

Tomografia de Hemácias

Giuseppe Glionna

Junho de 2009

Tomografia de Hemácias

Giuseppe Glionna

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Tese apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, como requisito parcial para a obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS (Física).

Agradecimentos

Considero que a elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e stress seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse ao termo. A todas elas registro minha gratidão.

Ao meu orientador Prof. Oscar Nassif de Mesquita na sua disponibilidade irrestrita, na sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, tenho certeza que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos.

Aos amigos e colegas do laboratório Bira, Marcio, Henrique, Camilla, Livia, Maria Clara e Mayumi pela ajuda prestada em todas os momentos que precisei.

Ao Prof. Monken pelo suporte e sugestões de óptica.

Às instituições CNPq e Fapemig, pelo financiamento do laboratório onde este trabalho foi desenvolvido juntamente com o Instituto do Milênio de Nanociências e Instituto do Milênio de Óptica Não-linear, Fotônica e Biofônica.

Sumário

Agradecimentos	1
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 Introdução	1
2 Microscopia de Desfocalização	8
2.1 Microscopia de Contraste de Fase	9
2.2 Espectro Angular do Campo Elétrico da Luz	13
2.2.1 A Equação de Helmholtz	13
2.2.2 Propagação Livre do Espectro Angular	15
2.2.3 Propagação do Espectro Angular através de uma Lente Delgada	19
2.3 Propagação do Espectro Angular através do Microscópio Desfocalizado	24
2.4 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado	28
2.5 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado através de um Objeto de Fase	30
2.5.1 Contraste da Intensidade de Luz da Imagem $C(\vec{\rho})$	30
2.5.2 Correlação das Flutuações do Contraste $\langle \Delta C(0, 0) \Delta C(\vec{r}, t) \rangle$.	35
2.5.3 Flutuação Quadrática Média do Contraste $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$	38
2.5.4 Espectro de Potência Espacial das Flutuações do Contraste usando $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$	42
2.6 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado através de um Objeto de Fase com duas Interfaces	45
2.6.1 Contraste da Intensidade de Luz da Imagem $C(\vec{\rho})$	45

2.6.2	Correlação das Flutuações do Contraste $\langle \Delta C(0,0)\Delta C(\vec{r}, t) \rangle$	50
2.6.3	Flutuação Quadrática Média do Contraste $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$	51
2.6.4	Espectro de Potência Espacial das Flutuações do Contraste usando $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$	55
3	Estrutura da Membrana e Citoesqueleto de Hemácias e Modelos de Elasticidade	58
3.1	A Bicamada Lipídica	61
3.2	Proteínas da Membrana	64
3.3	O Cortex da Membrana Plasmática	65
3.4	As Hemácias	67
3.5	Noções Básicas sobre Elasticidade	70
3.6	Flutuações em Filamentos e Membranas	77
3.6.1	Flutuações Térmicas da Forma de Filamentos e Comprimento de Persistência	77
3.6.2	Representação de Monge para Superfícies	85
3.6.3	Flutuações Térmicas da Área de Interfaces	86
3.6.4	Potencial de Confinamento	88
3.6.5	Curvatura de Superfícies	89
3.6.6	Energia Livre de Helfrich com Curvatura Espontânea	92
3.7	Modelos de Elasticidade de Hemácias	96
4	Metodologia Experimental e Análise de Dados	103
4.1	Montagem	105
4.1.1	Amostras	106
4.1.2	Calibração	107
4.2	Técnicas de Processamento de Dados	109
5	Resultados e Discussões	111
5.1	Interpretação para o Contraste Médio $\langle C \rangle$	113
5.2	Interpretação para a Flutuação Quadrática Média $\langle \Delta C^2 \rangle$	117
5.3	Interpretação para a Função de Auto-Correlação $\langle \Delta C(0,0)\Delta C(0,t) \rangle$	121
5.4	Obtenção do Espectro de Potência Espacial usando $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$	123

6 Conclusões e Perspectivas	125
Referências Bibliográficas	132

Lista de Figuras

1.1	Imagem desfocalizada de microscopia de campo-claro de um macrofágo.	3
1.2	Imagem desfocalizada de microscopia de campo-claro de uma hemácia.	4
2.1	(A) Perfil do objeto de fase (célula aderida em uma lâmina de vidro); (B) diferenças de fase na absorção da luz por parte do objeto de fase.	9
2.2	Imagens com microscópio (A) normal e (B) com contraste de fase.	10
2.3	Representação esquemática do sistema ótico para um microscópio de contraste de fase.	11
2.4	Coordenadas do sistema de referência: (A) no espaço real; (B) no espaço de Fourier dos vetores de ondas.	15
2.5	Representação das coordenadas e espessura da lente delgada.	19
2.6	Representação do tamanho das seções de cada segmento da lente. (A) e (C) são os segmentos laterais, (B) do segmento central	20
2.7	Esquema óptico do nosso microscópio: S é a fonte de luz (lâmpada halógena de tungstênio), C é a lente do condensador, L_1 é a lente objetiva, L_2 é a lente de tubo, f_1 e f_2 são as distâncias focais, O é objeto que esta no foco de L_1 , d é a distância entre as lentes e o plano imagem I está no plano focal de L_2 .	24
2.8	Esquema do microscópio desfocalizado: objeto está desfocalizado de uma pequena distância Δf ; as lentes estão separadas por uma dis- tância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I.	25

2.9	Geometria da propagação do campo elétrico através de uma interface ondulada: E_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\xi})$ é a amplitude da ondulação da interface ondulada; n_1 e n_2 são os índices de refração do meio antes e depois da interface onde o campo elétrico se propaga; $\vec{\xi}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico.	30
2.10	Curvas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ com $\frac{(\Delta nk_0)^2}{\pi} = 1$, $R = 4,9\mu m$ e $k = 9,3\mu m^{-1}$, usando no espectro $ u(q) ^2$ da equação 2.105 os parâmetros $a = 7,6$, $b = 212\mu m^{-2}$ e $c = 4680\mu m^{-4}$: linha azul correspondente a equação 2.102; linha vermelha correspondente a equação 2.103; linha verde correspondente ao limite $\langle \Delta C^2(\infty) \rangle$ para $z_f \rightarrow \infty$ da equação 2.104.	41
2.11	Espectro espacial das flutuações gerado pela equação 2.105 (linha contínua) e gerado pela equação 2.111 (linha pontilhada).	44
2.12	Geometria da propagação do campo elétrico através de duas interfaces transparentes finas. Na região entre as interfaces o índice de refração é $n + \Delta n$ e fora é n , considerados homogêneos e isotrópicos. E_0 é o campo elétrico inicial que incide na interface 1 colocada na posição p_1 ; E'_1 é o campo elétrico que difratado pela interface 1 se propaga até à interface 2 colocada na posição p_2 ; E_2 é o campo elétrico difratado logo após a interface 2, que será propagado até à posição z_f do plano focal da objetiva.	45
2.13	Curvas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ com $R = 4,9\mu m$, $k = 9,3\mu m^{-1}$ e $\frac{(\Delta nk_0)^2}{2\pi} = 1$, usando nos espectros $ u_1(q) ^2$ e $ u_2(q) ^2$ das equações 2.135a os parâmetros $a_1 = a_2 = 7,6$, $b_1 = b_2 = 212\mu m^{-2}$ e $c_1 = 4680\mu m^{-4}$: linha azul com $c_2 = 2c_1$ chamada de assimétrica; linha vermelha com $c_2 = c_1$ chamada de simétrica; $p_1 = -0,5\mu m$ e $p_2 = 0,5\mu m$	53
2.14	Curvas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ com os parâmetros utilizados na figura 2.13 no caso simétrico: linha azul e da equação 2.133; linha azul e da equação 2.134; linha verde e no limite para $z_f \rightarrow \infty$ da equação 2.136.	54
3.1	(A) Célula Procarionte: Organização celular simples, sem núcleo nem organelas ou orgânulos citoplasmáticos; (B) Célula Eucarionte: organização celular mais complexa [29].	59

3.2	Estrutura da Membrana: (A) imagem com microscópio eletrônico da membrana plasmática em seção transversal; (B) e (C) desenhos que mostram os modelos bi-dimensional e tridimensional de uma membrana celular [29].	60
3.3	As partes de uma molécula de fosfolípido: (A) Fosfatidilcolina, representada esquematicamente; (B) como modelo espacial.	61
3.4	Moléculas lipídicas em água: (A) a forma da molécula lipídica define qual estrutura é determinada. Uma forma cuneiforme forma micelas (figura de cima), enquanto cilíndrica forma bicamadas (figura de baixo); (B) visão tridimensional da bicamada lipídica com sua simulação em computador [29].	62
3.5	Mobilidade de fosfolípidios: os tipos de movimentos possíveis para moléculas de fosfolípidios em uma bicamada lipídica.	63
3.6	Modos pelos quais as proteínas da membrana associam-se com a bicamada lipídica: (A) muitas proteínas da membrana estendem-se através da bicamada, como parte de suas massas em ambos os lados: através de uma única α -hélice ou com múltiplas α -hélices. (B) Outras proteínas da membrana estão localizadas interiormente no citosol e são associadas com a bicamada no lado da membrana interno através de uma única α -hélice anfipática exposta a superfície da molécula. (C) Outras proteínas da membrana são totalmente expostas na superfície externa, sendo ligadas a bicamada somente por uma ligação covalente a um ou mais grupos lipídicos. (D) Algumas proteínas, das quais nenhuma das partes penetram no interior da bicamada, são ligadas molecularmente a uma ou outra das faces da membrana por interações não-covalentes com outras proteínas da membrana.	64
3.7	Esquema da estrutura do citoesqueleto sobre do lado citoplasmático da membrana do eritrócito humano.	65
3.8	Hemácias Humanas: (A) imagem com o microscópio eletrônico; (B) perfil horizontal e seção de uma única hemácia. Foto: Dave McCarthy and Annie Cavanagh/Wellcome Trust.	68
3.9	Esquema da moléculas de espectrina das hemácias humanas.	68
3.10	Composição protéica do cortex celular de hemácias.	69

3.11	Forças superficiais sobre um elemento de volume do material	71
3.12	(A) Deslocamento uniaxial Δu_{xx} ; (B) Deslocamento de cisalhamento Δu_{xy}	73
3.13	Forças superficiais em uma lâmina de espessura d	74
3.14	(A) Flexão de uma haste de comprimento L , largura b e espessura a . A linha pontilhada indica o plano neutro. (B) Secção reta da haste e sistema de referência para o cálculo do momento de inércia geométrico I	75
3.15	Linha genérica s cuja posição no espaço é dada pelo vetor $\vec{r}(s)$	78
3.16	Vetores tangentes no ponto zero e no ponto s de um filamento curvo.	79
3.17	Polímeros com diferentes razões entre ξ_p e L_c . Quanto menor ξ_p comparado com L_c , mais enovelado fica o polímero e mais próximos ficam suas extremidades.	80
3.18	Representação do vetor \vec{R} entre as extremidades do filamento.	82
3.19	(A) Figura de uma superfície com uma dobra, onde a função $h(x, y)$ não é single-valued. (B) Figura de uma superfície curva, onde a função $h(x, y)$ é single-valued. Mostra-se o deslocamento unitário ao longo de x que gera o vetor tangente \vec{r}_x	85
3.20	Camada anfifílica assimétrica que causa uma configuração de equilí- brio não planar (com curvatura espontânea).	92
3.21	(A) Modelo de acoplamento de citoesqueleto para hemácias; (B) Rup- tura da ligação de espectrina ativada por ATP.	98
3.22	Ilustração do acoplamento dos modos de cisalhamento do citoesque- leto e de curvatura da membrana indicando que para grandes com- primentos de onda as duas camadas flutuam juntas.	99
3.23	(A) Ilustração da bicamada e citoesqueleto não tensionados, super- fície plana; (B) Ilustração do aumento do potencial de confinamento causado pela curvatura local da bicamada-citoesqueleto. A curvatura local estica as molas entrópicas tensionando a estrutura e confinando as flutuações da bicamada lipídica.	100

4.1	(A) Figura esquemática de uma hemácia discótica, sistema de referência e símbolos utilizados. (B) Imagens de uma hemácia para três desfocalizações (z_f) diferentes relativas ao plano médio de simetria. A assinatura desta técnica é a inversão do contraste em torno do plano de simetria.	104
4.2	Foto do microscópio do Laboratório de Biofísica da UFMG/ICEX. . .	105
4.3	Esquema da montagem experimental utilizada nos experimentos. . . .	106
4.4	Porta amostras: consiste de um O-ring de diâmetro de cerca 1,5 <i>cm</i> colado com parafina, em uma lamínula de vidro (Corning) de 0,17 <i>mm</i> de espessura.	107
4.5	Nível de cinza N em função da intensidade luminosa I medida pelo contador de fótons. Para este ajuste particular da câmera, $N = -36,7 + 7,3I$. O parâmetro importante para calibração do contraste é $B = -36,7$, que corresponde ao nível de cinza para o valor da intensidade luminosa igual a zero, da extrapolação linear.	108
4.6	Menu do software ImageJ. Na hemácia a ser analisada (no alto a esquerda da figura) traçando uma linha (em amarelo) se pode observar (abaixo a esquerda) o seu perfil correspondente, em níveis de cinza. No lado direito, se pode observar a superfície em níveis de cinza da imagem inteira. Com os níveis de cinza para cada pixel em cada imagem podemos fazer uma série temporal que nos permite calcular a flutuação quadrática média e funções de correlação do contraste. . .	110
5.1	(A) imagem de uma hemácia desfocalizada com $\Delta f = -2\mu m$; (B) Gráficos de $\langle C \rangle$ (quadrado) e $\langle \Delta C^2 \rangle$ (círculos) em função da posição ao longo do eixo horizontal x indicado em figura (A); (C) Gráficos de κ^2 (quadrado) e $\langle \Delta C^2 \rangle$ (círculos) em função da posição horizontal. Nota-se a anticorrelação entre κ^2 e $\langle \Delta C^2 \rangle$ o longo da posição x	112
5.2	Diferentes orientações para o perfil 3-D da hemácia da figura 5.1 (A) obtido usando a equação 5.5.	115
5.3	Gráficos das médias angulares de curvaturas $\kappa_1^2(\rho)$ (quadrados) e $\kappa_2^2(\rho)$ (círculos) em função de ρ para a hemácia de figura 5.1 (A). As linhas contínuas são guias para os olhos.	116

- 5.4 (A) Modelo óptico que usamos para a parte central da hemácia, onde as superfícies são modeladas como redes de difração de fase planas; (B) Flutuação quadrática média do contraste da hemácia em função da desfocalização (círculos). Os mínimos ocorrem quando o plano focal da objetiva coincide com as interfaces; (C) Função de autocorrelação do contraste em função da desfocalização (círculos), para um tempo de atraso fixo de 1/30 segundos. Os mínimos não são mais resolvidos, porque os maiores vetores de onda das flutuações já decaíram, ilustrando a conexão entre resolução óptica lateral e longitudinal. As linha contínuas nas figuras (B) e (C) correspondem aos ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Auth. al. 120
- 5.5 Espectro de potência espacial onde os círculos são dados experimentais resultantes da integração numérica da flutuação quadrática média do contraste, como na equação 2.141. A linha contínua é o ajuste de $f(q)$ usando a equação 5.12, que retorna os valores $\frac{k_c}{kT_{ef}} = (6, 8 \pm 2, 0)$ e $\frac{\mu}{kT_{ef}} = (8, 9 \pm 0, 6) \times 10^3 \mu m^{-2}$ 124

Lista de Tabelas

3.1	Tempo de vida de hemácias na circulação para várias espécies.	68
-----	---	----

Resumo

Objetos transparentes (objetos de fase) se tornam visíveis em um microscópio óptico operando em campo-claro, se o microscópio estiver desfocalizado. Na verdade, um microscópio óptico desfocalizado operando em campo-claro é equivalente a um microscópio de contraste de fase, apresentando vantagens que serão discutidas nesta tese, em relação ao microscópio de contraste de fase convencional. A desfocalização introduz uma diferença de fase entre a luz transmitida (não-difratada) e a luz difratada pelo objeto, que ao serem recombinadas no plano de detecção e devido à interferência entre estas luzes, faz com que o objeto transparente se torne visível, com um contraste da imagem diferente de zero. Isto foi demonstrado em nosso laboratório e publicado em artigos e teses anteriores [1–7]. Nesta tese, melhoramos o modelo óptico de microscopia de desfocalização, para que ele fosse válido para qualquer desfocalização, inclusive no limite assintótico de grandes desfocalizações, e para números de onda de difração maiores. Obtivemos expressões teóricas para o contraste de objetos de fase compostos por uma e por duas interfaces paralelas. No limite de pequenas desfocalizações e números de onda de difração pequenos, através da média temporal do contraste, podemos obter a forma de equilíbrio de hemácias, como demonstrado em publicação anterior deste laboratório [4]. Nossa nova expressão é importante para estabelecer uma relação entre flutuações de contraste e flutuações na altura das superfícies da hemácia. Com este novo modelo óptico, nós mostramos que ao fazer uma varredura na posição do plano focal da objetiva (z_f), como as superfícies das hemácias estão em posições diferentes em relação à z , a luz difratada pelas superfícies tem fases diferentes e, portanto, podem ser distinguidas nesta técnica de microscopia de desfocalização. Este fato nos permite estudar as propriedades

de cada superfície separadamente. Para flutuações com números de onda maiores que $1 \mu m^{-1}$, podemos aproximar a região central da hemácia por planos paralelos e aplicar o modelo óptico para objetos de fase com duas interfaces desenvolvidos nesta tese. Usando o modelo elástico recente de Auth et al. [8], que leva em conta o acoplamento entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto de espectrina (que também considera as superfícies de hemácias como planos paralelos) e nosso modelo óptico, obtivemos um ótimo ajuste para os dados experimentais. Deste ajuste obtivemos os valores para o módulo de curvatura da bicamada, o módulo de cisalhamento do citoesqueleto e para a temperatura efetiva. As flutuações de altura na hemácia não são somente de origem térmica. Outra contribuição vem da conversão de energia química em trabalho mecânico nas superfícies, mediada por ATP (adenosina trifosfato, o combustível das células) [9,10]. Estes efeitos fora-do-equilíbrio são reduzidos a um único parâmetro, qual seja a temperatura efetiva introduzida de uma maneira ad-hoc. Este efeito ainda é motivo de controvérsia na literatura [11]. Estudamos também a relaxação destas flutuações analisando a função de auto-correlação temporal do contraste. Esta relaxação depende da elasticidade da bicamada lipídica e citoesqueleto de espectrina, e do escoamento do citoplasma através do canal estreito, de espessura d da ordem de 20 a 30 nm , entre a bicamada e o citoesqueleto. Do ajuste da teoria aos nossos dados obtivemos $d = 21 \pm 1 \text{ nm}$. Mostramos que a técnica de microscopia de desfocalização é uma técnica de microscopia óptica bastante útil e confiável para o estudo do perfil e rugosidades dinâmica e estática de interfaces em um material transparente em multicamadas, como membranas de células biológicas.

Abstract

Transparent objects (phase objects) render visible in a bright-field optical microscope, if the microscope is defocused. In fact, a defocused bright-field optical microscope is equivalent to a phase contrast microscope, presenting advantages over the conventional one, as it will be discussed in this thesis. Defocusing causes a phase difference between the transmitted light (non-diffracted) and the light diffracted by the phase object, which when combined at the detection plane due to light interference, renders the object visible, with an image contrast different than zero. This effect was demonstrated in our laboratory in several articles and previous thesis [1–7]. In this thesis, we improved our optical model of defocusing microscopy, such that its validity was extended to any defocusing, including asymptotically large defocusing, and for larger diffraction wavenumbers. We obtain theoretical expressions for the contrast of phase objects composed by one and by two parallel interfaces. In the limit of small defocusing and small diffraction wavenumbers, from the time averaged contrast, we can obtain information about the equilibrium shape of (RBC) red blood cells (erythrocytes), as previously demonstrated [4]. Our new expressions are important to establish a relationship between defocused image contrast fluctuations and surface height fluctuations on RBCs. With our new optical model we show that by scanning the microscope objective focal plane position (z_f), and since the RBC surfaces are at different positions in relation to the z-axis, their diffracted light are affected by different phase differences, such that their surface can be distinguished by using defocusing microscopy. This fact allows us to study the properties of each interface separately. For fluctuations with wavenumbers larger than $1 \mu m^{-1}$, one

can approximate the RBC central region by parallel planes, and apply the optical model for two interfaces developed in this thesis. By using the recently developed elastic model by Auth et al. [8], which takes into account the coupling between the lipid bilayer and the spectrin cytoskeleton (and also uses the approximation of parallel planes for the RBC surfaces) and our optical model, we have obtained a very good fit for the experimental data. From this fit we have obtained the values for the lipid bilayer curvature modulus, for the cytoskeleton shear modulus and for the effective temperature. The RBC height fluctuations are not only of thermal origin. Another contribution comes from the conversion of chemical energy into mechanical work driven by ATP (adenosine triphosphate, the cell's combustible) [9,10]. These non-equilibrium effects are lumped into a single parameter, namely the effective temperature introduced in an ad-hoc manner. This effect is still controversial in the literature [11]. We also studied the relaxation of RBC height fluctuations through the time autocorrelation function of contrast fluctuations. This relaxation is dictated by the elasticity of the lipid bilayer and the spectrin cytoskeleton, and by the flow of the cytoplasm through the narrow gap of width $d \sim 20$ to 30 nm , between the bilayer and the cytoskeleton. From the fit of this theory to our data, we obtained a gap-width $d = 21 \pm 1 \text{ nm}$. We showed that defocusing microscopy is an useful and trustable technique to study height profiles and static and dynamic roughness of interfaces in a transparent multilayered material, like membranes of living cells.

Capítulo 1

Introdução

O estudo de sistemas biológicos desde a escala de tamanhos moleculares (nm) até a escala de tamanhos das células (μm) tem se beneficiado das várias técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica (escala nm) e as várias técnicas de microscopia óptica (escala μm). A linha de pesquisa do nosso laboratório na área de Física de Sistemas Biológicos tem se dedicado ao estudo das propriedades elásticas e motilidade de células, através da medida das flutuações dinâmicas em suas superfícies, cujos comprimentos de onda de interesse se encontram na escala de μm e, portanto, podem ser estudadas com microscopia óptica. No caso de microscopia óptica destacam-se as técnicas de fluorescência (especialmente microscopia confocal), contraste de fase e DIC (differential contrast microscopy, ou microscopia de contraste diferencial), que são bastante usadas para o estudo de biologia celular [12,13]. Hoje já existe uma variedade grande de corantes fluorescentes que se ligam especificamente nas várias proteínas das células que se quer estudar, que permite a visualização de partes específicas das células onde aquelas proteínas se localizam [13]. Para microscópios convencionais de fluorescência, uma grande quantidade de corantes deve ser adicionada às células para visualização, e tal fato pode alterar algumas das propriedades da célula. As microscopias ópticas que usam efeitos ópticos não-lineares, como a microscopia de 2-fótons por exemplo, oferecem grande potencial de estudo uma vez que se pode usar luz infra-vermelha, que danifica menos as células [13]. No entanto, corantes fluorescentes são ainda necessários para visualização. Para visualização das membranas das células as técnicas de contraste de fase e DIC são bastante populares e fazem parte da grande maioria dos microscó-

pios usados por biólogos celulares. Estas técnicas são requeridas uma vez que a absorção da luz visível pelas membranas das células é muito pequena, impossibilitando sua visualização por um microscópio convencional operando em campo-claro. Além disto, a diferença de índice de refração entre as membranas e o meio é muito pequena (da ordem de 5%) e somente técnicas de interferência luminosa, seriam capazes de transformar pequenas variações na fase da luz em variações mensuráveis de intensidade luminosa. Estas membranas seriam em princípio impossíveis de serem observadas com um microscópio convencional operando em campo-claro. Na área de desenvolvimento de novas microscopias ópticas tem-se dado ênfase especial àquelas que podem melhorar a resolução óptica (vencendo o limite de difração) como as proporcionadas pelos microscópios de campo-próximo (near-field microscopes), que conseguem uma resolução com luz visível de até 50 *nm*. Assim, parece que em termos de microscopia óptica, contraste de fase e DIC estão bem estabelecidas e atingiram seus limites, enquanto que progressos têm sido feitos com as microscopias confocais, de campo-próximo e as não-lineares de multi-fóton. Iremos mostrar que a nossa microscopia de desfocalização é também uma possibilidade competitiva nesta área. Cada técnica de microscopia se adapta melhor a um dado tipo de aplicação. Em trabalhos recentes o nosso grupo mostrou que é possível observar objetos transparentes usando um microscópio operando em campo claro, se este microscópio estiver desfocalizado [1–5]. É surpreendente o contraste que pode ser obtido de deformações na superfície de membranas tão finas quanto 1 μm e com diferenças de índice de refração de 0,05, como mostrado na figura 1.1, que é a imagem de um macrófago ligeiramente desfocalizado. Na figura 1.2 está a imagem de uma hemácia, que deveria ser invisível (para a luz vermelha que está sendo usada na iluminação) se não fosse o efeito de desfocalização. A Física básica envolvida é a seguinte: a luz ao atravessar o objeto transparente é difratada pelas deformações na membrana. A desfocalização introduz uma diferença de fase entre a luz difratada e a luz transmitida (não difratada), que depende da desfocalização. A luz difratada e a transmitida, vinda de um objeto desfocalizado, ao se recombinarem no plano de detecção (no caso na câmera de vídeo), interferem dando origem às variações no contraste da imagem observada. Para o objeto em foco, nenhuma diferença de fase entre a luz difratada e transmitida é introduzida, e o objeto permanece invisível. Assim o microscópio desfocalizado operando em campo claro é uma forma de mi-

microscópio de contraste de fase. O modelo óptico do microscópio desfocalizado usado nas teses [6,7] e trabalhos anteriores [1-5] do nosso grupo é válido para pequenas desfocalizações. Nesta tese melhoramos este modelo e obtivemos expressões teóricas que nos permitem interpretar as imagens de objetos arbitrariamente desfocalizados. Com este novo modelo teórico, nós mostraremos claramente que existem vantagens no uso da nossa técnica de "microscopia de desfocalização" quando comparada com as microscopias de contraste de fase e DIC. Uma das grandes vantagens é que em um material transparente em multicamadas, conseqüentemente com múltiplas interfaces, podemos discriminar a contribuição (rugosidade estática e dinâmica) de cada interface separadamente no contraste da imagem, fazendo uma varredura da posição do plano focal através da amostra. Como as distâncias do plano focal da objetiva às interfaces são diferentes, a luz difratada por estas interfaces estarão afetadas por fases diferentes e então possíveis de serem discriminadas.

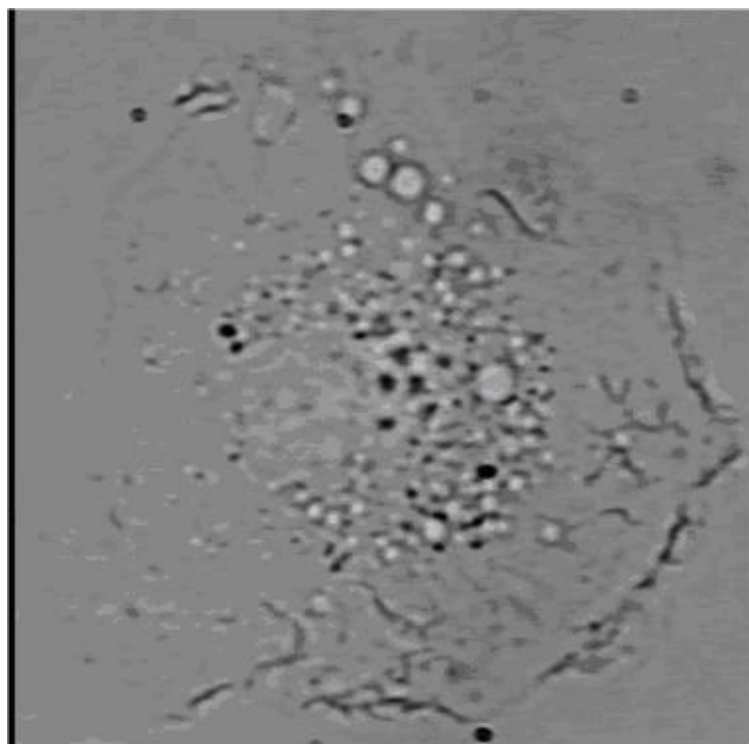


Figura 1.1: Imagem desfocalizada de microscopia de campo-claro de um macrófago.

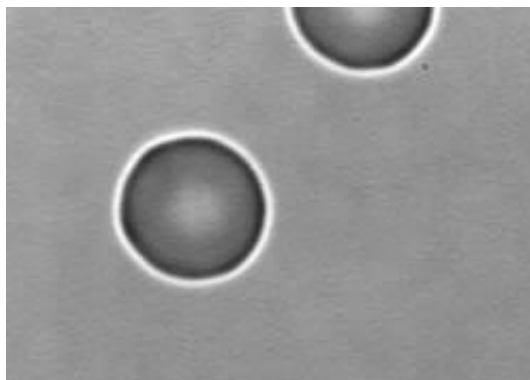


Figura 1.2: Imagem desfocalizada de microscopia de campo-claro de uma hemácia.

A técnica de microscopia de desfocalização será então aplicada ao estudo das flutuações nas superfícies de hemácias. Vários modelos elásticos para hemácias existem na literatura. Embora o primeiro modelo para explicar as flutuações nas superfícies de hemácias tenha sido feito por Brochard e Lennon [14] em 1975, o assunto é ainda bastante controverso e interessante para ter aparecido recentemente em vários *Physical Review Letters* e vários *Physical Review E* [8,15–19]. Mostraremos que a microscopia de desfocalização é muito efetiva nesta área e, com sensibilidade suficiente para que possamos medir flutuações nanométricas da altura da superfície de hemácias. Podemos medir a curvatura média local das superfícies das hemácias, que será importante para comparação com o modelo teórico recente de Auth et al. [8] e fazer uma reconstrução 3-D da superfície da hemácia. Outras técnicas desenvolvidas recentemente como a microscopia de Hilbert [19] dão informação sobre as flutuações da espessura da hemácia e não das superfícies individuais como a nossa. Uma outra técnica que é usada no estudo de flutuações de membrana e foi usada em hemácias é a técnica de RICM (reflection interferometry contrast microscopy) [20], que se vale da interferência entre a luz refletida na superfície de baixo da hemácia e a refletida na lamínula, originando um padrão dinâmico de interferência. Esta técnica tem a desvantagem que a membrana medida tem que estar em contato com a lamínula do microscópio e não se observa a outra superfície livre. Neste aspecto, esta tese tem como um dos objetivos demonstrar que a "microscopia de desfocalização" é uma microscopia óptica com vantagens em relação às técnicas convencionais e outras mais recentes que têm sido usadas no estudo de motilidade de células e de flutua-

ções dinâmicas em membranas e interfaces. Esta tese está dividida da maneira como mostramos a seguir.

Capítulo 1: Introdução.

Capítulo 2: Microscopia de Desfocalização.

O objetivo deste capítulo é o de apresentar com detalhes toda a teoria de microscopia de desfocalização, para que ficasse como uma referência completa para os futuros estudantes e para o laboratório. No nosso modelo de microscopia de desfocalização é usada a aproximação paraxial para propagação do espectro angular da luz difratada, que é equivalente à teoria escalar de difração de Fresnel, o que facilita bastante a manipulação algébrica [21,22]. Decidimos então partir do mais fundamental, ou seja, das Equações de Maxwell, e desenvolver toda a teoria óptica de desfocalização, para objetos de fase (objetos transparentes) com uma e duas interfaces, com fácil generalização para um número qualquer delas. Todas as passagens matemáticas são apresentadas em bastante detalhe, por questões didáticas, e podem ser puladas uma vez que os resultados principais estão devidamente destacados dentro de caixas retangulares. Serão apresentadas cálculos numéricos, usando o modelo desenvolvido, para a determinação da flutuação quadrática média do contraste da imagem de hemácias em função da posição do plano focal da objetiva, usando-se espectros de potência espacial da hemácia, a serem discutidos nos outros capítulos. Estes cálculos numéricos serão mostradas neste capítulo e, um aspecto interessante, é que elas foram realizadas como previsão teórica antes do experimento ser realizado. Veremos na apresentação dos resultados experimentais a excelente concordância entre teoria e experimento.

Capítulo 3: Estrutura da Membrana e Citoesqueleto de Hemácias e Modelos de Elasticidade.

Neste capítulo introduziremos os elementos básicos e definições para se entender elasticidade de materiais em geral [23], de membranas e interfaces [24,25]. Serão definidos os módulos elásticos de curvatura e curvatura Gaussiana, tensão superficial e potencial de confinamento. Serão discutidas as deformações em superfícies bidimensionais com o auxílio de conceitos básicos de geometria diferencial. Deduziremos a

expressão para a energia livre de curvatura (energia livre de Helfrich [26,27]) e a sua generalização para incluir tensão superficial e o potencial de confinamento de flutuações. Obteremos uma expressão para o espectro de potência espacial das flutuações de altura da interface em equilíbrio térmico, que incorpora os efeitos de curvatura, tensão superficial e potencial de confinamento das flutuações. Ainda neste capítulo discutiremos brevemente os modelos mais importantes sobre elasticidade de hemácias e, com mais detalhe, o modelo no qual nos basearemos para analisar nossos resultados experimentais. Embora o estudo de flutuações em hemácias tenha mais de 30 anos de pesquisa, originado no artigo seminal de Brochard e Lennon em 1975 [14], ele é ainda bastante controverso. Somente recentemente a hemácia foi tratada como um sistema elástico composto, onde o acoplamento da membrana lipídica e o citoesqueleto de espectrina é considerado [15,18]. Além disto, resultados experimentais [9,10] indicam que as flutuações na superfície das hemácias não são somente causadas por flutuações térmicas, mas também por processos mediados por ATP (adenosina-trifostato, o combustível das células), transformando energia química diretamente em trabalho mecânico. Para uma análise deste efeito foi introduzido o conceito de temperatura efetiva (maior que a temperatura ambiente), que é uma aproximação que nos permite usar o teorema da equipartição da energia, mesmo nesta situação de não-equilíbrio térmico [9,10,28]. O modelo mais detalhado da interação ATP-citoesqueleto foi feito por Gov et al. [16,17].

Capítulo 4: Metodologia Experimental e Análise de Dados.

Neste capítulo detalharemos o método experimental e a preparação de amostras. O método experimental, bastante simples e direto, consiste em filmar (com uma câmera CCD-MTI) hemácias humanas preparadas na hora (o estudante realmente "dá o sangue"), usando um microscópio óptico Nikon TE300 operando em campo-claro, mas cuja desfocalização é cuidadosamente controlada, através de um deslocador com precisão nanométrica da Physik Instruments, ao longo do eixo-z. Da análise das imagens em função da desfocalização, obtemos o contraste em função da posição e do tempo.

Capítulo 5: Resultados e Discussões.

Neste capítulo apresentaremos os resultados principais desta tese. Os dados ex-

perimentais serão analisados usando o modelo elástico de Auth et al. [8]. Este é um modelo que ainda necessita o escrutínio dos pesquisadores da área. Dentro do intervalo de vetores de onda estudados com nossa técnica, a concordância entre experimento e teoria foi excelente. A nossa técnica permitiu que o número de parâmetros ajustáveis na teoria, que era de quatro para duas superfícies, fosse reduzido a dois (o módulo de curvatura da membrana lipídica e o módulo de cisalhamento do citoesqueleto de espectrina, normalizados pela energia térmica efetiva), aumentando a confiabilidade da análise realizada.

Capítulo 6: Conclusões e Perspectivas.

Neste capítulo apresentaremos as conclusões e perspectivas deste trabalho.

Capítulo 2

Microscopia de Desfocalização

Este capítulo será dedicado ao desenvolvimento do nosso modelo teórico para a determinação do campo elétrico, quando uma fonte de luz, como aquela do nosso microscópio, é utilizada para analisar as imagens de membranas biológicas (amostras). Usaremos técnica usuais de óptica de Fourier [21,22]. Detalharemos todas as passagens matemáticas envolvidas construindo a teoria a partir das equações básicas de Maxwell, fazendo o campo elétrico interagir com estruturas, tais como lentes e objetos finos e transparentes, como por exemplo, as membranas de células. Neste estudo que envolve amplitudes e fases dos campos elétricos, que serão difratados pelos objetos em estudo, é conveniente descrever o campo elétrico como uma superposição de ondas difratadas. Assim o campo elétrico terá uma descrição no espaço de Fourier bidimensional no plano perpendicular à direção de propagação, que se mostrará bastante conveniente.

2.1 Microscopia de Contraste de Fase

Esta técnica foi inventada por F. Zernike em 1935 (prêmio Nobel e 1953) e revolucionou as pesquisas das células biológicas [21]. O contraste de fase é ideal quando se analisam imagens de objetos finos e transparentes como por exemplo células com um núcleo de espessura de até $10\mu m$ e parte das bordas com espessura de cerca $1\mu m$ como mostrado na figura 2.1. Estes objetos mudam a fase da luz, mas não a sua amplitude e portanto são transparentes, já que não geram diferenças de intensidade luminosa na imagem. Na figura 2.2 é mostrada a comparação de uma imagem de células, onde na figura 2.2 (A), com um microscópio tradicional, as células aparecem semi-transparente com só regiões altamente refratadas, assim as membranas, os núcleos são visíveis, e na figura 2.2 (B), quando observamos usando o contraste de fase, a mesma imagem revela mais detalhes significativos das estruturas das células.

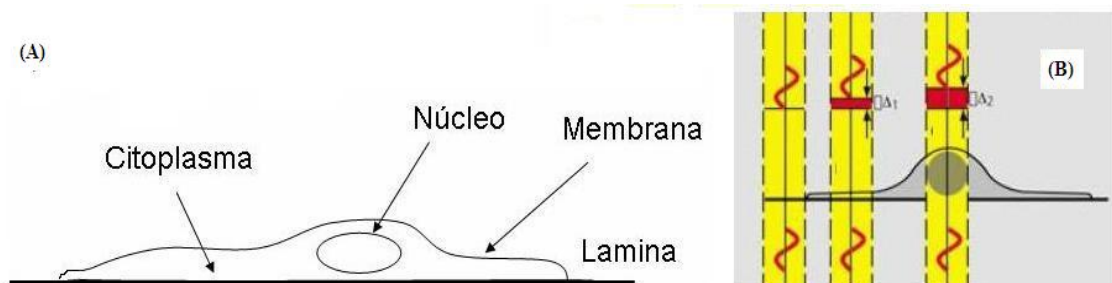


Figura 2.1: (A) Perfil do objeto de fase (célula aderida em uma lâmina de vidro); (B) diferenças de fase na absorção da luz por parte do objeto de fase.

