Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DOS FENÔMENOS
ANISOTRÓPICOS DO COLÁGENO APÓS IRRADIAÇÃO
COM *LASER* POLARIZADO DE EMISSÃO VERMELHA**

Daniela de Fátima Teixeira da Silva

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais**

**Orientadora:
Dra. Martha Simões Ribeiro**

**Co-orientador:
Dr. Benedicto de Campos Vidal**

São Paulo

2007

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DOS FENÔMENOS
ANISOTRÓPICOS DO COLÁGENO APÓS IRRADIAÇÃO
COM *LASER* POLARIZADO DE EMISSÃO VERMELHA**

Daniela de Fátima Teixeira da Silva

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais**

**Orientadora:
Dra. Martha Simões Ribeiro**

**Co-orientador:
Dr. Benedicto de Campos Vidal**

São Paulo

2007

*Dedico este trabalho ao meu pai, Eraldo
(in memoriam), a minha mãe, Olívia,
meu irmão, João Carlos, minhas irmãs,
Eliane e Fernanda, às amigas de sempre,
Renata e Lourdes, como prova de gratidão
pela estrutura, apoio e carinho que me dão.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^{ra}. Dra. Martha Simões Ribeiro, pela orientação e confiança. Cultivar uma verdadeira amizade requer dedicação e tempo e acho que conseguimos isto nestes nove anos de convivência! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelos ensinamentos, principalmente na arte da microscopia de polarização, e disposição em ajudar, sempre!

À Prof^{ra}. Dra. Denise Maria Zezell, pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho. Também, obrigada por ceder a sala para irradiação e manuseio dos animais!

Ao Prof. Dr. Anderson S. L. Gomes, pela acolhida, pela paciência e dicas preciosas para a realização do experimento de geração de segundo harmônico.

Ao Prof. Dr. Renato E. de Araújo, pela disposição em contribuir, e ao Diego Rativa, pela ajuda e companheirismo durante todo o experimento de geração de segundo harmônico.

Às colegas Marcela Aldrovani e Flávia, pelo auxílio e companheirismo durante a preparação das amostras biológicas.

À CAPES, pelo financiamento desta pesquisa.

Ao IPEN, pela infra-estrutura fornecida.

Ao CLA, por oferecer as condições necessárias para execução deste trabalho.

Ao Biotério do IPEN, pela pronta colaboração e doação dos animais, em especial à Dra. Nanci do Nascimento, Neide, Cícero e André.

Aos colegas do Departamento de Física da UFPE, em especial à Mariana, João e Bernardo, pelo companheirismo e afável acolhida.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular do IB-UNICAMP, em especial ao Juliano e Alberto, pela constante disposição em ajudar.

Às amigas Adriana Ribeiro e Renata Maciel, e aos seus pais, pelo carinho, confiança e acolhida mais do que familiar! Muito obrigada por tudo, inclusive por me apresentarem o maravilhoso Pernambuco!

A todos os professores do CLA que contribuíram para este trabalho, em especial ao Msc. Anderson Zanardi, Dr. Luis Tarelho, Dr. Nilson Dias, Dr. Ricardo Samad e Dra. Sônia Baldochi.

Ao amigo e prof. Luciano Bachmann, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP, campus Ribeirão Preto, pelas sugestões dadas.

Aos amigos do CLA, Aécio Yamada, Aguinaldo Garcez, Cláudia Emílio, Cristina Hashimoto, Ilka Kato, Luís Cláudio, Patrícia da Ana, Renato Prates, Sílvia Nuñez e Stella Sugayama, pelas discussões e descontrações!

À equipe da Divisão de Ensino, em especial ao Fernando, pela atenção e instruções valiosas.

Aos secretários do CLA, Elza e Sr. Tito, pela disposição em ajudar, sempre.

Ao Sr. Luiz, segurança do CLA, pela simpatia e profissionalismo sempre presentes.

À minha mãe, Olívia, meu irmão João Carlos, minhas irmãs Eliane e Fernanda, por entenderem e apoiarem minha vida acadêmica!

Aos cunhados Mônica, João Rocha e Luís, pelos momentos de descontração!

Aos meus amores, Thaís e João Luca, pelas brincadeiras, risos e sonhos!

À toda minha família, por acompanhar, torcer e rezar por mim!

À Renata Alves, Lourdes e Karina, pela paciência e convivência!

Aos meus amigos, pelo apoio e humor!

A Deus, pela força de vontade e crença num mundo melhor, tão necessários nos dias de hoje.

CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DOS FENÔMENOS ANISOTRÓPICOS DO COLÁGENO APÓS IRRADIAÇÃO COM *LASER* POLARIZADO DE EMISSÃO VERMELHA

Daniela de Fátima Teixeira da Silva

RESUMO

O colágeno é a forma funcional de um oligômero biológico, cujos monômeros são aminoácidos quirais. Tecidos ricos em colágeno são estruturas opticamente anisotrópicas, birrefringentes e não-lineares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o colágeno tipo I não irradiado e após irradiação com *laser* de He-Ne polarizado, utilizando a microscopia de polarização para investigação da birrefringência, e a geração de segundo harmônico (GSH) para análise da susceptibilidade não-linear. Doze ratos Wistar foram divididos em quatro grupos, de acordo com as idades: 34, 48, 62 e 76 dias. Os grupos receberam, respectivamente, 1; 5; 9 e 13 irradiações de $D = 1 \text{ J/cm}^2$, durante 46s, no tendão de Aquiles que, aleatoriamente, foi escolhido ser o direito ou esquerdo. Os animais foram então sacrificados e os tendões extraídos para a preparação das amostras. Para a microscopia de polarização foram obtidos cortes com $8 \mu\text{m}$ de espessura, e as birrefringências de forma e intrínseca foram avaliadas. Para a GSH foi utilizado um *laser* de Ti:Safira (150fs) com 76MHz de taxa de repetição, diâmetro do feixe $\phi = 40 \mu\text{m}$, comprimento de onda central $\lambda = 800 \text{ nm}$ e $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$ e $P_p = 110 \text{ mW}$. Um polarizador linear foi posicionado no caminho do feixe. Duas objetivas foram utilizadas para focalizar e coletar a radiação incidente e emergente da amostra, respectivamente. Um analisador, também linear, foi introduzido logo após a objetiva coletora. Um filtro absorvedor na faixa infravermelha do espectro eletromagnético, mas transmissor na faixa azul, foi utilizado para garantir que apenas $\lambda = 400 \text{ nm}$ era medido. A razão, ρ , entre dois tensores de hiperpolarizabilidade independentes foi estudada. As amostras irradiadas apresentaram maior birrefringência (Δn) e maior susceptibilidade não-linear (ρ), em comparação com as não irradiadas. Estes resultados indicam que o *laser* de He-Ne polarizado alinha as fibrilas de colágeno ao longo eixo do tendão.

CARACTERIZATION AND MODELLING OF COLLAGEN ANISOTROPICAL PHENOMENONS AFTER IRRADIATION WITH RED EMISSION POLARIZED LASER

Daniela de Fátima Teixeira da Silva

ABSTRACT

The collagen is the functional form of a biological oligomer whose monomers are chiral amino acids. Tissues filled up of collagen are anisotropic optically structures, birefringent and nonlinear. The purpose of this study was characterizing nonirradiated and polarized He-Ne *laser* irradiated type I collagen using polarized light microscopy to investigate the birefringence and the second harmonic generation (SHG) to analyze the nonlinear susceptibility. Twelve Wistar rats were alienated into four groups according to the ages: 34, 48, 62 and 76 days. The groups received, respectively, 1; 5; 9; and 13 irradiations of $D= 1\text{J}/\text{cm}^2$ during 46s on Achilles tendon, which was chosen randomly as right or left. Thereafter, the animals were sacrificed and the tendons were extracted to prepare the specimens. For polarized light microscopy, eight- μm sections were obtained to evaluate the form and intrinsic birefringences. For SHG, it was used a Ti:Safira (150fs) *laser* at a repetition rate of 76MHz, beam diameter of $\phi= 40\mu\text{m}$, wavelength of $\lambda= 800\text{nm}$ and $\Delta\lambda= 10\text{nm}$ and $P_p= 110\text{mW}$. The beam passed through a linear polarizer and two microscope objectives were used to focalize and collect the incident and emergent radiation, respectively. A second linear polarizer was placed after of collecting objective. An infrared absorber and blue transmitter filter was used a sure that only $\lambda= 400\text{nm}$ was measured. The ratio, ρ , between two hyperpolarizability tensors was studied. The irradiated samples presented higher birefringence (Δn) and nonlinear susceptibility (ρ) when compared to nonirradiated samples. These results indicate that a polarized He-Ne *laser* aligns the collagen fibrils to the long tendon axis.

SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Justificativa e Objetivos.....	03
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 Colágeno Tipo I.....	04
2.2 Interação da Luz com o Colágeno.....	13
2.2.1. Dispersão.....	14
2.3 Birrefringência e Colágeno.....	23
2.4 Geração de Segundo Harmônico e Colágeno.....	28
3. METODOLOGIA.....	33
3.1 Animais de Experimentação.....	33
3.2 Irradiação com <i>laser</i> de He-Ne.....	34
3.3 Preparação das Amostras.....	35
3.4 Microscopia de Polarização.....	37
3.5 Geração de Segundo Harmônico.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Microscopia de Polarização.....	42
4.2 Geração de Segundo Harmônico.....	51
4.3 Modelo Descritivo.....	59
5. CONCLUSÕES.....	63
APÊNDICE A: Macromoléculas Biológicas.....	64
APÊNDICE B: Teoria Eletromagnética.....	74
APÊNDICE C: Birrefringência.....	84
APÊNDICE D: Óptica Não-Linear.....	92
APÊNDICE E: Ângulos lidos no microscópio. Birrefringência de forma.....	101
APÊNDICE F: Ângulos lidos no microscópio. Birrefringência intrínseca.....	102
APÊNDICE G: Sinal do Segundo Harmônico Medido.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

LISTA DE FIGURAS

	Página
2.1	Coordenadas cartesianas segundo regra da mão direita..... 04
2.2	Resumo das principais características estruturais do colágeno..... 12
2.3	Subestruturas do feixe de colágeno tipo I e as principais técnicas de análise.. 12
2.4	Estruturas do colágeno, salientando o enrolamento das hélices..... 16
2.5	Orientação dos vetores E , D , S e k 22
3.6	Esquema de um rato, apontando o calcanhar de Aquiles..... 33
3.7	Esquema do sistema óptico montado para irradiação dos calcanhares..... 34
3.8	Esquema do tendão e dos cortes realizados no micrótomo..... 36
3.9	Esquema experimental para medição da birrefringência..... 37
3.10	Esquema do aparato para geração e medição do segundo harmônico..... 39
3.11	Sistema de coordenadas do aparato experimental da GSH..... 40
4.12	Retardos ópticos obtidos para as amostras estudadas..... 47
4.13	Curva das amostras não irradiadas dos animais com 34 dias de idade..... 54
4.14	Curva das amostras irradiadas dos animais com 34 dias de idade..... 54
4.15	Curva das amostras não irradiadas dos animais com 48 dias de idade..... 55
4.16	Curva das amostras irradiadas dos animais com 48 dias de idade..... 55
4.17	Curva das amostras não irradiadas dos animais com 62 dias de idade..... 56
4.18	Curva das amostras irradiadas dos animais com 62 dias de idade..... 56
4.19	Curva das amostras não irradiadas dos animais com 76 dias de idade..... 57
4.20	Curva das amostras irradiadas dos animais com 76 dias de idade..... 57
4.21	Esquema e características dos eixos (n_o) e (n_e) da molécula de colágeno..... 60
A.1	Energia das interações moleculares..... 68
A.2	Exemplos de simetria especular e rotacional..... 70
A.3	Estrutura geral de um aminoácido..... 71
A.4	Os vinte aminoácidos mais comuns..... 71
B.5	Campo elétrico E não estacionário..... 76
B.6	Campos E e B para uma onda com polarização linear..... 79
C.7	Feixe luminoso ao atravessar uma seção principal da calcita..... 86
C.8	Atividade óptica do quartzo..... 87
D.9	Geometria e diagrama de nível da geração de segundo harmônico..... 97
D.10	Intensidade do segundo harmônico em função de θ 99
D.11	Superfícies dos índices de refração para o cristal KDP..... 100

LISTA DE TABELAS

	Página
3.1 Divisão dos animais entre os quatro grupos estudados.....	35
4.2 Diferenças intragrupos de Δn medido em água.....	42
4.3 Diferenças intragrupos de Δn medido em glicerina.....	43
4.4 Comparação intergrupos de Δn medido em água. Tendões controle.....	44
4.5 Comparação intergrupos de Δn medido em glicerina. Tendões controle.....	45
4.6 Comparação intergrupos de Δn medido em água. Tendões irradiados.....	45
4.7 Comparação intergrupos de Δn medido em glicerina. Tendões irradiados.....	46
4.8 Sinal do segundo harmônico, de acordo com $Z(0^\circ)$ e $Z(90^\circ)$	51
A.1 Estrutura das macromoléculas.....	65
A.2 Relação das interações não covalentes com a distância.....	69
A.3 Simetria de algumas macromoléculas helicoidais.....	73

TABELA DE SÍMBOLOS

Fator	Prefixo	Símbolo
10^{-24}	yocto	y
10^{-21}	zepto	z
10^{-18}	atto	a
10^{-15}	femto	f
10^{-12}	pico	p
10^{-9}	nano	n
10^{-6}	micro	μ
10^{-3}	mili	m
10^{-2}	centi	c
10^{-1}	deci	d
10^1	deca	da
10^2	hecto	h
10^3	quilo	k
10^6	mega	M
10^9	giga	G
10^{12}	tera	T
10^{15}	peta	P
10^{18}	exa	E
10^{21}	zetta	Z
10^{24}	yotta	Y

TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	: área	μ	: permeabilidade magnética
esu	: cargas em unidades eletrostáticas	μ_0	: permeabilidade magnética do vácuo
λ	: comprimento de onda	ε	: permissividade elétrica
κ_M	: constante de permeabilidade relativa	ε_0	: permissividade elétrica do vácuo
h	: constante de Planck	P	: potência
κ_E	: constante dielétrica	Δn	: retardo óptico ou birrefringência
C	: coulomb	s	: segundos
D	: dose	t	: tempo
eV	: elétron-volt	β	: tensor de hiperpolarizabilidade
E	: energia	c	: velocidade da onda eletromagnética
F	: força	v	: velocidade de fase
ω	: frequência	$v_{\parallel}$	: velocidade o eixo extraordinário
v	: frequência do fóton	$v_{\perp}$	: velocidade o eixo ordinário
GSH	: geração de segundo harmônico	E	: vetor campo elétrico
$^{\circ}\text{C}$	: graus Celsius	B	: vetor campo magnético
He-Ne	: hélio e neônio	S	: vetor de Poynting
Z_0	: impedância do vácuo	k	: vetor de propagação
n	: índice de refração	D	: vetor deslocamento elétrico
n_e	: índice de refração extraordinário	P	: vetor polarização elétrica
n_o	: índice de refração ordinário	V	: volt
I	: intensidade	W	: watt
J	: joule		
Ω	: ohm		
ρ	: parâmetro das hiperpolarizabilidades relativas ao longo dos eixos Z e X do tendão		

1. INTRODUÇÃO

Historiadores reportam que civilizações antigas, como a egípcia, a grega e a asteca, conheciam os benefícios da exposição corporal à luz solar: os egípcios teriam usado luz e extratos de plantas para tratar desordens da pele, e na Grécia, Heródoto observou que a exposição à luz solar poderia fortalecer os ossos. Estas seriam as primeiras observações do que hoje é denominado fotobiologia [1].

No entanto, a ação da luz sobre os vários tecidos animais e humanos permaneceu por um longo tempo inexplorada. Somente após o surgimento dos *lasers*, um novo impulso foi dado à interação da radiação com a matéria, devido às suas propriedades: coerência, colimação e monocromaticidade. A emissão estimulada foi descrita pela primeira vez em 1917, por Einstein, de forma teórica. Em 1958, Townes e Arthur L. Schawlow expuseram as condições físicas gerais que se deveriam verificar para desencadear a amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation - LASER*). Finalmente, em julho de 1960, Theodore H. Maiman anunciou o funcionamento bem sucedido de um *laser* – certamente um dos grandes marcos da história da óptica e da história da ciência [2].

Em fevereiro de 1961, Ali Javan, W.R. Bennett e D. R. Herriott anunciaram o funcionamento bem sucedido de um *laser* gasoso contínuo de hélio-neônio (He-Ne), com um comprimento de onda de 1152,3nm [2]. O *laser* de He-Ne é ainda um dos *lasers* mais populares, funcionando principalmente na faixa visível do espectro eletromagnético (632,8nm) e fornecendo alguns miliwatts de potência contínua. Desde então, aplicações biológicas e médicas do *laser* de He-Ne são rotineiras e os fenômenos fotobiológicos são importantes para a ciência [3-6].

Recente trabalho de Silva *et al.* mostrou que o vetor campo elétrico da radiação *laser* linearmente polarizada afeta a organização do colágeno na derme, pois lesões irradiadas usando a polarização alinhada em paralelo com a direção da coluna vertebral mostraram maior retardo óptico, indicando que os feixes de colágeno estavam mais organizados do que nas lesões irradiadas usando a direção perpendicular relativa [7]. Por sua vez, o colágeno mais ordenado é importante para melhorar as propriedades mecânicas

dos tecidos. Na ortopedia, por exemplo, é relevante para suprir a perda da densidade mineral provocada por longos exercícios físicos ou disfunções ósseas [8-10]. Assim, estudar a interação da radiação *laser* com o tecido biológico é de extrema importância para fundamentar os efeitos observados.

O colágeno é uma proteína de importância vital na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. No homem, existem pelo menos 28 tipos de colágeno, cada um com diferentes funções. O colágeno tipo I, encontrado na pele, tendões, ossos e outros tecidos conjuntivos de animais vertebrados, está entre as mais abundantes proteínas nos organismos vivos e por isso foi escolhido para ser o alvo de estudo [11]. Nos tendões, no qual a concentração de colágeno pode atingir 80 a 90% de massa seca, as fibras de colágeno podem ser relacionadas diretamente à função biomecânica de transmissão de força do músculo ao osso [12].

Moléculas de colágeno têm dimensões nanométricas, cerca de 300nm de comprimento e 1,43nm de diâmetro e constroem superestruturas, como os tendões, por meio de auto-arranjo, de acordo com as leis da química supramolecular [13]. Microfibrilas são formadas a partir de cinco moléculas de colágeno. Várias microfibrilas formam fibrilas, que formam fibras, que formam feixes. O colágeno e suas propriedades serão detalhados no capítulo **dois**. Entretanto, devido à interdisciplinaridade deste trabalho, os **APÊNDICES A e B** apresentam os aspectos mais relevantes da bioquímica física de macromoléculas, e a teoria eletromagnética, respectivamente, que não têm a intenção de detalhar e exaurir os tópicos, mas sim, destacar os aspectos mais relevantes para a compreensão dos resultados obtidos.

O alto grau de ordenamento longitudinal das fibrilas, que se estende ao nível organizacional dos feixes, é um consenso na literatura há décadas e é responsável por suas anisotropias ópticas, como a birrefringência e a susceptibilidade não-linear [14, 15].

Neste trabalho, a birrefringência do colágeno foi estudada por meio da microscopia de polarização. O brilho exibido por um objeto birrefringente é devido à diferença de caminho óptico, ou retardo óptico $\Delta n = (n_e - n_o)$. O colágeno, quando colocado entre dois polarizadores, tal como ocorre em um microscópio de polarização, exibe um máximo de brilho quando um dos seus eixos de propagação é colocado a 45° em relação aos tais polarizadores. Assim, a luz polarizada sai do colágeno em duas frentes de onda, após percorrê-lo. Estas duas frentes apresentam uma diferença de fase, a qual se relaciona com o retardo óptico (**APÊNDICE C**). Quanto maior a diferença de fase da amostra, maior

é o retardo óptico e mais ordenada é a estrutura em torno dos eixos ordinário ou extraordinário [14]. Além disso, o colágeno é composto por moléculas dotadas de um tensor de polarizabilidade anisotrópica, e possui susceptibilidade de segunda ordem, que é sensível às mudanças estruturais sofridas pelas moléculas, permitindo seu estudo por intermédio da geração de segundo harmônico (**APÊNDICE D**).

1.1 Justificativa e Objetivos

Já que o colágeno é o componente estrutural predominante na maioria dos tecidos biológicos e a maior fonte biológica de geração de segundo harmônico (GSH), é possível assumir que mudanças no sinal do harmônico podem ser atribuídas às mudanças estruturais desses tecidos [16]. A análise das mudanças da birrefringência e da susceptibilidade não-linear causadas pela irradiação com *laser* de baixa potência utilizando a microscopia de polarização e a GSH, respectivamente, no melhor de nosso conhecimento, ainda não foi realizada, tampouco um modelo para descrever o comportamento desta macromolécula após irradiação *laser*.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho são:

- ❶ Caracterizar o colágeno tipo I por meio da birrefringência, utilizando a microscopia de polarização.
- ❷ Caracterizar o colágeno tipo I por meio da susceptibilidade não-linear, utilizando a geração de segundo harmônico.
- ❸ Comparar os resultados obtidos utilizando colágeno não irradiado e colágeno irradiado com um *laser* de baixa potência de He-Ne linearmente polarizado.
- ❹ Modelar descritivamente os fenômenos observados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Colágeno Tipo I

O colágeno é uma proteína fibrosa que não tem simetria especular, ou seja, é uma macromolécula quiral, porém é dotado de simetria rotacional (vide **APÊNDICE A**). Para expressar a relação de simetria, matematicamente, é preciso definir algumas convenções, as quais serão utilizadas por todo este trabalho. A estrutura será descrita por um modelo no qual cada átomo de uma molécula é localizado em um único conjunto de coordenadas (x, y, z) no espaço. Estas coordenadas serão representadas pelo sistema cartesiano, segundo regra da mão direita (**FIG. 2.1**).

