

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE FÍSICA GLEB WATAGHIN
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA
DEPARTAMENTO DE ELETRÔNICA QUÂNTICA

**Desenvolvimento de metodologia
de medida vetorial de forças em tempo
real de microorganismos utilizando pinças
ópticas para estudos de quimiotaxia e
osmotaxia de parasitas.**

Autora: Liliana de Ysasa Pozzo
Orientador: Dr. Carlos Lenz Cesar

Curso: Física

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada à comissão de Pós Graduação do Instituto de Física Gleb Wataghin, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Física.

Este exemplar corresponde à redação final da tese de mestrado defendida pela aluna Liliana de Ysasa Pozzo aprovada pela comissão julgadora.



Campinas, 2006
S.P – Brasil

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

P879d Pozzo, Liliansa de Ysasa
Desenvolvimento de metodologia de medida vetorial das forças em tempo real de microorganismos utilizando pinças ópticas para estudos de quimiotaxia e osmotaxia de parasita / Liliansa de Ysasa Pozzo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Carlos Lenz Cesar.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Pinças opticas. 2. Quimiotaxia. 3. Leishmania amazonensis. 4. Leishmaniose. 5. Parasitas.
I. Cesar, Carlos Lenz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin".
III. Título.

- **Título em inglês:** Development methodology of vectorial measurements of forces in real time of microorganisms using optical tweezers for chemotaxis and osmotaxis studies of parasites.
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 1. Optical tweezers
 2. Chemotaxis
 3. Leishmania amazonensis
 4. Leishmaniose
 5. Parasites
- **Área de concentração:** Física
- **Titulação:** Mestre em física
- **Banca examinadora:**
Prof. Carlos Lenz Cesar
Prof. Roberto Antonio Clemente
Prof. Selma Giorgio
- **Data da defesa:** 28.07.2006



100
40



Secretaria de Pós-Graduação - Tel: (19) 3788-5305 FAX: (19) 3788-4142

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE Mestrado de **LILIANA DE YSASA POZZO – RA 027461**, APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN” DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 28/07/2006.

COMISSÃO JULGADORA:

Carlos Lenz César

Prof. Dr. Carlos Lenz César (Orientador do Candidato)
DEQ/IFGW/UNICAMP

Roberto Clemente

Prof. Dr. Roberto Antonio Clemente – DEQ/IFGW/UNICAMP

Selma Giorgio

Prof^a. Dr^a. Selma Giorgio – IB/UNICAMP

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ser terminado sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto minha homenagem:

- ✓ Aos meus pais, Glória e Miguel pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.
- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr Carlos Lenz Cesar pela orientação paciente e dedicada.
- ✓ Ao meu marido, Alexey, por compartilhar todos os momentos de alegria e dificuldades.
- ✓ As minhas irmãs, Lorena, Liza e Ludmila pela eterna amizade e cumplicidade.
- ✓ A Dra. Adriana Fontes, pela cooperação irrestrita e pela amizade.
- ✓ Aos meus colegas de laboratório: Heloise, Diogo, Wendel e André.
- ✓ A Prof. Dra. Selma Giorgio do departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo fornecimento de amostras, discussões e idéias.
- ✓ As minhas colegas do departamento de parasitologia: Diana, Adriana, Leticia e Maira .
- ✓ Aos meus amigos do IFGW: Tânia, Elvis e José Daniel.
- ✓ A Fapesp , pelo apoio financeiro.

Dedicatória:

Dedico esta dissertação em memória a meu querido pai: Miguel.

Resumo

Microorganismos unicelulares, como os demais seres vivos, necessitam interagir com o ambiente e procurar ativamente por alimentos. Seus órgãos sensoriais, entretanto, se limitam a sensores hidrodinâmicos e receptores bioquímicos de membrana. A quimiotaxia estuda a resposta de organismos unicelulares frente a gradientes de concentração de substâncias atratoras ou repulsoras. Essa resposta é parte essencial do processo de infecção por parasitas no direcionamento e reconhecimento das células a serem infectadas. Dessa forma, um estudo quantitativo da quimiotaxia de parasitas requer o monitoramento tanto dos movimentos do parasita quanto das intensidades, direção e sentido das forças que exerce na presença de gradientes de concentração das substâncias atratoras e repulsoras. Forças de microorganismos com dimensões da ordem de $10\ \mu\text{m}$ são da ordem de pico-Newtons.

A pinça óptica é a microferramenta ideal para esse tipo de estudo pelas seguintes razões: (1) tem sensibilidade para medir forças desde 20 femto-Newtons até 200 pico-Newtons, da mesma ordem de grandezas das forças geradas pelos parasitas; (2) é uma técnica remota, sem necessidade de contacto e (3) não destrutiva, pois os lasers no infravermelho não geram calor suficiente para causar danos térmicos.

Nesse trabalho mostramos como se pode utilizar o deslocamento da posição de equilíbrio de uma microesfera como transdutor de forças vetoriais, determinando quantitativamente intensidade, direção e sentido das forças na microesfera. Um detector de quadrante da luz do próprio laser da pinça óptica fornece o deslocamento da mesma em duas dimensões. Dessa forma foi possível monitorar a força exercida pelo parasita em tempo real em diferentes gradientes de concentração de várias substâncias. Também desenvolvemos uma câmera de gradiente que garantiu um gradiente unidimensional estacionário na qual se pode aprisionar os parasitas e realizar a medida vetorial da força em função do tempo.

Demonstramos a capacidade do nosso sistema de realização de medidas de quimiotaxia utilizando o protozoário *Leishmania amazonensis*, responsável pela doença leishmaniose, na forma promastigota, na presença de gradientes de glucose. Nossos resultados mostram que além das forças serem fortemente direcionadas na direção do gradiente, que a intensidade das mesmas diminui nas direções contrária ou perpendicular ao gradiente. Com esse trabalho mostramos a construção de um sistema de medidas quantitativa capaz de estudar quantitativamente a quimiotaxia de qualquer parasita frente a qualquer gradiente de concentração de diferentes substâncias.

Abstract

Unicellular microorganisms, like others live beings, need to interact with environment to find nourishment. They have only hydrodynamics sensors and biochemical receptors on membrane to accomplish this task. The response of the microorganism to concentration gradients of attractive or repulsive chemical substances is called chemotaxis. The investigation of chemotaxis is essential to understand infection processes and how parasites recognizes and directs itself to the cells to be infected. This way a quantitative study of parasites chemotaxis requires the observation of not only its movements, but also the strength, direction and sense of forces exerted in the presence of concentration gradient of attractive or repellent chemical substances. Microorganism's forces with dimensions of around $10\mu\text{m}$ are the order of pico-Newton.

Optical tweezers are a suitable tool for this kind of investigation, we can justify this affirmation by the following reasons: (1) it has high sensibility to measure forces from 20 femto-Newton until 200 pico-Newton. These forces are in same order of the forces exerted by the parasites. (2) This technique does not need contact, therefore it is a remote technique; and (3) this tool does not destroy the parasites, because lasers on infrared band do not generate enough heat to cause thermal damage on them.

In this work we used the displacements of a microsphere trapped in an Optical Tweezers as the force transducer to measure the direction and the strength of the propulsion forces of flagellum of the microorganism under several gradient conditions. A quadrant detector was utilized to sense the displacement of optical tweeter's laser in two dimensions. So we monitor the force exerted by the parasites in real time in several concentrations gradients of different substances. We also developed a system enable to create concentration gradient. This system guaranteed a stationary one-dimensional gradient, which the parasites were arrested and the vectorial measurements of force in time function were realized.

In this study, we used the protozoa *Leishmania amazonensis* in its promastigote form. It is responsible by the disease called leishmaniose and it represents a serious problem of public health. We demonstrated that our system is able to perform chemotaxis measurements in gradients of glucose. Our results suggest that the direction and strength of force can be used to identify the movement of the parasite. We also notice differences in strength forces for both direction x and y for different glucose in several concentrations. Using that system we can investigate quantitatively taxis of any parasites in any concentration gradient with different chemical substance, temperature or other variables.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	3
ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	3
2.1 INTRODUÇÃO: A IMPORTÂNCIA DA BIOLOGIA.....	3
2.2 OBJETIVO DESSA TESE.....	4
2.3 QUIMIOTAXIA	5
2.3.1 <i>Motor Celular</i>	10
2.3.2 <i>Swimming e Tumbling</i>	11
2.3.3 <i>Quimiotaxia de Procariontes</i>	13
2.3.4 <i>Bioquímica da Quimiotaxia</i>	14
2.3.5 <i>Quimiotaxia de Eucariontes</i>	15
2.3.6 <i>Hidrodinâmica microscópica: baixos números de Reynolds</i>	15
2.4 LEISHMANIA AMAZONENSIS.....	17
2.5 ESTUDOS PRÉVIOS.....	25
CAPÍTULO 3	31
PINÇA ÓPTICA	31
3.1 INTRODUÇÃO À PINÇA ÓPTICA.....	32
3.2 PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA PINÇA ÓPTICA.	33
3.2.1 <i>Ordem de grandeza da força óptica.</i>	36
3.2.3 <i>Força óptica no Regime de Rayleigh</i>	37
3.3 PARÂMETROS IMPORTANTES NA MONTAGEM DE UMA PINÇA ÓPTICA.	38
3.3.1 <i>Importância do telescópio</i>	39
3.3.2 <i>Importância da Abertura Numérica e Falso Trap</i>	41
3.4 TEORIA ÓPTICA GEOMÉTRICA.....	44
3.5 TEORIA HIDRODINÂMICA E CALIBRAÇÃO DA PINÇA ÓPTICA	47
CAPÍTULO 4	50
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE CRIAÇÃO DE UM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO.....	50
4.1 DIFUSÃO	50
4.1.1 <i>Equação da Continuidade</i>	51
4.1.2 <i>Primeira lei de Fick</i>	53
4.1.3 <i>Equação da Difusão</i>	53
4.1.4 <i>Processo conservativo estacionário em dutos de seção reta constante.</i>	54
4.2 CÂMARA COM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO.....	55

4.2.1 <i>Condição de Difusão Estacionária</i>	55
4.3 MEDIDA DA FORÇA ÓPTICA.....	57
4.3.1 <i>Fotodetectores</i>	58
4.3.2 <i>Detector de quadrante (QPD)</i>	61
4.3.3 <i>Montagem experimental para medida da força óptica</i>	64
4.4 CALIBRAÇÃO DO DETECTOR DE QUADRANTE.....	65
4.5 RESULTADOS	70
4.6 MEDIDAS DE FORÇA DE PROMASTIGOTA DE LEISHMANIA AMAZONENSIS	71
4.6.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
CAPÍTULO 5	77
CONCLUSÃO	77
APÊNDICE A	78
APÊNDICE B	80
APÊNDICE C	81
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	86

Capítulo 1

Introdução

Objetos microscópicos , incluindo materiais biológicos podem ser remotamente manipulados por um laser fortemente focalizado[1]. Focando com objetivas de elevada abertura numérica, a pressão da luz e as forças do gradiente de força óptica poderiam segurar, e conseqüentemente mover, objetos de tamanhos sub-micrométricos, mesmo no interior de células[2]. Além da micromanipulação, pinças ópticas poderiam ser também empregadas para medidas de forças biológicas. Tipicamente, pinças ópticas que usam comprimentos de onda de baixa absorção (700-1100 nm), conseqüentemente menos destrutivos para materiais biológicos, podem facilmente exercer força de picoNewton.

Pinças óticas também estão sendo usadas extensivamente para estudar o movimento individual de motores de proteína, tal como a quinosina, miosina, e RNA polimerase[3, 4, 5, 6]. No início, as “armadilhas” forneciam uma maneira de capturar e segurar microesferas recobertas com motores, enquanto o substrato do motor era movido, manualmente, com o estágio de translação do microscópio. Os movimentos das microesferas eram gravados em baixa resolução espaço-temporal em vídeo [7]. Com o desenvolvimento tecnológico estes instrumentos estão tornando-se mais sofisticados e versáteis. Detectores de posição, baseados em interferometria ou quadrantes fotodiodos (QPDs-detectores de quadrantes), estão sendo utilizados para rastrear o movimento da esfera com a acuidade de sub-nanômetros e alta largura de banda.

Nesta dissertação de mestrado utilizaremos a pinça óptica como uma ferramenta de medida para o desenvolvimento de um sistema de medida vetorial de forças de parasitas frente a gradientes de concentração.

No capítulo 2, apresentou-se a descrição do fenômeno da quimiotaxia e do parasita da *Leishmania amazonensis* que será usado em particular. A quimiotaxia é a resposta de microorganismos frente estímulos de substâncias atratoras ou repelentes e tem sido extensivamente estudada de dois pontos de vista:

- a) Como uma caixa preta na qual se observa uma resposta a um estímulo, (determinando a função resposta).
- b) Com modelos de funcionamento interno da caixa preta. Nesses estudos os estímulos são a presença de gradientes de concentração das substâncias e a resposta a direcionalidade no tempo dos microorganismos.

No capítulo 3, descrevemos os princípios de funcionamento da pinça óptica e, principalmente, descrevemos o modelo de óptica geométrica utilizada para medida da força realizada no capítulo 4. O deslocamento da microesfera em relação à sua posição de equilíbrio é utilizado como transdutor de força. Esse modelo teórico foi desenvolvido na tese de mestrado da Adriana Fontes.

No capítulo 4, determinamos quantitativamente a intensidade, direção e sentido de forças em microesferas acopladas a *Leishmania amazonensis*. Utilizando para isso um detector de quadrante da luz do próprio laser da pinça óptica que fornece o deslocamento da mesma em duas dimensões. Dessa forma foi possível monitorar a força exercida pelo parasita em tempo real em diferentes gradientes de concentração de várias substâncias. Desenvolvemos uma câmara, constituída por dois reservatórios ligados por um canal, que garantiu a criação de um gradiente unidimensional estacionário no qual se pode aprisionar parasitas e realizar a medida vetorial da força em função do tempo.

Capítulo 2

Aspectos Biológicos

2.1 Introdução: A Importância da Biologia

A importância da biologia para o atual horizonte da ciência e da nanotecnologia foi reconhecida por Feynman em um seminário, hoje considerado o mais visionário seminário do século XX, intitulado **“There’s Plenty of Room at the Bottom”**. Nesse seminário Feynman afirma que a biologia aprendeu a produzir dispositivos fantasticamente versáteis e eficientes, em escala de tamanho extremamente pequenas e previu que seríamos capazes de aprender e copiar todo esse desenvolvimento. Além disso chamou a atenção de que não poderia haver qualquer lei da física, da química ou da biologia impedindo o desenvolvimento de tais dispositivos uma vez que a sua existência na biologia demonstrava sua factibilidade.

Microorganismos celulares possuem motores moleculares, na escala de nm, extremamente eficientes do ponto de vista energético. Entretanto, um dispositivo real necessita, além da energia motora, de sistemas de controle para garantir que o trabalho seja organizado na direção de seus objetivos. Para muitos microorganismos a sobrevivência depende de sua capacidade de encontrar regiões com temperatura, pH, pressão e até iluminação adequadas, além de ser capaz de encontrar alimentos e células hospedeiras e, finalmente, de reagir ao meio externo. Para microorganismos autotróficos a luz é o combustível fundamental através da fotossíntese. Para microorganismos que formam colônias, até alguma forma de comunicação entre os seus membros é necessária. Micropartículas tendem a ser carregadas e forças geradas por campos elétricos exercem enorme influência na repulsão e atração de microorganismos, células e/ou partículas coloidais, de modo geral. Hoje sabe-se que existem até bactérias capazes de responder a campos magnéticos externos. A questão que se coloca, então, é saber como operam os

diversos sensores de um microorganismo na escala de $\mu\text{m}/\text{nm}$. Sensores de pressão, temperatura, luz, velocidade de fluidos são fáceis de visualizar uma vez que o contacto/efeito sobre o corpo celular é forte. Sensores do ambiente químico das redondezas, entretanto, precisam de uma sofisticação muito maior envolvendo, de alguma forma, receptores de membrana.

Se pretendemos criar dispositivos mecânicos artificiais com dimensões nanométricas também necessitaremos de fontes de energia e de formas de controle do dispositivo. Nesse aspecto, descobrir como a biologia de seres unicelulares resolveu essas questões é um passo importante na direção de nanodispositivos motores. Para tanto, entender a bioquímica da geração da energia e da composição de membranas, receptores, mecanismos de transporte através da membrana, etc, é tarefa necessária mas de forma alguma suficiente. Os dispositivos precisam também ser caracterizados do ponto de vista mecânico através de medidas de forças, torques, elasticidades, viscosidades, viscoelasticidades, forças de adesão, etc, nas dimensões de micro-nano-metros. As massas de objetos com essas dimensões são da ordem de 10^{-15} a 10^{-12} kg, significando que as forças envolvidas devem ser da ordem de 10^{-14} a 10^{-10} Newtons, para garantir acelerações da ordem de unidades de gravidades g.

Nessa escala as pinças ópticas se tornam à ferramenta ideal de medida. Primeiro pela sensibilidade, as forças ópticas em sistemas típicos variam de dezenas de femto-Newtons a 200 pico-Newtons, enquanto sistemas de força atômica são mais adequados para a escala de nano-Newtons se aproximando de pico-Newtons no limite inferior. Segundo pelo fato da medida realizada pela pinça óptica ser feita remotamente, sem contacto, e não destrutivamente. Técnicas de força atômica são basicamente técnicas de contacto impedindo a realização de uma observação dentro de uma célula sem a sua destruição.

2.2 Objetivo dessa Tese

O objetivo desse trabalho de tese é desenvolver ferramentas utilizando pinças ópticas para estudar como o protozoário da leishmaniose infecta os macrófagos do hospedeiro humano e como se comporta com a proximidade dos mesmos. Para tanto,

estudaremos o parasita denominado *Leishmania amazonensis*, na sua forma promastigota apenas, pois é nesse forma que ele possui flagelos e deve encontrar as células a serem infectadas. Nosso sistema de medidas deve permitir uma melhor compreensão dos fenômenos de mobilidade flagelar, adesão, dissociação e sensibilidade a estímulos do microambiente externo do parasita. Demonstraremos a capacidade do nosso sistema através da realização de medidas de quimiotaxia deste parasita. Por isso esse capítulo é devotado à descrição do fenômeno da quimiotaxia em geral e da descrição da *Leishmania amazonensis* em particular.

2.3 Quimiotaxia

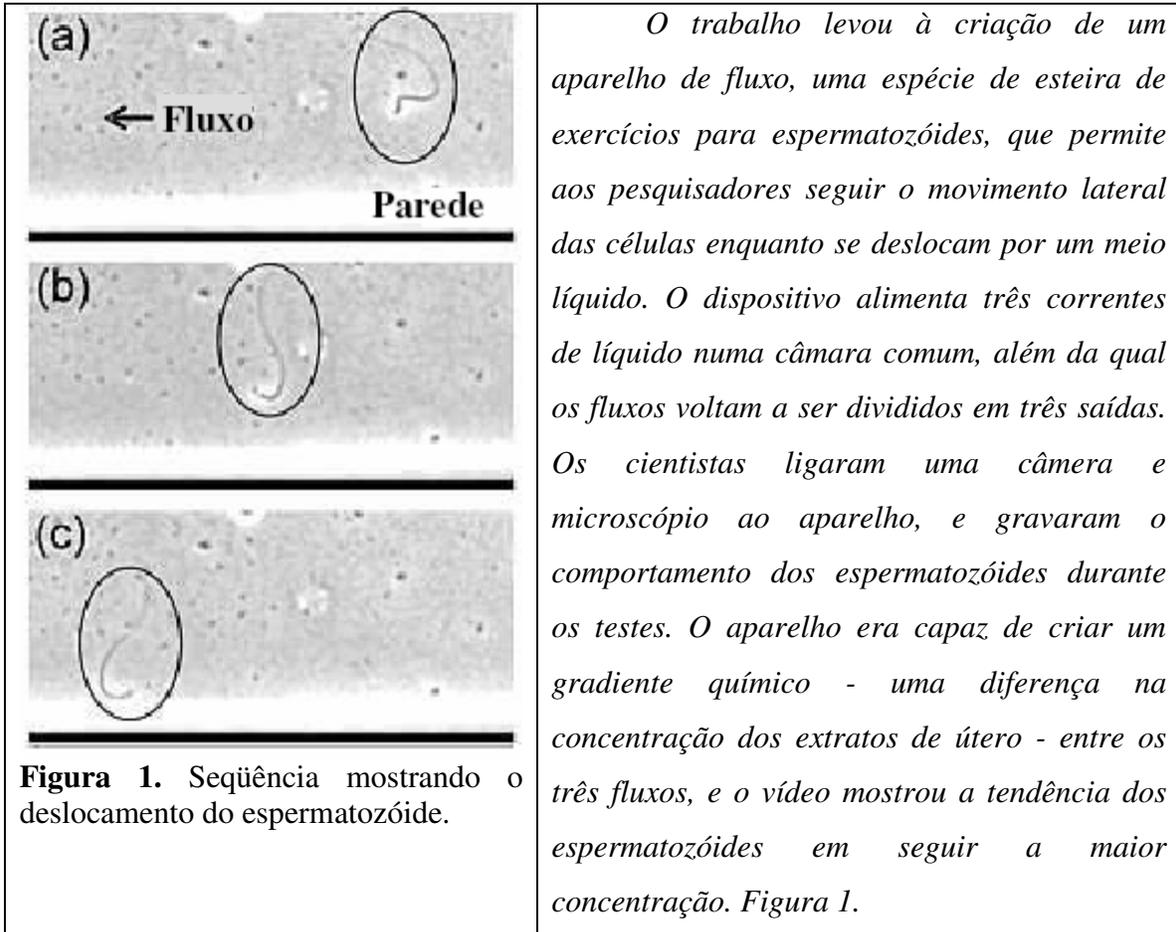
O termo quimiotaxia (químio refere-se ao estímulo, e o prefixo taxis significa o movimento em direção, ou em oposição, ao estímulo, em inglês se escreve *chemotaxis*) é usado para denotar o movimento da célula em direção, ou em oposição, a uma fonte de substância química, definida, respectivamente, como quimiotaxia positiva ou negativa. A substância é definida como sendo quimioatraente (positivo) ou quimiorepelente (negativo). Os espermatozóides podem ser citados como exemplo do estudo de quimiotaxia bem recente. O artigo abaixo que apareceu no O Estado de São Paulo afirma que:

Estado de São Paulo, 18 de maio de 2006:

Espermatozóide fareja o ovário, mostra pesquisa.

BLOOMINGTON, EUA - Não é só o nariz dos ratos que tem um faro apurado. Cientistas da Universidade de Indiana em Bloomington (IUB) apresentam, na edição desta semana da revista Analytical Chemistry, um sistema bioquímico que permite que espermatozóides de ratos sigam o cheiro mais tênue. Mesmo quando extratos de ovário são diluídos 100.000 vezes, algumas células ainda conseguem achar o alvo. "Já se sabia que o esperma apresenta quimiotaxia em relação aos extratos de diversos órgãos reprodutores femininos, mas o papel da quimiotaxia na reprodução é desconhecido", disse o cientista Stephen C. Jacobson, segundo nota divulgada pela IUB. "Quimiotaxia" é o nome dado à relação de atração ou repulsão entre células e substâncias químicas. "As substâncias que efetivamente atraem o esperma não foram identificadas. Estudo sistemático de diversos

compostos liberados pelos órgãos reprodutores da fêmea, sob diversas condições, pode aprofundar nosso conhecimento do processo". Compreender como, quando e por quê o espermatozóide é atraído pelos ovários poderá ajudar a resolver problemas da concepção humana. O projeto da IUB é liderado por Jacobson e pelo químico Milos V. Novotny.



A definição geral de quimiotaxia está relacionada a qualquer movimento celular que é afetado por um gradiente químico, que resulta em uma propagação na direção do gradiente quimioatraente, ou em direção contrária ao gradiente quimiorepelente, figura 2.

Células possuem uma variedade de movimentos que podem ser divididos em dois grupos, o *swimming* (natação), ou movimento tridimensional em meio aquoso, e o *crawling* (rastejamento), ou movimento sobre uma superfície rígida. Células ligadas à superfícies se deslocam muito lentamente e, portanto, qualquer sensibilidade à gradientes de concentração química deve ser obtida através de diferenças de concentração ao longo da própria membrana celular. A sensibilidade diferencial, portanto, aumenta com a dimensão da célula. Forças de adesão com a superfície de células altamente deformáveis

são as propriedades mecânicas mais importantes no caso de crawling. O interesse dessa tese está voltado apenas para a quimiotaxia de microorganismos com movimento de *swimming*.

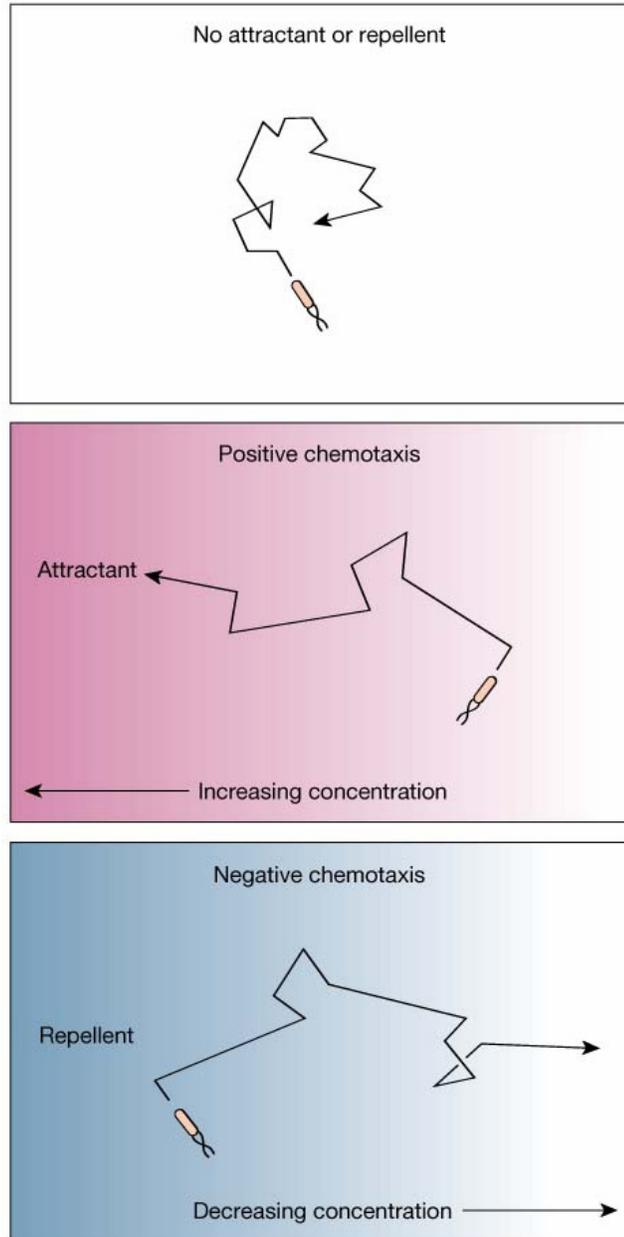


Figura 2. Esquema de movimento de célula em direção a uma fonte química denominado quimiotaxia positiva ou negativa.

A propulsão para esses movimentos é fornecida pelos cílios e flagelos, constituídas por pequenos apêndices, especialmente diferenciados, que variam em

número e tamanho. Se são escassos e longos recebem o nome de flagelos, ao passo que se são numerosos e curtos são denominados cílios, ou seja; os cílios e flagelos se diferenciam pela quantidade e pelo movimento. Um mesma célula não pode conter ambos, ou tem cílios ou flagelos. Nos cílios a propulsão se dá quando as áreas ciliadas se curvam em ondas unidirecionais coordenadas (figura 3). Cada cílio se move com um movimento de chicote, uma batida para frente na qual o cílio se estende totalmente golpeando o líquido circundante, seguida por uma fase de recuperação, na qual ele retorna à sua posição original com um movimento de enrolamento que minimize o arraste viscoso. Já o impulso do flagelo se dá através de uma rotação contínua.

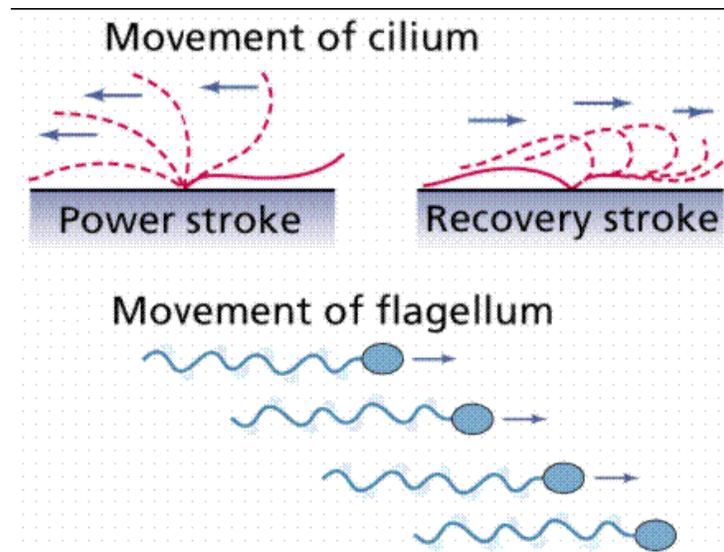


Figura 3. Diferenças dos movimentos entre os cílios e o flagelo.

Algumas bactérias possuem um único flagelo, como no caso da *Vibrio cholerae* e outras possuem múltiplos flagelos distribuídos em sua superfície, tal como a *Escherichia coli* (figura 4).

