e migração celular⁹⁴. Essa interação permite que as integrinas estabeleçam contato com os filamentos de actina e esse contato permite a ativação de sinais que regulam a reorganização do citoesqueleto⁹⁵. E essa reorganização tem uma influência importante nas alterações morfológicas das células.

Em nosso trabalho utilizamos a técnica de AFM para investigar as influências de um filme de fibronectina na morfologia a fim de quantificar as mudanças impostas à superfície das amostras, através dos parâmetros de rugosidade média, rugosidade média quadrática e ainda por um parâmetro alternativo, o da dimensão fractal.

4.4 Preparação do Substrato e Cultura das Células

Para a preparação dos substratos utilizados neste trabalho, lamínulas de vidro (16 mm 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 (5 μ g/mL) foi depositada 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.

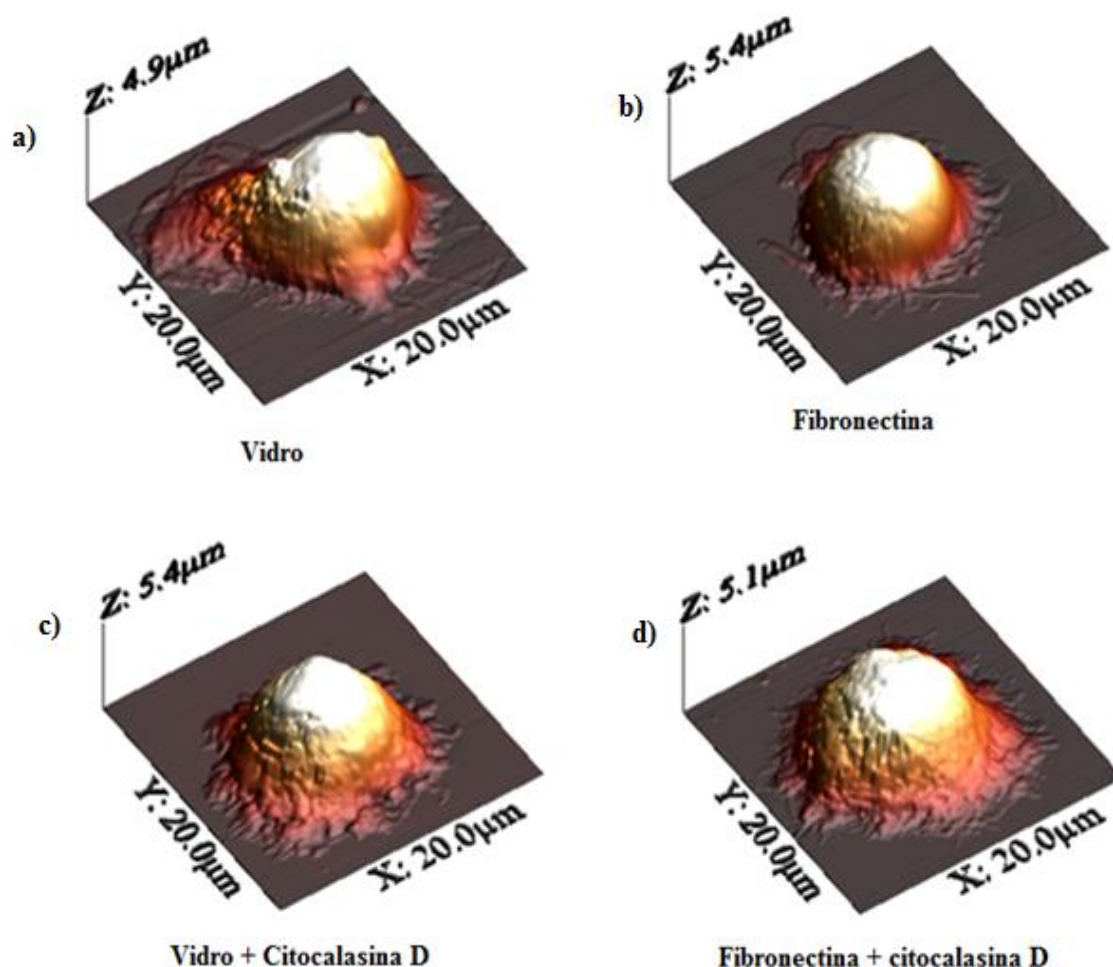
Macrófagos murinos de linhagem J774 foram cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo soro fetal bovino (FCS) (10%), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100g/ml). Os macrófagos foram cultivados numa incubadora a 37°C numa atmosfera umidificada de CO₂ (5%). As células foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células/mL em lamínulas de vidro esterilizadas inseridas em placas de cultura de 6 poços e incubadas durante 1 hora, 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 morfológicas das células, 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.

4.5 Topografia das Amostras

Utilizando do sistema Nanonics Multiview 4000 nos aproveitamos de uma de suas técnicas, a de AFM, que nos permitiu a obtenção de imagens das superfícies das células tratadas. As imagens obtidas mostraram a forma que as células adquiriram pós-adesão, tipicamente arredondada, peculiar dos macrófagos. A figura 4.3 mostra imagens do parâmetro de altura do AFM de células em cultura por 1 hora sob diferentes tratamentos.

Figura 4.3: Imagens de AFM de macrófagos (células diferentes) em cultura por 1 sobre, a) vidro, b) fibronectina, c) Citocalasina D e d) Fibronectina + citocalasina D.



Fonte: Elaborada pelo autor.