FIGURA 2.1: Coordenadas cartesianas segundo regra da mão direita, representando rotação positiva de x para y, ao redor do eixo z, o qual será o longo eixo da molécula.

O colágeno tipo I, encontrado na pele, tendões, ossos e outros tecidos conjuntivos de animais vertebrados, está entre as mais abundantes proteínas nos organismos vivos [11]. Nos tendões, no qual a concentração de colágeno pode atingir 80 a 90% de massa seca, as fibras de colágeno podem ser relacionadas diretamente à função biomecânica de transmissão de força do músculo ao osso [12].

No colágeno, a estrutura primária é caracterizada pelo fato de que na sequência de aminoácidos, toda terceira posição é ocupada pela glicina. Especificamente no colágeno tipo I, as moléculas são dispostas lado a lado e escalonadas umas às outras, estabilizadas por ligações covalentes cruzadas e intermoleculares, para formar microfibrilas. Isto é um consenso na literatura, porém, por que isto ocorre e como se comporta dinamicamente a cadeia polipeptídica, são perguntas que ainda instigam os bioquímicos.

A importância das ligações cruzadas na estabilização da molécula de colágeno é investigada desde a década de sessenta. De acordo com Milch *et al.* [17], há diferenças nas propriedades dielétricas entre pele controle e pele tratada com aldeídos que promovem aumento das ligações cruzadas. Uma significativa diminuição no momento de dipolo e perda dielétrica foi verificada nas peles tratadas com agentes que aumentaram as ligações cruzadas, sugerindo que dipolos, os quais normalmente deveriam contribuir com a constante dielétrica, são na verdade aprisionados nestas estruturas, perdendo mobilidade e não rodando de acordo com o campo elétrico. Então, tal tratamento tornou a pele um ótimo isolante, melhor até que a pele controle. Ela apresentou perda de condutividade em consequência da diminuição do número de cargas e/ou diminuição da mobilidade dos íons existentes nas cadeias polipeptídicas e/ou pelo aumento do número de ligações com as cadeias polipeptídicas do colágeno. A pele tratada com outro aldeído, o qual promove poucas ligações cruzadas, quando fervida, não diferenciou muito da pele não fervida, tanto para corrente alternada quanto para contínua. Pôde-se presumir que este aldeído foi capaz de introduzir apenas ligações relativamente fracas que não alteraram severamente a estrutura topográfica da rede de colágeno. Os aldeídos que têm a capacidade de aumentar bastante o número de ligações cruzadas alteram a rede molecular do colágeno, conforme evidenciado pela diminuição pronunciada em todos os parâmetros elétricos observados. Além disso, o fato dos efeitos concedidos por estes aldeídos não serem rapidamente reversíveis – quando reversíveis - pela fervura em água, sugeriram que ligações introduzidas por eles foram consideravelmente mais fortes do que aquelas introduzidas pelo primeiro aldeído. Também pôde ser inferido que o encolhimento térmico (contração axial) é importantemente relacionado à natureza e força de íons específicos e/ou dipolos no meio particular em que os espécimes são embebidos.

Segundo Ramshaw e colaboradores [18], mais de quatrocentas combinações são possíveis para o tripleto X - Y - Gly (sendo X e Y dois aminoácidos quaisquer). Porém a análise da sequência observada em colágeno fibrilar e não fibrilar, mostrou que somente um número limitado de combinações desse tripleto foi encontrado em quantidade significativa e muitas combinações nem foram observadas. A sequência que mais apareceu foi a glicina, prolina e hidroxiprolina.

Para Samouillan e co-autores [19], o fato da glicina ser sempre o terceiro aminoácido é um pré-requisito para a conformação da tripla hélice. O termograma do colágeno foi caracterizado por um pico endotérmico por volta de 226°C e por analogia com trabalhos prévios, este pico foi atribuído à desnaturação do colágeno desidratado, isto é, a

sua transição de estado helicoidal para gelatinoso, induzida pela ruptura térmica dos hidrogênios ligados. Também foram realizadas medições de relaxação dielétrica, as quais foram gravadas até 180°C, pois acima disto iniciava-se a desnaturação, acompanhada por encolhimento das fibras. O tempo de relaxação dielétrica mostrou-se dependente da temperatura e em torno de 20°C foi de $\tau_0 = 6,97 \cdot 10^{-11}$ s, com entalpia de ativação $\Delta H = 78,9$ kJ/mol. A entalpia de ativação de processos a baixas temperaturas sugere que a mobilidade molecular é localizada. Um ligeiro aumento da entalpia foi observado acima de 90°C, indicando efeito menos localizado. O trabalho concluiu que o colágeno possui características peculiares de um forte líquido.

No entanto, na pesquisa de Melacini e colaboradores [20] fica mais clara a relação entre a glicina, os hidrogênios ligados e estabilização da hélice sugerida no trabalho anterior. De fato, as três cadeias peptídicas do colágeno são escalonadas por um resíduo, e isto ocorre devido aos hidrogênios ligados entre o longo eixo das cadeias. As três cadeias são empacotadas ao redor de um eixo helicoidal, requerendo que a glicina esteja presente em toda terceira posição. Isto leva à sequência de repetição primária X - Y - Gly. No colágeno tipo I, o tripleto mais comum é Pro-Hyp-Gly, onde Hyp é a 4-hidroxiprolina, resultante da modificação enzimática da prolina. A Hyp contribui para estabilidade termodinâmica da tripla hélice. Mas parte da estabilização promovida pela Hyp não pode ser explicada diretamente pelas ligações de hidrogênio porque aceitadores disponíveis na tripla hélice não são estericamente acessíveis. Então, foi verificada a presença de um cilindro ordenado de hidratação ao redor da tripla hélice, onde pontes de água são tanto inter quanto intratripla hélice. O estudo também mostrou que a primeira camada de hidratação da tripla hélice é cineticamente instável, com tempos de estabilidade de nanossegundos a subnanossegundos.

A estrutura secundária do colágeno tipo I também é motivo para constantes pesquisas. A glicina, como visto, garante o formato helicoidal, mas os outros dois aminoácidos do tripleto também têm importante papel, pois eles direcionam a configuração local da cadeia devido a rigidez de suas ligações, principalmente quando estes aminoácidos são a prolina e hidroxiprolina [18, 21].

Para analisar a estrutura do colágeno, Lazarev e co-autores [22] propuseram o estudo da banda I do amido, com a promessa de auxiliar na caracterização dos parâmetros estruturais importantes, como as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e a organização supramolecular. De acordo com o trabalho, a interação vibracional na

estrutura da hélice resulta da divisão da banda I de amido em duas componentes: $\nu_{\parallel}(\theta) = \nu_0 + \sum_j D_j$, com a polarização paralela ao eixo helicoidal, e $\nu_{\perp}(-\theta) = \nu_0 + \sum_j D_j \cos(-j, \theta)$, com a polarização perpendicular ao eixo helicoidal, onde ν_0 é a frequência não perturbada; D_j são as constantes de acoplamento com grupos tripeptídicos; θ é o ângulo de rotação durante a transição de um grupo peptídico a outro ao longo da cadeia molecular (para a estrutura de tripla hélice, $\theta = 108^\circ$). Sob condições de desidratação, a hélice tornou-se mais estendida e sua ordem aumentou, enquanto o raio da molécula diminuiu. Estas mudanças foram reversíveis. Com a desnaturação por aquecimento, por exemplo, houve retirada da água ligada, e então diminuição da ordem molecular. De acordo com conceitos aceitos, moléculas de água podem formar pontes entre grupos CO de cadeias vizinhas e tornar as estruturas enroladas ao longo do eixo da hélice. O trabalho foi realizado em cadeias polipeptídicas sintéticas, pois o estudo em colágeno nativo é muito mais complicado, principalmente porque a estrutura principal da cadeia polipeptídica inclui maiores quantidades de carbonilas com diferentes características espectrais. Se três tipos de carbonilas foram considerados neste estudo, no colágeno nativo este número pode aumentar, no mínimo, para cinco. O colágeno nativo, em solução aquosa, apresenta completo estado de tripla hélice. A desidratação do colágeno prejudica a estrutura do amido I, fazendo até com que desapareça. A banda de amido I, como um todo, torna-se alargada. Evidentemente, a eliminação da água ligada fortemente perturba a regularidade do empacotamento da cadeia molecular do colágeno nativo.

De acordo com a literatura, a estrutura terciária do colágeno tipo I é caracterizada por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$, cada uma contendo cerca de 1050 aminoácidos [11]. Segundo Wess *et al.* [23], na estrutura desta tripla cada cadeia adota uma conformação helicoidal com as espiras voltadas para esquerda e as três cadeias juntas se interligam numa conformação helicoidal com as espiras voltadas para a direita. O comprimento de cada espira na fibrila, segundo difração de raios-X, é 64nm, e o comprimento da molécula é 300nm, sendo escalonada numa distância de 67nm em relação a uma outra molécula no estado nativo. No estado desidratado, esta distância diminuiu para 64nm. Assim como no trabalho de Lazarev *et al.* [22], a reversibilidade do processo de desidratação das amostras foi verificada.

O comprimento de cada espira na fibrila, bem como a distância do escalonamento obtidos por Wess *et al.* [23], aproximaram-se daqueles medidos por Baranauskas e colaboradores [24]. No entanto, estes últimos utilizaram a microscopia de

força atômica, ao invés da difração de raios-X. As imagens das fibrilas sugeriram estrutura helicoidal, com cada fibrila medindo de 124 a 170nm de diâmetro. Isto é interessante, pois não somente as cadeias alfa teriam conformação helicoidal, mas também sua supra-estrutura, as fibrilas. O comprimento de cada espira na fibrila foi de 59,4 a 61,7nm. A estrutura helicoidal pôde ser caracterizada pela medida do ângulo helicoidal, o qual variou de 84° a 89°. A distância intermolecular medida foi de 2,21nm. Esta distância sugere que não apenas forças de Van der Waals atuam, mas também grupos complexos como peptídeo-água-peptídeo. O diâmetro molecular foi 1,43nm, a periodicidade das espiras das cadeias polipeptídicas foi 1,15nm e a periodicidade de uma cadeia peptídica simples foi 8,03nm.

O padrão de ondulação, que o trabalho anterior [24] classificou como helicoidal, também foi verificado nas fibras colágenas durante a pesquisa de Ikoma e co-autores [25]. Eles utilizaram a microscopia de polarização e ressonância magnética nuclear, ambas sensíveis à anisotropia da estrutura. Quando água pesada ou íons de sódio interagem com macromoléculas, como o colágeno, o movimento e orientação das macromoléculas é altamente restrito. A ressonância magnética nuclear, então, pode ser empregada para detectar estas restrições. A intensidade máxima do sinal magnético de um tendão normal levou $\tau = 0,4\text{ms}$ para ser atingida. Em tempos maiores esta intensidade decaiu rapidamente. O tempo de decaimento foi definido como aquele cuja intensidade do sinal reduziu-se à metade, subtraindo-se o tempo de 0,4ms. Assim, $\tau_{1/2} = 0,67\text{ms}$. A separação residual dipolar da água dependeu de $(3 \cos^2 \theta - 1)$, onde θ foi o ângulo entre o eixo de simetria das fibras no tendão e o campo magnético. Para spins distribuídos randomicamente, a maior contribuição do resíduo dipolar foi obtida quando $\theta = 90^\circ$. Então, o efeito do alinhamento das fibras colágenas deve levar a um aumento na separação residual dipolar da água por um fator de 2 e ao aumento da amplitude do sinal para um fator de 4. De acordo com o trabalho, quanto maior o tempo para atingir a intensidade máxima, mais baixo é o estado de ordenamento do sistema. A intensidade máxima significa que prótons ligados ao colágeno alinharam-se com o campo magnético, formando 0° . Conforme a quantidade de água aumentou, verificada pelo aumento da espessura dos feixes, maior foi o resíduo polar, portanto maior o alinhamento e aumento da intensidade máxima, com τ mais curto e $\tau_{1/2}$ mais rápido.

Fechete e colaboradores [26], também por intermédio da ressonância magnética nuclear, concluíram que a anisotropia de acoplamento dos resíduos dipolares, no

tendão, de fato é relacionada firmemente com moléculas de água confinadas, as quais penetram o volume intersticial da tripla hélice e são fixadas por duas ligações de hidrogênio. Quando o ângulo entre o campo magnético e o longo eixo do tendão foi zero, isto é, $\theta = 0^\circ$, o ângulo médio entre o campo magnético e o longo eixo das fibrilas foi $12^\circ \pm 1^\circ$ e o ângulo médio entre o longo eixo das fibrilas e o longo eixo do tendão foi $4^\circ \pm 1^\circ$. Estes ângulos encontrados foram diferentes de zero porque são a manifestação da distribuição estatística das fibrilas do colágeno em torno do eixo simétrico macroscópico do tendão. Numa primeira aproximação, esta distribuição pode ser descrita por meio de uma função Gaussiana, com o centro da distribuição levemente deslocado a partir do eixo do tendão.

Utilizando espectroscopia Raman e teoria termodinâmica, Walrafen e Chu [27] verificaram que as forças de hidratação, no colágeno, diminuem exponencialmente conforme se aumenta a distância entre o longo eixo das moléculas, que está na faixa de 1,3nm (quando desidratado) a 1,8nm (quando hidratado). Forças para distâncias de 1,3 a 1,37nm correspondem a interações hidrofóbicas, enquanto forças para distâncias acima de 1,37nm correspondem a interações hidrofílicas. Também, segundo os autores, as forças hidrofílicas dirigem o auto-arranjo do colágeno quando o conteúdo de água é muito alto (grandes distâncias entre moléculas). A força do campo elétrico entre as moléculas foi medida e tem cerca de -3,3 mdina ($1 \text{ dina} = 10^{-5} \text{ N}$) quando a distância entre elas é 1,3nm. O sinal negativo implica em alteração na direção do vetor de polarização das moléculas quando há mudança do estado hidratado para o desidratado. A força do campo elétrico tende a zero, quando próxima da distância de 1,37nm, depois torna-se positiva e finalmente atinge uma constância, 0,6 mdina, na distância de 1,8nm.

Também por meio de espectroscopia, Tsuboi e colaboradores [28] investigaram a absorção de filmes finos de colágeno tipo I. A peculiaridade do trabalho foi a deposição do colágeno realizada por intermédio de *lasers* pulsados, com comprimentos de onda na região ultravioleta e também infravermelha do espectro eletromagnético, para formar os filmes. Eles observaram que a estrutura química dos filmes foi semelhante àquela da unidade principal do colágeno (Pro – Hyp – Gly) e que este não tem absorção significativa em regiões com comprimentos de onda maiores que 250nm.

Seguindo a linha de filmes finos, Neto *et al.* [29] estudaram as propriedades elétricas de filmes de colágeno tendo o ferro como impureza. A energia de ativação do colágeno puro, com corrente contínua, foi 0,71 eV. Já a condutividade foi $3,9 \cdot 10^{-12} / \Omega \text{m}$.

Nos filmes de colágeno, tanto puro quanto dopado com metal, houve desnaturação endotérmica por volta de 60°C, o qual demonstra que a dopagem não promove fortes mudanças na estrutura do colágeno, mesmo para amostras preparadas em diferentes condições de pH. No entanto, foi possível verificar maior piezoelectricidade usando o dopante Fe₂O₃, o qual também aumentou a permitividade e a condutividade elétricas. Foi verificado que monômeros de moléculas nativas são solúveis e formam soluções estáveis em $3,5 \leq \text{pH} \leq 7,4$ com baixa força iônica, desde temperaturas congelantes até 20°C. Em temperaturas maiores que isso, agregados e fibrilas começam a ser formar, embora a proporção dependa das condições da solução. As fibrilas são bem ordenadas e possuem padrão similar àquele observado *in vivo*. Segundo os autores, o auto-arranjo em sistemas puros é muito dependente da temperatura, força iônica, salinidade e pH, os quais sugerem que o crescimento das fibrilas é dirigido por forças hidrofóbicas e eletrostáticas. O auto-arranjo das fibrilas foi tido como um exemplo de processo de entropia dirigido.

A estrutura formada pela interação monômero - monômero em um oligômero, tal como o colágeno, é conhecida como quaternária. Para estabelecer a estrutura quaternária, cerca de cinco ou seis moléculas de colágeno tipo I alinham-se para formar microfibrilas, as quais se alinham para formar fibrilas, que formam fibras, que finalmente formam feixes [30].

Como mencionado anteriormente, o alto grau de ordenamento no empacotamento longitudinal das fibrilas de colágeno é conhecido, contudo não há um consenso quanto ao empacotamento lateral dos monômeros. Silver e colaboradores [31] propõem a idéia de que o empacotamento lateral das fibrilas é como o ocorrido em cristais líquidos. Simulações computacionais foram realizadas, sendo o colágeno representado por um cilindro. O modelo computacional incorporou o princípio de nucleação e propagação, pois estudos anteriores sugeriram que a estrutura inicial (denominada núcleo) tem uma conformação espiral ou helicoidal. De acordo com o modelo, o crescimento das fibrilas de colágeno a partir de um núcleo espiral ou helicoidal é similar ao processo de deslocamento de um parafuso e esse crescimento espiral é freqüentemente visto em cristais de pequenas moléculas, comuns na natureza.

Com o objetivo de mostrar que fibras de colágeno ou feixes de fibras em tendões não são arranjados em estruturas planares, mas sim em estruturas onduladas, as quais refletem o arranjo supramolecular helicoidal destas fibras, Vidal [32] realizou um trabalho com o auxílio da microscopia de luz polarizada. O resultado confirmou as observações anteriores de Baranauskas *et al.* [24] e Ikoma *et al.* [25], pois, de fato, as

fibras arranjam-se de maneira ondulada e helicoidal no espaço. O autor propôs, assim como no trabalho em conjunto com Mello [33], o modelo de *twisted grain boundary* para descrever o arranjo dos feixes. A fase de *twist grain boundary* frequentemente ocorre entre as fases esmética e colestérica ou isotrópica de cristais. No artigo também foi tratada a questão da íntima relação entre exercício físico e aumento da birrefringência textural nos feixes de colágeno. A questão levantada foi como fibroblastos, células constituintes do tecido conjuntivo cuja função é sintetizar as fibras estruturais como o colágeno, respondem à demanda biomecânica. Vidal propõe que feixes de colágeno podem atuar como transdutores, sinalizando às células por meio de sinais elétricos, piezoelectricidade e geometria helicoidal, que juntos poderiam influenciar a viscoelasticidade dos tendões.

Seguindo a linha da viscoelasticidade dos tendões, Sasaki e Odajima [34] sugerem que esta exista já dentro da molécula de colágeno, caracterizando as diferenças mecânicas entre os diversos tecidos que contém a proteína. Eles propõem que a viscoelasticidade seja relacionada com a rede de pontes de hidrogênio da molécula.

O colágeno tipo I está entre as mais importantes proteínas responsáveis pela condução de força nos mamíferos. Apesar de sua importância para o entendimento das propriedades mecânicas de muitos tecidos, há ainda uma lacuna sobre como esta proteína realiza esse trabalho. Por esta razão a literatura é rica em trabalhos que tratam das propriedades mecânicas e viscoelásticas do colágeno tipo I, os quais deixam muito claro que a característica mecânica do tecido conjuntivo é primariamente determinada pela composição e organização do colágeno [9, 35-37]. Já na década de sessenta o colágeno foi classificado como transdutor, por transformar energia mecânica em energia bioquímica. Pois, quando submetido a uma tensão, envia mensagens (como variações metabólicas, variações nos ácidos mucopolissacarídeos, nos fibroblastos) que atuam no sistema biológico. Este transdutor agiria nos fatores de entrada do sistema fibroblástico, determinando modificações que sustentariam a homeostase, com atuação da histamina, por exemplo. A energia mecânica aplicada promoveria deslocamentos inter e intramoleculares, deslocamentos estes que envolveriam o surgimento de grupos polares reativos livres, que juntos montariam o código de mensagem bioquímica [38].

As **FIGURAS 2.2 e 2.3** resumem as principais características do colágeno tipo I, de acordo com a literatura revisada.

FIGURA 2.2: Resumo das principais características estruturais do colágeno.

FIGURA 2.3: Subestruturas do feixe de colágeno tipo I e as principais técnicas de análise. ME= microscopia eletrônica, MFA= microscopia de força atômica, MEV= microscopia eletrônica de varredura, MO= microscopia óptica.

2.2. Interação da Luz com o Colágeno

O comportamento dos meios dielétricos - como o colágeno [17] - e dos meios não condutores, perante campos eletromagnéticos, é da maior importância em óptica. Com efeito, os dielétricos transparentes encontram-se constantemente sob a forma de lentes, prismas, lâminas, filmes, etc., sem mencionar o ar circundante.

Para realizar o estudo de dielétricos homogêneos e isotrópicos no espaço livre, é suficiente substituir nas equações de Maxwell ϵ_0 por ϵ e μ_0 por μ - o colágeno é um meio anisotrópico, mas esta abordagem será dada mais adiante para que a descrição matemática ocorra de maneira gradual, da forma menos complexa à mais complexa.