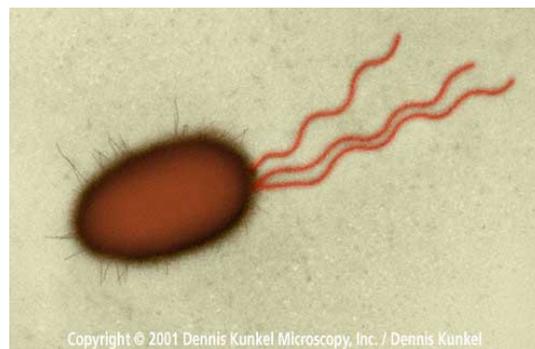


Figura 4. *Escherichia coli* com seus múltiplos flagelos.

(Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.)

A forma mais estudada de motilidade celular é o swimming, impulsionado pelo movimento dos flagelos. Existem dois tipos distintos de flagelos que dependem se estamos considerando os microorganismos procariontes ou os eucariontes. O flagelo do procarionte é um longo filamento construído por uma polimerização não-covalente de centenas de subunidades de proteínas idênticas, chamada flagelina. Apesar da mesma terminologia os flagelos da bactéria diferem dos flagelos eucarióticos. Os flagelos e cílios eucarióticos têm uma estrutura complexa envolvendo um grupo em torno de dez filamentos longos e paralelos que deslizam um em relação ao outro e se retorcem de maneira coordenada, todos envoltos por uma extensão da membrana plasmática da célula [8].

As células dos organismos procariontes se caracterizam por não ter organelas e apresentar um falso núcleo (nucleóide), não separado do meio intracelular por uma membrana, estando em contato direto com o citoplasma (figura 5).

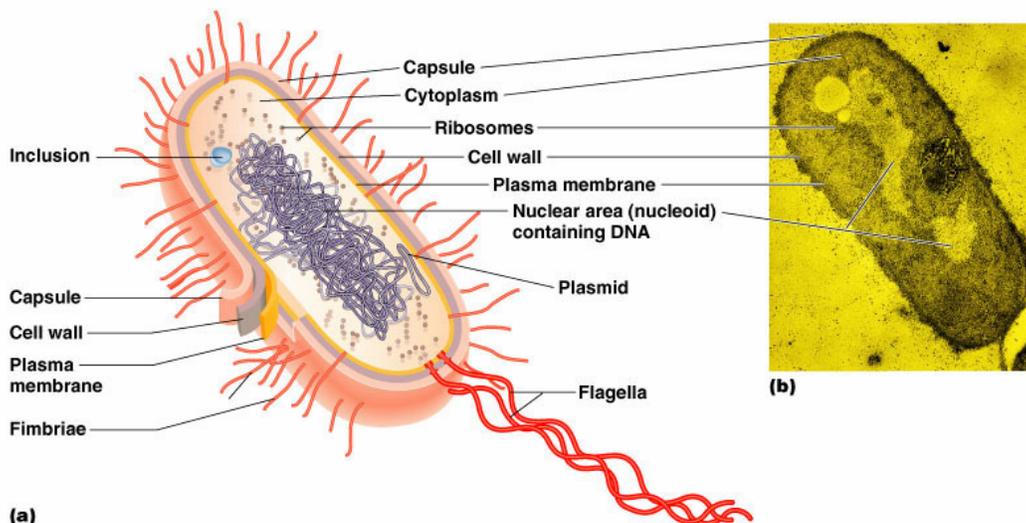


Figura 5. Diagrama esquemático da célula procariótica. Os pequenos apêndices ao longo da membrana celular não são cílios e são denominados fimbrias. (Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

A organização interna das células eucarióticas, que evoluíram das células procarióticas, é bem mais complexa. A principal feição que as distingue é o núcleo separado do citoplasma por uma dupla membrana denominada carioteca, além de possuírem diversas organelas para a realização de diferentes tarefas, (figura 6).

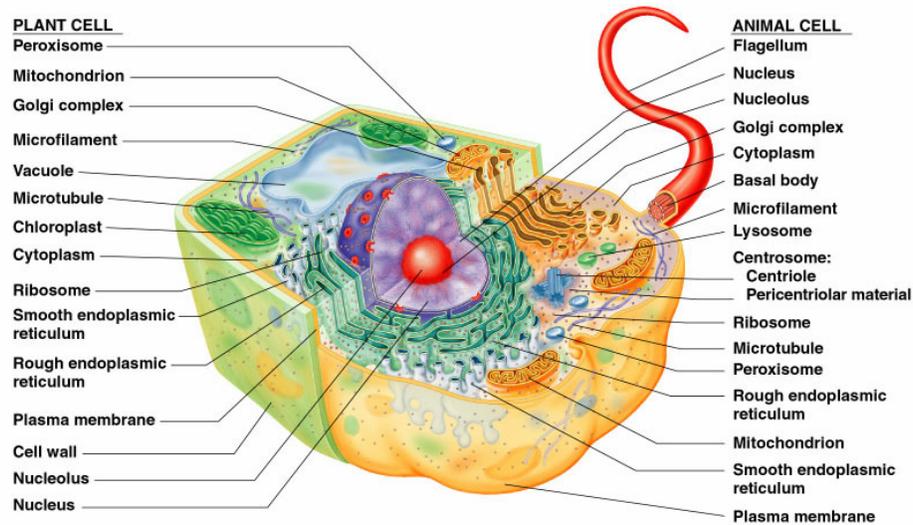


Figura 6. Diagrama esquemático da célula eucariótica, metade animal e metade vegetal. (Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

2.3.1 Motor Celular

Os procariontes usam a rotação dos flagelos para mover-se através do meio. A figura 7 representa o motor que gira o flagelo da bactéria. A propulsão desse motor se dá por gradiente de concentração de H^+ através da membrana plasmática conforme mostra a figura 7.

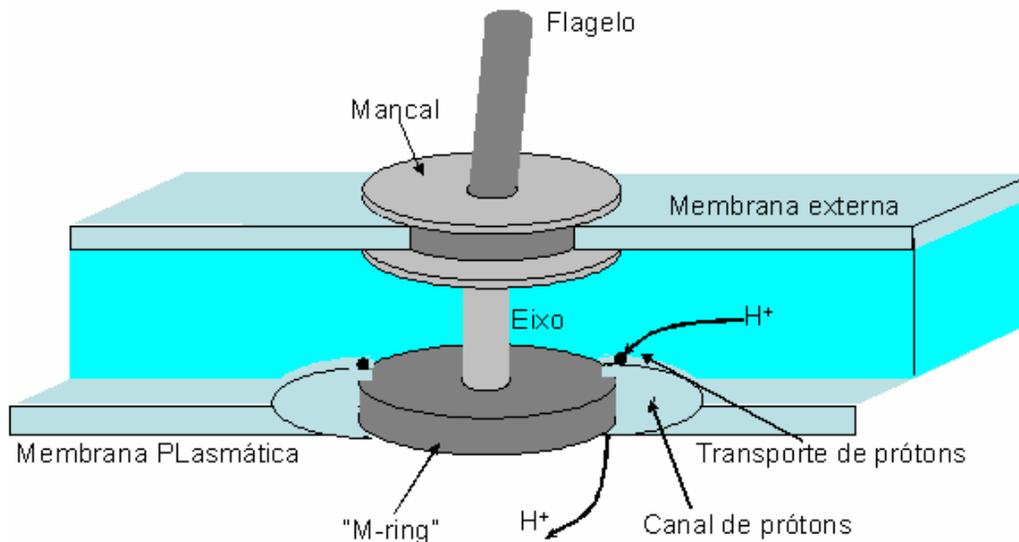


Figura 7. Motor que gira o flagelo da bactéria.

Este gradiente é gerado pela oxidação controlada de moléculas responsáveis pela produção de ATP. Com o transporte em uma ou outra direção o motor gira no sentido

antihorário ou horário. A *E. coli* conta com um conjunto de flagelos relativamente rígidos que a impulsionam via rotação das bases em torno de seus próprios eixos (com velocidade angular entre 100 a 200 rps) [9] (figura 8).

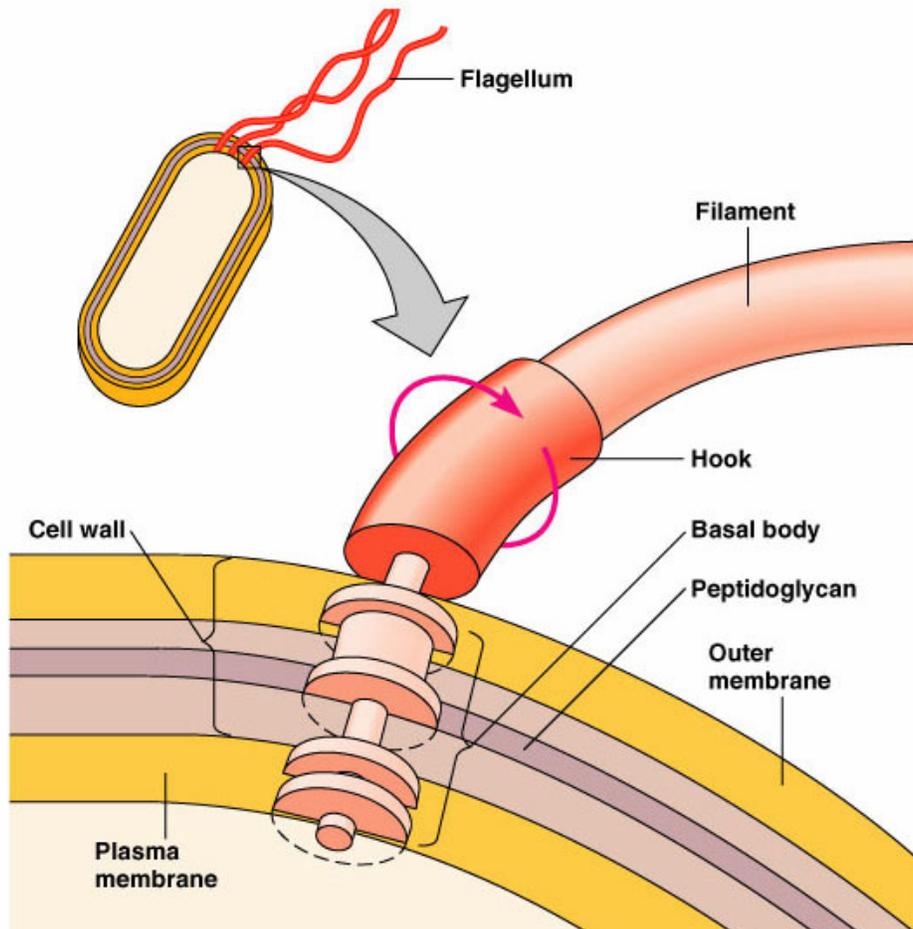


Figura 8. Motor para girar o flagelo de uma bactéria. (Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

2.3.2 Swimming e Tumbling

O movimento de swimming e tumbling é selecionado pelo sentido de rotação do flagelo. Quando ele gira no sentido antihorário a bactéria se move suavemente para frente, adotando o comportamento de nado (swimming). Entretanto, se o motor gira no sentido horário a bactéria passa a se movimentar aos saltos e cambalhotas, mudando de direção de forma aleatória o tempo todo (em inglês esse movimento é chamado de tumbling) [10]. As figura 9 mostra as razões para isso. Como a bactéria tem mais de um

flagelo, no movimento para frente eles se enovelam e operam como uma hélice só que impulsiona o movimento. Já no sentido contrário eles se abrem dando origem ao comportamento errático do tumbling.

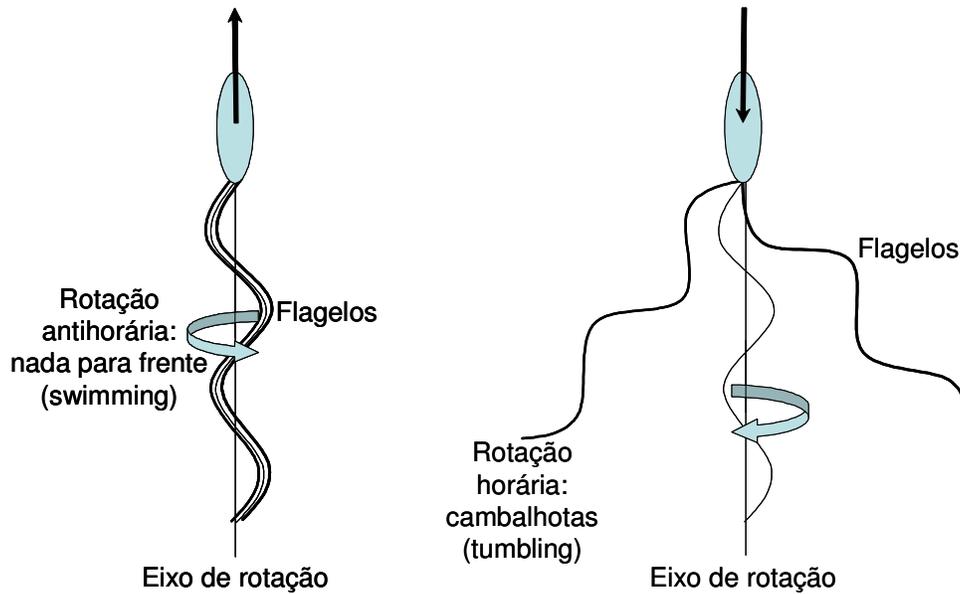


Figura 9. Comportamento de uma bactéria ao girar o flagelo nas direções anti-horária e horária.

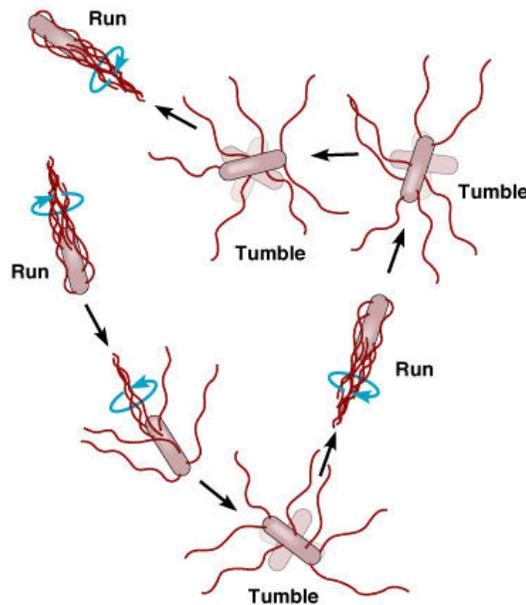


Figura 10. Esquema do comportamento de bactérias.
(Copyright 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

Usualmente uma bactéria nada com velocidades de 10 - 30 $\mu\text{m/s}$ por 1 - 2 s e muda para o movimento de tumbling, ao fim do qual ela pode estar em qualquer direção,

recomeçando a nadar. Isso dá origem a um comportamento tipo Browniano, só que de amplitude muito maior do que o movimento Browniano por choques térmicos de moléculas. Nadando com 10 $\mu\text{m/s}$ durante 1 segundo os passos do movimento Browniano seriam da ordem de 10 μm . O movimento de natação consome pouca energia da bactéria e a potência dispendida pode ser estimada considerando uma partícula esférica em escoamento de Stokes, com força de arraste dada por $F_{arraste} = 6\pi\eta a v$, com a = raio da esfera = 1 μm , η a viscosidade da água = 10^{-2} (g/cm.s) e v a velocidade de arraste = 10 $\mu\text{m/s}$. Nesse caso a potência dissipada será $P = Fv = 2 \times 10^{-18}$ W que corresponde a queima de 20 ATP's/s. Mesmo que a eficiência de queima seja de apenas alguns por cento nadar consumiria da ordem de 100 ATP's/s, muito menor do que os 10^7 ATP's/s necessários para a taxa metabólica da célula.

2.3.3 Quimiotaxia de Procariontes

A pergunta a ser feita então é: como a bactéria percebe o gradiente de concentração? Ela poderia fazer isso de duas formas, (1) medindo o diferencial de estímulo dos receptores ao longo de seu próprio corpo, ou (2) percebendo variações no tempo nas excursões que faz se movendo aleatoriamente. Só microorganismos maiores parecem ter a capacidade de perceber diretamente o gradiente de concentração ao longo de seu próprio corpo. As bactérias são essencialmente um sensor pontual da concentração local. Para isso a bactéria tem receptores seletivos na sua membrana externa para cada substância atratora ou repelente, que ativados pela ligação com as mesmas induzem o comportamento desejado. Para detectar o gradiente de concentração elas “pesquisam” a região à sua volta através dos movimentos “Browniano” de swimming e tumbling, guardando memória da concentração passada, quando estavam em determinada posição, e compará-la com a presente, na nova posição.

A seqüência de movimentos, swimming/tumbling, e a duração de um deslocamento unidirecional dependem da presença, ou não, de gradientes de substâncias atradoras ou repulsores. Na presença de um gradiente de nutrientes (atratores) a bactéria passa mais tempo nadando na direção do gradiente do que em tumbling, aproximando-se, em média, da fonte de alimentos. As bactérias são um algoritmo muito eficiente de

procurar máximos de concentrações diferenciais. Além de perceber a presença das substâncias atratoras elas vão inibindo os receptores à medida que a concentração aumenta e se tornando sensíveis apenas a diferencial de variações. O mecanismo inibidor acontece algum tempo depois do sensibilizador, para dar tempo para a bactéria ter se movimentado na direção do gradiente antes de inibição e providenciando a memória necessária para comparar a concentração entre as posições inicial e final. Dessa forma ela é capaz de detectar variações de concentrações de 1% em toda uma gama de concentrações que varia em 5 ordens de magnitude.

2.3.4 Bioquímica da Quimiotaxia

Existem modelos sobre como todo esse processo acontece ao nível interno da célula mostrada na figura 11. Quando um atrator se liga no seu receptor induz a ligação de uma proteína adaptadora CheW que controla a atividade de outra proteína CheA. Essa proteína abastece as proteínas CheY com radicais fosfatos que se liga ao motor flagelar induzindo uma rotação antihorária. O processo termina com a desfosforilação do CheY para CheZ. A metilação das proteínas intracelulares inibe o processo de sensoriamento. Para ter acesso a informações ao nível da caixa preta in vivo seria necessário acompanhar a formação dos grupos protéicos por alguma técnica óptica como luminescência seletiva ou Raman [11].

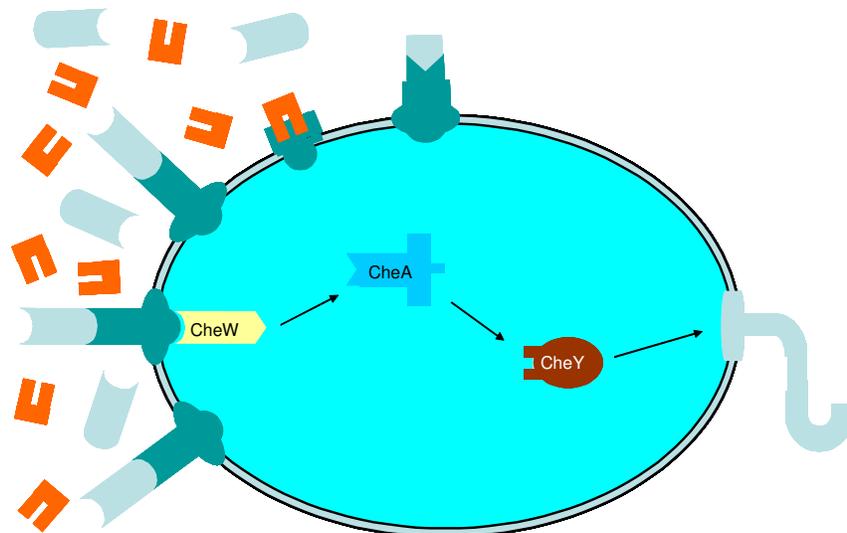


Figura 11. Esquema proposto para funcionamento interno da quimiotaxia de bactérias

2.3.5 Quimiotaxia de Eucariontes

Flagelos rotatórios nunca foram encontrados em eucariontes. Estes microorganismos usam diferentes tipos de flagelos e cílios para swimming. Quando as projeções da superfície da célula usadas como ‘remos’ flexíveis são pequenas e numerosas, como no paramécio, são chamadas de cílio, quando elas são longas e poucas como no espermatozóide, são chamadas de flagelo. Apesar da mesma terminologia os flagelos da bactéria diferem dos flagelos eucarióticos. Os flagelos e cílios eucarióticos têm uma estrutura complexa envolvendo um grupo em torno de dez filamentos longos e paralelos que deslizam um em relação ao outro e se retorcem de maneira coordenada, todos envoltos por uma extensão da membrana plasmática da célula [7]. Os movimentos dos eucariontes pode ser mais complexo do que o movimento dos procariontes, mas se admite que o processo de quimiotaxia dos mesmos seja muito semelhante ao dos procariontes.

2.3.6 Hidrodinâmica microscópica: baixos números de Reynolds

Microorganismos vivem imersos em fluidos e dependem da hidrodinâmica tanto para sua impulsão quanto para a manutenção do seu movimento. Mas a hidrodinâmica do meio microscópico em que vivem, denominada microhidrodinâmica, é a hidrodinâmica no regime de baixos números de Reynolds em que a energia cinética se torna desprezível.

O número de Reynolds é definido como $Re = \frac{\rho l v}{\mu}$, onde l é uma dimensão típica do

corpo na presença de um fluido com velocidade v . A viscosidade cinemática é definida

por $\nu = \mu/\rho$, de modo que $Re = \frac{l v}{\nu}$. Para a água $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$. Analisando a

dimensão desse número percebemos que

$[Re] = \frac{M}{L^3} LV \frac{LV}{F} = \frac{MV^2}{FL} = \frac{\text{energia cinética}}{\text{trabalho da viscosidade}}$, significando que a energia cinética

é desprezível em números de Reynolds muito pequenos. Notando que μ^2/ρ tem dimensão de força e usando os números para água, $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$, $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ percebemos que o valor da força que aparece em um corpo com número de Reynolds igual a 1 será $F =$

$(\mu^2/\rho) = 10^{-4}$ dynas = 10^{-9} N. Tratam-se de força muito pequenas, embora maiores do que as da pinça óptica, que só interessam para objetos muito pequenos. O número de Reynolds para um microorganismo com $L = 10 \mu\text{m}$, $v = 100 \mu\text{m/s}$ na água é de 10^{-3} .

Purcell [12] apresenta um exemplo interessante sobre a não relevância da energia cinética para um microorganismo com dimensões de microns se movendo na água com $30 \mu\text{m/s}$. Para o movimento é necessário uma força constante. Daí ele se faz a pergunta: em quanto tempo e que distância esse corpo pára após desligar essa força? Para estimar essa distância podemos supor válida a lei de Stokes para esferas $F = 6\pi\mu a v$, onde a é o raio da partícula. Nesse caso é

fácil integrar a equação de Newton obtendo $v = v_0 e^{-t/\tau}$ com $\tau = \frac{2a^2 \rho_{\text{corpo}}}{9\nu \rho_{H_2O}}$,

supondo a densidade do microorganismo igual à da água e um raio de $10 \mu\text{m}$, ele pára em $20 \mu\text{s}$, e $0,2 \mu\text{s}$ para um raio de $1 \mu\text{m}$. Integrando a velocidade nesse intervalo de tempo percebemos que ele percorre a distância de 6 \AA para o raio de $10 \mu\text{m}$ e $0,06 \text{ \AA}$ para o raio de $1 \mu\text{m}$. Em outras palavras, pára instaneamente. Não havia qualquer energia cinética armazenada. Para baixos números de Reynolds as forças estão sempre em equilíbrio, i.e., $F_{\text{externa}} = F_{\text{viscosa}}$. Trata-se do mundo pré-Galileano no qual só há movimento na presença de forças.

A microhidrodinâmica foi uma área aparentemente ignorada por muito tempo, mesmo após todo o desenvolvimento da aviação, mísseis teleguiados etc, conforme testemunho de Purcell [12]: *“Now, I’m going to talk about a world which, as physicists, we almost never think about. The physicist hears about viscosity in high school when he’s repeating Millikan’s oil drop experiment¹ and he never hears about it again, at least not in what I teach. And Reynold’s number, of course, is something for the engineers. And the low Reynolds number regime most engineers aren’t even interested in – except possibly chemical engineers, in connection with fluidized beds, a fascinating topic I heard about from a chemical engineering friend at MIT. But I want to take you into the world of very*

¹ Desconfio que o autor queria se referir à graduação e não high school. No ensino médio aqui no Brasil sequer se ensina as equações de Bernoulli, e jamais se demonstraria a experiência de Millikan.

low Reynolds number – a world which is inhabited by the overwhelming majority of the organisms in this room. This world is quite different from the one that we developed our intuitions in.”

Esse quadro entretanto mudou drasticamente na última década, não apenas porque a mundo biológico microscópico se tornou mais importante quanto porque a diminuição dos dispositivos eletromecânicos leva naturalmente ao regime de baixos números de Reynolds. Prova disso é que a palavra microfluidica está se tornando parte do vocabulário comum. No nosso caso, lidando com partículas capturadas pelas pinças ópticas em fluidos, se torna impossível entender completamente os problemas sem o uso da hidrodinâmica em baixo números de Reynolds. Muito menos se pretendemos estudar forças em microorganismos. Isso indica que mesmo físicos, interessados nos aspectos ópticos da pinça óptica e não na hidrodinâmica, serão obrigados a dedicar um esforço razoável para lidar com problemas de hidrodinâmica em baixos números de Reynolds.

2.4 Leishmania Amazonensis

Leishmania é um protozoário da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae. Esses parasitas, assim como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* tem como características principais a presença de um cinetoplasto, formas evolutivas adaptadas ao microambiente celular e/ou humoral e invertebrados como vetores de transmissão. Todos são responsáveis por parasitoses com altos índices de incidência em várias regiões do mundo. Doença de Chagas, leishmaniose e tripanossomíase africana afetam cerca de trinta milhões de pessoas [13].

O parasita *Leishmania* tem um ciclo de vida que envolve dois hospedeiros esquematizado na figura 12, e duas formas, promastigota e amastigota.

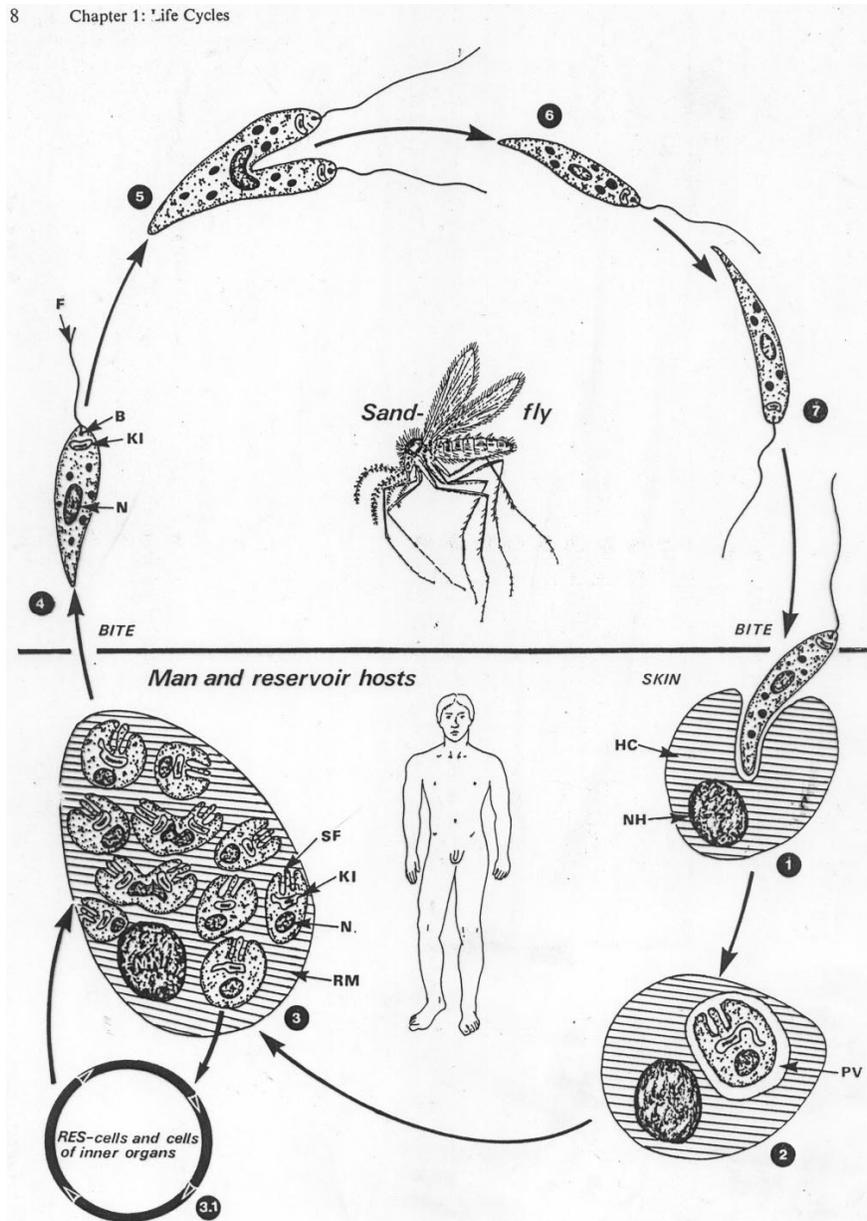


Figura 12. ciclo evolutivo da *Leishmania*

A forma promastigota é flagelar, móvel, tem cerca de 30 μm de extensão até a ponta final do flagelo. As fotos da figura 13 mostram esse parasita na forma promastigota capturado na pinça óptica do nosso grupo. Essa forma pode ser cultivada *in vitro* utilizando-se meios de cultura semi-sintéticos, descritos posteriormente. Na forma amastigota ele perde o flagelo e a mobilidade. Os amastigotas são menores em tamanho (cerca de 10 μm de diâmetro), ovóides, imóveis e com flagelo muito pequeno e intracelular.