Existe uma vasta literatura com a descrição e os cálculos para um microscópio do contraste de fase [12]. O que nós queremos fazer nesta seção, é uma breve introdução à física do contraste de fase, por isso, em linha gerais, o campo elétrico da luz ao atravessar um objeto de fase é difratado e vale $E_0 e^{i\varphi(\vec{\rho})}$, com $\varphi(\vec{\rho}) = \Delta n k_0 h(\vec{\rho})$, onde Δn é a diferença de índice de refração entre o objeto de fase e o meio, $h(\vec{\rho})$ é a espessura do objeto de fase e k_0 é o número de onda da luz no vácuo. Depois

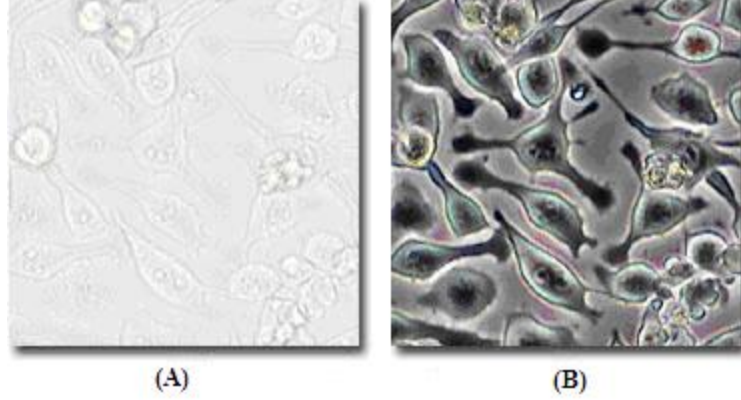


Figura 2.2: Imagens com microscópio (A) normal e (B) com contraste de fase.

de propagar através de um microscópio operando em campo claro, o campo elétrico no plano imagem I , vale $E_I = CE_0 e^{i\varphi(\vec{\rho})}$, onde $\rho' = M\rho$, e $M = \frac{f_1}{f_2}$ é o fator de magnificação do microscópio, como mostraremos na próxima seção. Portanto a intensidade de luz resultante será constante e conseqüentemente o contraste será nulo. Se a diferença de fase $\varphi(\vec{\rho})$ introduzida pelo objeto de fase é pequena, podemos expandir o campo elétrico da luz em primeira ordem nesta diferença,

$$E_0 e^{i\varphi(\vec{\rho})} \approx E_0 [1 - i\varphi(\vec{\rho})], \quad (2.1)$$

onde estão representados, em contra-fase de $\frac{\pi}{2}$, o campo elétrico da luz transmitida E_0 e o campo elétrico da luz difratado $iE_0\varphi(\vec{\rho})$. Ao mantermos tal contra-fase o contraste resultante será nulo. Por outro lado, se introduzirmos uma defasagem no campo da luz transmitida de $\pm\frac{\pi}{2}$, que é, de fato, a idéia principal do físico F. Zernike, obteremos

$$E_I = iE_0 [\pm 1 - \varphi(\vec{\rho})], \quad (2.2)$$

portanto a intensidade não será mais constante, mas terá o valor a seguir, em primeira ordem de $\varphi(\vec{\rho})$

$$I(\vec{\rho}) = |E_0|^2 [1 \pm 2\varphi(\vec{\rho})]. \quad (2.3)$$

Conseqüentemente o contraste será

$$C = \frac{|E_I|^2 - |E_0|^2}{|E_0|^2} = 2\varphi(\vec{\rho}), \quad (2.4)$$

e o objeto de fase se tornará visível, sendo o contraste proporcional à espessura do objeto, neste limite onde $\varphi = \Delta n k_0 h \ll 1$. A defasagem de $\pm \frac{\pi}{2}$ é conseguida no microscópio de contraste de fase, usando-se uma placa de fase, como indicado na figura 2.3.

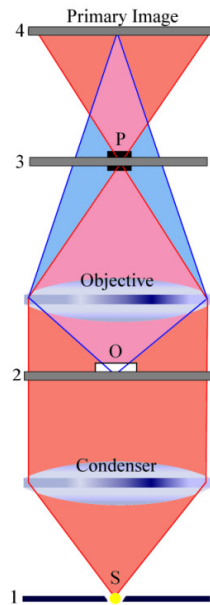


Figura 2.3: Representação esquemática do sistema óptico para um microscópio de contraste de fase.

Nesta figura, a fonte de luz S (plano 1) está no foco do condensador. Após o condensador tem-se então uma iluminação com raios paralelos. No plano 2, esta luz paralela após passar pela lamínula de vidro do microscópio e pelo objeto O (parte da luz que passa pelo objeto sem ser difratada - luz transmitida) é focalizada no plano 3 (plano focal traseiro da objetiva). Nesta região do foco traseiro está a placa de fase P , que causa uma mudança de fase de $\frac{\pi}{2}$ na luz transmitida. A parte da luz que é difratada pelo objeto é conjugada pela objetiva no plano imagem 4 e interfere com

a luz transmitida, originando assim a imagem de contraste de fase. Uma pequena porção da luz difratada pelo objeto, também passa pela placa de fase e, portanto, sofre a mudança de fase. Esta é, no entanto, uma fração muito pequena da luz difratada, que não prejudica a qualidade da imagem.

2.2 Espectro Angular do Campo Elétrico da Luz

2.2.1 A Equação de Helmholtz

A partir das equações de Maxwell livres de fontes,

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}, \quad (2.5a)$$

$$\nabla \times \vec{H} = -\frac{\partial \vec{D}}{\partial t}, \quad (2.5b)$$

$$\nabla \cdot \vec{E} = 0, \quad (2.5c)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (2.5d)$$

e com as equações que ligam a matéria ao campo eletromagnético para um meio linear, homogêneo e isotrópico,

$$\vec{B} = \mu \vec{H}, \quad (2.6a)$$

$$\vec{D} = \epsilon \vec{E} \quad (2.6b)$$

obtemos

$$\frac{1}{\mu} \nabla \times \vec{B} = \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}. \quad (2.7)$$

Aplicando o operador ∇ em ambos os lados de 2.5a para o campo elétrico teremos que

$$\begin{aligned} \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\frac{\partial}{\partial t} (\nabla \times \vec{B}) \\ &= -\frac{\partial}{\partial t} \left(\epsilon \mu \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right), \end{aligned} \quad (2.8)$$

usando a relação vetorial

$$\vec{A} \times (\vec{B} \times \vec{C}) = (\vec{A} \cdot \vec{C})\vec{B} - (\vec{A} \cdot \vec{B})\vec{C}, \quad (2.9)$$

então a equação 2.8 torna-se

$$\nabla(\nabla \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} = -\epsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}, \quad (2.10)$$

daqui segue a equação de onda

$$\nabla^2 \vec{E} = \epsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}. \quad (2.11)$$

A solução de onda plana da equação 2.11 é

$$E(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{\pm i(\vec{k}_0 \cdot \vec{r} - \omega t)}, \quad (2.12)$$

onde $\vec{k} \cdot \vec{E}_0 = 0$ e

$$k = \frac{\omega}{v} = \omega\sqrt{\epsilon\mu} \Rightarrow v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}}, \quad (2.13)$$

sendo que no vácuo vale

$$k_0 = \frac{\omega}{c} = \omega\sqrt{\epsilon_0\mu_0}, \quad (2.14)$$

e os valores das constantes mostradas a seguir

$$\begin{aligned} \epsilon_0 &= \frac{1}{36\pi} \cdot 10^{-9} = 8,85 \cdot 10^{-12} \left[\frac{C^2}{Nm^2} \right], \\ \mu_0 &= 4\pi \cdot 10^{-7} \left[\frac{Ns^2}{C^2} \right], \\ c &= \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0\mu_0}} \approx 3 \cdot 10^8 \left[\frac{m}{s} \right]. \end{aligned}$$

Através destas definições encontramos o índice de refração do meio

$$n = \frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}}. \quad (2.15)$$

Portanto substituindo na equação de onda 2.11 a equação 2.13, encontraremos

$$\begin{aligned} \nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) &= -\omega^2 \epsilon \mu \vec{E}(\vec{r}) \\ \nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + \frac{\omega^2}{v^2} \vec{E}(\vec{r}) &= 0, \end{aligned} \quad (2.16)$$

ou seja,

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + k^2 \vec{E}(\vec{r}) = 0. \quad (2.17)$$

A equação 2.17 é chamada Equação de Helmholtz.

2.2.2 Propagação Livre do Espectro Angular

Considerando o Campo Elétrico \vec{E} se propagando com uma polarização linear fixa, podemos representa-lo pelo campo escalar $E(\vec{r}, t)$. Como veremos posteriormente, por consistência, iremos considerar somente a aproximação escalar para a difração. Considerando o sistema de referência de figura 2.4

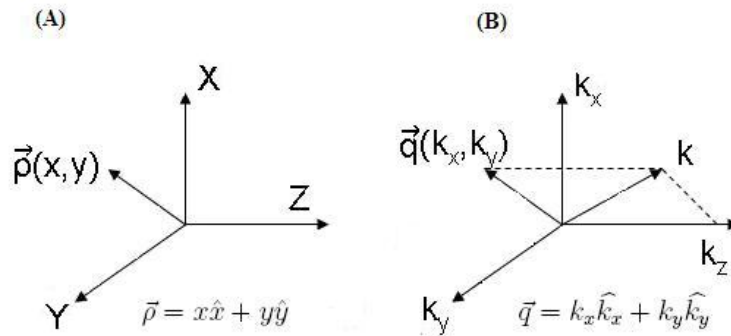


Figura 2.4: Coordenadas do sistema de referência: (A) no espaço real; (B) no espaço de Fourier dos vetores de ondas.

Podemos definir a transformada de Fourier no plano xy , perpendicular a direção de propagação z , por

$$\mathfrak{F}\{g(\vec{\rho})\} = G(\vec{q}) = \int g(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}, \quad (2.18)$$

onde $\int d\vec{\rho} = \int_{-\infty}^{+\infty} dx \int_{-\infty}^{+\infty} dy$, e a transformada inversa

$$\mathfrak{F}^{-1}\{G(\vec{q})\} = g(\vec{\rho}) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int G(\vec{q}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (2.19)$$

onde $\int d\vec{q} = \int_{-\infty}^{+\infty} dq_x \int_{-\infty}^{+\infty} dq_y$. Usando o formalismo do espectro angular para a propagação do campo elétrico [21,22], considerando-se uma única polarização fixa, podemos representar as transformadas de Fourier no plano (x, y) , como sendo

$$E(\vec{\rho}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (2.20)$$

onde o espectro angular $A(\vec{q}, z)$ é a transformada inversa, que vale

$$A(\vec{q}, z) = \int E(\vec{\rho}, z) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}, \quad (2.21)$$

onde $\vec{\rho}$ é o vector posição e \vec{q} o vector de onda ambos no plano (x, y) , com a luz se propagando ao longo de z . Portanto, vamos substituir na Equação de Helmholtz 2.17 o campo elétrico definido na equação 2.20

$$\frac{1}{(2\pi)^2} \int \nabla^2 \{A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}}\} d\vec{q} + \frac{k^2}{(2\pi)^2} \int A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} = 0,$$

$$\frac{1}{(2\pi)^2} \int \left\{ \left[\nabla_{\parallel}^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right\} d\vec{q} = 0,$$

$$\frac{1}{(2\pi)^2} \int \left\{ \left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) \right\} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} = 0. \quad (2.22)$$

Para que esta equação seja válida, o integrando deverá ser nulo, ou seja,

$$\left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) = 0, \quad (2.23)$$

sendo que $k_z^2 = k^2 - q^2$, então a equação 2.23 torna-se

$$\frac{\partial^2 A(\vec{q}, z)}{\partial z^2} + k_z^2 A(\vec{q}, z) = 0, \quad (2.24)$$

que tem solução do tipo

$$\begin{aligned} A(\vec{q}, z) &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k_z z} \\ &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k z \sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}}}. \end{aligned} \quad (2.25)$$

Vemos que para $q < k$ as soluções para o espectro angular são ondas propagantes. Por outro lado para $q > k$ o espectro decai exponencialmente e tem-se ondas evanescentes. Com um microscópio óptico convencional observamos a luz com $q < k$; com um microscópio de campo próximo (near-field) observamos luz com $q > k$. Uma grande simplificação nos cálculos é conseguida usando-se a aproximação paraxial, onde $q \ll k$, tal que teremos

$$k_z = \sqrt{k^2 - q^2} \simeq k - \frac{q^2}{2k}, \quad (2.26)$$

portanto reescrevemos a equação 2.25 para uma onda propagando-se para a direita, como

$$A(\vec{q}, z) = A(\vec{q}, 0) e^{i k z} e^{-i \frac{q^2}{2k} z}. \quad (2.27)$$

Fazer os cálculos além da aproximação paraxial, é uma tarefa bastante árdua, sendo necessário expandir a equação 2.26 com muitos dos seus termos, já que esta série converge lentamente. Além disso, fisicamente para feixes de luz convergentes os efeitos devido a polarização devem ser levados em conta, ou seja, a teoria escalar de difração não seria mais apropriada, tendo que ser introduzida a teoria vectorial, o que complica ainda mais a análise. Entretanto, no capítulo 4 mostraremos que a teoria paraxial fornece resultados bastante compatíveis com os nossos resultados experimentais. Com isso podemos observar que o espectro angular total difratado será uma superposição dos espectros $A(\vec{q}, z)$ sobre os various \vec{q} e a aproximação paraxial é equivalente a *aproximação de Fresnel* para difração.

2.2.3 Propagação do Espectro Angular através de uma Lente Delgada

Quando uma onda passa através de uma lente, ocorre um retardamento da sua fase. Este efeito é considerado no cálculo do campo depois da lente $E_l(\vec{\rho})$, através de

$$E_l(\vec{\rho}) = t_\ell(\vec{\rho})E_0(\vec{\rho}), \quad (2.28)$$

onde

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{i\phi(\vec{\rho})}, \quad (2.29)$$

sendo que $\phi(\vec{\rho})$ é a diferença de fase causada pela lente e $t_\ell(\vec{\rho})$ é chamada de transmissividade da lente. Pela figura 2.5 vemos que a diferença de fase introduzida pela lente é

$$\phi(\vec{\rho}) = k_0 n_m \Delta_0 + k_0 (n_1 - n_m) \Delta(\vec{\rho}), \quad (2.30)$$

onde k_0 é o módulo do vetor de onda da luz no vácuo, n_1 é o índice de refração da lente e n_m é o índice de refração do meio.

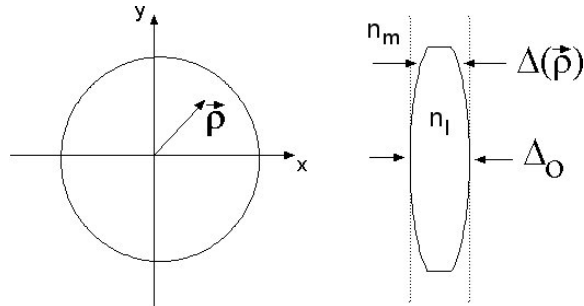


Figura 2.5: Representação das coordenadas e espessura da lente delgada.

Para encontrar uma expressão para as diferenças de fase na lente devemos definir o sinal do raio de curvatura da lente. Considerando a propagação da luz no sentido da esquerda para a direita, uma superfície convexa possui raio positivo e uma superfície côncava possui o raio negativo. Com essa definição e observando a figura 2.6 podemos calcular as diferenças de caminho.

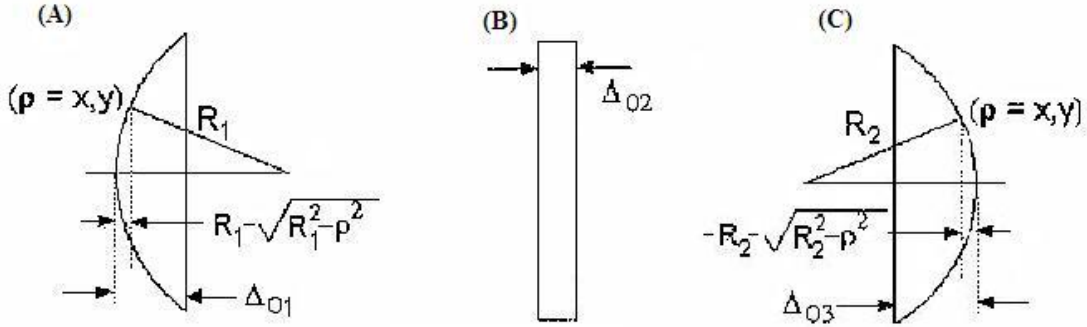


Figura 2.6: Representação do tamanho das seções de cada segmento da lente. (A) e (C) são os segmentos laterais, (B) do segmento central

Da figura 2.6 (A) temos

$$\Delta_1(\vec{\rho}) = \Delta_{01} - \left(R_1 - \sqrt{R_1^2 - \rho^2} \right) = \Delta_{01} - R_1 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{R_1^2}} \right). \quad (2.31)$$

Da figura 2.6 (B) temos

$$\Delta_2(\vec{\rho}) = \Delta_{02}. \quad (2.32)$$

Da figura 2.6 (C) temos

$$\Delta_3(\vec{\rho}) = \Delta_{03} - \left(-R_2 - \sqrt{R_2^2 - \rho^2} \right) = \Delta_{03} + R_2 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\rho^2}{R_2^2}} \right). \quad (2.33)$$

Utilizando a aproximação paraxial onde $\sqrt{1 - \frac{\rho^2}{R^2}} \cong 1 - \frac{\rho^2}{2R^2}$, encontramos que

$$\begin{aligned}
\Delta(\vec{\rho}) &= \Delta_1(\vec{\rho}) + \Delta_2(\vec{\rho}) + \Delta_3(\vec{\rho}) \\
&= \Delta_0 - \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right),
\end{aligned} \tag{2.34}$$

onde $\Delta_0 = \Delta_{01} + \Delta_2 + \Delta_{03}$. Substituindo a expressão 2.34 em 2.30 e colocando o resultado na expressão da lente 2.29 obtemos o resultado a seguir

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{ik_0 n_1 \Delta_0} e^{-ik_0(n_1 - n_m) \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right)}. \tag{2.35}$$

Substituindo a equação dos fabricantes de lentes a seguir (onde f é a distância focal da lente), na equação acima e retirando os termos que representam uma mudança de fase constante

$$\frac{1}{f} = \frac{n_1 - n_m}{n_m} \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right), \tag{2.36}$$

encontramos a expressão genérica para a transmissividade da lente

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i \frac{k_0 n_m}{2f} \rho^2}, \tag{2.37}$$

ou

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i \frac{k}{2f} \rho^2}, \tag{2.38}$$

onde k é o módulo do vetor de onda da luz no meio. O espectro angular da luz ao passar pela lente ficará então

$$A_\ell(\vec{q}, z) = \int E(\vec{\rho}, z) t_\ell(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} = \left(\frac{1}{2\pi} \right)^2 A(\vec{q}, z) \otimes T_\ell(\vec{q}), \tag{2.39}$$

onde o símbolo \otimes significa convolução e $T_\ell(\vec{q})$ é a transformada de Fourier bidimensional de $t_\ell(\vec{\rho})$. Vamos então calcular $T_\ell(\vec{q})$,

$$\begin{aligned}
T_\ell(\vec{q}) &= \mathfrak{F}\{t_\ell(\vec{\rho})\} \\
&= \int t_\ell(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \\
&= \int e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \\
&= \int e^{-i(\frac{k}{2f}\rho^2 + i\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{\rho} \\
&= \int e^{-i(\frac{k}{2f}\rho^2 + \vec{q}\cdot\vec{\rho} + \frac{f}{2k}q^2) - i(-\frac{f}{2k}q^2)} d\vec{\rho} \\
&= \int e^{-i|\sqrt{\frac{k}{2f}}\vec{\rho} + \sqrt{\frac{f}{2k}}\vec{q}|^2 - i(-\frac{f}{2k}q^2)} d\vec{\rho} \\
&= e^{i(\frac{f}{2k}q^2)} \int e^{-i|\sqrt{\frac{k}{2f}}\vec{\rho} + \sqrt{\frac{f}{2k}}\vec{q}|^2} d\vec{\rho}. \tag{2.40}
\end{aligned}$$

Fazendo uma troca de variáveis que segue,

$$\vec{\varepsilon}' = \sqrt{\frac{k}{2f}}\vec{\rho} + \sqrt{\frac{f}{2k}}\vec{q} \Rightarrow d\vec{\varepsilon}' = \sqrt{\frac{k}{2f}} d\vec{\rho} \tag{2.41}$$

e conhecendo o valor da integral

$$\int_{-\infty}^{+\infty} e^{-ax^2} dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}}, \tag{2.42}$$

a equação 2.40 terá solução

$$\begin{aligned}
T_\ell(\vec{q}) &= e^{i(\frac{f}{2k}q^2)} \int e^{-i\varepsilon'^2} \sqrt{\frac{2f}{k}} d\vec{\varepsilon}' \\
&= \sqrt{\frac{2f}{k}} e^{i\frac{f}{2k}q^2} \int e^{-i\varepsilon'^2} d\vec{\varepsilon}' \\
&= \sqrt{\frac{2\pi f}{ik}} e^{i\frac{f}{2k}q^2}. \tag{2.43}
\end{aligned}$$

Utilizando a importante propriedade de convolução da transformada de Fourier a seguir

$$\mathfrak{F}^{-1}\{G(\vec{q})H(\vec{q})\} = g(\vec{\rho}) \otimes h(\vec{\rho}) = \int g(\vec{\rho}')h(\vec{\rho} - \vec{\rho}')d\vec{\rho}', \quad (2.44)$$

o espectro angular da equação 2.39 torna-se

$$\begin{aligned} A_\ell(\vec{q}, z) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{\xi})T_\ell(\vec{q} - \vec{\xi}) d\vec{\xi} \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f}{ik}} \int A_0(\vec{\xi}) e^{i\frac{f}{2k}(\vec{q}-\vec{\xi})^2} d\vec{\xi}. \end{aligned} \quad (2.45)$$

que representa o espectro angular através de uma lente delgada.

2.3 Propagação do Espectro Angular através do Microscópio Desfocalizado

O microscópio utilizado possui a objetiva com óptica corrigida no infinito, isto significa que a imagem é conjugada no infinito. Com tal objetiva é necessário introduzir uma outra lente chamada de lente de tubo para que se consiga conjugar a imagem da objetiva na ocular ou na camera. Na figura 2.7 esta representado o esquema do nosso microscópio. Nosso modelo óptico consiste em considerar as lentes como delgadas, o que é uma aproximação, mas compatíveis com a aproximação paraxial, que já vem sendo usada pelo nosso grupo.

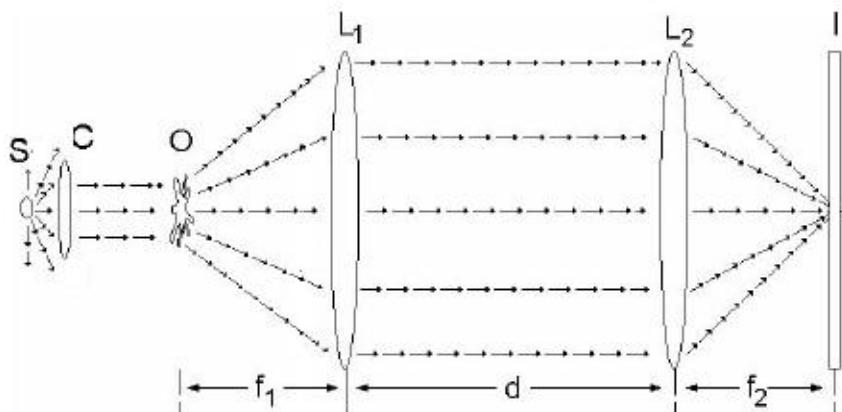


Figura 2.7: Esquema óptico do nosso microscópio: S é a fonte de luz (lâmpada halógena de tungstênio), C é a lente do condensador, L_1 é a lente objetiva, L_2 é a lente de tubo, f_1 e f_2 são as distâncias focais, O é objeto que está no foco de L_1 , d é a distância entre as lentes e o plano imagem I está no plano focal de L_2 .

O escopo desta seção é encontrar uma equação para a imagem desfocalizada, por isso, vamos supor que o objeto esteja desfocalizado de uma distância Δf , como mostrado na figura 2.8 a seguir [1].

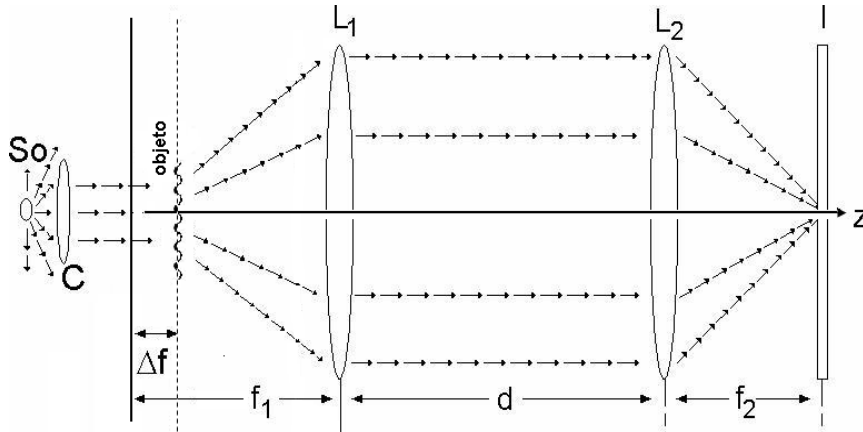


Figura 2.8: Esquema do microscópio desfocalizado: objeto está desfocalizado de uma pequena distância Δf ; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I.

Consideramos o campo elétrico incidente escalar $E(\vec{\rho}, 0)$ que se propaga na direção z e varia dentro de um plano perpendicular à propagação identificado pelo vetor $\vec{\rho}(x, y)$. Para determinar o espectro angular final utilizaremos cinco passos para a propagação:

1. da posição $z = 0$ no objeto até a lente L_1 em $z = f_1 - \Delta f$ através do meio com índice de refração n ;
2. através da lente L_1 ;
3. da lente L_1 até à lente L_2 por uma distância d através do ar;
4. através da lente L_2 ;
5. da lente L_2 até o plano I por uma distância f_2 através do ar, onde o número de onda da luz no meio é $k = nk_0$ e no ar k_0 .

Para o passo (1) aplicamos a equação de propagação do espectro angular no espaço livre da equação 2.27

$$A_1(\vec{q}, f_1 - \Delta f) = A(\vec{q}, 0) e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{-i\frac{q^2}{2k}(f_1 - \Delta f)}. \quad (2.46)$$

Por outro lado, no passo (2), vamos aplicar a equação 2.45 válida para o espectro angular que atravessa uma lente delgada

$$\begin{aligned} A_2(\vec{q}, f_1 - \Delta f) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} \int A_1(\vec{\xi}) e^{i\frac{f_1}{2k}(\vec{q} - \vec{\xi})^2} d\vec{\xi} \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} \int A_0(\vec{\xi}) e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{-i\frac{\xi^2}{2k}(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}(q^2 - 2\vec{q}\cdot\vec{\xi} + \xi^2)} d\vec{\xi} \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1 - \Delta f)} \int A_0(\vec{\xi}) e^{-i\frac{\xi^2}{2k}(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}q^2} e^{i\frac{f_1}{2k}\xi^2} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}\cdot\vec{\xi})} d\vec{\xi} \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1 - \Delta f)} \int B(\vec{\xi}) e^{i\frac{f_1}{2k}q^2} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}\cdot\vec{\xi})} d\vec{\xi} \\ &= \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1 - \Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}q^2} b_0\left(\frac{-f_1}{k}\vec{q}\right). \end{aligned} \quad (2.47)$$

Definimos ainda a variável $B(\vec{\xi})$ como segue

$$B(\vec{\xi}) = A_0(\vec{\xi}) e^{i\frac{\Delta f \xi^2}{2k}} \quad (2.48)$$

e

$$b_0\left(\frac{-f_1}{k}\vec{q}\right) = \mathfrak{F}^{-1}\{B(\vec{\xi})\} = \frac{1}{(2\pi)^2} \int B(\vec{\xi}) e^{-i\frac{f_1}{k}\vec{q}\cdot\vec{\xi}} d\vec{\xi}. \quad (2.49)$$

No passo (3), aplicamos a equação 2.27 considerando o espectro inicial $A_2(\vec{q})$ da equação 2.47

$$\begin{aligned} A_3(\vec{q}, d) &= A_2(\vec{q}) e^{ik_0 d} e^{-i\frac{q^2}{2k_0}d} \\ &= \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{i(kf_1 + k_0 d - k\Delta f)} e^{i\left(\frac{f_1}{2k} - \frac{d}{2k_0}\right)q^2} b_0\left(\frac{-f_1}{k}\vec{q}\right). \end{aligned} \quad (2.50)$$

No passo (4), aplicamos o espectro angular para uma lente, ou seja, a equação 2.45, considerando o espectro inicial $A_3(\vec{q})$ da equação 2.50

$$\begin{aligned}
A_4(\vec{q}, d) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_2}{ik_0}} \int A_3(\vec{\eta}) e^{i\frac{f_2}{2k_0}(\vec{q}-\vec{\eta})^2} d\vec{\eta} \\
&= -\frac{i}{2\pi} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{kk_0}} e^{i(kf_1+k_0d-k\Delta f)} e^{i\frac{f_2}{2k_0}q^2} \int e^{i\left(\frac{f_1}{2k}+\frac{f_2}{2k_0}-\frac{d}{2k_0}\right)\eta^2} b_0\left(\frac{-f_1}{k}\vec{\eta}\right) e^{-i\frac{f_2}{k_0}\vec{q}\cdot\vec{\eta}} d\vec{\eta}.
\end{aligned} \tag{2.51}$$

O último passo (5), aplicamos a equação 2.27, considerando o espectro inicial da equação 2.51

$$\begin{aligned}
A_5(\vec{q}, f_2) &= A_4(\vec{q}) e^{ik_0 f_2} e^{-i\frac{q^2}{2k_0} f_2} \\
&= -\frac{i}{2\pi} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{kk_0}} e^{i(kf_1+k_0d+k_0f_2-k\Delta f)} \int e^{i\left(\frac{f_1}{2k}+\frac{f_2}{2k_0}-\frac{d}{2k_0}\right)\eta^2} b_0\left(\frac{-f_1}{k}\vec{\eta}\right) e^{-i\frac{f_2}{k_0}\vec{q}\cdot\vec{\eta}} d\vec{\eta}.
\end{aligned} \tag{2.52}$$

Fazendo a troca de variáveis a seguir

$$\begin{aligned}
\vec{\rho}' &= -\frac{f_1}{k}\vec{\eta}, \\
d\vec{\eta} &= -\frac{k}{f_1}d\vec{\rho}',
\end{aligned} \tag{2.53}$$

a equação 2.52 torna-se

$$A_5(\vec{q}, f_2) = \frac{i}{2\pi} \sqrt{\frac{k_0 f_2}{k f_1}} e^{i(kf_1+k_0d+k_0f_2-k\Delta f)} \int b_0(\vec{\rho}') e^{i\frac{k^2}{f_1^2}\left(\frac{f_1}{2k}+\frac{f_2}{2k_0}-\frac{d}{2k_0}\right)\rho'^2} e^{i\frac{kf_2}{k_0 f_1}\vec{q}\cdot\vec{\rho}'} d\vec{\rho}', \tag{2.54}$$

que representa o espectro angular através do microscópio desfocalizado no plano imagem. As expressões obtidas nesta seção são ligeiramente diferentes das obtidas em Agero et al. [1], porque consideramos números de onda diferentes para as propagações até à objetiva (k) e da objetiva até à câmera de vídeo (k_0).

2.4 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado

Vamos calcular agora o campo elétrico da equação 2.20, considerando o espectro angular $A_5(\vec{q})$ encontrado no ítem anterior

$$\begin{aligned} E(\vec{\rho}, z) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_5(\vec{q}) e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q} \\ &= \frac{i}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_2}{k f_1}} e^{i\alpha} \int \int b_0(\vec{\rho}') e^{i\alpha' \rho'^2} e^{i\frac{k_0 f_2}{k f_1} (\vec{q}\cdot\vec{\rho}')} e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q} d\vec{\rho}', \end{aligned} \quad (2.55)$$

onde $\alpha \equiv k f_1 + k_0 d + k_0 f_2 - k \Delta f$ e $\alpha' \equiv \frac{k^2}{f_1^2} \left(\frac{f_1}{2k} + \frac{f_2}{2k_0} - \frac{d}{2k_0} \right)$. Através da definição da função delta

$$\delta(\vec{\rho}) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q}, \quad (2.56)$$

podemos observar que a equação 2.55 torna-se

$$\begin{aligned} E(\vec{\rho}, z) &= \frac{i}{(2\pi)} \sqrt{\frac{k_0 f_2}{k f_1}} e^{i\alpha} \int b_0(\vec{\rho}') e^{i\alpha' \rho'^2} \delta\left(\frac{k f_2}{k_0 f_1} \vec{\rho}' + \vec{\rho}\right) d\vec{\rho}' \\ &= \frac{i}{(2\pi)} \sqrt{\frac{k_0 f_2}{k f_1}} e^{i\alpha} b_0\left(\frac{-k_0 f_1}{k f_2} \vec{\rho}\right) e^{-i\alpha' \frac{k_0 f_1}{k f_2} \rho^2}. \end{aligned} \quad (2.57)$$

Usando a definição dada pela equação 2.49 podemos escrever

$$b_0\left(\frac{-k_0 f_1}{k f_2} \vec{\rho}\right) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}) e^{i\frac{\Delta f q^2}{2k}} e^{-i\frac{k_0 f_1}{k f_2} (\vec{\rho}\cdot\vec{q})} d\vec{q}, \quad (2.58)$$

portanto a equação do campo elétrico 2.57 resultará

$$E(\vec{\rho}, z) = \frac{i}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_2}{k f_1}} e^{i\alpha} e^{-i\alpha' \frac{k_0 f_1}{k f_2} \rho^2} \int A_0(\vec{q}) e^{i\frac{\Delta f q^2}{2k}} e^{-i\frac{k_0 f_1}{k f_2} (\vec{\rho}\cdot\vec{q})} d\vec{q}. \quad (2.59)$$

Fazemos uma troca de variável, onde $\vec{\rho}'$ é a coordenada no plano imagem e $\vec{\rho}$ no plano objeto,

$$\vec{\rho}' = -\frac{k_0 f_1}{k f_2} \vec{\rho} \quad (2.60)$$

sendo o termo $\frac{k_0 f_1}{k f_2}$ o fator de magnificação do microscópio e o sinal negativo significa que a imagem é invertida. Agrupando as fases fora da integral em $\beta(\rho')$ e a constante $C = \frac{i}{2\pi} \sqrt{\frac{k_0 f_2}{k f_1}}$, podemos finalmente reescrever o campo elétrico como

$$E(\vec{\rho}') = C \frac{e^{i\beta(\rho')}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}'} d\vec{q}.$$

Para não sobrecarregar muito a notação mudaremos ρ' para ρ novamente, onde agora $\vec{\rho}$ especifica uma posição sobre a imagem, tal que

$$E(\vec{\rho}) = C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho})}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}) e^{i\frac{\Delta f}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q}. \quad (2.61)$$

Podemos observar que quando não temos desfocalização, ou seja $\Delta f = 0$, a equação 2.61 do campo elétrico torna-se,

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{i\beta(\vec{\rho})} e^{i\varphi}, \quad (2.62)$$

onde

$$E_0 e^{i\varphi} = \frac{C}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q},$$

portanto a intensidade correspondente vale $I(\vec{\rho}) = |E(\vec{\rho})|^2 = I_0$, então o contraste $C = \frac{I-I_0}{I_0} = 0$, o que significa que objetos transparentes não serão visíveis. Observamos que para $\Delta f \neq 0$, a desfocalização introduz uma diferença de fase ($\frac{\Delta f q^2}{2k}$) entre a luz difratada com vetor de onda \vec{q} e a luz transmitida (não-difratada, $q = 0$). É a interferência entre a luz transmitida e a difratada no plano imagem, que torna o objeto de fase visível. O microscópio desfocalizado é então um microscópio de contraste de fase, mas como veremos, com vantagens em relação ao microscópio de contraste de fase convencional.

2.5 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado através de um Objeto de Fase

Analisaremos neste seção o comportamento do campo elétrico da luz através de um objeto de fase, usando a teoria desenvolvida na seção anterior. O objeto de fase a ser observado pelo microscópio é mostrado na figura 2.9.

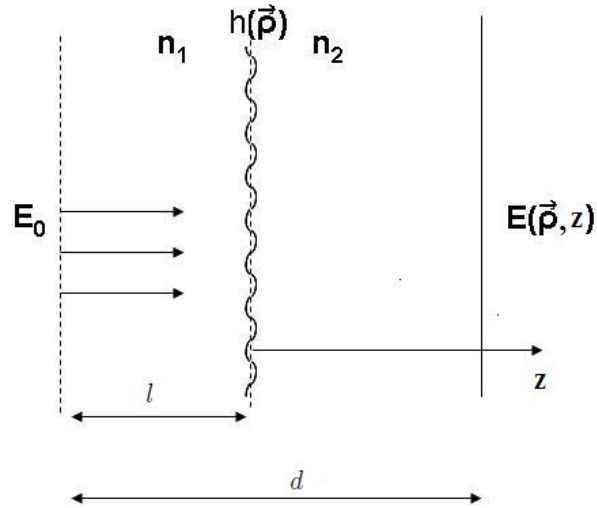


Figura 2.9: Geometria da propagação do campo elétrico através de uma interface ondulada: E_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\xi})$ é a amplitude da ondulação da interface ondulada; n_1 e n_2 são os índices de refração do meio antes e depois da interface onde o campo elétrico se propaga; $\vec{\xi}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico.