A velocidade de fase no meio é dada por:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}} \quad (2.1)$$

A razão entre as velocidades da onda eletromagnética no vazio, $c=2,99792458 \cdot 10^8$ m/s, e num meio qualquer é, por definição, o índice de refração absoluto desse meio, n , dado por:

$$n \equiv \frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}} \quad (2.2)$$

Em termos de permissividade e de permeabilidade relativas do meio, n toma a forma:

$$n = \sqrt{\kappa_E \kappa_M} \quad (2.3)$$

Existem materiais magnéticos transparentes no infravermelho e no ultravioleta. A ênfase é, todavia, posta no colágeno, o qual é transparente no visível e essencialmente não-magnético. De fato, κ_M é quase sempre muito próximo da unidade, com desvios de apenas algumas partes em 10^4 . Ao fazer $\kappa_M = 1$ na **Eq. 2.3**, obtém-se uma expressão conhecida por relação de Maxwell,

$$n = \sqrt{\kappa_E} \quad (2.4)$$

em que κ_E é a constante dielétrica estática. No entanto, esta relação só é válida para gases simples. De fato, κ_E , logo n , são grandezas que dependem da frequência quando um meio sólido, tal como o colágeno, é estudado. A dependência de n com o comprimento de onda da luz é um efeito bem conhecido, a dispersão.

2.2.1. Dispersão

O significado físico da dependência de n com a frequência depende, em última análise, do tipo de interação entre uma onda eletromagnética e o conjunto de átomos que constituem o meio dielétrico [39]. Um átomo pode reagir de dois modos diferentes à radiação em função da sua frequência, ou, o que é o mesmo, em função da energia do fóton incidente ($E = h\nu$, sendo h a constante de Planck $= 6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s). Por um lado, o átomo pode dispersar a luz, limitando-se a alterar a sua direção de propagação. Todavia, se a energia do fóton for igual à de um dos estados excitados do átomo, o fóton é absorvido e o átomo transita para o estado de energia correspondente. Em gases densos (pressões não inferiores a 10^2 Pa), em sólidos e em líquidos, é provável que esta energia de excitação seja rapidamente transformada em energia mecânica, pelo jogo de movimentos atômicos aleatórios, ou em energia térmica, antes que um fóton possa ser emitido. Este fenômeno (absorção de um fóton e a sua transformação em energia térmica) toma frequentemente o nome de “absorção”; este termo não abrange as transformações desencadeadas pela energia assim absorvida. Por consequência, este processo será designado de absorção dissipativa.

Os fenômenos de dispersão não-ressonante ocorrem quando um átomo interage com fótons de frequência distinta das frequências de ressonância. Nas condições deste estudo, as moléculas de colágeno interagem com o comprimento de onda $\lambda = 632,8$ nm, que está distante de suas frequências de ressonância que ocorrem no ultravioleta e infravermelho longínquo [11].

Um átomo no estado fundamental que interage com um fóton de energia demasiado reduzida para que o átomo transite para um estado excitado, sofrerá, no máximo, pulsações na nuvem eletrônica. Nenhuma transição atômica ocorrerá e o átomo permanecerá no estado fundamental. A nuvem eletrônica vibrará à frequência da radiação incidente e alterará continuamente a sua conformação relativamente ao núcleo positivo: o sistema constituirá, então, um dipolo elétrico em oscilação e poderá radiar à frequência da radiação incidente. A luz dispersa deste modo é constituída por fótons que se propagam com a mesma energia que o fóton incidente – a dispersão é dita elástica. Pressupõe-se, com efeito, que o átomo se comporta como um pequeno oscilador dipolar, modelo utilizado por Hendrik Antoon Lorentz na sua extensão clássica da teoria de Maxwell para o domínio atômico. Quando a luz incidente é não polarizada, os osciladores atômicos dispersam a luz segundo direções aleatórias, no entanto, quando é polarizada, há dispersão da luz em

direções bem definidas e por isso optou-se por polarizar a radiação incidente do *laser* utilizado, conforme será visto adiante.

Quando um átomo é irradiado com luz, os processos de excitação e de emissão espontânea sucedem-se rapidamente. Com vidas médias da ordem de $\approx 10^{-8}$ s, um átomo pode emitir, de maneira espontânea, aproximadamente 10^8 fótons por segundo, desde que exista energia suficiente disponível para o reexcitar constantemente.

Em geral, em meios iluminados, cada átomo comporta-se como se fosse “fonte” de um grande número de fótons (dispersos elasticamente ou por ressonância) emitidos em todas as direções. Quando um material sem ressonâncias no visível interage com a luz, produzem-se fenômenos de dispersão não-ressonante e cada átomo comporta-se como fonte de ondas. Em princípio, quanto mais próximas forem a frequência do feixe incidente e a frequência de ressonância atômica, mais intensa será a interação. Em materiais mais densos, maior será a quantidade de energia que é absorvida e dissipada de imediato.

A teoria de Maxwell considera a matéria como um contínuo e traduz a sua resposta a campos elétricos e magnéticos aplicados, $\mathbf{E}$ e $\mathbf{B}$, por meio das constantes ϵ e μ . κ_E e κ_M são também constantes e n resulta independentemente da frequência – o que não está de acordo com a realidade. A análise teórica da dispersão – a conhecida dependência do índice de refração com a frequência – pressupõe, assim, a incorporação da natureza atômica da matéria no modelo e a exploração de todas as características que dependam da frequência. De acordo com Lorentz, o comportamento dos meios dielétricos e isotrópicos decorre de médias sobre as contribuições de um grande número de átomos.

Quando se sujeita um dielétrico a um campo elétrico, a distribuição interna de cargas é distorcida e são gerados dipolos elétricos que também contribuem diretamente para o campo interno total, isto é, o campo externo separa as cargas positivas e negativas do meio (constituindo cada par um dipolo) e estas contribuem, por sua vez, com uma componente adicional para o campo. O momento dipolar resultante por unidade de volume é a polarização elétrica $\mathbf{P}$. $\mathbf{P}$ e $\mathbf{E}$ são proporcionais em muitos materiais, e verifica-se aproximadamente que

$$(\epsilon - \epsilon_0)\mathbf{E} = \mathbf{P} \quad (2.5)$$

A redistribuição da carga e a polarização conseqüente processam-se por intermédio de vários mecanismos. Algumas moléculas têm um momento dipolar permanente em virtude da partilha assimétrica dos elétrons de valência. A molécula da

água é um exemplo deste tipo de moléculas, denominadas moléculas polares. Cada ligação hidrogênio-oxigênio é uma ligação polar covalente, com as extremidades hidrogênio carregadas positivamente, relativamente ao oxigênio. A agitação térmica mantém os dipolos orientados aleatoriamente. Quando se aplica um campo elétrico, os dipolos alinham-se e o dielétrico adquire uma polarização orientada. No caso de átomos e moléculas não-polares, o campo elétrico deforma a nuvem eletrônica, alterando a sua conformação relativamente ao núcleo e dando origem, deste modo, a um momento dipolar.

A molécula de colágeno é formada por aminoácidos polares e não-polares. Os resíduos polares dos aminoácidos estão presentes no interior da molécula, enquanto os não-polares localizam-se na superfície da molécula (**FIG. 2.4**).

FIGURA 2.4: (a) e (b) Estrutura secundária, salientando o enrolamento das hélices para a esquerda [7]. Estrutura terciária, com a superfície preenchida por aminoácidos não-polares. (d) Visão axial da molécula do colágeno, sendo o interior formado por resíduos polares [11].

Além da polarização eletrônica existe ainda um outro processo que se aplica especificamente a moléculas. Na presença de um campo elétrico a posição relativa dos íons positivos e negativos altera-se ligeiramente, o que induz momentos dipolares. Trata-se da polarização iônica ou polarização atômica.

Quando um dielétrico é sujeito a um campo eletromagnético harmônico, a sua carga interna sofre forças variáveis no tempo e proporcionais à componente elétrica do campo incidente: as forças que são criadas pela componente magnética do campo têm a forma $\mathbf{F}_M = q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$ (ao comparar com $\mathbf{F}_E = q\mathbf{E}$ para a componente elétrica) e como os campos elétrico e magnético têm a mesma dependência temporal, mesma fase em todos os

pontos do espaço, diferindo apenas de uma constante escalar - a velocidade de propagação no vácuo - e $v \ll c$, a força $\mathbf{F}_M$ é, geralmente, desprezível.

Em fluídos dielétricos polares, as moléculas rodam sobre si próprias e alinham-se com o campo $\mathbf{E}(t)$. Estas moléculas são, no entanto, relativamente grandes e têm momentos de inércia apreciáveis pelo que, para grandes valores da frequência ω , as moléculas não acompanham as variações do campo. A sua contribuição para $\mathbf{P}$ diminui e κ_E diminui substancialmente. A permitividade da água é razoavelmente constante, cerca de 80, até cerca de 10^{10} Hz, após o que diminui rapidamente.

A inércia dos elétrons é reduzida. Eles seguem as variações do campo, contribuindo para $\kappa_E(\omega)$ até às frequências de, aproximadamente, $5 \cdot 10^{14}$ Hz. Assim, a dependência de n com ω é função da dependência relativa dos vários mecanismos de polarização elétrica com a frequência.

A nuvem eletrônica de um átomo está ligada ao núcleo positivo por meio de uma força elétrica atrativa que a mantém, de algum modo, numa configuração de equilíbrio. Independentemente de quaisquer outros detalhes relativamente às interações atômicas internas, pode-se afirmar que, tal como em outros sistemas mecânicos estáveis, perante pequenas perturbações, deve existir uma força F responsável pelo equilíbrio do sistema. Por outro lado, é razoável esperar que, para pequenos deslocamentos, x , em torno da posição de equilíbrio (para a qual $F=0$), essa força varie linearmente com x . Em outras palavras, um gráfico de $F(x)$ em função de x deverá ter a forma de uma reta que intercepte o eixo x no ponto de equilíbrio ($x=0$). Para pequenos deslocamentos pode-se, então, supor que a força de equilíbrio tem a forma $F=-kx$, sendo k conhecida como constante de mola. Uma vez momentaneamente perturbado, um elétron ligado desta maneira oscilará em torno da sua posição de equilíbrio com uma frequência natural, ou de ressonância, dada por $\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m_e}}$, em que m_e é a massa do elétron. Esta é a frequência de oscilação de um sistema não forçado.

Qualquer material pode ser visto como um sistema de um grande número de átomos polarizáveis, cada um dos quais de reduzidas dimensões (em comparação com o comprimento de onda incidente) e próximo dos seus vizinhos. Quando uma onda luminosa atravessa tal meio, cada átomo comporta-se como um oscilador clássico forçado, atuado pelo campo elétrico variável $E(t)$ da onda, suposto orientado segundo a direção positiva do eixo dos x . Mesmo sob a iluminação intensa da luz do sol, a amplitude das oscilações não

será superior a 10^{-17}m . A força (F_E) exercida sobre um elétron de carga q_e pelo campo $E(t)$ de uma onda harmônica de frequência ω tem a forma:

$$F_E = q_e E(t) = q_e E_0 \cos \omega t \quad (2.6)$$

A segunda lei de Newton permite descrever o movimento: a soma das forças aplicadas é igual ao produto da massa pela aceleração:

$$q_e E_0 \cos \omega t - m_e \omega_0^2 x = m_e \frac{d^2 x}{dt^2} \quad (2.7)$$

O primeiro termo do primeiro membro é a força de excitação, e o segundo termo representa a força oposta, de restauro do equilíbrio. Para satisfazer esta expressão, x deve ser uma função do tempo com segunda derivada muito semelhante à própria função. Pode também prever-se que o elétron oscile à frequência de $E(t)$. Então, a solução é do tipo

$$x(t) = x_0 \cos \omega t \quad (2.8)$$

Substituindo esta solução na **Eq. (2.7)**, obtém-se:

$$x(t) = \frac{q_e / m_e}{(\omega_0^2 - \omega^2)} E_0 \cos \omega t \quad (2.9)$$

ou

$$x(t) = \frac{q_e / m_e}{(\omega_0^2 - \omega^2)} E(t) \quad (2.10)$$

A última equação representa o deslocamento relativo da nuvem negativa relativamente ao núcleo positivo. Normalmente, q_e é considerado positivo. Sem qualquer força de excitação (na ausência de uma onda incidente) o oscilador vibrará à frequência natural, ou frequência de ressonância, ω_0 . Na presença de um campo com frequência inferior a ω_0 , $E(t)$ e $x(t)$ têm o mesmo sinal, a carga segue a força aplicada, isto é, está em fase com a força de excitação. Todavia, quando $\omega > \omega_0$, o deslocamento $x(t)$ tem a direção oposta à da força instantânea $q_e E(t)$: está, portanto, em oposição de fase com esta força. Assim, quando $\omega_0 > \omega$, o movimento relativo da carga positiva tem a forma de uma vibração segundo a direção do campo. Acima da frequência de ressonância a carga positiva está defasada de 180° em relação ao campo.

O momento dipolar é igual ao produto da carga q_e pela separação entre cargas; para N elétrons por unidade de volume, a polarização elétrica, ou densidade de momento dipolar é:

$$P = q_e x N \quad (2.11)$$

Logo,

$$P = \frac{q_e^2 N E / m_e}{(\omega_0^2 - \omega^2)} \quad (2.12)$$

E pela **Eq. (2.5)**

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + \frac{P(t)}{E(t)} = \varepsilon_0 + \frac{q_e^2 N / m_e}{(\omega_0^2 - \omega^2)} \quad (2.13)$$

Como $n^2 = \kappa_E = \varepsilon / \varepsilon_0$, obtém-se uma expressão para n em função de ω , conhecida como equação de dispersão:

$$n^2(\omega) = 1 + \frac{q_e^2 N}{\varepsilon_0 m_e} \left(\frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2} \right) \quad (2.14)$$

Para frequências superiores à de ressonância, ($\omega_0^2 - \omega^2 < 0$), o oscilador realiza deslocamentos em oposição de fase com a força de excitação. A polarização elétrica resultante está, portanto, também defasada relativamente ao campo elétrico aplicado. A constante dielétrica ε , logo, o índice de refração serão ambos inferiores a 1. Para frequências abaixo da frequência de ressonância ($\omega_0^2 - \omega^2 > 0$), a polarização elétrica está virtualmente em fase com o campo elétrico aplicado. A constante dielétrica e o índice de refração correspondente são superiores a 1. Este comportamento é observado no colágeno.

De um modo geral, o índice de qualquer substância tem várias transições entre $n > 1$ e $n < 1$ quando a frequência da radiação aumenta. Este fato significa que existem, aparentemente, várias frequências de ressonância. É lícito generalizar estas considerações para situações com N moléculas por unidade de volume, cada uma com f_j osciladores, com frequências naturais ω_{0j} , com $j = 1, 2, 3 \dots$ Neste caso,

$$n^2(\omega) = 1 + \frac{q_e^2 N}{\varepsilon_0 m_e} \sum_j \left(\frac{f_j}{\omega_{0j}^2 - \omega^2} \right) \quad (2.15)$$

Este resultado é o mesmo daquele que decorre de um tratamento quântico, apesar de alguns dos termos deverem ser reinterpretados. As grandezas ω_{0j} serão, assim, as frequências características as quais um átomo pode absorver ou emitir energia radiante. Os termos f_j que satisfazem a condição $\sum_j f_j = 1$ são fatores que refletem a importância relativa de cada um dos modos. Uma vez que representam uma medida da probabilidade de

ocorrência de uma dada transição atômica, os fatores f_j constituem também probabilidades de transição.

Uma reinterpretação semelhante dos termos f_j é necessária mesmo num tratamento clássico, uma vez que a experiência impõe que estes fatores sejam inferiores à unidade. Para resolver a inconsistência que daqui decorre - com o significado inicial dos f_j que permitiu obter a **Eq. (2.15)** - é necessário considerar que cada molécula possui vários modos de vibração, cada qual com características de ressonância distintas.

Note-se que, quando ω é igual a uma das frequências características, n sofre uma descontinuidade, contrariamente ao que se observa experimentalmente. Este fato decorre de se ter desprezado um termo de amortecimento que deveria ter aparecido no denominador da soma. Este amortecimento é, em parte, devido à perda de energia eletromagnética. Em distâncias muito curtas os átomos e moléculas interagem, resultando uma força de “atrito” que amortece os osciladores e dissipa a sua energia, sob a forma de “calor” (movimento molecular aleatório).

Se na equação do movimento se tivesse incluído uma força de amortecimento proporcional à velocidade (da forma $m_e \gamma \frac{dx}{dt}$), a **Eq. (2.15)** de dispersão tomaria a forma:

$$n^2(\omega) = 1 + \frac{q_e^2 N}{\epsilon_0 m_e} \sum_j \left(\frac{f_j}{\omega_{0j}^2 - \omega^2 + i\gamma_j \omega} \right) \quad (2.16)$$

Esta equação é aplicável em meios pouco densos, como os gases. Para substâncias mais densas, como o colágeno, outras complicações devem ser consideradas. Cada átomo interage com o campo elétrico local a que está sujeito. No entanto, num material denso, ao contrário de átomos isolados, como se considerou anteriormente, cada átomo está agora também sujeito à influência dos seus vizinhos. Um átomo “vê”, assim, além do campo aplicado $E(t)$, um outro campo, nomeadamente $\frac{P(t)}{3\epsilon_0}$ [40]. Com efeito, é possível mostrar que:

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \frac{q_e^2 N}{3\epsilon_0 m_e} \sum_j \left(\frac{f_j}{\omega_{0j}^2 - \omega^2 + i\gamma_j \omega} \right) \quad (2.17)$$

Consideraram-se, até agora, e exclusivamente, osciladores eletrônicos. Os mesmos são, todavia, aplicáveis a íons ligados em posições atômicas fixas. Nesse caso, m_e seria substituído pela massa (consideravelmente maior) do íon. Deste modo, enquanto que

a polarização eletrônica é importante em todo o espectro óptico, as contribuições da polarização iônica apenas afetam significativamente n próximo das regiões de ressonância ($\omega_{0j}=\omega$). Daqui se conclui que apenas a polarização eletrônica deve ser considerada na análise da influência da radiação vermelha sobre o colágeno.

As situações em que a absorção é desprezível, isto é, $\omega_{0j}^2 - \omega^2 \gg \gamma_j \omega$, o índice de refração é real e o termo de amortecimento, na **Eq. (2.17)** pode ser desprezado. Neste caso, ω^2 também poderá ser desprezado quando $\omega_{0j}^2 \gg \omega^2$, o que faz com que o índice de refração possa ser considerado constante nesta região. Mas à medida que ω aumenta e se aproxima de ω_{0j} , $(\omega_{0j}^2 - \omega^2)$ diminui e n aumenta gradualmente com a frequência. A este fenômeno dá-se o nome de dispersão normal. Quando $\omega_{0j} = \omega$, o termo de amortecimento da **Eq. (2.17)** torna-se dominante. As regiões na vizinhança imediata dos vários valores de ω_{0j} constituem bandas de absorção. Nestas regiões, $dn/d\omega$ é negativo e a dispersão diz-se anômala.

Isto posto, o índice de refração pode ser escrito de maneira a abranger seu comportamento diante de todo o espectro eletromagnético, ou seja, desde quando a absorção é desprezível até as regiões em que é dominante: $N = n + in_2$. Este é o índice de refração complexo, composto pelo índice de refração n (parte real), e pelo índice de refração n_2 (parte imaginária) que representa a absorção.

Em suma, na região visível do espectro a polarização eletrônica é o mecanismo que determina $n(\omega)$. Também, com a constante dielétrica introduz-se o tecido como um fator na estabilização da conformação do colágeno. Numa interpretação clássica, imaginam-se osciladores eletrônicos vibrando à frequência da onda incidente. Quando esta é bastante diferente da frequência de ressonância dos osciladores, as oscilações são pequenas e a absorção é reduzida. Nas zonas de ressonância a amplitude de vibração dos osciladores aumenta significativamente e o campo realiza maior quantidade de trabalho sobre as cargas. A energia eletromagnética, então, é convertida em energia mecânica e dissipada no interior da substância sob a forma de calor. Diz-se, então, que se constitui uma banda de absorção. O material, mesmo quando essencialmente transparente às outras frequências, torna-se opaco à radiação eletromagnética com frequência próxima das suas frequências características.

Desta maneira, o colágeno será polarizado ao interagir com um campo elétrico, pois haverá deformação da distribuição de cargas de suas moléculas e dipolos elétricos

serão criados. O campo no interior do tecido rico em colágeno altera-se, então, pela inclusão do campo induzido, o que obriga a introduzir uma nova grandeza, o deslocamento elétrico, $\mathbf{D}$. Em meios isotrópicos, $\mathbf{D}$ relaciona-se com $\mathbf{E}$ por meio de uma grandeza escalar e estes dois campos são sempre paralelos. Sendo o colágeno um material birrefringente e, portanto, anisotrópico, $\mathbf{D}$ e $\mathbf{E}$ relacionam-se por meio de um tensor e nem sempre são paralelos. Aplicando as equações de Maxwell (vide **APÊNDICE B**) ao problema da propagação de uma onda num tal meio, conclui-se que os campos que vibram com a frente de onda são os campos $\mathbf{B}$ e $\mathbf{D}$ e não, como anteriormente, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{E}$. Em outras palavras, o vetor de propagação $\mathbf{k}$, que é normal às superfícies de igual fase, é agora perpendicular a $\mathbf{D}$ e não a $\mathbf{E}$. De fato, $\mathbf{D}$, $\mathbf{E}$ e $\mathbf{k}$ são coplanares. A direção de propagação é a direção do vetor de Poynting, $\mathbf{S} = c^2 \epsilon_0 \mathbf{E} \times \mathbf{B}$, que é diferente da direção de $\mathbf{k}$. Todavia, devido à forma como os átomos estão distribuídos, $\mathbf{E}$ e $\mathbf{D}$ são colineares quando ambos forem paralelos ou perpendiculares ao eixo óptico. Isto significa que a onda ordinária encontra um meio isotrópico com $\mathbf{S}$ e $\mathbf{k}$ colineares. Pelo contrário, para a onda extraordinária, $\mathbf{S}$ e $\mathbf{k}$ (ou $\mathbf{E}$ e $\mathbf{D}$), só são paralelos entre si ao longo de direções paralelas ou perpendiculares ao eixo óptico. Em todos os outros pontos sobre a onda é $\mathbf{D}$ que é tangente a onda extraordinária, e é, portanto, sempre $\mathbf{D}$ que define a envolvente ou a frente de onda plana composta no interior do tecido anisotrópico (**FIG. 2.5**).