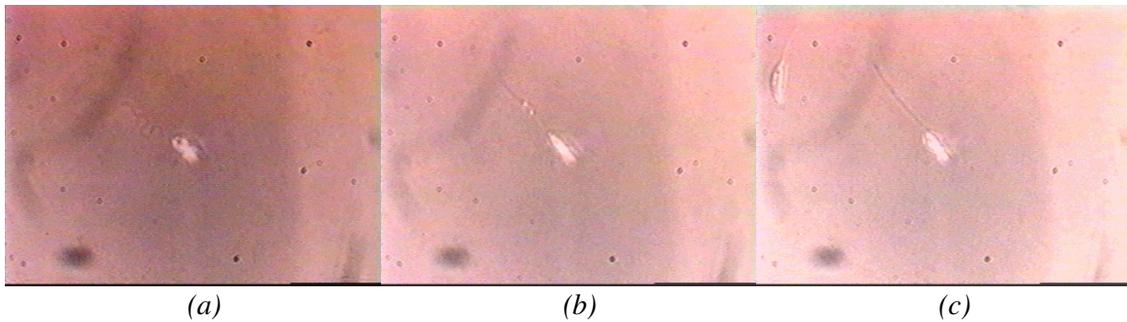


Figura 13. Promastigota de *Leishmania Amazonensis* capturado na pinça óptica do IFGW-UNICAMP tentando escapar dobrando seu flagelo (a e b) e expelindo-o repentinamente (c).

Um dos hospedeiros do ciclo da *Leishmania* é um inseto. Agentes responsáveis pela disseminação de uma doença aos humanos são denominados por VETOR da referida doença. No caso em questão, o vetor da doença é um díptero da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (figura 14). Essa família se divide em dois gêneros:

- Phlebotomus, prevalente na África, Europa e Ásia
- Lutzomyia, prevalente nas Américas.

As fêmeas necessitam de sangue para completarem o ciclo reprodutivo, são hematófagas, e costumam exercer a hematofagia no período noturno [14, 15] . Elas se contaminam ao ingerir macrófagos do hospedeiro infectado com formas amastigotas do parasita.



Figura 14. Inseto causador da leishmaniose.

No Brasil, espécies do gênero *Lutzomyia* estão presentes em todas as regiões do país, onde recebem nomes populares, tais como, “cangalha”, “mosquito-palha”, “birigui”

e “tatuíra”. Estes insetos são morfologicamente menores do que os mosquitos comuns, apresentam-se muito pilosos e tem coloração clara. Abaixo está representado a distribuição geográfica da leishmaniose no mundo.

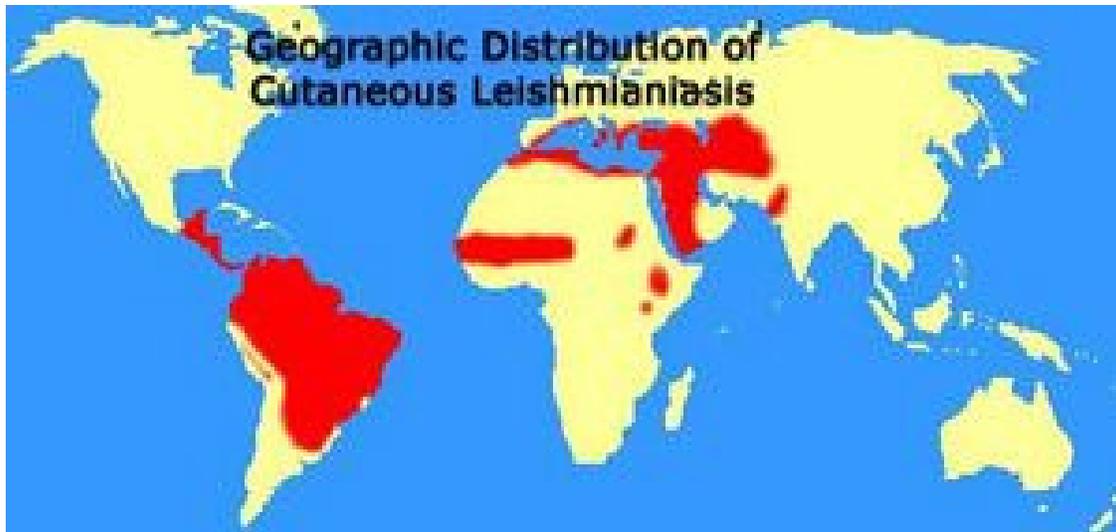


Figura 15. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea.

A *Leishmania* vive no tubo digestivo do vetor na forma promastigota ligada às microvilosidades, onde também proliferam. Os mecanismos moleculares de ligação dos promastigotas ao intestino do inseto não são bem conhecidos. Esse parasita não causa maiores danos ao inseto hospedeiro. Quando o inseto pica o segundo hospedeiro, um vertebrado, no caso da leishmaniose, roedores, gambá, tamanduá, tatu, macaco, cachorros e seres humanos, ele inocula os promastigotas da *Leishmania* ressuspensos na sua saliva. No interior do corpo do hospedeiro vertebrado os parasitas procuram se infiltrar nos macrófagos. Nesse momento a quimiotaxia aumenta a eficiência do processo infeccioso. Para adesão com os macrófagos utilizam vários receptores de membrana, como CR1, CD35, CR3 e receptores de manose-fucose e fibronectina. Principalmente o rearranjo do citoesqueleto do macrófago e o recrutamento de mais receptores de sua membrana para a região próxima do contato com o parasita causam a emissão de pseudópodes e a fagocitose.

Dentro da célula dos macrófagos ocorre a diferenciação para a forma amastigota. Os detalhes sobre essa transição/transformação da forma promastigota para amastigota

não são bem conhecidos. Há evidências que promastigotas são sensíveis às mudanças ambientais. As mudanças microambientais sofridas pelos promastigotas são drásticas. A temperatura do tubo digestivo do flebotomíneo fica em torno de 26°C e o pH é de 7,2 enquanto o ambiente intracelular dos macrófagos de mamíferos tem temperaturas entre 35 a 37°C e pH de 5. No interior dos macrófagos eles vivem em regiões chamadas vacúolos parasitoforos, fechadas por uma membrana. É no interior dos macrófagos que eles se multiplicam fortemente, destruindo a célula na sua liberação, (lisando a célula) e reinfectando outros macrófagos em volta. Nesse momento a doença se manifesta no hospedeiro.

Dependendo da espécie de *Leishmania*, se observa tropismo por macrófagos de diferentes tecidos, ocasionando diferentes patologias. A *L. amazonensis*, parasita que usaremos nesse trabalho, provoca lesões cutâneas simples mostrada na Figura 16. Essa forma cutânea tende a desaparecer com o tempo mesmo sem qualquer tratamento.

<http://www.crorj.org.br/biosseguranca/Guia%20de%20Vigilancia%20Epidemiologica.pdf>



Figura 16. Lesão cutânea simples

Em baixa porcentagem de indivíduos infectados há evolução para a leishmaniose cutânea difusa, mostrada na Figura 17a, na qual o parasita migra por vasos linfáticos disseminadamente para todo corpo, provocando o aparecimento de lesões por toda a pele e formando metástases[14, 16]. É comum também o aparecimento de lesões não-ulcerosas com focos necróticos e granulomas, principalmente no rosto e membros, mostrado na figura 17b.



Figura 17. (a) Lesão cutânea difusa

(b) Leishmaniose mucosa

Finalmente, ela pode se manifestar na forma de Leishmaniose visceral, mostrada na figura 18.



Figura 18. Leishmaniose visceral. Áreas marcadas com caneta azul estão aumentadas.

É também conhecida como Calazar, Esplenomegalia Tropical, Febre Dundun, dentre outras denominações menos conhecidas. É uma doença crônica sistêmica, caracterizada por febre de longa duração e outras manifestações, e, quando não tratada, evolui para óbito, em 1 ou 2 anos após o aparecimento dos sintomas. Não há vacinas e a

quimioterapia, utilizada há mais de quarenta anos para todos os tipos da doença, não é totalmente efetiva, apresenta efeitos colaterais sérios e casos de resistência [12].

Cultura e manipulação da *Leishmania amazonensis* na forma promastigota:

A forma promastigota de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/M2269) utilizada em nosso trabalho é coletada do material de lesões cutâneas de camundongos de linhagem susceptível e cultivada em meio RPMI 1640, complementado com antibiótico gentamicina, que tem a função de impedir a proliferação de bactérias e fungos, e soro fetal bovino (10%), que fornece compostos como proteínas, hormônios e fatores de crescimento, na temperatura de 26°C em estufa. O meio RPMI-1640 foi desenvolvido por Moore e cols. (1969) no Roswell Park Memorial Institute e é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular que são mostrados na figura 19.

Para a retirada dos amastigotas seguimos o seguinte protocolo:

1. Coloca-se 15 ml de salina estéril em um tubo de centrifuga também estéril.
2. Adiciona-se antibiótico (gentamicina), cerca de 100ml.
3. Escolhe-se um camundongo, que tenha sido infectado há muito tempo e esteja com a pata bem grande.
4. A seguir, fora da capela de fluxo laminar, lava-se o camundongo com álcool 70% e corta-se a pata infectada.
5. Dentro do fluxo, em um papel de alumínio retira-se a casca da pata com infecção secundária peles e dedos. Transfere-se o que sobrou para uma placa estéril, adiciona-se a solução salina e raspa-se a pata com bisturi estéril. Filtra-se a solução salina com uma gaze estéril no tubo de centrifuga. Contam-se as células na câmara de Neubauer. Dilui-se 20 µl de amastigotas em 980 µl de solução salina.
6. Finalmente, coloca-se 5 ml de meio de cultura em uma garrafinha estéril e acrescenta-se 300 µl de amastigotas. Coloca-se essa garrafinha em uma estufa a 26 a 28°C. A diferenciação em promastigotas ocorrem entre 2 a 3 dias.

AMINOÁCIDOS		mg/L	
L-Arginina HCl	200,000		
L-Asparagina	50,000		
L-Ácido Aspártico	20,000		
L-Cistina 2HCl	65,150		
L-Ácido Glutâmico	20,000		
L-Glutamina	300,000		
Glicina	10,000		
L-Histidina	15,000		
L-Hidroxiprolina	20,000		
L-Isoleucina	50,000		
L-Leucina	50,000		
L-Lisina HCl	40,000		
L-metionina	15,000		
L-Fenilalanina	15,000		
L-Prolina	20,000		
L-Serina	30,000		
L-Treonina	20,000		
L-Triptofano	5,000		
L-Tirosina 2Na·2H ₂ O	28,830		
L-Valina	20,000		
SAIS INORGÂNICOS			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100,000		
KCl	400,000		
MgSO ₄ (anidro)	48,840		
		NaCl	6.000,000
		Na ₂ HPO ₄ (anidro)	800,000
VITAMINAS			
		d-Biotina	0,200
		D-Ca Pantotenato	0,250
		Cloreto de Colina	3,000
		Ácido Fólico	1,000
		Mio-Inositol	35,000
		Niacinamida	1,000
		Piridoxina HCl	1,000
		Riboflavina	0,200
		Tiamina HCl	1,000
		Vitamina B12	0,005
OUTROS COMPONENTES			
		D-glicose	2.000,000
		Ácido para-Aminoenzóico (PABA)	1,000
		Glutaciona (reduzida)	1,000
		Vermelho de fenol (sódio)	5,300
		NaHCO ₃	2.000,000
		HEPES	5,950

Figura 19. Composição do meio de cultura RPMI 1640 usado neste trabalho [17].

Isso foi realizado na biologia sobre orientação da Prof. Dra. Selma Giorgio do departamento de parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Foram respeitadas todas as normas de biossegurança para a manipulação e descarte do material biológico. Tais como:

- Uso de roupas protetoras de laboratório (jalecos) .
- Uso de luvas sempre que manuseado o material biológico. Luvas devem ser usadas em todos os procedimentos que envolverem o contato direto da pele com toxinas, sangue, materiais infecciosos ou animais infectados. Anéis ou outros adereços de mão que interferem com o uso da luva devem ser retirados. As luvas devem ser removidas com cuidado. Trocar de luvas ao trocar de material.

Experiências anteriores do grupo mostraram que, sem cuidados com a cultura, o parasita se torna enfraquecido e incapaz de gerar impulsos fortes o suficiente para uma boa medida da força. Trata-se de dominar um conhecimento de outra área que não a física sem o qual esta dissertação não poderia evoluir.

2.5 Estudos prévios

Quimiotaxia:

Fazendo um levantamento bibliográfico usando a palavra “chemotaxis” na base Web-of-science, constatamos que já foram publicados 15.077 trabalhos desde 1946 até hoje sobre quimiotaxia. O primeiro deles foi *McCutcheon M.*, “*Chemotaxis in Leukocytes*”, *Physiological Reviews* 26 (3): 319-336 (1946) que foi citado 151 vezes. Já o segundo trabalho publicado no assunto, *Bonner Jt.*, “*Evidence For The Formation Of Cell Aggregates By Chemotaxis In The Development Of The Slime Mold Dictyostelium Discoideum*”, *Journal Of Experimental Zoology* 106 (1): 1-26 1947 foi citado 696 vezes. Os 10 trabalhos mais citados de quimiotaxia em geral são:

1. Zigmond SH, Hirsch JG, “*Leukocyte Locomotion and Chemotaxis - New Methods for Evaluation and Demonstration of a Cell-Derived Chemotactic Factor*”, *Journal of Experimental Medicine* **137** (2): 387-410, 1973, citado 1780 vezes.
2. Nelson RD, Quie PG, Simmons RL, “*Chemotaxis under Agarose - New and Simple Method for Measuring Chemotaxis and Spontaneous Migration of Human Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes*”, *Journal of Immunology* **115** (6): 1650-1656 (1975), citado 1151 vezes.
3. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, et al., “*Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth-Factor Signal-Transduction*”, *Science* **270** (5234): 296-299 (1995), citado 1098 vezes.

4. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al., “*Interleukin-8 as a Macrophage-Derived Mediator of Angiogenesis*”, Science **258** (5089): 1798-1801 (1992), citado 1017 vezes.
5. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al., “*The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*”, NATURE **382** (6594): 829-833 (1996), citado 1004 vezes.
6. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al., “*Transforming Growth-Factor Type-Beta Induces Monocyte Chemotaxis And Growth-Factor Production*”, PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84** (16): 5788-5792 (1987), citado 968 vezes.
7. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al., “*Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*”, Nature **406** (6799): 959-964 (2000), citado 948 vezes.
8. Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ, “*A 48-Well Micro Chemotaxis Assembly for Rapid and Accurate Measurement of Leukocyte Migration*”, Journal of Immunological Methods **33** (3): 239-247 (1980), citado 917 vezes.
9. Murphy PM, “*The Molecular-Biology Of Leukocyte Chemoattractant Receptors*”, Annual Review of Immunology **12**: 593-633 (1994), citado 819 vezes.
10. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al., “*Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*”, NATURE **382** (6592): 635-638 (1996), citado 810 vezes.

Dos títulos dos trabalhos dessa lista se percebe que os trabalhos mais citados se referem à quimiotaxia típica de sistema imune, lenta, com movimentação tipo “crawling”, responsável pelos nossos processos de defesa. Entretanto, se a defesa é lenta, o ataque é rápido, com parasitas pequenos e ágeis. Dos mais de 15.000 trabalhos sobre quimiotaxia, apenas 1067 são de quimiotaxia de bactérias, sendo o primeiro Adler J, “*Chemotaxis in bacteria*”, Science **153** (3737): 708& (1966), que foi citado 392 vezes. Os trabalhos a

seguir definiram o conhecimento básico dessa área conforme descrição das seções anteriores.

1. Adler J, “*Chemotaxis in Bacteria*”, Annual Review of Biochemistry **44**: 341-356 (1975), citado 320 vezes.
2. Larsen SH, Adler J, Gargus JJ, et al., “*Chemomechanical coupling without ATP - source of energy for motility and chemotaxis in bacteria*”, PNAS **71** (4): 1239-1243 (1974), citado 228 vezes.
3. Bilwes AM, Alex LA, Crane BR, et al., “*Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase*”, CELL **96** (1): 131-141 (1999), citado 189 vezes.
4. Blair DF., “*How bacteria sense and swim*”, Annual Review of Microbiology **49**: 489-522 (1995), citado 159 vezes.
5. Keller HU., Sorkin E., “*Studies on Chemotaxis .v. On Chemotactic Effect of Bacteria*”, International Archives of Allergy and Applied Immunology **31** (5): 505& 1967, citado 151 vezes.
6. Berg HC, “*Chemotaxis in Bacteria*”, Annual Review of Biophysics and Bioengineering: 119-136 (1975), citado 123 vezes.

Além desses trabalhos mais gerais, descrevemos a seguir os trabalhos mais fortemente relacionados ao nosso objetivo.

Bray (1983) [18], usando uma metodologia crua, foi o primeiro a obter evidências experimentais que a *Leishmania* também apresenta quimiotaxia. Mais tarde, foi desenvolvido um método para analisar respostas em *Leishmanias* [19]. Neste método, um gradiente da substância a ser analisada foi produzido dentro de um tubo capilar, o qual estava submerso em uma suspensão de promastigotas (figura 20). Depois de um período de incubação, as atrações das substâncias testadas foram medidas através da contagem dos parasitas dentro do tubo capilar. Neste estudo oito tipos diferentes de carboidratos atraíram as promastigotas. A frutose, glicose e sacarose foram identificadas como as substâncias atratoras mais fortes.

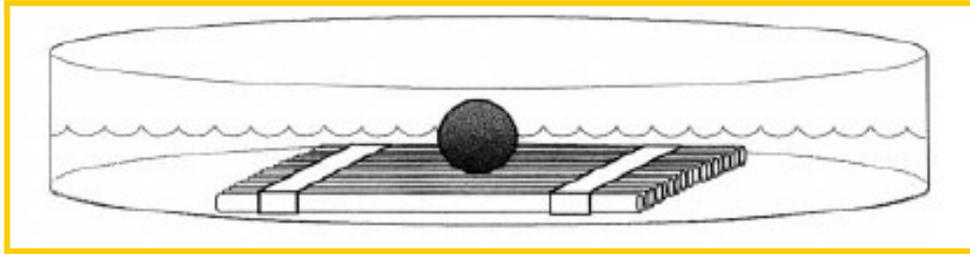


Figura 20. Esquema do método para analisar respostas em Leishmanias, com tubos capilares suspensos [18].

Leslie et al. [20] usou esta técnica de tubos capilares para observar que promastigotas migravam em direção a qualquer das substâncias por eles testadas, incluindo NaCl. Estas respostas pareceram depender somente do gradiente osmótico, que ocorre quando a célula se deslocada de um meio mais diluído (solução hipotônica) para um meio menos diluído (solução hipertônica), assim respostas táxicas apresentadas pelas promastigotas foram re-interpretadas como sendo osmotáticas (figura 21).

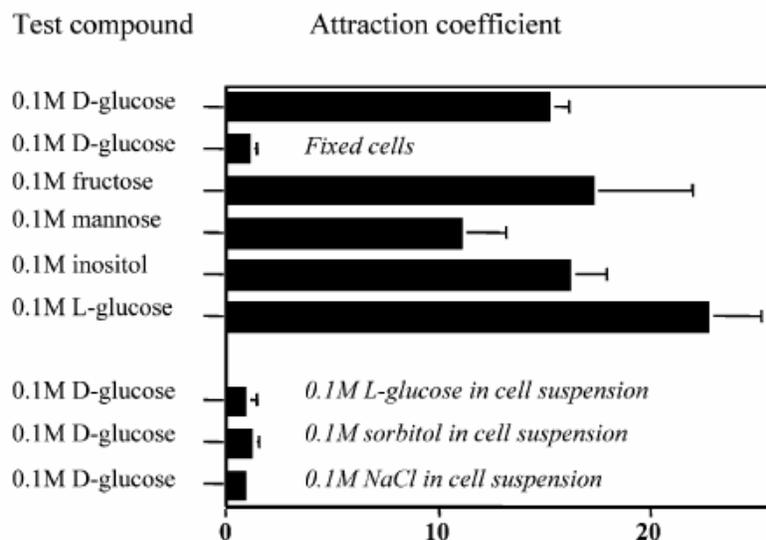


Figura 21. A esquerda encontram-se componentes testados (0,1 M) enchidos parcialmente em cada tubo capilar. A direita os coeficientes de atração com o número médio de células movendo-se dentro de cada capilar com substâncias testadas [19]

Foi descrito por Aaron M. J. Law (2005) [21] uma modificação no uso de capilares para quantificar a quimiotaxia da bactéria. Ao invés de colocar os capilares dentro de um recipiente com uma suspensão de bactérias, o fluxo passa pela extremidade

aberta do capilar que é perpendicular ao caminho do fluxo contínuo (figura 22). O fluxo da suspensão cria uma concentração constante de atraentes químicos e bactérias na parte aberta do capilar. As condições de concentração constante na região aberta do capilar simplifica o tratamento dos dados porque somente o domínio capilar necessita ser considerado na modelagem matemática. Na ausência de uma substância atratora, a bactéria nada aleatoriamente nos capilares. Se os capilares são preenchidos com substâncias atradoras, a bactéria nadará no capilar, sentindo o gradiente quimioatraente que se forma no capilar e nada quimiotaticamente para dentro do capilar. O movimento de bactérias nos capilares são aferidos pela contagem de células que se acumulam nos capilares.

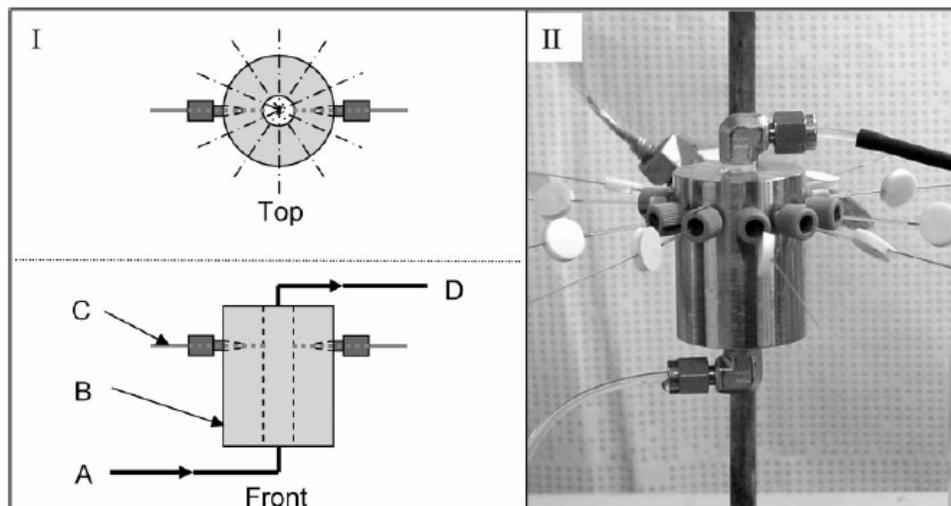


Figura 22. (I) Representa o diagrama usado por Aaron M. J. Law. (II) Mostra a fotografia do aparelho de capilares com fluxo contínuo. As bactérias suspensas são bombeadas dentro de canais(A) por meio de blocos de aço (B), além de capilares (C), por meio de uma porta de saída (D) [20].

Oliveira et al. (2006)[22] desenvolveram uma metodologia que permitiu que os mecanismos envolvidos nas respostas táticas das promastigotas de *Leishmania amazonensis* serem caracterizadas. Este método permite que as respostas quimiotáticas possam ser distinguidas das osmotáticas e evidencia que promastigotas, assim como bactérias, respondem a ambos os tipos de estímulo.

Há uma extensa literatura sobre as moléculas e os antígenos do parasita que contribuem para a infecção celular e para o controle imunológico das leishmanioses. Entretanto, os aspectos relacionados à cinética de entrada e adesão dos promastigotas, sua mobilidade e sensibilidade a estímulos externos são pouco estudados. Entre os poucos trabalhos de cinética por filmagens, realizados com *Leishmania*, estão os do grupo de Rabinovitch [23]. A cinética de fusão do vacúolo parasitoforo e o intervalo entre a fagocitose do parasita e a fusão de vacúolos contendo partículas zymosan foram analisadas em filmagens de culturas vivas. O estudo foi feito com células infectadas com a forma amastigota e não tinha como objetivo avaliar a aderência ou o processo de infecção. Para avaliar o papel do corpo axial na mobilidade de promastigotas de *L. mexicana* o grupo de LeBowitz [24], analisou a mobilidade de mutantes PFR2, que não possuem essa estrutura. Os estudos, realizados em microscopia estroboscópica em campo escuro se limitaram a medição da frequência das “batidas” flagelares. Nenhum outro parâmetro, como por exemplo, amplitude, força, elasticidade ou deformabilidade foram analisadas.

Em outros microorganismos ciliados e flagelados os parâmetros citados acima são mais bem estudados e medidas mais precisas são obtidas através do uso da pinça óptica (para detalhes sobre a metodologia e outras aplicabilidades biológicas ver o item seguinte). Por exemplo, em *Escherichia coli* ligadas a microesferas, o uso da pinça óptica possibilitou a análise de dezenas de bactérias individuais, os cálculos de velocidade e tempo de rotação, de força e de torque. Medidas das forças envolvidas na adesão da bactéria a superfícies com manose também foram possíveis usando a pinça óptica para manipulação. Os autores quantificaram e avaliaram as forças necessárias para a adesão e o desligamento da bactéria da superfície [25].

Capítulo 3

Pinça Óptica

Para o desenvolvimento da nanotecnologia se torna necessário a criação de ferramentas de medidas em escalas de valores cada vez menores. Por exemplo, forças envolvidas na escala micro/nanometros, intermoleculares, estão entre femto-pico Newtons. Como as forças das Pinças Ópticas estão nesse intervalo ela se torna uma técnica competitiva para medidas de forças nessa escala. A tabela 1 abaixo mostra as técnicas de medidas de forças modernas, da qual se percebe que apenas Pinças Ópticas e Força de Biomembranas podem chegar na escala de femto Newtons. A técnica de pinças ópticas possui outra vantagem muito significativa é que se trata de uma técnica remota de não contacto. Todas as outras são de contacto e não poderiam ser utilizadas no interior de microorganismos vivos.

Técnica de Medidas de Força	Alcance de Força
Surface Force Apparatus (SFA)[26]	10.000 – 1.000.000 pN
Atomic Force Microscopy (AFM)[27]	10 – 100.000 pN
Optical Tweezers (OT) [1]	0.01 – 200 pN
Biomembrane Force Probe (BFP) [28]	0.01 – 1.000 pN

Tabela 1 Valores típicos das técnicas de medidas de força disponíveis [29].

Neste capítulo descreveremos os princípios de funcionamento das pinças ópticas e, principalmente, desenvolvemos o modelo de óptica geométrica utilizado para medida da força realizada no capítulo 4. O deslocamento da microesfera em relação à sua posição de equilíbrio é utilizado como transdutor de força. Esse modelo teórico foi previamente desenvolvido na tese de mestrado da Adriana Fontes, para o cálculo da força óptica sobre microesferas. Apesar do modelo eletromagnético, posteriormente desenvolvido nas teses

de Doutorado da Adriana Fontes e Antônio Neves, fornecer uma descrição mais completa e correta sobre as forças ópticas, o modelo de óptica geométrica é suficientemente preciso para pequenos deslocamentos em torno da posição de equilíbrio e pode ser utilizado em medidas de força, principalmente quando bem calibrado.

3.1 Introdução à Pinça óptica.

A pressão de radiação eletromagnética foi proposta pela primeira vez por Johannes Kepler no século XVII para explicar que a cauda dos cometas apontava sempre na direção oposta à do sol [30]. James Clerk Maxwell desenvolveu a teoria eletromagnética em 1873 que explicou como uma onda eletromagnética também é capaz de transferir momento, em outras palavras, de exercer pressão de radiação [31]. Mas foi apenas na década de 1970 que Ashkin e colaboradores do AT&T Bell Laboratories iniciaram as experiências de levitação e captura de partículas através da pressão de radiação [32]. Essas experiências foram realizadas equilibrando a força da pressão de radiação de um feixe de laser contra a força gravitacional. Mais tarde utilizaram 6 feixes de laser contra-propagantes para aprisionar partículas apenas com feixes de luz laser. Em 1985-1986 Ashkin percebeu que apenas um feixe altamente focalizado era suficiente para aprisionar partículas nas três dimensões, criando a técnica hoje denominada por Pinças Ópticas, ou Optical Tweezers [33]. Desde então essa técnica tem sido utilizada para manipular vírus e bactérias, células vivas, organelas, para inserir DNA dentro de diferentes tipos de células, para conectar DNA ao silício na tentativa de construção de uma interface biomecânica e para fertilizações in vitro [34, 35]. Como ferramenta de medida a pinça óptica foi utilizada para estudar propriedades mecânicas de hemácias [36], para medir e comparar deslocamentos celulares e forças de miosinas cardíacas [37], para caracterização de motores biológicos moleculares [38] e rigidez flexural de microtubos [39], para medir o comprimento de uma molécula de DNA [40] e estudar a motilidade de espermatozóides humanos [41]. Foi utilizada também para detectar concentrações ao nível de femtomolar de antígenos [42] e permitiu a observação da ausência de travamento do movimento de rotação reversa de flagelos motores de bactérias [43].