2.5.1 Contraste da Intensidade de Luz da Imagem $C(\vec{\rho})$

Se não existisse a interface, a variação da fase do campo elétrico no espaço livre propagando a uma distância d em um meio com índice de refração n_1 seria

$$\varphi_0 = n_1 k_0 d. \quad (2.63)$$

Considerando agora a interface, a variação de fase torna-se

$$\varphi_1 = n_1 k_0 (l + h) + n_2 k_0 [d - (l + h)], \quad (2.64)$$

portanto a diferença de fase vale

$$\begin{aligned} \Delta\varphi &= \varphi_1 - \varphi_0 \\ &= (n_1 - n_2)k_0(l - d) + (n_1 - n_2)k_0h \\ &= -\Delta n k_0(l - d) - \Delta n k_0h \\ &= \text{constante} + \varphi(\vec{\rho}), \end{aligned} \quad (2.65)$$

onde $\Delta n = n_2 - n_1$ e

$$\varphi(\vec{\rho}) = -\Delta n k_0 h(\vec{\rho}). \quad (2.66)$$

Podemos escrever o campo elétrico da seguinte forma,

$$E = E_0 e^{i\varphi(\vec{\rho})}, \quad (2.67)$$

onde E_0 é o campo sem interface no espaço livre com amplitude e fase constantes do tipo $E_0' e^{i\varphi_0}$ (*). Se a condição $\varphi(\vec{\rho}) \ll 1$ é satisfeita, podemos expandir o campo elétrico da equação 2.67 em primeira ordem em h e obter,

$$E \simeq E_0 [1 - i\varphi(\vec{\rho})] = E_0 [1 + i\Delta n k_0 h(\vec{\rho})]. \quad (2.68)$$

Podemos decompor a rugosidade $h(\vec{\rho})$ real da interface em série de Fourier, como segue,

*A equação 2.67 é uma aproximação local para o campo elétrico difratado, válida para números de onda da modulação menores que o número de onda da luz.

$$h(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}), \quad (2.69)$$

onde S é a superfície da interface e $h(\vec{q}')$ representa a amplitude do modo \vec{q}' da ondulação da interface. Como $h(\vec{\rho})$ tem que ser um valor real, então necessariamente $h(\vec{q}')$ também é real, portanto

$$E(\vec{\rho}, 0) = E_0 \left[1 + \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right]. \quad (2.70)$$

Tal equação representa o campo escalar do campo elétrico resultante da difração da luz pela interface (*). Considerando a definição delta em duas dimensões,

*A equação 2.70 tem o limite de validade para $\Delta nk_0 h \leq 1$, já que vale a seguinte expansão até segunda ordem

$$\begin{aligned} e^{i\Delta nk_0 h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})} &= \sum_{-\infty}^{\infty} J_m(\Delta nk_0 h) e^{im\vec{q} \cdot \vec{\rho}} \\ &\simeq J_0(\Delta nk_0 h) + J_{-1}(\Delta nk_0 h) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} + J_1(\Delta nk_0 h) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} + J_{-2}(\Delta nk_0 h) e^{-2i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} + J_2(\Delta nk_0 h) e^{2i\vec{q} \cdot \vec{\rho}}, \end{aligned}$$

onde os J_s são funções de Bessel. Sabendo que $J_{m\text{par}}(x) = J_{-m\text{par}}(x)$ e $J_{m\text{impar}}(x) = -J_{-m\text{impar}}(x)$, temos que

$$\begin{aligned} e^{i\Delta nk_0 h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})} &= J_0(\Delta nk_0 h) + 2iJ_1(\Delta nk_0 h) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) + 2J_2(\Delta nk_0 h) \cos(2\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \\ &= J_0(\Delta nk_0 h) \left[1 + \frac{2iJ_1(\Delta nk_0 h) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})}{J_0(\Delta nk_0 h)} + \frac{2J_2(\Delta nk_0 h) \cos(2\vec{q} \cdot \vec{\rho})}{J_0(\Delta nk_0 h)} \right]. \end{aligned}$$

Como para $x \ll 1$ temos que $J_0(x) = 1$ e $J_1(x) = 0,5$, esta última igualdade torna a expressão $e^{i\Delta nk_0 h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})} = 1[1 + i\Delta nk_0 h \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho})]$ como esperado, em concordância com a equação 2.68. Para estimar o erro em ordens superiores, podemos fazer dois exemplos numéricos:

$\Delta nk_0 h = 0,5$ então $J_0(0,5) = 0,938$, $J_1(0,5) = 0,242$ e $J_2(0,5) = 0,031$, portanto $\frac{2J_1(0,5)}{J_0(0,5)} = 0,516$, $\frac{2J_2(0,5)}{J_0(0,5)} = 0,066$, ou seja, a amplitude do campo difratado em primeira ordem é 7,8 vezes maior que a de segunda ordem; $\Delta nk_0 h = 1$ então $J_0(1) = 0,765$, $J_1(1) = 0,44$ e $J_2(1) = 0,115$, portanto $\frac{2J_1(1)}{J_0(1)} = 1,15$, $\frac{2J_2(1)}{J_0(1)} = 0,30$, e a amplitude do campo difratado em primeira ordem é 3,8 vezes maior que a de segunda ordem. Concluimos que para $\Delta nk_0 h = 0,5$ a segunda ordem contribui com 12,8 % na amplitude e para $\Delta nk_0 h = 1$ contribui com 26,1%. Assim dentro destes limites a equação 2.70 é válida para $\Delta nk_0 h \lesssim 1$.

$$\int e^{-i(\vec{q}-\vec{q}')\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} = (2\pi)^2 \delta^{(2)}(\vec{q}-\vec{q}'), \quad (2.71)$$

calculamos o espectro angular correspondente,

$$\begin{aligned} A_0(\vec{q}) &= \int E(\vec{\rho}, 0) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 \left[1 + \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right] e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 \left[1 + \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\frac{e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}}}{2i} \right) \right] e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} + \int E_0 \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\frac{e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}}}{2i} \right) d\vec{\rho} \\ &= (2\pi)^2 E_0 \left[\int \frac{1}{(2\pi)^2} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} + \frac{1}{(2\pi)^2} \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \int \left(e^{i(\vec{q}'-\vec{q})\cdot\vec{\rho}} - e^{-i(\vec{q}'+\vec{q})\cdot\vec{\rho}} \right) d\vec{\rho} \right] \\ &= (2\pi)^2 E_0 \left[\delta^{(2)}(\vec{q}) - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta^{(2)}(\vec{q}+\vec{q}') + \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta^{(2)}(\vec{q}-\vec{q}') \right]. \end{aligned} \quad (2.72)$$

Portanto o campo elétrico da luz difratado pela interface após propagar pelo microscópio desfocalizado será obtido usando o $A_0(\vec{q})$ acima, na equação 2.61 com a substituição de $z_f \equiv \Delta f$, onde colocamos a origem z do sistema de referência na interface,

$$\begin{aligned} E(\vec{\rho}) &= C \frac{e^{i\beta}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}) e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} e^{i(\vec{\rho}\cdot\vec{q})} d\vec{q} \\ &= C e^{i\beta} E_0 \left\{ \int \left[\delta^{(2)}(\vec{q}) - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\delta^{(2)}(\vec{q}+\vec{q}') - \delta^{(2)}(\vec{q}-\vec{q}') \right) \right] e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right\} d\vec{q} \\ &= C e^{i\beta} E_0 \left\{ 1 - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \left[\sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} - \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \right] \right\} \\ &= C e^{i\beta} E_0 \left\{ 1 - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left[e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \right] e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} \right\} \end{aligned}$$

$$= Ce^{i\beta} E_0 \left\{ 1 - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} \right\}. \quad (2.73)$$

Fazendo a troca de variável $\vec{q}' \rightarrow \vec{q}$ e definindo $I(\vec{\rho}) = C^2 |E(\vec{\rho})|^2$ e $I_0 = C^2 E_0^2$ vamos calcular a intensidade da luz observada, mantendo a expansão até primeira ordem em h ,

$$\begin{aligned} I(\vec{\rho}) &= I_0 \left\{ 1 - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} \right\} \\ &\times \left\{ 1 + \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{-i\frac{z_f}{2k} q^2} \right\} \\ &= I_0 \left\{ 1 + \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{z_f}{2k} q^2\right) \right] \right\}. \end{aligned} \quad (2.74)$$

Definimos o contraste da imagem por,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{I(\vec{\rho}) - I_0}{I_0}, \quad (2.75)$$

portanto em primeira ordem em h temos que

$$\boxed{C(\vec{\rho}) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{z_f}{2k} q^2\right) \right]}. \quad (2.76)$$

Este é um dos resultados centrais desta técnica e desta tese. Podemos observar que para pequenas desfocalizações e pequenos vetores de onda \vec{q} vale a seguinte condição,

$$\frac{z_f}{2k} q^2 \ll 1,$$

tal que

$$\text{sen}\left(\frac{z_f}{2k} q^2\right) \approx \frac{z_f}{2k} q^2,$$

portanto o contraste é aproximadamente,

$$C(\vec{\rho}) \approx \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \frac{z_f}{2k} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) q^2 \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) = -\frac{\Delta n}{n} z_f \nabla^2 h(\rho). \quad (2.77)$$

2.5.2 Correlação das Flutuações do Contraste $\langle \Delta C(0,0) \Delta C(\vec{r}, t) \rangle$

Vamos agora calcular a função de correlação espacial do contraste dado pela equação 2.76, subentendendo que nas notações das médias que se seguirão representaremos as médias espaciais ou temporais. Consideraremos somente os sistemas estacionários no tempo e com simetria de translação espacial. a função de correlação espacial é dada por

$$\begin{aligned} \langle C(\vec{\rho}) C(\vec{\rho} + \vec{r}) \rangle &= \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}) h(\vec{q}') \text{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \\ &\times \text{sen}\left(\frac{z_f q'^2}{2k}\right) \left\langle \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}(\vec{q}' \cdot (\vec{\rho} + \vec{r})) \right\rangle, \end{aligned} \quad (2.78)$$

onde \vec{r} é também um vetor no plano xy . Analisando separadamente o valor médio espacial das funções senoidais da equação 2.88, aplicando algumas regras de trigonometria obtemos que,

$$\left\langle \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}(\vec{q}' \cdot (\vec{\rho} + \vec{r})) \right\rangle = \delta_{\vec{q}\vec{q}'} \left(\frac{\cos(\vec{q} \cdot \vec{r})}{2} \right), \quad (2.79)$$

então substituindo este resultado na equação 2.88 obteremos

$$\langle C(\vec{\rho}) C(\vec{\rho} + \vec{r}) \rangle = \frac{2(\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} |h(\vec{q})|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \cos(\vec{q} \cdot \vec{r}), \quad (2.80)$$

ou

$$\langle C(0) C(\vec{r}) \rangle = \frac{2(\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} |h(\vec{q})|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \cos(\vec{q} \cdot \vec{r}), \quad (2.81)$$

onde $|h(\vec{q})|^2$ é a densidade espectral da flutuação de altura $h(\vec{q})$. Seja

$$H(\vec{\rho}, t) = h(\vec{\rho}) + u(\vec{\rho}, t) \quad (2.82)$$

que representa a altura do perfil da interface como uma soma de uma parte independente do tempo e de outra flutuante no tempo, tal que a média temporal $\langle H(\vec{q}, t) \rangle = h(\vec{q})$, já que $\langle u(\vec{\rho}, t) \rangle = 0$. Correspondentemente no espaço de Fourier

$$H(\vec{q}, t) = h(\vec{q}) + u(\vec{q}, t). \quad (2.83)$$

Usando a equação 2.76 o contraste é então dado por

$$C(\vec{\rho}, t) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} H(\vec{q}, t) \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}), \quad (2.84)$$

tal que a media temporal é

$$\begin{aligned} \langle C(\vec{\rho}, t) \rangle &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \langle H(\vec{q}, t) \rangle \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \\ &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}). \end{aligned} \quad (2.85)$$

Definindo a flutuação do contraste por

$$\Delta C(\vec{\rho}, t) = C(\vec{\rho}, t) - \langle C(\vec{\rho}, t) \rangle, \quad (2.86)$$

obtemos,

$$\begin{aligned} \Delta C(\vec{\rho}, t) &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \{H(\vec{q}, t) - h(\vec{q})\} \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \\ &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} u(\vec{q}, t) \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}). \end{aligned} \quad (2.87)$$

Assim, para um sistema estacionário com relaxação temporal simples tal que $\langle u(\vec{q}, 0)u^*(\vec{q}, t) \rangle = |u(\vec{q}, t)|^2 e^{-\omega(\vec{q})t}$, tem se que

$$\begin{aligned} \langle C(\vec{\rho})C(\vec{\rho} + \vec{r}) \rangle &= \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q})h(\vec{q}') \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \\ &\times \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q'^2}{2k}\right) \left\langle \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \operatorname{sen}(\vec{q}' \cdot (\vec{\rho} + \vec{r})) \right\rangle, \end{aligned} \quad (2.88)$$

$$\begin{aligned} \langle \Delta C(\vec{\rho}, 0)\Delta C(\vec{\rho} + \vec{r}, t) \rangle &= \left\langle \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} \sum_{\vec{q}'} u(\vec{q}, 0)u^*(\vec{q}', t) \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q'^2}{2k}\right) \right. \\ &\times \left. \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \operatorname{sen}(\vec{q}' \cdot (\vec{\rho} + \vec{r})) \right\rangle \\ &= \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} \sum_{\vec{q}'} \langle u(\vec{q}, 0)u^*(\vec{q}', t) \rangle \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \operatorname{sen}\left(\frac{z_f q'^2}{2k}\right) \\ &\times \left\langle \operatorname{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \operatorname{sen}(\vec{q}' \cdot (\vec{\rho} + \vec{r})) \right\rangle \\ &= \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} |u(\vec{q})|^2 e^{-\omega(\vec{q})t} \operatorname{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \left(\frac{\cos(\vec{q} \cdot \vec{r})}{2}\right) \\ &= \frac{2(\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} |u(\vec{q})|^2 e^{-\omega(\vec{q})t} \operatorname{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \cos(\vec{q} \cdot \vec{r}), \end{aligned} \quad (2.89)$$

Sumarizando o resultado anterior, temos que

$$\boxed{\langle \Delta C(0, 0)\Delta C(\vec{r}, t) \rangle = \frac{2(\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} |u(\vec{q})|^2 e^{-\omega(\vec{q})t} \operatorname{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \cos(\vec{q} \cdot \vec{r})}.} \quad (2.90)$$

No caso contínuo,

$$\sum_{\vec{q}} \longrightarrow \frac{S}{(2\pi)^2} \int_0^{q_{max}} d\vec{q},$$

onde q_{max} é o maior número de onda coletado pela objetiva do microscópio com abertura numérica NA , tal que $q_{max} = k_0 NA$. A equação 2.90 torna-se

$$\boxed{\langle \Delta C(0) \Delta C(\vec{r}) \rangle = \frac{2(\Delta n k_0)^2}{(2\pi)^2} \int_0^{q_{max}} q dq \int_0^{2\pi} d\theta |u(\vec{q})|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \cos(\vec{q} \cdot \vec{r})}. \quad (2.91)}$$

2.5.3 Flutuação Quadrática Média do Contraste $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$

Para funções de correlação com simetria radial,

$$\langle \Delta C(0) \Delta C(\vec{r}) \rangle \rightarrow \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle \quad (2.92)$$

e

$$|u(\vec{q})|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \rightarrow |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right), \quad (2.93)$$

portanto

$$\langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle = \frac{2(\Delta n k_0)^2}{(2\pi)^2} \int_0^{q_{max}} dq q |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \int_0^{2\pi} d\theta \cos(qr \cos\theta),$$

ou seja,

$$\boxed{\langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^{q_{max}} dq q |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) J_0(qr)}, \quad (2.94)$$

já que

$$\int_0^{2\pi} d\theta \cos(qr \cos(\theta)) = (2\pi) J_0(qr).$$

Multiplicando por $rJ_0(q'r)$ e integrando em dr ambos os lados da equação 2.94 obtemos

$$\begin{aligned} \int_0^\infty dr r \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle J_0(q'r) &= \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^{q_{max}} dq q |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \int_0^\infty dr r J_0(qr) J_0(q'r) \\ &= \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^{q_{max}} dq q |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) \frac{\delta(q - q')}{q'}, \end{aligned} \quad (2.95)$$

então

$$\int_0^\infty dr r \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle J_0(qr) = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right). \quad (2.96)$$

Para condições de contorno tipo Dirichlet com $J_0(q_n R) = 0$ sendo que $(q_n R)$ são as raízes da função de Bessel e R é o raio da superfície circular (como no caso da membrana de um tambor fixada pelas extremidades), esta última integral será,

$$\int_0^\infty dr r \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle J_0(q_n r) = \int_0^R dr r \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle J_0(q_n r). \quad (2.97)$$

Se $\langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle \simeq 0$ para $r \geq R$, a igualdade acima é aproximada. Para o caso discreto, podemos expandir $\langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle$ em série de Fourier-Bessel, ou seja,

$$\langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle = \sum_n a_n J_0(q_n r), \quad (2.98)$$

com isso a equação 2.97 torna-se

$$\begin{aligned} \int_0^R dr r \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle J_0(q_{n'} r) &= \sum_n a_n \int_0^R dr r J_0(q_n r) J_0(q_{n'} r) \\ &= \sum_n a_n \frac{R^2}{2} [J_1(q_n R)]^2 \delta_{n, n'}, \end{aligned} \quad (2.99)$$

então

$$\begin{aligned}
a_n &= \frac{\int_0^R dr r \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle J_0(q_n r)}{\frac{R^2}{2} [J_1(q_n R)]^2} \\
&= \frac{(\Delta n k_0)^2 |u(q_n)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q_n^2}{2k}\right)}{\pi \frac{R^2}{2} [J_1(q_n R)]^2}, \tag{2.100}
\end{aligned}$$

portanto

$$\langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \frac{2}{R^2} \sum_n \frac{|u(q_n)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q_n^2}{2k}\right)}{[J_1(q_n R)]^2} J_0(q_n r). \tag{2.101}$$

Calculando $\langle \Delta C(0) \Delta C(0) \rangle = \langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ obtemos

$$\boxed{\langle \Delta C^2(z_f) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \frac{2}{R^2} \sum_{n=1}^{q_{max}} \frac{|u(q_n)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q_n^2}{2k}\right)}{J_1^2(q_n R)}}. \tag{2.102}$$

A sua representação contínua, usando a equação 2.94 em $r = 0$, será

$$\boxed{\langle \Delta C^2(z_f) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^{q_{max}} dq q |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right)}. \tag{2.103}$$

Finalmente, aplicando a regra trigonométrica de $\text{sen}^2\theta = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos 2\theta$ podemos obter o comportamento assintótico da equação 2.103, para $z_f \rightarrow \infty$ (limite de difração de Fraunhofer)

$$\begin{aligned}
\langle \Delta C^2(\infty) \rangle &= \lim_{z_f \rightarrow \infty} \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 \text{sen}^2\left(\frac{z_f q^2}{2k}\right) q dq \\
&= \lim_{z_f \rightarrow \infty} \frac{(\Delta n k_0)^2}{2\pi} \left\{ \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 q dq - \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) q dq \right\} \\
&\simeq \frac{(\Delta n k_0)^2}{2\pi} \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 q dq \\
&= (\Delta n k_0)^2 \langle u^2 \rangle. \tag{2.104}
\end{aligned}$$

O valor obtido para a flutuação $\langle \Delta C^2(\infty) \rangle$ é metade do valor da flutuação de contraste que seria obtido para um microscópio de contraste de fase focalizado.

Na figura 2.10 é mostrado o gráfico de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$, quando especificamos o espectro espacial $|u(q)|^2$, como na equação a seguir

$$|u(q)|^2 = \frac{1}{aq^4 + bq^2 + c}. \quad (2.105)$$

Veremos, em uma das próximas seções, que um espectro espacial do tipo dado pela equação 2.105 acima, aparece comumente em flutuações de membranas. Na figura 2.10 é mostrada uma simulação numérica de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ em função de z_f usando as equações 2.102 e 2.103 para o espectro dado pela equação 2.105 com os parâmetros especificados na legenda da figura.

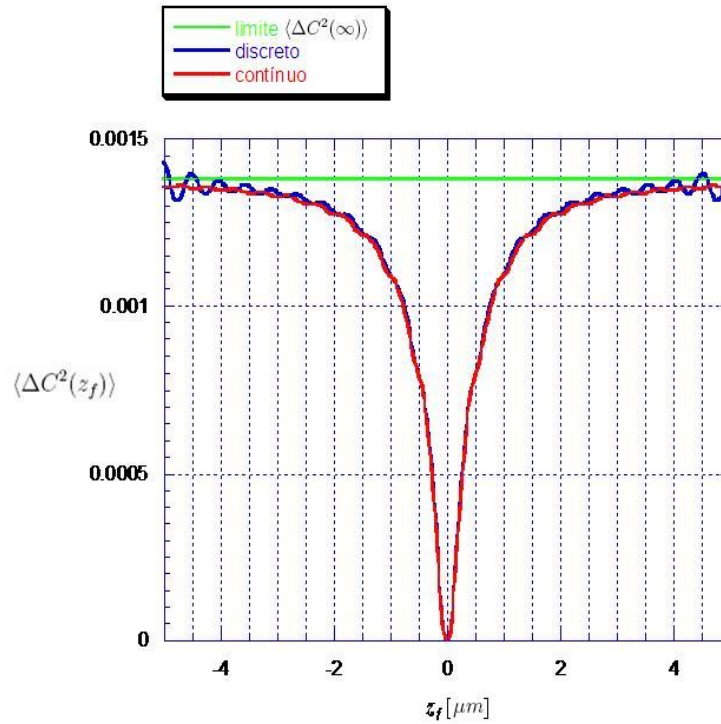


Figura 2.10: Curvas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ com $\frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} = 1$, $R = 4,9 \mu m$ e $k = 9,3 \mu m^{-1}$, usando no espectro $|u(q)|^2$ da equação 2.105 os parâmetros $a = 7,6$, $b = 212 \mu m^{-2}$ e $c = 4680 \mu m^{-4}$: linha azul correspondente a equação 2.102; linha vermelha correspondente a equação 2.103; linha verde correspondente ao limite $\langle \Delta C^2(\infty) \rangle$ para $z_f \rightarrow \infty$ da equação 2.104.

2.5.4 Espectro de Potência Espacial das Flutuações do Contraste usando $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$

Consideramos as equações 2.103, 2.104 válidas no limite contínuo, e aplicando a regra trigonométrica de $\text{sen}^2\theta = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos 2\theta$ teremos

$$\begin{aligned} \langle \Delta C^2(z_f) \rangle &= \frac{(\Delta nk_0)^2}{2\pi} \left\{ \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 q dq - \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) q dq \right\}, \\ &= \langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \frac{(\Delta nk_0)^2}{2\pi} \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) q dq \end{aligned}$$

logo

$$\int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) q dq = \frac{2\pi}{(\Delta nk_0)^2} \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z_f) \rangle \right]. \quad (2.106)$$

Em ambos os lado da equação 2.106 podemos multiplicar por $\cos\left(\frac{z_f q'^2}{k}\right)$ e integrar em dz_f , portanto

$$\boxed{\int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 q dq \int \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) \cos\left(\frac{z_f q'^2}{k}\right) dz_f = \frac{2\pi}{(\Delta nk_0)^2} \int \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z_f) \rangle \right] \cos\left(\frac{z_f q'^2}{k}\right) dz_f}, \quad (2.107)$$

logo passamos a calcular o integral

$$I = \int_{-\infty}^{+\infty} \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) \cos\left(\frac{z_f q'^2}{k}\right) dz_f,$$

que fazendo uma troca de variável do tipo $\theta = kz_f$, torna-se

$$\begin{aligned} I &= \int_0^{2\pi} \cos\left(\frac{\theta q^2}{k^2}\right) \cos\left(\frac{\theta q'^2}{k^2}\right) \frac{d\theta}{k} \\ &= \frac{\pi}{k} \delta\left(\frac{q^2}{k^2} - \frac{q'^2}{k^2}\right) \\ &= \pi k \delta(q^2 - q'^2). \end{aligned} \quad (2.108)$$

No lado esquerdo da equação 2.107 fazendo uma ulterior troca de variável do tipo $q^2 = x$, ou seja $2q dq = dx$, e substituindo o resultado da equação 2.108, obtemos

$$\begin{aligned} \int_0^{q_{max}} |u(q)|^2 \pi k \delta(q^2 - q'^2) q dq &= \int |u(x)|^2 \pi k \delta(x - x') \frac{dx}{2} \\ &= \frac{\pi k}{2} |u(x')|^2, \end{aligned} \quad (2.109)$$

portanto

$$\frac{\pi k}{2} |u(x')|^2 = \frac{2\pi}{(\Delta n k_0)^2} \int \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z_f) \rangle \right] \cos\left(\frac{z_f q'^2}{k}\right) dz_f, \quad (2.110)$$

que ao voltar na variável original q , esta última expressão nos permite escrever a equação do *espectro de potência espacial* a seguir

$$\boxed{|u(q)|^2 = \frac{4}{(\Delta n k_0)^2 k} \int \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z_f) \rangle \right] \cos\left(\frac{z_f q^2}{k}\right) dz_f}. \quad (2.111)$$

Para um teste dessas equações, geramos a flutuação quadrática média usando a equação 2.103 e o espectro espacial dado pela equação 2.105, com os parâmetros $\Delta n = 0,06$, $k = q_{max} = 12,3 \mu m^{-1}$, $a = 7,6$, $b = 212 \mu m^{-2}$ e $c = 4680 \mu m^{-4}$. Os espectros espaciais gerados a partir das equações 2.105 e 2.111 estão mostrados na figura 2.11. A discrepância para q pequeno é devido ao intervalo limitado de desfocalizações ($-6 \mu m \leq z_f \leq 6 \mu m$) usado nos cálculos.

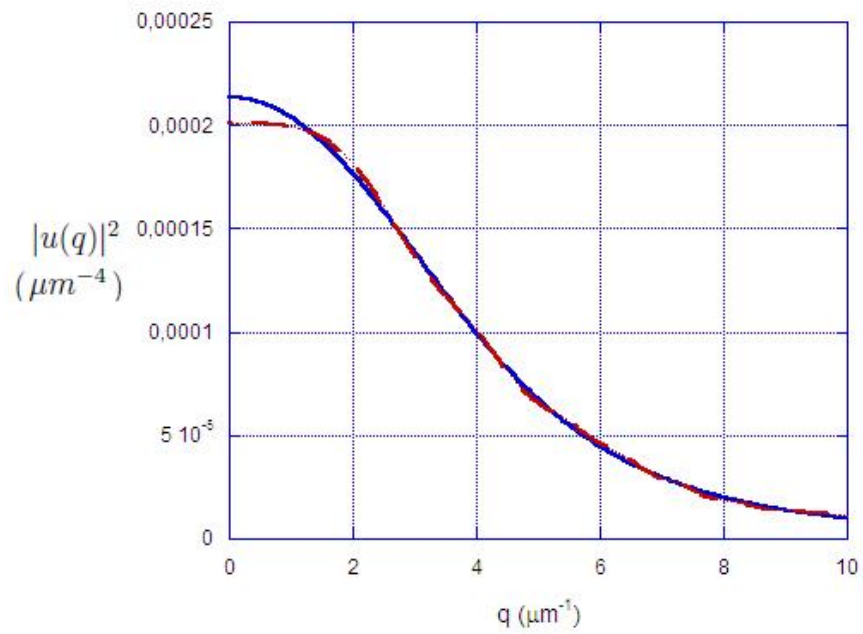


Figura 2.11: Espectro espacial das flutuações gerado pela equação 2.105 (linha contínua) e gerado pela equação 2.111 (linha pontilhada).

2.6 Campo Elétrico para Microscópio Desfocalizado através de um Objeto de Fase com duas Interfaces

Usando a formulação da seção precedente, analisaremos a propagação do campo elétrico considerando a geometria mostrada na figura 2.12.

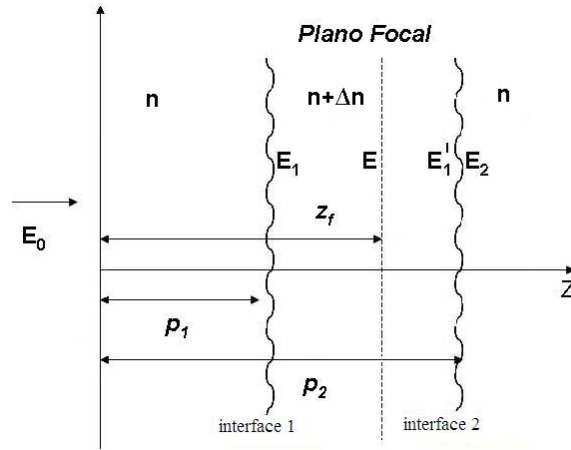


Figura 2.12: Geometria da propagação do campo elétrico através de duas interfaces transparentes finas. Na região entre as interfaces o índice de refração é $n + \Delta n$ e fora é n , considerados homogêneos e isotrópicos. E_0 é o campo elétrico inicial que incide na interface 1 colocada na posição p_1 ; E'_1 é o campo elétrico que difratado pela interface 1 se propaga até à interface 2 colocada na posição p_2 ; E_2 é o campo elétrico difratado logo após a interface 2, que será propagado até à posição z_f do plano focal da objetiva.

2.6.1 Contraste da Intensidade de Luz da Imagem $C(\vec{\rho})$

Os campos elétricos ao atravessarem as interfaces transparentes indicadas na figura, considerando $k(n) \cong k(n + \Delta n) = k$, podem ser escritos como

$$E_1 = E_0 e^{i\varphi_1(\vec{\rho})}, \quad (2.112a)$$

$$E_2 = E_1' e^{i\varphi_2(\vec{\rho})}. \quad (2.112b)$$

Usaremos o mesmo procedimento anterior para determinar os campos difratados pelas interfaces 1 e 2 no plano imagem do microscópio desfocalizado. Para isto iremos aplicar as etapas a seguir:

- 1) propagação do campo E_0 após a interface 1;
- 2) propagação do campo E_1 no espaço livre até a interface 2;
- 3) propagação do campo E_2 logo após a interface 2;
- 4) propagação do campo E_2 no espaço livre até o plano focal.

Vamos começar com o passo (1), portanto aplicaremos a equação 2.70 para o campo elétrico E_1 e a equação 2.21 para o espectro angular A_1

$$E_1(\vec{\rho}, 0) = E_0 \left[1 + \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right], \quad (2.113)$$

então seguindo o procedimento da seção anterior obtemos

$$\begin{aligned} A_1(\vec{q}) &= \int E_1(\vec{\rho}, 0) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= (2\pi)^2 E_0 \left[\delta^{(2)}(\vec{q}) - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \delta^{(2)}(\vec{q} + \vec{q}') + \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \delta^{(2)}(\vec{q} - \vec{q}') \right]. \end{aligned} \quad (2.114)$$

Para o passo (2) aplicaremos a equação 2.27 para o espectro angular

$$A_1'(\vec{q}) = A_1(\vec{q}) e^{ik(p_2 - p_1)} e^{-i\frac{q^2}{2k}(p_2 - p_1)}, \quad (2.115)$$

onde $k = nk_0$. Portanto o campo elétrico correspondente vale

$$\begin{aligned} E_1'(\vec{\rho}) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_1'(\vec{q}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q} \\ &= C e^{i\beta} E_0 \int \left\{ \left[\delta^{(2)}(\vec{q}) - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \left(\delta^{(2)}(\vec{q} + \vec{q}') - \delta^{(2)}(\vec{q} - \vec{q}') \right) \right] \right\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& \times e^{ik(p_2-p_1)} e^{-i\frac{q^2}{2k}(p_2-p_1)} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \Big\} d\vec{q} \\
& = C e^{i\beta} E_0 e^{ik(p_2-p_1)} \left\{ 1 - \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \left[e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \right] e^{-i\frac{q'^2}{2k}(p_2-p_1)} \right\} \\
& = E_0' \left\{ 1 - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{-i\frac{q'^2}{2k}(p_2-p_1)} \right\}, \tag{2.116}
\end{aligned}$$

sendo $E_0' = E_0 e^{ik(p_2-p_1)}$ é um fator constante independente de \vec{q}' . Para o passo (3) aplicaremos a equação 2.70 e lembrando que a variação do índice de refração é $-\Delta n$,

$$\begin{aligned}
E_2(\vec{\rho}, 0) & = E_1' \left\{ 1 - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}} \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right\} \\
& = E_0' \left\{ 1 - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{-i\frac{q'^2}{2k}(p_2-p_1)} \right\} \\
& \times \left\{ 1 - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}} \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right\}. \tag{2.117}
\end{aligned}$$

Desprezando os termos quadráticos em h o espectro angular pode ser calculado como

$$\begin{aligned}
A_2(\vec{q}) & = \int E_2(\vec{\rho}, 0) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \\
& = E_0' \left\{ \int e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}} \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') \int \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \right. \\
& \quad \left. - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') e^{-i\frac{q'^2}{2k}(p_2-p_1)} \int \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} \right\} \\
& = (2\pi)^2 E_0' \left\{ \delta^{(2)}(\vec{q}) - \left(\frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_2}} \right) \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') \left[\delta^{(2)}(\vec{q} - \vec{q}') - \delta^{(2)}(\vec{q} + \vec{q}') \right] \right. \\
& \quad \left. - \left(\frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_1}} \right) \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') e^{-i\frac{q'^2}{2k}(p_2-p_1)} \left[\delta^{(2)}(\vec{q} - \vec{q}') - \delta^{(2)}(\vec{q} + \vec{q}') \right] \right\}. \tag{2.118}
\end{aligned}$$

O passo (4) é válido aplicando a equação 2.61 obtemos

$$E(\vec{\rho}) = C \frac{e^{i\beta}}{(2\pi)^2} \int A_2(\vec{q}) e^{i\frac{(p_2-z_f)}{2k}q^2} e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q}$$

$$\begin{aligned}
&= C e^{i\beta} E'_0 \left\{ \int \delta^{(2)}(\vec{q}) e^{i\frac{(p_2-z_f)}{2k}q^2} e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q} \right. \\
&+ \left(\frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_2}} \right) \int \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') e^{i\frac{(p_2-z_f)}{2k}q'^2} e^{i(\vec{q}'\cdot\vec{\rho})} \left[\delta^{(2)}(\vec{q}-\vec{q}') - \delta^{(2)}(\vec{q}+\vec{q}') \right] d\vec{q}' \\
&- \left(\frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S_1}} \right) \int \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') e^{i\frac{(p_2-z_f)}{2k}q'^2} e^{-i\frac{(p_2-p_1)}{2k}q'^2} e^{i(\vec{q}'\cdot\vec{\rho})} \left[\delta^{(2)}(\vec{q}-\vec{q}') - \delta^{(2)}(\vec{q}+\vec{q}') \right] d\vec{q}' \left. \right\} \\
&= E''_0 \left\{ 1 + \left(i \frac{\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}} \right) \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') e^{i\frac{(p_2-z_f)}{2k}q'^2} \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right. \\
&- \left. \left(i \frac{\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \right) \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') e^{i\frac{(p_1-z_f)}{2k}q'^2} \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right\}.
\end{aligned} \tag{2.119}$$

Definimos as seguintes variáveis

$$a_1 = \frac{\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}}, \tag{2.120a}$$

$$a_2 = -\frac{\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}}, \tag{2.120b}$$

$$H_1(\vec{q}') = h_1(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}), \tag{2.120c}$$

$$H_2(\vec{q}') = h_2(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}), \tag{2.120d}$$

$$F(\vec{q}') = \frac{(p_1 - z_f)}{2k} q'^2, \tag{2.120e}$$

$$G(\vec{q}') = \frac{(p_2 - z_f)}{2k} q'^2, \tag{2.120f}$$

portanto

$$E(\vec{\rho}) = E''_0 \left\{ 1 - ia_2 \sum_{\vec{q}'} H_2(\vec{q}') e^{iG(\vec{q}')} - ia_1 \sum_{\vec{q}'} H_1(\vec{q}') e^{iF(\vec{q}')} \right\}. \tag{2.121}$$

Vamos agora a calcular a intensidade desprezando os termos em segunda ordem em H ,

$$I(\vec{\rho}) = E(\vec{\rho}) E^*(\vec{\rho})$$

$$\begin{aligned}
&= E_0''^2 \left\{ 1 - ia_2 \sum_{\vec{q}'} H_2(\vec{q}') e^{iG(\vec{q}')} - ia_1 \sum_{\vec{q}'} H_1(\vec{q}') e^{iF(\vec{q}')} \right\} \\
&\times \left\{ 1 + ia_2 \sum_{\vec{q}'} H_2(\vec{q}') e^{-iG(\vec{q}')} + ia_1 \sum_{\vec{q}'} H_1(\vec{q}') e^{-iF(\vec{q}')} \right\} \\
&= E_0''^2 \left\{ 1 + ia_2 \sum_{\vec{q}'} H_2 e^{-iG} + ia_1 \sum_{\vec{q}'} H_1 e^{-iF} - ia_2 \sum_{\vec{q}'} H_2 e^{iG} - ia_1 \sum_{\vec{q}'} H_1 e^{iF} \right\} \\
&= E_0''^2 \left\{ 1 - ia_2 \sum_{\vec{q}'} H_2 \left[e^{iG} - e^{-iG} \right] - ia_1 \sum_{\vec{q}'} H_1 \left[e^{iF} - e^{-iF} \right] \right\} \\
&= E_0''^2 \left\{ 1 + 2a_2 \sum_{\vec{q}'} H_2 \text{sen}G + 2a_1 \sum_{\vec{q}'} H_1 \text{sen}F \right\}.
\end{aligned} \tag{2.122}$$

Fazendo a troca de variável $\vec{q}' \rightarrow \vec{q}$ e substituindo os valores das variáveis a_1, a_2, \dots a intensidade resultante será

$$\begin{aligned}
I(\vec{\rho}) &= E_0''^2 \left\{ 1 - \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}} \sum_{\vec{q}} h_2(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \sin \left[\frac{(p_2 - z_f)}{2k} q^2 \right] \right. \\
&\quad \left. + \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}} h_1(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \sin \left[\frac{(p_1 - z_f)}{2k} q^2 \right] \right\}.
\end{aligned} \tag{2.123}$$

O contraste será

$$\begin{aligned}
C(\vec{\rho}) &= \frac{I(\vec{\rho}) - I_0}{I_0} \\
&= \left\{ -\frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S_2}} \sum_{\vec{q}} h_2(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left[\frac{(z_f - p_2)}{2k} q^2 \right] \right. \\
&\quad \left. + \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S_1}} \sum_{\vec{q}} h_1(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left[\frac{(z_f - p_1)}{2k} q^2 \right] \right\}.
\end{aligned} \tag{2.124}$$

Fazendo as superfícies $S_1 = S_2 = S$ então o contraste é dado por

$$\boxed{C(\vec{\rho}) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[h_1(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - h_2(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}}. \tag{2.125}$$

2.6.2 Correlação das Flutuações do Contraste $\langle \Delta C(0,0)\Delta C(\vec{r}, t) \rangle$

Seguindo os passos da seção anterior e as mesmas definições de $H(\vec{\rho}, t)$ podemos escrever o novo contraste como

$$C(\vec{\rho}, t) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[H_1(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - H_2(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}. \quad (2.126)$$

Para encontrar as flutuações do contraste $\Delta C(\vec{\rho}, t) = C(\vec{\rho}, t) - \langle C(\vec{\rho}, t) \rangle$, calculando antes a média temporal do contraste da equação 2.126,

$$\begin{aligned} \langle C(\vec{\rho}, t) \rangle &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[\langle H_1(\vec{q}, t) \rangle \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - \langle H_2(\vec{q}, t) \rangle \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\} \\ &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[h_1(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - h_2(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \end{aligned} \quad (2.127)$$

portanto

$$\begin{aligned} \Delta C(\vec{\rho}, t) &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[\left(H_1(\vec{q}, t) - h_1(\vec{q}) \right) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. - \left(H_2(\vec{q}, t) - h_2(\vec{q}) \right) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\} \\ &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[u_1(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - u_2(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\} \end{aligned} \quad (2.128)$$

e como

$$\begin{aligned} \Delta C(\vec{\rho} + \vec{r}, t) &= \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[u_1(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - u_2(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \right. \\ &\quad \left. \times \text{sen}(\vec{q} \cdot (\vec{\rho} + \vec{r})) \right\}, \end{aligned} \quad (2.129)$$

então lembrando que agora a média representa os valores médios temporal e espacial e que para um sistema com relaxação simples temos que $\langle u(\vec{q}, t)u^*(\vec{q}, t) \rangle = |u(\vec{q}, t)|^2 e^{-\omega(\vec{q})t}$, onde $\omega(\vec{q})$ é taxa de relaxação para cada modo \vec{q} , então

$$\begin{aligned} \langle \Delta C(\vec{\rho}, t) \Delta C(\vec{\rho} + \vec{r}, t) \rangle &= \frac{2(\Delta n k_0)^2}{S} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[|u_1(\vec{q})|^2 e^{-\omega_1(\vec{q})t} \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + |u_2(\vec{q})|^2 e^{-\omega_2(\vec{q})t} \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \cos(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \end{aligned} \quad (2.130)$$

portanto

$$\begin{aligned} \langle \Delta C(0, 0) \Delta C(\vec{r}, t) \rangle &= \frac{2(\Delta n k_0)^2}{S} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[|u_1(\vec{q})|^2 e^{-\omega_1(\vec{q})t} \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + |u_2(\vec{q})|^2 e^{-\omega_2(\vec{q})t} \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \cos(\vec{q} \cdot \vec{r}) \right\}. \end{aligned} \quad (2.131)$$

A sua representação correspondente no contínuo é dada por,

$$\begin{aligned} \langle \Delta C(0) \Delta C(r) \rangle &= \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \left\{ \int_0^{q_{max}} dq q \left[|u_1(q)|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + |u_2(q)|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] J_0(qr) \right\}. \end{aligned} \quad (2.132)$$

2.6.3 Flutuação Quadrática Média do Contraste $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$

Repetindo os mesmos passos da seção anterior podemos escrever

$$\langle \Delta C^2(z_f) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \frac{2}{R^2} \sum_{n=1}^{q_{max}} \left\{ \frac{|u_1(q_n)|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q_n^2 \right)}{J_1^2(q_n R)} + \frac{|u_2(q_n)|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q_n^2 \right)}{J_1^2(q_n R)} \right\}, \quad (2.133)$$

e a sua representação contínua é dada por

$$\boxed{\langle \Delta C^2(z_f) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \left\{ \int_0^{q_{max}} dq q \left[|u_1(q)|^2 \operatorname{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) + |u_2(q)|^2 \operatorname{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \right\}.}$$
(2.134)

Na figura 2.14 apresentamos o gráfico de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ em função de z_f gerado numericamente usando a equação 2.134 com

$$|u_1(q)|^2 = \frac{1}{aq^4 + bq^2 + c_1}, \quad (2.135a)$$

$$|u_2(q)|^2 = \frac{1}{aq^4 + bq^2 + c_2}, \quad (2.135b)$$

sendo que é mostrado o caso que $c_1 = c_2$ dito simétrico e o caso $c_2 = 2c_1$ dito assimétrico.