FIGURA 2.5: Orientação dos vetores $\mathbf{E}$, $\mathbf{D}$, $\mathbf{S}$ e $\mathbf{k}$.

2.3 Birrefringência e Colágeno

A diferença entre os índices de refração extraordinário e ordinário, $n = (n_e - n_o)$, é uma medida da birrefringência. Quando a velocidade de propagação do eixo ordinário é maior que àquela do eixo extraordinário, $v_{\perp} > v_{\parallel}$, ocorre que a diferença $(n_e - n_o)$ é positiva e o meio diz-se uniaxial positivo [41], tal qual o colágeno (para maiores detalhes, vide **APÊNDICE C**).

A correlação entre birrefringência e estrutura do colágeno é explorada desde a década de sessenta [42, 43]. Até os dias atuais, a microscopia de polarização é um método eficiente para quantificar a alteração da birrefringência do colágeno devido influência de diferentes agentes [7, 44].

Isto não impede que muitos trabalhos utilizem outros métodos de análise, os quais corroboram com àqueles da microscopia de luz polarizada. Por exemplo, com o intuito de avaliar algumas propriedades do colágeno tipo I em função do campo elétrico aplicado, Yoshioka e co-autores [45] concluíram que sua birrefringência é positiva, ou seja, $(n_e > n_o)$. Pôde-se verificar que o efeito do campo elétrico nas soluções diluídas de colágeno é alinhar o longo eixo da molécula na direção do campo. Com um valor alto de campo elétrico, 2.10^4V/cm , a birrefringência atingiu ponto de saturação e baixou conforme o campo elétrico diminuiu. O momento de dipolo encontrado foi de 5.10^{26}C/m e a anisotropia da polarizabilidade entre os eixos foi de $2,7.10^{-15} \text{cm}^3$. Já a anisotropia óptica entre os eixos foi de $1,7.10^{-3}$. O tempo de relaxação dielétrica do colágeno diluído em $2,9.10^{-3} \text{N}$ de ácido acético foi $1,5.10^{-4} \text{s}$. Esta mesma solução de colágeno aquecida por 30 minutos a 40°C apresentou birrefringência diminuída em cerca de $1/3$. O tempo de relaxação foi o mesmo, já que a porção de colágeno nativo permaneceu intacta, sem a desnaturação causada pelo aquecimento.

Com o objetivo de encontrar os principais responsáveis pela birrefringência medida no colágeno, Vidal [46] concluiu que o ácido mucopolissacarídeo, um componente da substância de fundo do tecido conjuntivo que auxilia na agregação das moléculas do colágeno para formar fibrilas, desempenha papel importante na birrefringência de forma da macromolécula. Foi utilizada uma enzima que retirou este ácido do tendão analisado, fazendo com que a birrefringência do colágeno diminuísse. Segundo o autor, este achado pode contribuir para o entendimento de patologias do tecido conjuntivo e até para as chamadas disfunções do colágeno, segundo o autor.

O mesmo autor [47], dois anos depois, verificou que nos tendões isolados e também nos tendões implantados, o ácido mucopolissacarídeo gradualmente sofre desordem estrutural, perdendo orientação molecular. Nestes tendões, a perda de orientação estrutural do ácido mucopolissacarídeo precede a desorientação das cadeias polipeptídicas do colágeno. Assim, o arranjo molecular do ácido mucopolissacarídeo, no tendão, é independente do arranjo do colágeno, sendo então um componente que adiciona um arranjo complementar ao tendão. Também, o colágeno possui orientação molecular independente do arranjo do ácido.

Quanto aos índices de refração, a literatura relata que no longo eixo do feixe vale 1,5434, sendo este o índice extraordinário. Na direção perpendicular ao longo eixo do feixe vale 1,5376, sendo este o índice ordinário. De fato, $n_e > n_o$. Os valores foram obtidos para amostras não fixadas e não coradas, com espessura de 7 μ m, e estes foram maiores em relação às amostras fixadas [48].

O dicroísmo, o qual não está presente no colágeno quando iluminado com comprimentos de onda da região visível do espectro, foi observado quando tendões foram impregnados com prata. Há maior absorção na direção paralela ao plano da luz polarizada, em 480nm. A maior absorção na direção perpendicular ocorre em 440nm. Há dicroísmo linear negativo de 410 a 440nm, com máximo em 420nm, e positivo de 440 a 680nm, com máximo em 530nm. Em tendões impregnados com prata pintada de ouro há maior absorção na direção paralela ao plano da luz polarizada, de 620 a 640nm. Na direção perpendicular, de 530 a 540nm. Com esta última impregnação, o dicroísmo linear é apenas positivo, com depressão na curva em 510nm. Para ambas as impregnações, a curva da luz não polarizada é semelhante à curva da direção perpendicular, inclusive os picos. A coincidência no comprimento de onda do ponto de inflexão da dispersão anômala da birrefringência com o dicroísmo máximo, conforme esperado pelo efeito Cotton, não foi encontrada. Somente no caso da impregnação com prata pôde-se verificar uma quase coincidência desses fenômenos. Desta forma, segundo Mello e Vidal [49], é possível assumir que a absorção anisotrópica do colágeno impregnado com metais tem, provavelmente, um fundamento diferente daquele verificado sobre colágeno fixado com cromóforos, como o azul de toluidina. Supõe-se que a anisotropia verificada é devido orientação, concentração e distribuição dos bastonetes metálicos.

A influência do meio de embebição durante análise ao microscópio de polarização foi verificada por Vidal *et al.* [50] A dispersão da birrefringência de seções impregnadas com prata e ouro teve pontos de inflexão variáveis, de 470 a 510nm, em

função do meio usado. Valores de retardo óptico foram positivos para comprimentos de onda curtos. Para 680nm, a birrefringência é fortemente compensada. Quando o meio foi a água, o ponto de inflexão foi em 635nm. Em seções não impregnadas, o menor retardo foi $(10,62 \pm 2,16)$, com meio de embebição de índice de refração $n = 1,4610$ (glicerina pura), o qual ofereceu a birrefringência intrínseca. O maior retardo $(47,56 \pm 2,80)$ foi com meio de índice de refração $n = 1,333$ (água). Em seções criocortadas (sem tratamento com parafina) o menor retardo também foi com glicerina, e o maior também foi com água. Uma das fontes de variação do retardo óptico nas fibras de colágeno é a espessura dos cortes. Contudo, a espessura das seções de parafina não afeta significativamente as curvas de birrefringência de forma, conforme demonstrado por meio dos pequenos desvios padrão e coeficientes de variação. Cortes de um mesmo bloco de parafina variam cerca de 6% e de blocos diferentes variam cerca de 12%. As variações das seções criocortadas são maiores quando comparadas às seções de parafina. Por isso as seções de parafina são eleitas quando se quer analisar arranjo macromolecular. Se o arranjo dos bastonetes metálicos fosse predominantemente paralelo às fibras de colágeno, um aumento relativo do índice de refração correspondente ao raio extraordinário seria esperado para todos os comprimentos de onda. Então, uma dispersão normal da birrefringência com retardo óptico positivo deveria ser detectada, mas isso não ocorreu. Assim, é possível assumir que os bastonetes se arranjaram de acordo com as várias camadas, com diferentes níveis de deflexão a partir do longo eixo das fibras, de tal forma que o efeito total induzido, quando da incidência da luz polarizada, deve ser similar àquele de partículas orientadas helicoidalmente.

Feixes de colágeno são complexos poliméricos, constituídos também de proteoglicanas e glicoproteínas estruturais. Então, é preciso levar em consideração estas substâncias no resultado final da birrefringência de forma. Quando o meio de embebição foi a água, o retardo da amostra controle foi $28,37 \pm 3,86$; quando imersa em *α -amylase* foi $18,92 \pm 3,06$; e quando finalmente imersa em *hyaluronidase* foi $12,81 \pm 1,58$. Estes foram os maiores retardos obtidos. Quando o meio de embebição foi a glicerina pura, o retardo para amostra controle foi $7,61 \pm 1,05$; quando imersa em *α -amylase* foi $7,05 \pm 0,67$; e quando imersa em *hyaluronidase* foi $4,34 \pm 1,61$. Estes foram os retardos ópticos mais baixos. Assim, a birrefringência de forma mudou após digestão enzimática. A birrefringência intrínseca também foi afetada. Então, os materiais enzimaticamente removidos estavam macromolecularmente orientados nos feixes. Prova disso é que esses compostos, isolados, apresentam birrefringência. Especialmente em feixes de tendão, onde

fibras colágenas são componentes mais frequentes e orientadas, o aumento dos valores de retardo afetados pela birrefringência de forma deve ocorrer por meio de um aumento relativo de ordem molecular da estrutura. É importante dizer que as enzimas usadas não digerem colágeno, portanto está descartada a hipótese de que a birrefringência de forma diminui devido à remoção de colágeno. O trabalho propõe que cadeias das proteoglicanas devem ser inclinadas com respeito ao longo eixo das fibras colágenas. Com este modelo, confirma-se o arranjo helicoidal, agora das moléculas ácido sulfatadas de glicosaminoglicanas [51].

A birrefringência intrínseca de um material é determinada pela orientação e força de oscilação de todas as transições eletrônicas das moléculas. A birrefringência textural, ou de forma, é dependente da concentração, geometria, estado organizacional e orientação dos feixes, conforme descrito por Vidal [52], em um trabalho sobre o papel dos carboidratos na agregação e ordenamento do colágeno. Constatou-se que, ao ser submetido à oxidação ácida, o colágeno apresenta diminuição do número de resíduos de carboidratos, com a conseqüente diminuição do retardo óptico. Vale ressaltar que esta oxidação não solubiliza ou quebra a molécula de colágeno, mas só retira carboidratos.

Em um trabalho sobre ordenamento molecular dos tendões em função da idade, Vidal e Carvalho [53] discutem a organização hierárquica do colágeno em molécula, fibrila, fibra e feixe. Segundo os autores, a fibrila, por si só, é um sistema molecular com alta ordem e cristalinidade, e é a principal fonte das propriedades anisotrópicas de estruturas que contém colágeno. Também, a birrefringência intrínseca, por ser uma média de todas as transições eletrônicas das moléculas, deve conter a mesma informação oriunda do dicroísmo linear. Além disso, determinações quantitativas das birrefringências intrínseca e de forma são correlacionadas ao diâmetro das fibrilas e ao seu empacotamento, então, diferenças de retardo óptico podem ser usadas para determinar modificações de estruturas anisotrópicas devido idade ou processo patológico. Foi verificada que a espessura de 8 μ m apresenta menos variação de corte e que o retardo óptico aumenta com a idade quando a birrefringência de forma é medida. Animais de experimentação com 21 dias de idade têm $\Delta n = 12,5 \pm 1,4$; 90 dias, $\Delta n = 15,6 \pm 4$; 710 dias, $\Delta n = 24,2 \pm 4$. Já a birrefringência intrínseca não muda significativamente após 21 dias de idade, pois os retardos são: 21 dias, $\Delta n = 5,7 \pm 0,5$; 90 dias, $\Delta n = 8,2 \pm 1$; 710 dias, $\Delta n = 10,4 \pm 1,2$. Os dados corroboram com a difração de raios-X quanto ao estado organizacional devido idade.

Segundo Király e colaboradores [54], o estudo do retardo óptico deve, preferencialmente, ser conduzido sem corar a amostra, devendo a parafina ser completamente removida do tecido, para não aumentar a birrefringência. Os autores concluíram que, assim como Vidal *et al.* [51], a remoção das glicosaminoglicanas diminui o retardo óptico e, também, que um meio de embebição de índice de refração próximo ao da glicerina aumenta a especificidade da análise da birrefringência intrínseca.

A birrefringência de forma foi medida por Silva e colaboradores [7], num trabalho onde a radiação *laser* vermelha linearmente polarizada foi aplicada, terapeuticamente, em pele queimada. Foram testadas duas polarizações do campo elétrico do *laser*, uma paralela e outra perpendicular à direção do longo eixo da coluna dos animais de experimentação. Concluiu-se que a polarização paralela à coluna vertebral acelera a cicatrização, conforme resultados da microscopia de polarização, pois a pele assim irradiada apresentou-se mais ordenada. Sugeriu-se que a polarização paralela à coluna foi também paralela às linhas de tensão da pele, favorecendo a cicatrização.

Devido às propriedades fotônicas interessantes presentes no colágeno quando impregnado com prata, medição detalhada do dicroísmo linear foi realizada com o intuito de prover aplicação em nanotecnologia. O dicroísmo linear observado é positivo, além disso, a fibra colágena impregnada com grãos de prata polariza a luz, pois um forte dicroísmo linear, de mesma intensidade como àquele obtido anteriormente, é conseguido com apenas um polarizador. O dicroísmo linear no complexo colágeno-prata permite medição na faixa visível do espectro eletromagnético e isto é interessante porque o colágeno é dicróico apenas em 190 e 210nm [32].

A tomografia por coerência óptica sensível à polarização também é um método óptico que permite examinar a birrefringência do colágeno e cada vez mais estudos são realizados com o objetivo de auxiliar a diferenciação entre tecido sadio e lesado, de uma maneira não-invasiva. Este método baseia-se na análise da imagem de estruturas anisotrópicas, onde reduções na birrefringência correspondem a diferentes profundidades do tecido e a diferentes estados de ordenamento [55, 56].

Apesar das novas tecnologias, a microscopia de polarização para estudo do ordenamento do colágeno é uma ferramenta que, ainda hoje, permite a imagem e a quantificação de sua birrefringência [7, 44].

2.4 Geração de Segundo Harmônico e Colágeno

Óptica não-linear é o estudo dos fenômenos que ocorrem como consequência da modificação das propriedades ópticas de um sistema material devido presença de luz [57]. Os fenômenos ópticos não-lineares são assim chamados porque eles ocorrem quando a resposta do sistema material a um campo óptico aplicado depende de uma maneira não-linear em função da força do campo aplicado. Por exemplo, a geração de segundo harmônico ocorre como um resultado de parte da resposta atômica que depende quadraticamente da força do campo óptico aplicado. Conseqüentemente, a intensidade da luz gerada na frequência do segundo harmônico tende a aumentar com o quadrado da intensidade da luz *laser* aplicada (para maiores detalhes, vide **APÊNDICE D**).

A técnica de geração do segundo harmônico aplicada para quantificar o ordenamento de tecidos biológicos foi introduzida por Roth e Freund [15]. O colágeno de tendão foi escolhido por ser bem conhecido por meio de outras técnicas e, portanto, seria um bom teste para o novo método. Vale ressaltar que a biologia do tendão não foi o foco do trabalho, mas sim a física da GSH aplicada a sistemas biológicos intactos. Os autores consideraram a molécula de colágeno com uma simetria cilíndrica ao redor do longo eixo com polaridade em cada cadeia alfa. Esta descrição implica numa simetria de grupo pontual classificada como C_α . O longo eixo é denominado z, e x, y são direções ortogonais arbitrárias no plano normal ao eixo z. Assim, o trabalho descreve as componentes da polarização do segundo harmônico, $P(2\omega)$, induzida por campos ópticos $E(\omega)$:

$$P_z(2\omega) = \beta_3 E_z^2(\omega) + \beta_1 \{E_x^2(\omega) + E_y^2(\omega)\};$$

$$P_x(2\omega) = 2\beta_1 E_x(\omega)E_z(\omega)$$

$$P_y(2\omega) = 2\beta_1 E_y(\omega)E_z(\omega).$$

onde $\beta_3 = \beta_{zzz}$; $\beta_1 = \beta_{zxx} = \beta_{zyy} = \beta_{xzx} = \beta_{yzy}$, etc. Segundo os pesquisadores, estas equações estão de acordo com a forma de tensor óptico não-linear, com uma simbologia simplificada, de acordo com a contração piezelétrica e condições de simetria de Kleinman. Desta forma, as equações descrevem a GSH de uma fibrila isolada, com o entendimento de que $\beta_{fibrila} = N\beta_{molécula}$, sendo N o número de moléculas contido na fibrila. Esta última imposição permite o tratamento das fibrilas como moléculas supergigantes. Esta extrapolação é correta, desde que a geometria da amostra e as dimensões da fibrila sejam tais que as fases relativas dos vários campos ópticos não variem grandemente de uma

fibrila para outra. Esta foi, então, a base teórica construída pelos autores, as quais concordaram com os resultados experimentais. Apesar da grande quantidade de luz espalhada, os autores verificaram que a luz polarizada paralelamente ou perpendicularmente ao longo eixo do tendão conserva sua polarização em 99%, enquanto para orientações intermediárias o tendão comporta-se como um cristal altamente birrefringente. Também foi verificado um espalhamento linear da luz, confinada no plano normal do eixo da fibra, quando os polarizadores foram posicionados cruzados a $\pm 45^\circ$ ao longo eixo da amostra. Quando medidos a 90° , a extensão do padrão de espalhamento é uma medição conveniente do grau de alinhamento das fibras.

Quatro anos mais tarde os mesmos autores, Roth e Freund [58], ressaltaram o fato de que mesmo os estudos mais cuidadosos apenas estimam a função da distribuição de orientação do colágeno no tecido. Desta forma, eles propuseram uma função e verificaram a validade por meio da GSH e os resultados concordaram com aqueles da difração de raios-X. Além disso, descreveram o ordenamento verificado por meio de um modelo mosaico, no qual um perfeito paralelismo é mantido dentro das unidades individuais ou blocos do modelo. Neste sistema, a maior fonte de desordem angular verificada é devido à inclinação relativa destes blocos. Assim como no trabalho anterior, os tensores β , isto é, os componentes do tensor da hiperpolarizabilidade, tiveram somente a intensidade relativa medida, ou seja, $\rho = \beta_3/\beta_1$. De acordo com as mesmas condições de simetria do trabalho anterior, com adição de que a orientação azimutal de x e y podem ser escolhidas arbitrariamente, e portanto, pode-se ter $E_y = 0$, as equações da polarização não-linear podem ser reduzidas para:

$$P_z(2\omega) = \rho E_z^2(\omega) + E_x^2(\omega);$$

$$P_x(2\omega) = 2E_x(\omega)E_z(\omega).$$

Os autores também incluíram, além do sistema de coordenadas da fibrila, xyz, um sistema de coordenadas para o tendão, X, Y (eixo de propagação do feixe incidente), Z (longo eixo do tendão). Considerando um sistema cujas fibrilas são alinhadas paralelamente ao eixo do tendão, tal que xyz e XYZ coincidam, então P_z irradia segundo harmônico polarizado em Z e P_x segundo harmônico polarizado em X. Se um *laser* linearmente polarizado é utilizado, tal que o vetor campo elétrico faça um ângulo α relativo ao eixo Z, cujo segundo harmônico seja medido com um polarizador orientado paralelamente a Z ou a X, as duas intensidades, neste sistema perfeitamente orientado, são:

$$Z(\alpha) = [\rho \cos^2 \alpha + \sin^2 \alpha]^2;$$

$$X(\alpha) = [\sin 2\alpha]^2.$$

Os pesquisadores verificaram que $\rho > 0$ e que o grau de ordenamento das fibrilas depende da idade do espécime, usualmente sendo maior para animais mais velhos. Comprimir as amostras entre lâminas altera a espessura e, portanto, altera o sinal de segundo harmônico medido. O modelo mosaico permitiu aos autores retificar uma conclusão equivocada no artigo anterior, onde haviam dito que $\rho < 0$. Isto foi possível porque no presente trabalho eles consideraram a espessura da amostra, sendo o modelo mosaico sensível a isto, o que não aconteceu com o modelo anteriormente proposto, denominado modelo de fibrilas randômicas. Outra conclusão foi que o meio de embebição também altera a GSH, sendo preferível utilizar meios cujo índice de refração se aproxime daquele do colágeno.

Uma vez que mudanças no sinal do segundo harmônico significam alterações estruturais no colágeno, Kim e co-autores [16] desenvolveram um estudo sobre os efeitos do aquecimento, glicação e clivagem enzimática sobre a GSH no colágeno. O sinal do segundo harmônico é maior quando a polarização do feixe incidente é paralela à direção das fibras colágenas e menor quando é perpendicular. Em contraste à variabilidade da intensidade na GSH, a intensidade da luz espalhada na frequência fundamental é pouco alterada. O sinal da GSH diminuiu em todas as situações testadas, mas especificamente para a glicação, o sinal decresceu 40%. Os autores concluíram que a GSH tende a ser um indicador mais sensível às mudanças estruturais na molécula do que as técnicas que exploram a óptica linear.

O trabalho de Georgiou *et al.* [59] demonstrou que, além da GSH, também é possível gerar terceiro harmônico com o colágeno tipo I. Múltiplos espectros foram gravados sem diminuição da intensidade do sinal, em cada caso, mostrando que a habilidade do colágeno em gerar harmônicos não é severamente afetada pela exposição repetitiva de altas intensidades de excitação pulsada e infravermelha. Os autores mostraram que a GSH pode ser observada desde as excitações com comprimentos de onda 766 a 1064nm, mas nesta faixa, somente em 1064nm foi possível detectar a geração de terceiro harmônico.