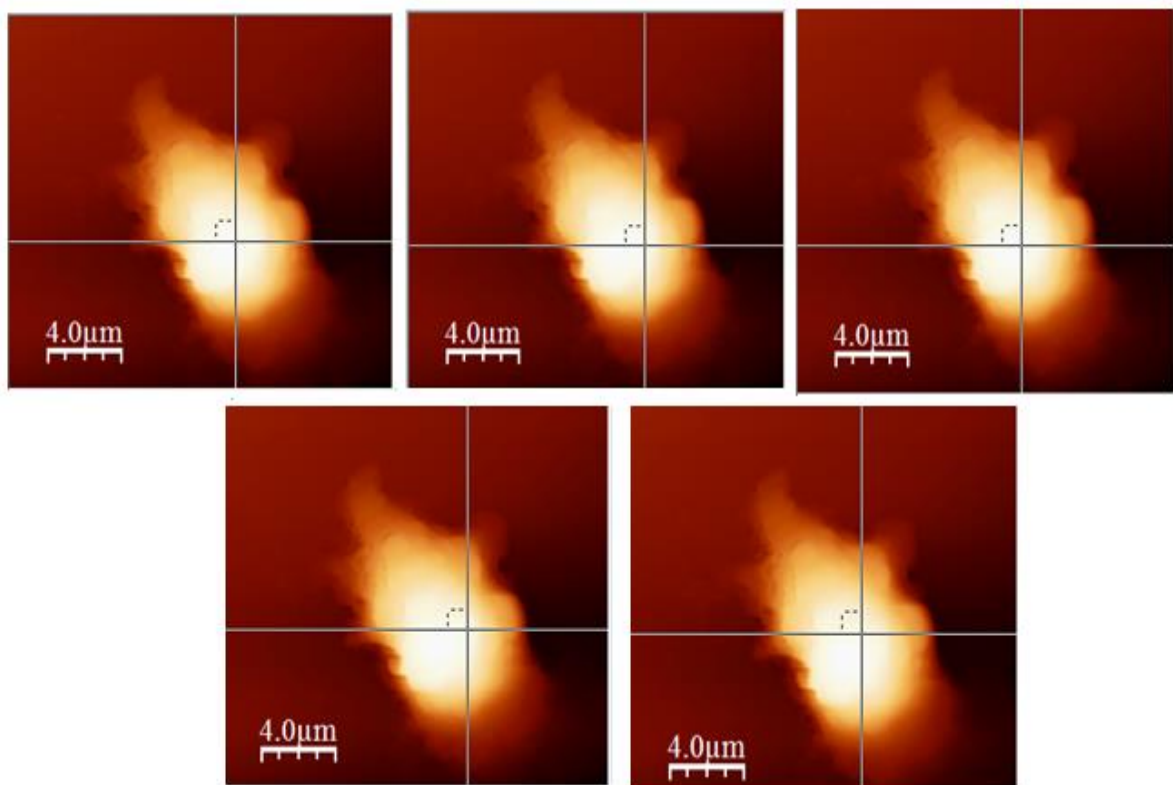
Para estimar os valores de Ra e RMS das células em questão, utilizamos a análise estatística do software WSxM⁹⁶.

Para perceber as alterações causadas na morfologia da membrana das células, calculamos os valores de Ra e RMS de quatro grupos dos macrófagos em diferentes situações, em cada grupo haviam cinco células.

Em um desses grupos as células estão aderidas apenas ao vidro e os resultados em seus valores de Ra e RMS servem como controle para o grupo de células aderidas a filmes de fibronectina e para o grupo de células aderidas no vidro e tratadas com citocalasina D. O quarto grupo corresponde as células aderidas a fibronectina e tratadas com citocalasina seus valores são comparados com os das células aderidas a fibronectina sem qualquer tratamento.

Para encontrarmos os valores de rugosidade da membrana, nas diferentes situações de cada grupo realizamos o seguinte procedimento: selecionamos em cada célula de cada grupo cinco regiões ao redor do núcleo da célula com dimensões de $1.1\mu\text{m}$ por $1.1\mu\text{m}$ para análise da rugosidade em cada região. A figura 4.4 exemplifica cinco regiões de uma célula usadas para o cálculo da Ra e da RMS.

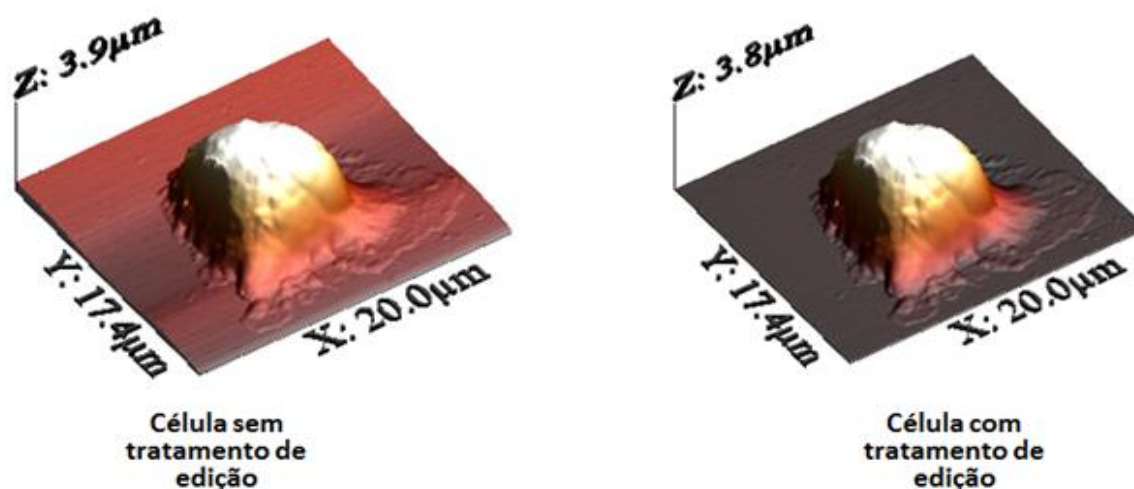
Figura 4.4: Cinco regiões diferentes da superfície da célula ao redor do núcleo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As imagens criadas pelo AFM podem apresentar algumas inclinações no substrato (mesmo que invisíveis a olho nu), isso ocorre durante o processo de preparação das amostras para as imagens de AFM, para corrigir essa inclinação do substrato utilizamos um tratamento de edição nas imagens, que foi feito com a opção “flatten” do programa WSxM.

Figura 4.5: célula sem tratamento de edição (esquerda) e com tratamento de edição (direita) do software WSxm.