3.2 Princípio de Funcionamento da Pinça Óptica.

Um entendimento intuitivo do princípio de funcionamento da pinça óptica pode ser obtido no contexto de raios de luz com capacidade de transferir momento da óptica geométrica. A “armadilha” óptica acontece devido a transferência de momento do fóton para o objeto capturado. Suponha um raio é desviado devido a presença de um centro espalhador na direção mostrada na figura 23. O centro espalhador percebe um impulso na direção da bissetriz do ângulo entre os raios incidente e espalhado, como se fosse um choque entre partículas.

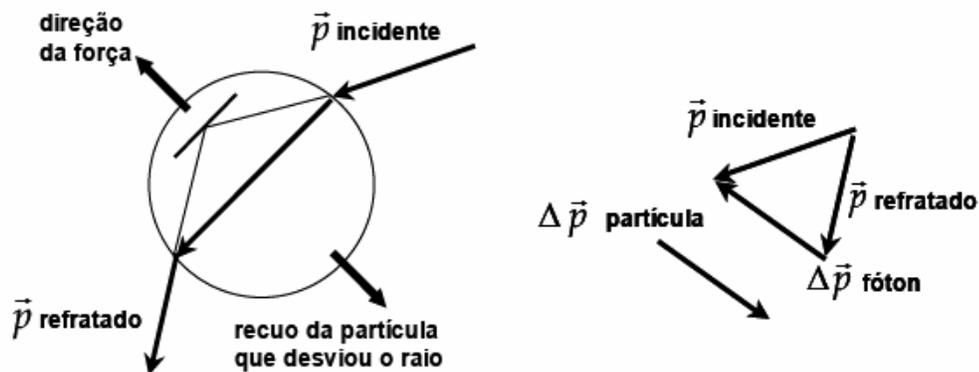


Figura 23. Choque entre fóton e centro espalhador.

Vamos analisar o desvio de raios de luz sofrendo refração em uma microesfera em diversas situações. Vamos colocar o origem das coordenadas no centro da microesfera, definir z_0 como o ponto de encontro do raio não desviado com o eixo vertical (z) de uma esfera em um plano meridional, n_1 o índice de refração da esfera e n_2 o índice de refração do meio externo. As figuras 24 e 25 mostram como o raio é desviado em quatro situações distintas, para $n_1 > n_2$, $n_1 < n_2$, $z_0 > 0$ e $z_0 < 0$. Quando $n_1 > n_2$ o raio se aproxima da normal ao entrar na partícula e se afasta da mesma ao sair e o oposto ocorre se $n_1 < n_2$.

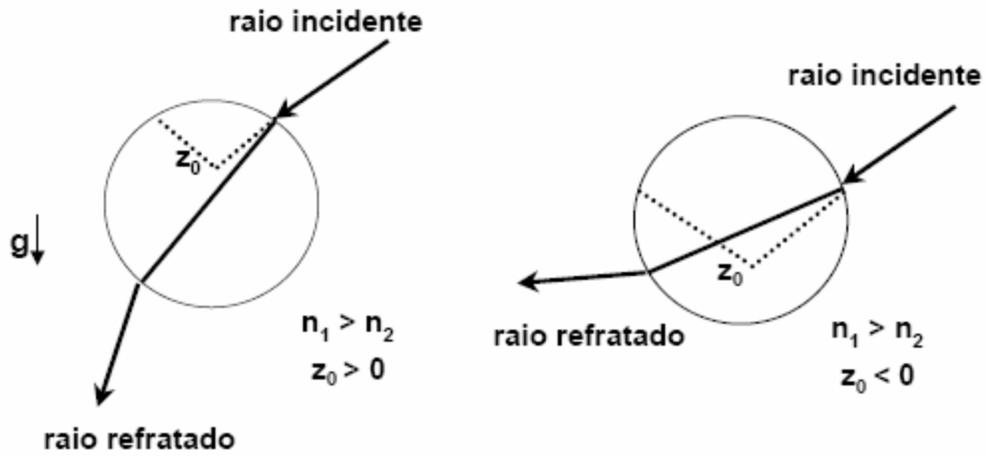


Figura 24. Trajetórias dos raios para $n_1 > n_2$.

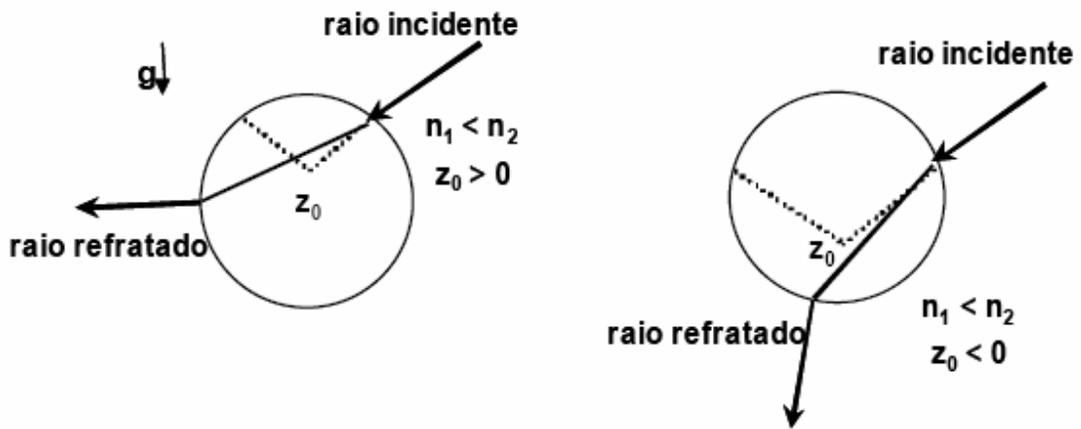


Figura 25. Trajetórias dos raios para $n_1 < n_2$.

A figura 26 mostra que a transferência de momento de dois raios simétricos no caso $n_1 > n_2$ gera uma força resultante que tende a levar o centro da esfera para o foco do laser em z_0 , em que os dois raios se encontrariam na ausência da partícula.

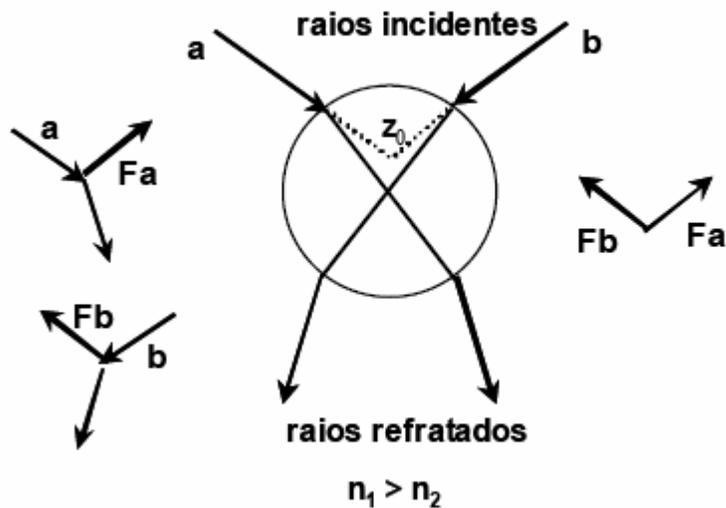


Figura 26. Forças e trajetórias de dois raios para o caso $n_1 > n_2$.

Já a figura 27 mostra que essa força resultante tende a expulsar mais ainda a partícula no caso em $n_1 < n_2$.

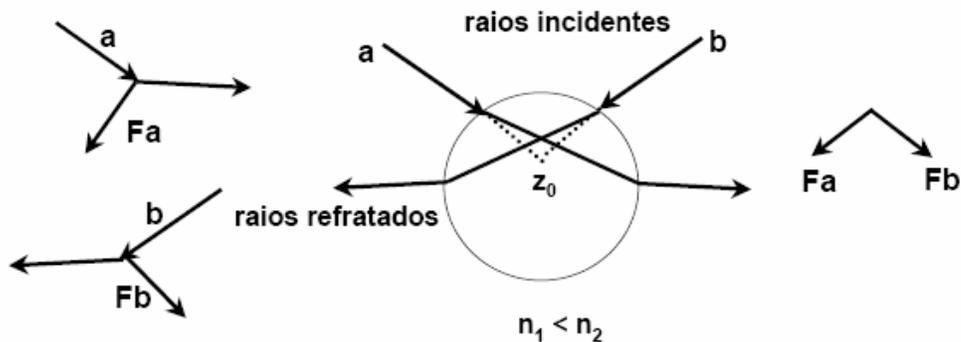


Figura 27. Forças e trajetórias de dois raios para o caso $n_1 < n_2$.

O fato de que um único feixe focalizado gera uma armadilha óptica estável em três dimensões pode ser entendido através da figura em que o foco do laser cai acima do raio no eixo z , abaixo do raio no eixo z e na lateral fora do eixo z , na qual se nota que a força resultante tende sempre a trazer o centro da partícula para o foco do laser. Esse quadro simples da óptica geométrica mostra intuitivamente como se pode construir uma

pinça óptica. Na realidade permite além disso, entender a dependência da força óptica em função de diversos parâmetros.

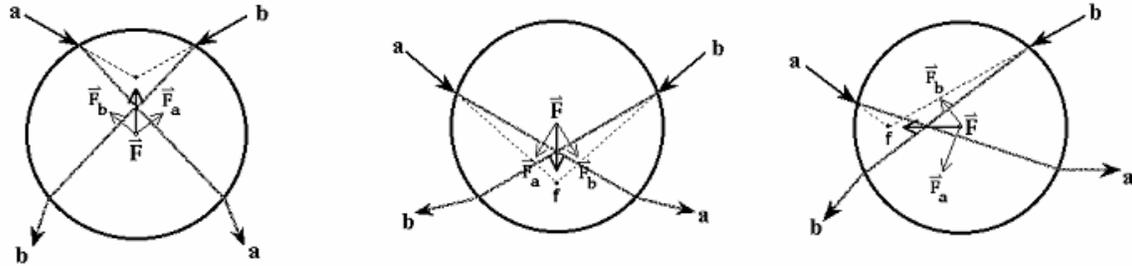


Figura 28. Dois raios simétricos a e b incidindo sobre a esfera com índice de refração $n_1 > n_2$ sendo refratados pela mesma. No processo ocorre transferência de momento dos fótons para a esfera ocasionando uma força \vec{F} sempre direcionada para a região de maior intensidade do laser (foco).

3.2.1 Ordem de grandeza da força óptica.

O fóton tem um momento muito pequeno, por isso as forças ópticas são muito pequenas e só podem movimentar partículas também muito pequenas, da ordem de micrometros. Tomamos como exemplo, um laser de 1 W de potência, totalmente absorvido por uma partícula. Temos que o momento de um fóton é então dado por:

$$p_{\text{fóton}} = \frac{h\nu}{c}$$

Então a força é dada por:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{n^\circ \text{ fótons}}{\text{tempo}} \times p_{\text{fóton}} = \frac{\text{potência}}{h\nu} \times \frac{h\nu}{c} = \frac{\text{potência}}{c}$$

$$F = \frac{1\text{W}}{3 \times 10^8 \text{ m/s}} = 3 \times 10^{-9} \text{ N}$$

Vamos considerar uma partícula cúbica de $1\mu\text{m}$ de aresta com densidade igual a da água. Nesse caso, $m = (10^3 \text{ kg/m}^3) \times (10^{-6})^3 \text{ m}^3 = 10^{-15} \text{ kg}$, e a aceleração causada pela força óptica nessa partícula será $a = F/m = 3.10^{-9} \text{ N} / 10^{-15} \text{ kg} = 3.10^6 \text{ m/s}^2 = 3.10^5 \times g$, onde g é a aceleração da gravidade. Acelerações dessa ordem permitem qualquer manipulação dessa partícula. Se a dimensão da partícula cresce para 1 mm entretanto, a

massa será de $m = 10^{-6} \text{ kg}$, e a aceleração $a = 3.10^{-2} \times g$, muito pequena para manipulações. Conclui-se, portanto, que a aceleração causada pela força do laser só é considerável para partículas microscópicas menores do que $50 \text{ }\mu\text{m}$. Para partículas macroscópicas essa aceleração é desprezível e não é possível capturar e mover uma partícula.

3.2.3 Força óptica no Regime de Rayleigh.

No limite inferior da força óptica é preciso tratar a pressão de radiação em outro regime, conhecido como regime de Rayleigh em que a dimensão da partícula é muito menor do que o comprimento de onda da radiação incidente ($d \ll \lambda$). Neste regime, os campos eletromagnéticos são uniformes através da partícula dielétrica, de forma que estas podem ser tratadas como dipolos induzidos. A força de Lorentz agindo nos dipolos induzidos pelo campo elétrico da luz é dada por [44]:

$$\vec{F}_{grad} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} \times \vec{B} \quad 0.1$$

onde \vec{p} é o momento de dipolo da partícula. Considerando $\vec{p} = \alpha \vec{E}$ obtem-se

$$\vec{F}_{grad} = \alpha \left[(\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \times \vec{B} \right] \quad 0.2$$

Utilizando a identidade vetorial $(\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} = \nabla \left(\frac{E^2}{2} \right) - \vec{E} \times \nabla \times \vec{E}$ e a equação de

Maxwell $\nabla \times \vec{E} + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = 0$ podemos escrever a equação 0.2

como $\vec{F}_{grad} = \alpha \left[\nabla \left(\frac{E^2}{2} \right) + \frac{\partial}{\partial t} (\vec{E} \times \vec{B}) \right]$ e tomando a média temporal:

$$\langle \vec{F}_{grad} \rangle = \frac{\alpha}{2} \nabla \langle E^2 \rangle = \beta \nabla I ,$$

onde $\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)$ é a polarizabilidade da partícula [45], e I a intensidade do feixe.

Ou seja, nesse caso a força é na direção do gradiente da intensidade de luz. A força será positiva se $m > 1$, ou seja, $n_1 > n_2$, e negativa no caso inverso, da mesma forma que no caso

da óptica geométrica. Desse formalismo se percebe que a força no regime de Rayleigh depende do raio da partícula ao cubo. Por isso, ao diminuir muito a dimensão da partícula capturada atinge-se um limite em que a força se torna menor do que as forças de flutuação do movimento Browniano e a partícula não pode mais ser capturada.

3.3 Parâmetros importantes na montagem de uma pinça óptica.

O primeiro parâmetro importante na montagem de uma pinça óptica é o comprimento de onda do laser utilizado. No início, Ashkin utilizou um laser de argônio de comprimento de onda de 514nm. Logo notou que estava matando os microorganismos capturados devido aos efeitos térmicos. Ou seja, o alto coeficiente de absorção de radiação no comprimento de onda visível, aumentava a absorção de luz e causava danos aos microorganismos [1]. Como a pinça óptica só utiliza a refração, pode-se perfeitamente evitar a absorção utilizando comprimentos de onda na região de transparência da maioria dos materiais biológicos. Figura 29 mostra a absorção de substâncias comumente encontradas em materiais biológicos. A região do visível envolve transições dos níveis eletrônicos das moléculas, sendo, portanto, cheia de picos de absorção. As transições dos níveis vibracionais tendem a ocorrer na região do infravermelho, acima de 2 μm . Isso deixa uma janela espectral no infravermelho próximo em que não há nem absorção devido aos níveis eletrônicos nem devido aos estados vibracionais. O laser comercial mais comum e barato nessa região é o laser de Nd:YAG, Neodímio Yttrium Aluminum Garnet, operando em 1064 nm. Por isso Ashkin trocou o laser de argônio pelo laser de Nd:YAG e demonstraram que podiam capturar microorganismos vivos por várias horas.

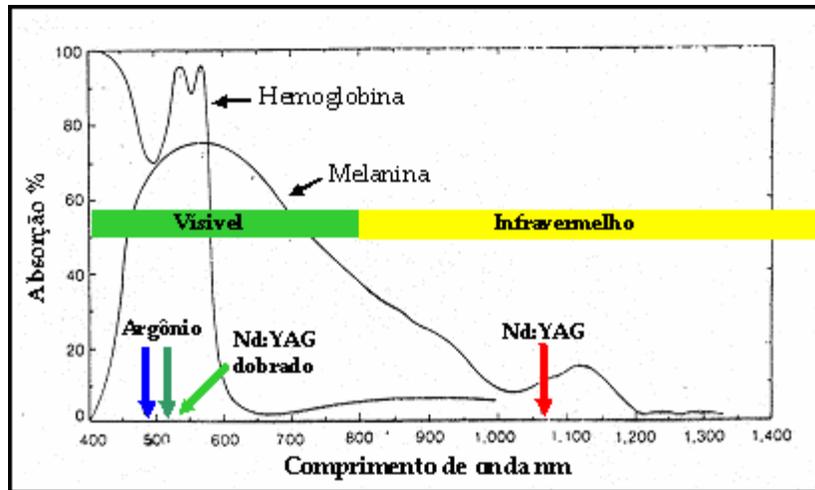


Figura 29. Notamos que a força óptica só depende da refração e não da absorção

3.3.1 Importância do telescópio

A Figura 30 mostra um esquema da montagem experimental típica de uma pinça óptica. Um feixe de laser passa por um telescópio, formado por duas lentes e é focalizado na amostra através da objetiva. Como o feixe de laser tende a ser um feixe de raios paralelos, ao incidir diretamente na objetiva, será focalizado no foco da mesma, e não no plano de visão. Isso significa que as partículas capturadas não serão visualizadas, ou seja, estarão fora de foco, como mostra a Figura 32. Para focalizar o feixe do laser no plano de visão devemos torná-lo ligeiramente divergente

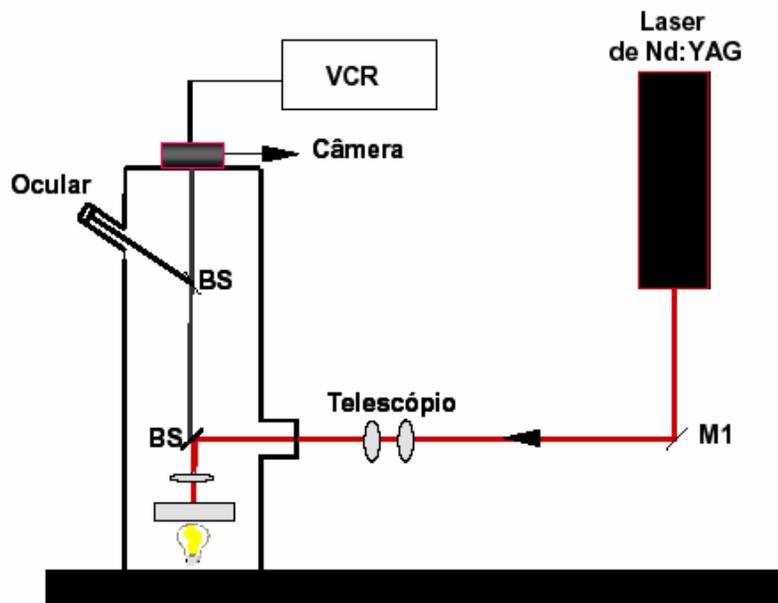


Figura 30. Sistema Experimental de Pinça Óptica .

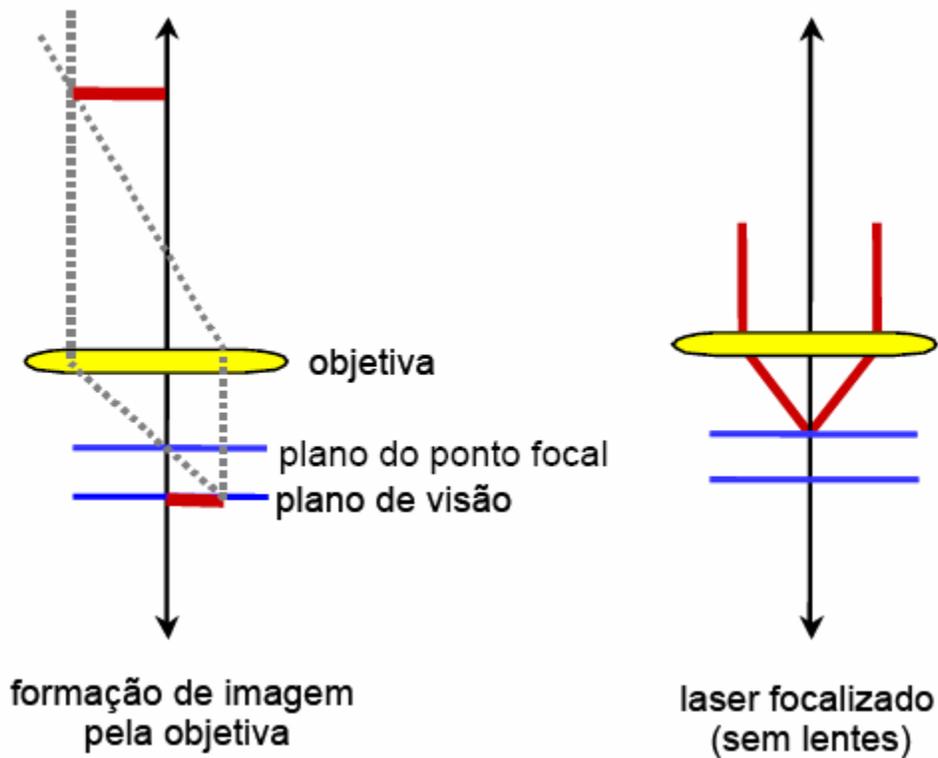


Figura 31. Plano do ponto focal e plano de visão.

Isso é feito inserindo um telescópio, um sistema de duas lentes colocadas uma no foco da outra, conforme ilustra a Figura 32. Quando aproximamos as lentes o feixe torna-se convergente e quando afastamos essas lentes o feixe torna-se divergente. As duas lentes, devem estar aproximadamente uma no foco da outra para possibilitar que capturemos no plano de visão do microscópio. A mudança da posição de captura é feita ajustando a distância entre as duas lentes.

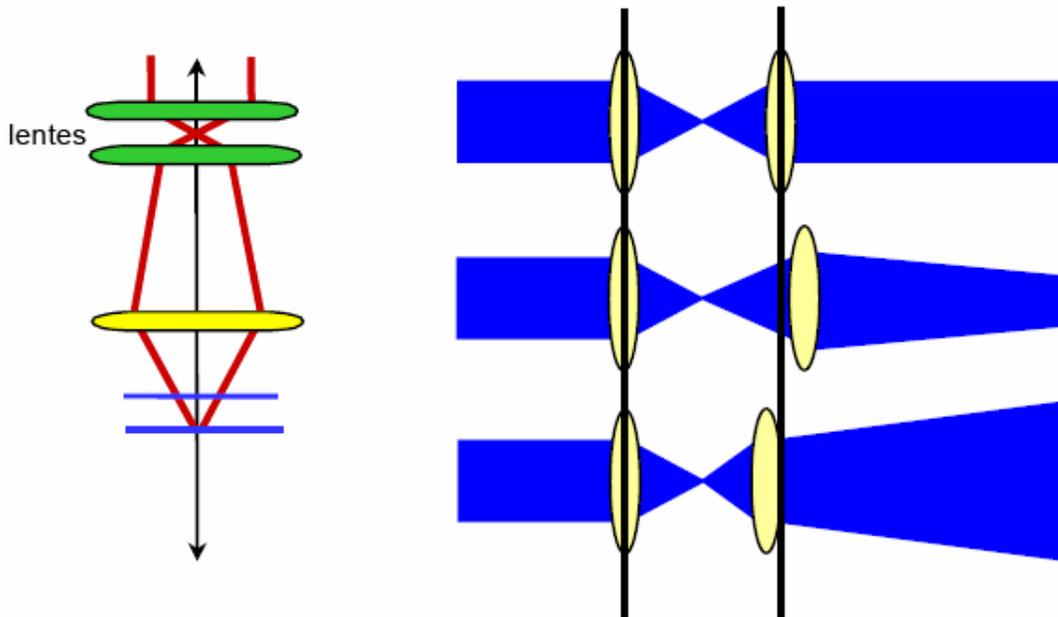


Figura 32. Importância do telescópio.

3.3.2 Importância da Abertura Numérica e Falso Trap

Um outro aspecto importante na montagem experimental da pinça óptica é a abertura numérica da objetiva. A abertura numérica é definida como o ângulo do cone de luz na saída na objetiva $N.A. = r/f$, como mostra a figura 33. De acordo com a lei do seno de Abbe, $r/f = \text{sen}\theta$ onde θ é a abertura angular de um cone de luz que atravessa uma objetiva. Se não é o ar que está entre a mesma e a lâmina, a abertura numérica é então definida por $N.A. = n \text{sen}\theta$, onde n é o índice de refração do meio.

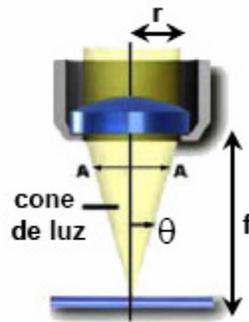


Figura 33. Definição de abertura numérica.

Uma pinça óptica deve ser capaz de capturar um objeto em três dimensões, o que só ocorre se os raios de luz têm componentes nessas 3 direções. Mas é possível se criar um FALSO TRAP, capaz de gerar forças em duas dimensões apenas com qualquer feixe de luz. Considere apenas um raio incidindo em uma esfera. Se ele estiver fora do centro será desviado na forma mostrada na figura 34 com força resultante fazendo coincidir o eixo da esfera com a trajetória do raio, mas sem qualquer força restauradora ao longo do raio. Na realidade, a força devido as reflexões empurrariam a partícula eternamente. Por isso Ashkin utilizava o sistema com seis feixes contrapropagantes mostrado no lado direito. Sendo contrapropagantes as forças de reflexão se cancelam. Se o movimento da partícula ao longo do raio, no eixo z, é impossível, devido a presença de uma superfície, por exemplo, ela será transportada facilmente no plano xy. Esse é o caso do FALSO TRAP, a partícula está capturada, mas apenas em duas dimensões, e não três. FALSO TRAP não permite levantar uma partícula e muito menos capturar microorganismos vivos que escapariam facilmente pela dimensão em que não existe força.

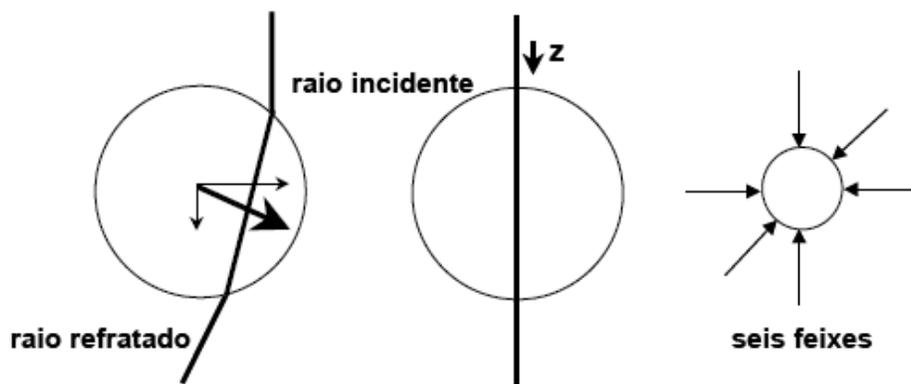


Figura 34. Configuração de um falso trap.

Para aumentar a força na direção z é preciso inclinar o máximo possível os raios, conforme mostrado na figura 35. Note que a força vertical dos dois raios azuis, mais inclinados, é maior do que a força vertical dos dois raios vermelhos, menos inclinados.

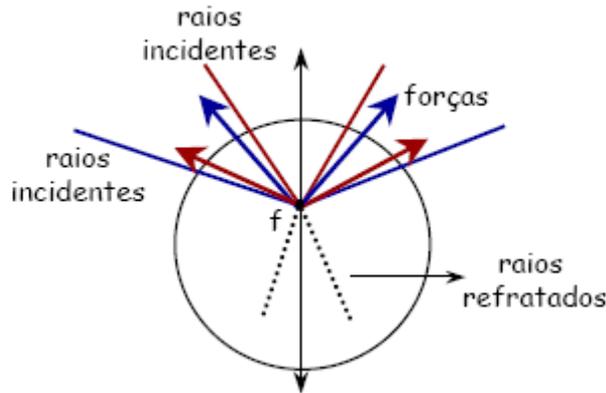


Figura 35. Falso trap e abertura numérica.

Esse fato ilustra a importância de usar feixes com grandes aberturas numéricas para obter uma armadilha óptica tridimensional, em lugar de um FALSO TRAP. Num cone de luz são os raios mais inclinados, com maiores componentes horizontais, que geram as forças na direção vertical. A parte central do cone, quase toda vertical, gera forças restauradoras na direção horizontal. Quanto maior a abertura numérica, maior a força na direção vertical às custas de uma força menor na direção horizontal. Armadilhas em 3 dimensões só são obtidas com aberturas numéricas da ordem de 1, tipicamente com aumentos acima de 60X. Qualquer movimento horizontal observado com objetivas de 40X ou menos são, na realidade, de falso trap.

Quanto maior for a abertura numérica, maior é o ângulo de abertura do cone de luz formado. Para que isso ocorra é necessário que o feixe de luz preencha toda a objetiva, pois se isso não ocorrer é como se tivéssemos uma objetiva de abertura numérica pequena onde não poderíamos observar as partículas capturadas figura 36.