Finalizando podemos calcular o limite assintótico para $z_f \rightarrow \infty$ da equação 2.134, o que resulta,

$$\begin{aligned} \langle \Delta C^2(\infty) \rangle &\simeq \frac{(\Delta n k_0)^2}{2\pi} \left\{ \int_0^{q_{max}} |u_1(q)|^2 q dq + \int_0^{q_{max}} |u_2(q)|^2 q dq \right\} \\ &= (\Delta n k_0)^2 [\langle u_1^2 \rangle + \langle u_2^2 \rangle]. \end{aligned} \quad (2.136)$$

Representamos na figura 2.14 o comportamento de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ no caso contínuo e discreto, como também o limite assintótico.

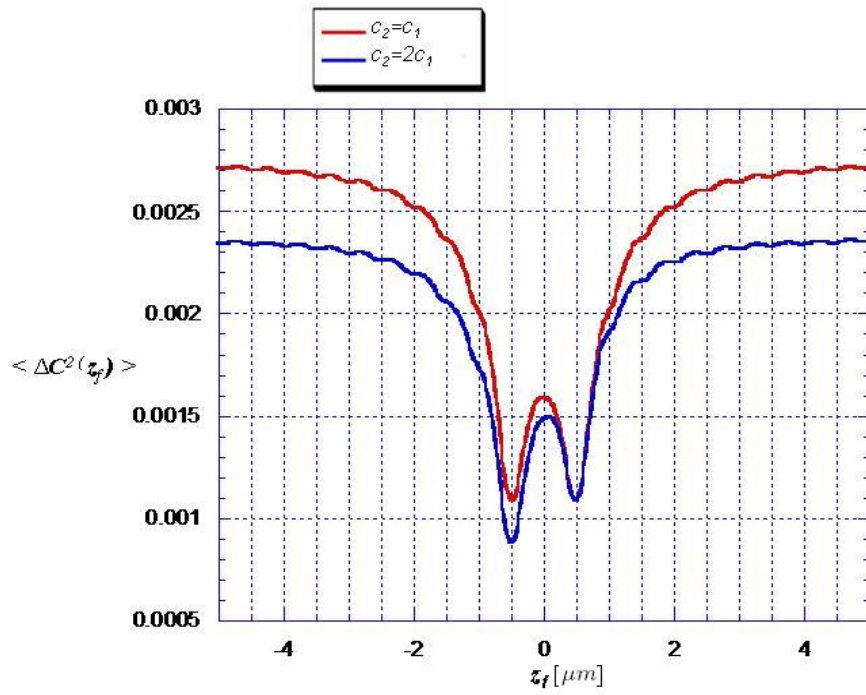


Figura 2.13: Curvas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ com $R = 4,9\mu m$, $k = 9,3\mu m^{-1}$ e $\frac{(\Delta n k_0)^2}{2\pi} = 1$, usando nos espectros $|u_1(q)|^2$ e $|u_2(q)|^2$ das equações 2.135a os parâmetros $a_1 = a_2 = 7,6$, $b_1 = b_2 = 212\mu m^{-2}$ e $c_1 = 4680\mu m^{-4}$: linha azul com $c_2 = 2c_1$ chamada de assimétrico; linha vermelha com $c_2 = c_1$ chamada de simétrica; $p_1 = -0,5\mu m$ e $p_2 = 0,5\mu m$.

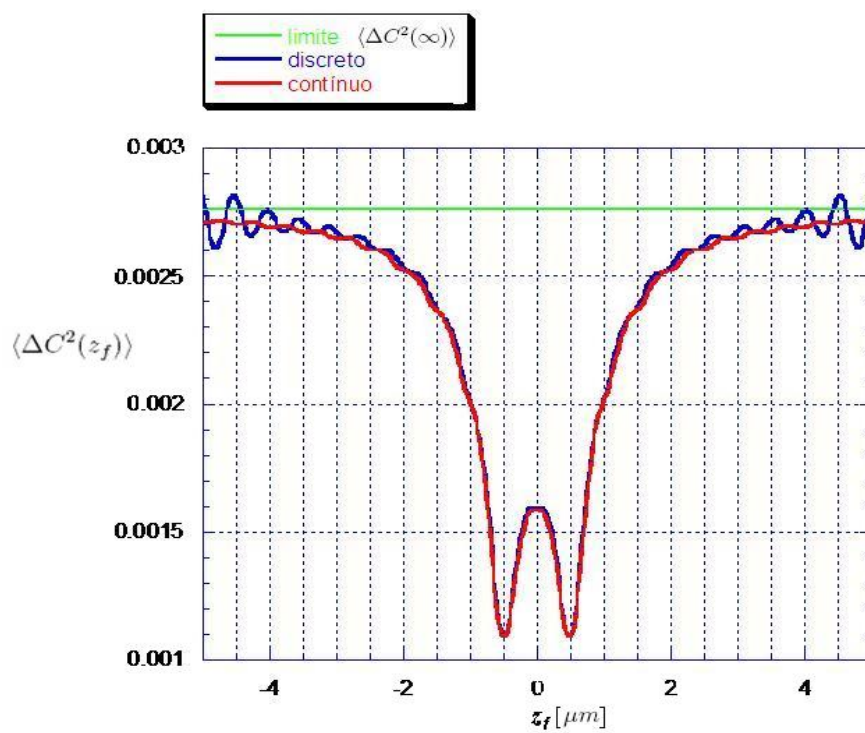


Figura 2.14: Curvas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ com os parâmetros utilizados na figura 2.13 no caso simétrico: linha azul e da equação 2.133; linha azul e da equação 2.134; linha verde e no limite para $z_f \rightarrow \infty$ da equação 2.136.

2.6.4 Espectro de Potência Espacial das Flutuações do Contraste usando $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$

A equação 2.134, fazendo uma troca de variáveis do tipo $z' = z_f - p_1$, resulta em

$$\langle \Delta C^2(z') \rangle = \frac{(\Delta nk_0)^2}{\pi} \int_0^{q_{max}} \left\{ |u_1(q)|^2 \sin^2 \left(\frac{z'}{2k} q^2 \right) + |u_2(q)|^2 \sin^2 \left(\frac{z' + (p_1 - p_2)}{2k} q^2 \right) \right\} q dq ,$$

e se aplicamos a regra trigonométrica $\text{sen}^2\theta = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos 2\theta$, torna-se

$$\begin{aligned} \langle \Delta C^2(z') \rangle &= \frac{(\Delta nk_0)^2}{2\pi} \left\{ \int_0^{q_{max}} \left[|u_1(q)|^2 \sin^2 + |u_2(q)|^2 \right] q dq \right. \\ &\quad \left. - \int_0^{q_{max}} \left[|u_1(q)|^2 \cos \left(\frac{z'}{k} q^2 \right) + |u_2(q)|^2 \cos \left(\frac{z' + (p_1 - p_2)}{k} q^2 \right) \right] q dq \right\} \\ &= \langle \Delta C^2(\infty) \rangle \\ &\quad - \frac{(\Delta nk_0)^2}{2\pi} \int_0^{q_{max}} \left[|u_1(q)|^2 \cos \left(\frac{z'}{k} q^2 \right) + |u_2(q)|^2 \cos \left(\frac{z' + (p_1 - p_2)}{k} q^2 \right) \right] q dq, \end{aligned}$$

portanto teremos a seguinte equação

$$\begin{aligned} \int_0^{q_{max}} \left[|u_1(q)|^2 \cos \left(\frac{z'}{k} q^2 \right) + |u_2(q)|^2 \cos \left(\frac{z' + (p_1 - p_2)}{k} q^2 \right) \right] q dq \\ = \frac{2\pi}{(\Delta nk_0)^2} \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z') \rangle \right]. \end{aligned} \quad (2.137)$$

Em ambos os lado da equação 2.137 podemos multiplicar por $\cos \left(\frac{z' q'^2}{k} \right)$ e integrar em dz' e portanto obter

$$\begin{aligned} \int \int_0^{q_{max}} \left[|u_1(q)|^2 \cos \left(\frac{z'}{k} q^2 \right) + |u_2(q)|^2 \cos \left(\frac{z' + (p_1 - p_2)}{k} q^2 \right) \right] \cos \left(\frac{z' q'^2}{k} \right) q dq dz' \\ = \frac{2\pi}{(\Delta nk_0)^2} \int \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z') \rangle \right] \cos \left(\frac{z' q'^2}{k} \right) dz', \end{aligned} \quad (2.138)$$

logo passamos a calcular os integrais

$$I_1 = \int_{-\infty}^{+\infty} \cos\left(\frac{z' - p_1}{k}q^2\right) \cos\left(\frac{z'q'^2}{k}\right) dz',$$

$$I_2 = \int_{-\infty}^{+\infty} \cos\left(\frac{z' + (p_1 - p_2)}{k}q^2\right) \cos\left(\frac{z'q'^2}{k}\right) dz'$$

que fazendo uma troca de variável do tipo $\theta = kz'$, teremos que

$$I_1 = \pi k \delta(q^2 - q'^2) \tag{2.139}$$

e

$$I_2 = \cos\left(\frac{p_2 - p_1}{k}q^2\right) \pi k \delta(q^2 - q'^2). \tag{2.140}$$

No lado esquerdo da equação 2.138 fazendo uma ulterior troca de variável do tipo $q^2 = x$, ou seja $2q dq = dx$, e substituindo os resultados das equações 2.139, 2.140 obteremos

$$\begin{aligned} & \int_0^{q_{max}} \left[|u_1(q)|^2 + |u_2(q)|^2 \cos\left(\frac{p_2 - p_1}{k}q^2\right) \right] \pi k \delta(q^2 - q'^2) q dq \\ &= \int \left[|u_1(x)|^2 + |u_2(x)|^2 \cos\left(\frac{p_2 - p_1}{k}x\right) \right] \pi k \delta(x - x') \frac{dx}{2} \\ &= \frac{\pi k}{2} \left[|u_1(x')|^2 + |u_2(x')|^2 \cos\left(\frac{p_2 - p_1}{k}x\right) \right], \end{aligned}$$

portanto teremos

$$\frac{\pi k}{2} \left[|u_1(x')|^2 + |u_2(x')|^2 \cos\left(\frac{p_2 - p_1}{k}x\right) \right] = \frac{2\pi}{(\Delta n k_0)^2} \int \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z') \rangle \right] \cos\left(\frac{z'q'^2}{k}\right) dz',$$

que ao voltar nas variáveis originais z_f e q' , esta última expressão nos permite escrever a equação do *espectro de potência espacial* a seguir

$$\boxed{|u_1(q')|^2 + |u_2(q')|^2 \cos\left(\frac{p_2 - p_1}{k} q'^2\right) = \frac{4}{(\Delta n k_0)^2 k} \int \left[\langle \Delta C^2(\infty) \rangle - \langle \Delta C^2(z_f) \rangle \right] \cos\left(\frac{z_f q'^2}{k}\right) dz_f}.$$

(2.141)

Capítulo 3

Estrutura da Membrana e Citoesqueleto de Hemácias e Modelos de Elasticidade

O conteúdo deste capítulo baseia-se principalmente na referência [29]. Todos os seres vivos são formados por células, compartimentos envolvidos por membranas, preenchidos com uma solução aquosa concentrada de substâncias químicas. As membranas celulares são constituídas de uma dupla camada de moléculas lipídicas com espessura de cerca de $5nm$ e proteínas. A função da membrana não é só de barreira ao recipiente celular, mas também permite que a célula sobreviva e cresça. Se de um lado as substâncias nutrientes devem atravessar a membrana para entrar na célula, por outro lado, os produtos nocivos devem sair dela. Por isso a membrana é transpassada por canais e filtros com alta seletividade, constituídos de moléculas protéicas que permitem a importação de determinadas substâncias e exportação de outras. As propriedades mecânicas das células permitem que elas cresçam mudando de forma, da mesma maneira as membranas se estendem acrescentando, onde for necessário, nova membrana, podendo deformar-se sem rasgar-se. As formas de vida mais simples são células procariontes individualizadas, como por exemplo, as bactérias, que tem uma só membrana, chamada de membrana plasmática, ver figura 3.1 (A). Por outro lado, uma forma mais complexa são as células eucariontes (animal e vegetal) que podem conter mais de uma membrana interna, delimitando assim, seus

compartimentos celulares, como mostrado na figura 3.1 (B) [29].

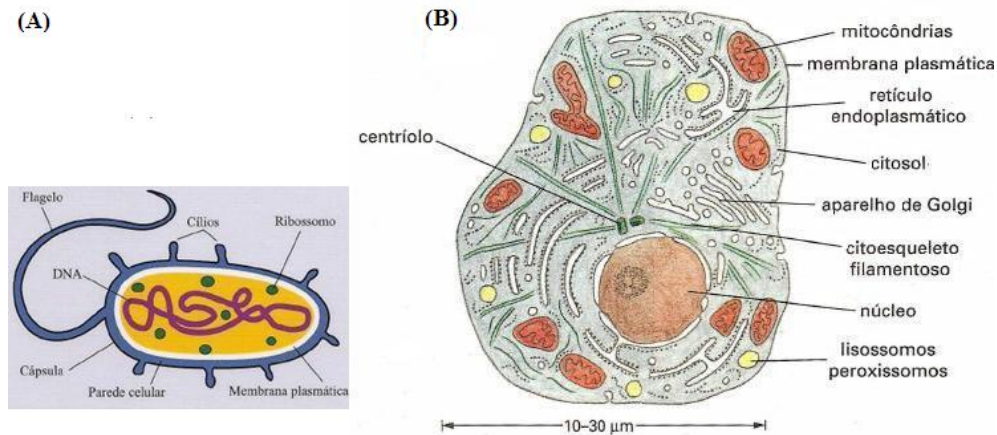


Figura 3.1: (A) Célula Procarionte: Organização celular simples, sem núcleo nem organelas ou orgânicos citoplasmáticos; (B) Célula Eucarionte: organização celular mais complexa [29].

Este sistema de membranas, constituído pelo retículo endoplasmático, pelo aparelho de Golgi, pelas mitocôndrias e de outras organelas é que mantém as várias características estruturais e funcionais das células [29]. Todas as membranas têm uma estrutura geral comum: cada uma é um filme muito fino de moléculas de lipídios e de proteínas, mantidas juntas principalmente por interações não covalentes. As membranas, como já mencionado, são estruturas dinâmicas, fluidas e a maior parte de suas moléculas são capazes de mover-se no plano da membrana. As moléculas lipídicas são arranjadas em uma bicamada lipídica contínua que fornece a estrutura básica da membrana, como mostrado na figura 3.2 [29].

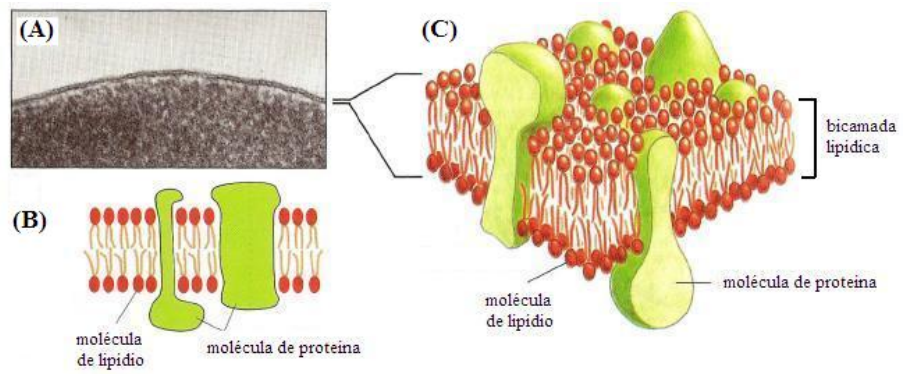


Figura 3.2: Estrutura da Membrana: (A) imagem com microscópio eletrônico da membrana plasmática em seção transversal; (B) e (C) desenhos que mostram os modelos bi-dimensional e tridimensional de uma membrana celular [29].

3.1 A Bicamada Lipídica

A bicamada lipídica constitui a base universal para a estrutura da membrana celular. As moléculas de lipídios são insolúveis em água e elas são cerca de 50% da massa das maiorias das membranas de células animais, sendo o restante quase todo proteínas. Todas as moléculas de lipídios nas membranas celulares são anfipáticas: elas têm uma extremidade *hidrofílica*: ('gosta de água', ou polar) e uma extremidade *hidrofóbica* ('repele a água', ou não polar). Os mais abundantes são os *fosfolipídios*, que tem uma forma como mostrada na figura 3.3, ou seja, uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas. As caudas usualmente são ácidos graxos e podem diferir em comprimento; uma cauda geralmente tem uma ou mais duplas ligações *cis*, enquanto a outra não as contém. Como mostrado na figura 3.3 cada dupla ligação causa uma pequena flexão na cauda. Diferenças no comprimento e saturação das caudas de ácidos graxos são importantes, porque elas influenciam a capacidade das moléculas de fosfolipídios de se agrupar umas às outras, e por essa razão afetam a fluidez das membranas.

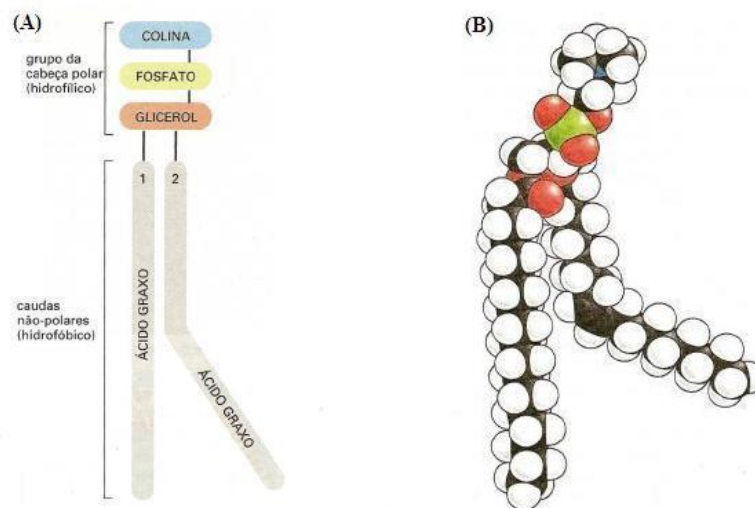


Figura 3.3: As partes de uma molécula de fosfolipídio: (A) Fosfatidilcolina, representada esquematicamente; (B) como modelo espacial.

Quando as moléculas lipídicas são circundadas por água por todos os lados, elas tendem a agrupar-se de modo que suas caudas fiquem ocultas no interior e suas cabeças fiquem expostas à água. Dependendo de sua forma, elas podem fazer isso de duas maneiras: formando micelas esféricas, com as caudas para dentro, ou formando folhas bi-moleculares, ou bicamadas, com suas caudas interpostas entre os grupos das cabeças, como mostrado na figura 3.4 . Por causa da sua forma cilíndrica, as moléculas de fosfolípídios da membrana formam bicamadas espontaneamente em água; ademais, essas bicamadas lipídicas tendem a se fechar sobre si mesmas para formar compartimentos fechados, desse modo eliminando bordas livres, onde as caudas entrariam em contato com a água. Pela mesma razão, compartimentos formados por bicamadas lipídicas, tendem a resselar-se quando são rompidos.

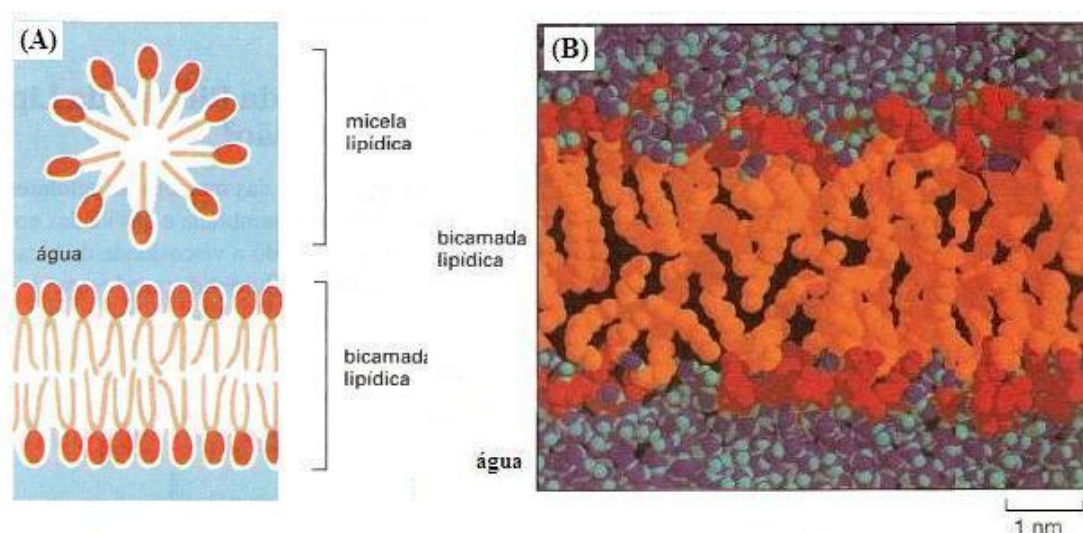


Figura 3.4: Moléculas lipídicas em água: (A) a forma da molécula lipídica define qual estrutura é determinada. Uma forma cuneiforme forma micelas (figura de cima), enquanto cilíndrica forma bicamadas (figura de baixo); (B) visão tridimensional da bicamada lipídica com sua simulação em computador [29].

Uma outra característica importante, além de sua propriedade auto-selante, que tornam os fosfolípídios ideais para formar membranas celulares, é a fluidez que é essencial para muitas funções da membrana. Tal característica foi descoberta através de estudos de bicamadas lipídicas sintéticas. Tais estudos mostraram que moléculas

de fosfolipídio em bicamadas sintéticas muito raramente migram da monocamada de um lado para a do outro. Este movimento, chamado de flip-flop, ocorre menos do que uma vez por mês para qualquer molécula individual. Por outro lado, moléculas lipídicas rapidamente trocam de lugar com suas vizinhas dentro de uma monocamada. Isso dá origem a uma difusão lateral rápida. Esses estudos também tem mostrado que moléculas lipídicas individuais se orientam muito rapidamente em torno do seu eixo maior, e que suas cadeias de hidrocarbonetos (caudas) são flexíveis, como mostrado na figura 3.5.

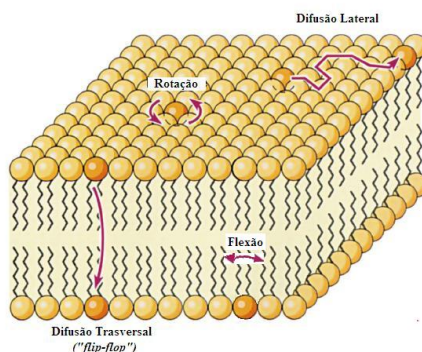


Figura 3.5: Mobilidade de fosfolipídios: os tipos de movimentos possíveis para moléculas de fosfolipídios em uma bicamada lipídica.

3.2 Proteínas da Membrana

Embora a bicamada lipídica seja a estrutura-base para todas as membranas, são as proteínas imersas na membrana que realizam quase todas as funções específicas da estrutura. Nos animais as proteínas constituem cerca de 50% da massa das membranas plasmática, o resto são lipídios. Tais proteínas, além de deixar entrar as substâncias nutrientes através da barreira lipídica, conseguem ligar a membrana com as moléculas que estão em um lado ou ambos da bicamada funcionando também como receptores de sinais químicos que chegam do ambiente e são retransmitidos ao interior de célula. A membrana celular contém diversas proteínas que se relacionam com a bicamada lipídica de quatro modos diferentes, como mostrado na figura 3.6.

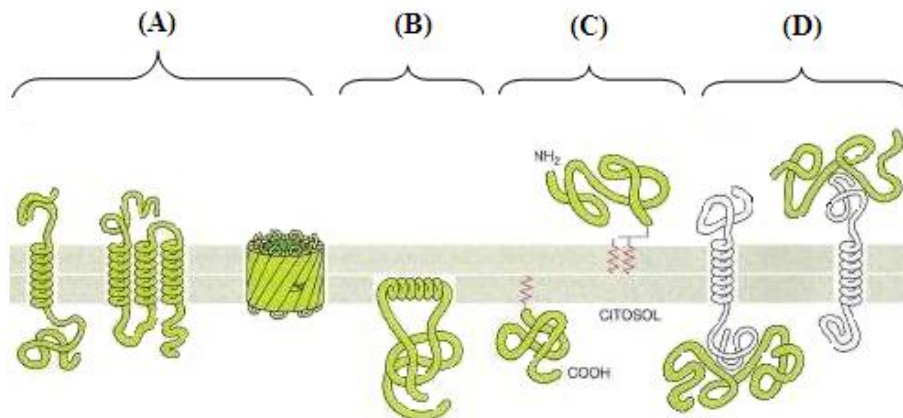


Figura 3.6: Modos pelos quais as proteínas da membrana associam-se com a bicamada lipídica: (A) muitas proteínas da membrana estendem-se através da bicamada, como parte de suas massas em ambos os lados: através de uma única α -hélice ou com múltiplas α -hélice. (B) Outras proteínas da membrana estão localizadas interiormente no citosol e são associadas com a bicamada no lado da membrana interno através de uma única α -hélice anfipática exposta a superfície da molécula. (C) Outras proteínas da membrana são totalmente expostas na superfície externa, sendo ligadas a bicamada somente por uma ligação covalente a um ou mais grupos lipídicos. (D) Algumas proteínas, das quais nenhuma das partes penetram no interior da bicamada, são ligadas molecularmente a uma ou outra das faces da membrana por interações não-covalentes com outras proteínas da membrana.

3.3 O Cortex da Membrana Plasmática

O conteúdo desta seção baseia-se nas referências [29,30]. A membrana celular é muito fina e frágil: são necessárias 10.000 membranas celulares uma acima da outra para chegar-se a espessura do papel dessa página. Por isso todas as membranas celulares são reforçadas e sustentadas por uma rede protéica, fixada por meio de proteínas transmembrânicas. Em particular, essas se organizam em uma rede de proteínas fibrosas, chamado de *córtex celular* aderido à face citosólica (face interna à célula), que determina a forma celular e as propriedades mecânicas da membrana plasmática. No caso de hemácias, os dímeros auto-associam-se cabeça com cabeça para formar tetrâmeros longos, de 200nm. As extremidades das caudas de quatro ou cinco tetrâmeros são interligadas por ligações e filamentos curtos de actina e outras proteínas do citoesqueleto, formando um *complexo funcional*. O resultado final é uma malha deformável, em forma de rede, subjacente a toda a superfície citoplasmática da membrana, como mostrado na figura 3.7.

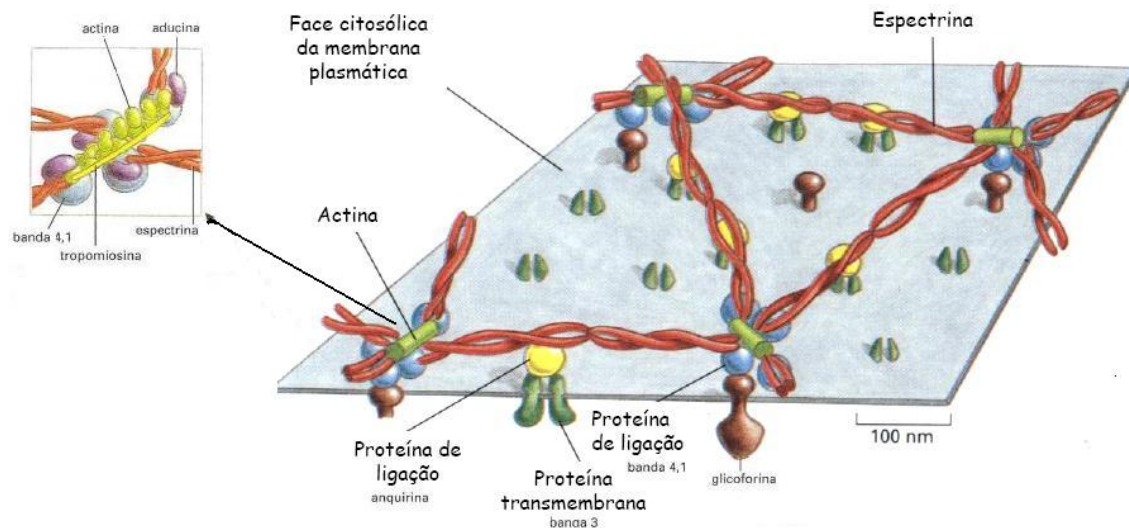


Figura 3.7: Esquema da estrutura do citoesqueleto sobre o lado citoplasmático da membrana do eritrócito humano.

É esse citoesqueleto constituído de espectrina, que capacita as hemácias a su-

portar a tensão de cisalhamento em sua membrana na medida em que ele é forçado através de capilares estreitos. Camundongos e humanos com anomalias genéticas da espectrina são anêmicos e têm hemácias que são esféricas (ao invés de bicôncavas) e normalmente frágeis; a gravidade da anemia aumenta em proporção à deficiência da espectrina. A principal proteína responsável pela ligação do citoesqueleto à membrana plasmática da hemácia foi identificada por monitoração de ligação de espectrina radiomarcada à membrana de hemácia, das quais a espectrina e várias outras proteínas periféricas tinham sido removidas. Esses experimentos mostraram que a ligação da espectrina depende de uma grande proteína intracelular de ligação chamada *ankirina*, a qual se liga tanto à espectrina, quanto ao domínio citoplasmático da proteína banda 3. Conectando algumas das moléculas da banda 3 à espectrina, a ankirina liga a malha da espectrina à membrana, e também reduz muito a taxa de difusão dessas moléculas da banda 3 na bicamada lipídica. O citoesqueleto de espectrina, é também ligado à membrana por um segundo mecanismo, o qual depende da proteína banda 4.1. Essa proteína que se liga à espectrina e actina, também liga-se ao domínio citoplasmático, tanto da banda 3 quanto da *glicoforina*, que é outra das principais proteínas transmembrânicas em hemácias. Uma rede citoesquelética análoga porém muito mais elaborada e complicada existe sob a membrana plasmática das células com núcleo.

3.4 As Hemácias

As hemácias dos mamíferos são células sem núcleo que normalmente circulam por alguns meses apesar de se exporem repetidas vezes a choques mecânicos e metabólicos. O fato de não possuírem núcleo e outras organelas impossibilita a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. Os hemácias são células únicas que executam funções vitais no organismo. O objetivo primário desta célula é o transporte de *hemoglobina* (Hb), visto que esta proteína está associada a outras funções como o transporte de oxigênio (O_2), transporte de dióxido de carbono (CO_2) e tamponamento dos íons de hidrogênio (H^+). Estas funções requerem energia sob a forma de *adenosina trifosfato* (ATP). Embora as demandas metabólicas sejam menores do que as de outras células sanguíneas, as hemácias ainda precisam de energia. O ATP é necessário para a manutenção da forma, da deformabilidade e do transporte ativo de várias moléculas. Os benefícios de conter hemoglobina dentro das células, ao contrário de livre no plasma, incluem: uma meia-vida maior (a Hb livre no plasma possui uma meia-vida de apenas algumas horas), a capacidade metabólica das hemácias de manter o ferro ligado à Hb em seu estado funcional e a habilidade de controlar a afinidade do oxigênio pela Hb, alterando as concentrações de fosfatos orgânicos. Além disso, a presença de hemoglobina livre no plasma na concentração normalmente encontrada no sangue iria exceder a pressão osmótica muitas vezes mais do que normalmente ocorre pelas proteínas plasmáticas, afetando de maneira significativa o movimento de fluidos entre o sistema vascular e os tecidos. As hemácias humanas são pequenas células que possuem forma de disco bicôncavo (discócito) como mostrado na figura 3.8. A componente principal do córtex celular das hemácias, devido basicamente a sua abundância, é uma proteína chamada *espectrina*, uma molécula cilíndrica longa, fina e flexível, com cerca de $100nm$ de comprimento, e que constitui cerca de 25% da massa de proteínas associadas com a membrana (aproximadamente $2,5 \times 10^5$ moléculas de espectrina por célula), como mostrado na figura 3.9. Ela é a base do arcabouço protéico (o *citoesqueleto*) subjacente à membrana da hemácia, mantendo a integridade estrutural e a forma bicôncava dessa membrana.

Estudos comparativos têm demonstrado que a sobrevivência das hemácias está associada a uma série de fatores. Atualmente se sabe, por exemplo, que a sobrevivência

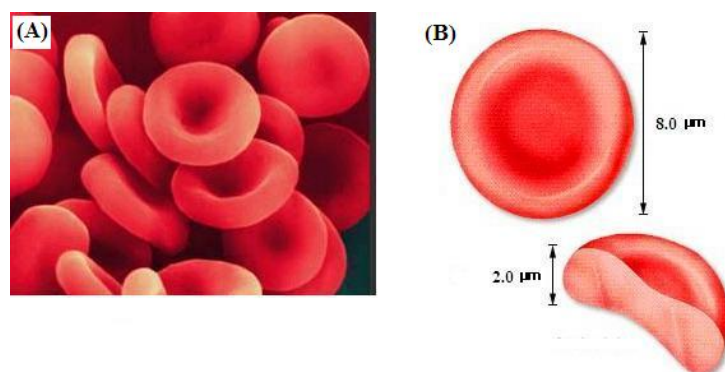


Figura 3.8: Hemácias Humanas: (A) imagem com o microscópio eletrônico; (B) perfil horizontal e seção de uma única hemácia. Foto: Dave McCarthy and Annie Cavanagh/Wellcome Trust.

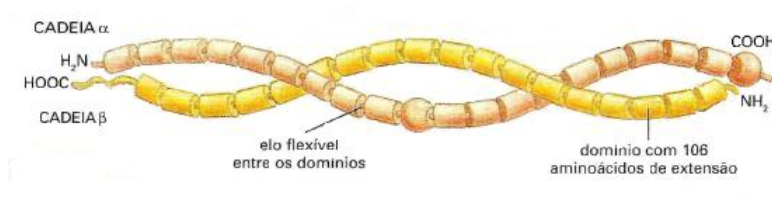


Figura 3.9: Esquema da moléculas de espectrina das hemácias humanas.

das hemácias varia com a taxa metabólica, que está intimamente ligada à taxa de estresse oxidativo que a célula sofre, e que é inversamente proporcional ao tamanho e à longevidade da espécie mostrada na Tabela 3.1.

<i>Sobrevida dos eritrócitos</i>	
<i>Espécie</i>	<i>(dias)</i>
<i>Cavalo</i>	140 a 145
<i>Vaca</i>	130
<i>Homen</i>	120
<i>Cão</i>	100 a 115
<i>Gato</i>	73
<i>Camundungo</i>	43

Tabela 3.1: Tempo de vida de hemácias na circulação para várias espécies.