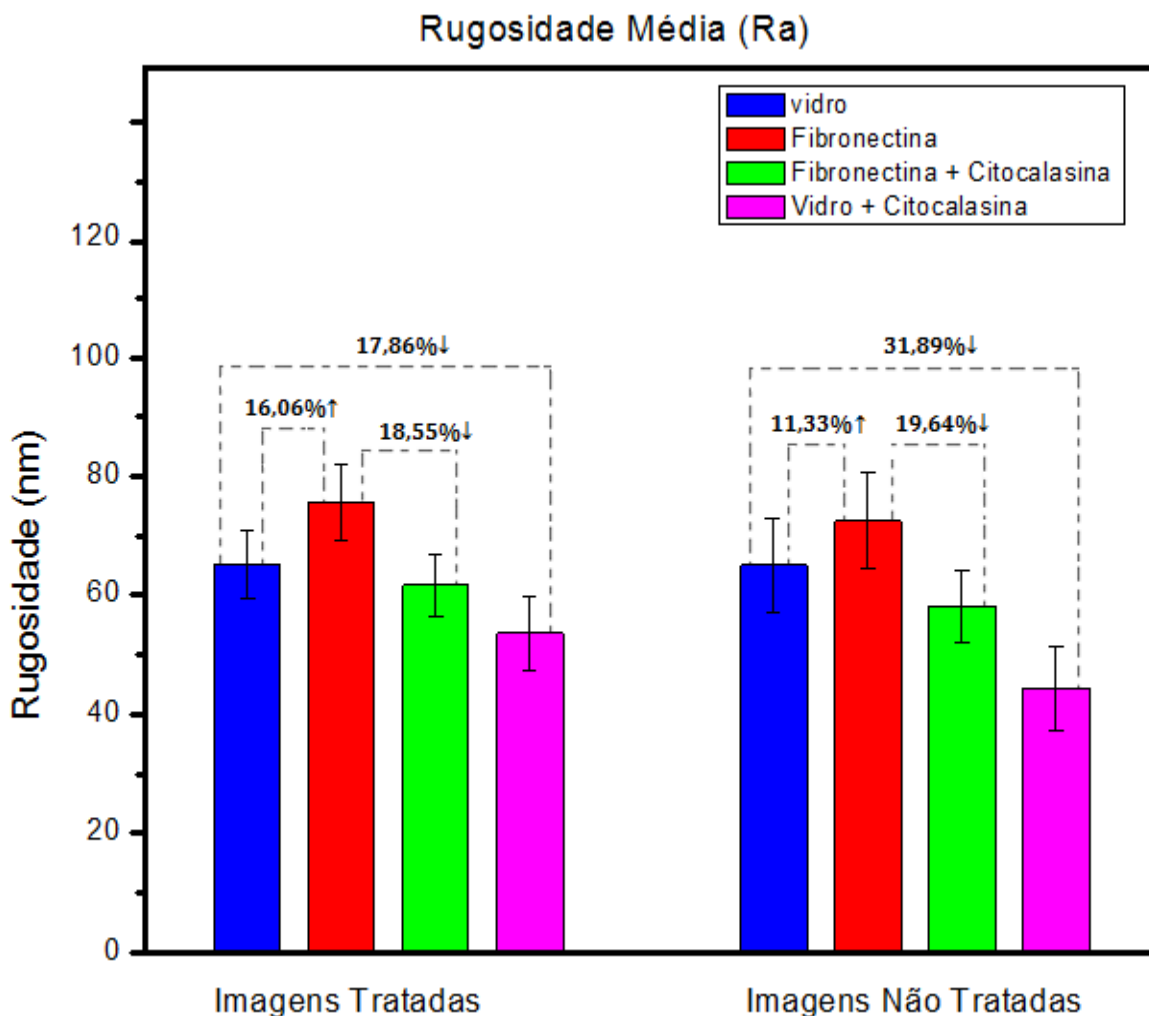
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com isso o programa WSxM permite o cálculo das rugosidades das regiões escolhidas. Desta forma obtivemos 25 valores tanto para Ra quanto para RMS, por grupo de células com e sem correção da inclinação do substrato. A partir destes valores foi calculada uma média das rugosidades por grupo, estimadas pelas distribuições de alturas das regiões escolhidas nas imagens de AFM.

4.5.1 Medidas de Ra e RMS

Com o WSxM utilizamos a opção análise de rugosidade, que nos permitiu um total de 100 regiões, diferentes das nossas células e assim fomos capazes de comparar as rugosidades obtidas por cada grupo de tratamento com relação ao grupo controle. Na figura 4.6 temos o gráfico dos resultados obtidos para a rugosidade média com e sem filtro para as células aderidas sobre os diferentes substratos.

Figura 4.6: Gráficos das rugosidades médias obtidas com tratamento e sem tratamento de edição no software WSxM. A barra de escala representa o desvio padrão. E os percentuais representam as variações com relação ao vidro (controle). Exceto o tratamento de fibronectina + citocalasina que tem seu percentual com relação ao tratamento com fibronectina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados neste capítulo são apresentados como média \pm desvio padrão (média \pm DP), e quando citados dados com ou sem filtro fazem referência a utilização ou não da edição do programa WSxM, que corrige as inclinações do substrato.

Para a rugosidade média percebemos que todos os valores Ra com tratamento de edição no software foram maiores que os valores sem edição até mesmo na amostra controle (vidro) em que o Ra do vidro com filtro vale $65,2 \pm 5,7$ nm e o Ra sem filtro vale $65,1 \pm 7,9$ nm.

Na figura 4.6 expomos os crescimentos e decaimentos percentuais das rugosidades médias com relação à situação controle das células aderidas ao vidro. O grupo de células aderidas a fibronectina obtiveram aumento em suas rugosidades médias com relação às

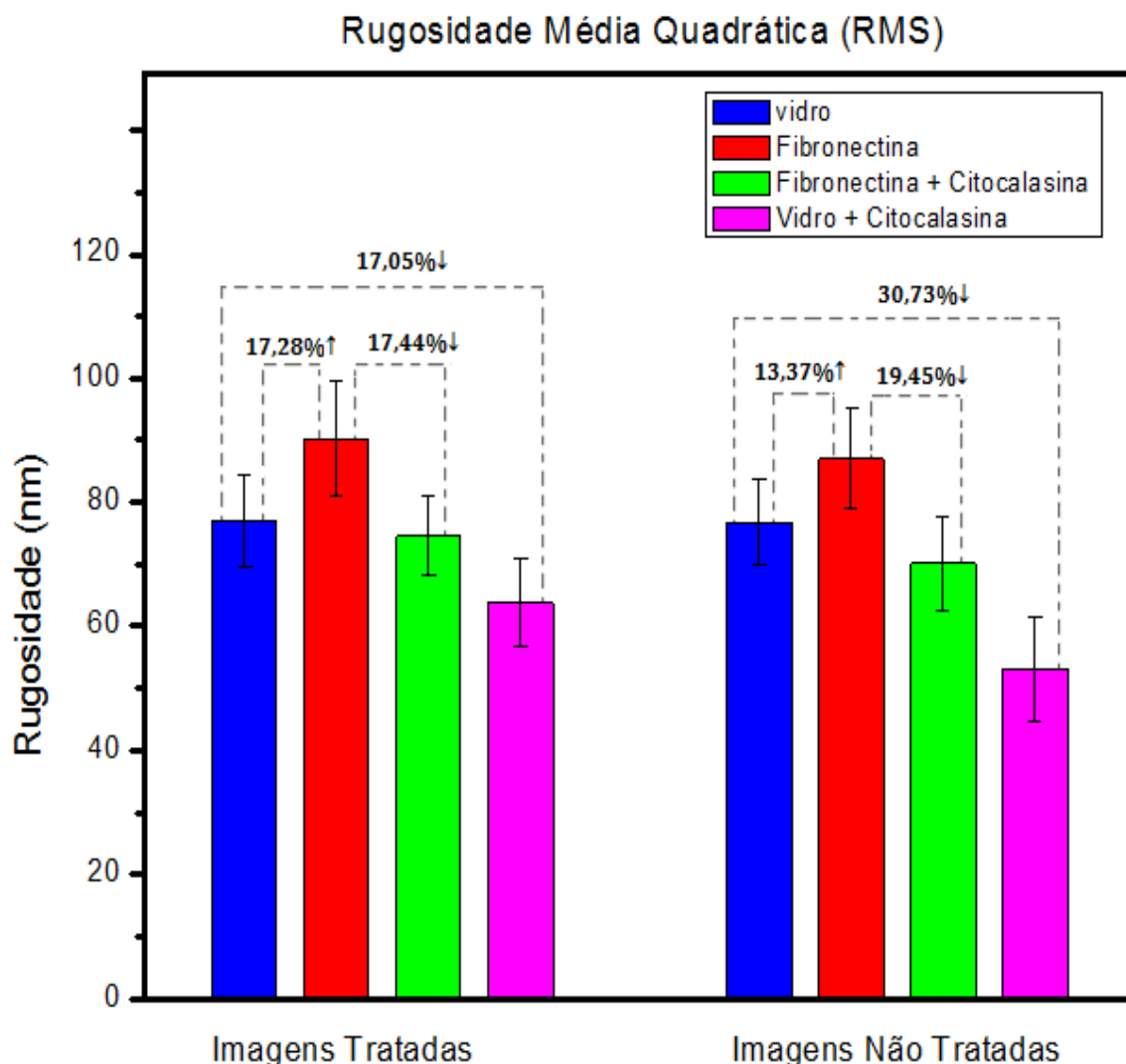
células aderidas ao vidro. A rugosidade média do grupo aderido a fibronectina sem edição aumentou 11,33% com relação ao grupo de células aderidas ao vidro e sem edição apresentando Ra de $72,5 \pm 8,0$ nm. Enquanto o grupo aderido a fibronectina com edição teve Ra de $75,7 \pm 6,4$ nm e aumentou 16,06% com relação ao grupo de células aderidas ao vidro e com edição. Ou seja, a fibronectina afetou a rugosidade da célula provocando um aumento da rugosidade média.