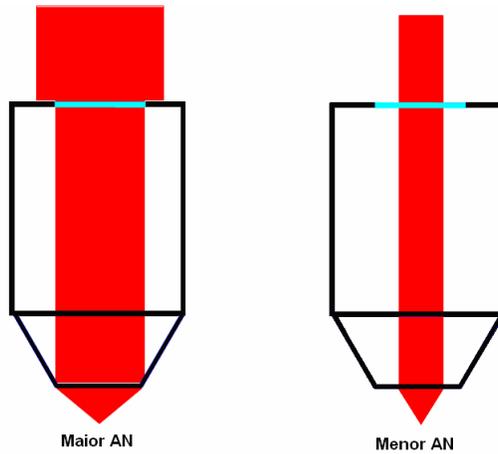


Figura 36. Importância do preenchimento de toda a objetiva.

3.4 Teoria Óptica Geométrica

Feito o estudo intuitivo de como a pinça óptica captura as partículas, devemos calcular a força óptica na aproximação geométrica. Isso foi realizado levando em consideração todas as refração e reflexões que um raio de luz exerce sobre uma esfera (figura 37).

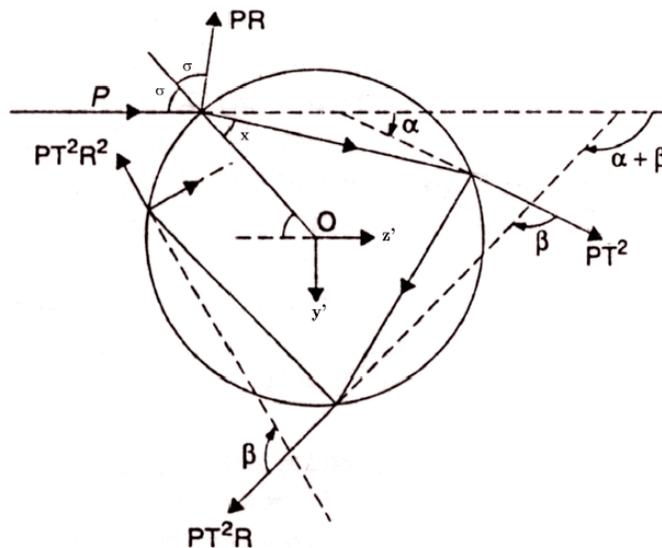


Figura 37. Reflexões e refrações de um raio dentro de uma esfera. Origem das coordenadas no centro da esfera e o eixo z' está na direção do raio incidente.

onde P é a potência devido a um único raio com momento incidente igual a $\frac{n_1 P}{c}$ e n_1 é o índice de refração do meio.

Após esse raio incidir na esfera com um ângulo de σ , ele sofre diversas refrações e reflexões. E a porção transmitida interage com a esfera, dando origem a uma série de raios espalhados que saem da esfera com diversas potências sucessivamente menores, $PR, PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n$. Sendo R e T os coeficientes de reflexão e transmissão de Fresnel. Os ângulos dos raios espalhados são $\pi + 2\sigma, \alpha, \alpha + \beta, \dots, \alpha + n\beta$.

As forças de um único raio sobre a esfera nas coordenadas z' e y' são:

$$F_{y'} = \frac{n_1 P}{c} \left[-R \sin(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right]$$

$$F_{z'} = \frac{n_1 P}{c} \left[1 - R \cos(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right]$$

Para realizar os somatórios, as forças foram descritas no plano complexo através da transformação $F_c = F_{z'} + iF_{y'}$ e assim as somas se tornam séries geométricas e temos:

$$F_c = \frac{n_1 P}{c} \left(1 + R \exp(2\sigma i) - T^2 \exp(i\alpha) \left[\frac{1}{1 - R \exp(i\beta)} \right] \right)$$

Por simples geometria (figura 36) têm-se:

$$\alpha = 2(\sigma - x)$$

$$\beta = \pi - 2x$$

$$\sin x = n \sin \sigma$$

O ângulo de incidência varia para cada raio, então é necessário trocar a origem e o sistema de coordenadas para uma posição fixa que escolhemos ser o foco do feixe de laser, figura 38. Escrevendo o ângulo de incidência σ em função dos vetores $\vec{\delta}$ e \vec{r} temos que a expressão final de força dependerá somente do deslocamento \vec{r} vetor (variável que conecta o foco do feixe ao centro da esfera), o ângulo de convergência do feixe (abertura numérica), o raio da esfera, a potência do laser (que consideramos ser igual para cada raio) e o índice de refração relativo, todos parâmetros conhecidos. Usando a lei dos cossenos temos que,

$$\sigma = \arccos \left[1 + d^2 - (r/a)^2 / 2d \right],$$

onde $d = \|\delta\|$, $|\vec{\delta} - \vec{r}| = a$ e o deslocamento $\vec{r} = (r \sin \gamma, 0, r \cos \gamma)$.

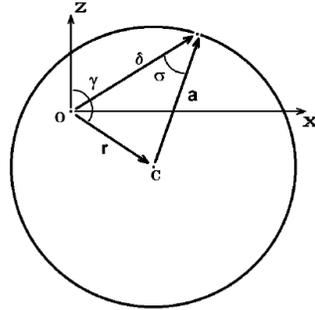


Figura 38. Troca do sistema de coordenadas e definição de ângulos e vetores.

A força de todo o feixe cônico do laser é obtido pela integração $F = \int \vec{F} dA / \int dA$. Obteve-se o diferencial de integração através de $r = f \operatorname{tg} \theta$, de modo que $r dr d\varphi = f^2 \sec^2 \theta \operatorname{tg} \theta d\theta d\varphi$ conforme Ashkin havia proposto. Aqui corrigimos isso usando a condição seno de Abbe para a qual $r = f \operatorname{sen} \theta$ e $r dr d\varphi = f^2 \operatorname{sen} \theta \cos \theta d\theta d\varphi$. A figura 39 mostra a geometria de integração do feixe de laser incidente. A expressão da força óptica e seus valores foram obtidos usando *Mathematica* (Apêndice A).

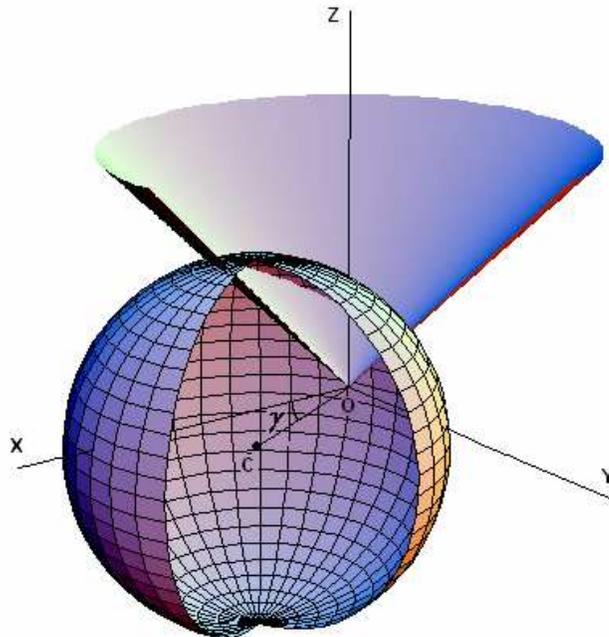


Figura 39. Geometria de integração do feixe de laser incidente.

3.5 Teoria Hidrodinâmica e Calibração da Pinça Óptica

Para garantir que a teoria da óptica geométrica funcionava bem foi realizada uma calibração da força óptica contra a força hidrodinâmica. (Tese de Mestrado de Adriana Fontes) As forças óptica e hidrodinâmica de uma partícula arrastada em um fluido com velocidade v devem se igualar no equilíbrio, e uma pode ser utilizada para calibrar a outra. A calibração mais simples seria contra a lei de Stokes em que a força hidrodinâmica é dada por $F = 6\pi\mu a v$, onde μ é a viscosidade do meio e a o raio da esfera. Entretanto, o erro por desprezar a presença das paredes no cálculo da força hidrodinâmica é muito grande. A força hidrodinâmica de arraste em uma microesfera em velocidade constante na presença de duas paredes é um dos poucos problemas hidrodinâmicos em baixos números de Reynolds suficientemente estudado e o resultado, até ordem de $(a/l)^3$, é dado por $F = \frac{6\pi\mu a v}{1 - A\left(\frac{a}{l}\right) + B\left(\frac{a}{l}\right)^3}$, onde A e B são os coeficientes

$$F = \frac{6\pi\mu a v}{1 - A\left(\frac{a}{l}\right) + B\left(\frac{a}{l}\right)^3}, \text{ onde } A \text{ e } B \text{ são os coeficientes}$$

integrais dados por:

$$A = \frac{3(1-h)}{4} \int_0^{+\infty} \frac{x}{N(st-1)} \left\{ s^2 t^3 (1-h) [(1-h)x-1] + s^3 t^2 (1+h) [(1+h)x-1] + 4s^2 t^2 [2(1-h^2)x^2 - 2x + 1] \right. \\ \left. + 2st^2 [(3-h^2)x-h] + 2s^2 t [(3-h^2)+h] - 4st [2(1-h^2)x^2 + 2x + 1] + s(1-h) [(1-h)x+1] \right. \\ \left. + t(1+h) [(1+h)x+1] \right\} dx + \frac{9(1-h)}{8} \int_0^{+\infty} \frac{s+t-2}{st-1} dx$$

$$B = \frac{2(h-1)(1-h)^2}{8(h-2)} \int_0^{+\infty} \frac{x^2}{N} \left\{ st^2 [2(1-h)x-1] + s^2 t [2(1+h)x-1] + st [(4x-1)^2 + 1] + t [2(1+h)x+1] \right. \\ \left. + s [2(1-h)x+1] \right\} dx + \frac{(1-h)^3}{4} \int_0^{+\infty} \frac{x^3}{N(st-1)} \left\{ s^2 t^3 (1-h) + s^3 t^2 (1+h) + s^2 t^2 (8x-4) - st^2 (8x-2h) \right. \\ \left. - s^2 t (8x+2h) + st (8x+4) \right\} dx - \frac{(1-h)^3}{8} \int_0^{+\infty} x^2 \frac{s+t-2}{st-1} dx,$$

com $N = (st - 1)^2 - 16x^2st$, $s = e^{2x(1-h)}$, $t = e^{2x(1+h)}$, $l = (1-h)L$ e $b = (1+h)L$.

A Figura 40 mostra a geometria do problema, com uma esfera de raio a separada de uma das paredes pela distância l e da outra b , de forma que a distância entre as mesmas é $l + b$, e com a origem das coordenadas no centro da esfera, para facilitar a aplicação das condições de contorno na mesma. A velocidade v da partícula é paralela às paredes.

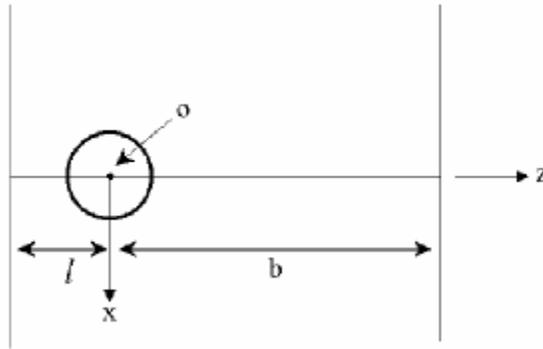


Figura 40. Esquema do modelo hidrodinâmico.

Figura 41 mostra o gráfico das medidas da força óptica, obtida através dos deslocamentos da microesfera, versus força hidrodinâmica, obtida da velocidade de arraste. Desse gráfico percebe-se a qualidade do modelo da óptica geométrica para a quantificação da força óptica até limites de centenas de pico Newtons.

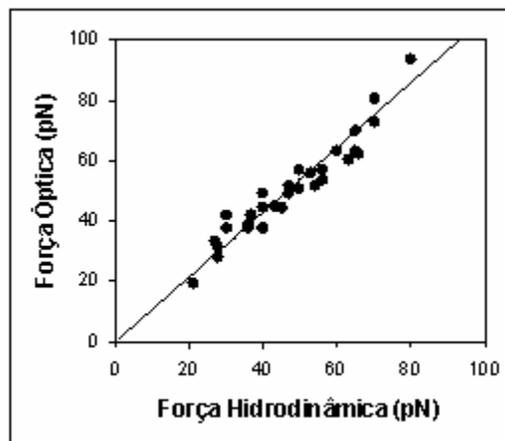


Figura 41. Gráfico da força óptica versus força hidrodinâmica.

A medida da força óptica foi tão boa que se decidiu demonstrar que ela agora pode ser usada para calibrar o modelo da força hidrodinâmica, utilizando valores medidos da força óptica para medir o valor da viscosidade de um meio. Assim, os deslocamentos foram medidos e os valores calculados para força óptica usado para determinar a força hidrodinâmica, através da qual foram calculadas as viscosidades e comparadas com os valores tabelados no Handbook de Química e Física.

	<i>20% de glicerina</i>	<i>32% de glicerina</i>
<i>Handbook</i>	1.73cP	2.63cP
<i>Pinça Óptica</i>	1.83cP ±6%	2.76cP±5%

Tabela 2. Viscosidades tabeladas no Handbook de Química e Física e medidas pela pinça óptica.

Esses resultados demonstram, portanto, que o modelo de óptica geométrica é suficientemente bom para utilização na quantificação de forças.

Capítulo 4

Desenvolvimento de sistema de criação de um gradiente de concentração.

Neste capítulo descreveremos o método de criação de um gradiente unidimensional, onde os parasitas são colocados dentro de um canal em uma câmara com dois reservatórios. Uma substância atrativa ao parasita *leishmania amazonensis* foi colocada em um dos reservatórios. Assim, um dos reservatórios conterá o meio de cultura e parasitas e o outro o meio de cultura e a substância atrativa, criando um gradiente de concentração. O desenvolvimento desse método baseou-se na teoria de difusão, que será apresentada brevemente na seção seguinte. Para as medidas vetoriais de força do parasita utilizou-se um detector de quadrante posicionado após o condensador do microscópio.

4.1 Difusão

Difusão é o movimento aleatório de partículas de uma região da alta concentração para uma região de baixa concentração. As partículas difundidas movem-se independentemente uma das outras. Elas podem colidir frequentemente com as moléculas do fluido no qual estão imersas, mas raramente colidem entre si. O fluido envolto pode estar em repouso, neste caso a difusão é o único mecanismo para o transporte do soluto, ou ele pode estar em movimento, neste caso ele carrega junto o soluto. Ambos os efeitos podem ocorrer juntos.

Primeiro, consideraremos a difusão do ponto de vista macroscópico e escreveremos uma equação diferencial aproximada para descrevê-la. Obtemos então uma segunda forma da equação de difusão pela combinação desta com a equação da continuidade. Depois de discutir brevemente algumas soluções para essas equações,

olhamos o problema do ponto de vista macroscópico, considerando o movimento aleatório das partículas e mostramos que obtemos os mesmos resultados.

Suponha que o solvente envolto não se move. Se a concentração do soluto é completamente uniforme não existe rede de fluxo. Como muitas partículas vagueiam da região A para a região B, a concentração permanece a mesma. Desta maneira existirá flutuações locais na concentração. Assim se a concentração é mais elevada na região A que na região B, existirão mais partículas viajando da região A para região B do que da região B para a A (figura 42).

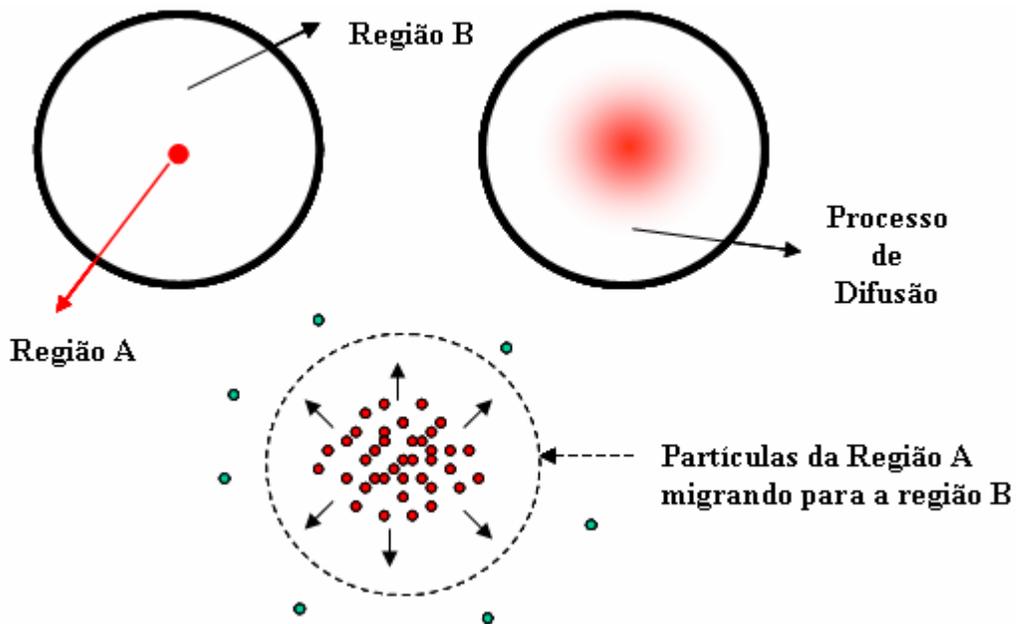


Figura 42. Um exemplo de difusão.

4.1.1 Equação da Continuidade

Vamos considerar uma região do espaço delimitada por uma superfície S na presença de um fluxo de uma grandeza qualquer. A intensidade de um fluxo é definida

por $|\vec{j}| = \frac{\text{quantidade da grandeza}}{\text{área} \times \text{tempo}}$ e sua direção é definida como a normal ao elemento

de superfície que maximiza $|\vec{j}|$ apenas através de uma rotação da superfície, conforme mostra a figura 43.

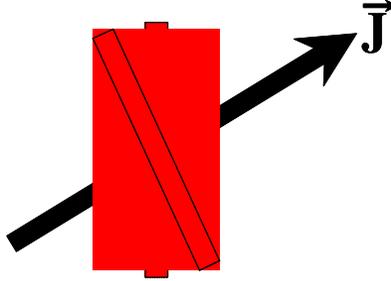


Figura 43. Superfície S na presença de um fluxo $|\vec{J}|$.

A quantidade da “grandeza” fluindo que atravessa um elemento de área dS por unidade de tempo será $\frac{d \text{ grandeza}}{dt} = \vec{J} \cdot \vec{n} dS$, onde \vec{n} é a normal ao elemento de superfície dS . Se o fluxo se dá porque alguma partícula transporta a grandeza em questão esse fluxo pode ser escrito como $\vec{J} = \rho \vec{v}$, onde ρ é a densidade da grandeza e \vec{v} o vetor velocidade média das partículas que transportam tal grandeza. Em um volume limitado pela superfície fechada S a quantidade total da grandeza fluindo para dentro do volume será: $(\frac{d \text{ grandeza}}{dt})_{\text{fluxo}} = -\oint_S \vec{J} \cdot \vec{n} dS$. O sinal menos vem do fato de que a normal é para fora do volume e o fluxo é para dentro. Usando o teorema da divergência $\oint_S \vec{J} \cdot \vec{n} dS = \int_V \nabla \cdot \vec{J} dV$ obtém-se $(\frac{d \text{ grandeza}}{dt})_{\text{fluxo}} = -\int_V \nabla \cdot \vec{J} dV$.

Por outro lado a grandeza pode ser criada ou destruída dentro do volume V através de fontes ou sumidouros. Definindo $\text{Fonte} = \frac{\text{quantidade criada}}{\text{volume} \times \text{tempo}}$ e

$\text{Sumidouro} = \frac{\text{quantidade destruída}}{\text{volume} \times \text{tempo}}$, a quantidade da grandeza criada ou destruída no

volume por unidade de tempo será $(\frac{d \text{ grandeza}}{dt})_{\text{criada/destruída}} = \int_V [F - S] dV$.

A quantidade total da grandeza por unidade de tempo devida a fluxos, fontes e sumidouros, portanto, será $\frac{d \text{ grandeza}}{dt} = -\int_V \nabla \cdot \vec{J} dV + \int_V [F - S] dV$. Para um elemento

de volume infinitesimal essa equação é escrita como $\frac{d \text{ grandeza}}{dt} = [-\nabla \cdot \vec{J} + F - S] dV$

ou $\frac{\partial}{\partial t} \left[\frac{d \text{ grandeza}}{dV} \right] = -\nabla \cdot \vec{J} + F - S$, pois a derivada temporal é realizada em um volume fixo no tempo. Essa equação pode ser escrita, finalmente, na famosa forma da equação da continuidade:

$$\nabla \cdot \vec{J} + \frac{\partial \rho}{\partial t} = F - S$$

onde $\rho = \frac{d \text{ grandeza}}{dV}$ é a densidade volumétrica da grandeza em questão.

4.1.2 Primeira lei de Fick

Agora vamos considerar que a grandeza é o próprio número da partículas. Então $\rho = C$ é a concentração de partículas. A primeira lei de Fick (Adolf Fick, fisiologista alemão), afirma que o fluxo de difusão será diretamente proporcional ao gradiente de concentração $\vec{J} = -D \nabla C$. A constante D é chamada de coeficiente de difusão e tem

dimensões de $[D] = \frac{[\vec{J}]}{[\nabla C]} = \frac{\frac{\text{quantidade}}{\text{área tempo}}}{\frac{\text{quantidade}}{\text{volume distância}}} = \frac{\text{área}}{\text{tempo}}$, $\frac{m^2}{s}$ no MKS, mas

comumente encontrado nas unidades $\frac{cm^2}{s}$ do CGS. O sinal negativo vem do fato de que o fluxo é direcionado da região com alta concentração para a de baixa concentração, ou seja, oposto ao gradiente.

4.1.3 Equação da Difusão

Substituindo a primeira lei de Fick na equação da continuidade $-D \nabla \cdot \nabla C + \frac{\partial C}{\partial t} = F - S$, obtém-se a equação de difusão:

$$\nabla^2 C - \frac{1}{D} \frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{F - S}{D}$$

4.1.4 Processo conservativo estacionário em dutos de seção reta constante.

Na situação em que o número de partículas se conserva não existem fontes nem sumidouros, logo $F = S = 0$. No caso estacionário a concentração não muda com o tempo, $\frac{\partial C}{\partial t} = 0$, embora varie no espaço. Vamos considerar um duto de seção reta constante com paredes laterais impermeáveis, i.e., não há fluxo pelas laterais (figura 44). Nesse caso a quantidade de partículas entrando em uma seção reta de um duto na posição x_1 tem que ser a mesma que sai na posição x_2 , ou seja, $J_1 A_1 = J_2 A_2$, ou $J_1 = J_2$ pois $A_1 = A_2$, por hipótese.



Figura 44. Duto de seção reta constante, onde o fluxo que entra é igual ao fluxo que sai.

Se $J = \text{constante}$ e o tubo tem comprimento total L , então: $\nabla C = \frac{C_2 - C_1}{x_2 - x_1} = \frac{\Delta C}{L}$ e

$J = -D \frac{\Delta C}{L}$. A quantidade de partículas que flui por unidade de tempo nesse duto será:

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = -AD \frac{\Delta C}{L}.$$

4.2 Câmara com Gradiente de Concentração

Neste trabalho desenvolvemos um sistema de criação de gradiente de concentração, construindo a câmara da figura 45, constituída de dois reservatórios ligados por um canal.

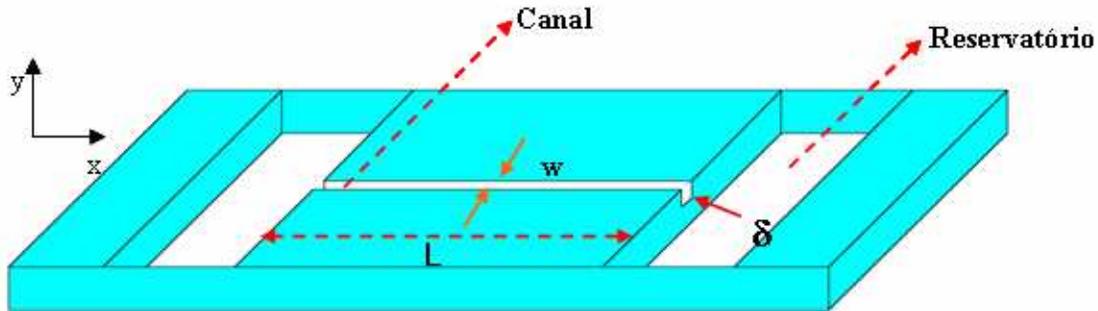


Figura 45. Câmara desenvolvida para criação do gradiente de concentração. L, w e d são o comprimento, a largura e a profundidade do canal, respectivamente.

Se a difusão for estacionária o gradiente será dado simplesmente por $\bar{\nabla}C = \frac{C_2 - C_1}{L}$, o que é muito conveniente, pois poderemos controlá-lo através das concentrações nas duas câmaras. Entretanto, é necessário estabelecer uma relação entre as dimensões do canal e os volumes das câmaras para garantir a condição de difusão estacionária.

4.2.1 Condição de Difusão Estacionária

Supondo que a condição de difusão estacionária seja instantaneamente válida, as concentrações entre as duas câmaras tendem a se equalizar com o tempo devido ao fluxo difusivo. Se esse tempo for muito grande, teremos garantida a condição de difusão estacionária. Tomando as concentrações C_2 e C_1 das duas câmaras em um tempo arbitrário t a quantidade de partículas fluindo de uma lado ao outro será

$$\frac{\Delta Q}{\Delta t} = -\delta w D \frac{C_2 - C_1}{L}.$$

Nesse caso as concentrações variam no tempo de acordo com o par de equações diferenciais acopladas:

$$\begin{cases} \frac{dC_2}{dt} = -D \frac{\delta w}{LV_2} [C_2 - C_1] \\ \frac{dC_1}{dt} = D \frac{\delta w}{LV_1} [C_2 - C_1] \end{cases}$$

onde V_1 e V_2 são os volumes em cada reservatório. Substituindo no sistema acima uma solução do tipo:

$$\begin{cases} C_2(t) = C_2(0)e^{-pt} + C_{eq} [1 - e^{-pt}] \\ C_1(t) = C_1(0)e^{-pt} + C_{eq} [1 - e^{-pt}] \end{cases}$$

obtemos: $C_2(t) - C_1(t) = [C_2(0) - C_1(0)] e^{-pt}$ e

$$\begin{cases} \frac{dC_2(t)}{dt} = -pC_2(0)e^{-pt} + pC_{eq}e^{-pt} \\ \frac{dC_1(t)}{dt} = -pC_1(0)e^{-pt} + pC_{eq}e^{-pt} \end{cases}$$

Substituindo de volta no sistema obtemos:

$$\begin{cases} -pC_2(0)e^{-pt} + pC_{eq}e^{-pt} = -D \frac{\delta w}{LV_2} [C_2(0) - C_1(0)] e^{-pt} \\ -pC_1(0)e^{-pt} + pC_{eq}e^{-pt} = D \frac{\delta w}{LV_1} [C_2(0) - C_1(0)] e^{-pt} \end{cases}$$

O C_{eq} pode ser obtido igualando os p 's das duas equações

$$\begin{cases} p = D \frac{\delta w}{LV_2} \frac{[C_2(0) - C_1(0)]}{[C_2(0) - C_{eq}]} \\ p = D \frac{\delta w}{LV_1} \frac{[C_2(0) - C_1(0)]}{[C_{eq} - C_1(0)]} \end{cases}, \text{ ou seja, } V_1 [C_{eq} - C_1(0)] = V_2 [C_2(0) - C_{eq}] \text{ que nos}$$

leva a média ponderada pelo volumes para a concentração de equilíbrio final

$$C_{eq} = \frac{V_1 C_1(0) + V_2 C_2(0)}{V_1 + V_2}, \text{ como era de se esperar de um sistema fechado no qual as}$$

partículas só podem sair de V_2 para V_1 .

O p , agora, pode ser obtido substituindo o C_{eq} em qualquer uma das duas equações. Substituindo o termo $C_2(0) - C_{eq} = \frac{V_1 [C_2(0) - C_1(0)]}{V_1 + V_2}$ em

$$p = D \frac{\delta w}{LV_2} \frac{[C_2(0) - C_1(0)]}{[C_2(0) - C_{eq}]}, \text{ finalmente obtemos:}$$

$$p = D \left(\frac{\delta w}{L} \right) \frac{V_1 + V_2}{V_1 V_2}$$

Percebe-se, portanto, que o sistema entra em equilíbrio em um tempo da ordem de $\tau = 1/p$, $\tau = \frac{L}{D \delta w} \frac{V_1 V_2}{V_1 + V_2}$. No caso $V_1 = V_2 = V$, então $\tau = \frac{L V}{2 D \delta w}$.

Desejamos garantir que esse tempo de equilíbrio, τ , seja muito grande, mas sem influenciar o gradiente. Portanto não se deve variar D e L , mas podemos diminuir δ e w e aumentar V à vontade. Entretanto, existe o limite da “working distance” da ordem de 100 μm para objetiva de 100X para a espessura, se desejamos poder visualizar qualquer parasita no canal. Por isso escolhemos $\delta = 100\mu\text{m} = 0,01 \text{ cm}$. Utilizando os outros parâmetros que foram $L = 2,6 \text{ cm}$, $w = 0,3 \text{ cm}$, $V = 0,02 \text{ cm}^3$ e $D = 5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ [46] para o coeficiente de difusão da glucose, estimamos que o tempo de equilíbrio seria de 4815 horas, ou seja, infinito para todos os fins práticos. Isso garante a condição de um processo de difusão estacionário.