Uma nova técnica fundamentada pela GSH foi introduzida por Stoller e colaboradores [60], quando propuseram fazer imagem de tecido rico em colágeno e, simultaneamente, obter um parâmetro relacionado à susceptibilidade de segunda ordem. Foram utilizadas amostras liofilizadas e a intensidade do sinal foi significativamente menor nas regiões desordenadas, em relação às regiões onde as fibrilas apresentaram arranjo

quase paralelo. Corroborando com os trabalhos anteriores, a organização fibrilar, de fato, desempenha papel importante na determinação das propriedades da GSH no colágeno. Contudo, o aumento da intensidade da GSH não coincidiu com o aumento do parâmetro proposto e os autores propõem, então, que este parâmetro não seja influenciado pelo arranjo ao nível molecular, tampouco ao fibrilar. Eles sugerem, assim, que o nível de organização medido pelo parâmetro envolve algum alinhamento desconhecido dentro dos feixes.

Cox e colaboradores [61] encontraram parâmetros interessantes para caracterização do sinal de GSH no colágeno. Embora o principal objetivo do artigo tenha sido contribuir com a melhora da técnica de microscopia por GSH, algumas informações são também importantes para o melhor entendimento do comportamento do colágeno frente a campos elétricos altos. Por exemplo, o colágeno tipo I apresenta fluorescência em 590nm (excitação em 355nm) e os autores sugerem que seja devido às ligações cruzadas que permanecem mesmo após o processo de purificação. Os autores introduzem um coeficiente que correlaciona a fluorescência e a GSH e vice-versa. Foi encontrado, para o colágeno tipo I presente em cauda de canguru, que a correlação entre GSH e fluorescência é muito maior que a correlação entre fluorescência e GSH, indicando que a maioria das regiões que gera segundo harmônico é também fluorescente, porém, muitas regiões que são fluorescentes não mostram nenhum sinal de GSH. Por outro lado, em colágeno puro, as correlações foram parecidas entre si e menores que a correlação GSH/fluorescência do colágeno no tecido. Também foi verificada a polarização do sinal da GSH, a qual foi fraca quando um analisador foi colocado em paralelo à polarização incidente. Por outro lado, o sinal aumentou com o analisador a 90° da polarização incidente. Os autores justificam este achado com a direção randômica que as amostras de colágeno tomam quando são purificadas e que poucas moléculas devem ter se posicionado favoravelmente à excitação. Este achado não concorda, por exemplo, com Stoller *et al.* [60].

Para testar os efeitos da quiralidade óptica no sinal da geração de segundo harmônico do colágeno, Pena *et al.* [62] estudaram moléculas de colágeno em pó, para evitar a contribuição do ordenamento das fibrilas no sinal. Concluiu-se que a quiralidade da molécula do colágeno é importante na GSH, mas não é a grande responsável pelos intensos sinais observados quando um tecido é analisado. Na verdade, a principal contribuição para um aumento no sinal da GSH é o efeito coerente devido a alta densidade e ordenamento cristalino das fibrilas.

Embora Shcheslavskiy e co-autores [63] não tenham utilizado a GSH para medir propriedades não-lineares do colágeno, vale a pena citar os resultados obtidos para a hiperpolarizabilidade. Os autores investigaram o colágeno em solução e, quando em baixas concentrações, a hiperpolarizabilidade medida foi $2,4 \pm 0,24 \cdot 10^{-28}$ esu. Para altas concentrações, ou seja, $1,4 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ foi $1,8 \pm 0,22 \cdot 10^{-28}$ esu. Foi observado que moléculas de colágeno espontaneamente se organizam em arranjos supramoleculares e que, ao contrário do que se imaginava, em concentrações menores a hiperpolarizabilidade foi maior. Assim, os pesquisadores sugerem que a hiperpolarizabilidade não tem relação direta com o arranjo supramolecular que, a princípio, deveria aparecer em maior quantidade quando a concentração é maior.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais de Experimentação

Doze *rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, foram utilizados neste estudo. Os calcanhares de Aquiles esquerdo e direito das patas traseiras de cada rato foram depilados (**FIG. 3.6**).

FIGURA 3.6: Esquema de um rato, apontando o calcânar de Aquiles de onde se extraiu o tendão.

Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a idade: 34, 48, 62 e 76 dias de vida. Estas idades foram escolhidas com base no tempo de desmame e intervalo para extração dos tendões. Os animais desmamaram com 28 dias de vida e, aproximadamente, uma semana foi necessária para o devido preparo do experimento. Optou-se por extrair as amostras a cada quinze dias, coincidindo, portanto, com as idades acima mencionadas. Durante o período experimental, os animais foram anestesiados com éter. Os animais receberam alimentação *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com luz por 12 horas e sem luz por 12 horas. Também foram seguidos os princípios estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN.

3.2 Irradiação com *laser* de He-Ne

Foi utilizado um *laser* de He-Ne (*Uniphase, USA*), $\lambda = 632,8\text{nm}$, potência de saída 12mW, inserido em um sistema óptico, conforme figura 3.7.

FIGURA 3.7: Esquema do sistema óptico montado para irradiação dos calcânhares.

O sistema óptico consiste de um conjunto de lentes para expandir o feixe, resultando em um diâmetro de 6mm. Um polarizador Glan-Thompson, sempre alinhado a 0° com o longo eixo do calcânhar, foi inserido no caminho do feixe para obtenção da luz linearmente polarizada. Após atravessar o sistema óptico, a potência do *laser* reduziu-se à metade, $P = 6\text{mW}$, conforme medição realizada por um medidor de potência (*LaserCheck, Coherent, USA*). A confirmação da potência foi realizada em todos os dias de irradiação, antes de submeter cada animal à exposição *laser*. O tempo de exposição à radiação foi 46s. O tempo, bem como o diâmetro do feixe, foram escolhidos de modo a obter dose igual $1\text{J}/\text{cm}^2$, conforme a seguinte relação entre dose (D), área (A), potência (P) e tempo (t):

$$t = \frac{DA}{P} \Rightarrow D = \frac{tP}{A} \quad (3.18)$$

No sistema MKS, tem-se:

$$D = \frac{46 \cdot 6 \cdot 10^{-3}}{\pi \cdot (3 \cdot 10^{-3})^2} = \frac{9,8\text{kJ}}{\text{m}^2} = \frac{1\text{J}}{\text{cm}^2}$$

A intensidade (I) obtida nestas condições foi:

$$I = \frac{P}{A} \quad (3.19)$$

Então,

$$I = \frac{6.10^{-3}}{\pi.(3.10^{-3})^2} = \frac{212,2W}{m^2} = \frac{21,2mW}{cm^2}$$

Nestas condições, o campo elétrico (E) gerado por este *laser* - onde “I” é a intensidade, “Z₀” é a impedância do vácuo e “n” é o índice de refração do meio - de acordo com a (Eq. D.31), é:

$$|E| = \sqrt{\frac{IZ_0}{2n}} = \sqrt{\frac{212,21.377}{2.1}} = \frac{200V}{m} \quad (3.20)$$

Foi escolhido o calcanhar direito ou esquerdo, de acordo com a numeração do animal, para ser irradiado. O calcanhar não irradiado foi chamado de controle. O número de irradiações que cada animal recebeu, dependeu do grupo em que estava inserido, conforme tabela 3.1. A radiação foi entregue ao tecido por meio de varredura, movimentando-se os animais num vai-e-vem, durante 46s.

Em todos os grupos, os animais foram sacrificados imediatamente após a última irradiação.

TABELA 3.1: Divisão dos animais entre os quatro grupos estudados.

Animais	Idade com que ocorreu o sacrifício	Número de irradiações recebidas
#1, #2, #3	34 dias	1
#4, #5, #6	48 dias	5
#7, #8, #9	62 dias	9
#10, #11, #12	76 dias	13

3.3 Preparação das Amostras

Logo após o sacrifício, os tendões direito e esquerdo, correspondentes aos calcanhares irradiados e controle, ou vice-versa, eram extraídos e colocados individualmente em frascos devidamente identificados contendo paraformaldeído 4%.

Cada frasco foi cuidadosamente esgotado e em seguida preenchido com água destilada, ficando o tendão imerso por cinco minutos. Este procedimento foi repetido três vezes.

Depois, deu-se início à desidratação, sendo o material imerso em álcool etílico 70%, por uma hora. Este álcool foi esgotado e trocado por álcool etílico 80%, 95%, 100% e álcool etílico absoluto P.A. Cada um permaneceu por uma hora dentro do frasco, num ambiente a vácuo. Após esgotar o álcool absoluto P.A., uma mistura de álcool absoluto P.A. e xilol (proporção de 1:1) foi inserida no frasco e mantida por trinta minutos, a vácuo.

Este último foi esgotado e, então, iniciou-se a diafanização com xilol P.A. durante tempo suficiente para o material ficar transparente (cerca de dez minutos), também no ambiente a vácuo. A seguir, metade do xilol P.A. foi extraída e o frasco completado com parafina, permanecendo por trinta minutos na estufa, com temperatura entre 60°C e 70°C. Este último líquido foi descartado e o frasco foi preenchido apenas com parafina, ficando durante uma hora na estufa, na mesma faixa de temperatura acima. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Assim, o material foi moldado em pequenas caixas de papel. Após o resfriamento da parafina já enformada, aderiu-se um bloco de madeira a ela para sustentação ao micrótomo. Os cortes foram feitos longitudinalmente, com espessura de 8µm (**FIG. 3.8**).

FIGURA 3.8: Esquema do tendão e dos cortes realizados no micrótomo.

Para a microscopia de polarização, cerca de seis amostras foram obtidas para cada tendão, sendo o material restante utilizado para a técnica de GSH.

Tanto para a microscopia de polarização, quanto para a GSH, as amostras foram desparafinizadas. Os cortes, já aderidos às lâminas para microscopia óptica, foram imersos em xilol P.A. durante quinze minutos, por duas vezes, depois em uma mistura de clorofórmio e metanol (na proporção de 1:1) durante trinta minutos, uma mistura de álcool absoluto P.A. e xilol (proporção de 1:1) durante quinze minutos, álcool etílico 100%, 95%,

80%, 70% e 50%, durante cinco minutos cada, e por fim, água destilada durante cinco minutos, por duas vezes.

Todo o procedimento de preparação das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, assim como a medição sob o microscópio de polarização.

3.4 Microscopia de Polarização

O microscópio de polarização utilizado foi o Pol-Interferencial Photomicroscope (Zeiss, Germany), com objetiva acromática 10/0,22 Pol 160/, iluminação com lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO 200W) e filtro de interferência (PIL 546) para obtenção de luz monocromática com $\lambda = 546\text{nm}$ (FIG. 3.9).

FIGURA 3.9: Esquema experimental para medição da birrefringência com um microscópio de polarização.

O primeiro conjunto de medições foi realizado com as amostras embebidas em água destilada, para obtenção da birrefringência de forma. Durante todo o tempo tomou-se o devido cuidado para os espécimes não ressecarem, gotejando, quando necessário, água destilada entre a lâmina de microscópio e a lamínula que protegia o corte. Estas medições foram conduzidas com um compensador Sénarmont, o qual introduz um retardo óptico de $\lambda/4$. Quando a diferença de caminho óptico da amostra é igual ao retardo do compensador, há interferência destrutiva entre os raios ordinário e extraordinário, provenientes da amostra, caracterizada por um fundo escuro visto na ocular do microscópio. Este campo é encontrado variando-se a posição, em grau, do analisador em relação ao feixe de luz. Ao encontrar este campo escuro, lê-se o ângulo no microscópio. O ângulo, denominado α , é relacionado com o retardo óptico da amostra de acordo com a expressão:

$$\Delta n = \frac{\alpha}{180^\circ} \lambda \quad (3.21)$$

Se $\lambda=546\text{nm}$, a expressão torna-se:

$$\Delta n = \frac{\alpha}{180^\circ} 546 \Rightarrow \Delta n = \alpha \cdot 3,03\text{nm}$$

Deste modo, para determinar o retardo óptico (Δn) das amostras, em nm, multiplicou-se o ângulo (α) lido no microscópio por 3,03nm. Em média, vinte leituras de α foram realizadas por tendão.

O segundo conjunto de medições foi realizado com as amostras embebidas em glicerina pura, para obtenção da birrefringência intrínseca. Os valores da birrefringência intrínseca são menores que os valores da birrefringência de forma, então, utilizou-se um compensador mais sensível a pequenas variações de birrefringência. Sendo assim, foi usado o compensador do tipo Brace-Koehler, o qual introduz um retardo óptico de $\lambda/10$. A relação entre o retardo óptico da amostra, em nm, e o ângulo α lido no microscópio, para este compensador, é:

$$\Delta n = 47,20 \sin[2(45^\circ - \alpha)] \quad (3.22)$$

Também foram realizadas, aproximadamente, vinte leituras de α para cada tendão, conforme **APÊNDICES E e F**.

As medidas dos três animais de cada grupo foram unidas, resultando em sessenta leituras para cada tendão, de cada grupo. Os retardos ópticos calculados foram submetidos à análise estatística, para verificação de diferenças entre amostras irradiadas e não irradiadas.

3.5 Geração de Segundo Harmônico

O aparato experimental para geração e medição do segundo harmônico foi composto por um *laser* de femtosegundos de Ti:Safira (150fs) com 76MHz de taxa de repetição, diâmetro do feixe $\phi = 40\mu\text{m}$, comprimento de onda central $\lambda = 800\text{nm}$ e $\Delta\lambda = 10\text{nm}$. A potência pico do pulso, $P_p = 110\text{mW}$, foi verificada com um medidor de potência (*Coherent, USA*) previamente ao início de todas as medições, para garantir os mesmos parâmetros durante todo o experimento. Esta potência foi obtida com o auxílio de um filtro circular de densidade óptica variável (*Newport, USA*).

Um polarizador linear de calcita Glan-*Laser* (Newport, USA) foi posicionado no caminho do feixe, o qual podia ser girado livre e precisamente, de 1° em 1°, numa escala de 0° a 360°. Duas objetivas de magnificação 20x e abertura numérica 0,35 (Newport, USA) foram utilizadas para focalizar e coletar a radiação incidente e emergente da amostra, respectivamente. Um segundo polarizador, ou seja, um analisador, cujas especificações são as mesmas do primeiro polarizador, foi introduzido logo após a objetiva coletora. Um filtro absorvedor na faixa infravermelha do espectro eletromagnético, mas transmissor na faixa azul, foi utilizado para garantir que apenas a radiação do segundo harmônico ($\lambda = 400\text{nm}$) atingia o detetor, um tubo fotomultiplicador (Hamamatsu, Japan). O esquema do aparato pode ser visualizado na figura 3.10.

FIGURA 3.10: Esquema do aparato experimental para geração e medição do segundo harmônico.

O aparato, sem amostra, foi testado para verificar a inexistência da geração de harmônicos do conjunto óptico.

As 24 amostras, doze fatias de tendões controle e doze de tendões irradiados, (**FIG. 3.8**), foram analisadas assumindo que a fibrila do colágeno tem simetria cilíndrica, conforme trabalho de Roth and Freund [58]. Escolheu-se o eixo z, no sistema de coordenadas retangulares, para representar o longo eixo da fibrila, de tal modo que foi possível escrever as componentes da polarização não-linear, **P**, em termos do campo elétrico, **E**, do *laser* de Ti:Safira:

$$P_z(2\omega) = \rho E_z^2(\omega) + E_x^2(\omega) \quad (3.23a)$$

$$P_x(2\omega) = 2E_x(\omega)E_z(\omega) \quad (3.23b)$$

Na **Eq. (3.23a)**, ρ é a intensidade relativa dos tensores da hiperpolarizabilidade, mais especificamente dos tensores β_{zzz} e β_{zxx} . As susceptibilidades do meio são o resultado de como os elétrons ou íons reagem aos campos na matéria, e para meios como o colágeno, podem ser escritas como $\chi_2 = N \cdot \beta$, sendo esta a susceptibilidade de segunda ordem, e N a densidade eletrônica do meio. Somente dois tensores da hiperpolarizabilidade (β_{zzz} e β_{zxx}) foram considerados devido às condições de simetria de Kleinman [40].

Também, em adição ao sistema de coordenadas da fibrila, foi introduzido um sistema de coordenadas para o tendão, denominado XYZ. O longo eixo do tendão foi considerado Z, e a direção ao longo da propagação do feixe incidente, Y, conforme figura 3.11:

FIGURA 3.11: Sistema de coordenadas do aparato experimental da GSH.

Assumiu-se que a orientação média da função distribuição é simétrica na direção Z do tendão. Sendo assim, num sistema hipotético, cujas fibrilas são todas alinhadas paralelas ao eixo Z, tal que xyz e XYZ coincidam, P_z emite segundo harmônico na direção Z, e P_x na direção X. O aparato experimental consistiu em introduzir radiação *laser* cujo vetor campo elétrico fizesse um ângulo α relativo ao eixo Z, para medir o sinal do segundo harmônico por meio do analisador orientado paralelamente a Z, como mostrado na figura 3.11.

Desta forma, por meio das hiperpolarizabilidades, o parâmetro ρ foi utilizado para indicar o ordenamento na função de distribuição das fibrilas, em relação ao longo eixo do tendão, conforme referência [58]:

$$\rho = \frac{Z(0^\circ)}{Z(90^\circ)} = \frac{\beta_{zzz}}{\beta_{zxx}} \quad (3.24)$$

Quanto maior o valor de ρ , maior o ordenamento do meio, de acordo com a **Eq. (3.24)**.

As medições foram conduzidas embebendo-se as amostras em Nujol[®], um óleo mineral, o qual possui índice de refração $n = 1,48$ [50], permitindo melhor homogeneidade entre o conjunto lâmina de vidro ($n = 1,50$) e amostras ($n = 1,54$). Uma lâmina embebida em Nujol[®] foi colocada, sem amostra, no aparato experimental e esta não gerou segundo harmônico. Tomou-se o devido cuidado para as amostras permanecerem, durante as medições, sempre imersas em Nujol[®].

Para verificar o campo elétrico atingido pelo *laser* de Ti:Safira nas condições apresentadas, calculou-se a intensidade, de acordo com a potência pico:

$$I = \frac{110 \cdot 10^{-3}}{\pi \cdot (20 \cdot 10^{-6})^2} = \frac{8,75 \cdot 10^7 \text{ W}}{\text{m}^2} \quad (3.25)$$

Então,

$$|E| = \sqrt{\frac{IZ_0}{2n}} = \sqrt{\frac{8,75 \cdot 10^7 \cdot 377}{2 \cdot 1}} = \frac{0,13 \text{ MV}}{\text{m}} \quad (3.26)$$

Os valores do sinal do segundo harmônico medido, em mV, para as condições $Z(0^\circ)$ e $Z(90^\circ)$, encontram-se no **APÊNDICE G**.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é dividido de acordo com as duas técnicas utilizadas. O item **4.1** aborda a microscopia de polarização, e o item **4.2** a GSH.

4.1 Microscopia de Polarização

Foi possível observar, com a análise estatística, que os dados obtidos não são paramétricos, ou seja, não respondem ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias.

Desta forma, para analisar as diferenças entre amostras controle e irradiadas, bem como entre amostras controle de grupos diferentes, e irradiadas de grupos diferentes, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, o qual pressupõe que as amostras sejam independentes. De fato, as amostras deste trabalho são independentes, pois as medições realizadas nas amostras controle foram provenientes de cortes diferentes daqueles das amostras irradiadas. Além disso, os tendões eram o esquerdo, ou o direito.

As diferenças entre amostras controle e irradiadas, de um mesmo grupo, são mostradas nas tabelas **4.2** e **4.3**. Esta análise foi denominada intragrupo e o nível de significância escolhido para concluir se os retardos ópticos foram diferentes entre as condições controle e irradiada, foi 0,05.

TABELA 4.2: Diferenças intragrupos dos retardos ópticos calculados, em nm, para os tendões controle (não irradiados) e irradiados, quando o meio de embebição foi água.

Grupos	Retardos ópticos (nm) medidos em água		
	Medianas		Nível de Significância
	Controle	Irradiada	
34 dias	53,0	70,3	$p < 0,00001$
48 dias	57,0	64,4	$p < 0,00001$
62 dias	55,8	70,3	$p < 0,00001$
76 dias	58,5	64,9	$p < 0,00001$

TABELA 4.3: Diferenças intragrupos dos retardos ópticos calculados, em nm, para os tendões controle (não irradiados) e irradiados, quando o meio de embebição foi glicerina.

Grupos	Retardos ópticos (nm) medidos em glicerina		Nível de Significância
	Medianas		
	Controle	Irradiada	
34 dias	16,3	22,2	$p < 0,00001$
48 dias	17,7	19,0	$p = 0,0009$
62 dias	13,6	19,5	$p < 0,00001$
76 dias	14,4	16,9	$p < 0,00001$

A birrefringência é a medida da diferença entre n_e e n_o . Logo, um aumento da birrefringência do colágeno pode significar (a) aumento de n_e ou (b) diminuição de n_o .

De acordo com os resultados, os valores de retardo óptico obtidos para todas as amostras foram positivos, indicando que $n_e > n_o$, como de fato deve ser [45]. Além disso, para as amostras cujo meio de embebição foi a água, os retardos obtidos foram maiores em comparação àquelas analisadas com glicerina, conforme prediz a literatura [50, 51, 53]. Neste trabalho, as diferenças de retardo óptico entre as amostras controle cujo meio foi a água, em comparação com a glicerina, foram: 30,8% para o grupo 34 dias; 31,1% para o grupo 48 dias; 24,4% para o grupo 62 dias e 24,6% para o grupo 76 dias. A mesma comparação para as amostras irradiadas forneceu os seguintes resultados: 31,6% para o grupo 34 dias; 29,5% para o grupo 48 dias; 27,7% para o grupo 62 dias e 26% para o grupo 76 dias.