Quando as células foram aderidas ao vidro e tratados com citocalasina D os grupos apresentaram queda nas suas rugosidades médias com relação às células aderidas ao vidro. O grupo com filtro tratado com citocalasina D caiu 17,86% e teve Ra de $53,6 \pm 6,3$ nm e o grupo sem filtro com o mesmo tratamento caiu 31,89% e apresentou Ra de $44,3 \pm 7,0$ nm.

E para quantificarmos o envolvimento do citoesqueleto na mudança da morfologia na membrana da célula aderidas a fibronectina, as tratamos após adesão com citocalasina D para que houvesse degradação dos filamentos de actina das células. E assim obtivemos que as células tratadas com citocalasina após adesão a fibronectina tiveram quedas em suas rugosidades quando comparadas apenas com as células aderidas ao filme de fibronectina. Células com filtro aderidas a fibronectina e depois tratadas com citocalasina D tiveram queda de 18,55% e Ra de $61,7 \pm 5,2$ nm as sem filtro na mesma situação tiveram queda de 19,64% e valor de Ra igual a $58,2 \pm 6,0$ nm.

Para a rugosidade média quadrática realizamos o mesmo procedimento, cujos resultados obtidos podem ser analisados na figura 4.7, que mostra os valores de RMS com e sem filtro de edição e seus respectivos percentuais comparativos com relação à situação controle.

Figura 4.7: Gráficos das rugosidades médias quadráticas obtidas com tratamento e sem tratamento de edição no software WSxM. A barra de escala representa o desvio padrão. E os percentuais representam as variações com relação ao vidro (controle). Exceto o tratamento de fibronectina + citocalasina que tem seu percentual com relação ao tratamento com fibronectina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a rugosidade média quadrática percebemos que todos os valores RMS com filtro foram maiores que os valores sem filtro até mesmo na amostra controle (vidro) em que o RMS do vidro com filtro vale $76,9 \pm 7,5$ nm e o RMS sem filtro vale $76,7 \pm 6,9$ nm.

Como esperado também temos que todos os valores RMS são maiores que os valores R_a para cada grupo de células. As células aderidas a fibronectina aumentaram as suas rugosidades. A RMS da fibronectina com filtro aumentou 17,28% com valor de $90,2 \pm 9,2$ nm e

a RMS da fibronectina sem filtro teve valor de $87,0 \pm 8,0$ nm e aumentou 13,37% com relação aos seus respectivos controles com e tratamento aderidos ao vidro.

Também com relação ao vidro as amostras aderidas ao vidro tratadas com citocalasina D tiveram queda em suas RMS. A RMS das células apenas tratadas com citocalasina D com filtro foi de $63,8 \pm 7,2$ nm e caíram 17,05% com relação ao controle em vidro e o mesmo grupo sem filtro teve RMS de $53,1 \pm 8,5$ nm tendo queda de 30,73% com relação ao controle em vidro sem filtro.

As células aderidas a fibronectina e logo depois tratadas com citocalasina D também registraram quedas em seus percentuais de RMS. O grupo com filtro com este tratamento teve baixa de 17,44% e RMS de $74,5 \pm 6,5$ nm e o grupo sem filtro teve uma queda de 19,45% com RMS de $70,1 \pm 7,6$ nm com relação à situação controle que nesse caso é a situação de células aderidas a fibronectina.

4.5.2 Discussão dos resultados das medidas de rugosidade

Utilizamos o AFM para investigar os impactos da MEC nas propriedades morfológicas da membrana, pois as influências nas características do citoesqueleto podem significar um fator importante para o estudo topográfico das células. Através das medidas de rugosidade média e rugosidade média quadrática tentamos quantificar a influência dessa adesão a diferentes substratos.

Notamos que quando as células são aderidas a fibronectina há um aumento nos registros de suas Ra e RMS. E quando tratamos as células com citocalasina D às quantidades de Ra e RMS diminuíram, evidenciando a importância do citoesqueleto em nosso estudo, pois, quando a citocalasina age ela impede a polimerização de novos filamentos de actina, degradando o citoesqueleto⁹⁷, esse processo impede algumas funções da célula e altera a morfologia da membrana até mesmo causando a apoptose celular⁹⁸.

Podemos perceber que as interações entre célula e MEC mediada pelo citoesqueleto, podem de acordo com nossas medidas influenciar nas alterações na morfologia da membrana celular e também que com o tratamento das imagens com o filtro “flatten”, do programa WSxM, interfere nos valores de rugosidade, tendo em vista que todos os grupos que foram tratados apresentaram maiores valores para os valores Ra e RMS da rugosidade.