4.3 Medida da Força Óptica

Conforme discutido no capítulo 3, a medida da força óptica será realizada através do deslocamento de uma microesfera da sua posição de equilíbrio. No passado esse deslocamento era obtido através da análise da imagem da microesfera utilizando o software Image Pro Plus, em um procedimento lento e impreciso. Esse procedimento seria inviável, entretanto, para acompanhar o deslocamento muito rápido de microesferas ligadas a microorganismos vivos. Por isso optamos pelo esquema de detectar o movimento através de um fotodetector de quadrante, que detecta a luz espalhada do

próprio laser de Nd:YAG usado como pinça óptica. Esse espalhamento dependerá da posição da microesfera em relação ao foco do laser da pinça óptica. Trata-se de um método muito rápido, pode chegar a MHz, e barato de detecção de posição da microesfera. Ainda tem a vantagem de usar o mesmo laser para capturar a partícula e monitorar sua posição.

4.3.1 Fotodetectores

Fotodetector de Silício. O Silício é um semicondutor com um *band gap* indireto com energia de 1.12 eV à temperatura ambiente. Este é o band gap entre a banda de valência e a banda de condução. Na temperatura de zero absoluto a banda de valência está completamente preenchida e a banda de condução está vazia. Os elétrons podem saltar para a banda de condução por absorção de fótons com energias maiores que 1.12eV, que correspondem a comprimentos de onda menores que 1100 nm. Cada fóton absorvido cria um buraco na banda de valência e um elétron na banda de condução. Ambos os portadores, elétrons e buracos, nas bandas de valência e de condução, são portadores livres, capazes portanto de conduzir corrente elétrica. Esses portadores fotogerados precisam ser transformados em corrente elétrica. Para tanto devem ser gerados em uma região em que existe um potencial atraindo os elétrons para uma direção e os buracos para a outra. Isso é feito gerando os portadores na região de uma junção p-n. O silício pode ser dopado com doadores, que liberam elétrons livres para a banda de condução, formando um semicondutor dopado tipo n, ou aceitadores, que retiram elétrons da banda de condução deixando buracos livres na mesma, formando um semicondutor dopado tipo p. Apesar de existirem portadores livres o semicondutor é neutro pois as impurezas fixas possuem carga igual e de sinal contrário à dos portadores. Na junção p-n, entretanto, os portadores livres difundem para o outro lado deixando uma carga líquida do outro lado. Esse processo termina quando o campo elétrico criado por essa diferença de cargas impede a continuação desse processo de difusão. Na junção, portanto, existe um potencial que atrai elétrons para um dos lados e buracos para o outro. Figura 46 mostra o esquema de um detector de silício típico.

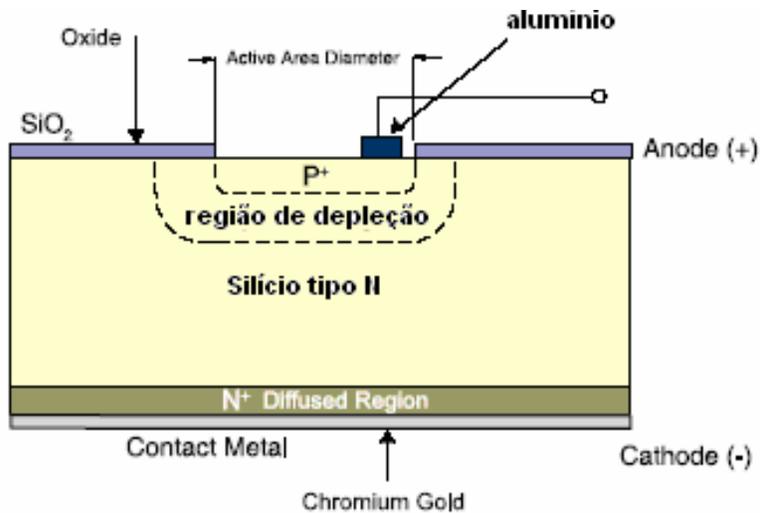


Figura 06. Fotodiodo de Si por difusão planar

Portadores foto gerados nessa região são atraídos para lados opostos e se transformam em corrente entre os dois eletrodos mostrados na figura 46. Essa corrente pode ser transformada em um sinal de voltagem através de o amplificador operacional típico mostrado na figura 47.

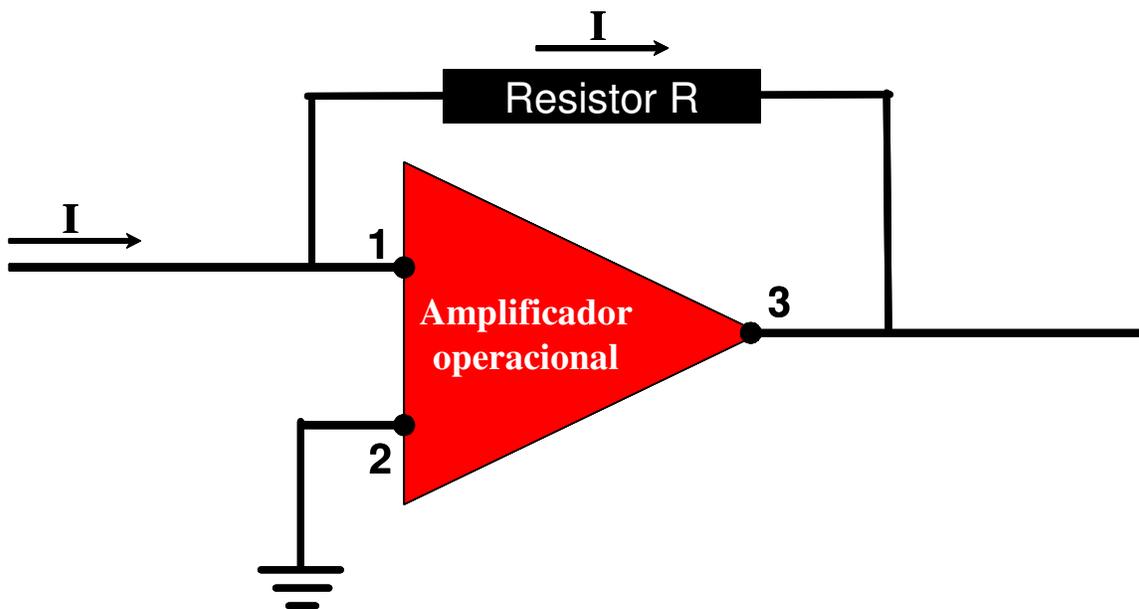


Figura 47. Amplificador operacional para transformar corrente em voltagem.

O amplificador operacional mantém as voltagens das portas 1 e 2 idênticas mas sem deixar corrente fluir entre as mesmas. Nesse caso toda a corrente I que entra na porta 1 é obrigada a passar pelo resistor R gerando a voltagem $V = - RI$. Os amplificadores

operacionais também são muito úteis para a construção de circuitos de soma e de diferença, mostrados nas figuras 48 e 49.

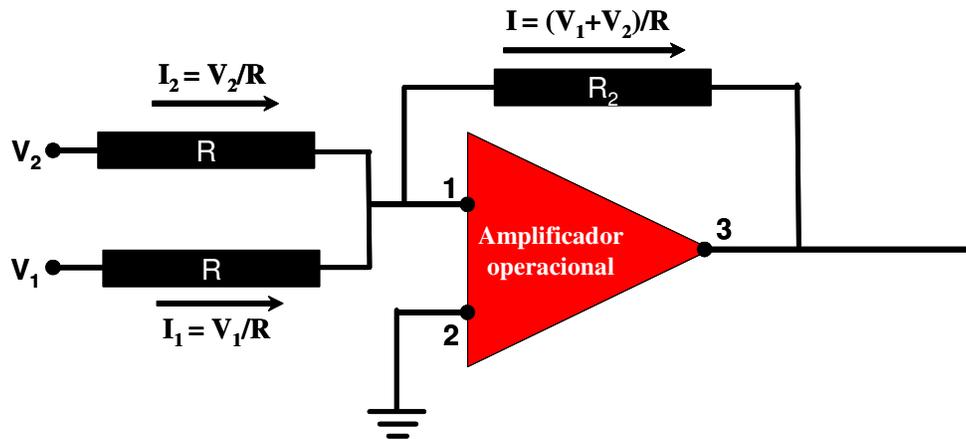


Figura 48. Circuito de soma utilizando amplificador operacional.

No circuito de soma acima as duas correntes $I_1 = V_1/R$ e $I_2 = V_2/R$ se somam em R_2 e a voltagem de saída será $V = - (V_1 + V_2) (R_2/R)$, proporcional à $V_1 + V_2$. Fazendo $R_2 = R$ a constante de proporcionalidade será -1.

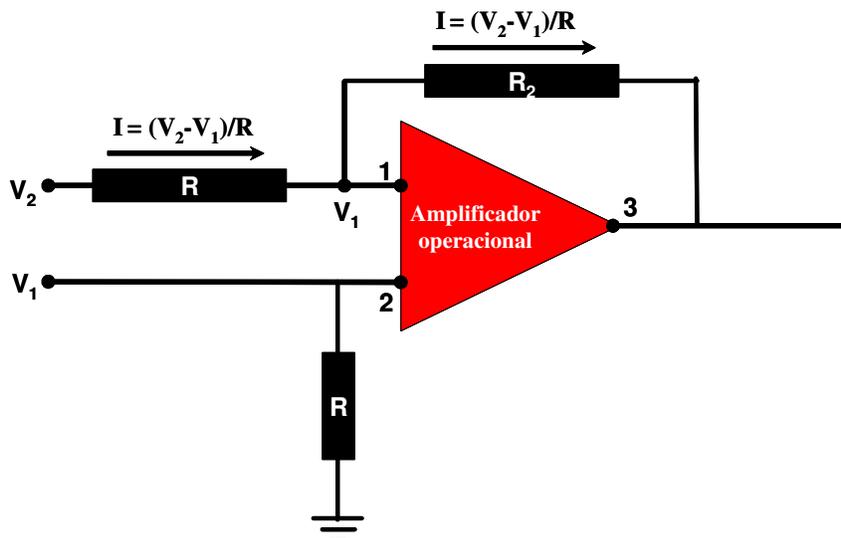


Figura 49. Circuito de diferença utilizando amplificador operacional.

Já no circuito de diferença a corrente será $I_2 = (V_2 - V_1)/R$ e a voltagem de saída será $V = - (V_2 - V_1) (R_2/R)$, proporcional à $V_2 - V_1$. Fazendo $R_2 = R$ a constante de proporcionalidade será, novamente, -1.

Responsividade R_λ

A responsividade de um fotodiodo de Si é uma medida de sua sensibilidade à luz, e é definida como a razão entre a fotocorrente I_p pela potência da luz incidente P em um

dado comprimento de onda $R_\lambda = \frac{I_p}{P}$ (figura 50).

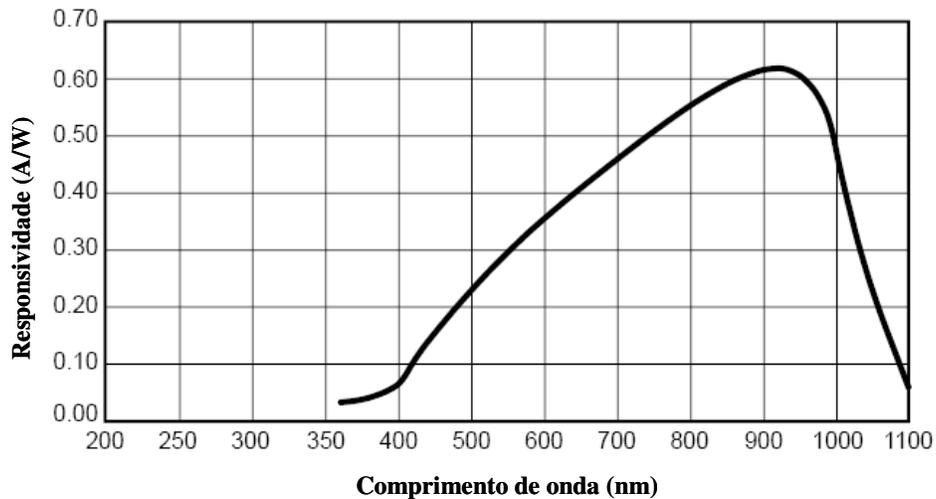


Figura 50. Gráfico da responsividade do detector utilizado versus o comprimento de onda.

4.3.2 Detector de quadrante (QPD)

O detector de quadrante utilizado nesta dissertação é um disco uniforme de silício com quatro fotodetectores iguais e independentes conforme mostrado na figura 51.

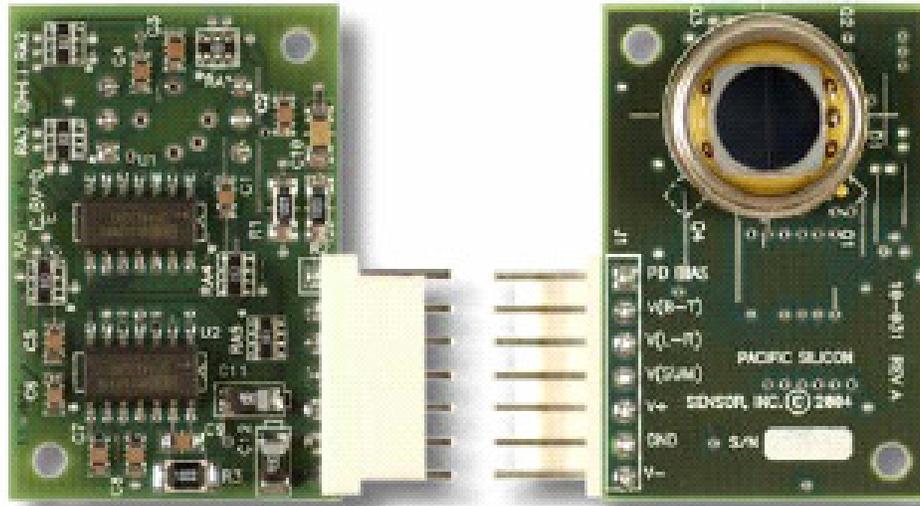


Figura 51. Detector de Quadrante Modelo QP506SD2 da Pacific Sensor Incorporated. Sensor de quadrante na parte superior do lado direito tem 7,8 mm.

O sinal de cada um desses 4 fotodetores será proporcional à potência do feixe que incide em cada um deles. Figura 52 mostra um feixe que incide centrado simetricamente sobre o detector de quadrante. Nesse caso as 4 fotocorrentes serão iguais.

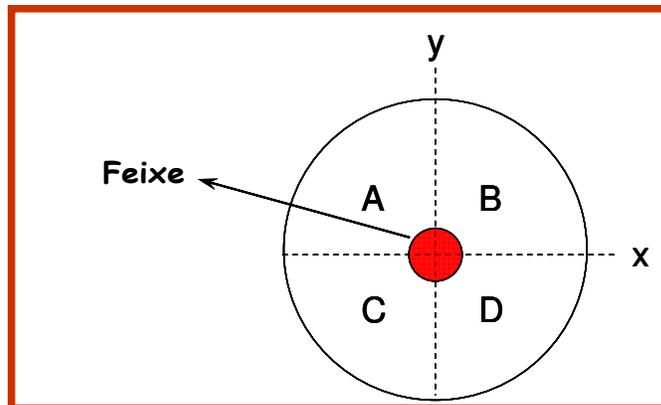


Figura 52. Geometria do sensor do Detector de Quadrante.

Se o feixe de laser se deslocar em relação ao centro do detector os sinais serão diferentes. Figura 53 mostra o caso em que o feixe se deslocou na vertical e a figura 54 o caso em que o feixe do laser se deslocou na horizontal.

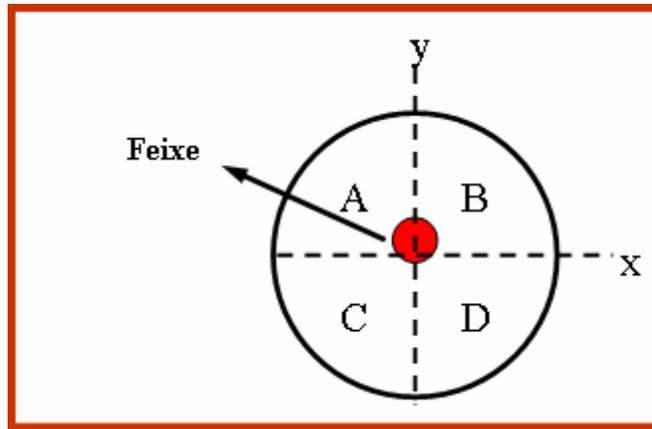


Figura 53. Caso onde o feixe de deslocou na vertical.

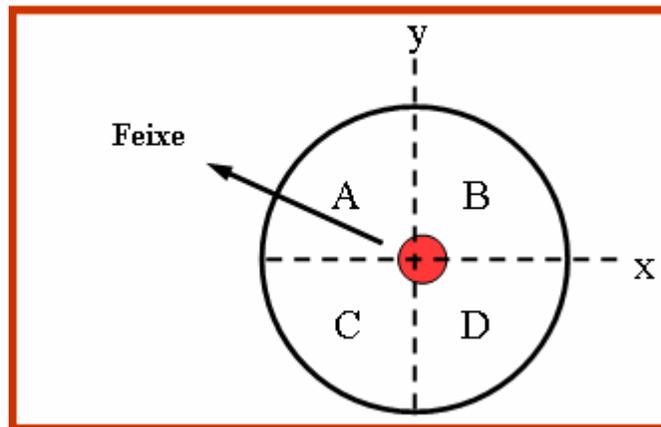


Figura 54. Caso onde o feixe de deslocou na horizontal.

Uma forma conveniente de medir um sinal proporcional ao deslocamento da microesfera nas direções x e y é:

$$y = \frac{(S_A + S_B) - (S_C + S_D)}{S_A + S_B + S_C + S_D} \quad x = \frac{(S_B + S_D) - (S_A + S_C)}{S_A + S_B + S_C + S_D}$$

onde S_A , S_B , S_C e S_D são correntes geradas por cada um dos quatro setores. Note que a divisão pela soma dos 4 sinais evita que flutuações da potência do laser apareçam como variações de posição. Usando os circuitos de diferença e soma com amplificadores operacionais essas operações podem ser realizadas facilmente, como mostra o esquema do circuito do detector adquirida da Pacific Sensor Incorporated. Esse dispositivo, que custou por volta de US\$ 200, já vem tanto com os pré-amplificadores que transformam corrente em voltagem quanto com os circuitos de soma, diferença e divisão (figura 55).

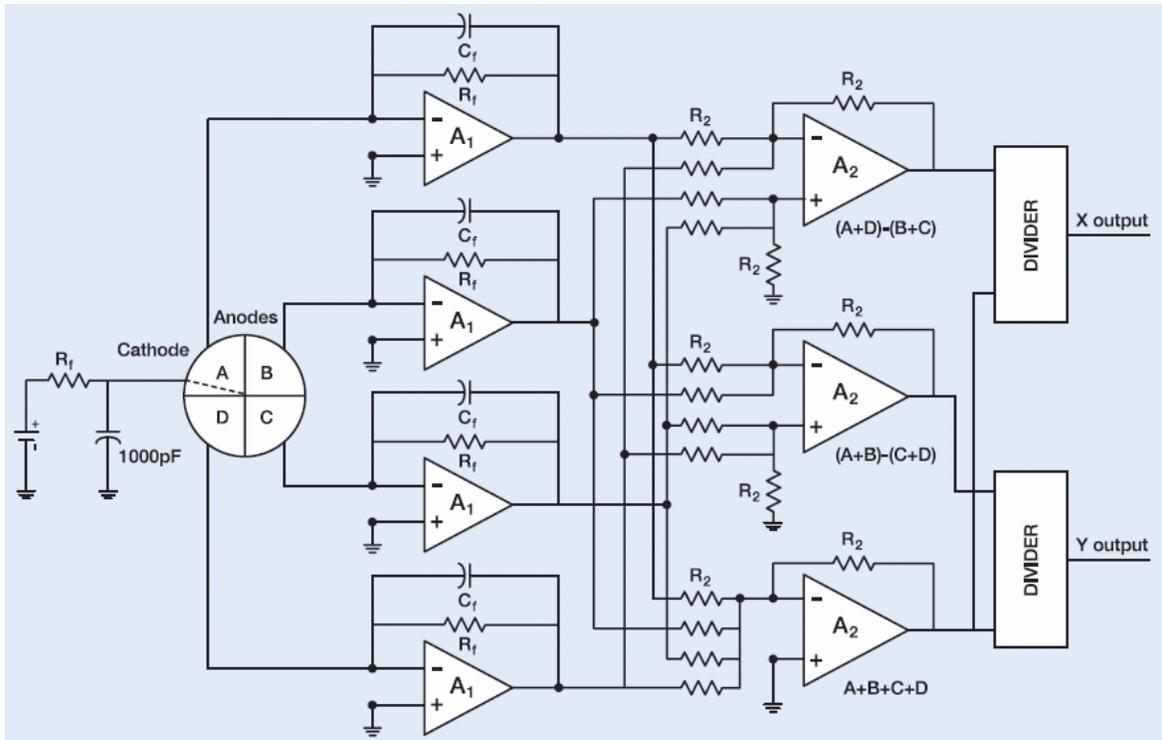


Figura 55. Diagrama do circuito do Detector de Quadrante.

4.3.3 Montagem experimental para medida da força óptica

A detecção usada aqui baseia-se na interferência do espalhamento da luz sobre a microesfera [47, 48, 49, 50]. O sinal de interferência é monitorado com o QPD posicionado ao longo do eixo óptico em um plano conjugado ao plano focal posterior do condensador. O padrão da luz impresso sobre o QPD é então convertido, em uma saída diferencial em ambas as dimensões laterais. Esta abordagem requer a utilização de um espelho dielétrico posicionado após o condensador do microscópio. O sistema experimental utilizado nesta dissertação está representado na figura 56.

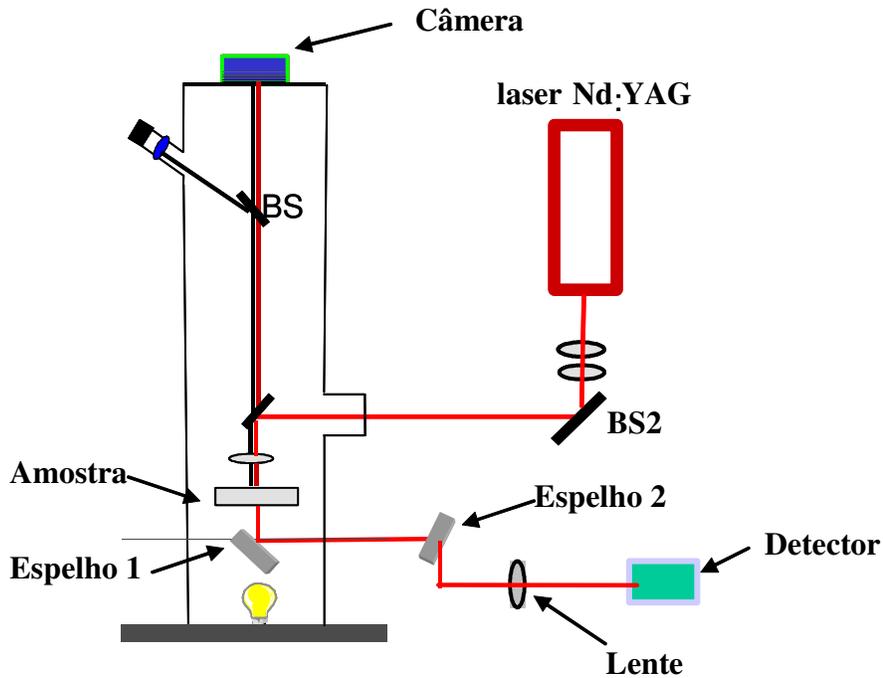


Figura 56. Sistema experimental.

Este sistema requer um alinhamento cuidadoso, pois se o feixe não estiver no centro do sensor poderemos obter leituras erradas do mesmo. Em frente ao detector, que está sobre um estágio de translação x e y, foi colocada uma lente de distância focal 5 cm, para controlar o tamanho do feixe sobre o detector. Além de dois espelhos dielétricos que foram colocados após o condensador do microscópio. Após o processo de alinhamento foi necessário zerar o detector movendo dessa forma, o micrômetro do estágio em x e y. Os sinais do detector são mandados a um osciloscópio (Tektronix, modelo TDS 1012).

4.4 Calibração do detector de quadrante

A calibração do detector precisa ser feita para obter a relação entre a voltagem que sai do detector com o deslocamento da microesfera. Para a realização da calibração foi inserido ao sistema experimental da figura 56 um estágio de translação do microscópio (figura 57) com o qual moveremos as microesferas com velocidades constantes. Esse estágio é equipado com interfaces GPIB/RS232 (saída paralela e serial) e controlado pelo

Driver Controller Modelo ITL09 da Microcontrol através do computador, ele pode controlar quatro estágios de translação.

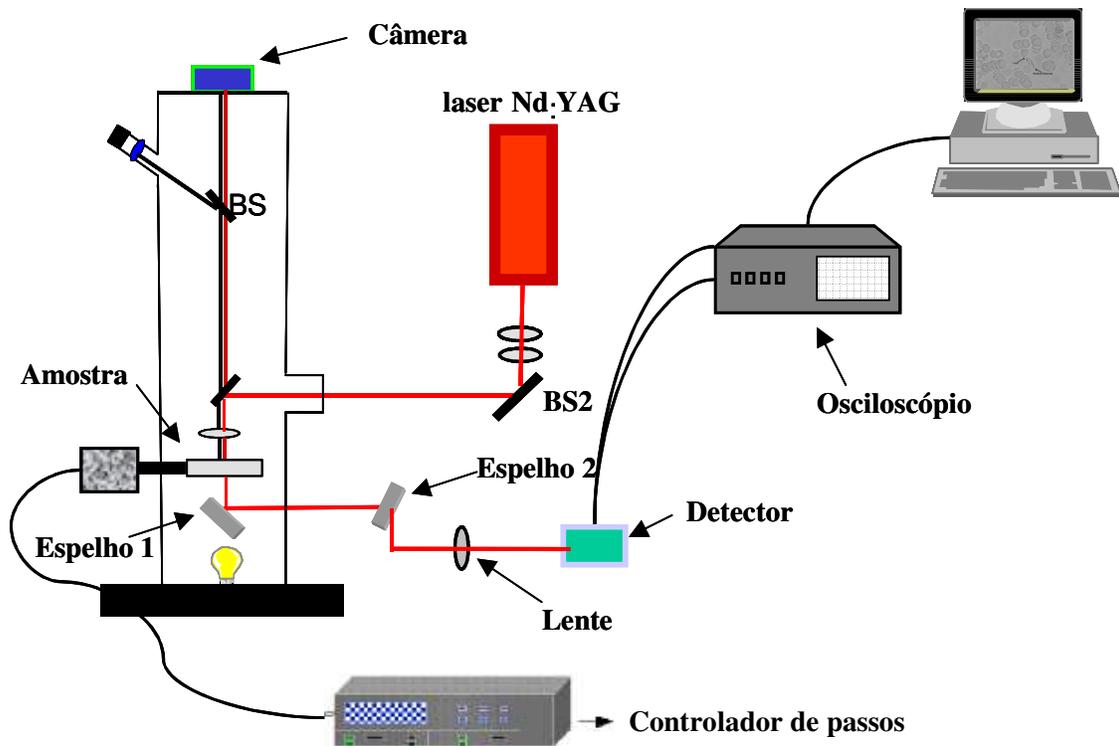


Figura 57. Sistema experimental usado para realização da calibração.

O procedimento para realização da calibração consiste no deslocamento da microesfera de poliestireno de $9\mu\text{m}$ de diâmetro na direção x e na direção y, em relação ao feixe de captura. O uso de microesferas com diâmetros maiores é necessário, pois observamos que o parasita se posiciona na frente do feixe de luz da pinça quando preso em microesferas de diâmetros menores, causando toda sorte de espalhamento de luz que interfere na medida do deslocamento da microesfera. Nas esferas maiores isso quase nunca ocorre. A calibração foi realizado com microesferas presas no fundo de uma câmara de Neubauer (figura 58). Assim, com o motor de passos deslocamos a plataforma do microscópio, fazendo com que toda microesfera passe pelo feixe da pinça.

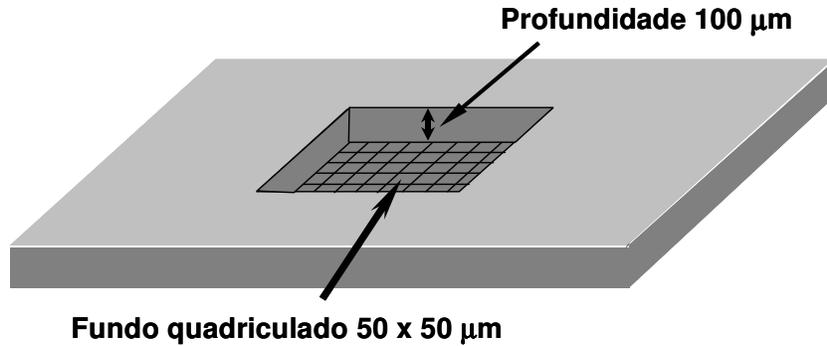


Figura 58. Ilustração da câmara de Neubauer.

Para controlar o motor de passos construímos um programa em *LabView* da *National Instruments* (figura 59), que foi desenvolvido especialmente para facilitar a interface computador-equipamentos usando portas GPIB e seriais. Os códigos são escritos graficamente como se fosse um diagrama de fluxo em que apenas conectamos os blocos da maneira desejada. A microesfera foi deslocada a uma velocidade lenta, de $1\mu\text{m/s}$, para aquisição de um grande número de pontos no osciloscópio.