Analisando as diferenças entre amostras controle e irradiadas de um mesmo grupo, todas as amostras controle apresentaram menor retardo óptico do que as amostras irradiadas, conforme tabelas 4.2 e 4.3. Quando a água foi utilizada como meio de embebição, a diferença no grupo 34 dias (uma irradiação) foi cerca de 32,6%; no grupo 48 dias (cinco irradiações) foi 13,0%; 62 dias (nove irradiações) foi 26% e 76 dias (treze irradiações) foi 10,9%. Quando a glicerina foi utilizada, a diferença no grupo 34 dias foi 36,2%; no grupo 48 dias foi 7,3%; 62 dias foi 43,4% e 76 dias foi 17,4%. Com isso, é possível verificar que a diferença de retardo óptico entre controle e irradiada não tem relação direta com o número de irradiações, já que a diferença de retardo óptico não foi crescente.

Desta forma, outros fatores devem ser considerados para as diferenças observadas entre controle e irradiada. A fisiologia do animal, por exemplo, muda conforme

a idade aumenta. De acordo com o trabalho de Vidal e Carvalho, tendões de animais de experimentação apresentam retardo óptico, medido em água, crescente para as idades de 21, 90 e 710 dias [53].

Então, diferenças entre as amostras controle, de diferentes idades, e entre as amostras irradiadas, também de diferentes idades, foram analisadas. Esta análise, por sua vez, recebeu o nome de intergrupo e o nível de significância escolhido para concluir se os retardos ópticos das amostras foram diferentes entre os grupos, foi também 0,05. Os resultados para os tendões controle são apresentados nas tabelas **4.4** e **4.5** e para os tendões irradiados, nas tabelas **4.6** e **4.7**.

TABELA 4.4: Comparação intergrupos dos retardos ópticos calculados para os tendões controle (não irradiados), quando o meio de embebição foi água.

Grupos	Nível de Significância (p)			
	34 dias	48 dias	62 dias	76 dias
34 dias		0,0087	0,0058	0,0016
48 dias	0,0087		0,6327	0,5706
62 dias	0,0058	0,6327		0,3300
76 dias	0,0016	0,5706	0,3300	

Os retardos ópticos considerados estatisticamente diferentes estão hachurados.

De acordo com a tabela **4.4**, o grupo cujos animais tinham 34 dias de idade foi estatisticamente diferente dos demais e, segundo a tabela **4.2**, este grupo mostrou Δn significativamente menor em relação aos outros grupos.

As idades investigadas (34, 48, 62 e 76 dias) são mais próximas que àquelas do trabalho de Vidal e colaboradores [53], conseqüentemente, as diferenças fisiológicas, embora existam, são mais discretas. De fato, os resultados da tabela **4.4** mostram que não houve diferença entre os grupos 48 e 62 dias, 48 e 76 dias e 62 e 76 dias.

TABELA 4.5: Comparação intergrupos dos retardos ópticos calculados para os tendões controle (não irradiados), quando o meio de embebição foi glicerina.

Grupos	Nível de Significância (p)			
	34 dias	48 dias	62 dias	76 dias
34 dias		0,0036	0,0078	0,0117
48 dias	0,0036		0,0005	0,0296
62 dias	0,0078	0,0005		0,7290
76 dias	0,0117	0,0296	0,7290	

Os retardos ópticos considerados estatisticamente diferentes estão hachurados.

Na tabela 4.5 pôde-se verificar que os grupos cujos animais tinham 34 e 48 dias de idades foram estatisticamente diferentes dos demais. Por outro lado, os grupos 62 e 76 dias não mostraram diferenças estatísticas entre si. De fato, de acordo com a tabela 4.3, os retardos ópticos foram maiores nestes dois grupos, em relação aos demais. Assim, a birrefringência intrínseca foi mais sensível às mudanças não percebidas por meio da birrefringência de forma. Sabe-se que a birrefringência intrínseca é determinada pela orientação e força de oscilação das transições eletrônicas das moléculas, enquanto que a birrefringência de forma é dependente da concentração, geometria, estado organizacional e orientação dos feixes [52].

Para os tendões irradiados, os resultados são apresentados nas tabelas 4.6 e 4.7:

TABELA 4.6: Comparação intergrupos dos retardos ópticos calculados para os tendões irradiados, quando o meio de embebição foi água.

Grupos	Nível de Significância (p)			
	34 dias	48 dias	62 dias	76 dias
34 dias		0,0045	0,0846	0,0076
48 dias	0,0045		0,0971	0,4232
62 dias	0,0846	0,0971		0,1266
76 dias	0,0076	0,4232	0,1266	

Os retardos ópticos considerados estatisticamente diferentes estão hachurados

Não houve diferença entre os grupos 34 e 62 dias, 48 e 62 dias, 48 e 76 dias, e 62 e 76 dias. No entanto, houve diferença entre os grupos com 34 dias de idade e 48, assim como entre 34 e 76 dias de idade. Como pode ser verificado na tabela 4.2, o grupo 34 dias apresentou Δn maior que os grupos 48 e 76 dias.

TABELA 4.7: Comparação intergrupos dos retardos ópticos calculados para os tendões irradiados, quando o meio de embebição foi glicerina.

Grupos	Nível de Significância (p)			
	34 dias	48 dias	62 dias	76 dias
34 dias		< 0,00001	0,3023	< 0,00001
48 dias	< 0,00001		0,1042	0,0174
62 dias	0,3023	0,1042		0,0001
76 dias	< 0,00001	0,0174	0,0001	

Os retardos ópticos considerados estatisticamente diferentes estão hachurados

Os grupos 34 e 48 foram diferentes, bem como 34 e 76 dias, 48 e 76 dias e também 62 e 76 dias. De acordo com a tabela 4.3, o grupo 76 dias mostrou Δn menor que os demais grupos. Além disso, o grupo 34 dias mostrou Δn maior que o grupo 48 dias.

Assim, estas diferentes formas de encontrar o retardo óptico (birrefringência intrínseca e de forma), também mostraram diferenças quando as amostras irradiadas, entre diferentes grupos, foram estudadas. A tabela 4.6 traz a comparação dos tendões irradiados quando analisados com água: somente os grupos 34 e 48 dias e 34 e 76 dias foram diferentes. Na tabela 4.7 é possível verificar que somente não foram diferentes os grupos 34 e 62 dias e 48 e 62 dias. Ou seja, a birrefringência intrínseca foi mais sensível às mudanças fisiológicas provocadas pela irradiação.

É preciso, agora, considerar os efeitos da irradiação, pois independentemente dos grupos estudados e dos meios de embebição utilizados, as amostras irradiadas apresentaram maior retardo óptico, conforme a figura 4.12.

FIGURA 4.12: Retardos ópticos, em nm, obtidos para as amostras estudadas.

Qualquer *laser* é constituído por três elementos: meio ativo, bombeamento e ressonador. No *laser* de He-Ne, o meio ativo são os gases hélio e neônio, o bombeamento, normalmente, ocorre por meio de descarga elétrica e o ressonador é formado por dois espelhos altamente refletivos, paralelos, colocados frente a frente. Tais refletores enviam a onda eletromagnética em múltiplas passagens de ida e volta no meio ativo, amplificando assim o campo eletromagnético na cavidade. O acoplamento óptico em direção ao exterior realiza-se tornando semitransparente um dos espelhos, ou então fazendo um orifício em um dos espelhos.

A maioria dos *lasers* comerciais de He-Ne emite feixes mais ou menos polarizados [2] e por ser o tendão uma estrutura provida de direção preferencial (as fibras alinham-se preferencialmente ao longo eixo do tendão) optou-se por proceder a irradiação com um feixe 99% polarizado em paralelo com o longo eixo, colocando para isto, um polarizador linear no caminho do feixe. O intuito de polarizar a radiação desta maneira foi forçar a resposta do meio à radiação na direção do longo eixo, para verificar se isto auxiliaria no ordenamento das fibras, ou não.

O *laser* utilizado funciona no modo TEM_{00} , sendo esta uma propriedade espacial. O modo TEM_{00} é denominado modo fundamental do ressonador e, neste caso, a distribuição do campo é gaussiana. Do ponto de vista da teoria da difração, isto significa que a amplitude do campo que se propaga na cavidade possui, em todos os pontos, uma distribuição gaussiana. A propriedade fundamental que torna importante os feixes gaussianos é que eles mantêm sua distribuição gaussiana mesmo quando focalizados ou transmitidos por sistemas ópticos, como foi o caso deste trabalho, o qual utilizou, além do polarizador, um conjunto de lentes para expandir o feixe. Na prática, o modo TEM_{00} significa que a maior distribuição da potência do *laser* ocorre no centro do perfil gaussiano do feixe, isto é, o feixe, ao incidir na amostra, possui maior concentração da potência no centro do *spot*. Outra propriedade espacial dos *lasers* é a direcionalidade, ou seja, pouca divergência do feixe. A coerência é uma das características mais importantes e se manifesta simultaneamente pela monocromaticidade (coerência temporal) e pela frente de onda unifásica (coerência espacial).

Para concluir, as características de brilhância, diretividade e monocromaticidade das fontes *lasers* estão intimamente ligadas ao elevado nível de coerência apresentado por sua radiação. Portanto, a coerência é o ponto que diferencia os *lasers* das outras fontes luminosas, além do alto campo elétrico ao qual o alvo pode ser submetido.

Ao irradiar os tendões de maneira que o feixe *laser* seja perpendicular à superfície da pele, uma pequena fração da radiação incidente é refletida, cerca de 4 a 7% para comprimentos de onda de 250nm a 3000nm [64]. O restante da radiação é transmitido e, nas condições deste trabalho, a dispersão não-ressonante predomina, favorecendo a profundidade de penetração, principalmente numa estrutura anisotrópica como o tendão. De acordo com Tuchin, comprimentos de onda no intervalo de 600 a 1500nm, quando interagem com a pele, podem atingir profundidade de penetração de 8mm a 10mm [65]. Estas considerações são importantes porque até a radiação atingir o tendão, ela deve atravessar a pele que o reveste. De acordo com a literatura citada, a radiação atinge, sem dúvida, o tendão, pois na hipótese mais exagerada, a espessura do calcanhar de Aquiles dos ratos estudados não chega a atingir 8mm, incluindo a pele.

Portanto, a radiação *laser* pode ter causado um aumento do retardo óptico do colágeno devido ao aumento de n_e ou à diminuição de n_o . De acordo com a **Eq. (2.4)**, mudanças na constante dielétrica levam a mudanças no índice de refração. Quando a luz incidente é polarizada, os osciladores atômicos do meio dispersam a luz segundo direções

específicas. No caso deste estudo, as oscilações foram ao longo eixo do tendão, devido ao plano de polarização incidente. Desta forma, a polarizabilidade ao longo eixo do tendão aumentou, conseqüentemente, a constante dielétrica também, contribuindo para o aumento de n_e e, portanto, de Δn . A potência do *laser* de He-Ne utilizada foi 6mW, logo, o fluxo fotônico médio, calculado como $P/h\nu_0$, foi $6.10^{-3}/[6,626.10^{-34} \cdot (2,998.10^8/632,8.10^{-9})]$, resultando em $1,9.10^{16}$ fótons por segundo. Quando um material sem ressonância no visível interage com a luz, de acordo com a teoria eletromagnética, produzem-se fenômenos de dispersão não-ressonante e cada átomo comporta-se como fonte de ondas. Então, cada átomo da molécula de colágeno emitiu cerca 10^{16} fótons por segundo e isto é capaz de gerar um campo elétrico no colágeno suficiente para que a distribuição interna de cargas da molécula seja distorcida e sejam gerados dipolos elétricos que também contribuem diretamente para o campo interno total. Isto é, o campo externo separou as cargas positivas e negativas do meio e estas contribuíram, por sua vez, com uma componente adicional para o campo. O momento dipolar resultante por unidade de volume é a polarização elétrica da **Eq. (2.5)**.

Se os dipolos oscilam de acordo com o campo elétrico, há aumento da constante dielétrica, sendo assim, pode-se dizer que as diferenças entre tendão controle e irradiado foram dielétricas. De fato, o aumento da mobilidade dos íons existentes nas cadeias polipeptídicas alteram a constante dielétrica [17].

No caso do exterior da molécula de colágeno, onde há aminoácidos não-polares, o campo elétrico deforma a nuvem eletrônica, alterando a sua conformação relativamente ao núcleo e dando origem, deste modo, a um momento dipolar não permanente, o qual também deve ter sido suficiente para contribuir com o efeito biológico observado. A **Eq. (2.10)** representa o deslocamento relativo da nuvem negativa ao núcleo positivo. Quando a frequência do *laser* é menor que a frequência de ressonância do meio, tal qual ocorreu neste estudo, o movimento relativo da carga positiva tem a forma de uma vibração segundo a direção do campo e a polarização eletrônica é o mecanismo que determina $n(\omega)$ e, conseqüentemente, κ_E .

Há um cilindro de água ordenado ao redor da tripla hélice, onde pontes de hidrogênio existem tanto inter quanto intratripla hélice e já foi verificado que o efeito do alinhamento das fibras colágenas deve levar a um aumento na separação residual dipolar da água [20] - embora nossa hipótese seja de que a separação residual dipolar é que acarreta um alinhamento nas fibras, e não o contrário. De acordo com o trabalho de

Fechete *et al.*, a maior contribuição da separação residual dipolar foi obtida quando o ângulo entre o campo magnético e o longo eixo das fibras foi 90° [25]. Numa onda eletromagnética, quando o campo magnético é 90° , o campo elétrico é 0° , tal como neste trabalho. A água residual é aquela que penetra no volume intersticial da tripla hélice e é fixada por pontes de hidrogênio, devido a característica hidrofílica do interior da molécula.

A interação hidrofílica dirige o auto-arranjo do colágeno quando o conteúdo de água é grande, o qual gera grandes distâncias entre as moléculas. A força do campo elétrico entre as ligações diminui quando as interações hidrofílicas prevalecem [27]. Estas interações são fracas e de acordo com a tabela A.2, no **APÊNDICE A**, podem ser dipolo-dipolo induzido ou dispersão. Se as interações hidrofílicas prevalecem no centro da molécula, a qual tem os dipolos elétricos alinhados com o campo elétrico incidente e, portanto, tem os resíduos polares da água intersticial também alinhados com a polarização incidente, então há maior polarizabilidade no longo eixo da molécula. Há maior polarizabilidade no longo eixo da molécula porque as ligações hidrofílicas são fracas, de acordo com a teoria, portanto mais susceptíveis ao campo elétrico incidente, proporcionando novamente, maior constante dielétrica na direção do longo eixo das moléculas. Mesmo que as moléculas se distribuam helicoidalmente ao longo eixo das fibrilas, as ligações das interações hidrofílicas oscilam de acordo com o campo elétrico incidente, ou seja, em paralelo ao longo eixo do tendão. Se estas forças dirigem o auto-arranjo, pode-se supor que as sucessivas irradiações tenham auxiliado as interações hidrofílicas a auto-arranjarem as novas moléculas que constantemente são sintetizadas pelo tecido, numa conformação mais paralela ao longo eixo das fibrilas, favorecendo o ordenamento supramolecular e por fim, do tendão.

No entanto, o estudo de Kadler e colaboradores sugere que tanto forças hidrofóbicas quanto hidrofílicas dirigem o auto-arranjo das fibrilas [29]. O fato é que ainda nos dias atuais o auto-arranjo do colágeno não é conhecido, portanto, este trabalho não pretende esclarecer como o auto-arranjo acontece, mas pode auxiliar no entendimento da interação da radiação com a estrutura do colágeno. A hipótese do auto-arranjo ser dirigido por forças hidrofílicas encaixa-se bem com os efeitos que o *laser* é capaz de fazer num meio dirigido por estas forças.

As interações hidrofílicas são forças que podem dirigir o auto-arranjo no empacotamento longitudinal, o qual é mais conhecido do que o empacotamento lateral das fibrilas. Portanto, o colágeno é uma macromolécula que necessita ainda de muitos estudos.

Por exemplo, dentre as teorias sobre como se dá o empacotamento lateral, há a que prediz que o empacotamento é tal qual o dos cristais líquidos [31].

4.2 Geração de Segundo Harmônico

O sinal do segundo harmônico, em mV, foi medido para cada amostra (APÊNDICE G), porém, fez-se a média entre as três amostras de cada grupo, para então analisar as diferenças entre amostras controle e irradiadas, em função da intensidade relativa dos tensores da hiperpolarizabilidade, ρ (TAB. 4.8).

TABELA 4.8: Sinal do segundo harmônico medido, em mV, para os tendões controle (não irradiados) e irradiados, de acordo com $Z(0^\circ)$ e $Z(90^\circ)$.

Grupos	Sinal do segundo harmônico (mV)					
	Controle			Irradiada		
	$Z(0^\circ)$	$Z(90^\circ)$	ρ	$Z(0^\circ)$	$Z(90^\circ)$	ρ
34 dias	77,0	78,7	1,0	67,0	46,7	1,4
48 dias	70,3	46,8	1,5	93,3	25,9	3,6
62 dias	54,3	29,0	1,9	41,7	18,7	2,2
76 dias	25,0	2,9	8,6	33,9	2,7	12,6

ρ é adimensional, pois é o valor relativo entre $Z(0^\circ)$ e $Z(90^\circ)$.

É possível observar que as amostras irradiadas apresentaram, para todos os grupos, maior ρ em relação às amostras controle. Além disso, comparando-se os diferentes grupos, tanto ρ das amostras controle, quanto das amostras irradiadas foi crescendo com a idade dos animais, com exceção da amostra irradiada no grupo 62 dias.

Diferentemente do trabalho de Roth e Freund, o objetivo deste trabalho foi investigar a resposta do tendão, mais precisamente o ordenamento obtido com a irradiação, utilizando a técnica de geração de segundo harmônico para corroborar, ou não, com a microscopia de polarização [15]. As condições assumidas pelos autores para validar a teoria da GSH aplicada ao colágeno foram também assumidas neste trabalho. Por exemplo, considerou-se a simetria rotacional helicoidal da molécula envolta por um cilindro de água [20], sendo o longo eixo do cilindro coincidente com o longo eixo da molécula. O interior

da molécula foi tratado como polar e o exterior como não-polar [27]. Esta descrição coincide com a simetria de grupo pontual C_∞ , que é um caso especial para moléculas retilíneas. Desta forma, as componentes da polarização do segundo harmônico consideradas foram:

$$P_z(2\omega) = \beta_3 E_z^2(\omega) + \beta_1 \{E_x^2(\omega) + E_y^2(\omega)\};$$

$$P_x(2\omega) = 2\beta_1 E_x(\omega) E_z(\omega).$$

A componente $P_y(2\omega)$ foi considerada nula porque de acordo com as condições de simetria, os eixos x e y perpendiculares a z podem ser escolhidos arbitrariamente e, portanto, é possível ter $E_y \equiv 0$. Os tensores da hiperpolarizabilidade são $\beta_3 = \beta_{zzz}$; $\beta_1 = \beta_{zzx} = \beta_{zyy} = \beta_{xzx} = \beta_{yzy}$, etc. Estas equações estão de acordo com a forma de tensor óptico não-linear, com uma simbologia simplificada, de acordo com a contração piezelétrica e condições de simetria de Kleinman. Estas equações descrevem a GSH de uma fibrila isolada, com o entendimento de que $\beta_{fibrila} = N\beta_{molécula}$, sendo N o número de moléculas contido na fibrila. Esta última imposição permite o tratamento das fibrilas como moléculas supergigantes. Esta extrapolação é correta, desde que a geometria da amostra e as dimensões da fibrila sejam tais que as fases relativas dos vários campos ópticos não variem grandemente de uma fibrila para outra.

Mas assim como no trabalho [58], foram mensuradas as hiperpolarizabilidades relativas $\rho = (\beta_{zzz}/\beta_{zzx}) = (\beta_3/\beta_1)$, porque β_3 representa a polarização ao longo do eixo z , enquanto β_1 , ao longo do eixo x . A razão entre as duas é uma medição conveniente do grau de alinhamento das fibrilas, pois quanto maior β_3 , maior é o número de entidades susceptíveis ao campo elétrico naquela direção, isto é, maior o número de moléculas em relação à direção x . Desta maneira, quanto maior o índice ρ , mais alinhada é a estrutura do tendão em torno do eixo z da fibrila, o qual é coincidente com o denominado eixo Z do tendão (**FIG. 3.11**).

Quando um campo elétrico polariza o colágeno, isto é, deforma a distribuição de cargas e cria dipolos elétricos, o campo no interior do colágeno altera-se pela inclusão do campo induzido, o que obriga a introduzir a grandeza **D**. No colágeno, **D** e **E** relacionam-se por meio de um tensor, e no modelo proposto, este tensor é β , e nem sempre são paralelos. Aplicando as equações de Maxwell, conclui-se que os campos que vibram com a frente de onda são os campos **B** e **D** e não **B** e **E**. Ou seja, o vetor de propagação torna-se perpendicular a **D** e não a **E**. Neste caso, a direção de propagação passa a ser o vetor de Poynting, conforme teoria apresentada no capítulo seis. Mas devido à forma como

os átomos são distribuídos, **E** e **D** são colineares quando ambos forem paralelos ou perpendiculares ao eixo óptico. Sendo assim, analisou-se apenas as direções $Z(0^\circ)$ e $Z(90^\circ)$ (**FIG. 3.11**).

De acordo com o trabalho [58], ρ deve ser crescente com a idade do animal e, de fato, isto foi observado para as amostras controle de todos os grupos e também para as amostras irradiadas, com exceção do grupo 62 dias, cujo ρ foi menor do que do grupo anterior e próximo do valor de ρ do grupo 34 dias. Este fato é interessante, já que ao medir a birrefringência intrínseca, os grupos 34 e 62 dias foram estatisticamente iguais. Outro fato que faz as duas técnicas corroborarem é que as amostras irradiadas apresentaram, em todos os grupos, índice ρ maior que as amostras controle.