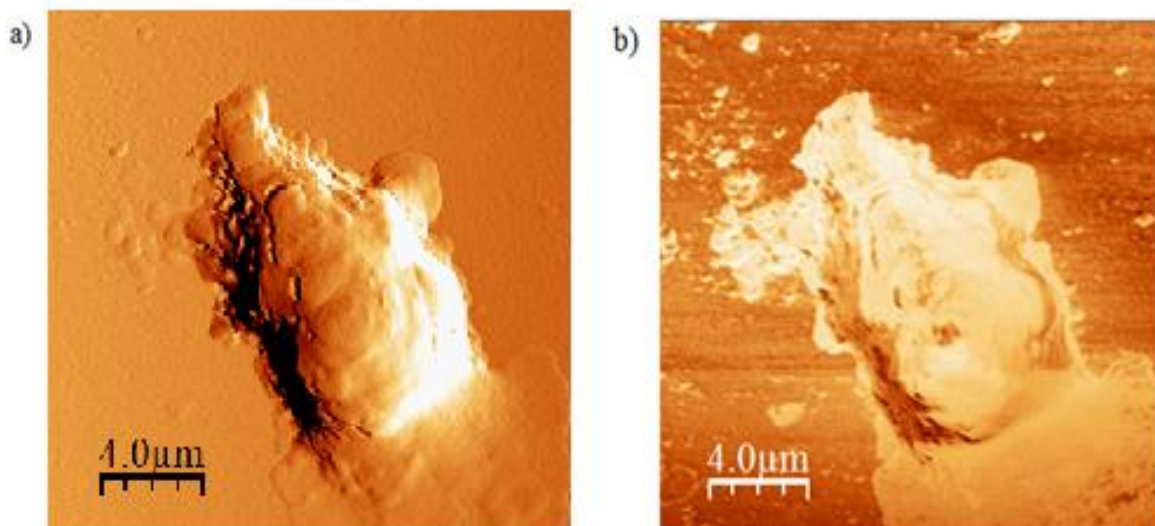
4.6 Medidas de Dimensão Fractal

As imagens de AFM também foram importantes para a análise do nosso parâmetro alternativo, a dimensão fractal. Para quantificar a dimensão fractal de nossas células, utilizamos os métodos da variância e da potência espectral.

Para isso utilizamos as imagens de erro e de amplitude do AFM. A imagem de erro representa a medida de erro de sinal que é enviado para o sistema de feedback, esse “erro” é a diferença entre o sinal da sonda e o sinal de força enviado pelo sistema. A imagem de amplitude representa as variações na amplitude de oscilação do cantilever no decorrer da varredura.

Esses tipos de imagens foram escolhidos porque contrastam mais os detalhes da superfície do material estudado e com isso podem fornecer melhores informações que caracterizem fractais. Na figura 4.7 temos duas imagens de AFM uma do tipo erro e outra de amplitude.

Figura 4.7: Imagens de AFM. a) imagem de erro e b) imagem de amplitude.

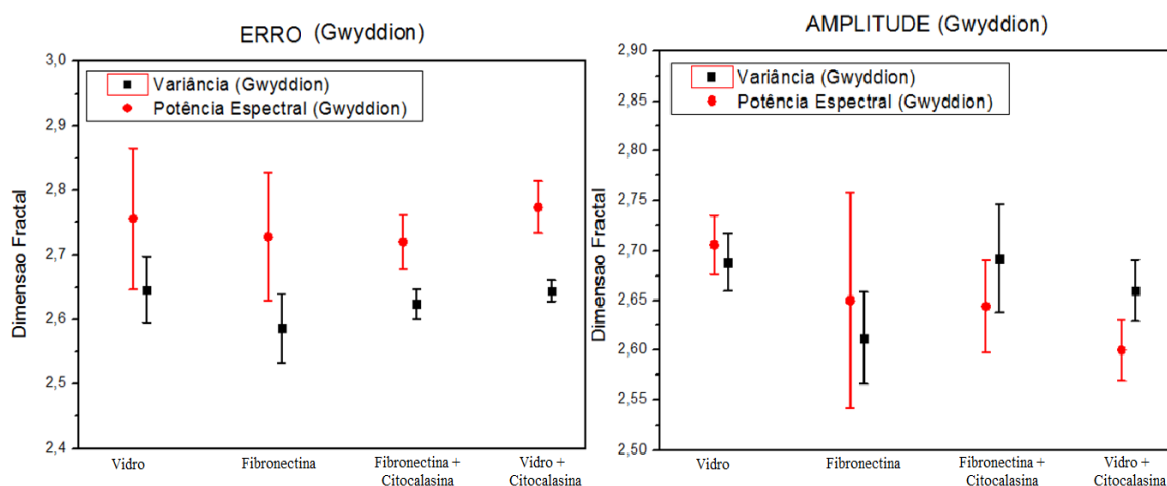


Fonte: Elaborada pelo autor.

Como já explicado cada grupo contém 5 células, obtivemos a dimensão fractal média por grupo de células (vidro, fibronectina, citocalasina com fibronectina e citocalasina). Calculamos os valores médios por grupo para as imagens de erro e de amplitude, as análises dos métodos de dimensão fractal foram realizadas pelo software Gwyddion que é um programa livre e de código aberto para visualização e análise de dados SPM⁹⁹. Através desse

programa analisamos 20 imagens tanto de erro quanto de amplitude pelos métodos da variância e da potência espectral, os resultados obtidos estão expressos na figura 4.8.

Figura 4.8: Resultados das medidas de dimensão fractal média por grupo. a) imagens de erro e b) imagem de amplitude.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 4.8 estão expostos os valores da dimensão fractal média por grupos de diferentes situações, calculados por dois métodos o da variância e o da potência espectral.

No método da variância, utilizando as imagens de erro obtivemos uma dimensão fractal média de 2,646 no grupo de células aderidas ao vidro e esse valor diminuiu quando as células foram aderidas a fibronectina, esse grupo teve dimensão fractal média de 2,586. O grupo aderido ao vidro, e tratado com citocalasina D teve dimensão fractal média de 2,644 e também apresentou uma diminuição com relação ao controle. Já o grupo aderido a fibronectina e tratado com citocalasina D apresentou um diminuição com relação ao seu grupo controle e teve em uma dimensão fractal média de 2,624.

Com o método da potência espectral, aplicado nas imagens de erro todos os grupos alcançaram valor maior para a dimensão fractal média, do que os resultados no método da variância também nas imagens de erro. A dimensão fractal média pelo método da potência espectral no grupo controle aderido ao vidro, foi de 2,756 e a do grupo aderido a fibronectina teve leve queda alcançando 2,728. O grupo aderido ao vidro e tratado com citocalasina, obteve o maior valor, sendo este de 2,774. O grupo aderido a fibronectina e tratado com citocalasina muito próximo ao apenas aderido a fibronectina tendo dimensão fractal igual 2,72.

Para as imagens de amplitude no método de potência espectral, a dimensão fractal média do grupo de células aderidas ao vidro foi de 2,706, o grupo de células aderidas a fibronectina, apresentou uma pequena queda, tendo uma média no grupo com dimensão fractal de 2,65. Também com essas imagens e neste método o grupo aderido ao vidro e tratado com citocalasina D também caiu com relação ao controle e apresentou dimensão fractal média de 2,6 e o grupo aderido a fibronectina e tratado com citocalasina D teve dimensão fractal média de 2,644.

Também para as imagens de amplitude utilizamos o método da variância que para o grupo de células aderidas ao vidro apresentou dimensão fractal média de 2,688. O grupo de células aderidas ao vidro teve uma queda nesse valor apresentando dimensão fractal média igual a 2,612. As células aderidas a fibronectina e tratadas com citocalasina D alcançaram um aumento com relação as apenas aderidas a fibronectina sendo a dimensão fractal média de 2,692. O grupo aderido ao vidro e tratado com citocalasina teve queda com relação ao grupo controle e apresentou dimensão fractal média de 2,66. Na tabela 4.1 temos esses resultados expostos.