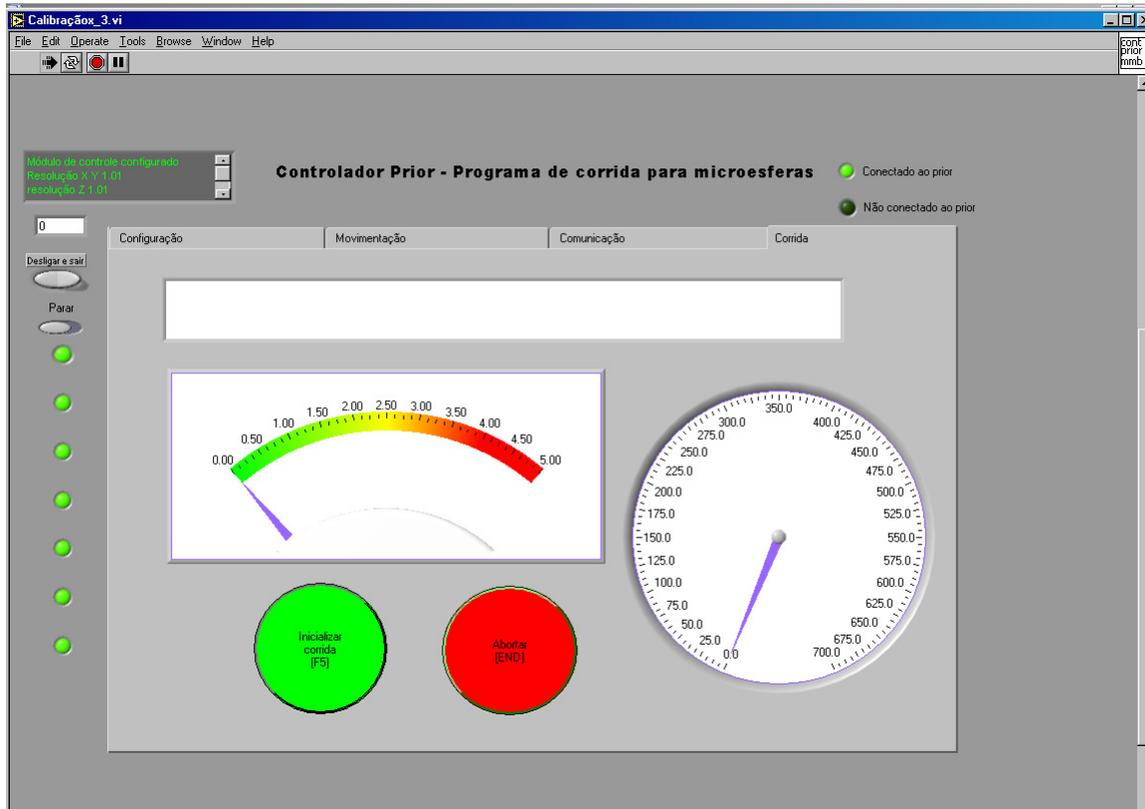


Figura 59. Programa em LabView usado para deslocar as microesfera.

O software modelo TDSPCS1 do próprio fornecedor do osciloscópio, Tektronix, foi usado para a transferência de dados para o computador (figura 60). No canal 1 (CH1) do osciloscópio colocamos o sinal na direção x e no canal 2 (CH2) o sinal na direção y do detector de quadrante.

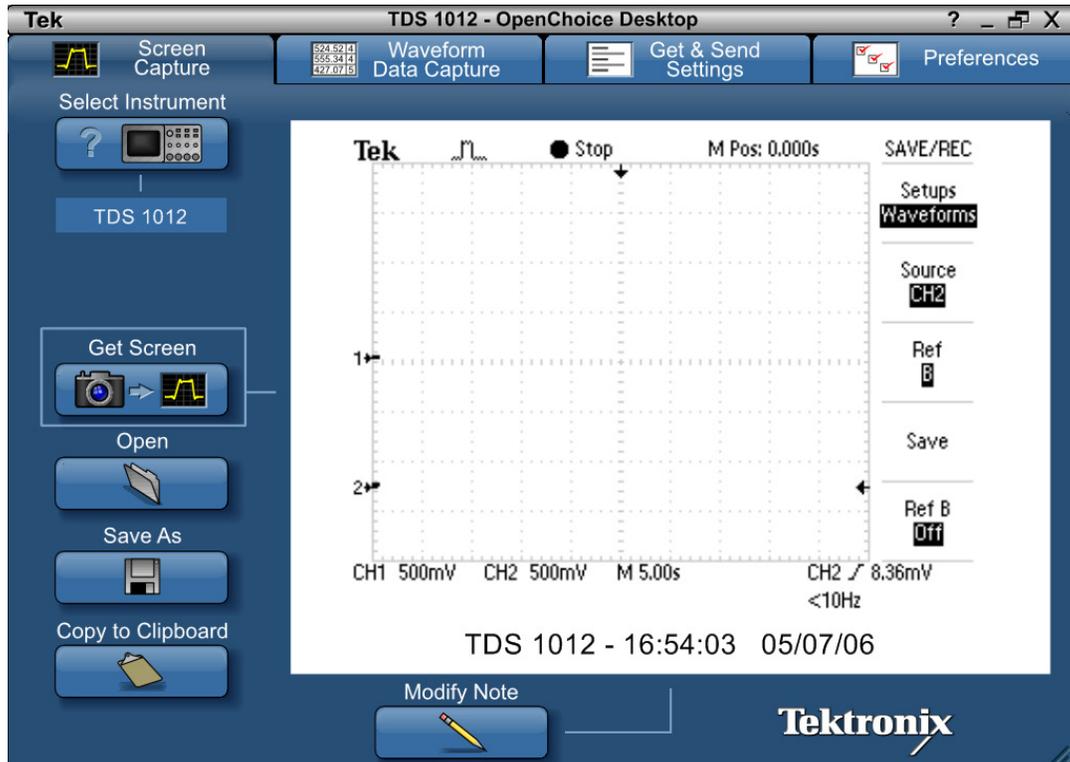


Figura 60. Software usado para aquisição dos dados vindos do osciloscópio, para a calibração do detector.

Os resultados obtidos da calibração do detector na direção x e y são mostrados abaixo nas figuras 61 e 62.

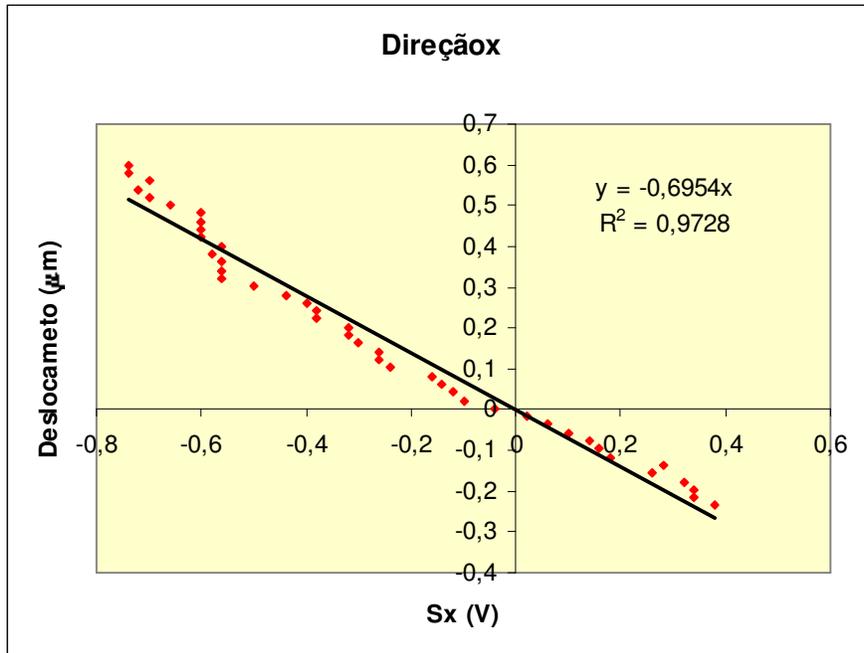


Figura 61. Gráfico de calibração do detector do deslocamento versus o sinal na direção x (Sx).

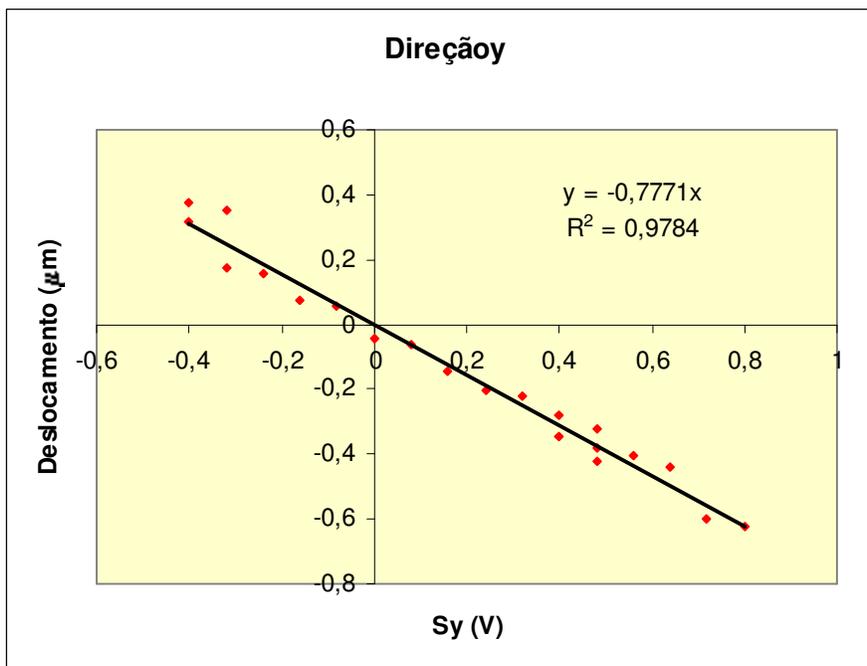


Figura 62. Gráfico de calibração do detector do deslocamento versus o sinal na direção y (Sy).

Com esses resultados nosso sistema de medidas de força ficou pronto para ser utilizado na caracterização da quimiotaxia dos parasitas.

4.5 Resultados

Inicialmente, preparou-se uma situação controle, colocando-se 20 μl de meio de cultura com parasitas e apenas 20 μl de meio de cultura no reservatório 2. Esperamos alguns minutos para que o fluxo dentro do canal diminua. Utilizamos uma objetiva 20X para a visualização das promastigotas de *Leishmania amazonensis* dentro do canal. A objetiva de 20X permite a visualização de quase toda a largura do canal e não toca a lamínula, evitando perturbações ao sistema. Assim, nesta situação controle, observou-se que a maioria dos parasitas deslocava-se de forma aleatória figura 63.

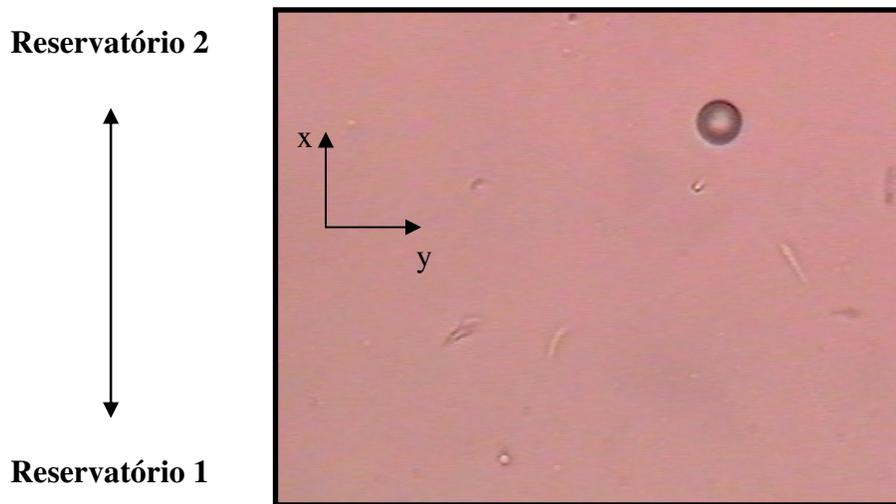


Figura 63. Imagem capturada dos parasitas dentro do canal sem adição de substância atratora.

Agora que sabemos como o parasita se comporta sem a presença de substâncias atradoras, colocamos no 20 μl de meio de cultura com parasitas no reservatório 1 e 20 μl meio de cultura com adição de glucose no reservatório 2. Nesta configuração, o parasita mudou de comportamento, nadando em círculos por três a cinco vezes seguidos por tumbling figura 64. Aparentemente, esse protozoário percebe o gradiente à sua volta não pelo típico nado retilíneo seguido de tumbling da bactéria, mas pela movimentação em círculos seguida pelo tumbling. Pode-se teorizar que ele obtém medida mais precisa da direção do gradiente através do movimento em círculos.

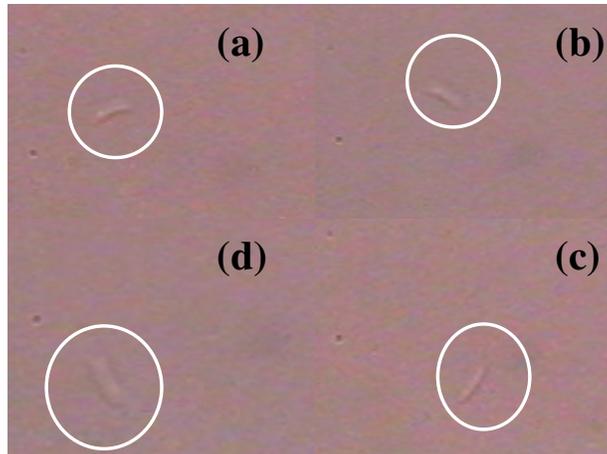


Figura 64. Imagem dos parasitas dentro do canal em contato com a substância atratora glucose.

4.6 Medidas de força de promastigota de *Leishmania amazonensis*

A seguir, medimos o vetor direção da força dos parasitas ao longo do canal na presença do gradiente de concentração. Nesta seção usaremos a câmara anteriormente, para a medida vetorial da força de parasitas acoplados na microesfera (figura 65) e em contato com uma substância de glucose em duas concentrações. Os deslocamentos dos parasitas foram obtidos com o espalhamento do laser de Nd:YAG sobre o detector de quadrante, que estava posicionado após o condensador do microscópio.

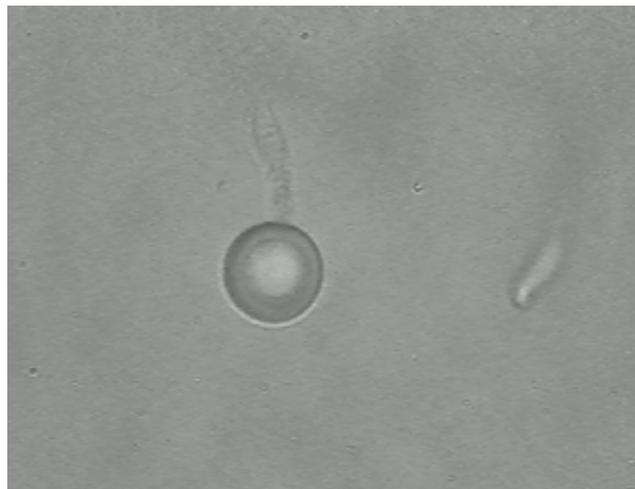


Figura 65. Imagem do parasita acoplado à microesfera

Cerca de um milhão de promastigotas foram diluídos em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino na presença de microesferas de poliestireno de 9 μm . Esta solução foi colocada no reservatório 1 da câmara (figura 45). Iniciamos o experimento inserindo no reservatório 2 uma concentração de 0,2% de glucose diluído no meio de cultura. Antes de acoplar o parasita na microesfera foi necessário apagar a luz do microscópio, pois este prejudica os parasitas, e esperar uns 3 minutos até que a corrente de fluxo parasse. Em seguida mudamos a concentração de glucose para 0.5%, para observarmos se o parasita responde a essa mudança.

Para prender o parasita na microesfera iniciamos pela captura da microesfera com alta potência do laser da pinça e a aproximamos de um parasita mantendo-a em contacto por alguns segundos até que ocorra a adesão. Nesse momento o parasita não pode mais andar em círculos, pois está preso à microesfera, mas apenas tenta escapar encolhendo seu flagelo e liberando-o repentinamente. Para medir a força diminuimos a potência do laser para 25mW, para garantir maiores deslocamentos horizontais provocados pela leishmania. A potência do laser foi medida com um powermeter posicionado após a objetiva.

Com o deslocamento da microesfera, o feixe de Nd:YAG é espalhado e detectado com o detector de quadrante, os sinais tanto em x como em y foram mandados a um osciloscópio. Para obtermos os deslocamentos usamos as curvas de calibração mostradas anteriormente. Com o uso de um programa em *matemática 5* (Apêndice A), foi possível o cálculo da força que o parasita exerce sobre a microesfera. Medimos os índices de refração das soluções utilizadas, e percebemos que são iguais ao da água, 1.33, dentro do erro experimental. O índice de refração dado da microesfera de poliestireno foi de 1.61. Assim obtivemos todos os parâmetros necessários para o cálculo da força, os índices de refração da microesfera, da solução, a potência do laser e o deslocamento da microesfera. Abaixo descreveremos os resultados obtidos.

4.6.1 Resultados e discussão

As curvas obtidas com o cálculo da força para a solução de 0.5% de glucose são mostradas na figura 66 e 67.

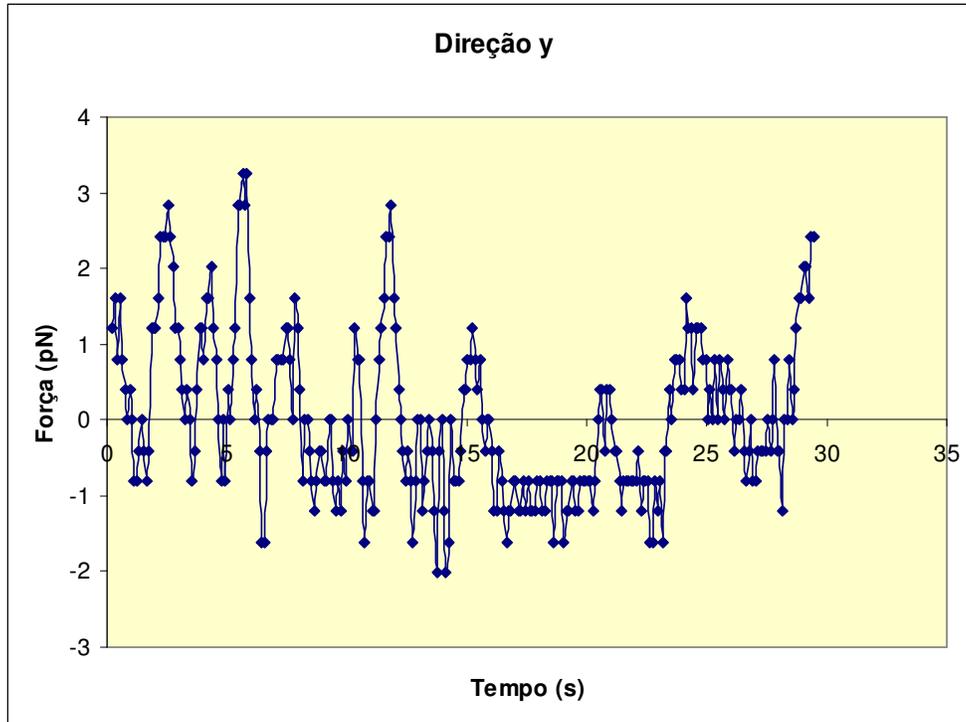


Figura 66. Gráfico da força versus o tempo na direção y. Com o parasita dentro do canal da câmara com uma solução de 0.5% de glucose no reservatório 2 .

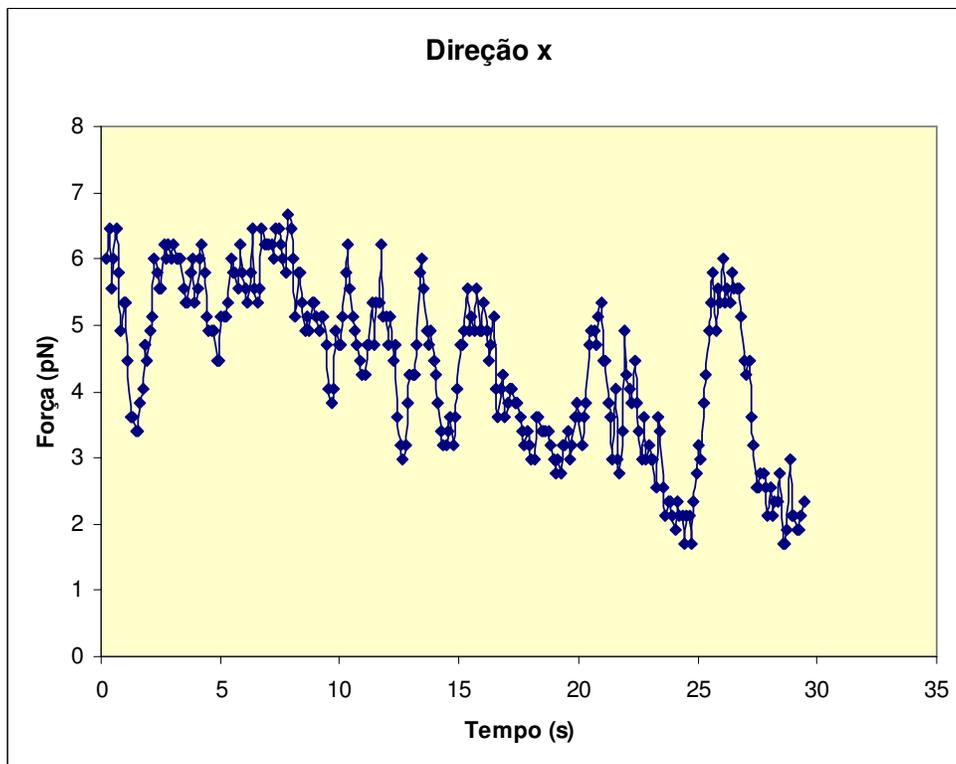


Figura 67. Gráfico da força versus o tempo na direção x. Com o parasita dentro do canal da câmara com uma solução de 0.5% de glucose no reservatório 2 .

Para esta concentração de glucose observamos um elevado valor da força, chegando a 7pN, na direção x do gradiente de concentração, enquanto na direção y as forças de variaram de -2pN até 3pN. As figuras 68 e 69 mostram os gráficos obtidos do cálculo da força para a solução de 0.2% de glucose, inserida no reservatório 2.

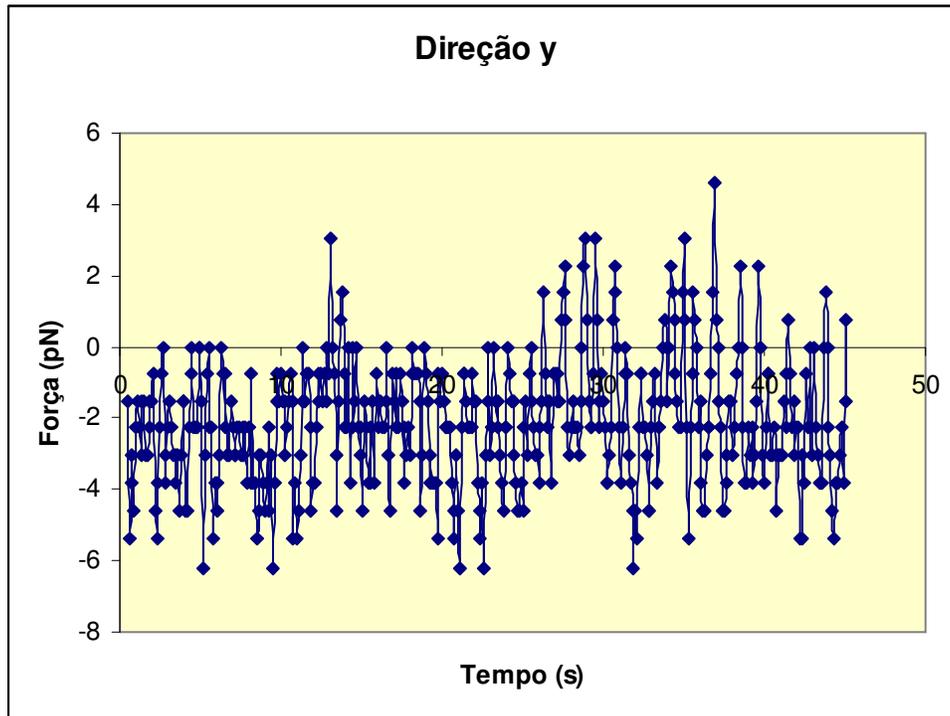


Figura 68. Gráfico da força versus o tempo na direção y. Com o parasita dentro do canal da câmara com uma solução de 0.2% de glucose no reservatório 2 .

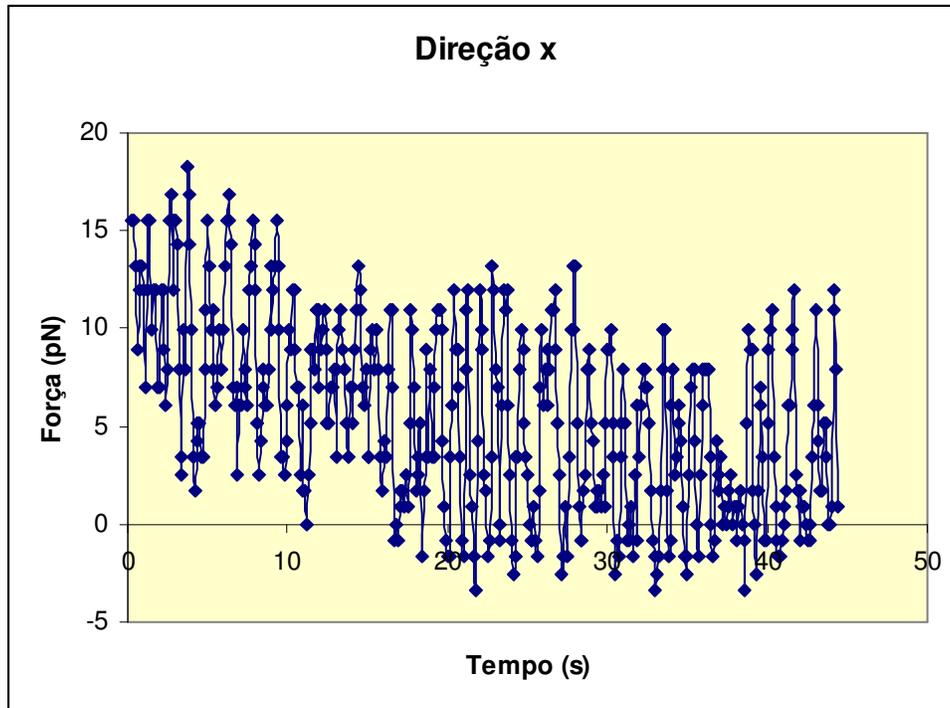


Figura 69. Gráfico da força versus o tempo na direção x. Com os parasitas dentro do canal da câmara com uma solução de 0.2% de glucose no reservatório 2 .

Para esta concentração observou-se um elevado módulo da força em média de 15pN na direção x que é onde se encontrava a solução de 0.2% de glucose. Já na direção y observamos forças em média de módulo variando de -5pN até 3pN. A figura 70 mostra os gráficos vetoriais das forças obtidas em x e y para as duas concentrações de glucose 0,2 e 0,5 % de glucose, estes gráficos foram feitos no *matemática 5.2* (Apêndice B).

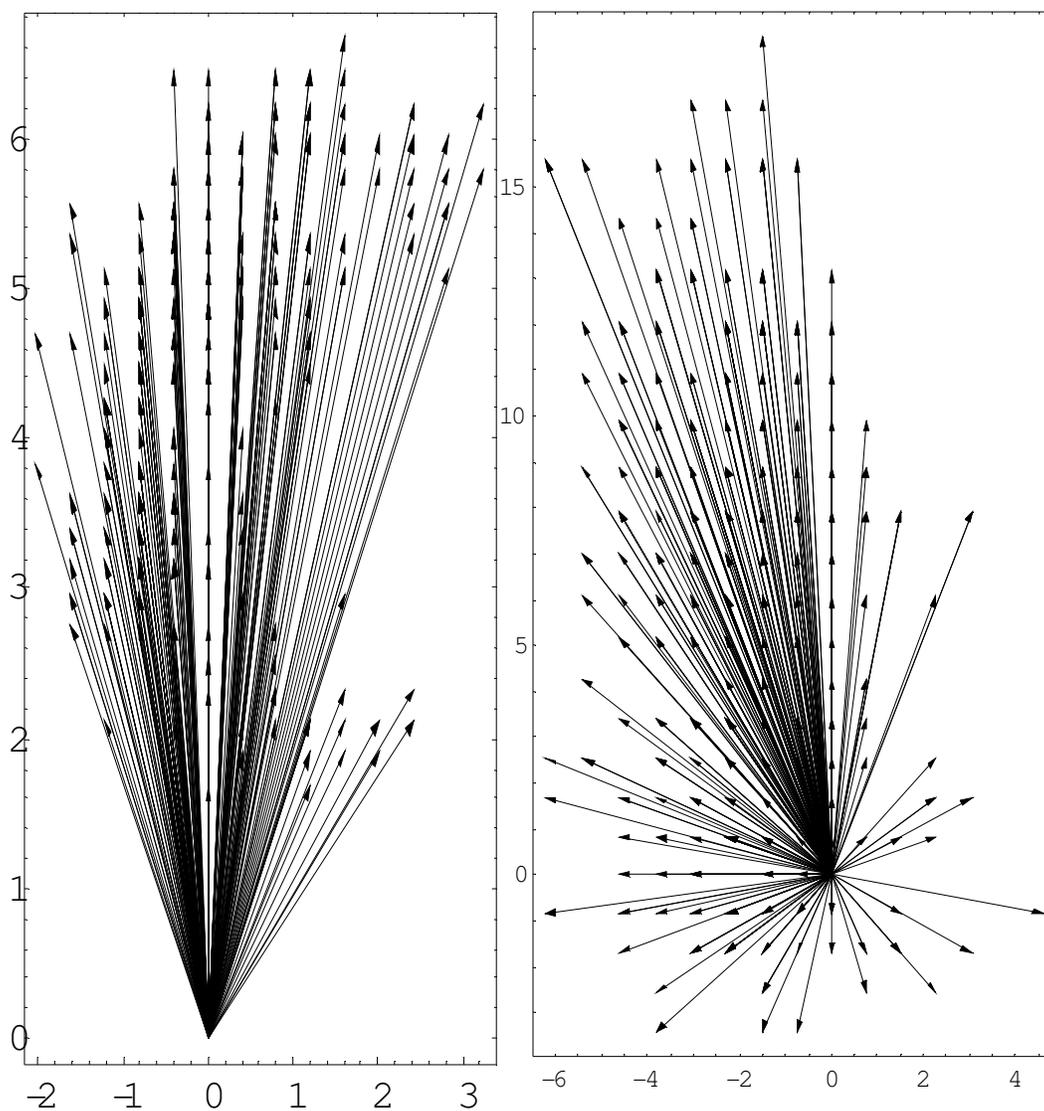


Figura 70. Gráfico vetorial das forças na direção x e y, a esquerda uma concentração de 0.5% de glucose e a direita uma concentração de 0.2% de glucose.