De acordo com a **Eq. (D.36)**, a curva do sinal de segundo harmônico deve obedecer uma função coseno, então, a análise das curvas (**FIG. 4.13 até FIG. 4.20**) também foi realizada. Foram construídas curvas com o polarizador mantido em 90° e o analisador variando de 0° a 90° . Esta escolha se deve ao fato de que sendo a molécula de colágeno uma estrutura uniaxial, anisotrópica e birrefringente, a orientação do campo relativamente ao eixo óptico determina a velocidade com que a onda eletromagnética se propaga. Ao incidir luz cujo campo elétrico **E** é perpendicular ao eixo óptico, a luz se propagará com velocidade $v_\perp$ em todas as direções, devido este campo ser paralelo ao eixo ordinário.

De fato, todas as curvas obedeceram à função $\text{Acos}(BX+C)+D$. Os valores de R^2 - valores indicativos de ajuste quando próximos da unidade – são mostrados.

FIGURA 4.13: Curva das amostras não irradiadas dos animais com 34 dias de idade.

FIGURA 4.14: Curva das amostras irradiadas dos animais com 34 dias de idade.

FIGURA 4.15: Curva das amostras não irradiadas dos animais com 48 dias de idade.

FIGURA 4.16: Curva das amostras irradiadas dos animais com 48 dias de idade.

FIGURA 4.17: Curva das amostras não irradiadas dos animais com 62 dias de idade.

FIGURA 4.18: Curva das amostras irradiadas dos animais com 62 dias de idade.

FIGURA 4.19: Curva das amostras não irradiadas dos animais com 76 dias de idade.

FIGURA 4.20: Curva das amostras irradiadas dos animais com 76 dias de idade.

É curioso notar que ρ não é diretamente proporcional ao sinal do segundo harmônico, pois analisando as curvas geradas, o sinal tende a diminuir com a idade dos animais. Segundo Tanaka *et al.*, de fato o sinal do segundo harmônico deve diminuir com a idade dos animais de experimentação e um motivo para isso seria o processo de glicação. A glicação é uma modificação estrutural associada com a idade e ocorre em todos os tecidos e órgãos, em todas as espécies [66].

A explicação para ρ não ser diretamente proporcional ao sinal do segundo harmônico pode ser matemática. Para o cálculo de ρ são tomados dois pontos: onde o polarizador faz 0° em relação ao eixo Z – $Z(0^\circ)$ – e onde o polarizador faz 90° em relação ao eixo Z – $Z(90^\circ)$. Por outro lado, para fazer as curvas, tomam-se todos os pontos, desde quando o polarizador faz 0° até 90° com o eixo Z.

Sendo assim, a análise das curvas, pura e simplesmente olhando-se o comportamento e a magnitude do sinal, deve servir apenas para verificar se corresponde a uma função harmônica, ou não. Pois se o comportamento deixasse de ser cossenóide poderia representar uma desnaturação, onde o ordenamento intrínseco das moléculas de colágeno estivessem sendo destruídos devido, por exemplo, à grande intensidade do *laser* de Ti:Safira. Desta forma, o que se estaria analisando não seria o segundo harmônico, mas uma interação linear.

Assim, é perfeitamente possível ter diminuição na amplitude da curva do sinal do segundo harmônico e aumento de ordenamento no tendão, porque ambos avaliam diferentes características. A amplitude do sinal do segundo harmônico pode diminuir com o processo de glicação inerente da idade [16], mas mesmo assim as fibrilas podem distribuir-se majoritariamente ao longo do eixo Z do tendão.

De fato, o índice ρ é independente da amplitude do sinal do segundo harmônico, conforme sugere o trabalho de Stoller e co-autores [60]. Os autores propuseram a medição de um parâmetro relacionado à susceptibilidade de segunda ordem, similar a ρ . Contudo, o aumento da intensidade da GSH não coincidiu com o aumento do parâmetro proposto e sugeriram que tal parâmetro não é influenciado pelo arranjo ao nível molecular, tampouco ao fibrilar. Os autores sugerem, então, que o nível de organização medido deve envolver algum alinhamento desconhecido dentro dos feixes e que o sinal do segundo harmônico não é influenciado pelo arranjo molecular ou fibrilar, mas sim pelo parâmetro que envolve as hiperpolarizabilidades.

A observação de que as amostras irradiadas apresentaram, em todos os grupos, índice ρ maior que as amostras controle significa, além do maior alinhamento na direção Z, que a irradiação aumentou a não-linearidade do colágeno. Uma das causas do aumento da não-linearidade é a redistribuição eletrônica do meio, conforme apresentado no capítulo oito. A origem desta não-linearidade é a tendência das moléculas tornarem-se alinhadas com o campo elétrico incidente. A onda óptica então “vê” um índice de refração modificado por causa da polarizabilidade média por molécula ter sido alterada com o alinhamento molecular. A redistribuição eletrônica, então, implica em maior polarizabilidade do meio, portanto, em maior constante dielétrica e os mesmos motivos já discutidos anteriormente sobre o aumento da polarizabilidade quando utilizada a microscopia de polarização podem ser utilizados aqui, para justificar os resultados da GSH.

O aumento da não-linearidade também pode estar associado ao aumento da quiralidade da molécula, já que apenas meios não-centrossimétricos são capazes de gerar não-linearidade de segunda ordem [67]. Assim, pode-se também supor que, além de aumentar a polarizabilidade do meio, a radiação do *laser* de He-Ne tenha aumentado a quiralidade da molécula.

4.3 Modelo Descritivo

De acordo com a revisão de literatura, o colágeno é a forma funcional de um oligômero biológico, cujos monômeros são aminoácidos quirais [68]. Sua estrutura primária é caracterizada, tipicamente, pela sequência glicina, prolina e hidroxiprolina, estabilizada por ligações covalentes cruzadas e intermoleculares [18]. A estrutura secundária descreve a hélice formada pelas cadeias polipeptídicas, sendo uma hélice unida à outra pelas pontes de hidrogênio. A estrutura terciária é o enrolamento da hélice, sendo constituído por três cadeias alfa, e a quaternária é a estrutura que fornece a característica fibrosa do colágeno. A espira da hélice da molécula do colágeno é para a direita, no entanto, a espira da hélice de cada cadeia alfa é para esquerda (**FIG. 2.4**) [23]. Os aminoácidos, embora quirais, se combinam para formar uma estrutura rotacionalmente simétrica, como a helicoidal, percebida tanto na molécula, quanto nas fibrilas e feixes [32, 33].

Estas características conferem ao colágeno anisotropias ópticas, isto é, as suas propriedades ópticas não são as mesmas em todas as direções na mesma amostra e isto ocorre porque os átomos da molécula não são dispostos de um modo especularmente

simétrico e, conseqüentemente, as forças de ligação dos elétrons na molécula também não são especularmente simétricas. Conforme o **APÊNDICE C**, qualquer anisotropia nas forças de ligação é refletida numa anisotropia correspondente do índice de refração.

Então, se o campo elétrico **E** incidente na molécula do colágeno for paralelo às ligações mais fortes (eixo ordinário), a frequência natural dos elétrons será elevada. Por outro lado, se **E** se orientar segundo o eixo cujas ligações são mais fracas (eixo extraordinário), a frequência natural será um pouco menor. De fato, o índice de refração no longo eixo do feixe vale 1,5434, sendo este o índice extraordinário. Na direção perpendicular ao longo eixo do feixe vale 1,5376, sendo este o índice ordinário [48]. Deste modo, $n_e > n_o$, ou seja, o colágeno é um oligômero positivamente birrefringente e uniaxial. A classificação em uniaxial vem do fato de possuir um único eixo óptico, o qual corresponde à direção em torno da qual os átomos se distribuem rotacionalmente de modo simétrico (**FIG. 4.21**).

FIGURA 4.21: Esquema e características dos eixos ordinário (n_o) e extraordinário (n_e) da molécula de colágeno.

A estrutura do colágeno, assim como de todas as moléculas, não pode ser diretamente visualizada devido às nanométricas dimensões. No entanto, é possível medir suas propriedades por meio das interações com campos eletromagnéticos e então, formular modelos apropriados, em conformidade com estas propriedades medidas [69].

Sendo assim, é proposto um modelo descritivo para o entendimento da interação do colágeno com luz monocromática visível e polarizada paralelamente ao longo

eixo das fibras. As moléculas do colágeno são helicoidais, além disso, distribuem-se espacialmente de maneira também helicoidal ao redor do longo eixo das fibrilas. Cada molécula tem um cilindro de água que a envolve, assim como um conteúdo de água residual. A água, por si só, é polar, e a distância entre seus dipolos e as moléculas de colágeno é dirigida por interações eletrostáticas. Este seria o modelo para o colágeno, num sistema em equilíbrio, de acordo com dados da literatura revisada. Num sistema perturbado, tal qual aquele que é submetido à radiação eletromagnética, se uma destas moléculas tiver o eixo óptico paralelo ao campo elétrico $\mathbf{E}$ da onda incidente, este campo deslocará as cargas, tanto das moléculas de colágeno quanto da água, em ambos os sentidos ao longo da molécula, gerando um momento de dipolo elétrico variável no tempo, paralelo ao eixo. Mesmo que as moléculas se distribuam helicoidalmente ao longo eixo das fibrilas, as interações eletrostáticas oscilam de acordo com o campo elétrico incidente. É sugerido que o campo elétrico linearmente polarizado ao longo eixo do tendão, tenha aumentado a distância de separação dos dipolos da água. Este aumento, por sua vez, influencia as interações eletrostáticas entre a água e a molécula, conferindo maior mobilidade às moléculas de colágeno, desde a estrutura terciária até a quaternária. Como os dipolos oscilam de acordo com $\mathbf{E}$ incidente, esta mobilidade pode ser preferencialmente conduzida para a mesma direção de $\mathbf{E}$, aumentando o alinhamento da estrutura.

É interessante discutir se esta mobilidade é permanente, ou não. De acordo com a metodologia deste trabalho não há condições de afirmar se o alinhamento da estrutura do colágeno é definitivo. Para isto, novas pesquisas são sugeridas, as quais deverão acompanhar os efeitos produzidos pela irradiação por períodos mais longos.

Também é preciso considerar os efeitos da radiação polarizada sobre as células do tecido que contém o colágeno tipo I. Por exemplo, a matriz extracelular é todo conteúdo do tecido que está fora das células que o compõem. É formada por um conjunto heterogêneo de macromoléculas (como o colágeno) produzidas pelas próprias células dos tecidos. O tipo de macromolécula, bem como sua organização e quantidade relativa determinam as propriedades físicas e funcionais dos tecidos. A matriz pode constituir a maioria do tecido, como é o caso dos tendões, da pele, dos ossos e das cartilagens ou a minoria, como ocorre no tecido nervoso. Atualmente sabe-se que a matriz não é uma componente passiva do tecido, pelo contrário, pode influenciar as suas células em vários fenômenos biológicos importantes, tais como migração, proliferação, desenvolvimento, forma e função [70].

O colágeno tipo I está entre as mais importantes proteínas responsáveis pela condução de força nos mamíferos. Independente de sua importância para o entendimento das propriedades mecânicas de muitos tecidos, há ainda uma lacuna no entendimento de como esta proteína realiza esse trabalho. Porém, há um consenso de que a característica mecânica do tecido conjuntivo é primariamente determinada pela composição e organização de suas moléculas [9, 35-37]. Lesões de tendão têm aumentado tanto em frequência quanto em complexidade e a terapia *laser* já se mostrou eficiente, contribuindo para diminuição do tempo de recuperação e melhora da cicatrização [71-73]. Desta maneira, as aplicações médicas e biológicas da radiação polarizada sobre o colágeno tipo I, devido ao melhor ordenamento proporcionado ao tecido, torna-se interessante.

No melhor de nosso conhecimento, este é um trabalho pioneiro, que objetivou investigar e contribuir com o entendimento da interação do *laser* de baixa potência de emissão vermelha com o colágeno. O conhecimento da relação entre os fatores físicos discutidos e os seus efeitos, certamente são de fundamental significância quando utilizados para provocar efeitos que dependem primariamente da propagação da luz no tecido, e não da dispersão ressonante. Este trabalho pode auxiliar no entendimento de fenômenos cujas causas também podem ser direcionadas à polarização do campo eletromagnético da radiação *laser*, como parece ser o caso da terapia *laser* de baixa potência, por exemplo. Mas outros trabalhos devem ser realizados para que os fenômenos fotobiológicos sejam completamente entendidos.

5. CONCLUSÕES

❶ O colágeno tipo I não irradiado apresentou valores menores de birrefringência (Δn).

❷ O colágeno tipo I não irradiado apresentou valores menores de susceptibilidade não-linear (ρ).

❸ O colágeno tipo I irradiado com um *laser* de baixa potência de He-Ne linearmente polarizado apresentou maiores valores de birrefringência (Δn) e susceptibilidade não-linear (ρ), indicando maior alinhamento ao longo eixo do tendão, em comparação ao colágeno não irradiado.

❹ É proposto que o campo elétrico $\mathbf{E}$, linearmente polarizado a 0° com relação ao longo eixo do tendão, tenha aumentado a distância entre os dipolos da água presentes na molécula. Este aumento, por sua vez, influencia as interações eletrostáticas entre a água e a molécula, conferindo maior mobilidade às moléculas de colágeno, desde a estrutura terciária até a quaternária. Como os dipolos oscilam de acordo com $\mathbf{E}$ incidente, esta mobilidade pode ser preferencialmente conduzida para a mesma direção de $\mathbf{E}$, aumentando o alinhamento da estrutura.

APÊNDICE A - Macromoléculas Biológicas

A estequiometria de uma proteína é a sua composição de aminoácidos. A geometria de uma molécula biológica é o arranjo linear e tridimensional destes aminoácidos.

Uma macromolécula é, literalmente, uma molécula grande. Uma macromolécula biológica, ou biopolímero, é tipicamente definida como uma grande e complexa molécula com funções biológicas. O colágeno tem importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. No homem, existem pelo menos 28 tipos de colágeno, cada um com diferentes funções.

De uma perspectiva química, o tamanho da macromolécula é definido em termos do número de componentes (átomos, grupos funcionais, monômeros) a ela incorporados. A complexidade geralmente refere-se à organização da estrutura tridimensional da molécula.

Uma vez que macromoléculas são biopolímeros, o tamanho pode ser definido da mesma forma que a química de polímeros, isto é, de acordo com o número de resíduos de açúcares ou aminoácidos ou ácidos nucleicos que polimerizam para formar uma molécula simples.

Polímero é a substância constituída de moléculas caracterizadas pela repetição múltipla de uma ou mais espécies de átomos ou grupos de átomos, ligados uns aos outros em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades que não variam acentuadamente com a adição ou a remoção de uma ou algumas unidades constitucionais. Enquanto oligômero é a substância constituída de moléculas que contêm poucos átomos de uma ou mais espécies ou grupos de átomos, ligados repetitivamente uns aos outros. As propriedades físicas de um oligômero variam com a adição ou a remoção de uma ou de algumas das unidades constitucionais de suas moléculas [74]. Dessa forma, o colágeno é um oligômero [68].

Não é possível ver, diretamente, a estrutura de uma molécula, mas pode-se medir suas propriedades. Então, uma imagem de uma molécula é apenas um modelo representado por átomos e posições de átomos no espaço tridimensional. Este modelo é correto somente quando está em conformidade com as propriedades medidas. Os métodos

utilizados para determinar a estrutura de uma molécula medem as interações desta com a luz, ou com um campo magnético ou elétrico [69].

A estrutura das macromoléculas biológicas é hierárquica, com níveis distintos, os quais representam crescente complexidade, conforme tabela **A.1**.

TABELA A.1: *Estrutura das macromoléculas.*

Nível	Nomenclatura	Definição
1	Monômeros	Blocos de construção que, quando polimerizados, produzem a molécula. São os próprios resíduos de aminoácidos.
2	Estrutura primária	Arranjo linear (ou seqüência) de resíduos ligados covalentemente ao polímero.
3	Estrutura secundária	Estrutura local regular de uma macromolécula ou regiões específicas da molécula.
4	Estrutura terciária	Entrelaçamento global tridimensional ou topologia de uma molécula, relativo às posições de cada átomo e resíduo no espaço tridimensional.
5	Estrutura quaternária	Arranjo espacial de múltiplos polímeros distintos que formam um complexo funcional.

Nem todos os níveis de estrutura são requeridos ou representados em todas as macromoléculas biológicas. Mas em geral, toda macromolécula biológica requer um nível acima da estrutura secundária para desempenhar uma função.

Os níveis apresentados são didaticamente úteis, porém não significam que a molécula se desenvolve, necessariamente, nesta mesma seqüência. Modelos recentes sugerem que o desenvolvimento da proteína inicia-se da estrutura terciária, para formar o ambiente de estabilização da estrutura secundária. Um dos objetivos da bioquímica física é entender as regras que relacionam estes níveis de complexidade estrutural [69].

Configuração e Conformação

O arranjo de átomos ou grupos de átomos em uma molécula é descrito por meio dos termos configuração e conformação. Estes termos não são idênticos. A configuração de uma molécula define a posição dos átomos ao redor de uma ou mais

ligações químicas não-rotatórias ou ao redor de um centro quiral, definido como um átomo que não tem plano ou centro de simetria. Para mudar a configuração de uma molécula, ligações químicas devem ser quebradas e refeitas, sendo a molécula resultante chamada estereoisômero ou enantiômero da estrutura inicial. Os enantiômeros de uma molécula, ainda que sejam idênticos na composição química, são moléculas completamente diferentes com distintas propriedades, particularmente suas propriedades biológicas. Nas macromoléculas biológicas, a configuração é muito importante na descrição da estereoquímica da molécula quiral. Uma simples molécula quiral tem quatro grupos químicos únicos arranjados em torno de um átomo tetraédrico (usualmente um átomo de carbono) [69].

A conformação de uma molécula, por outro lado, descreve o arranjo espacial dos átomos sobre uma ou mais ligações livremente rotatórias. Então, ela descreve a estrutura dos isômeros gerados pelas rotações sobre as ligações simples. Uma molécula não requer qualquer mudança nas ligações químicas para adotar uma nova conformação, mas pode adquirir um novo conjunto de propriedades específico para a nova conformação [69].

Estereoquímica dos Monômeros

A compreensão da estereoquímica é fundamental para a compreensão da química, especialmente da química orgânica, onde a grande diversidade das moléculas se dá pelas múltiplas possibilidades de ligações entre poucos átomos e as muitas maneiras como estas moléculas se arranjam no espaço. No comportamento de uma molécula orgânica, a questão da forma é muito importante, pois é a partir dela que se deduz o comportamento molecular e a reatividade.

Os blocos construtores das macromoléculas biológicas, os monômeros, são moléculas quirais, salvo raras exceções. Há muitas convenções para descrever a estereoquímica das moléculas quirais, mas segundo a bioquímica, as configurações de resíduos de açúcares, aminoácidos e ácidos nucleicos são designadas em relação às estruturas do L - e D – gliceraldeído. Na projeção da fórmula padrão, os grupos funcionais do D – gliceraldeído giram na direção horária ao redor do carbono quiral, começando no aldeído (HC=O), indo para hidroxila (OH), então para o metil (CH_2OH), e finalmente para o hidrogênio (H) [11].

A configuração dos monômeros é determinada, então, de acordo com o arranjo dos grupos funcionais análogos aos acima mencionados, que estão ao redor dos seus centros quirais. Esta configuração é a mesma para monômeros de carboidratos nos polissacarídeos, assim como para os açúcares ribose e desoxirribose dos ácidos nucleicos [11].

Biopolímeros são tipicamente construídos a partir de apenas um enantiômero dos monômeros. Para os aminoácidos, como a alanina, o centro quiral (carbono C_α) é o carbono diretamente adjacente ao ácido carboxílico. Os grupos funcionais ao redor do carbono C_α são análogos, mas não idênticos àqueles ao redor do centro quiral do gliceraldeído. A configuração L de um aminoácido tem o ácido carboxílico, o grupo amina, o α -hidrogênio, e o metileno arranjados ao redor do carbono C_α , exatamente da mesma maneira que os análogos aldeído, hidroxila, hidrogênio e metileno estão arranjados no L – gliceraldeído [69].

Conformação das Moléculas

Diferentemente da configuração, o número de possíveis conformações de uma macromolécula pode ser enorme por causa do grande número de ligações rotatórias livres. Então, é mais conveniente descrever o ângulo de torção sobre cada ligação rotatória livre. O ângulo de torção é aquele entre dois grupos, tanto de um lado quanto de outro da ligação química rotatória. O ângulo de torção também pode ser chamado de ângulo diedro [69].

Mudar a conformação de uma molécula não é fazer uma nova molécula, mas podem ocorrer mudanças de propriedades. Por regra, a conformação enovelada de uma proteína, referida como conformação nativa, é considerada a forma funcional, enquanto a conformação não enovelada ou desnaturada é não-funcional. Assim, tanto configuração quanto conformação de uma molécula são importantes para seu formato e função, mas representam características distintas e não são termos inter-relacionados [69].

Interações Moleculares

As configurações das macromoléculas são fixadas por ligações covalentes. As conformações, contudo, são altamente variáveis e dependem de vários fatores. A sequência para o enovelamento das macromoléculas em estruturas secundária, terciária e quaternária

depende de um número específico de interações. Isto inclui as interações entre átomos nas moléculas e entre a molécula e seu ambiente.

Interações Fracas

As ligações covalentes que mantêm os átomos de uma molécula unidos são fortes, e portanto, difíceis de quebrar, conforme pode ser verificado na figura A.1.

FIGURA A.1: Energia das interações moleculares. As interações que definem a estrutura de uma molécula são as ligações covalentes, classificadas como fortes (200 a 800 kJ/mol). As interações fracas são íon-íon, dipolo-dipolo, dispersão e ligações de hidrogênio (0 a 60 kJ/mol). Figura traduzida da fonte [69].