Tabela 4.1: Resultados das medidas de dimensão fractal média usando as imagens do erro e da amplitude de cada grupo. As setas indicam o crescimento ou decaimento com relação a situação controle.

	ERRO		AMPLITUDE	
	Potência Espectral	Variância	Potência Espectral	Variância
Vidro	2,756	2,646	2,706	2,688
Fibronectina	2,728 ↓	2,586 ↓	2,65 ↓	2,612 ↓
Fibro. + Cito. D	2,72 ↓	2,624 ↑	2,644 ↓	2,692 ↑
Vidro + Cito.D	2,774 ↑	2,644 ↓	2,6 ↓	2,66 ↓

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6.1 Discussão dos resultados das medidas de dimensão fractal

Assim em nossas amostras a dimensão fractal se mostrou um quantificador importante para detectar alterações nas mudanças morfológicas da membrana celular impostas pela adesão da célula a MEC. As imagens de amplitude e de erro pelo método da variância

apresentam o mesmo comportamento, tendo queda nos grupos de células aderidas a fibronectina e no grupo de células aderidas ao vidro e tratadas com citocalasina D quando comparadas apenas as células aderidas ao vidro (controle) e o grupo aderido a fibronectina e tratado com citocalasina apresentaram alta quando comparados ao grupo apenas aderido a fibronectina.

Pelo método da potência espectral as imagens de erro e amplitude, apresentam queda na dimensão fractal média no grupo de células aderidas a fibronectina quando comparadas ao grupo das células apenas aderidas ao vidro, e também apresentam diminuição da dimensão fractal média no grupo aderido a fibronectina e tratado com citocalasina D com relação às células apenas aderidas a fibronectina. Já no grupo de células aderidas ao vidro e tratadas com citocalasina D há uma pequena discrepância quanto aos resultados.

5 CONCLUSÃO

Nesta dissertação, fizemos o estudo de alguns parâmetros importantes para quantificar a influência da MEC nas propriedades morfológicas da membrana, para isto, foi feita a medida da dimensão fractal e rugosidade de macrófagos aderidos ou não a substratos de fibronectina e tratados com citocalasina D, a fim de quantificar o quanto essa adesão interfere nas mudanças morfológicas da membrana celular.

Em nosso trabalho demonstramos, também, a eficiência do AFM em medir e mapear a morfologia a nível nanométrico de células biológicas, sem oferecer danos a sua estrutura e com alta capacidade de resolução.

Percebemos que a adesão de células à MEC causa variações morfológicas na superfície da membrana, e o citoesqueleto é um fator chave nesse comportamento²⁹, visto que quando aderida à fibronectina o citoesqueleto passa por uma reorganização, e quando tratado com citocalasina o citoesqueleto sofre uma degradação dos filamentos de actina, o que impossibilita a adição de novas subunidades monoméricas a esses filamentos. Este comportamento justifica as variações morfológicas detectadas nas membranas.

Também constatamos que os tratamentos de edição de imagens realizados no software WSxM podem interferir nas variações da rugosidade da membrana, tendo em vista que o mesmo corrige as inclinações do substrato.

Quatro parâmetros foram utilizados para avaliar a rugosidade das amostras, sendo dois deles métodos de dimensão fractal e os outros dois parâmetros de rugosidade. Na análise via dimensão fractal conseguimos perceber alterações na complexidade da membrana, sobretudo pós análise das imagens de erro e amplitude do AFM que detectaram essas mudanças. A partir dos diferentes valores que a dimensão fractal assumiu nas diferentes situações a que os macrófagos foram submetidos, e quanto maior os valores obtidos para a dimensão fractal, maior a complexidade da membrana. Os valores encontrados pelos métodos da potência espectral e da variância se correlacionam, havendo apenas uma pequena dessemelhança nos resultados obtidos no grupo de células aderidas ao vidro e tratadas com citocalasina D.

Em contrapartida, a análise da rugosidade através dos parâmetros de rugosidade média e rugosidade média quadrática demonstraram-se quantificadores importantes da adesão celular à MEC, caracterizando as diferenças ocorridas na superfície da membrana celular quando esta é aderida a uma MEC. Tendo em vista que todos os grupos tiveram alterações em suas morfologias, esses parâmetros estabeleceram um padrão para o crescimento e decaimento da rugosidade a partir das diferentes situações a que a célula foi submetida quando comparada a situação controle.

As interações entre a célula e a MEC, nas diferentes circunstâncias que utilizamos, evidenciaram um papel essencial do citoesqueleto nessas modificações morfológicas causadas na membrana das células. Com isso, ter parâmetros úteis e sensíveis que caracterizem quantitativamente mudanças morfológicas na superfície da membrana, são importantes na avaliação de efeitos biológicos reais que podem ser utilizados nas áreas médicas, farmacológicas, dentre outras.

Uma perspectiva promissora deste trabalho consiste na possibilidade de investigar outros tipos de propriedades físicas das amostras biológicas, tais como propriedades elétricas, elásticas, dentre outras que são propiciadas pelo sistema de multi-sonda.

REFERÊNCIAS

- 1 HOOKE, R. **Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon.** Courier Corporation, 2003. ISBN 0486495647.
- 2 CARBONI, G. **A glass-sphere microscope** 1996.
- 3 BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists.** Jones & Bartlett Learning, 1999. ISBN 0763701920.
- 4 BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy. **Helvetica Physica Acta**, v. 55, n. 6, p. 726-735, 1982. ISSN 0018-0238.
- 5 MIRONOV, V. Fundamentals of Scanning Probe Microscopy, The Textbook for Students of the Senior Courses of Higher Educational Institutions, The Russian Academy of Sciences. **Nizhniy Novgorod**, 2004.
- 6 PRIOLI, R. et al. Atomic force microscopy investigation of the effects of annealing on amorphous carbon nitride films deposited by rf magnetron sputtering. **Diamond and related materials**, v. 8, n. 6, p. 993-995, 1999. ISSN 0925-9635.
- 7 BAISH, J. W.; JAIN, R. K. Fractals and cancer. **Cancer research**, v. 60, n. 14, p. 3683-3688, 2000. ISSN 0008-5472.
- 8 ANSELME, K. et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, v. 49, n. 2, p. 155-166, 2000. ISSN 0021-9304.
- 9 MANDELBROT, B. B.; PASSOJA, D. E.; PAULLAY, A. J. Fractal character of fracture surfaces of metals. **Nature**, v. 308, n. 5961, p. 721, 1984. ISSN 1476-4687.
- 10 MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos materiais: uma introdução.** Editora E-papers, 2002. ISBN 8587922548.