A membrana da hemácia contém aproximadamente quantidades iguais de lipídeos e proteínas. Os lipídeos são fosfolipídeos ou lipídeos neutros, em sua maior parte colesterol não esterificado, e eles têm papel importante na manutenção da flexibilidade e da deformabilidade celular. O componente protéico da membrana é representado por diversas proteínas que podem ser divididas em duas porções: proteínas transmembrânicas (que atravessam a bicamada lipídica) e proteínas interiores (situadas na base da bicamada lipídica). As principais proteínas transmembrânicas são a *glicoforina A* e a *proteína banda 3*. A glicoforina A possui carboidratos na porção externa da molécula, a presença destes confere carga negativa as hemácias e impede a aglutinação dos mesmos. As glicoforinas (GP) estão relacionadas com os antígenos eritrocitários. A proteína banda 3 está inserida na bicamada lipídica e funciona como canal transportador de ânions e água para a célula. Esta proteína mantém uma ligação importante com as proteínas periféricas *ankirina* e *espectrina*, que serve para fixar a membrana ao citoesqueleto. As proteínas associadas ao citoesqueleto são denominadas de periféricas. Dentre elas estão a espectrina, a actina (banda 5), a ankirina (proteína 2.1), banda ou proteína 4.1, proteína banda 4.2 e a proteína banda 4.9, veja a figura 3.10. Alterações nos componentes da membrana, lipídeos ou proteínas, podem resultar em mudanças na forma com conseqüente diminuição da resistência aos estímulos metabólicos e mecânicos que estas células sofrem constantemente na circulação e aumento da destruição destas células (anemia hemolítica).

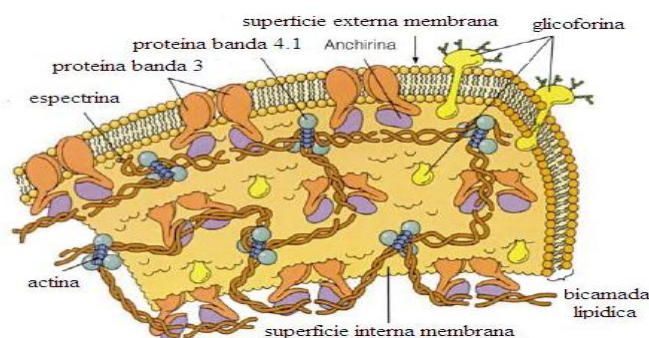


Figura 3.10: Composição protéica do cortex celular de hemácias.

3.5 Noções Básicas sobre Elasticidade

Como já mencionado anteriormente, além da bicamada lipídica, as células possuem uma estrutura abaixo e ligada à bicamada que dá a elas a necessária rigidez mecânica, que é o citoesqueleto. O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que dá motilidade às células. A composição do citoesqueleto varia entre as células. Alterações nas proteínas associadas ao citoesqueleto e motilidade das células podem causar várias doenças [31,32]. O desenvolvimento de novas técnicas experimentais pode ajudar na caracterização e entendimento destas doenças. Nas células com núcleo o citoesqueleto é composto por três tipos principais de filamentos: microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina. Os microtúbulos são os filamentos mais rígidos com comprimento de persistência (conceito que será definido posteriormente) da ordem de 15mm , ou seja, muito maior que o tamanho da célula e, portanto, podem se estender dentro da célula sem flexão, servindo de sustentação mecânica para a membrana e como vias de transporte para organelas e vesículas carregadas pelas proteínas motoras kinesina e dineína. Os filamentos de actina são bem mais flexíveis com comprimento de persistência da ordem de $15\mu\text{m}$, ou seja, da ordem de mil vezes mais flexíveis que os microtúbulos. Os filamentos de actina se localizam mais na periferia das células proporcionando uma extensão e contração rápida das células, pela polimerização e despolimerização destes filamentos. A motilidade, quimiotaxia e outros movimentos das células são basicamente causados pela resposta dos filamentos de actina a estímulos internos e externos nas células. Os filamentos intermediários, como o próprio nome sugere, têm rigidez intermediária entre microtúbulos e filamentos de actina, dando sustentação mecânica adicional para as células [29]. Existe uma enorme literatura a este respeito [30] e modelos mais físicos de motilidade foram elaborados mais recentemente por George Oster e co-autores, baseados em catracas Brownianas [33,34]. Dois livros excelentes e bastante didáticos sobre o assunto são "Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton", autor Jonathon Howard [35], e "Mechanics of the Cell", autor David Boal, [25]. Nesta tese estamos interessados na biomecânica de hemácias, que têm uma bicamada lipídica como outras células, não têm núcleo, e têm um citoesqueleto mais simples constituído majoritariamente por moléculas de espectrina, cujo com-

primário de persistência é da ordem de $5nm$ e forma uma rede hexagonal, como será discutido posteriormente [25]. Embora as propriedades mecânicas de hemácias tenham sido estudadas por mais de 30 anos, ainda existem várias questões em aberto neste problema, que modelos físicos recentes tentam responder [8,15–17]. O objetivo desta tese é apresentar uma nova técnica experimental (microscopia de desfocalização) que pode ser útil na solução destas questões e que temos usado para o estudo da motilidade de outras células também. Nesta seção apresentaremos os ingredientes básicos para se entender os modelos de elasticidade de hemácias e como podemos obter informações sobre a elasticidade de hemácias usando a técnica de microscopia de desfocalização. Para tanto apresentaremos uma breve introdução sobre elasticidade básica, definição dos módulos elásticos de compressão e flexão, noções sobre elasticidade entrópica de filamentos e membranas, energia livre de Helfrich e espectro das flutuações da membrana plasmática e citoesqueleto. Considere o elemento de volume de um material sujeito às forças que agem em sua superfície como indicado na figura 3.11 [23].

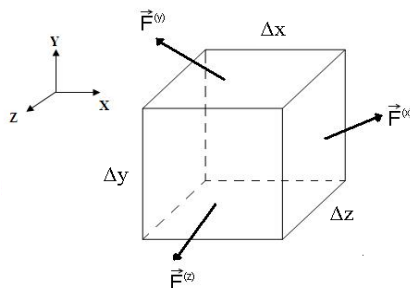


Figura 3.11: Forças superficiais sobre um elemento de volume do material

Estas forças podem ser decompostas em suas componentes cartesianas em cada face: as componentes normais às superfícies destas forças são as forças de compressão ou expansão, enquanto as componentes paralelas às superfícies são as forças de cisalhamento (shear). Consideraremos que este elemento de volume está em equilíbrio mecânico, tal que a soma das forças e soma dos torques é zero. Na figura 3.11 só estão representadas as forças nas faces positivas. Naturalmente nas outras faces, as forças são iguais e opostas para satisfazer a condição de equilíbrio.

O vetor de tração em cada superfície é definido como

$$\vec{t}^{(x)} = \frac{\vec{F}^{(x)}}{\Delta y \Delta z} = \sigma_{xx} \hat{i} + \sigma_{xy} \hat{j} + \sigma_{xz} \hat{k} \quad (3.1a)$$

$$\vec{t}^{(y)} = \frac{\vec{F}^{(y)}}{\Delta x \Delta z} = \sigma_{yx} \hat{i} + \sigma_{yy} \hat{j} + \sigma_{yz} \hat{k} \quad (3.1b)$$

$$\vec{t}^{(z)} = \frac{\vec{F}^{(z)}}{\Delta x \Delta y} = \sigma_{zx} \hat{i} + \sigma_{zy} \hat{j} + \sigma_{zz} \hat{k}. \quad (3.1c)$$

Define-se o tensor das tensões (stress tensor) como

$$\tilde{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix}, \quad (3.2)$$

tal que os vetores de tração são escritos como

$$\vec{t}^{(\hat{n})} = \hat{n} \cdot \tilde{\sigma}, \quad (3.3)$$

onde \hat{n} é a normal à superfície de interesse. O tensor $\tilde{\sigma}$ é simétrico, isto é $\sigma_{ij} = \sigma_{ji}$ para $i \neq j$, do contrário o torque sobre o elemento de volume não seria zero. Estas forças aplicadas ao material causam deformações. Deslocamentos uniaxiais (Δu_{ii}) são aqueles que estão ao longo das componentes normais dos vetores de tração, enquanto que deslocamentos de cisalhamento ($\Delta u_{ij}, i \neq j$) são perpendiculares a estas direções, como na figura 3.12.

Definimos $\varepsilon_{xx} = \frac{\Delta u_{xx}}{\Delta x}$ (deformação uniaxial) e $\varepsilon_{xy} = \frac{\Delta u_{xy}}{\Delta x}$ (deformação de cisalhamento). Para pequenas deformações, $\varepsilon_{ii} = \frac{\partial u_i}{\partial x_i}$ são as deformações uniaxiais e $\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right)$, para $i \neq j$, são as deformações de cisalhamento, com i e j variando de 1 a 3, com $1 \equiv x$, $2 \equiv y$ e $3 \equiv z$. Os tensores das tensões e de deformação dependem da posição no material e são, portanto, campos tensoriais. A lei de Hooke é expressa no caso geral como $\sigma_{ij} = \sum_{kl} C_{ijkl} \varepsilon_{kl}$, onde C_{ijkl} são as constantes elásticas do material. Em princípio se teria $3^4 = 81$ constantes elásticas. Com argumentos de simetria o número destas constantes cai consideravelmente. Em

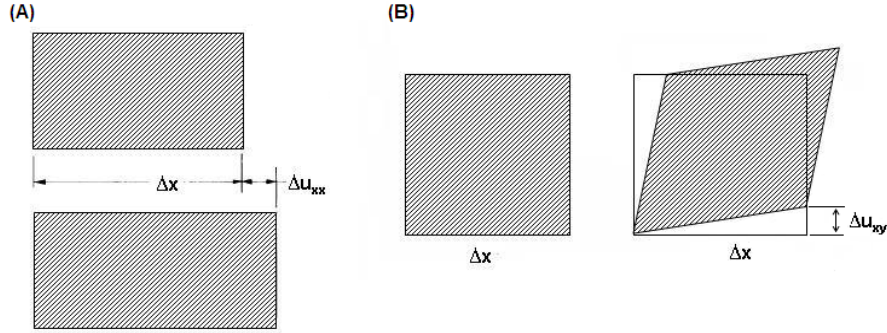


Figura 3.12: (A) Deslocamento uniaxial Δu_{xx} ; (B) Deslocamento de cisalhamento Δu_{xy} .

particular as propriedades mecânicas de um cristal cúbico são definidas por apenas três constantes elásticas, enquanto que para um material homogêneo, isotrópico necessita-se de somente duas constantes, o módulo de Young Y e a razão de Poisson ν , que são definidos a partir de $\sigma_{ii} = Y\varepsilon_{ii}$ e $\frac{\varepsilon_{ii}}{\varepsilon_{jj}} = -\nu$. A unidade do módulo de Young é a mesma de σ já que ε é adimensional, ou seja, Y é dado em $N/m^2 = Pa$. A razão de Poisson é também adimensional e em materiais usuais é maior que 0 e menor que 0,5, e dá a medida de quanto o material encolhe em uma direção quando é esticado na outra. Assim podemos escrever mais geralmente,

$$\varepsilon_{xx} = \frac{\sigma_{xx}}{Y} - \nu \frac{\sigma_{yy}}{Y} - \nu \frac{\sigma_{zz}}{Y} \quad (3.4a)$$

$$\varepsilon_{yy} = -\nu \frac{\sigma_{xx}}{Y} + \frac{\sigma_{yy}}{Y} - \nu \frac{\sigma_{zz}}{Y} \quad (3.4b)$$

$$\varepsilon_{zz} = -\nu \frac{\sigma_{xx}}{Y} - \nu \frac{\sigma_{yy}}{Y} + \frac{\sigma_{zz}}{Y} \quad (3.4c)$$

$$\varepsilon_{ij} = \frac{\sigma_{ij}}{\mu}, \quad (3.4d)$$

com ($i \neq j$) e sendo $\mu = \frac{Y}{2(1+\nu)}$ o módulo de cisalhamento. Podemos então caracterizar o material também pelo módulo de Young e módulo de cisalhamento. Vamos aplicar as equações acima para algumas situações de interesse [25].

1. *Módulo volumétrico K_V*

Vamos considerar um material volumétrico de volume V sujeito a uma pressão

hidrostática p , tal que $\sigma_{ij} = -p\delta_{ij}$. A variação relativa de volume está relacionada com as deformações uniaxiais através de $\frac{\Delta V}{V} = \varepsilon_{xx} + \varepsilon_{yy} + \varepsilon_{zz}$. Substituindo nas equações acima obtemos que $\frac{\Delta V}{V} = -\frac{3(1-2\nu)}{Y}p$. O módulo volumétrico é definido como $\frac{1}{K_V} = -\frac{1}{V}\frac{\Delta V}{p}$ o que resulta em $K_V = \frac{Y}{3(1-2\nu)}$, que mostra que o material com $\nu = 1/2$ é incompressível. Usando a expressão para o módulo de cisalhamento podemos escrever que $Y = \frac{9K_V\mu}{3K_V+\mu}$. Para muitos materiais $\nu \approx 1/3$ resultando em $\mu \approx \frac{3Y}{8}$ e $K_V \approx Y$.

2. Módulo de compressão/expansão superficial K_A

Vamos considerar agora uma lâmina muito fina de espessura d e área A , como da figura 3.13,

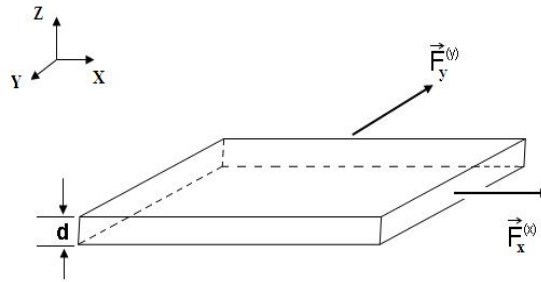


Figura 3.13: Forças superficiais em uma lâmina de espessura d .

sujeita às tensões $\sigma_{xx} = \sigma_{yy} = \sigma$ e com $\sigma_{zz} = 0$, tal que a espessura d varia muito pouco. O módulo superficial K_A é definido a partir da seguinte relação

$$d\sigma = K_A \left(\frac{\Delta A}{A} \right), \quad (3.5)$$

e como

$$\frac{\Delta A}{A} = \varepsilon_{xx} + \varepsilon_{yy} = \frac{2(1-\nu)}{Y}\sigma \quad (3.6)$$

obtemos após alguma manipulação a expressão

$$K_A = \frac{dK_V}{\frac{4}{9} + \frac{K_V}{3\mu}} \quad (3.7)$$

que relaciona os módulos de compressão superficial e volumétrico. O módulo superficial tem unidade de N/m , ou seja, a mesma unidade de uma constante de mola. Estas expressões são importantes no estudo das propriedades mecânicas da bicamada lipídica e citoesqueleto.

3. Flexão de uma haste

Considere uma haste de comprimento L que é flexionada como indicado na figura 3.14. Se a haste é uniforme existe um plano neutro que passa pelo meio da barra dividindo-a em duas partes iguais. Quando esta barra é flexionada este plano neutro não sofre qualquer deformação. Todos os planos acima deste são estendidos e todos abaixo comprimidos, a haste tendo então uma energia potencial elástica (energia de curvatura ou de flexão) maior do que no estado não curvada. Na figura 3.14 os planos constitutivos da haste de largura dy são

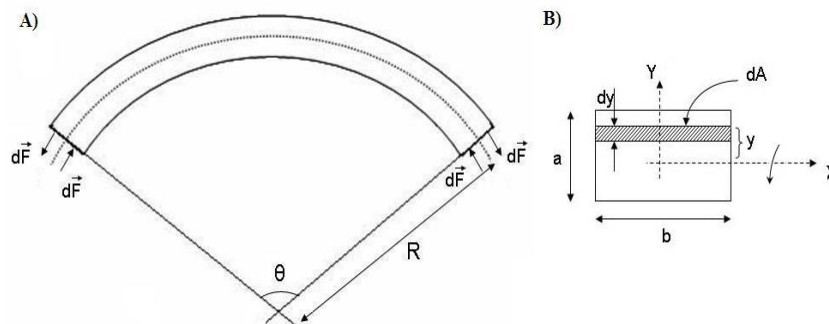


Figura 3.14: (A) Flexão de uma haste de comprimento L , largura b e espessura a . A linha pontilhada indica o plano neutro. (B) Seção reta da haste e sistema de referência para o cálculo do momento de inércia geométrico I .

indexados pela coordenada y , tal que o plano neutro tem coordenada $y = 0$, os planos acima $y > 0$ e os abaixo $y < 0$; o plano na coordenada $y > 0$ estende-se para $L + \Delta L$ e o para $y < 0$ contrai-se para $L - \Delta L$. Assim podemos escrever, $\theta = \frac{L}{R} = \frac{L + \Delta L}{R + y}$ tal que $\frac{\Delta L}{L} = \frac{y}{R}$. O elemento de força dF aplicado na área transversal de área dA da haste como indicado na figura 3.14 causa uma tensão $\sigma = \frac{dF}{dA} = Y \frac{\Delta L}{L} = Y \frac{y}{R}$, assim $dF = \frac{Y}{R} y dA$. O módulo do torque fletor na área

transversal é dado por

$$\tau = \int y dF = \frac{Y}{R} \int_A y^2 dA. \quad (3.8)$$

O termo

$$I = \int_A y^2 dA, \quad (3.9)$$

é chamado de momento de inércia geométrico da haste e é uma constante para uma dada área transversal da haste e para flexão em torno de um dado eixo (I é um tensor). No caso de uma haste com área transversal retangular (como na figura 3.14 b) com espessura a e largura b é fácil mostrar que $I = \frac{a^3b}{12}$ e para uma haste cilíndrica de raio a , $I = \frac{a^4\pi}{4}$. O produto do módulo de Young pelo momento de inércia geométrico da haste é chamado de rigidez fletora

$$\boxed{k_f = YI}, \quad (3.10)$$

assim

$$\boxed{\tau = \frac{YI}{R} = k_f C}, \quad (3.11)$$

com a curvatura $C = \frac{1}{R}$. A energia elástica de curvatura de uma haste de comprimento L pode ser calculada através do trabalho realizado pelo torque para flexionar a haste por um ângulo $d\theta = LdC$, da curvatura inicial zero até a curvatura final C , que resulta em

$$\boxed{U = \int \tau d\theta = k_f L \int_0^C C dC = \frac{1}{2} k_f L C^2}. \quad (3.12)$$

Como se espera de uma energia elástica ela depende da deformação (curvatura) ao quadrado.

3.6 Flutuações em Filamentos e Membranas

Nesta seção faremos a termodinâmica de filamentos e membranas. A questão que queremos analisar é se um filamento ou uma membrana em equilíbrio térmico à temperatura T permanecerão retos e lisos ou apresentarão corrugações. Quantificar estas corrugações é o objetivo dessa seção. Para tanto introduziremos uma escala de comprimento importante chamada de *comprimento de persistência*.

3.6.1 Flutuações Térmicas da Forma de Filamentos e Comprimento de Persistência

O conteúdo desta seção baseia-se seguindo as referências [25,35]. Muitas das principais moléculas biológicas são polímeros mais rígidos, como é o caso dos filamentos de actina e microtúbulos do citoesqueleto, ou polímeros mais flexíveis como é o caso do DNA e espectrina. Para definirmos o significado de rígido ou flexível temos que estudar a termodinâmica de polímeros: se em equilíbrio térmico o polímero esta enovelado na nossa definição ele é flexível, do contrario é rígido. O enovelamento (ou não) ocorre se a energia térmica é maior (ou menor) que a energia elástica de deformação do polímero. Introduziremos o conceito de comprimento de persistência para quantificar a flexibilidade do polímero. Para tanto usaremos o modelo de Kratky-Porod (generalização da equação 3.12), que trata o polímero como um bastonete delgado e que nos fornece a sua energia para uma dada conformação de equilíbrio. Tal modelo é também válido para uma cadeia polimérica sem estresse torsional. Se imaginarmos uma curva qualquer, com comprimento total fixo L_c (que também é chamada de comprimento de contorno), como mostrado na figura 3.15, a cada ponto desta curva corresponderá um vetor posição \vec{r} , representado pelo tripuleto cartesiano (x, y, z) . É conveniente escrever este vetor posição em uma representação paramétrica como função do comprimento do arco s , portanto $\vec{r}(s) \equiv [x(s), y(s), z(s)]$. Nesta parametrização a tangente à curva no ponto s é dada por

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}. \quad (3.13)$$

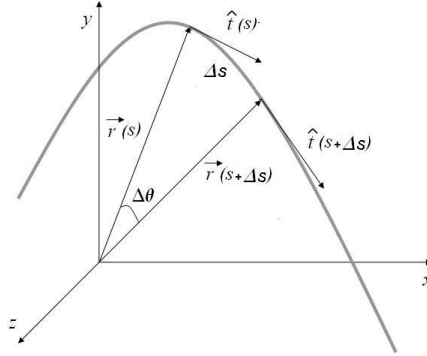


Figura 3.15: Linha genérica s cuja posição no espaço é dada pelo vetor $\vec{r}(s)$.

A curvatura do filamento no ponto s é definida por

$$C\hat{n} = \frac{1}{R}\hat{n} = \frac{1}{R}\frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta} = \frac{\partial \theta}{\partial s}\frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta} = \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \quad (3.14)$$

onde \hat{n} é a normal ao filamento no ponto s . Pela equação 3.12, para um segmento pequeno Δs a energia potencial ΔU armazenada numa flexão é

$$\Delta U = \frac{1}{2}YI \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 \Delta s, \quad (3.15)$$

e finalmente a energia de curvatura total do polímero, neste modelo de Kratky-Porod, pode ser escrita como

$$\boxed{E_{curv} = \frac{1}{2}k_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds}. \quad (3.16)$$

À temperatura zero, um filamento adota uma forma que minimiza a sua energia, o que corresponde a um bastonete reto e rígido. Se a temperatura é diferente de zero, o filamento faz uma troca energética com o ambiente circundante, permitindo que as suas formas flutuem. A energia de curvatura de um filamento é tanto maior quanto mais a sua forma se torna mais contorcida. As forças térmicas associadas ao movimento Browniano produzem flutuações da forma de um filamento flexível. O parâmetro fundamental que descreve a sua resistência à dobradura é o comprimento de persistência ξ_p . Para entender melhor o seu significado, vamos considerar um

arco de comprimento s de um filamento e sejam $\theta(0)$ e $\theta(s)$ os ângulos entre o vetor tangente \vec{t} ao filamento e o eixo horizontal, na origem e no ponto s , respectivamente, como mostrado na figura 3.16.

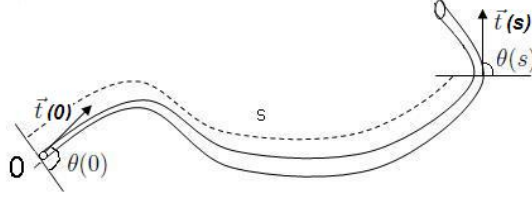


Figura 3.16: Vetores tangentes no ponto zero e no ponto s de um filamento curvo.

Iremos calcular a correlação estatística entre a direção do vetor tangente \vec{t} no ponto 0 e no ponto s . O comprimento de correlação assim obtido é chamado de comprimento de persistência ξ_p . Para $s \gg \xi_p$, $\theta(0)$ e $\theta(s)$ não estão correlacionados, ou seja, a dobradura térmica terá feito o filamento perder a memória da sua direção inicial. Assim quanto menor o ξ_p (quanto mais flexível for o filamento), maior é a sua curvatura produzida pelas forças térmicas, e menor a distância entre as extremidades do filamento. Um exemplo é ilustrado na figura 3.17.

Para definir ξ_p de forma quantitativa, consideramos primeiro um filamento restrito a se mover em um plano, e seja $\theta(s)$ o ângulo entre a tangente do filamento no ponto s e o eixo horizontal. Por simplicidade vamos considerar $\theta(0) = 0$, que não restringe a generalidade do problema, e seja $f(s) = \langle \cos \theta(s) \rangle$, onde o símbolo $\langle \rangle$ se refere à média térmica em um ensemble em equilíbrio térmico à temperatura T . Sendo que $\Delta\theta \equiv \theta(s + \Delta s) - \theta(s)$ temos que [36]

$$\begin{aligned}
 \frac{df}{ds} \Delta s &= f(s + \Delta s) - f(s) \\
 &= \langle \cos [\theta(s + \Delta s)] \rangle - \langle \cos \theta(s) \rangle \\
 &= \langle \cos [\theta(s) + \Delta\theta] \rangle - \langle \cos \theta(s) \rangle \\
 &= \langle \cos \theta(s) \cos \Delta\theta \rangle - \langle \sin \theta(s) \sin \Delta\theta \rangle - \langle \cos \theta(s) \rangle. \quad (3.17)
 \end{aligned}$$

Como as forças térmicas que atuam no segmento $(s, s + \Delta s)$ são estatisticamente

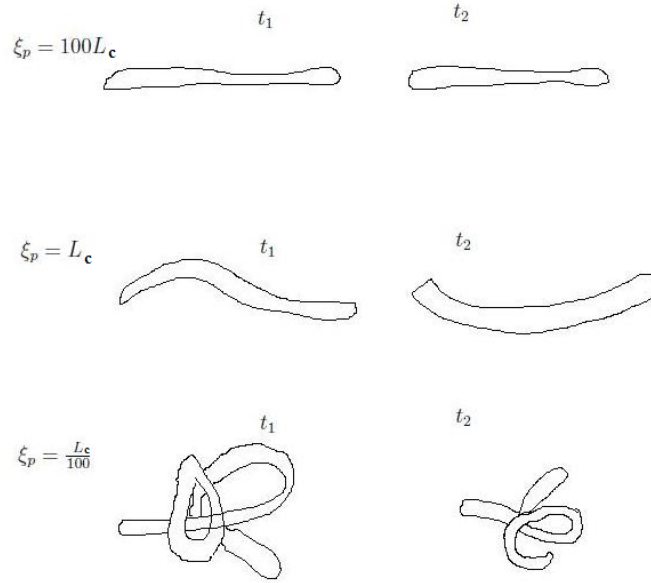


Figura 3.17: Polímeros com diferentes razões entre ξ_p e L_c . Quanto menor ξ_p comparado com L_c , mais enovelado fica o polímero e mais próximos ficam suas extremidades.

independentes das que atuam no segmento $(0, s)$, temos que $\langle \cos \theta(s) \cos \Delta \theta \rangle = \langle \cos \theta(s) \rangle \langle \cos \Delta \theta \rangle$ e além disso, $\langle \sin \Delta \theta \rangle = 0$. Logo, para $\sin \Delta \theta$ suficientemente pequeno, teremos que a equação 3.17 torna-se

$$\begin{aligned} \frac{df}{ds} \Delta s &\approx \langle \cos \Delta \theta - 1 \rangle \langle \cos \theta(s) \rangle \\ &\approx \langle -\frac{1}{2} (\Delta \theta)^2 \rangle f(s) \end{aligned} \quad (3.18)$$

e

$$\frac{df}{ds} = -\frac{1}{2} \langle \left(\frac{\Delta \theta}{\Delta s} \right)^2 \Delta s \rangle f(s). \quad (3.19)$$

Considerando a energia potencial de flexão da equação 3.15 armazenada em Δs , teremos que $\frac{1}{2} \left(\frac{\Delta \theta}{\Delta s} \right)^2 \Delta s = \frac{\Delta U}{YI} = \frac{\Delta U}{k_f}$, logo

$$\frac{df}{ds} = -\frac{\langle \Delta U \rangle}{k_f} f(s). \quad (3.20)$$

Através do Princípio de Equipartição da Energia temos que $\langle \Delta U \rangle = kT$ (um grau de liberdade para cada ângulo) portanto a equação 3.20 fica

$$\frac{df}{ds} = -\frac{kT}{k_f} f(s). \quad (3.21)$$

Definindo $\frac{k_f}{kT} \equiv \xi_p$ (comprimento de persistência) e integrando a equação 3.21 $\int_{f(0)}^{f(s)} \frac{df}{f} = -\int_0^s \frac{ds}{\xi_p}$, portanto $f(s) = f(0)e^{-\frac{s}{\xi_p}}$. Como $f(s) = \langle \cos[\theta(s) - \theta(0)] \rangle$, temos que $f(0) = 1$ e então

$$\boxed{\langle \vec{t}(0) \cdot \vec{t}(s) \rangle \equiv f(s) = e^{-\frac{s}{\xi_p}}}. \quad (3.22)$$

A equação 3.22 mostra que a correlação entre as inclinações $\theta(s)$ e $\theta(0)$ decai exponencialmente com s e que ξ_p é o comprimento de correlação das flutuações de ângulo. Assim quanto mais rígido o filamento maior o comprimento de persistência, conforme seria de se esperar. Quanto mais elevada a temperatura, menor é o valor de ξ_p , porque o impacto das forças térmicas para dobrar o filamento aumenta. O comprimento de persistência também pode ser relacionado com a distância média entre as extremidades do filamento, que é tanto menor quanto mais o polímero se enovela. Para obter essa relação, definimos a distância média entre as extremidades do polímeros, através da média quadrática $\langle R^2 \rangle$, onde \vec{R} é o vetor que une as extremidades, como mostrado na figura 3.18.

Sendo $\hat{t}(s)$ o vetor tangente em cada ponto, \vec{R} é o limite da resultante de uma poligonal construída juntando as extremidade do filamento, portanto

$$\vec{R} = \int_0^{L_c} \hat{t}(s) ds$$

então

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle &= \langle \vec{R} \cdot \vec{R} \rangle \\ &= \left\langle \int_0^{L_c} \hat{t}(s) ds \cdot \int_0^{L_c} \hat{t}(s') ds' \right\rangle \end{aligned}$$

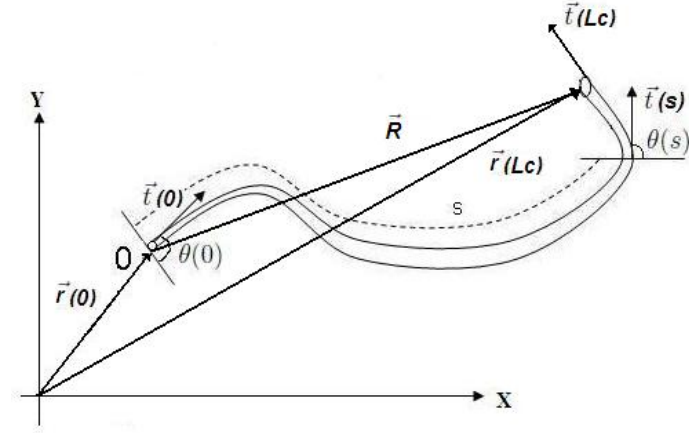


Figura 3.18: Representação do vetor \vec{R} entre as extremidades do filamento.

$$\begin{aligned}
 &= \int_0^{L_c} ds \int_0^{L_c} \langle \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') \rangle ds' \\
 &= 2 \int_{s=0}^{L_c} ds \int_{s'=s}^{L_c} \langle \cos[\theta(s') - \theta(s)] \rangle ds'.
 \end{aligned}$$

Aplicando a equação 3.22 teremos

$$\begin{aligned}
 \langle R^2 \rangle &= 2 \int_{s=0}^{L_c} ds \int_{s'=s}^{L_c} e^{\left[-\frac{(s'-s)}{\xi_p}\right]} ds' \\
 &= 2 \int_0^{L_c} e^{\left(\frac{s}{\xi_p}\right)} ds \int_{s'=s}^{L_c} e^{\left(-\frac{s'}{\xi_p}\right)} ds' \\
 &= 2\xi_p^2 \left[e^{\left(-\frac{L_c}{\xi_p}\right)} - 1 + \frac{L_c}{\xi_p} \right].
 \end{aligned} \tag{3.23}$$

No limite flexível $L_c \gg \xi_p$ o termo exponencial vai para zero, portanto

$$\boxed{\langle R^2 \rangle \simeq 2\xi_p L_c}. \tag{3.24}$$

No limite rígido $L_c \ll \xi_p$ temos que $\langle R^2 \rangle \simeq L_c^2$, que seria o esperado para um filamento reto. Usando o teorema da equipartição da energia no caso flexível, podemos definir uma constante de mola entrópica k_M para o filamento, tal que a energia elástica é dada por

$$U = \frac{1}{2}k_M\langle R^2 \rangle = \frac{3}{2}kT \quad (3.25)$$

e

$$\boxed{k_M = \frac{3kT}{2\xi_p L_c}}. \quad (3.26)$$

Usando este conceito de elasticidade entrópica é possível estimar um limite inferior para o módulo de cisalhamento μ do citoesqueleto de hemácias. Imagens de microscopia eletrônica do citoesqueleto de hemácias indicam que ele é formado por uma rede hexagonal de filamentos de espectrina. Se considerarmos os filamentos de espectrina como molas entrópicas com constante de força entrópica $k_M = \frac{3}{2} \frac{kT}{\xi_p L_c}$, como deduzido na equação 3.26, pode-se mostrar que para esta rede hexagonal bidimensional [25], o módulo de cisalhamento é dado por

$$\mu = \frac{\sqrt{3}}{4}k_M \quad (3.27)$$

e módulo de expansão superficial é dado por

$$K_A = \frac{\sqrt{3}}{2}k_M. \quad (3.28)$$

Note que no caso bidimensional μ tem a mesma unidade de K_A ($\frac{N}{m}$). No caso de filamentos de espectrina $L_c \sim 200nm$ e $\xi_p \sim 5nm$ [37], que resulta em $\frac{\mu}{kT} \cong 650\mu m^{-2}$. As medidas de μ em hemácias dependem de vários fatores como a osmolaridade do meio, que define o estado de tensão do citoesqueleto, concentração de ATP e o modelo elástico/geométrico usado para a sua determinação, uma vez que os experimentos implicam na aplicação de forças e medidas das deformações, o que não é fácil de obter para geometrias complicadas. Várias técnicas são usadas desde sucção por micropipetas [38] até mais recentemente pinças-ópticas [32,39]. Os valores encontrados na literatura se situam no intervalo, $10^3\mu m^{-2} \leq \frac{\mu}{kT} \leq 10^5\mu m^{-2}$. Notamos que o valor previsto pelo modelo entrópico no regime linear é bem próximo do menor valor medido. Veremos nesta tese que usando a técnica de microscopia de

desfocalização e um modelo elástico que será discutido a seguir, obteremos valores da ordem de $\frac{\mu}{kT} \cong 10^4 \mu m^{-2}$. Em particular Hénon et al. [39] para hemácias em um meio hipotônico com osmolaridade de $25 \frac{moles}{Kg}$ e sem ATP encontraram os valores de $\mu = (2,5 \pm 0,4) \frac{\mu N}{m}$ e $K_A = (4,8 \pm 0,8) \frac{\mu N}{m}$, tal que $\frac{K_A}{\mu} = 1,9$ é muito próximo de 2 como previsto para redes hexagonais e com valores compatíveis com uma rede de molas entrópicas.

3.6.2 Representação de Monge para Superfícies

O conteúdo desta seção baseia-se nas referências [24,25]. Para estudar as propriedades de superfícies e interfaces precisamos ter uma descrição de sua geometria, o que pode ser obtido através da geometria diferencial de superfícies. A seguir iremos introduzir alguns dos elementos básicos para esta descrição. Usaremos coordenadas cartesianas para expressar um ponto \vec{r} sobre uma superfície qualquer, tal que $\vec{r}(x, y, z) \equiv \vec{r}[(x, y, h(x, y))]$, onde a coordenada z foi parametrizada pela função $h(x, y)$. A função $h(x, y)$ pode não ser uma função (single-valued) no caso de superfícies com dobras como na figura 3.19 (A).

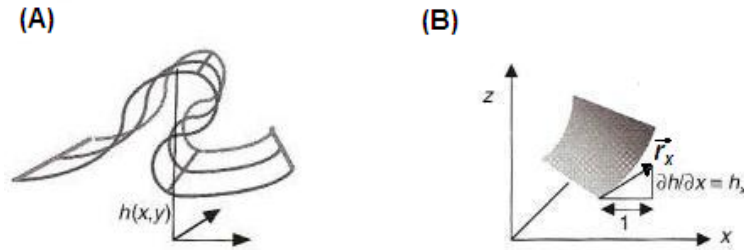


Figura 3.19: (A) Figura de uma superfície com uma dobra, onde a função $h(x, y)$ não é single-valued. (B) Figura de uma superfície curva, onde a função $h(x, y)$ é single-valued. Mostra-se o deslocamento unitário ao longo de x que gera o vetor tangente \vec{r}_x .

Adotaremos a *representação de Monge* onde $h(x, y)$ é uma função (single-valued) e, portanto, esta descrição é válida para pequenas deformações, ou seja, para regiões da superfície com dimensões lineares menores que seu comprimento de persistência. O vetor tangente à superfície ao longo da direção x é construído fazendo-se um deslocamento unitário ao longo de x , como na figura 3.19 (B), tal que $\vec{r}_x = (1, 0, h_x)$ com $h_x \equiv \frac{\partial h}{\partial x}$. Analogamente para um deslocamento ao longo de y obtemos $\vec{r}_y = (0, 1, h_y)$, com $h_y \equiv \frac{\partial h}{\partial y}$. Os vetores tangentes \vec{r}_x e \vec{r}_y não são necessariamente unitários. O vetor unitário normal a esta superfície é dado por

$$\hat{n} = \frac{\vec{r}_x \times \vec{r}_y}{|\vec{r}_x \times \vec{r}_y|} = \frac{(-h_x, -h_y, 1)}{\sqrt{1+h_x^2+h_y^2}}. \quad (3.29)$$

O produto vetorial dos vetores $r_x^{\vec{}}dx$ e $r_y^{\vec{}}dy$ fornece o elemento de área desta superfície,

$$dA = dxdy|r_x^{\vec{}} \times r_y^{\vec{}}| = dxdy\sqrt{1 + h_x^2 + h_y^2}. \quad (3.30)$$

A quantidade $g = \sqrt{1 + h_x^2 + h_y^2}$ é chamada de métrica da superfície. Claramente para uma superfície plana $h_x = h_y = 0$, tal que $g = 1$ e $dA = dxdy$ como se esperaria.