Nossos resultados sugerem que a direção da força e seu módulo podem também ser usados para identificar o movimento do parasita. Porque para ambos os casos, onde utilizou a substância glucose em diferentes concentrações, observou-se uma diferença nos módulos das forças tanto para a direção x como também para a direção y. O fato de que a força diminuiu com o aumento da concentração de glucose sugere que a taxia, nesse caso, se deva a diferenças de pressão osmótica, conforme observado por Leslie [19], e não quimiotaxia.

Capítulo 5

Conclusão

Nesta dissertação de mestrado desenvolvemos um sistema capaz de medir o vetor força em x e y de parasitas posicionados em um gradiente estacionário unidimensional de qualquer substância. Através da construção de uma câmara constituída de dois reservatórios ligados por um canal, pudemos observar que *Leishmania amazonensis* muda sua impulsão na presença da substância usada que foi a glucose. O comportamento observado é melhor explicado por um mecanismo de osmotaxia do que de quimiotaxia. Com esse sistema construído podemos estudar quantitativamente a taxia de qualquer parasita frente a qualquer gradiente de concentração de diferentes substâncias, ou mesmo de temperatura e outras variáveis.

Próximas etapas:

Para uma melhor quantificação dos resultados existe a necessidade de considerar um regime transiente, já que nesta abordagem partimos do principio de que o regime estacionário seria alcançado instantaneamente Assim a próxima etapa será a inclusão do tempo transiente no sistema. Os cálculos relativos a inclusão dessa nova condição já foram feitos e seguem em anexo no apêndice C.

Uma consequência desse novo modelo é a miniaturização da câmara, isso implicaria numa redução significativa do tempo transiente fazendo com que o regime estacionário seja alcançado rapidamente. As dimensões do novo dispositivo também seguem em anexo no apêndice C.

Além do projeto da nova câmara constituída de dois reservatórios e um canal construiremos novas câmaras com múltiplos reservatórios e canais, investigando assim o comportamento do parasita frente as diversas concentrações de substâncias quimioatraente ou quimiorepelentes em um mesmo dispositivo .

APÊNDICE A

Programa do *matemática* 5.1 para o cálculo da força:

```
SetOptions[NIntegrate, AccuracyGoal→2, PrecisionGoal→2, WorkingPrecision→3];
```

```
v[γ_] := {Sin[γ], 0, Cos[γ]};
```

```
δ[θ_, φ_, γ_, r_] := √((Sin[γ] Sin[θ] Cos[φ] + Cos[θ] Cos[γ])^2 -
```

```
1 + 1/r^2) + (Sin[γ] Sin[θ] Cos[φ] + Cos[θ] Cos[γ]);
```

```
cσ[θ_, φ_, γ_, r_] := (1 + (r δ[θ, φ, γ, r])^2 - r^2) / (2 r δ[θ, φ, γ, r]);
```

```
sσ[θ_, φ_, γ_, r_] := √(1 - cσ[θ, φ, γ, r]^2);
```

```
eσ[θ_, φ_, γ_, r_] := cσ[θ, φ, γ, r] + I sσ[θ, φ, γ, r];
```

```
sx[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := n sσ[θ, φ, γ, r];
```

```
cx[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := √(1 - sx[θ, φ, γ, r, n]^2);
```

```
ex[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := cx[θ, φ, γ, r, n] + I sx[θ, φ, γ, r, n];
```

```
ea[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := (eσ[θ, φ, γ, r] / ex[θ, φ, γ, r, n])^2;
```

```
eβ[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := -1 / ex[θ, φ, γ, r, n]^2;
```

```
Rs[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := (Im[eσ[θ, φ, γ, r] / ex[θ, φ, γ, r, n]] / Im[eσ[θ, φ, γ, r] * ex[θ, φ, γ, r, n]])^2;
```

```
Rp[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := (Tan[Arg[eσ[θ, φ, γ, r] / ex[θ, φ, γ, r, n]]] / Tan
```

```
[Arg[eσ[θ, φ, γ, r]*ex[θ, φ, γ, r, n]])^2;
```

```
fc[θ_, φ_, γ_, r_, n_, R_] := 1 + R eσ[θ, φ, γ, r]^2 - ((1 - R)^2  
ea[θ, φ, γ, r, n]) / (1 - R eβ[θ, φ, γ, r, n]);
```

```
fz[θ_, φ_, γ_, r_, n_, R_] := Re[fc[θ, φ, γ, r, n, R]];
```

```
fy[θ_, φ_, γ_, r_, n_, R_] := Im[fc[θ, φ, γ, r, n, R]];
```

```
z[θ_, φ_] := {-Sin[θ] Cos[φ], -Sin[θ] Sin[φ], -Cos[θ]};
```

```
y[θ_, φ_, γ_] := z[θ, φ] × (v[γ] × z[θ, φ]);
```

```
yn[θ_, φ_, γ_] := y[θ, φ, γ] / (√(y[θ, φ, γ] · y[θ, φ, γ]) + 0.0001);
```

```
fs[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := fy[θ, φ, γ, r, n, Rs[θ, φ, γ, r, n]]  
yn[θ, φ, γ] + fz[θ, φ, γ, r, n, Rs[θ, φ, γ, r, n]] z[θ, φ];
```

```
fp[θ_, φ_, γ_, r_, n_] := fy[θ, φ, γ, r, n, Rp[θ, φ, γ, r, n]]  
yn[θ, φ, γ] + fz[θ, φ, γ, r, n, Rp[θ, φ, γ, r, n]] z[θ, φ];
```

```
constante[θmax_] := Integrate[ Sin[θ] Cos[θ], {θ, 0, θmax}, {φ, 0, 2  
Pi}];
```

```
ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_, φ1_, φ2_] := NIntegrate[fs[θ, φ, γ, r, n][[1]] Sin[θ]  
Cos[θ], {θ, 0, θmax}, {φ, φ1, φ2}];
```

```
ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_, φ1_, φ2_] := NIntegrate[fs[θ, φ, γ, r, n][[3]] Sin[θ]  
Cos[θ], {θ, 0, θmax}, {φ, φ1, φ2}];
```

```
ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_, φ1_, φ2_] := NIntegrate[fp[θ, φ, γ, r, n][[1]] Sin[θ]  
Cos[θ], {θ, 0, θmax}, {φ, φ1, φ2}];
```

```
ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_, φ1_, φ2_] := NIntegrate[fp[θ, φ, γ, r, n][[3]] Sin[θ]  
Cos[θ], {θ, 0, θmax}, {φ, φ1, φ2}];
```

```
ComponenteXPolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_] := (ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 0, Pi/2] + ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi/2, Pi] + ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi, 3Pi/2] + ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 3Pi/2]);
```

```

Pi/2, 2 Pi))/constante[θmax];

ComponenteZPolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_] := (ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 0, Pi/2]+ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi/2, Pi]+ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi, 3 Pi/2]+ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 3 Pi/2, 2 Pi])/constante[θmax];

ComponenteXPolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_] := (ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 0, Pi/2]+ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi/2, Pi]+ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi, 3 Pi/2]+ComponenteXQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 3 Pi/2, 2 Pi])/constante[θmax];

ComponenteZPolarizaçãoS[γ_, r_, n_, θmax_] := (ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 0, Pi/2]+ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi/2, Pi]+ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, Pi, 3 Pi/2]+ComponenteZQuadranteφ1φ2PolarizaçãoS[γ, r, n, θmax, 3 Pi/2, 2 Pi])/constante[θmax];
(*21/09/2005*)
SetAttributes[ComponenteXPolarizaçãoS, Listable];
a=ComponenteXPolarizaçãoS[Pi/2,
{
1.17
}/2, 1.33/1.61, 57*Pi/180]
{-0.033}
F=(32* 10^-3*1.33*{0.033})/((3*10^8)/10^12)
{4.6816}

(*01/2006*)
SetAttributes[ComponenteXPolarizaçãoS, Listable];
a=ComponenteXPolarizaçãoS[Pi/2,
{
0.17795
}/4.5, 1.33/1.61, 57*Pi/180]
F=(25* 10^-3*1.33*{-
0.0109170202005782577`1.6513369257129764, })/((3*10^8)/10^12)
(*F=(P*1.33*{Q})/((3*10^8)/10^12)*)

```

APÊNDICE B

Programa do *matemática* 5.1 para gráficos vetoriais:

```

<<Graphics`PlotField`
  Vec = Table[{{1,2},{-1,2}},{{0,1},{2,3}}];
ListPlotVectorField[Vec]
Table::iterb: Iterator {{0,1},{2,3}} does not have appropriate bounds.
ListPlotVectorField::lpvf: ListPlotVectorField requires a rectangular
array of vectors or a list of {base, vector} pairs.
ListPlotVectorField[Table[{{1,2},{-1,2}},{{0,1},{2,3}}]]

ListPlotVectorField[{{0,0},{0.17795,1.95768}},{{0,0},{0.237
353,2.11542}},{{0,0},{0.118603,1.80376}},ScaleFactor->None]
-Graphics-

```

APÊNDICE C

Solução transiente da difusão:

A equação da difusão sem fontes nem sumidouros é dada por:

$$\nabla^2 C(x, y, z, t) = \frac{1}{D} \frac{\partial}{\partial t} C(x, y, z, t)$$

Temos duas soluções aqui, a estacionária, em que $\frac{\partial}{\partial t} C(x, y, z, t) = 0$, e a transiente, em que $\frac{\partial}{\partial t} C(x, y, z, t) \neq 0$. Para a solução transiente pode-se notar que soluções do tipo:

$$C(x, y, z, t) = \begin{Bmatrix} \sin k_x x \\ \cos k_x x \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} \sin k_y y \\ \cos k_y y \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} \sin k_z z \\ \cos k_z z \end{Bmatrix} e^{pt}$$

são válidas se $p = -D(k_x^2 + k_y^2 + k_z^2)$. Por outro lado impondo que as soluções laterais para y e z não tenham fluxo nas paredes, i.e.:

$$\left. \frac{\partial}{\partial y} C(x, y, z, t) \right|_{y=0} = \left. \frac{\partial}{\partial y} C(x, y, z, t) \right|_{y=w} = 0$$

$$\left. \frac{\partial}{\partial z} C(x, y, z, t) \right|_{z=0} = \left. \frac{\partial}{\partial z} C(x, y, z, t) \right|_{z=\delta} = 0$$

Percebemos que apenas as soluções coseno são possíveis, com as restrições $\sin k_y w = 0$,

ou $k_y = \frac{j\pi}{w}$, e $\sin k_z \delta = 0$, ou $k_z = \frac{m\pi}{\delta}$. Também percebe-se que a solução com

$j = m = 0$ é uma constante não nula. Como vamos depois impor que a função em $x = 0$ e $x = L$ seja uma constante independente de y e z , a solução constante é a solução adequada ao problema, que se transforma no problema unidimensional com solução do tipo:

$$C(x, t) = \left\{ \begin{array}{l} \sin k x \\ \cos k x \end{array} \right\} e^{-k^2 D t}$$

A solução estacionária é obviamente do tipo $C(x, t) = C_o [1 - \frac{x}{L}]$ de modo que a solução mais geral é da forma:

$$C(x, t) = C_o [1 - \frac{x}{L}] + \sum_k [A_k \cos kx + B_k \sin kx] e^{-k^2 D t}$$

As condições de contorno são:

Para qualquer tempo $C(0, t) = C_o$, logo $C_o = C_o + \sum_k A_k e^{-k^2 D t}$ que leva a $A_k = 0$.

Também para qualquer tempo $C(L, t) = 0$, logo $0 = \sum_k B_k \sin kL e^{-k^2 D t}$ que leva a $\sin kL = 0$ ou $k = \frac{n\pi}{L}$. Dessa forma a solução é escrita da forma:

$$C(x, t) = C_o [1 - \frac{x}{L}] + \sum_{n=1} B_n \sin(\frac{n\pi}{L} x) e^{-\frac{n^2 \pi^2 D}{L^2} t}$$

Falta a condição $C(x, 0) = 0$ para tempo nulo, que leva a:

$$0 = C_o [1 - \frac{x}{L}] + \sum_{n=1} B_n \sin(\frac{n\pi}{L} x)$$

Nesse caso precisamos da série de Fourier: $\sum_{n=1} B_n \sin(\frac{n\pi}{L} x) = -C_o [1 - \frac{x}{L}]$. Para tanto usamos o fato de que

$$\sin\left(\frac{n\pi}{L}x\right)\sin\left(\frac{m\pi}{L}x\right) = \frac{1}{2}\cos\left[\frac{(n-m)\pi}{L}x\right] - \frac{1}{2}\cos\left[\frac{(n+m)\pi}{L}x\right] \text{ para mostrar}$$

$$\text{que } \int_0^L \sin\left(\frac{n\pi}{L}x\right)\sin\left(\frac{m\pi}{L}x\right)dx = \frac{1}{2}\int_0^L \cos\left[\frac{(n-m)\pi}{L}x\right]dx - \frac{1}{2}\int_0^L \cos\left[\frac{(n+m)\pi}{L}x\right]dx = \frac{L}{2}\delta_{nm}$$

Multiplicando de ambos os lados por $\sin\left(\frac{m\pi}{L}x\right)$ e integrando de zero a L, temos:

$$\sum_{n=1}^L B_n \int_0^L \sin\left(\frac{n\pi}{L}x\right)\sin\left(\frac{m\pi}{L}x\right)dx = -C_o \left[\int_0^L \sin\left(\frac{m\pi}{L}x\right)dx - \int_0^L \frac{x}{L} \sin\left(\frac{m\pi}{L}x\right)dx \right]$$

Ou

$$\sum_{n=1}^L B_n \frac{L}{2} \delta_{nm} = -C_o \left[-\frac{L}{m\pi} \cos\left(\frac{m\pi}{L}x\right) \Big|_0^L - \left[-\frac{L}{m\pi} \frac{x}{L} \cos\left(\frac{m\pi}{L}x\right) \Big|_0^L + \frac{L}{m\pi} \int_0^L \frac{1}{L} \cos\left(\frac{m\pi}{L}x\right)dx \right] \right]$$

$$\frac{L}{2} B_m = -C_o \left[-\frac{L}{m\pi} \cos\left(\frac{m\pi}{L}\right) + \frac{L}{m\pi} + \frac{L}{m\pi} \cos\left(\frac{m\pi}{L}\right) \right] = -C_o \frac{L}{m\pi}, \text{ portanto } B_n = -C_o \frac{2}{n\pi}.$$

Com isso:

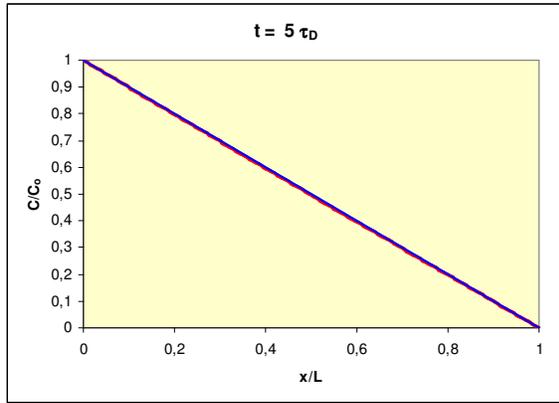
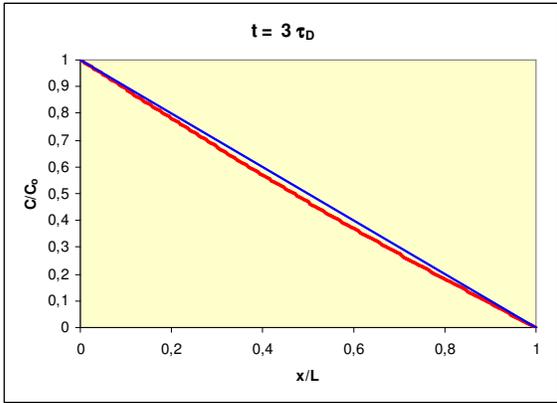
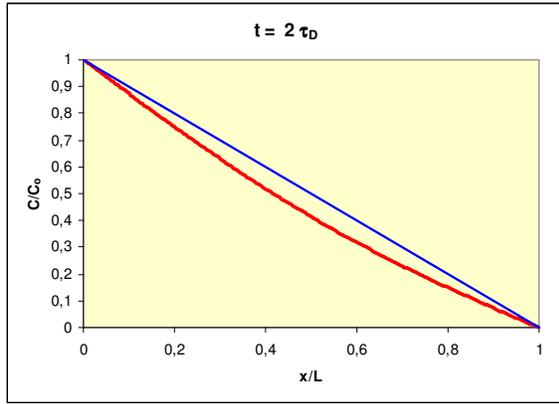
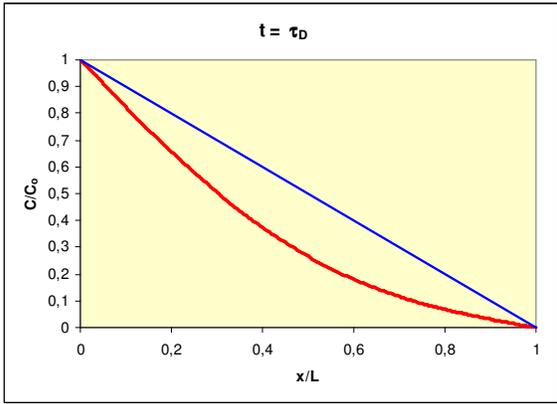
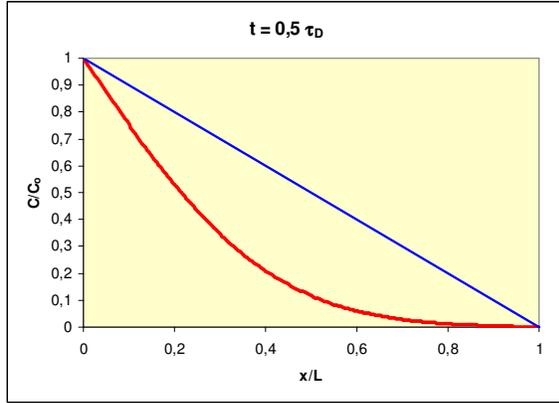
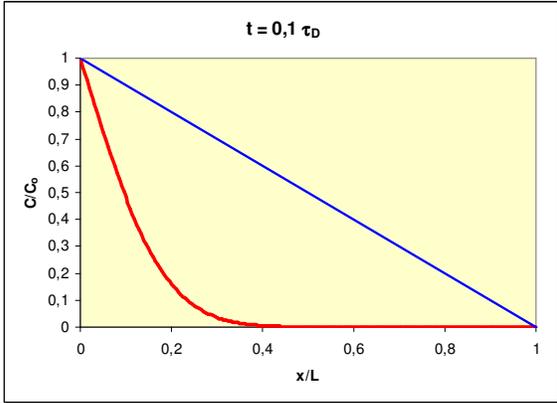
$$\frac{C(x,t)}{C_o} = 1 - \left(\frac{x}{L} \right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\sin\left[n\pi\left(\frac{x}{L}\right)\right]}{n} e^{-\frac{n^2 t}{\tau_D}} \}$$

onde $\tau_D = \frac{L^2}{\pi^2 D}$.

O tempo transiente para estabelecer o regime estacionário é dado, portanto, por

$\tau_D = \frac{L^2}{\pi^2 D}$, pois os termos de Fourier com maiores n's vão rapidamente à zero.

$$\frac{C(x,t)}{C_o} = 1 - \left(\frac{x}{L} \right) - \frac{2}{\pi} \sin\left[\pi\left(\frac{x}{L}\right)\right] e^{-\frac{t}{\tau_D}}$$



Projeto da câmara de difusão:

Queremos o tempo para atingir o regime estacionário seja curto mas o tempo para equilibrar as duas concentrações seja muito longo, ou seja $\tau_D = \frac{L^2}{\pi^2 D} \ll 1$ e

$\tau_{eq} = \frac{L V}{2 D W \delta} \gg 1$. Como a razão entre esses tempos é

$$\frac{\tau_D}{\tau_{eq}} = \frac{\frac{L^2}{\pi^2 D}}{\frac{L V}{2 D W \delta}} = \frac{L W \delta}{\pi^2 V} = \frac{V_{canal}}{\pi^2 V_{câmara}}$$

a estratégia clara é diminuir o volume do canal

principalmente através de L, para diminuir τ_D , diminuir W e aumentar $V_{câmara}$.

As dimensões da nova câmara são:

w (largura do canal) = 0.04 cm

L (comprimento do canal) = 0.04 cm

V (volume do reservatório) = 0.02 cm³

δ (profundidade do canal) = 0.01 cm

τ_D (tempo de difusão) = 9 min.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1 A.Ashkin, J. Dziedzic: “Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria”.*Science*, vol. 235, pg. 1517 -1520, 1987.
- 2 Ghislain, L. P., Switz, N. A., and Webb, W. W., Measurement of small forces using an optical trap. *Rev. Sci. Instr.* 1994. 65:2762-2768.
- 3 Finer, J. T., R. M. Simmons, and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 368:113–119.
- 4 Molloy, J. E., J. E. Burns, J. Kendrick-Jones, R. T. Tregear, and D. C. White. 1995. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*. 378:209–212.
- 5 Wang, M. D., M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. 1998. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*. 282:902–907.
- 6 Warshaw, D. M., W. H. Guilford, Y. Freyzon, E. Kremontsova, K. A. Palmiter, M. J. Tyska, J. E. Baker, and K. M. Trybus. 2000. The light chain binding domain of expressed smooth muscle heavy meromyosin acts as a mechanical lever. *J. Biol. Chem.* 275:37167–37172.
- 7 Block, S. M., L. S. Goldstein, and B. J. Schnapp. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*. 348: 348–352.
- 8 Fletcher, D.A. & Theriot, J.A. (2004), 'An introduction to cell motility for the physical scientist', *Physical Biology* **1**, T1-T10.
- 9 Berg HC & Brown DA (1972) Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* 239: 500–504.
- 10 Berg H C 2003 The rotary motor of bacterial flagella *Ann. Rev. Biochem.* 72 19– 54.
- 11 Cluzel, P.; Surette, M. & Leibler, S. (2000), 'An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells', *SCIENCE* **287**(5458), 1652--1655.
- 12 E. M. Purcell: “Life at Low Reynolds Number”. *A. J. Phys.* 45 (3), pg. 124, 1977.

-
- 13** Who, World Health Organization, 2001.
- 14** Cunningham, A.C. Parasite adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology* 72: 132-141, 2002.
- 15** Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R.; Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 36(1): 71-80, 2003.
- 16** Handman, E. & Bullem, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology* 18(8) 332-334, 2002.
- 17** Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes – FIOCRUZ (www.fiocruz.br/ctbio).
- 18** Bray, R.S. (1983), 'Leishmaniachemotaxic Responses Of Promastigotes And Macrophages Invitro', *Journal Of Protozoology* 30(2), 322--329.
- 19** Oliveira, J.S., Melo, M.N., Gontijo, N.F., 2000. A sensitive method for assaying chemotaxic responses of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 96, 187–189.
- 20** Leslie, G., Barrett, M., Burchmore, R., 2002. *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. *Experimental Parasitology* 102, 117–120.
- 21** Aaron M. J. Law and Michael D. Aitken , Continuous-Flow Capillary Assay for Measuring Bacterial Chemotaxis, *Applied And Environmental Microbiology*, June 2005, p. 3137–3143.
- 22** V.C. Barros a, J.S. Oliveira b, M.N. Melo a, N.F. Gontijo, *Leishmania amazonensis*: Chemotaxic and osmotaxic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut, *Experimental Parasitology* 112 (2006) 152–157.
- 23** P.S.T. Veras, A Topilko, N. Gouhier, M.F. Moreau, M. Rabinovitch, M. Pouchelet:

“Fusion of *Leishmania amazonensis* parasitophorous vacuoles with phagosomes containing zymosan particles: Cinemicrographic and ultrastructural observations”, *Braz. J. Med. Biol. Res* 29, pg. 1009, 1996.

24 J. A Maga, J.H. LeBowitz: “Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod”, *Trends Cell Biol.* 9, pg. 409, 1999.

25 H. Liang, W. H. Wright, W. He, M. W. Berns. “Micromanipulation of chromosomes in PTK-2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laserinduced optical forces (optical tweezers)”. *Exp. Cell Res.* 204 (1), pg.110, 1993.

26 Israelachvili Jn, Adams Ge , Measurement Of Forces Between 2 Mica Surfaces In Aqueous-Electrolyte Solutions In Range 0-100 Nm, *Journal Of The Chemical Society-Faraday Transactions I* 74: 975-& Part 4, 1978.

27 Binnig G, Smith Dpe, Single-Tube 3-Dimensional Scanner For Scanning Tunneling Microscopy, *Review Of Scientific Instruments* 57 (8): 1688-1689 Part 1, Aug 1986.

28 Evans E, Cooley J, Remoldodonnell E, Characterization And Chromosomal Localization Of Elanh2, The Gene Encoding Human, *Genomics* 28 (2): 235-240 Jul 20 1995.

29 Leckband, D. 2000.”Measuring The Forces That Control Protein Interactions”. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.***29**:1–26.

30 Hecht, E. (1987) *Optics*. 2nd Ed. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.

31 Blaschitz et al., "Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er : YAG) laser", *Hum Reprod* 12, 2242 (1997).

32 Ashkin, A. (1970) Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev.Lett.*, 24, 156-159.

-
- 33** A.Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm, S. Chu: Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles". Optics Lett. 11, pg. 288, 1986
- 34** [Anon], "Optical tweezer attaches single DNA molecular to silicon", Laser Focus World 34, 9-9 (1998).
- 35** C.S. Buer, K.T. Gahagan, A. Grover A et al., "Insertion of Agrobacterium rhizogenes into Ginkgo biloba using lasers as optical tweezers and scalpel", Plant Physiol 114, 1613 (1997).
- 36** R.R. Huruta, M.L. BarjasCastro, S.T.O. Saad, F.F. Costa and C.L. Cesar, "A new method to study mechanical properties of red blood cells using optical tweezer", Blood 90, 9-9 (1997).
- 37** S. Sugiura, N. Kobayakawa, H. Fujita et al., "Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique - Molecular basis for cardiac adaptation", Circ Res 82, 1029 (1998).
- 38** N. Thomas, R.A. Thornhill, "The physics of biological molecular motors", J Phys D Appl Phys 31, 253 (1998).
- 39** H. Felgner, R. Frank, M. Schliwa,"Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers", J Cell Sci 109, 509 (1996).
- 40** K. Sakata-Sogawa, M. Kurachi, K. Sogawa K et al.,"Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions", Eur Biophys J Biophys 27, 55 (1998).
- 41** K. Konig, L. Svaasand, Y.G. Liu et al.,"Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap", Cell Mol Biol 42, 501 (1996).
- 42** K. Helmerson, R. Kishore, W.D. Phillips et al.,"Optical tweezers-based immunosensor detects femtomolar concentrations of antigens", Clin Chem 43, 379 (1997).

43 H.C. Berg, R.M. Berry, "Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers", *P Natl Acad Sci USA* **94**, 14433 (1997).

44 Gordon J. P. "Radiation forces and momenta in dielectric media"- *Phys.Rev.A* **8**:14-21.

45 K. Svoboda and S. M. Block, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247–285 (1994).

46 K. Groebe, S.Ers, W. Mueller-Klieser, "Glucose Diffusion Coefficient Determined from concentration profiles in EMT6 tumor spheroids incubated in radioactively labeled L-glucose" *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. **361**: 619-625.

47 S. E. Rice, T. J. Purcell, and J. A. Spudich, *Methods Enzymol.* **361**, 112 (2003).

48 A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer, *J. Appl. Phys.* **91**, 5474 (2002).

49 F. Gittes and C. F. Schmidt, *Opt. Lett.* **23**, 7 (1998).

50 M. W. Allersma *et al.*, *Biophys. J.* **74**, 1074 (1998).