- 11 KNOLL, M. Aufladepotential und sekundäremission elektronenbestrahlter körper. **Zeitschrift für technische Physik**, v. 16, p. 467-475, 1935.
- 12 VON ARDENNE, M. Das elektronen-rastermikroskop. **Zeitschrift für Physik**, v. 109, n. 9-10, p. 553-572, 1938. ISSN 0044-3328.
- 13 BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical review letters**, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.
- 14 HOWLAND, R.; BENATAR, L.; INSTRUMENTS, P. S. **A practical guide to scanning probe microscopy**. Park scientific instruments, 1996. ISBN 0788171267.
- 15 COHEN, S. H.; BRAY, M.; LIGHTBODY, M. L. **Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy**. Springer Science & Business Media, 1994. ISBN 0306448904.
- 16 FUKUI, M. Técnicas de microscopia de tunelamento de eletrons (MTE) e microscopia de força atomica (MFA) aplicadas ao estudo desuperficies de grafite e diamante. 1992.
- 17 BETZIG, E.; FINN, P.; WEINER, J. Combined shear force and near-field scanning optical microscopy. **Applied physics letters**, v. 60, n. 20, p. 2484-2486, 1992. ISSN 0003-6951.
- 18 MARTIN, Y.; WICKRAMASINGHE, H. K. Magnetic imaging by "force microscopy" with 1000 Å resolution. **Applied Physics Letters**, v. 50, n. 20, p. 1455-1457, 1987. ISSN 0003-6951.
- 19 GIRARD, P. Electrostatic force microscopy: principles and some applications to semiconductors. **Nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 485, 2001. ISSN 0957-4484.
- 20 FISCHER-CRIPPS, A. C. Contact Mechanics. In: (Ed.). **Nanoindentation**. New York, NY: Springer New York, 2004. p.1-20. ISBN 978-1-4757-5943-3.
- 21 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, 1990. ISSN 0021-8979.
- 22 HANSMA, P. K. et al. The scanning ion-conductance microscope. **Science**, v. 243, n. 4891, p. 641-643, 1989. ISSN 0036-8075.

- 23 SCHMALZ, G. Über Glatte und Ebenheit als physikalisches und physiologisches Problem. **Verein Deutscher Ingenieure**, p. 1461-1467, 1929.
- 24 HELMUT, B. et al. **Apparatus for measuring surface irregularities**: Google Patents 1955.
- 25 YOUNG, R.; WARD, J.; SCIRE, F. The topografiner: an instrument for measuring surface microtopography. **Review of Scientific Instruments**, v. 43, n. 7, p. 999-1011, 1972. ISSN 0034-6748.
- 26 EATON, P.; WEST, P. **Atomic force microscopy**. Oxford University Press, 2010. ISBN 0199570450.
- 27 HERRMANN, P. S. et al. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 97, p. 51-61, 1997.
- 28 REZENDE, C. A. D. Auto-organização de nanopartículas utilizando padrões formados por transição de molhabilidade. 2007.
- 29 SOUZA, S. T. D. Microscopias de varredura por sondas aplicadas ao estudo de amostras biológicas, vítreas e cerâmicas. 2014.
- 30 NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica; uma introdução Scanning probe microscopy; an introduction. **Cerâmica**, v. 44, n. 290, p. 212-219, 1998. ISSN 0366-6913.
- 31 DOS SANTOS, D. F. A. **Microscopia de Força Atômica IN-SITU de Superfícies de Membranas Poliméricas de Nafion com Nanopartículas de Sílica Incorporadas**. 2008. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa
- 32 SUÁREZ, V. I. T. Sistema de microscopia com multi-pontas: força atômica e campo próximo. 2012.
- 33 EISENSCHITZ, R.; LONDON, F. Über das Verhältnis der van der Waalsschen Kräfte zu den homöopolaren Bindungskräften. **Zeitschrift für Physik**, v. 60, n. 7-8, p. 491-527, 1930. ISSN 0044-3328.

- 34 LENNARD-JONES, J. E. Cohesion. **Proceedings of the Physical Society**, v. 43, n. 5, p. 461, 1931. ISSN 0959-5309.
- 35 GUIZADO, T. R. C. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana. 2008.** 2008. Dissertação (Mestrado em Física)–Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro
- 36 ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces.** Academic press, 2011. ISBN 0123919339.
- 37 ALBRECHT, T. et al. Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v. 8, n. 4, p. 3386-3396, 1990. ISSN 0734-2101.
- 38 ZHONG, Q. et al. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. **Surface Science Letters**, v. 290, n. 1-2, p. L688-L692, 1993. ISSN 0167-2584.
- 39 KARRASCH, S. et al. Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution. **Biophysical journal**, v. 65, n. 6, p. 2437-2446, 1993. ISSN 0006-3495.
- 40 MURPHY, M. F. et al. Comparative study of the conditions required to image live human epithelial and fibroblast cells using atomic force microscopy. **Microscopy research and technique**, v. 69, n. 9, p. 757-765, 2006. ISSN 1059-910X.
- 41 MOREAU, A. L. D. Processamento e funcionalização de pontas para aplicações biológicas de microscopia de força atômica. 2005.
- 42 OHNESORGE, F.; BINNIG, G. True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces. **Science**, v. 260, n. 5113, p. 1451-1456, 1993. ISSN 0036-8075.
- 43 FUJIHIRA, M. et al. Scanning near-field fluorescence microscopy and nanoscopic fluorescence spectroscopy in combination with a non-contact scanning force microscope. **Chemistry letters**, v. 23, n. 3, p. 657-660, 1994. ISSN 1348-0715.
- 44 MORITA, S. et al. Contact and non-contact mode imaging by atomic force microscopy. **Thin Solid Films**, v. 273, n. 1-2, p. 138-142, 1996. ISSN 0040-6090.

- 45 BOWEN, W. R. et al. Visualisation of an ultrafiltration membrane by non-contact atomic force microscopy at single pore resolution. **Journal of Membrane Science**, v. 110, n. 2, p. 229-232, 1996. ISSN 0376-7388.
- 46 IRMAN, Š. et al. protein interactions on phospholipid bilayer, studied by AFM under physiological conditions. In: (Ed.). **Atomic Force Microscopy Investigations into Biology-From Cell to Protein**: InTech, 2012.
- 47 ALESSANDRINI, A.; FACCI, P. AFM: a versatile tool in biophysics. **Measurement science and technology**, v. 16, n. 6, p. R65, 2005. ISSN 0957-0233.
- 48 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.
- 49 BOWEN, W. R.; HILAL, N. **Atomic force microscopy in process engineering: An introduction to AFM for improved processes and products**. Butterworth-Heinemann, 2009. ISBN 0080949576.
- 50 WEST, P. E. **Introduction to atomic force microscopy: Theory, practice, applications**. Pacific Nanotechnology, 2007.
- 51 NBR, A. 6023: informação e documentação—referências—elaboração. **Rio de Janeiro**, 2002.
- 52 DE OLIVEIRA, R. et al. Measurement of the nanoscale roughness by atomic force microscopy: basic principles and applications. In: (Ed.). **Atomic force microscopy-imaging, measuring and manipulating surfaces at the atomic scale**: InTech, 2012.
- 53 SILVA, A. A. D. **Efeitos topográficos em espectros RBS**. 2006. Universidade de São Paulo
- 54 PARRA, B. S. et al. Rugosidade superficial de revestimentos cerâmicos. **Cerâmica Industrial**, v. 11, n. 2, p. 15-18, 2006.
- 55 GADELMAWLA, E. et al. Roughness parameters. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, n. 1, p. 133-145, 2002. ISSN 0924-0136.
- 56 PETROPOULOS, G. P.; PANDAZARAS, C. N.; DAVIM, J. P. Surface texture characterization and evaluation related to machining. In: (Ed.). **Surface integrity in machining**: Springer, 2010. p.37-66.