3.6.3 Flutuações Térmicas da Área de Interfaces

O conteúdo desta seção baseia-se na referência [24]. Aproveitando de imediato o resultado da equação 3.30, podemos obter informações interessantes sobre flutuações térmicas de interfaces. A energia livre da interface que separa dois meios é dada por

$$F_S = \sigma \int dA \quad (3.31)$$

onde σ é a tensão superficial desta interface. Vemos que a unidade de σ é $\frac{J}{m^2}$ ou $\frac{N}{m}$. A variação da energia livre de uma interface em relação à configuração de interface plana é então,

$$\Delta F_S = \sigma \int dxdy\sqrt{1 + h_x^2 + h_y^2} - \sigma \int dxdy. \quad (3.32)$$

Para flutuações com amplitudes pequenas e suaves, $h_x \ll 1$ e $h_y \ll 1$ e podemos fazer a expansão $\sqrt{1 + h_x^2 + h_y^2} \simeq 1 + \frac{h_x^2}{2} + \frac{h_y^2}{2}$. Finalmente obtemos $\Delta F_S = \sigma \int (1 + \frac{h_x^2}{2} + \frac{h_y^2}{2} - 1)dxdy = \frac{\sigma}{2} \int (h_x^2 + h_y^2)dxdy$ ou mais compactamente,

$$\boxed{\Delta F_S = \frac{\sigma}{2} \int |\nabla h|^2 dxdy}. \quad (3.33)$$

Decompondo as deformações da superfície em série de Fourier,

$$h(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{A}} \sum_q h(\vec{q}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \quad (3.34)$$

com $\vec{\rho} \equiv x\hat{i} + y\hat{j}$, temos que $|\nabla h|^2 = \frac{1}{A} \sum_q q^2 |h(\vec{q})|^2$. Se a interface está em equilíbrio térmico à temperatura T e como ΔF_s é uma energia elástica (quadrática na amplitude h), podemos usar o teorema da equipartição de energia, tal que para cada modo espacial

$$\frac{kT}{2} = \frac{\sigma q^2}{2A} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle \int_A dx dy = \frac{\sigma q^2}{2} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle. \quad (3.35)$$

Finalmente obtemos o espectro de potência espacial das flutuações de capilaridade da superfície,

$$\boxed{\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma q^2}}. \quad (3.36)$$

A unidade de $\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle$ é m^4 . A dependência do espectro espacial com q^{-2} é uma assinatura de flutuações de capilaridade. Pela equação 3.36 quanto maior o número de onda q (ou menor o comprimento de onda) da flutuação, menor a amplitude da flutuação. No espaço real, temos que

$$\langle h^2 \rangle = \frac{1}{A} \sum_{\vec{q}} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle,$$

que no limite contínuo,

$$\sum_{\vec{q}} \rightarrow \frac{A}{(2\pi)^2} \int d\vec{q} = \frac{A}{2\pi} \int q dq,$$

resulta em,

$$\langle h^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{q_0}^{q_m} \frac{kT}{\sigma q} dq = \frac{kT}{2\pi\sigma} \ln \frac{q_m}{q_0}.$$

O limite inferior é definido pelo tamanho da interface $q_0 = \frac{\pi}{L}$, e o limite superior é definido pelo tamanho a da molécula constituinte da interface, $q_m = \frac{\pi}{a}$. O resultado é

$$\boxed{\langle h^2 \rangle = \frac{kT}{2\pi\sigma} \ln \frac{L}{a}}. \quad (3.37)$$

Pela equação 3.37 vemos que $\langle h^2 \rangle \rightarrow \infty$ para $L \rightarrow \infty$. Por exemplo, para a interface água-ar tem-se $\sigma = 0,075 \frac{J}{m^2}$, $a \sim 0,3nm$, para uma interface de tamanho $L \sim 1mm$ e $kT = 4 \times 10^{-21} J$, obtemos

$$h_{rms} \equiv \sqrt{\langle h^2 \rangle} = 0,36nm.$$

A capilaridade inibe as flutuações da interface água-ar na escala de comprimentos de onda de mm ou menores. Para membranas biológicas a tensão superficial é em geral bem menor, da ordem de $\sigma \sim 10^{-4} \frac{J}{m^2}$, tal que $h_{rms} \sim 10nm$ para as mesmas condições anteriores. Flutuações desta amplitude podem ser estudadas com a nossa técnica de microscopia de desfocalização, como veremos depois.

3.6.4 Potencial de Confinamento

O conteúdo desta seção baseia-se na referência [24]. Pela equação 3.37 temos que $\langle h^2 \rangle$ diverge quando o tamanho da interface se torna muito grande, $L \rightarrow \infty$. Esta divergência é eliminada se consideramos o efeito da força gravitacional, que também é uma força restauradora para que a interface volte à forma planar. Qual força restauradora (capilar ou gravitacional) é a mais importante depende do comprimento de onda da flutuação, como veremos. A energia potencial gravitacional de uma partícula em uma altura $h(x, y)$ acima do plano $z = h = 0$, que estabelece o zero da energia, é mgh , onde m é a massa e g é a constante gravitacional. A energia gravitacional por unidade de área é $\int_0^h \rho_0 g z dz$ onde ρ_0 é a densidade (ou diferença de densidades para o caso da interface entre dois líquidos). A variação da energia gravitacional da interface é então,

$$\Delta F_g = \frac{\rho_0 g}{2} \int h^2(x, y) dx dy.$$

Identificando $\rho_0 g \equiv \gamma$, com γ o potencial de confinamento com unidade $\frac{J}{m^4}$, podemos escrever a variação de energia livre, levando em conta as duas contribuições, como

$$\boxed{\Delta F = \frac{\sigma}{2} \int |\nabla h|^2 dx dy + \frac{\gamma}{2} \int h^2 dx dy}. \quad (3.38)$$

Usando o mesmo procedimento anterior de decomposição em série de Fourier, as flutuações de equilíbrio terão o seguinte espectro de potência espacial,

$$\boxed{\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{kT}{\sigma q^2 + \gamma}} \quad (3.39)$$

com a divergência para $q \rightarrow 0$ eliminada pelo potencial de confinamento. Existe um comprimento de onda característico neste caso, tal que para valores menores que ele a força de capilaridade domina e para valores maiores a força gravitacional domina a restauração. Este comprimento de onda é definido por $\sigma(\frac{2\pi}{\xi})^2 = \gamma$, ou seja $\xi = 2\pi\sqrt{\frac{\sigma}{\gamma}}$. No caso água-ar $\xi \simeq 17mm$. Assim para flutuações com comprimentos de onda maiores que $17mm$ a força gravitacional domina a restauração e para valores menores a força de capilaridade domina a restauração. No espaço real

$$\langle h^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{q_0}^{q_m} \frac{kT}{\sigma q^2 + \gamma} q dq = \frac{kT}{4\pi\sigma} \ln \frac{\sigma q_m^2 + \gamma}{\sigma q_0^2 + \gamma}.$$

Para $L \rightarrow \infty$, $q_0 \rightarrow 0$ e $q_m = \frac{\pi}{a}$ teremos

$$\langle h^2 \rangle = \frac{kT}{4\pi\sigma} \ln \left[\frac{\sigma q_m^2}{\gamma} + 1 \right] = \frac{kT}{4\pi\sigma} \ln \left[\left(\frac{\xi}{2a} \right)^2 + 1 \right],$$

portanto, $h_{rms} \simeq 0,05nm$, a divergência é eliminada. Veremos no capítulo seguinte, em um dos modelos de elasticidade para hemácias, o acoplamento da bicamada lipídica com o citoesqueleto de espectrina é modelado por um potencial harmônico, que introduz um potencial de confinamento como acima, com o mesmo espectro de potência dado pela equação 3.39.

3.6.5 Curvatura de Superfícies

O conteúdo desta seção baseia-se nas referências [24,25]. No caso de membranas biológicas as deformações de curvatura são das mais importantes como veremos. A curvatura de uma superfície pode ser obtida da mesma definição para uma

linha, como dado pela equação 3.14 anterior. Repetindo a equação 3.14 temos que $C = \hat{n} \cdot \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2}$, onde s é o comprimento de arco e $\vec{r}[x, y, h(x, y)]$ especifica um ponto na superfície, na parametrização de Monge. Entretanto, a curvatura de uma superfície não é única, tal que o caminho sobre a superfície, ao longo do qual se está determinando a curvatura, deve ser especificado. Por exemplo, a curvatura de uma casca cilíndrica de raio R é zero na direção paralela ao eixo do cilindro e $\frac{1}{R}$ ao longo do círculo perpendicular ao eixo. Poderíamos escolher outros caminhos sobre a superfície do cilindro, cada um tendo uma curvatura diferente. Os valores extremos das curvaturas são chamados de curvaturas principais, denotados por C_1 e C_2 e são os autovalores do tensor de curvatura. As combinações $H = \frac{C_1 + C_2}{2}$ e $K = C_1 C_2$ são chamadas de curvatura média e curvatura Gaussiana, respectivamente. Para determinar as curvaturas temos que resolver a equação $C = \hat{n} \cdot \frac{d^2 \vec{r}}{ds^2}$ com as condições $\hat{n} \cdot \vec{r}_x = \hat{n} \cdot \vec{r}_y = 0$. Este é um problema de geometria diferencial, que envolve algumas páginas de álgebra e portanto, nos limitaremos a apresentar os principais resultados na representação de Monge. Os invariantes do tensor de curvatura são a curvatura média H e a curvatura Gaussiana, que na representação de Monge são dados por,

$$H = \frac{(1 + h_x^2)h_{yy} + (1 + h_y^2)h_{xx} - 2h_x h_y h_{xy}}{2\sqrt{1 + h_x^2 + h_y^2}}$$

e

$$K = \frac{h_{xx}h_{yy} - h_{xy}^2}{(1 + h_x^2 + h_y^2)^2}.$$

No limite de superfície quase plana $h_x \ll 1$ e $h_y \ll 1$, tem-se que

$$\boxed{H \simeq \frac{1}{2}(h_{xx} + h_{yy}) \equiv \frac{C_1 + C_2}{2}} \quad (3.40)$$

e

$$\boxed{K \simeq h_{xx}h_{yy} - h_{xy}^2 \equiv C_1 C_2}. \quad (3.41)$$

Graças ao teorema de Gauss-Bonnet a curvatura Gaussiana não é importante na determinação do espectro das flutuações. Segundo este teorema a integral de superfície da curvatura Gaussiana é uma constante para superfícies com mesma topologia,

$\int C_1 C_2 dA = 2\pi\chi$ onde χ é um invariante topológico da superfície. Para a esfera $\chi = 2$. Assim, para pequenas flutuações em torno de uma superfície com forma fixa, a topologia da superfície é mantida. A integral da curvatura Gaussiana simplesmente soma uma constante à energia livre de curvatura da superfície. Desta forma a variação da energia livre de curvatura em relação à interface plana é dada por

$$\boxed{\Delta F_c = \frac{k_c}{2} \int (C_1 + C_2)^2 dA}. \quad (3.42)$$

Está é uma das versões da energia livre de Helfrich [26,27], com k_c o módulo de curvatura que tem unidade de energia (J). Veremos adiante que no modelo elástico para hemácias de Auth et al. [8], o potencial de confinamento bicamada-citoesqueleto depende das duas curvaturas através do termo $(2H^2 - K)$. Para estudar as flutuações de curvatura em membranas, substituímos a equação 3.40 na equação 3.42 e obtemos,

$$\boxed{\Delta F_c = \frac{k_c}{2} \int (h_{xx} + h_{yy})^2 dA = \frac{k_c}{2} \int (\nabla^2 h)^2 dA}. \quad (3.43)$$

Fazendo a mesma decomposição em Fourier que anteriormente, o espectro de potência espacial para flutuações de curvatura em equilíbrio térmico é dado por

$$\boxed{\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{kT}{k_c q^4}}. \quad (3.44)$$

A dependência do espectro espacial com q^{-4} é uma assinatura de flutuações de curvatura. As flutuações no espaço-real resultam em

$$\langle h^2 \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{q_0}^{q_m} \frac{kT}{k_c q^4} q dq = \frac{kT}{4\pi k_c} \left(\frac{1}{q_0^2} - \frac{1}{q_m^2} \right).$$

Para $q_0 = \frac{\pi}{L}$, $q_m = \frac{\pi}{a}$ e com $L \gg a$ temos $\langle h^2 \rangle \simeq \frac{kT}{4\pi^3 k_c} L^2$, que também diverge para $L \rightarrow \infty$. Um potencial de confinamento evita esta divergência. Tipicamente para membranas biológicas $k_c \sim 10^{-19} J$ e para $L = 1mm$, $h_{rms} \sim 18\mu m$, o que poderia ser medido com técnicas de microscopia óptica. Para uma membrana livre não tensionada ($\sigma \sim 0$) a flutuação principal é de curvatura. Somando todas as

contribuições mencionadas anteriormente, podemos escrever a variação de energia livre para membranas como

$$\Delta F = \int \left[\frac{k_c}{2} (\nabla^2 h)^2 + \frac{\sigma}{2} |\nabla h|^2 + \frac{\gamma}{2} h^2 \right] dA. \quad (3.45)$$

que resulta em um espectro de potência espacial para as flutuações em equilíbrio térmico dado por,

$$\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{kT}{k_c q^4 + \sigma q^2 + \gamma}. \quad (3.46)$$

Veremos que nossos dados experimentais de flutuações das superfícies de hemácias são bem ajustados pelo espectro de potência dado pela equação 3.46. O modelo de Auth et al. [8], que iremos discutir na próxima seção, prevê o espectro espacial acima, com uma interpretação física para σ e γ resultante do acoplamento entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto de espectrina.

3.6.6 Energia Livre de Helfrich com Curvatura Espontânea

O conteúdo desta seção baseia-se na referência [40]. Para membranas com a parte interna e externa assimétricas a configuração de equilíbrio não é necessariamente planar. Por exemplo, uma camada com moléculas anfifílicas onde as cabeças polares se atraíam, mas as caudas carbônicas têm que ficar separadas (efeitos estéricos), a tendência da camada em equilíbrio é ter a curvatura como indicado na figura 3.20.



Figura 3.20: Camada anfifílica assimétrica que causa uma configuração de equilíbrio não planar (com curvatura espontânea).

As hemácias podem assumir várias formas e são somente ativas na forma biconcava. A energia livre de Helfrich que iremos apresentar à seguir é capaz de

prever as várias formas de hemácias e vesículas lipídicas. As tensões superficiais de membranas são em geral muito pequenas tal que deformações de curvatura são as que mais contribuem para a energia livre. A energia livre de Helfrich é uma energia livre de curvatura. Desta forma iremos fazer uma definição fenomenológica das constantes elásticas fazendo uma expansão em série da energia livre em termos de suas curvaturas principais C_1 e C_2 ou combinações lineares dela. Em particular, para evidenciar certas propriedades de simetria, é conveniente fazer a expansão em termos das variáveis $C_+ = C_1 + C_2$ e $C_- = C_1 - C_2$. Expandindo a energia livre até segunda ordem em torno da configuração planar $C_+ = C_- = C_1 = C_2 = 0$, temos

$$F(C_+, C_-) = F(0, 0) + \left(\frac{\partial F}{\partial C_+}\right)_{0,0} C_+ + \left(\frac{\partial F}{\partial C_-}\right)_{0,0} C_- + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+^2}\right)_{0,0} C_+^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_-^2}\right)_{0,0} C_-^2 + \left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+ \partial C_-}\right)_{0,0} C_+ C_-.$$

Os termos lineares em C_- devem ser anulados por causa da simetria do problema, isto é, a invariância da energia livre com respeito à transformação $C_1 \rightarrow C_2$, $C_2 \rightarrow C_1$ e conseqüentemente $C_+ \rightarrow C_+$ e $C_- \rightarrow -C_-$. Então,

$$F(C_+, C_-) = F(0, 0) + \left(\frac{\partial F}{\partial C_+}\right)_{0,0} C_+ + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+^2}\right)_{0,0} C_+^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_-^2}\right)_{0,0} C_-^2. \quad (3.47)$$

O segundo termo da equação 3.47 determina a curvatura para qual a energia livre é mínima. Para camadas simétricas, isto é aqueles para as quais $F(C_+, C_-) = F(-C_+, -C_-)$, a geometria planar com $C_+ = C_- = C_1 = C_2 = 0$ é a configuração de equilíbrio. As derivadas segundas originam duas constantes elásticas independentes. No caso não-simétrico, as curvaturas C_+^0 e C_-^0 que minimizam F são soluções das equações,

$$\left(\frac{\partial F}{\partial C_+}\right)_{C_+^0, C_-^0} = 0 \quad (3.48)$$

e

$$\left(\frac{\partial F}{\partial C_-}\right)_{C_+^0, C_-^0} = 0. \quad (3.49)$$

Resolver a equação 3.48 corresponde a derivar a equação 3.47 em relação a C_+ e igualar o resultado a zero, o que resulta em

$$C_+^0 = \frac{-\left(\frac{\partial F}{\partial C_+}\right)_{0,0}}{\left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+^2}\right)_{0,0}}. \quad (3.50)$$

Analogamente a solução da equação 3.49 é

$$C_-^0 = 0 \quad (3.51)$$

uma vez que $\left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+^2}\right)_{0,0} \neq 0$. Redefinindo as constantes através de

$$\left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+^2}\right)_{0,0} \equiv \left(k_c + \frac{k_G}{2}\right)a \quad (3.52)$$

$$\left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_-^2}\right)_{0,0} \equiv -\frac{k_G}{2}a \quad (3.53)$$

e

$$-\left(\frac{\partial F}{\partial C_+}\right)_{0,0} = C_+^0 \left(\frac{\partial^2 F}{\partial C_+^2}\right)_{0,0} \equiv k_c C_0 a \quad (3.54)$$

com a a área média ocupada por cada molécula. A densidade superficial de energia livre $f \equiv \frac{F}{a}$ é dada por

$$f = f(0,0) - k_c C_0 C_+ + \frac{1}{2} \left(k_c + \frac{k_G}{2}\right) C_+^2 - \frac{1}{2} \left(\frac{k_G}{2}\right) C_-^2 \quad (3.55)$$

ou

$$f - f(0,0) + \frac{1}{2} k_c C_0^2 = \frac{1}{2} k_c (C_+ - C_0)^2 + \frac{1}{4} k_G (C_+^2 - C_-^2) \quad (3.56)$$

ou

$$\Delta f = \frac{1}{2}k_c(C_1 + C_2 - C_0)^2 + k_G C_1 C_2 \quad (3.57)$$

onde k_c é o módulo de curvatura, k_G é o módulo elástico Gaussiano e C_0 é a curvatura espontânea. Para estabelecer certos limites para os módulos elásticos, se a interface plana é o estado de equilíbrio, as derivadas da equações 3.52 e 3.53 devem ser maiores que zero (mínimo de F), ou seja $(k_c + \frac{k_G}{2})a > 0$ e $-\frac{k_G}{2}a > 0$ o que resulta em $-2k_c < k_G < 0$. A forma geral da energia livre de Helfrich é então,

$$\Delta F_c = \frac{k_c}{2} \int (C_1 + C_2 - C_0)^2 dA + \frac{k_G}{2} \int C_1 C_2 dA \quad (3.58)$$

Helfrich [26,27] usando a equação 3.58 foi capaz de prever várias formas reais de hemácias e vesículas lipídicas artificiais. A curvatura espontânea $C_0 \neq 0$ faz com que a configuração de menor energia livre não seja uma interface plana. O estudo das flutuações de hemácias em torno de uma forma real com $C_0 \neq 0$ é uma tarefa formidável e foi realizado por M.A.Peterson [41], considerando a hemácia como uma casca homogênea. Todos os outros modelos usam a aproximação de superfícies planas $C_0 = 0$ o que simplifica muito o problema e permite uma descrição mais realista da interação membrana-citoesqueleto. Como já mencionamos anteriormente, a integral sobre a curvatura Gaussiana não afeta o resultado do espectro das flutuações. Assim para interfaces planas a equação 3.58 se reduz efetivamente à equação 3.42 para a determinação do espectro de potência espacial das flutuações de curvatura. O comprimento de persistência da membrana, considerando-se flutuações de curvatura, é calculado da mesma maneira que para filamentos, mas agora calculando a função de correlação entre as normais à superfície em pontos diferentes. Este é um cálculo trabalhoso que simplesmente apresentaremos o resultado [24], $\xi_p = ae^{\frac{4\pi k_c}{\alpha k T}}$, com a uma dimensão molecular e α da ordem da unidade. Para membranas típicas $k_c \simeq 10^{-19} J$, tal que ξ_p é muito grande da ordem de $10^{30} m$! Conseqüentemente as distâncias na membrana são muito menores que ξ_p . Assim a representação de Monge para estas superfícies se adequa muito bem, sendo uma aproximação excelente.

3.7 Modelos de Elasticidade de Hemácias

As hemácias são células sem núcleo, convenientes para o estudo da membrana celular e para modelagem física. As hemácias têm interfaces compostas consistindo de uma membrana que é uma bicamada lipídica (com propriedades de um fluido bidimensional) acoplada a um citoesqueleto bidimensional de espectrinas (com propriedades de sólido), que confere às hemácias a necessária maciez e ao mesmo tempo uma grande rigidez ao cisalhamento, para que elas possam atravessar capilares sem serem destruídas. Por causa desta composição dupla, resultados experimentais diferentes para os módulos elásticos são obtidos quando se usam técnicas diferentes. O módulo de curvatura tem valores $k_c \sim 30kT$ a $80kT$ [38] quando se mede com aspiração por pipeta, que é uma técnica estática, comparado com os valores $k_c \sim 3kT$ a $8kT$ [14] obtidos a partir das flutuações de curvatura da membrana, com $kT = 4 \times 10^{-21}$ J sendo a energia térmica em temperatura ambiente. Como foi demonstrado experimentalmente por Zilker et al. [20,42], o módulo de curvatura é dependente do comprimento de onda das flutuações da membrana, sendo maior para comprimentos de onda maiores e menor para comprimentos de onda menores. Estes resultados serviram de motivação para novos experimentos e novos modelos de elasticidade de hemácias. O experimento pioneiro com uma modelagem somente baseada nas flutuações de curvatura da membrana foi realizado por Brochard e Lennon [14] em 1975. Neste trabalho foi usado o espectro de potência espacial das flutuações dado pela equação 3.44 ($\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{kT}{k_c q^4}$), onde k_c é o módulo de curvatura da membrana, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Foram obtidos valores de $k_c \sim 3$ a $8kT$. Além disto, neste trabalho foi considerado a interação entre as duas superfícies da hemácia (superior e inferior), que dá um tempo de decaimento para as flutuações temporais proporcional a q^{-6} . O modelo de Brochard e Lennon, bem como todos os modelos posteriores consideram as duas superfícies das hemácias como planos paralelos. O único trabalho teórico que leva em conta a forma apropriada para hemácias é o trabalho de M.A. Peterson [41]. No entanto, neste trabalho a hemácia é considerada como um material homogêneo, não se distinguindo as propriedades da membrana das do citoesqueleto. O modelo de Peterson aparentemente reproduz os resultados do módulo de curvatura para comprimentos de onda longos, próximos dos valores estáticos. Os experimentos de Korenstein e

co-autores [9,10] indicam claramente que para descrever as flutuações de curvatura de hemácias um novo ingrediente deveria ser adicionado, ou seja, a interação de ATP (adenosina trifosfato) com o citoesqueleto de espectrina. Neste trabalho é mostrado que as flutuações aumentam com o aumento de ATP. Talvez, também devido a este fato, o módulo de curvatura obtido através de medidas de flutuações apresenta valores muito menores que os de outras técnicas, por causa da transformação de energia química diretamente em trabalho mecânico, além das flutuações de origem puramente térmicas. Recentemente estes resultados foram contestados por Evans et al. [11]. Os primeiros modelos que tentam descrever a interação da membrana com o citoesqueleto são os modelos de Gov et al. [15] e o de Fournier et al. [18]. O primeiro modelo que tenta descrever o efeito da fosforilação das proteínas do citoesqueleto por ATP é o de Gov et al. [16,17], onde o ATP corta as ligações entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto, que são refeitas após algum tempo, aumentando as flutuações de curvatura da bicamada, como mostrado na figura 3.21. Este modelo é também capaz de explicar o fato da amplitude das flutuações dependerem da viscosidade do meio [9], o que não seria esperado de um sistema em equilíbrio térmico. Neste caso fora-do-equilíbrio, para ocorrer a reação química entre o ATP e os nodos do citoesqueleto, ATP deve difundir até estes locais, o que causa a dependência da amplitude das flutuações com a viscosidade, já que a cinética da reação depende do coeficiente de difusão do ATP. O tempo de reconexão dos filamentos ao citoesqueleto depende também da viscosidade.

O citoesqueleto de espectrina tem uma estrutura hexagonal e está ligado à bicamada lipídica nos nodos de actina, como indicado na figura 3.21. Os filamentos de espectrina entre os nodos agem como molas entrópicas, que além de proporcionar ao citoesqueleto a rigidez ao cisalhamento, limita as flutuações de altura da bicamada. Uma síntese fenomenológica dos modelos para o espectro espacial das flutuações, onde o acoplamento citoesqueleto-bicamada e o efeito de ATP são levados em conta em uma primeira versão é dada pela relação abaixo [15], que é a mesma equação 3.46, com as modificações abaixo

$$\langle |u(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{kT_{ef}}{k_c q^4 + \sigma_{ef} q^2 + \gamma}. \quad (3.59)$$

O termo em q^4 no denominador é o termo tradicional devido a flutuações de cur-

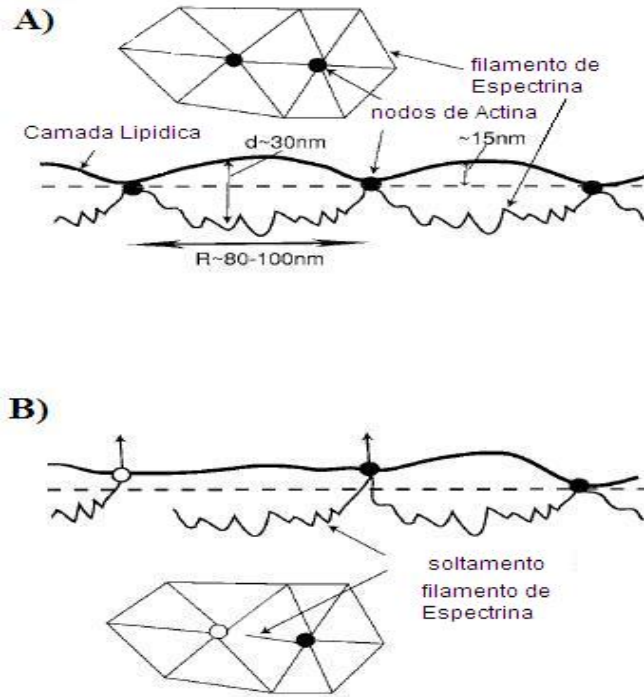


Figura 3.21: (A) Modelo de acoplamento de citoesqueleto para hemácias; (B) Ruptura da ligação de espectrina ativada por ATP.

vatura com k_c o módulo de curvatura da membrana; as conexões da membrana ao citoesqueleto introduzem uma tensão superficial efetiva σ_{ef} ; como esta ligação é feita através de molas entrópicas de espectrina, aparece o potencial de confinamento γ que deve estar também relacionado ao módulo de cisalhamento do citoesqueleto, como veremos adiante; a temperatura efetiva T_{ef} incorpora em uma constante fenomenológica ad-hoc os efeitos térmicos e não-térmicos (dependentes de ATP), com $T_{ef} > T_{ambiente}$. Uma justificativa para a T_{ef} baseada em um modelo microscópico pode ser vista na referência [17]. O potencial de confinamento faz com que a distância média d entre a membrana e o citoesqueleto se mantenha fixa, sendo da ordem da raiz quadrada da flutuação quadrática média de altura $d \cong u_{rms} = \sqrt{\langle u^2 \rangle}$. A equação 3.59 ajusta a maioria dos dados disponíveis para hemácias. Recentemente Auth et al., [8] fizeram um tratamento teórico mais rigoroso sobre a interação bicamada-citoesqueleto, partindo de um modelo microscópico e chegando ao limite contínuo, válido para comprimentos de onda maiores que 400 nm, apropriado para análise dos

experimentos de flutuações da membrana de hemácias usando-se microscopia óptica.

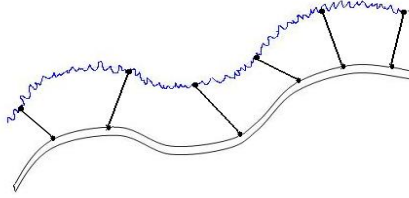


Figura 3.22: Ilustração do acoplamento dos modos de cisalhamento do citoesqueleto e de curvatura da membrana indicando que para grandes comprimentos de onda as duas camadas flutuam juntas.

Neste artigo é mostrado que devido à interação dos modos de curvatura da membrana líquida (bicamada lipídica) com os modos de cisalhamento da membrana sólida (citoesqueleto de espectrina), para comprimentos de onda maiores que a distância típica entre nodos (da ordem de 80 a 100 nm), as duas membranas flutuam juntas de tal forma que os módulos elásticos de ambas podem ser representados por módulos efetivo de uma única membrana, como ilustrado na figura 3.22. Em particular, como o módulo de curvatura da bicamada é muito maior que o do citoesqueleto, este prevalece, enquanto que o módulo de cisalhamento da bicamada é zero e o do citoesqueleto é μ , portanto é este que prevalece.

Além disto o potencial de confinamento γ depende da curvatura local da hemácia, uma vez que a energia livre requerida para expandir o citoesqueleto depende da curvatura local. Na figura 3.23 ilustramos este fato tal que quanto maior é a curvatura local da hemácia, mais as molas entrópicas de espectrina estão esticadas, o que tensiona a estrutura e aumenta o potencial de confinamento. O resultado final deste modelo para o espectro de potência espacial das flutuações de altura é dado pela mesma equação 3.59, onde [8]

$$\sigma_{ef} = \frac{9\mu k T_{ef}}{16\pi k_c} \quad (3.60)$$

e

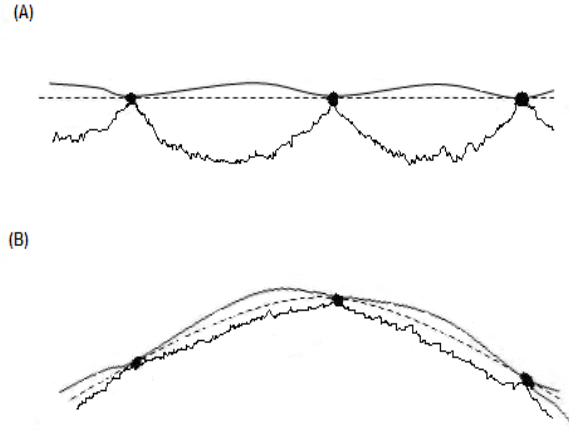


Figura 3.23: (A) Ilustração da bicamada e citoesqueleto não tensionados, superfície plana; (B) Ilustração do aumento do potencial de confinamento causado pela curvatura local da bicamada-citoesqueleto. A curvatura local estica as molas entrópicas tensionando a estrutura e confinando as flutuações da bicamada lipídica.

$$\boxed{\gamma = \frac{3\mu}{A} \int_A (2H^2 - K) dS}, \quad (3.61)$$

com A área da região da membrana considerada, μ o módulo de cisalhamento do citoesqueleto, k_c o módulo de curvatura da bicamada, H a curvatura média da membrana e K a curvatura Gaussiana local, ou seja $H = \frac{1}{2}(C_1 + C_2)$ e $K = C_1 C_2$, com C_1 e C_2 as curvaturas principais, como visto nas seções anteriores. Este modelo tem a vantagem dos módulos de curvatura da bicamada e o de cisalhamento do citoesqueleto aparecerem explicitamente. Este modelo é bastante atrativo para ser testado com a nossa técnica de microscopia de desfocalização, porque com esta técnica podemos medir a curvatura local da hemácia que está relacionada ao contraste médio da imagem [4], reduzindo o número de parâmetros ajustáveis na equação 3.59. Este modelo prevê então que nos locais da hemácia onde as curvaturas são menores o potencial de confinamento local é menor e conseqüentemente $\langle u^2 \rangle$ será maior. Como veremos posteriormente nossos resultados experimentais mostram claramente que as flutuações $\langle u^2 \rangle$ ao longo da superfície da hemácia são maiores onde o contraste da imagem é zero, ou seja, onde a curvatura média é zero, de acordo com o modelo acima. A relaxação temporal das flutuações entre duas membranas separadas por uma distância d foi calculada por Gov et al. [43] cujo resultado é apresentado abaixo,

$$\langle u(q, 0)u(q, t) \rangle = \langle |u(q)|^2 \rangle e^{-\omega(q)t}$$

com

$$\omega(q) = \frac{e^{(-2qd)}[-1+e^{(2qd)}-2(qd)-2(qd)^2]}{4\eta q} (k_c q^4 + \sigma_{ef} q^2 + \gamma), \quad (3.62)$$

onde η é a viscosidade do citoplasma entre as membranas separadas. Neste modelo além de considerar um espectro de potência espacial diferente, a interação hidrodinâmica é entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto, enquanto no modelo de Brochard-Lennon é entre as duas superfícies opostas da hemácia. Temos que para d muito grande esta relaxação deve se aproximar da relaxação de uma membrana livre, e considerando somente flutuações de curvatura obtemos o resultado tradicional, fazendo $d \rightarrow \infty$ e $\sigma_{ef} = \gamma = 0$ na equação 3.62,

$$\omega(q) = \frac{k_c q^3}{4\eta}. \quad (3.63)$$

Vemos aqui um efeito que explica porque podemos estudar as flutuações na membrana da hemácia com técnicas de vídeo comuns. Tipicamente, para hemácias e membranas lipídicas $k_c \approx 10^{-19} J$, o citoplasma das células tem viscosidade da ordem de 3 vezes a viscosidade da água, ou seja, $\eta \approx 3 \times 10^{-3} Pa.s$ e para nosso microscópio óptico o número de onda máximo é da ordem de $q \approx 10^7 m^{-1}$. Usando a equação 3.63 para membrana livre, obtem-se um tempo de relaxação ($\tau = \frac{1}{\omega(q)}$) para este q de $\tau \approx 120 \mu s$, muito menor do que $33 ms$, que é o tempo de captura da imagem pela câmera de $30 Hz$ que usamos. No caso da hemácia, devido ao fato do citoplasma ter que escoar entre a bicamada e o citoesqueleto separados por uma distância $d \approx 20 nm$ para a membrana relaxar, a dinâmica desta relaxação é muito mais lenta, com tempo de relaxação da ordem de 150 vezes maior que o de uma membrana livre no mesmo citoplasma, resultando em um tempo de relaxação da ordem de $\tau = 18 ms$. O estudo das flutuações da membrana de vesículas lipídicas artificiais usando-se técnicas de vídeo é limitado por este fato, permitindo este estudo somente para números de onda q muito pequenos. Vemos que mesmo em nosso caso, uma flutuação com um numero de onda de $q \approx 10^7 m^{-1}$ não poderia ser observada.

Para $q \approx 0,8 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$, no entanto, o tempo de relaxação é da ordem de $\tau \approx 35 \text{ ms}$, observável em nosso sistema. Como vimos no capítulo 2 com a nossa técnica de microscopia de desfocalização, fazendo medidas das flutuações de contraste $\langle \Delta C^2 \rangle$ pixel-a-pixel, podemos obter informação do espectro espacial, fazendo uma varredura na desfocalização z_f . Portanto, não precisamos necessariamente medir $\langle \Delta C^2 \rangle$ com uma câmera de vídeo, mas podemos usar um detetor rápido, expandindo consideravelmente as possibilidades da microscopia de desfocalização. Pretendemos no futuro usar esta técnica para medir flutuações em membranas lipídicas artificiais e sua interação com fármacos e proteínas. As equações 3.59, 3.60, 3.61 e 3.62 acima serão usadas para a análise de nossos dados experimentais que serão apresentados e discutidos no capítulo 5.

Capítulo 4

Metodologia Experimental e Análise de Dados

O escopo da parte experimental é medir, através da técnica de microscopia de desfocalização, o contraste médio $\langle C \rangle$ e as flutuações de contraste $\langle \Delta C^2 \rangle$ pixel-a-pixel em um filme (seqüências de imagens consecutivas), em amostras biológicas tais como hemácias humanas. Tal medição nos permite obter informação sobre o perfil da hemácia e o espectro de potência espacial das flutuações de superfície, fazendo uma varredura na desfocalização z_f . Nesse capítulo apresentaremos a metodologia utilizada nos experimentos realizados, descrevendo também as técnicas de processamento de imagens dos filmes realizados. Na figura 4.1 são mostradas imagens de uma hemácia para três desfocalizações diferentes. É também apresentado um diagrama esquemático de uma hemácia e o sistema de referência utilizado.

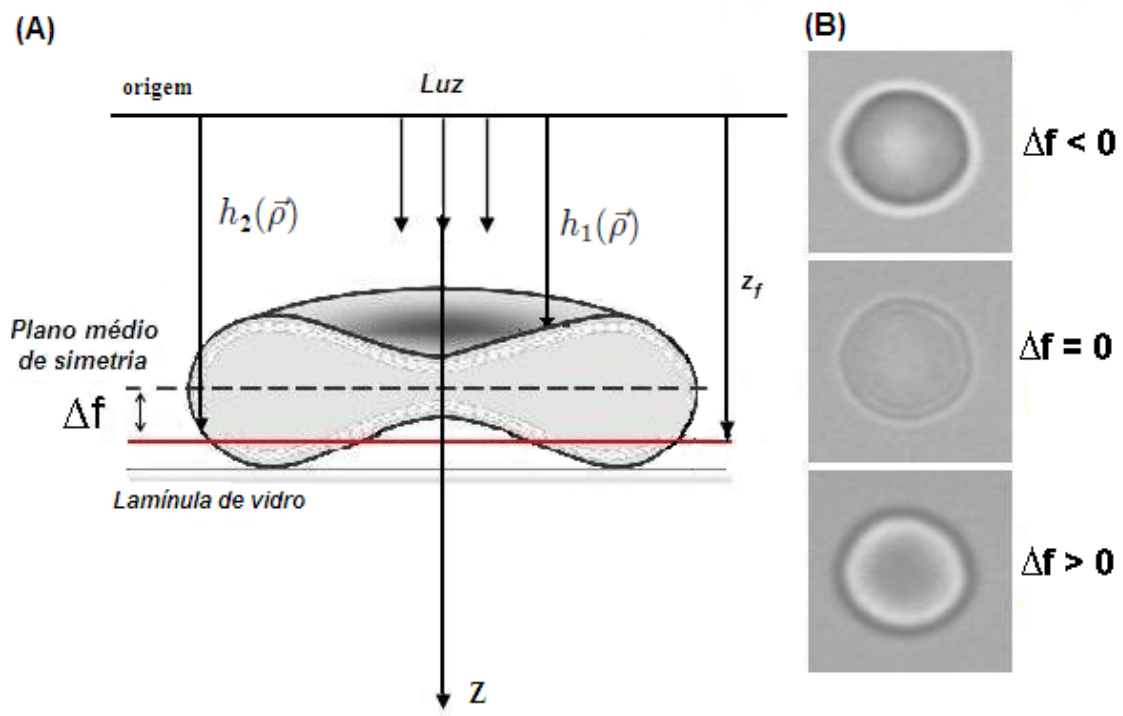


Figura 4.1: (A) Figura esquemática de uma hemácia discótica, sistema de referência e símbolos utilizados. (B) Imagens de uma hemácia para três desfocalizações (z_f) diferentes relativas ao plano médio de simetria. A assinatura desta técnica é a inversão do contraste em torno do plano de simetria.