- 57 CHI, T. et al. Surface texture analysis using dektak stylus profilers. **Veeco Instruments Inc**, 2004.
- 58 BEI OBERFLÄCHEN, R.; ROSTFREI, I. E. Merkblatt 984.
- 59 RODRIGUEZ FERREIRA, V. et al. **Roughness measurement problems in tribological testing**. Sustainable Construction and Design 2011 (SCAD): Ghent University, Laboratory Soete, 2011. 115-121 p.
- 60 WHITEHOUSE, D. J. **Surfaces and their Measurement**. Elsevier, 2004. ISBN 0080518230.
- 61 MANDELBROT, B. B. The fractal geometry of nature/Revised and enlarged edition. **New York, WH Freeman and Co., 1983, 495 p., 1983**.
- 62 FERREIRA FILHO, J. R. Geometria fractal: da natureza para a sala de aula. 2015.
- 63 SERRA, C. P.; KARAS, E. W. **Fractais gerados por sistemas dinâmicos complexos**. Universitaria Champagnat, 1997. ISBN 8572920250.
- 64 MANDELBROT, B. Les objets Fractals: Forme, Hasard. **Dimension, Paris Ed. Flammarion**, 1975.
- 65 PELLING, A. E. et al. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, v. 305, n. 5687, p. 1147-1150, 2004. ISSN 0036-8075.
- 66 BUTT, H.-J. et al. Imaging cells with the atomic force microscope. **Journal of structural biology**, v. 105, n. 1-3, p. 54-61, 1990. ISSN 1047-8477.
- 67 ANTONIO, P. D. et al. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1818, n. 12, p. 3141-3148, 2012. ISSN 0005-2736.
- 68 AGHAJANOVA, A.; SAFARZADEH, A. Atomic Force Microscopy in the Study of Cell Membranes Normal Epithelium and Adenocarcinoma Cell of the Large Intestine. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 6, n. 2, p. 032-035, 2014. ISSN 1948-5956.

- 69 SOKOLOV, I. Atomic force microscopy in cancer cell research. **Cancer nanotechnology**, v. 1, p. 1-17, 2007.
- 70 ASCH, B. B.; KAMAT, B. R.; BURSTEIN, N. A. Interactions of normal, dysplastic, and malignant mammary epithelial cells with fibronectin in vivo and in vitro. **Cancer research**, v. 41, n. 6, p. 2115-2125, 1981. ISSN 0008-5472.
- 71 YANG, I. H.; HO, C.-C. Alteration of human neuroblastoma cell morphology and neurite extension with micropatterns. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6599-6609, 2005. ISSN 0142-9612.
- 72 TAO, N.; LINDSAY, S.; LEES, S. Measuring the microelastic properties of biological material. **Biophysical journal**, v. 63, n. 4, p. 1165-1169, 1992. ISSN 0006-3495.
- 73 HOH, J. H.; SCHOENENBERGER, C.-A. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. **Journal of cell science**, v. 107, n. 5, p. 1105-1114, 1994. ISSN 0021-9533.
- 74 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, 2000. ISSN 0006-3495.
- 75 ZHANG, X. 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, 2004. ISSN 0363-6135.
- 76 LADOUX, B.; NICOLAS, A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. **Reports on Progress in Physics**, v. 75, n. 11, p. 116601, 2012. ISSN 0034-4885.
- 77 LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359-369, 1996. ISSN 0092-8674.
- 78 BERRY, C. C. et al. The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5781-5788, 2004. ISSN 0142-9612.
- 79 DALBY, M. J. Nanostructured surfaces: cell engineering and cell biology. 2009. ISSN 1743-5889.

- 80 MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 4:** EPSJV 2009.
- 81 GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores. Tradução de Adriana Paulino do Nascimento:** Rio de Janeiro: Elsevier 2007.
- 82 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**, v. 94, n. 3, p. 849-854, 1997. ISSN 0027-8424.
- 83 BRAY, D. Cell Movements: From Molecules to Motility (Garland, New York). **Bray303Cell Movements: From Molecules to Motility2001**, p. 303-305, 2001.
- 84 PARAMESWARAN, K. et al. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 1, p. 139-146, 2006. ISSN 1085-9195.
- 85 HORWITZ, A. F. Integrins and health. **Scientific American**, v. 276, n. 5, p. 68-75, 1997. ISSN 0036-8733.
- 86 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, 2002. ISSN 0014-4827.
- 87 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, 1997. ISSN 0092-8674.
- 88 GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 345-357, 1996. ISSN 0092-8674.
- 89 LIU, S.; CALDERWOOD, D. A.; GINSBERG, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. **Journal of cell science**, v. 113, n. 20, p. 3563-3571, 2000. ISSN 0021-9533.
- 90 JULIANO, R. 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, n. 1, p. 283-323, 2002. ISSN 0362-1642.

- 91 COLLINS, S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, n. 5, p. 1233-1244, 1987. ISSN 0006-4971.
- 92 GIL, L. D. M. et al. A interface célula-matriz extracelular-biomaterial e a biocompatibilidade de implantes de titânio. 2009.
- 93 GEORGE, E. L. et al. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. **Development**, v. 119, n. 4, p. 1079-1091, 1993. ISSN 0950-1991.
- 94 HYNES, R. Fibronectins springer series in molecular biology. **Springer, New York**, 1990.
- 95 BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 269, 2010. ISSN 0302-766X.
- 96 HORCAS, I. et al. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of scientific instruments**, v. 78, n. 1, p. 013705, 2007. ISSN 0034-6748.
- 97 CASELLA, J. F.; FLANAGAN, M. D.; LIN, S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. **Nature**, v. 293, n. 5830, p. 302, 1981. ISSN 1476-4687.
- 98 HAIDLE, A. M.; MYERS, A. G. An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: Synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 33, p. 12048-12053, 2004. ISSN 0027-8424.
- 99 NEČAS, D.; KLAPETEK, P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. **Open Physics**, v. 10, n. 1, p. 181-188, 2012. ISSN 2391-5471.