4.1 Montagem

A montagem experimental está disponível no Laboratório de Biofísica da UFMG/ICEX (foto de figura 4.2) e se encontra em condições de uso sistemático. A estrutura de medição é feita através da montagem representada na figura 4.3.

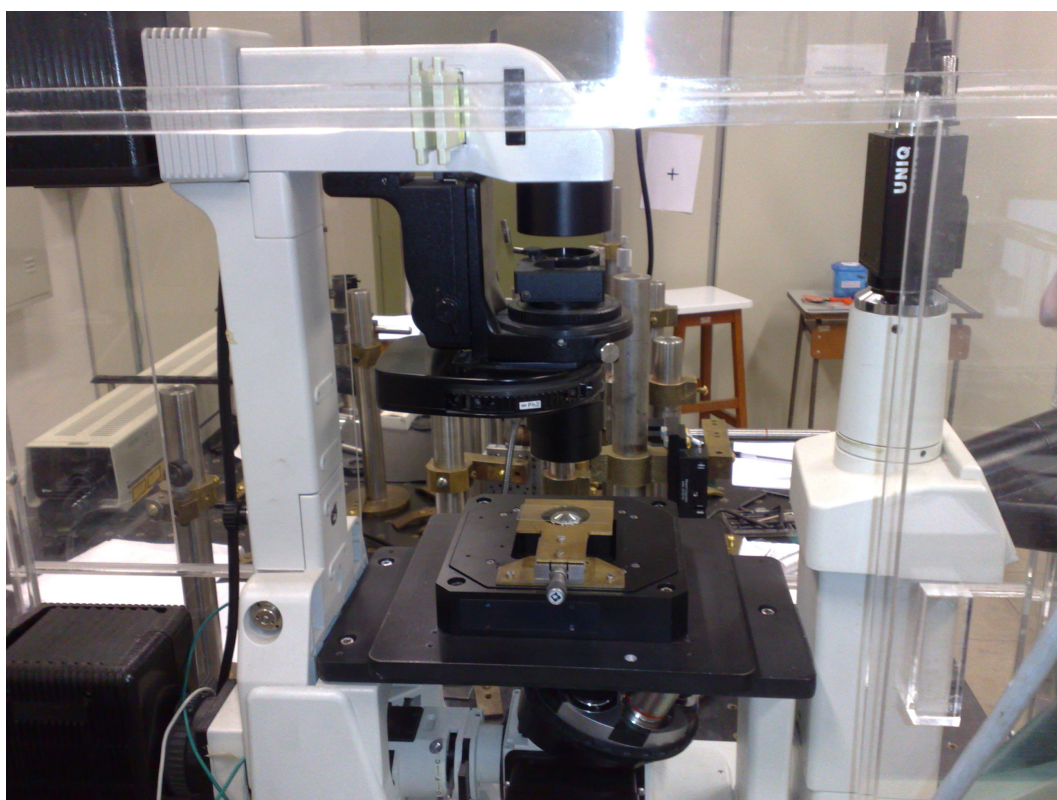


Figura 4.2: Foto do microscópio do Laboratório de Biofísica da UFMG/ICEX.

O equipamento central desta montagem [6] é o microscópio invertido, modelo *Eclipse TE 300* do fabricante Nikon, com uma objetiva de imersão à óleo (CFI Plan Apochromat 100 \times), com aumento de 100 \times e com uma abertura numérica de 1,4. As amostras biológicas a serem analisadas são contidas em uma cubeta de vidro colocada em um suporte mecânico. Tal suporte é conectado a um deslocador piezoelétrico (PI Digital Piezo Controller, Modelo E-710.3CD), que permite translações com precisão nanométrica no plano do suporte e também deslocamentos perpendi-

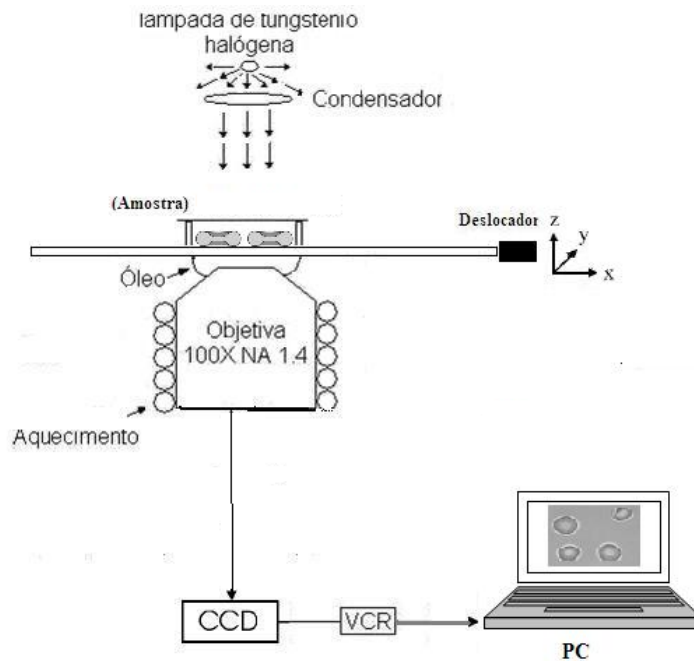


Figura 4.3: Esquema da montagem experimental utilizada nos experimentos.

culares a tal plano. A saída do microscópio está conectada a uma câmera CCD (Dage MTI 72) e as imagens são capturadas e gravadas através de um vídeo VCR (Sony Hi8, EVO9650 / Sony DVCAM, DSR 20). A análise das imagens é feita posteriormente através de um sistema computacional. O controle de temperatura pode ser feito por um sistema de circulação de água ligado a um banho térmico (LAUDA Compact Low-Temperature Thermostats, RC 6/RCS 20) e acoplado à objetiva do microscópio. Em todas as medidas com hemácias a iluminação foi através de um filtro vermelho centrado em $\lambda_0 = 0,68\mu m$. No nosso modelo óptico desprezamos o efeito do condensador do microscópio, assumindo que a amostra é iluminada por luz paralela. Como consequência disto q_{max} é ligeiramente subestimado.

4.1.1 Amostras

Como já mencionado as amostras utilizadas nesse experimento são as hemácias humanas. As hemácias são obtidas, alguns minutos antes da medição, retirando o sangue diretamente do dedo do estudante. O sangue é diluído em uma solução de PBS (Phosphate Buffer Saline de $pH = 7,4$) com BSA (Bovine Serum Albumin),

na concentração de 1 mg/ml , de modo que as hemácias mantenham a sua forma discóide durante todo o experimento. Após tal diluição, com a ajuda de uma pipeta, coloca-se tal solução (cerca de 1 ml), contendo as hemácias, em um porta amostras. Este porta amostras (veja foto de figura 4.4) é formado por uma pequena lamínula de vidro (Corning) de $0,17 \text{ mm}$ de espessura onde é colado, com parafina, um anel de borracha (O-ring) de diâmetro de cerca $1,5 \text{ cm}$.



Figura 4.4: Porta amostras: consiste de um O-ring de diâmetro de cerca $1,5 \text{ cm}$ colado com parafina, em uma lamínula de vidro (Corning) de $0,17 \text{ mm}$ de espessura.

4.1.2 Calibração

Precisamos obter uma relação entre o contraste luminoso C , obtido na teoria, e o contraste em níveis de cinza C_N , obtido através da digitalização das imagens medidas. Desta digitalização resultam valores de nível de cinza N no intervalo de valores de 0 (mais escuro) até 255 (mais claro). Esta escala de nível de cinza está relacionada à escala de intensidade de luz I de modo arbitrário. Esta escala pode ser mudada, ajustando-se na câmera CCD o nível de preto e o ganho. Para fazer isso, calibramos o sistema, medindo simultaneamente a intensidade de luz usando um detetor de fótons acoplado ao microscópio e o nível de cinza obtido da imagem digitalizada. Escolhemos o nível de preto e o ganho da câmera de tal maneira a obter uma resposta linear do nível de cinza em função da intensidade (fótons por segundo) na região de interesse da medição. O gráfico da nossa calibração é mostrado na figura 4.5 e podemos observar que tem uma forma do tipo $N = B + A \cdot I$, onde a constante A é o ganho e a constante B é o nível de preto. A relação entre os contrastes é dada por

$$C = \frac{I - I_0}{I_0} = \frac{\frac{N-B}{A} - \frac{N_0-B}{A}}{\frac{N_0-B}{A}} = \frac{N - N_0}{N_0} \left(\frac{N_0}{N_0 - B} \right) = C_N \left(\frac{N_0}{N_0 - B} \right) \quad (4.1)$$

onde I_0 é a intensidade fora da imagem do objeto (*background*), N_0 é o nível de cinza medido correspondente a esta intensidade e $C_N = \frac{N-N_0}{N_0}$. Vemos na equação 4.1 que a relação entre os contrastes não depende do ganho da câmera, mas somente do valor do nível de preto B . Em particular para $B = 0$ teremos que $C = C_N$. Portanto, conhecendo B , podemos obter o contraste luminoso C da imagem, multiplicando o contraste do nível de cinza C_N por um fator de ajuste da câmera $f_a = \frac{N_0}{N_0 - B}$. O ajuste linear dos dados da figura 4.5 é dado por $N = -36,7 + 7,3I$. Usaremos $N_0 = 150$, o mesmo valor utilizado nos experimentos, resultando um fator de ajuste de $f_a = 0,803$.



Figura 4.5: Nível de cinza N em função da intensidade luminosa I medida pelo contador de fótons. Para este ajuste particular da câmera, $N = -36,7 + 7,3I$. O parâmetro importante para calibração do contraste é $B = -36,7$, que corresponde ao nível de cinza para o valor da intensidade luminosa igual a zero, da extrapolação linear.

4.2 Técnicas de Processamento de Dados

O filme produzido no experimento é gravado em uma fita do videocassete VCR. Conectando a saída do vídeo ao computador, utilizando uma porta firewire e usando um programa chamado *Windv*^{*}, conseguimos transferir esses filmes para o computador. Faz-se o processamento do filme (k-seqüências de imagens), usando um outro software chamado ImageJ[†], um programa de domínio público, que converte as imagens de vídeo para 8-bits, o que resulta em uma imagem digitalizada com 256 níveis de cinza variando de 0 (preto) a 255 (completamente branco). Além disto, com ImageJ podemos escolher o formato de armazenagem e usamos o padrão *.tiff*. O menu do ImageJ e algumas de suas ferramentas de análise são mostradas na figura 4.6. A informação mais importante utilizada é o nível de cinza de cada pixel (p_i, p_j) da imagem em cada quadro k correspondente ao tempo $t_k = \frac{k}{30}$ segundo. O pixel tem um tamanho de $0,13\mu m \times 0,13\mu m$, tal que podemos obter o vetor posição $\vec{\rho}$ para cada pixel da imagem e determinar o contraste luminoso $C(\rho, t)$. Os ajustes dos resultados obtidos serão feitos utilizando a rotina *Statistics NonlinearFit/NonlinearRegress* do software científico *Mathematica 5.0*, como será descrito no capítulo 5.

^{*}<http://windv.mourek.cz>

[†]rsb.info.nih.gov/ij/

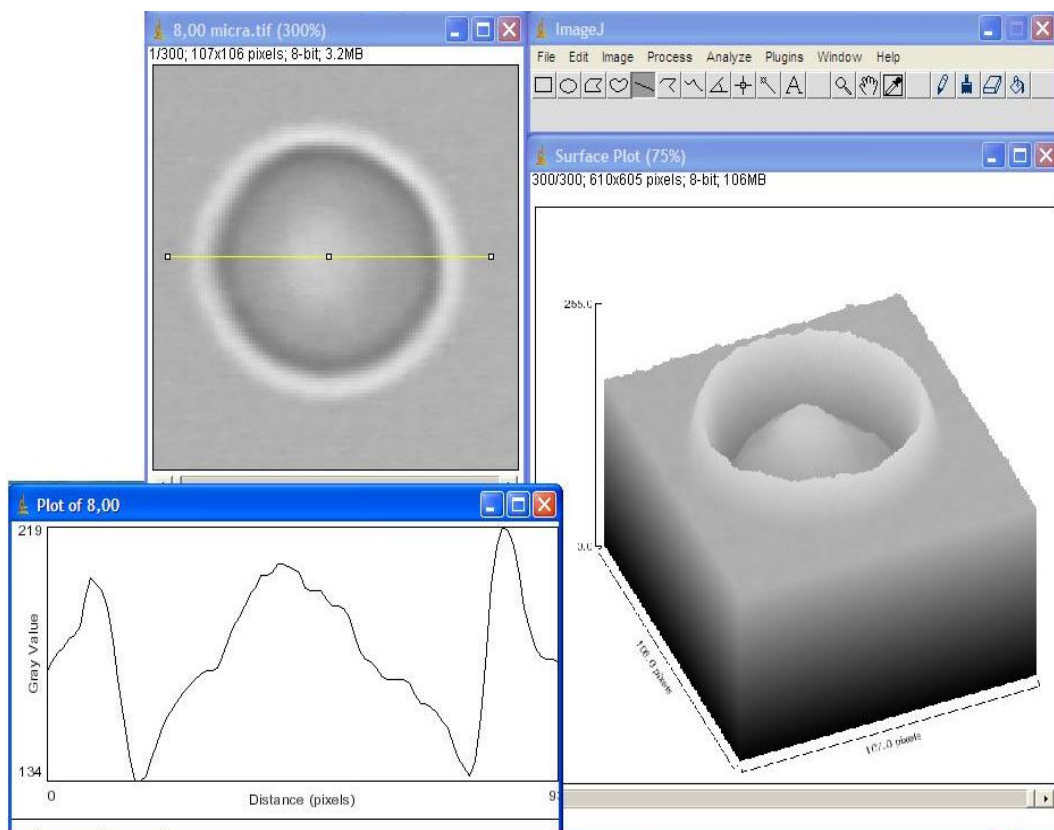


Figura 4.6: Menu do software ImageJ. Na hemácia a ser analisada (no alto a esquerda da figura) traçando uma linha (em amarelo) se pode observar (abaixo a esquerda) o seu perfil correspondente, em níveis de cinza. No lado direito, se pode observar a superfície em níveis de cinza da imagem inteira. Com os níveis de cinza para cada pixel em cada imagem podemos fazer uma série temporal que nos permite calcular a flutuação quadrática média e funções de correlação do contraste.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

Os nossos dados experimentais são vídeos de hemácias para várias desfocalizações, filmadas com uma câmera CCD devidamente calibrada, como descrito no Capítulo 4. A variável importante assim obtida é o contraste da imagem da hemácia $C(\vec{\rho}, t)$ em função da posição $\vec{\rho} \equiv x\hat{i} + y\hat{j}$ e do tempo t , para cada z_f . O valor de contraste é obtido para cada pixel da imagem de tamanho $0,13\mu m \times 0,13\mu m$ e com um tempo de integração de 1/30 segundos. A varredura em z_f é feita em intervalos de 50 nm. As medidas típicas desta tese, que iremos discutir em seguida, estão sintetizadas na figura 5.1. Na figura 5.1 (A) temos uma imagem de uma hemácia para uma desfocalização em relação ao plano médio de simetria de $\Delta f = -2\mu m$. Na figura 5.1 (B) apresentamos os gráficos do contraste médio, $\langle C \rangle$, e da flutuação quadrática média, $\langle (\Delta C)^2 \rangle$, em função da posição horizontal da hemácia. Na figura 5.1 (C) temos os gráficos $\langle C \rangle^2$ e de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ em função da posição na superfície da hemácia. As características principais destes gráficos são: 1) o contraste médio não é uniforme ao longo da superfície da hemácia; 2) a flutuação quadrática média também não é uniforme ao longo da superfície da hemácia; 3) existe uma anti-correlação entre as funções $\langle C^2 \rangle$ e $\langle (\Delta C)^2 \rangle$, já que quando o valor de uma é máximo, o da outra é mínimo. Em nossas análises evitamos coletar luz do halo em torno da hemácia, causado pela difração das bordas. Para levar este efeito em conta deveríamos acrescentar no cálculo do espectro angular o tamanho finito da hemácia, o que complicaria ainda mais os cálculos. Decidimos manter a teoria simples e evitar experimentalmente o halo. Nas medidas das flutuações somente utilizamos a região central da hemácia com um raio de aproximadamente $1\mu m$.

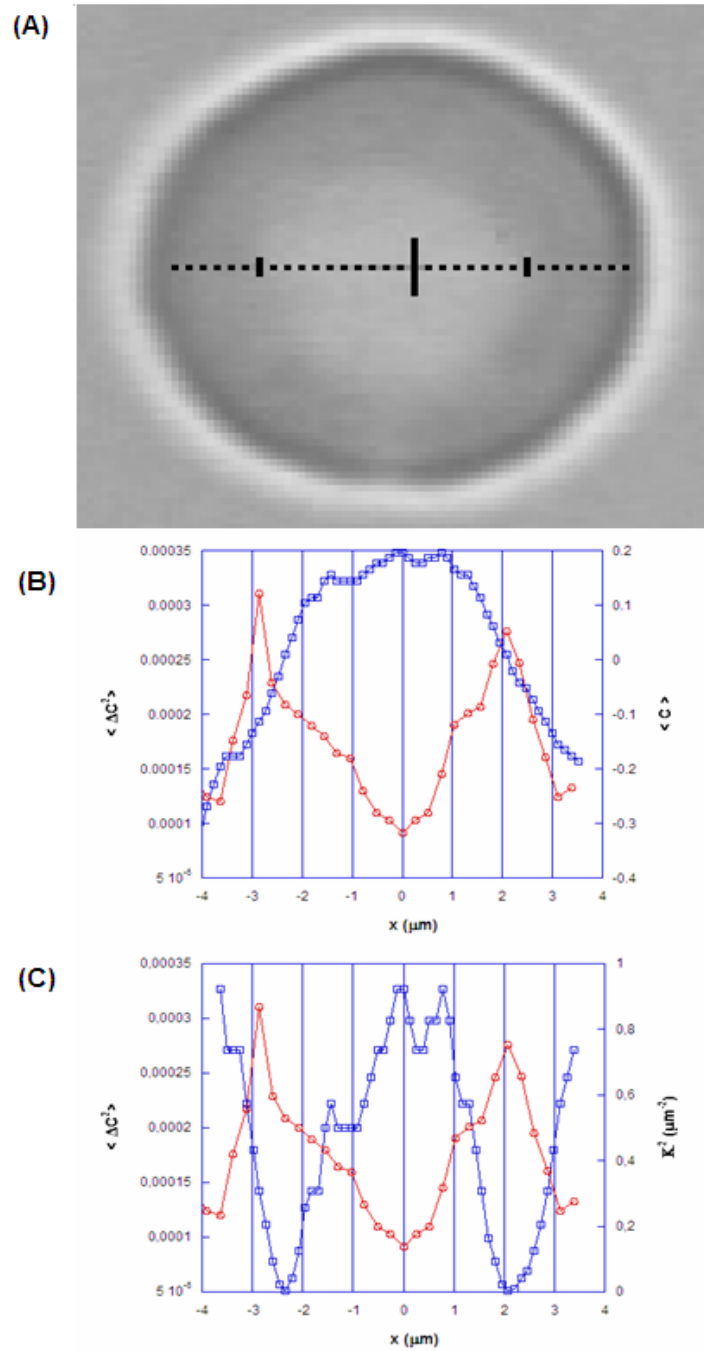


Figura 5.1: (A) imagem de uma hemácia desfocalizada com $\Delta f = -2\mu\text{m}$; (B) Gráficos de $\langle C \rangle$ (quadrado) e $\langle \Delta C^2 \rangle$ (círculos) em função da posição ao longo do eixo horizontal x indicado em figura (A); (C) Gráficos de κ^2 (quadrado) e $\langle \Delta C^2 \rangle$ (círculos) em função da posição horizontal. Nota-se a anticorrelação entre κ^2 e $\langle \Delta C^2 \rangle$ o longo da posição x .

5.1 Interpretação para o Contraste Médio $\langle C \rangle$

A equação 2.127 do Capítulo 2 relaciona o contraste médio do objeto de fase com duas interfaces paralelas e o perfil de modulação destas interfaces. No caso de interfaces planas, o contraste médio seria nulo. O contraste médio da hemácia, que não é nulo e nem uniforme, está relacionado então, com a forma de equilíbrio da hemácia. Em princípio, poderíamos inverter a equação 2.127 para obter os perfis $h_1(\rho)$ e $h_2(\rho)$, após uma varredura em z_f . No entanto, usaremos uma aproximação para a Equação 2.127, que veremos é muito boa neste caso. Nos limites em que $(z_f - p_1)q^2/2k \ll 1$, $(z_f - p_2)q^2/2k \ll 1$ e se as interfaces p_1 e p_2 não são planas, mas variam lentamente com a posição [2,4], podemos escrever que

$$\langle C \rangle = \frac{\Delta n}{n} [(z_f - h_1)\nabla^2 h_1 - (z_f - h_2)\nabla^2 h_2]. \quad (5.1)$$

Ainda, para obter um perfil médio da hemácia, podemos assumir simetria de reflexão em torno do plano médio de simetria, tal que $\nabla^2 h_1 \cong -\nabla^2 h_2$ e finalmente,

$$\langle C \rangle = \frac{-2\Delta n}{n} \left(z_f - \frac{h_1 + h_2}{2} \right) \nabla^2 h_1. \quad (5.2)$$

Embora h_1 e h_2 variem com $(\vec{\rho})$, a soma é praticamente constante e $\frac{h_1+h_2}{2}$ define a posição do plano médio de simetria da hemácia indicado na figura 5.2. Assim, nesta aproximação e deslocando a origem do sistema de coordenadas para o centro da hemácia no plano xy e para $\frac{h_1+h_2}{2}$ no eixo z , temos que

$$\langle C(\vec{\rho}) \rangle = \frac{-2\Delta n}{n} \Delta f \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) = \frac{-2\Delta n}{n} \Delta f \kappa(\vec{\rho}). \quad (5.3)$$

Nesta aproximação, o contraste é então proporcional à curvatura local $\kappa(\vec{\rho}) \equiv -\nabla^2 h_1$ da hemácia (*). A figura 5.2 (C) nos diz então, que quanto maior a curvatura quadrática κ^2 , menor a flutuação quadrática média do contraste. Vejamos em que condições, a equação 5.3 é válida em nossos experimentos. As formas de equilíbrio de hemácias discóticas, como em nossos experimentos, se decompostas em modos

*No capítulo 3, definimos a curvatura média H , então $H = \kappa/2$.

de Fourier circulares, apresentam números de onda q entre 0,6 e $1 \mu m^{-1}$. Assim, na pior situação $\frac{\Delta f q^2}{2k} \ll 1$, ou seja $\Delta f \ll \frac{2 \times 9,3 \times 1,33}{1} \sim 25 \mu m$. A imagem da figura 5.1 (A) feita com $\Delta f = -2 \mu m$, satisfaz plenamente essa condição. Para os experimentos relatados nesta tese, que envolve determinação de perfis de equilíbrio, essa condição será sempre satisfeita. Podemos voltar na decomposição em Fourier da equação 5.3, e obter

$$\mathfrak{F}\left\{\langle C(\vec{\rho}) \rangle\right\} = \frac{2\Delta n}{n} \Delta f q^2 h_1(\vec{q}) \quad (5.4)$$

e finalmente

$$h_1(\vec{\rho}) = \frac{n}{2\Delta n \Delta f} \mathfrak{F}^{-1}\left\{\frac{\mathfrak{F}\left\{\langle C(\vec{\rho}) \rangle\right\}}{q^2}\right\}. \quad (5.5)$$

Esta equação fornece o perfil correto das hemácias a menos de uma altura h_0 aditiva, em relação ao plano médio, que pode ser determinada medindo-se a posição do plano médio, correspondente à situação $\langle C \rangle \approx 0$, como visto na figura 4.1 (B). Aplicando as operações da equação 5.5 à imagem da figura 5.1 (A), obtemos o perfil médio 3D da hemácia como mostrado na figura 5.2. Esse é um perfil médio, já que a simetria de reflexão nunca é plenamente satisfeita. De fato, a seguir, mostraremos que é justamente a assimetria entre $h_1(\vec{\rho})$ e $h_2(\vec{\rho})$, que gera potenciais de confinamento diferentes, para cada superfície da hemácia. Se nos concentrarmos na região central da hemácia ($\rho < 1 \mu m$), podemos aproximar esta região para planos paralelos e reescrever a equação 5.2, como

$$\langle C(\vec{\rho}) \rangle = \frac{\Delta n}{n} [(z_f - p_1)\kappa_1 - (z_f - p_2)\kappa_2], \quad (5.6)$$

relembrando que estamos indentificando as curvaturas $\kappa_1 \equiv -\nabla^2 h_1$ e $\kappa_2 \equiv -\nabla^2 h_2$. Desta forma, quando $z_f = p_1$, medimos κ_2 e quando $z_f = p_2$, medimos κ_1 . Na figura 5.3, apresentamos os gráficos de κ_1^2 e κ_2^2 em função da distância ρ ao centro da hemácia. A assimetria dos perfis fica evidenciada neste gráfico.

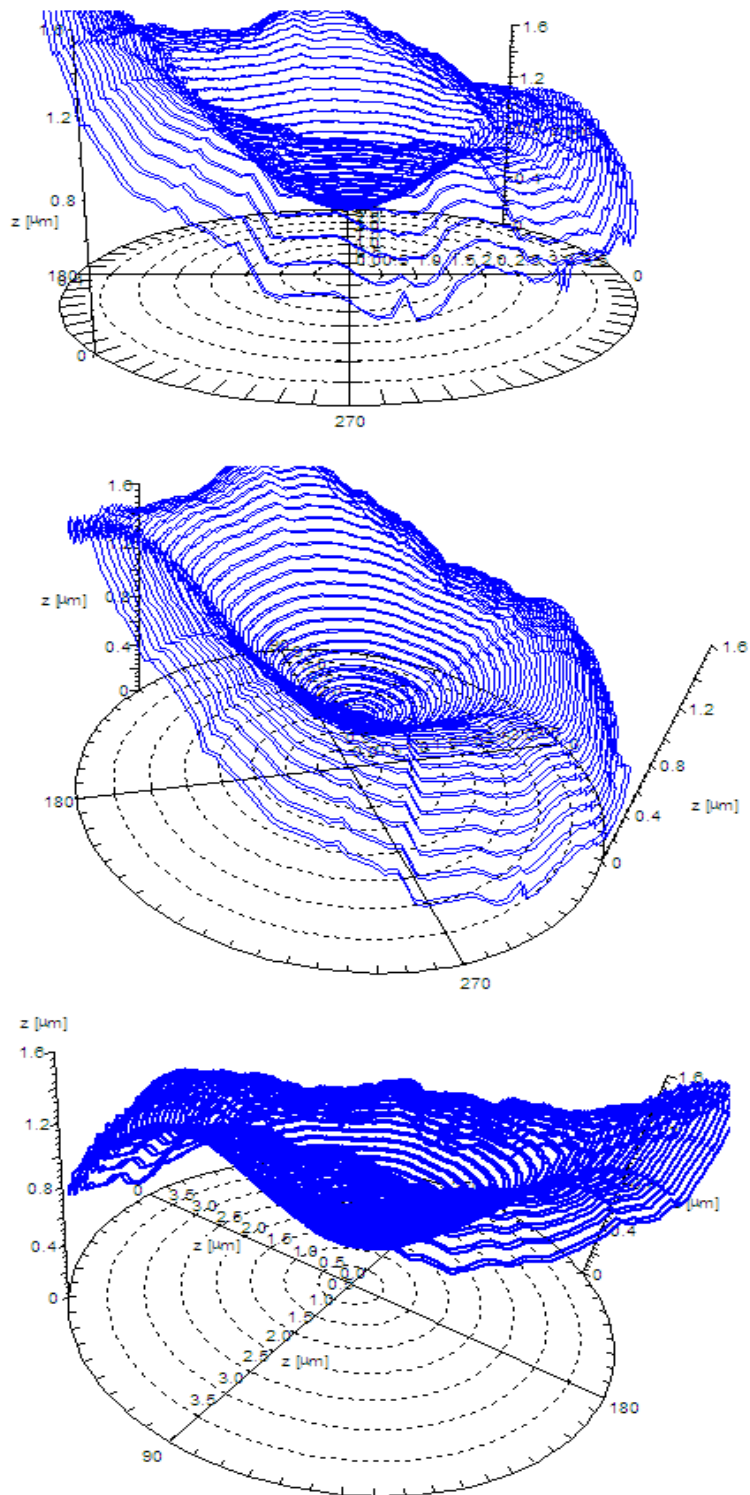


Figura 5.2: Diferentes orientações para o perfil 3-D da hemácia da figura 5.1 (A) obtido usando a equação 5.5.

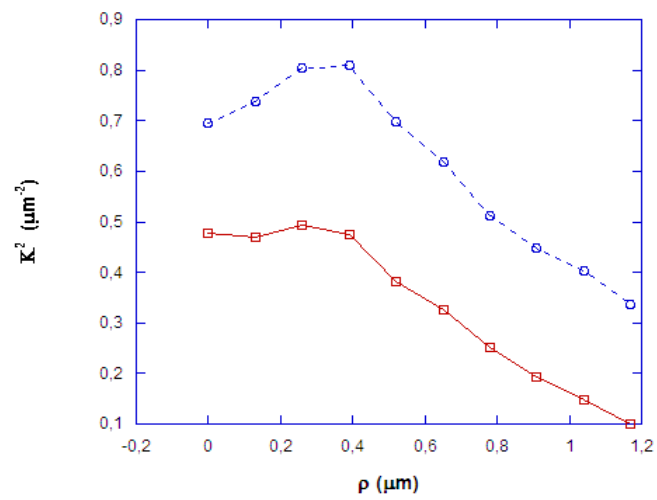


Figura 5.3: Gráficos das médias angulares de curvaturas $\kappa_1^2(\rho)$ (quadrados) e $\kappa_2^2(\rho)$ (círculos) em função de ρ para a hemácia de figura 5.1 (A). As linhas contínuas são guias para os olhos.

5.2 Interpretação para a Flutuação Quadrática Média $\langle \Delta C^2 \rangle$

Vimos na seção anterior, que o contraste médio $\langle C \rangle$ está diretamente relacionado com a forma de equilíbrio da hemácia. Nesta seção, daremos uma interpretação para as flutuações temporais, em torno da forma de equilíbrio, $\Delta C(\vec{\rho}, t) = C(\vec{\rho}, t) - \langle C \rangle$, mas concentrando inicialmente nas medidas da flutuação quadrática média do contraste, em função da desfocalização z_f . Na figura 5.4 (A), está o nosso modelo óptico para a hemácia, onde as superfícies são tratadas como redes de fases finas e paralelas. Essa é uma boa aproximação para a região central da hemácia e para flutuações com números de onda $q > 1\mu m^{-1}$. Para teste do modelo elástico de Auth et al. [8], discutido no Capítulo 4, a região de números de onda q importante, é entre $2\mu m^{-1}$ e $8\mu m^{-1}$, onde nossa aproximação deve funcionar bem. Na figura 5.4 (B), os círculos são os dados experimentais das medidas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$ e a curva contínua é o ajuste teórico usando o modelo elástico de Auth et al. [8], como será discutido a seguir. A equação 2.133 será usada para interpretar os resultados das medidas de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$. Nos dados da figura 5.4 (B), vemos que quando o plano focal está exatamente sobre a superfície 1 ($z_f = p_1$), somente as flutuações da superfície 2 são observadas e vice-versa, quando ($z_f = p_2$). Vemos que o gráfico experimental de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$ é muito semelhante ao gráfico da figura 2.12 no caso assimétrico. Esta previsão teórica foi feita primeiro do que o experimento. Na equação 2.133, os espectros de potência espacial das duas superfícies da hemácia, $|u_1(q)|^2$ e $|u_2(q)|^2$, são desconhecidos e são as grandezas que gostaríamos de determinar em comparação com os modelos elásticos. Usaremos como espectro de potência espacial, aquele originado do modelo elástico de confinamento de Auth et al [8], dado pelas equações 3.59, 3.60 e 3.61. Reescrevendo estas equações para as duas superfícies da hemácia como

$$\langle |u_{1,2}(q)|^2 \rangle = \frac{kT_{ef}}{k_c q^4 + \frac{9\mu kT_{ef}}{16\pi k_c} q^2 + 3\mu f_{C_{1,2}}}, \quad (5.7)$$

com

$$f_{C_{1,2}} = \frac{1}{R^2} \int_0^R k_{1,2}^2 \rho d\rho. \quad (5.8)$$

Lembrando que $H = \frac{\kappa}{2}$ e os sub-índices 1 e 2, referem-se às superfícies 1 e 2 da hemácia. Na expressão 5.8 desprezamos a curvatura Gaussiana, que pode contribuir no máximo com 13%, a partir de estimativas feitas com perfis teóricos de hemácias discóticas [44]. Como visto na sessão anterior, podemos medir $\kappa_1(\rho)$ e $\kappa_2(\rho)$ a partir de $\langle C(\rho) \rangle$ em função de z_f e assim, determinar f_{C_1} e f_{C_2} . Este fato é de grande vantagem para esta análise, uma vez que conhecendo f_{C_1} e f_{C_2} , o número de parâmetros livres para ajuste da equação 5.7 cai de quatro $(\frac{k_c}{kT_{ef}}, \frac{\mu}{kT_{ef}}, \frac{\gamma_1}{kT_{ef}}, \frac{\gamma_2}{kT_{ef}})$ para dois $(\frac{k_c}{kT_{ef}}, \frac{\mu}{kT_{ef}})$. Usando os dados dos gráficos da figura 5.5 e fazendo a integral da equação 5.8, numericamente no intervalo $0 \leq \rho \leq 1,17\mu m$, obtemos os resultados $f_{C_1} = 0,13\mu m^{-2}$ e $f_{C_2} = 0,25\mu m^{-2}$. Além das flutuações de contraste originadas das flutuações de superfície da hemácia, tem-se as flutuações da fonte de luz e do detector de luz ("shot noise") e alguma contribuição devido a rugosidade da lamínula de vidro. Estas contribuições adicionais causam um aumento do ruído de fundo ("background") de $\langle \Delta C^2 \rangle$. Assim para o ajuste dos dados experimentais somamos à equação 2.133 uma constante a ser ajustada, que denominamos bkg. Desta forma o ajuste é feito com três parâmetros livres: $(\frac{k_c}{kT_{ef}}, \frac{\mu}{kT_{ef}})$ e bkg . A curva contínua na Figura 5.4 (B) é o melhor ajuste, correspondendo aos valores $\frac{k_c}{kT_{ef}} = 7,6 \pm 1,0$, $\frac{\mu}{kT_{ef}} = (9,2 \pm 0,4) \times 10^3 \mu m^{-2}$ e $bkg = (1,40 \pm 0,04) \times 10^{-4}$ (*). Usando o critério introduzido por Auth et al. [8] que $\frac{k_c}{T_{ambiente}} \simeq 25$, obtemos então que $T_{ef} \simeq 3,3T_{ambiente}$, comparável aos valores encontrados nas referências [9,10], para a contribuição de processos mediados por ATP às flutuações de superfície da hemácia. Os valores acima variam dentro de 50% para hemácias diferentes. Na maioria das hemácias que analisamos a assimetria no potencial de confinamento era desprezível, indicando que a interação hemácia- substrato é também desprezível. Escolhemos uma hemácia particular que tinha a maior assimetria, para evidenciar a capacidade de microscopia de desfocalização de medir interfaces distintas e, portanto, ser uma técnica útil para estudo da interação de células com substrato. Muitas doenças

*No nosso artigo Glionna et al., Applied Phys. Lett. 94, 193701 (2009), anexado ao final desta tese, os parâmetros de ajuste são diferentes destes porque usamos $\Delta\varphi = \frac{\Delta f q^2}{2k_0}$ ao invés de $\Delta\varphi = \frac{\Delta f q^2}{2k}$ da presente análise, com $k = 1,33k_0$.

alteram a adesividade das células ao substrato [31] e poderiam assim ser estudadas, com a vantagem que a superfície controle é a superfície livre da mesma célula.

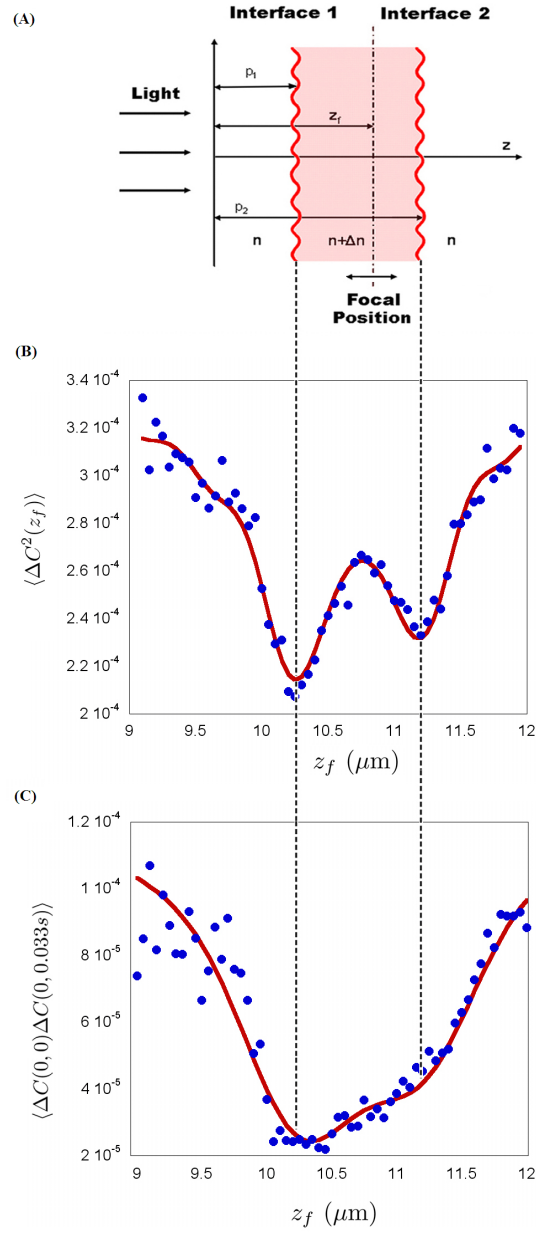


Figura 5.4: (A) Modelo óptico que usamos para a parte central da hemácia, onde as superfícies são modeladas como redes de difração de fase planas; (B) Flutuação quadrática média do contraste da hemácia em função da desfocalização (círculos). Os mínimos ocorrem quando o plano focal da objetiva coincide com as interfaces; (C) Função de autocorrelação do contraste em função da desfocalização (círculos), para um tempo de atraso fixo de 1/30 segundos. Os mínimos não são mais resolvidos, porque os maiores vetores de onda das flutuações já decaíram, ilustrando a conexão entre resolução óptica lateral e longitudinal. As linhas contínuas nas figuras (B) e (C) correspondem aos ajustes aos dados experimentais usando o modelo de Auth. al.

5.3 Interpretação para a Função de Auto-Correlação $\langle \Delta C(0, 0) \Delta C(0, t) \rangle$

Para $t = 0$, $\langle \Delta C(0, 0) \Delta C(0, 0) \rangle = \langle \Delta C^2 \rangle$ que discutimos na seção anterior. Ao fazer a correlação do contraste em um certo instante de tempo ($t = 0$ por exemplo) e num instante de tempo posterior t , alguns modos com números de onda maiores já decaíram, e desta forma é possível estudar a dinâmica de relaxação das flutuações. O tempo de relaxação das flutuações é ditado pela elasticidade da bicamada lipídica e citoesqueleto e pelo escoamento do citoplasma (com viscosidade $\eta \simeq 0,003 P_a s$) através do estreito espaço entre a bicamada e citoesqueleto. O modelo de Auth. et al. [8] considera que a bicamada e citoesqueleto são mantidos separados por distância média d , tal que $\sqrt{\langle u^2 \rangle} \simeq d$ e portanto entre 20 a 30 nm . É considerado ainda que não existe escoamento através do citoesqueleto, uma vez que este está flutuando rápido o suficiente, para que na escala de tempo de escoamento, seja considerado como uma parede impermeável. Na Figura 5.4 (C) é mostrado com círculos o gráfico experimental de $\langle \Delta C(0, 0) \Delta C(0, 1/30s) \rangle$ em função da z_f . Reescrevendo a equação 2.131 para simetria radial e para $\vec{r} = 0$ temos,

$$\begin{aligned} \langle \Delta C(0, 0) \Delta C(0, t) \rangle &= \frac{2(\Delta n k_0)^2}{\pi R^2} \sum_n \left\{ \frac{|u_1(\vec{q}_n)|^2}{J_1^2(q_n R)} e^{-\omega_1(q_n)t} \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k_0} q^2 \right) \right. \\ &\quad \left. + \frac{|u_2(q_n)|^2}{J_1^2(q_n R)} e^{-\omega_2(q_n)t} \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k_0} q^2 \right) \right\} \end{aligned} \quad (5.9)$$

com $\omega(q)$ [43] dado pela equação 3.62. Reescrevendo $\omega(q)$ para as 2 interfaces temos

$$\omega_{1,2}(q) = \left[k_c q^4 + \frac{9\mu k T_{ef}}{16\pi k_c} q^2 + 3\mu f_{C_{1,2}} \right] \Lambda(q) \quad (5.10)$$

onde

$$\Lambda(q) = \frac{-e^{-2dq}}{4\eta q} [1 - e^{2dq} + 2dq + 2(dq)^2]. \quad (5.11)$$

Usando a equação 5.9 para $t = 1/30$ segundos junto com as equações 5.10 e 5.11 ajustamos a teoria aos dados experimentais. Neste ajuste, usamos os valores de

k_c , μ e T_{ef} determinados no ajuste anterior e $\eta = 0,003Pa.s$. Como parâmetros livres usamos a distância d e a constante bkg que somamos à equação 5.9 como anteriormente. O ajuste retornou os valores $d = (21 \pm 1)nm$ e $bkg = (1,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$, dentro do que era esperado pela teoria. Na Figura 5.4 (C) vemos que os mínimos não são mais resolvidos, porque as flutuações com números de onda (q) maiores já decaíram, mostrando o efeito óptico interessante do acoplamento entre resolução lateral e longitudinal. Vemos que o modelo elástico de Auth et al. [8] ajusta-se muito bem aos nossos dados experimentais.

5.4 Obtenção do Espectro de Potência Espacial usando $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$

Usando a equação 2.141 podemos obter da função $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle$ os espectros espaciais $|u_1(\vec{q})|^2$ e $|u_2(\vec{q})|^2$. Para tanto fazemos a Transformada de Fourier do dado experimental, ao longo de z_f . Do resultado desta Transformada de Fourier resulta a função $f(q)$

$$f(q) \equiv |u_1(q)|^2 + |u_2(q)|^2 \cos\left[\frac{(p_1 - p_2)q^2}{k}\right], \quad (5.12)$$

cujos resultados experimentais são mostrados com círculos na Figura 5.5. A curva contínua é um ajuste da equação 5.12 com o espectro de potência espacial dado pela equação 5.7, usando os valores $p_2 - p_1 = 0,95\mu\text{m}$, $f_{c_1} = 0,13\mu\text{m}^{-2}$ e $f_{c_2} = 0,25\mu\text{m}^{-2}$ determinados anteriormente, com $\frac{k_c}{kT_{ef}}$ e $\frac{\mu}{kT_{ef}}$ como parâmetros livres. Este ajuste retorna os valores $\frac{k_c}{kT_{ef}} = (6,8 \pm 2,0)$ e $\frac{\mu}{kT_{ef}} = (8,9 \pm 0,6) \times 10^3\mu\text{m}^{-2}$, próximos dos valores determinados anteriormente, indicando a consistência dos métodos. O fato de podermos obter o espectro de potência espacial de uma medida realizada em pixels únicos, abre a possibilidade de usarmos ao invés da câmera CCD, um detector de fótons rápido para construir o gráfico de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$. Assim poderemos estudar flutuações rápidas em membranas e sua interação com fármacos e proteínas, como é o caso de sistemas modelos usando-se vesículas lipídicas artificiais.

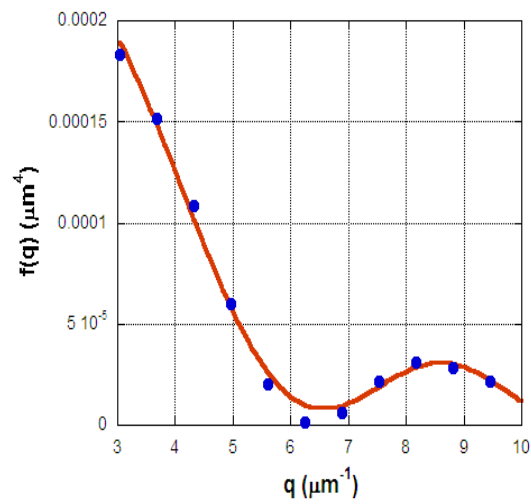


Figura 5.5: Espectro de potência espacial onde os círculos são dados experimentais resultantes da integração numérica da flutuação quadrática média do contraste, como na equação 2.141. A linha contínua é o ajuste de $f(q)$ usando a equação 5.12, que retorna os valores $\frac{k_c}{kT_{ef}} = (6,8 \pm 2,0)$ e $\frac{\mu}{kT_{ef}} = (8,9 \pm 0,6) \times 10^3 \mu m^{-2}$.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas

Conclusões

1. Desenvolvemos um modelo óptico melhor para a microscopia de desfocalização, estendendo o modelo anterior usado nos trabalhos do nosso laboratório, válido para qualquer desfocalização e para números de onda de difração q maiores.
2. Aplicamos nosso modelo a uma interface transparente que se comporta como uma rede de difração de fase fina e relacionamos o contraste da imagem desfocalizada em função da posição do plano focal da objetiva z_f , ao perfil de altura da modulação espacial da interface.
3. Estendemos o modelo para uso com um objeto de fase que é composto por duas interfaces, cada uma podendo ser representada por redes de difração de fase paralelas separadas por uma certa distância.
4. Com o modelo de duas interfaces mostramos teoricamente que ao varrer a posição do plano focal da objetiva z_f , podemos medir as curvaturas e modulação

de altura de cada interface separadamente.

5.

Modelamos a região central da hemácia como interfaces quase-planas e paralelas e usamos o modelo óptico desenvolvido anteriormente.

6.

Da teoria óptica desenvolvida determinamos uma expressão teórica para a flutuação quadrática média do contraste, $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$, onde o espectro de potência espacial das flutuações de altura para cada interface deve ser especificado. Usando espectros de potência espacial oriundos da teoria de flutuações em membranas, fizemos previsões teóricas sobre o comportamento de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$ para hemácias, que se confirmaram posteriormente nos experimentos realizados.

7.

Fizemos experimentos onde hemácias são filmadas para várias desfocalizações e obtivemos o contraste $C(\vec{\rho}, t)$ das imagens em função da desfocalização. Destas imagens obtivemos o valor médio, a flutuação quadrática média e a função de auto-correlação temporal do contraste. Do valor médio do contraste podemos reconstruir o perfil superficial da hemácia em 3 dimensões; da flutuação quadrática média e da função de auto-correlação temporal do contraste podemos estudar o espectro de potência espacial e a relaxação das flutuações na altura das superfícies de hemácias.

8.

Nossos dados experimentais são adequadamente explicados pelo modelo elástico de hemácia de Auth et al. [8], onde o acoplamento entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto é considerado. Do ajuste deste modelo elástico aos nossos dados obtemos valores para o módulo de curvatura da bicamada lipídica (k_C), módulo de cisalhamento do citoesqueleto (μ) e para a temperatura

efetiva (T_{ef}) devido a processos de conversão de energia química em trabalho mecânico mediados por ATP.

9.

A "Microscopia de Desfocalização" se revelou uma ótima técnica de microscopia óptica para o estudo do perfil e rugosidade (estática e dinâmica) de múltiplas interfaces em objetos transparentes em multicamadas.

Perspectivas

1.

Esta tese abre a possibilidade do estudo da interação entre fármacos e proteínas com membranas lipídicas artificiais, como em vesículas, se usarmos câmeras de vídeo mais rápidas (CMOS por exemplo com respostas em kHz), ou usarmos detetores rápidos de luz, uma vez que mostramos que da medida de $\langle \Delta C^2(z_f) \rangle \times z_f$, que são medidas em pixels únicos, podemos obter informações sobre os espectros de potência espacial.

2.

A questão do efeito do ATP nestas flutuações de superfícies de hemácia é ainda motivo de controvérsia. Podemos tentar resolver estas controvérsias fazendo um estudo sistemático, do mesmo tipo de medidas que fizemos nesta tese, em função da concentração de ATP nas hemácias.

3.

Um experimento, como feito nesta tese, mas variando a temperatura das hemácias, pode nos fornecer maiores informações sobre contribuição de efeitos térmicos e efeitos devido ao ATP, no valor da temperatura efetiva.

4.

Aparentemente, a contribuição não térmica à temperatura efetiva, que é um

efeito de não-equilíbrio, depende do número de onda q da flutuação. Usando câmeras mais rápidas, poderemos ter maior sensibilidade para grandes números de onda, onde supostamente estas contribuições seriam de maior relevância.

5.

Da interação de fármacos foto-sensíveis, usados em fototerapia dinâmica, com a membrana de vesículas lipídicas artificiais, poderíamos estudar o mecanismo de conversão de energia química diretamente em trabalho, medindo as flutuações em altura da membrana lipídica, em função da intensidade de luz laser sobre a vesícula.

6.

Tanto em hemácias, quanto em macrófagos (que temos estudado em nosso laboratório) ou em outras células, o fato de podermos estudar as duas interfaces separadamente, abre a perspectiva de estudos de adesividade da célula ao substrato, importante para a caracterização e estudo de várias doenças, entre elas o câncer. A vantagem, neste caso, é que podemos comparar o espectro de flutuações da superfície que interage com o substrato que deve ser alterado pela adesividade ao substrato, com o espectro da outra superfície que está livre, esta então servindo de controle, na mesma célula.

Tomography of fluctuating biological interfaces using defocusing microscopy

G. Glionna, C. K. Oliveira, L. G. Siman, H. W. Moyses, D. M. U. Prado, C. H. Monken, and O. N. Mesquita^{a)}

Departamento de Física, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 702, Belo Horizonte, Minas Gerais 30123-970, Brazil

(Received 13 February 2009; accepted 24 April 2009; published online 14 May 2009)

We show that a bright-field defocused microscope is effectively a phase-contrast microscope, but with advantages over the conventional one and maintaining the same optical resolution. In a multilayered transparent object, the height amplitude (static and dynamic) of each interface can be measured separately with nanometer sensitivity. By scanning the position of the objective focal plane in relation to the surfaces of a red blood cell, we obtain quantitative information on height fluctuations from each surface individually, which can be analyzed with our model of a defocused microscope and compared with theoretical models. © 2009 American Institute of Physics.

[DOI: 10.1063/1.3136842]

Thin transparent objects (phase objects) may be rendered visible in a standard bright-field optical microscope if it is defocused. To understand this phenomenon, we analyze the angular spectrum of the light crossing a phase object through a defocused microscope using the paraxial approximation,¹ which is equivalent to Fresnel diffraction theory, and obtain the light electric field in the image plane. We show that a bright-field defocused microscope is, in fact, a phase-contrast microscope, where the phase difference between the diffracted and nondiffracted light is given by $\Delta\varphi = \Delta f q^2 / 2k_0$,² where Δf is the distance between the object and the focal plane of the microscope objective, q is the diffracted wavenumber in the xy -plane (perpendicular to the propagation direction, z , so that $q=0$ for the nondiffracted light), k_0 is the vacuum light wavenumber. One can show that the image contrast for each diffracted component is then proportional to $\sin(\Delta f q^2 / 2k_0)$. In the limit of small diffracted wavenumbers and small defocus distances Δf , $\sin(\Delta f q^2 / 2k_0) \cong \Delta f q^2 / 2k_0$, such that the image contrast of a phase object is proportional to Δf and to the local curvature of the phase object.² Information on macrophage surface fluctuations was obtained and related to the phagocytic capacity of the cell^{3,4} and the shape profile and fluctuations of red blood cells (RBCs).⁵ In this work, we present a significantly improved model for defocusing microscopy (DM) such that we can analyze images largely defocused and with larger diffraction wavenumbers. As an important consequence of this improved model, which is the central result of this work, in a multilayered transparent material one can measure, with nanometer sensitivity, the amplitude height fluctuations of each interface separately since the interfaces are at different distances from the objective focal plane and, consequently, affected by different relative phases. By measuring the spectrum of amplitude height fluctuations, one can study cell biomechanics and motility. There are diseases that affect directly the biomechanics and adhesion properties of cells⁶ and could be diagnosed and studied with DM.

As a model system, let us consider the phase object of Fig. 1(a), with planar interfaces at positions p_1 and p_2 and objective focal plane position at z_f , in relation to an arbitrary

reference frame. The medium and the object refractive indices are n and $n + \Delta n$, respectively, considered homogeneous and isotropic; S is the area of each interface. We define the image contrast by $C(\vec{\rho}, t) = (I(\vec{\rho}, t) - I_0) / I_0$, where $I(\vec{\rho}, t)$ is the local image intensity of the phase object at time t , $\vec{\rho}$ is the two-dimensional xy -position vector of a location on the image, and I_0 is the intensity outside the object. The fluctuating height amplitudes in relation to the average position of interfaces 1 and 2 are $u_1(\vec{\rho}, t)$ and $u_2(\vec{\rho}, t)$, causing contrast fluctuations $\Delta C(\vec{\rho}, t) = C(\vec{\rho}, t) - \langle C \rangle$ in the defocused image. By expanding the diffracted electric field up to the first order of diffraction valid for $\Delta n k_0 u \ll 1$, for a stationary process, and considering interfaces 1 and 2 statistically independent, we can write the following for the correlation function of contrast fluctuations:⁷

$$\begin{aligned} \langle \Delta C(0, 0) \Delta C(\vec{\rho}, t) \rangle &= \frac{2(k_0 \Delta n)^2}{S} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[\langle |u_1(\vec{q})|^2 \rangle \times e^{-\omega_1(\vec{q})t} \sin^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k_0} q^2 \right) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + \langle |u_2(\vec{q})|^2 \rangle e^{-\omega_2(\vec{q})t} \times \sin^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k_0} q^2 \right) \right] \cos(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \end{aligned} \quad (1)$$

where $\omega_1(\vec{q})$ and $\omega_2(\vec{q})$ are the relaxation rates for each mode \vec{q} . For $z_f = p_1$, only fluctuations due to interface 2 are observed, while for $z_f = p_2$ only fluctuations due to interface 1 are observed, allowing discrimination between them. For correlation functions with radial symmetry, $\cos(\vec{q} \cdot \vec{\rho})$ can be replaced by $J_0(q\rho)$, where J_0 is the zero-order Bessel function, which is the case for RBCs. From Eq. (1) and for radial symmetry, one can determine the mean square fluctuation of contrast $\langle (\Delta C)^2 \rangle$, which is given by

$$\begin{aligned} \langle \Delta C^2(z_f) \rangle &= \frac{(k_0 \Delta n)^2}{\pi} \frac{2}{R^2} \left\{ \sum_n \frac{1}{J_1^2(q_n R)} \left[\langle |u_1(q_n)|^2 \rangle \right. \right. \\ &\quad \times \sin^2 \left(\frac{z_f - p_1}{2k_0} q_n^2 \right) \\ &\quad \left. \left. + \langle |u_2(q_n)|^2 \rangle \sin^2 \left(\frac{z_f - p_2}{2k_0} q_n^2 \right) \right] \right\}. \end{aligned} \quad (2)$$

^{a)}Electronic mail: mesquita@fisica.ufmg.br.

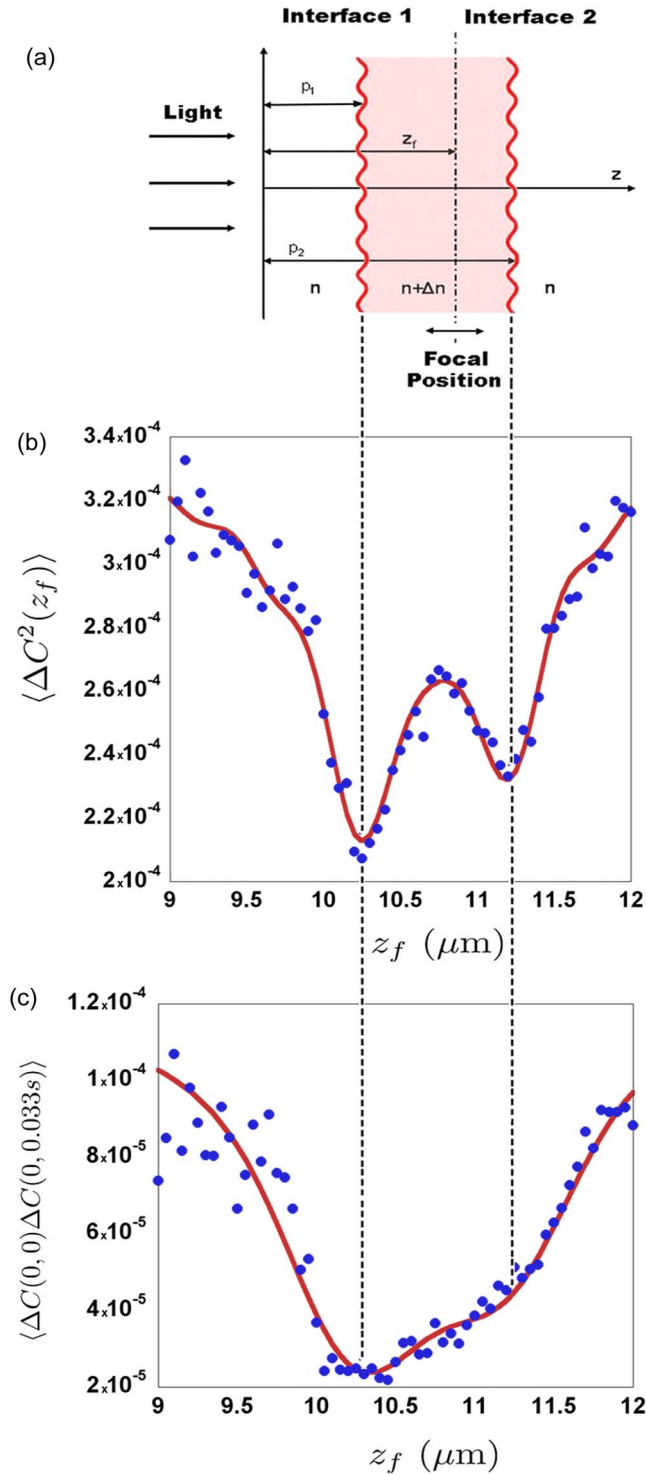


FIG. 1. (Color online) (a) Scheme of the phase object considered in our optical model. (b) Plot of the measured $\langle \Delta C^2 \rangle$ of a RBC as function of z_f (circles); continuous curve is the fit using the membrane-cytoskeleton-confinement model (Ref. 17). (c) Plot of the measured time contrast correlation for a time delay of 0.033 s as a function of z_f (circles); the continuous curve is the fit using the membrane-cytoskeleton-confinement model.

This sum is over the roots of $J_0(q_n R) = 0$, where R is the object radius; J_1 is the first-order Bessel function. We apply this improved model of DM to study fluctuations (flicker) of RBC surfaces, an old but still controversial problem.⁸⁻¹⁸ In addition to contrast fluctuations caused by the RBC, there are other sources of noise such as the shot noise of the light and intensity detector [charge coupled device (CCD) camera],

which contribute as a background noise and will be considered later during the data fitting procedure.

Our microscope is a Nikon Eclipse TE 300 operating in bright field, equipped with a 100 \times oil immersion objective and numerical aperture NA=1.4. Images are captured by a CCD camera (CCD-72 Dage-MTI), digitized and converted to an 8 bit format, and analyzed using the program ImageJ. Gray-level contrast has to be converted into light intensity contrast, as described in Ref. 3. The defocus distance is varied in steps of 50 nm with a Physik Instruments z -translator. At each position z_f , we film the RBC for 10 s, enough to yield good statistics and minimal focal plane drift. Human RBCs are freshly collected for the experiments and prepared by a standard procedure to yield discocyte RBCs.⁵ In order to avoid absorption, we use a red filter with $\lambda_0 = 0.68$ μm , such that $k_0 = 9.3$ μm^{-1} . In addition, $n = 1.33$, $\Delta n = 0.06$,¹⁶ $k = nk_0 = 12.3$ μm^{-1} . The maximum wavenumber in the sums above is limited by the NA of the microscope objective, which in our case is $q_m = 0.93k \approx 11$ μm^{-1} , limiting the lateral resolution to about 0.3 μm . The signal-to-noise ratio allows us to have nanometer sensitivity in the membrane height measurements.

A plot of measured $\langle \Delta C^2 \rangle$ (around the center of the RBC) is shown as a function of z_f in Fig. 1(b) (circles). We observe two dips in the data: one at $p_1 = 10.25$ μm and another at $p_2 = 11.20$ μm , where the upper and lower surfaces are located, respectively. In this case, the lower surface (in contact with the substrate) fluctuates less than the upper one. A RBC is a convenient model system for studying cell membranes since it does not have nucleus. It has a composite interface consisting of a lipid bilayer membrane (fluidlike) coupled to a two-dimensional spectrin cytoskeleton (solid-like), what provides RBCs the needed properties of softness and strong shear elasticity. Only recently, models have been proposed, attempting to describe the coupling between the lipid membrane and the spectrin cytoskeleton,^{13,15,17} which may explain the observed q -dependence of the spectrum of height fluctuations,⁹ and the increase in fluctuation amplitude due to adenosine triphosphate [ATP]-driven active processes.^{12,14} In Ref. 17 a detailed model of the coupling between the shear modes of the cytoskeleton and the bending modes of the lipid bilayer membrane is worked out. This coupling confines the fluctuations to amplitudes of the order of the separation between membrane and cytoskeleton, around 20–30 nm, and provides a q -dependence for the spatial spectrum of height fluctuations, which is given below (subindices 1 and 2 refer to interfaces 1 and 2),

$$\langle |u_{1,2}(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T_{\text{eff}}}{K_C q^4 + (9\mu k_B T_{\text{eff}} q^2 / 16\pi K_C) + 3\mu f_{C1,2}}, \quad (3)$$

where K_C is the lipid membrane bending modulus, μ is the cytoskeleton shear modulus, $3\mu f_{C1,2}$ are the confinement potentials,¹⁹ $f_{C1,2} \approx \langle 2\kappa_{1,2}^2 \rangle_{\text{spatial average}}$, $\kappa_{1,2}$ are the local mean curvatures.²⁰ One of the results in favor of this model (data not shown) is that we observe that the rms height amplitude fluctuation (u_{rms}) along the surface of RBC presents a sharp maximum at the position where the mean curvature is nearly zero, i.e., where the confinement potential is minimum, as predicted by the model. We measure contrast fluctuations in a region of radius of 0.5 μm around the center of the RBC, where the interfaces are nearly planar. For each surface, from the average values of contrast,⁵ we obtain $f_{C1} = 0.13$ μm^{-2}

and $f_{C2}=0.25 \mu\text{m}^{-2}$. In the model, T_{eff} is the effective temperature, higher than the ambient temperature, due to the presence of ATP-driven active processes.^{12–14} In Fig. 1(b) the raw data (circles) for $\langle\Delta C^2\rangle$ are shown; in addition to fluctuations from the RBC, there is the shot noise from the light, video system, and glass-slide roughness, which gives an additional background noise (bkg). We fit our data using Eq. (2) + (bkg) and Eq. (3) with $K_C/k_B T_{\text{eff}}$, $\mu/k_B T_{\text{eff}}$, and bkg as free parameters. The continuous curve in Fig. 1(b) is the best fit, corresponding to the values $K_C/k_B T_{\text{eff}}=11 \pm 13\%$, $\mu/k_B T_{\text{eff}}=(10.3 \pm 4\%) \times 10^3 \mu\text{m}^{-2}$, and $\text{bkg}=(1.40 \pm 3\%) \times 10^{-4}$. Using the criterion¹⁷ $K_C/k_B T_{\text{ambient}} \approx 25$, we then obtain $T_{\text{eff}} \approx 2.3 T_{\text{ambient}}$. These values are within the range of values reported by Auth *et al.*¹⁷

The relaxation time of fluctuations is dictated by the elasticity of membrane and cytoskeleton and by the flow of the cytoplasm [with viscosity $\eta=0.003 \text{ Pa s}$ (Ref. 13)] through the narrow space between the membrane and the cytoskeleton. The model in Ref. 13 considers that the membrane and cytoskeleton are kept separated by an average distance d , such that $u_{\text{rms}} \approx d$, and then by around 20–30 nm. The relaxation rate for each spatial mode q is given by

$$\omega_{1,2}(q) = \left[K_C q^4 + \frac{9\mu k_B T_{\text{eff}} q^2}{16\pi K_C} + 3\mu f_{C1,2} \right] \Lambda(q),$$

$$\Lambda(q) = \frac{-e^{-2dq}}{4\eta q} [1 - e^{2dq} + 2dq + 2(dq)^2]. \quad (4)$$

In Fig. 1(c) we plot $\langle\Delta C(0,0)\Delta C(0,0.033 \text{ s})\rangle$ as a function of z_f . This function is obtained by multiplying the contrast of a given pixel by the contrast of the same pixel in the next frame, such that the delay time is 0.033 s. The dips in this plot are no longer resolved, indicating that the fluctuations with larger wavenumbers have already decayed. Using Eq. (1) + (bkg) with $\rho=0$, and Eqs. (3) and (4), one can fit the data using the values for K_C , μ , T_{eff} , and η above, with d and bkg as adjustable parameters. The best fit is the continuous curve in Fig. 1(c) with the values $d=(29 \pm 8\%) \text{ nm}$ and $\text{bkg}=(1.8 \pm 10\%) \times 10^{-5}$, as expected.

In conclusion, we presented a more accurate model of DM, which allows measurements of interface height fluctuations with nanometer sensitivity for each interface separately in a multilayered transparent object, such as membranes of living cells. We applied this technique to study flicker fluc-

tuations in RBCs and were able to measure height fluctuations and obtain the elastic properties for each surface separately. The spatial spectrum predicted in the membrane-cytoskeleton-confinement model by Auth *et al.*¹⁷ fitted our data very well.

We acknowledge T. Auth for important comments and suggestions, J. M. A. Figueiredo for computational help, and R. Dickman for a critical reading of the manuscript. We also acknowledge the financial support from the Brazilian Agencies CNPq, FAPEMIG, Instituto do Milênio de Óptica Não-linear, Fotônica e Biofotônica, and Instituto do Milênio de Nanotecnologia.

¹L. Mandel and E. Wolf, *Optical Coherence and Quantum Optics* (Cambridge University Press, Cambridge, 1995).

²U. Agero, C. H. Monken, C. Ropert, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. E* **67**, 051904 (2003).

³J. C. Neto, U. Agero, D. C. P. Oliveira, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita, *Exp. Cell Res.* **303**, 207 (2005).

⁴J. C. Neto, U. Agero, D. C. P. Oliveira, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita, *Biophys. J.* **91**, 1108 (2006).

⁵L. G. Mesquita, U. Agero, and O. N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett.* **88**, 133901 (2006).

⁶G. Y. H. Lee and C. T. Lim, *Trends Biotechnol.* **25**, 111 (2007).

⁷Detailed calculations will appear in a future publication.

⁸F. Brochard and J. F. Lennon, *J. Phys. (Paris)* **36**, 1035 (1975).

⁹A. Zilker, H. Engelhardt, and E. Sackmann, *J. Phys. (France)* **48**, 2139 (1987).

¹⁰M. A. Peterson, *Phys. Rev. A* **45**, 4116 (1992).

¹¹H. Strey, M. Peterson, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **69**, 478 (1995).

¹²S. Tuvia, S. Levin, A. Bitler, and R. Korenstein, *J. Cell Biol.* **141**, 1551 (1998).

¹³N. Gov, A. G. Zilman, and S. Safran, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 228101 (2003).

¹⁴N. Gov and S. Safran, *Biophys. J.* **88**, 1859 (2005).

¹⁵J. B. Fournier, D. Lacoste, and E. Raphael, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 018102 (2004).

¹⁶G. Popescu, T. Ikeda, K. Goda, C. A. Best-Popescu, M. Laposata, S. Manley, R. R. Dasari, K. Badizadegan, and M. S. Feld, *Phys. Rev. Lett.* **97**, 218101 (2006).

¹⁷T. Auth, S. A. Safran, and N. S. Gov, *Phys. Rev. E* **76**, 051910 (2007).

¹⁸J. Evans, W. Gratzer, N. Mohandas, K. Parker, and J. Sleep, *Biophys. J.* **94**, 4134 (2008).

¹⁹There is a mistake in the expression for the confinement potential in Ref. 17, such that for RBCs it is $3\mu f_C$ instead of $4\mu f_C$. T. Auth, personal communication (7 October 2008).

²⁰With DM we can measure the local mean curvature of RBCs. We neglected the Gaussian curvature, which in our case can cause an error of at most 13% in the calculation of the confinement potentials. T. Auth, personal communication (7 October 2008).

Referências Bibliográficas

- [1] **Agero, U., Monken, C. H., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Cell Surface Fluctuations Studied with Defocusing Microscopy.” *Physical Review E* 67, 051904 (2003).
- [2] **Agero, U., Mesquita, L. G., Neves, B. R. A., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Defocusing Microscopy.” *Microscopy Research and Technique* 65, 159–165 (2004).
- [3] **Neto, J. C., Agero, U., Oliveira, D. C. P., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Real-time Measurements of Surface Dynamics on Macrophages and the Phagocytosis of *Leishmania* Parasites.” *Experimental Cell Research* 303, 207–217 (2005).
- [4] **Mesquita, L. G., Agero, U., and Mesquita, O. N.**, “Defocusing Microscopy: An approach for Red Blood Cell Optics.” *Applied Physics Letters* 88, 133901 (2006).
- [5] **Neto, J. C., Agero, U., Oliveira, D. C. P., Gazinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Measuring Optical and Mechanical Properties of a Living Cell with Defocusing Microscopy.” *Biophysics Journal* 91, 1108–1115 (2006).
- [6] **Batista, U. A.**, Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo de Fagocitose por Macrófagos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2003).
- [7] **Neto, J. C.**, Motilidade do Citoesqueleto de Macrófagos e sua Relação com o Processo de Fagocitose Estudado Através da Microscopia de Desfocalização. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2005).

- [8] **Auth, T., Safran, S. A., and Gov, N. S.**, “Fluctuations of Coupled Fluid and Solid Membranes with Application to Red Blood Cells.” *Physical Review E* 76, 051910(1–18) (2007).
- [9] **Tuvia, S., Levin, S., and Koreinsein, R.**, “Cell Membrane Fluctuations are Regulated by Medium Macroviscosity: Evidence for a Metabolic Driving Force.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5045 (1997).
- [10] **Tuvia, S., Levin, S., Bither, A., and Koreinsein, R.**, “Mechanical Fluctuations of the Membrane-Skeleton are Dependent on F-actin ATPase in Human Erythrocytes.” *J. Cell. Biol.* 141, 1551 (1998).
- [11] **Evans, J., Gratzer, W., Mohandas, N., Parker, K., and Sleep, J.**, “Fluctuations of the Red Blood Cell Membrane: Relation to Mechanical Properties and Lack of ATP-Dependence.” *Biophys. J.* 94 (10), 4134 (2008).
- [12] **Born, M. and Wolf, E.**, Principles of Optics. Cambridge University Press, New York, 7th ed. (1999).
- [13] **Murphy, D. B.**, Fundamental of Light Microscopy and Electronic Imaging. John Wiley Sons, New York (2001).
- [14] **Brochard, F. and Lennon, J. F.**, “Frequency Spectrum Of Flicker Phenomenon In Erithrocytes.” *Le Journal De Physique* 36 (11), 1035–1047 (1975).
- [15] **Gov, N., Zilman, A. G., and Safran, S.**, “Cytoskeleton Confinement and Tension of Red Blood Cell Membrane.” *Physical Review Letters* 90 (22), 228101(1–4) (2003).
- [16] **Gov, N. and Safran, S.**, “Red Blood Cell Membrane Fluctuations and Shape Controlled by ATP-Induced Cytoskeletal Defects.” *Biophys. J.* 88 (22), 1859 (2005).
- [17] **Gov, N.**, “Active Elastic Network: Cytoskeleton of the Red Blood Cell.” *Phys. Rev. E* 75, 011921 (2007).
- [18] **Fournier, J. B., Lacoste, D., and Raphael, E.**, “Fluctuation Spectrum of Fluid Membranes Coupled to an Elastic Meshwork: Jump of the Effective

Surface Tension at the Mesh Size.” *Physical Review Letters* 92 (1), 018102 (2004).

- [19] **Popescu, G., Ikeda, T., Goda, K., Best-Popescu, C. A., Laposata, M., Manley, S., Dasari, R. R., Badizadegan, K., and Feld, M. S.**, “Optical Measurement of Cell Membrane Tension.” *Phys. Rev. Lett.* 94, 4134 (2006).
- [20] **Zilker, A., Engelhardt, H., and Sackmann, E.**, “Dynamical Reflection Interference Contrast (RIC) Microscopy. A New Method to Study Surface Excitations of Cells and to Measure Membrane Bending Elastic-Moduli.” *J. Physique* 48, 2139 (1987).
- [21] **Mandel, L. and Wolf, E.**, *Optical Coherence and Quantum Optics*. Cambridge University Press, Cambridge (1995).
- [22] **Goodman, J. W.**, *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill Co., Inc., New York (2002).
- [23] **Feynman, R., Leighton, R., and Sands, M.**, *The Feynman Lectures on Physics*. Addison-Wesley Publishing Co., New York (2005).
- [24] **Safran, S. A.**, *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes*. Addison-Wesley Publishing Company (1994).
- [25] **Boal, D.**, *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press, UK (2002).
- [26] **Helfrich, W. and Naturforsch, Z.**, “Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments.” *Z. Naturforsch* 28, 693 (1973).
- [27] **Deuling, H. and Helfrich, W.**, “The Curvature Elasticity of Fluid Membranes: A Catalogue of Vesicle Shapes.” *Le Journal de Physique* 37, 1335 (1976).
- [28] **Mannenile, J., Basserean, P., Levy, D., and Prost, J.**, “Activity of Transmembrane Proteins Induces Magnification of Shape Fluctuations of Lipid Membranes.” *Physical Review Letters* 82 (21), 4356 (1999).
- [29] **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D.**, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York (1994).

- [30] **Bray, D.**, Cell Movements: From Molecules to Motility. Garland Publishing, New York, 2nd ed. (2001).
- [31] **Lee, G. Y. H. and Lim, C. T.**, “Biomechanics Approaches to Studying Human Diseases.” *Trends in Biotechnology* 25 (3), 111–118 (2007).
- [32] **Sleep, J., Wilson, D., Simmons, R., and Gratzner, W.**, “Elasticity of the Red Blood Cell Membrane and its Relation to Hemolytic Disorders: An Optical Tweezers Study.” *Biophys. J.* 77, 3085 (1999).
- [33] **C. S. Peskin, G. M. O. and Oster, G. F.**, “Cellular Motions and Thermal Fluctuations: The Brownian Ratchet.” *Biophysical Journal* 65, 316–324 (1993).
- [34] **Mogilner, A. and Oster, G. F.**, “Cell Motility Driven by Actin Polymerization.” *Biophysical Journal* 71, 3030–3045 (1996).
- [35] **Howard, J.**, Mechanics of Motor Proteins and Cytoskeleton. Sinauer Associates, Inc, Sunderland - Massachusetts (2001).
- [36] **Nussenzveig, H. M.**, “Pinças Ópticas e Biologia Celular.” *Notas de aulas do curso de Pós-Graduação em Física - UFRJ* (2006).
- [37] **G. Lenormand, A. R. J. S., S. Hénon and Gallet, F.**, “Direct Measurement of the Area Expansion and Shear Moduli of the Human Red Blood Cell Membrane Skeleton.” *Biophys. J.* 81, 43 (2001).
- [38] **Evans, E.**, “Structure and Deformation Properties of Red Blood Cells - Concepts and Quantitative Methods.” *Methods Enzymol.* 173, 3 (1989).
- [39] **Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F.**, “A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers.” *Biophys. J.* 76, 1145 (1999).
- [40] **Szleifer, I., Kramer, D., Ben-Shaul, A., Gelbart, W., and Safran, S.**, “Molecular Theory of Curvature Elasticity in Surfactants Films.” *J. Chem. Phys.* 92 (11), 6800 (1990).
- [41] **Peterson, M.**, “Linear response of the Human Erythrocyte to Mechanical Stress.” *Phys. Rev. A* 45 (6), 4116 (1992).

- [42] **Zilker, A., Ziegler, M., and Sackmann, E.**, “Spectral Analysis of Erythrocyte Flickering in the 0,3-4,0 μm^{-1} Regime by Microinterferometry Combined with Fast Image-Processing.” *Phys. Rev. A* 46, 7998 (1992).
- [43] **Gov, N., Zilman, A. G., and Safran, S.**, “Hydrodynamics of Confined Membranes.” *Phys. Rev. E* 70, 011104 (2004).
- [44] **Auth, T.**, “Comunicação particular.” (2008).