A conformação de uma macromolécula, contudo, é estabilizada por ligações fracas. As interações fracas descrevem como átomos ou grupos de átomos são atraídos ou repelidos para minimizar a energia de uma conformação.

Há, em geral, interações dependentes da distância, com as energias sendo inversamente proporcionais à distância r ou às potências de r (r^2 , r^3 , etc.). Esta distância é aquela que separa dois grupos que estão interagindo (TAB. A.2).

TABELA A.2: *Relação das interações não covalentes com a distância (r) que separa as moléculas envolvidas na interação.*

Tipo de Interação	Relação com a Distância
Carga-carga	$1/r$
Carga-dipolo	$1/r^2$
Dipolo-dipolo	$1/r^3$
Carga-dipolo induzido	$1/r^4$
Dispersão ou dipolo-dipolo induzido	$1/r^6$

Tabela traduzida da fonte [69].

Conforme a potência da distância aumenta, a interação tende a zero mais rapidamente. A energia de interação entre duas cargas varia de acordo com $1/r$; esta é uma grande interação. No outro extremo estão as interações dipolo-dipolo induzido ou dispersão. Estas interações descrevem a tendência natural dos átomos atraírem, não obstante a carga e polaridade, por causa da polarizabilidade das nuvens eletrônicas. A dependência de $1/r^6$ define que essa é uma interação muito pequena, tendo energia de interação insignificante a aproximadamente 1nm. Diretamente oposta a esta atração, contudo, é a repulsão estérica, a qual não permite que dois átomos ocupem o mesmo espaço ao mesmo tempo. Esta repulsão ocorre em distâncias mais curtas ainda e é dependente de $1/r^{12}$. Contudo, as dispersões atrativa e repulsiva definem uma distância ótima de separação entre dois quaisquer átomos neutros, no qual a energia de interação é mínima. Esta distância ótima define um raio efetivo (o raio de van der Waals) para cada tipo de átomo [69].

As energias associadas às grandes interações (carga-carga, carga-dipolo e dipolo-dipolo) são dependentes do meio em que estão inseridas. Um meio minimamente polarizável é o vácuo, com uma constante dielétrica $\kappa_E = 4\pi 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 / \text{J.m}$. A polarizabilidade de um meio é definida como sua constante dielétrica D relativa àquela do vácuo. As expressões para as grandes interações energéticas são todas inversamente relacionadas ao dielétrico do meio e são, então, enfraquecidas em um meio altamente polarizável, como a água ($D \approx 80\kappa_E$), porém fortalecidas quando o meio é o vácuo [69].

Com a constante dielétrica, introduz-se o ambiente como um fator na estabilização da conformação de uma macromolécula.

Relação de Simetria entre Moléculas

Sistemas biológicos tendem a ter simetria, desde a forma de um organismo até a estrutura das moléculas deste organismo. Isto é verdade, embora os monômeros (aminoácidos, por exemplo), sejam sempre assimétricos. Na verdade, frequentemente os monômeros se combinam para formar estruturas simétricas. Moléculas assimétricas são aquelas que não tem plano ou centro de simetria, isto é, são moléculas quirais [11].

Simetria é a correspondência na composição, forma e posição relativa de partes que estão de lados opostos de uma linha divisória ou eixo. Há dois tipos de simetria relevantes para a biologia e para a estrutura molecular: simetria especular e simetria rotacional. A simetria especular relaciona duas metades de lados opostos em relação a uma linha ou plano. O outro tipo de simetria relaciona partes distribuídas ao redor de um ponto ou eixo (**FIG. A.2**). Esta última inclui simetria radial sobre um único eixo ou múltiplos eixos, e simetria helicoidal [69].

FIGURA A.2: Exemplos de simetria especular (borboleta) e rotacional (octógono).

Estrutura das Proteínas

Proteínas são formas funcionais dos polipeptídeos e são constituídas por diferentes categorias: proteínas globulares solúveis em água, proteínas fibrosas insolúveis em água e proteínas que se associam com ambiente hidrofóbico da bicamada de membranas. Cada uma destas categorias é caracterizada por composições e seqüências distintas de aminoácidos, mas todas elas podem ser descritas por um conjunto idêntico de princípios básicos [11].

Monômeros

Proteínas são polímeros construídos com aminoácidos (os monômeros). Há vinte aminoácidos que são comuns a todos os organismos vivos na Terra. Todos eles são

α -aminoácidos, ou seja, possuem o grupo amina ($-\text{NH}_2$) na posição 2. Os grupos amina e carboxila são separados por um carbono C_α simples (**FIG. A.3**).

FIGURA A.3: Estrutura geral de um aminoácido.

Todos os aminoácidos comuns são L-aminoácidos, com exceção da glicina, que é aquiral [69]. Os aminoácidos distinguem-se pelas propriedades químicas de suas cadeias laterais (R) ligadas ao carbono C_α (**FIG. A.4**).

FIGURA A.4: Os vinte aminoácidos mais comuns, categorizados como não-polares (hidrofóbicos), polares não carregados, ou carregados em pH neutro. Foram listados de acordo com a frequência de ocorrência nas proteínas típicas.

Aminoácidos podem ser hidrofóbicos (repulsão à água) ou hidrofílicos (afinidade à água). Muitas proteínas são anfipáticas, isto é, possuem aminoácidos tanto

hidrofóbicos quanto hidrofílicos e sua carga total dependerá não apenas da quantidade destes aminoácidos, mas também do pH em que estiverem inseridas. O pH no qual a carga total é zero (todas as cargas negativas são balanceadas pelas cargas positivas), é o chamado ponto isoelétrico ou pI da proteína [69].

Estrutura Primária

A estrutura primária caracteriza-se pela seqüência única dos aminoácidos e ligações peptídicas da proteína. A ligação peptídica é aquela que liga dois resíduos de aminoácidos por meio da ligação C-N, fazendo com que surja a função amida. Esta estrutura apresenta, em uma extremidade, um terminal amina e, na outra extremidade, um terminal carboxila. Ela pode ser destruída por hidrólise química ou enzimática das ligações peptídicas, com liberação de peptídeos menores e aminoácidos livres [69].

Estrutura Secundária

A estrutura secundária é dada pelo arranjo espacial e regular da estrutura primária. Ela ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos α e seus grupos amina e carboxila. O termo “regular” refere-se à simetria da estrutura. Desse modo, a única estrutura espacial simétrica que pode ser construída a partir de uma cadeia linear de monômeros quirais é uma hélice. Então, a estrutura secundária de uma proteína descreve a hélice formada por cadeias polipeptídicas. Estas hélices são mantidas unidas pelas pontes de hidrogênio formadas entre os hidrogênios da amina (hidrogênios doadores) e os oxigênios da carboxila (onde estão os hidrogênios receptores) [69].

Estrutura Terciária

A estrutura terciária resulta do enrolamento da hélice, conferindo função biológica às proteínas. Enquanto a estrutura secundária é determinada pelo relacionamento estrutural de curta distância, a terciária é caracterizada pelas interações de longa distância entre os aminoácidos. Uma hélice é uma estrutura na qual resíduos giram e ascendem de uma maneira repetitiva ao longo de um eixo, ocupando posições bem definidas. A rotação na hélice pode ser tanto para direita, quanto para esquerda. Existem vários tipos de

estruturas terciárias helicoidais na bioquímica das proteínas (**TAB. A.3**), mas a α -hélice talvez seja a mais facilmente reconhecida [69].

TABELA A.3: *Simetria de algumas macromoléculas helicoidais.*

Tipo de Estrutura	Resíduos por volta	Ascendência (nm)	Simetria Helicoidal
β -sheet	2	0,34	2_1
α -hélice	3,6	0,15	18_5
π -hélice	4,4	0,12	22_5
A-DNA	11	0,273	11_1
Z-DNA	-12	-0,372	6_5^*

* O sinal negativo denota rotação da estrutura para esquerda.

A simetria helicoidal significa que, no caso da α -hélice, existem 18 resíduos para cada 5 voltas completas da hélice. Tabela traduzida da fonte [69].

Estrutura Quaternária

A estrutura quaternária também é dada pelo arranjo espacial dos aminoácidos, porém não só de uma cadeia polipeptídica, mas de quantas forem necessárias para formar a proteína. Esta estrutura é estabilizada pelas mesmas interações da terciária. Há duas grandes categorias para a estrutura quaternária, a fibrosa e a globular. O colágeno é um exemplo de proteína cuja estrutura quaternária é fibrosa [69].

APÊNDICE B - Teoria Eletromagnética

O trabalho de J. C. Maxwell e os desenvolvimentos a que deu origem, desde o final do século XIX, tornaram inequívoca a natureza eletromagnética da luz. As leis da eletrodinâmica clássica permitem prever que a energia se transfere continuamente por meio de ondas eletromagnéticas. A eletrodinâmica descreve as interações eletromagnéticas e os fluxos de energia em termos de “partículas” elementares sem massa, os fótons, quanta de energia localizada. A natureza quântica da energia radiante nem sempre é evidente e o seu interesse prático em Óptica é reduzido. O fluxo de luz incidente contém quase sempre energia suficiente para que a sua natureza corpuscular não seja diretamente manifestada [2].

Quando o comprimento de onda da luz é pequeno relativamente às dimensões dos objetos, a Óptica Geométrica pode ser utilizada em primeira aproximação. A Óptica Física, por outro lado, permite um tratamento mais preciso, ainda aplicável mesmo quando as dimensões dos objetos forem pequenas. No paradigma da Óptica Física a característica mais importante da luz é a sua natureza ondulatória. É possível abordar a maior parte dos problemas, na Física, sem especificar o tipo de onda com que se está trabalhando. De fato, na Óptica Física clássica é suficiente tratar a luz como uma onda eletromagnética.

A luz pode ser tratada como uma outra manifestação da matéria. Com efeito, um dos principais pilares em que assenta a Mecânica Quântica é o fato de tanto a luz, como os objetos materiais, apresentarem propriedades corpusculares e ondulatórias semelhantes. Para Erwin C. Schrödinger, um dos fundadores da teoria quântica, todas as partículas têm natureza ondulatória e vice-versa. Nenhum dos dois conceitos deve ser abandonado, mas sim fundidos. E qual dos dois aspectos se impõe, depende não do objeto físico, mas sim do sistema experimental utilizado para o analisar [2].

A Mecânica Quântica associa a uma partícula, seja ela fóton, elétron, próton, etc, uma equação de ondas. No caso de partículas materiais, os aspectos ondulatórios são introduzidos por intermédio de uma equação de campo conhecida por equação de Schrödinger. Para os fótons, a sua natureza ondulatória é descrita pelas equações clássicas do campo eletromagnético de Maxwell. Com base nestas equações é possível construir uma teoria quântica dos fótons e das suas interações com as cargas elétricas. A natureza dual da luz é reforçada pelo fato de a luz se propagar no espaço como uma onda, mas manifestar comportamento corpuscular durante os processos de emissão e absorção. A

energia radiante eletromagnética não varia de uma forma contínua, como numa onda clássica, mas sim por criação ou destruição de fótons. O seu modo de propagação através de lentes, aberturas ou fendas é, no entanto, determinado pelas suas características ondulatórias [2].

O fóton tem massa em repouso nula e, portanto, qualquer número de fótons de baixa energia pode coexistir num feixe de luz. Num modelo deste tipo, feixes densos de fótons atuam como um todo e produzem campos clássicos bem definidos [2]. Pode construir-se uma analogia, embora não muito precisa, com o fluxo de pessoas numa estação de trem em horário de pico. Cada pessoa comporta-se presumivelmente como ser humano com vontade própria, mas todos têm a mesma intenção e seguem trajetórias bastantes semelhantes. Para um observador míope e afastado, existe um aparente fluxo contínuo e homogêneo. As características globais deste fluxo são previsíveis diariamente e o movimento de cada passageiro pode ser considerado irrelevante, pelo menos para um tal observador. A energia transportada por uma grande quantidade de fótons é, em média, equivalente à energia transportada por uma onda eletromagnética clássica. É por estas razões que o conceito de campo, aplicado à representação dos fenômenos eletromagnéticos, tem sido e continuará a ser de extrema utilidade.

Pragmaticamente, a luz pode ser considerada como uma onda eletromagnética clássica, não esquecendo que existem situações em que esta descrição é completamente inadequada [2].

Campos Eletromagnéticos

Sabe-se experimentalmente que cargas, mesmo no vácuo, interagem mutuamente. Segundo a teoria clássica, ao associar a cada carga um campo elétrico que a rodeia, é fácil admitir que cada carga interage diretamente com o campo em que está imersa. Assim, se a carga q é influenciada por uma força $\mathbf{F}_E$, o campo elétrico $\mathbf{E}$ na posição da carga é definido por $\mathbf{F}_E = q\mathbf{E}$. Então, uma carga em movimento pode estar sujeita a uma outra força $\mathbf{F}_M$ proporcional a sua velocidade $\mathbf{v}$. Define-se um outro campo, a indução magnética $\mathbf{B}$, tal que $\mathbf{F}_M = q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$. Se ambas as forças $\mathbf{F}_E$ e $\mathbf{F}_M$ se fizerem sentir simultaneamente, a carga desloca-se numa região do espaço onde se manifestam campos elétricos e magnéticos, e $\mathbf{F} = q\mathbf{E} + q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$.

Assim, campos elétricos são gerados quer por cargas elétricas quer por campos magnéticos variáveis no tempo. Do mesmo modo, os campos magnéticos são gerados por correntes elétricas e por campos elétricos variáveis. Esta interdependência entre **E** e **B** é fundamental para a descrição da luz. As letras em negrito representam grandezas vetoriais, ou seja, têm módulo, direção e sentido.

Para detalhes das próximas equações recomenda-se a referência [75], a qual faz uma dedução completa das equações de Maxwell para ondas eletromagnéticas.

Ondas Eletromagnéticas

Um campo **E** variável gera um campo **B** perpendicular, em todos os pontos, à direção ao longo da qual **E** varia (**FIG. B.5**).

FIGURA B.5: Campo elétrico **E** não-estacionário. As linhas do campo magnético **B** formam anéis fechados em torno dos pontos em que o fluxo do campo elétrico varia.

Do mesmo modo, um campo variável **B** gera um campo **E** perpendicular à direção ao longo da qual **B** varia. Numa perturbação eletromagnética arbitrária, os campos **E** e **B** deverão, então, ser transversos relativamente à direção de propagação.

Uma carga em repouso gera um campo elétrico radial e uniforme que se estende até o infinito. No instante em que a carga começa a ser mover e torna-se acelerada, o campo **E** é alterado na vizinhança imediata da carga; esta alteração propaga-se no espaço com uma velocidade finita. Este campo **E**, variável no tempo, induz um campo magnético, de acordo com a equação:

$$\nabla \times \mathbf{B} = \mu_0 \epsilon_0 + \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (\text{B.1})$$

Onde:

μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo;

ϵ_0 é a permitividade elétrica no vácuo.

Se a velocidade da carga for constante, a taxa de variação do campo **E** será também constante e o campo **B** resultante será igualmente constante. A carga, todavia, está acelerada: $\frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}$ não é constante e, portanto, o campo induzido **B** depende do tempo. Uma variação de **B** induz, por sua vez, um campo **E**:

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (\text{B.2})$$

O processo continua, com os campos **E** e **B** intrinsecamente acoplados e propagando-se sob a forma de um impulso. A variação de qualquer um dos campos dá origem a um novo campo que se estende um pouco mais além, e deste modo, o impulso propaga-se de um ponto para outro, através do espaço.

Assim, os campos **E** e **B** devem ser considerados como dois aspectos do mesmo fenómeno, o campo eletromagnético, cuja fonte é constituída por cargas em movimento. A perturbação, uma vez gerada, toma a forma de uma onda que se propaga a partir da fonte e independentemente desta.. Constituindo uma só entidade, os campos eléctrico e magnético regeneram-se mutua e indefinidamente.

Forma Geral

Para construir a equação das ondas eletromagnéticas na sua forma mais geral, é necessário aceitar algumas hipóteses sobre o meio em que ocorre a propagação. Como se viu anteriormente, a polarização **P** constitui uma medida da resposta global do meio, na medida em que representa o momento dipolar eléctrico resultante por unidade de volume. Como o campo no material é alterado, define-se um novo campo vetorial, o vetor deslocamento **D**, por meio de:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad (\text{B.3})$$

Mas então:

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{D}}{\epsilon_0} - \frac{\mathbf{P}}{\epsilon_0} \quad (\text{B.4})$$

O campo eléctrico **E** é a diferença entre o campo $\mathbf{D}/\epsilon_0$ – que seria medido na ausência de qualquer polarização – e o campo $\mathbf{P}/\epsilon_0$ devido à polarização. Para um

dielétrico homogêneo, linear e isotrópico, $\mathbf{P}$ e $\mathbf{E}$ têm a mesma orientação e são proporcionais entre si. Consequentemente, $\mathbf{D}$ é também proporcional a $\mathbf{E}$:

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E} \quad (\text{B.5})$$

Tal como $\mathbf{E}$, $\mathbf{D}$ está definido em todo o espaço e não está confinado ao volume do dielétrico, como $\mathbf{P}$. De um modo geral, a resposta dos meios ópticos a campos magnéticos $\mathbf{B}$ pouco difere do vazio [40]. É suficiente dizer que o material se polariza. Define-se uma polarização magnética ou vetor de magnetização, $\mathbf{M}$, como o momento dipolar magnético por unidade de volume. Para tratar da influência da polarização magnética, define-se um campo auxiliar $\mathbf{H}$, conhecido tradicionalmente como intensidade do campo magnético:

$$\mathbf{H} = \mu_0^{-1} \mathbf{B} - \mathbf{M} \quad (\text{B.6})$$

Em meios homogêneos, lineares (não-ferromagnéticos) e isotrópicos, $\mathbf{B}$ e $\mathbf{H}$ são paralelos e proporcionais entre si:

$$\mathbf{H} = \mu^{-1} \mathbf{B} \quad (\text{B.7})$$

Existe uma outra equação constitutiva que deve ser considerada, além das **Eq. (3.20) e (3.21)**:

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} \quad (\text{B.8})$$

Conhecida como Lei de Ohm, esta equação traduz resultados experimentais obtidos em condutores a temperatura constante. Os fluxos de carga são determinados pela intensidade do campo elétrico e, portanto, pela força que se exerce sobre cada elétron do condutor. A constante de proporcionalidade que liga $\mathbf{E}$ e $\mathbf{J}$ é a condutividade elétrica do meio, σ . Considerando um meio suficientemente geral, linear (não-ferroelétrico e não-ferromagnético), homogêneo e isotrópico, estático, isto é, em repouso relativamente ao observador, as equações constitutivas permitem rescrever as equações de Maxwell:

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \rho / \epsilon \quad (\text{B.9})$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (\text{B.10})$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = - \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (\text{B.11})$$

$$\nabla \times \mathbf{B} = \mu \sigma \mathbf{E} + \mu \epsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (\text{B.12})$$

Polarização

A luz pode ser representada em termos de ondas eletromagnéticas transversas. Até agora considerou-se apenas luz polarizada linearmente, isto é, luz para a qual a orientação do campo elétrico é constante, embora a amplitude e o sentido deste possam variar no tempo (**FIG. B.6**).

FIGURA B.6: Campos E e B (harmônicos e perpendiculares entre si) para uma onda com polarização linear.

O campo elétrico, ou a perturbação óptica, mantém-se deste modo num plano que se designa como plano de polarização. Este plano, fixo, é definido por $\mathbf{E}$, o vetor campo elétrico, e por $\mathbf{k}$, o versor da direção de propagação.

Agora, considerando duas ondas luminosas, harmônicas, polarizadas linearmente e com a mesma frequência, propagando-se na mesma região do espaço e segundo a mesma direção, se os campos forem paralelos, o campo resultante da sobreposição das duas ondas constitui uma onda polarizada linearmente. Se, pelo contrário, os campos das duas ondas luminosas forem perpendiculares, a onda resultante pode ter ou não polarização linear.

Polarização Linear

Os dois campos luminosos ortogonais acima considerados, ao propagarem-se ao longo do eixo dos z , podem ser representados na forma

$$\mathbf{E}_x(z, t) = \hat{\mathbf{i}} E_{0x} \cos(kz - \omega t) \quad (\text{B.13})$$

e

$$\mathbf{E}_y(z, t) = \hat{\mathbf{j}} E_{0y} \cos(kz - \omega t + \psi) \quad (\text{B.14})$$

Sendo ψ a fase relativa entre as duas ondas. Quando se escreve a fase na forma $(kz - \omega t)$, a adição de um ψ positivo significa que a função coseno na **Eq. (B.14)** só atinge um valor idêntico ao do coseno na **Eq. (B.13)** depois de ter decorrido um intervalo de tempo (ψ/ω) . E_y está, então, atrasada de $\psi > 0$ em relação a E_x . Quando ψ for negativo, E_x estará atrasado de $\psi < 0$ em relação a E_y . A perturbação óptica resultante é igual à soma vetorial destes dois campos polarizados perpendicularmente:

$$\mathbf{E}(z, t) = \mathbf{E}_x(z, t) + \mathbf{E}_y(z, t) \quad (\text{B.15})$$

Quando ψ for igual a zero ou a um múltiplo inteiro de $\pm 2\pi$, as ondas dizem-se em fase. Neste caso, a **Eq. (B.15)** toma a forma:

$$\mathbf{E} = (\hat{\mathbf{i}} E_{0x} + \hat{\mathbf{j}} E_{0y}) \cos(kz - \omega t) \quad (\text{B.16})$$

A amplitude da onda resultante é constante e igual a $(\hat{\mathbf{i}} E_{0x} + \hat{\mathbf{j}} E_{0y})$, isto é, a sua polarização é também linear. Seja qual for o plano de observação, o campo $\mathbf{E}$ resultante varia harmonicamente no tempo segundo uma direção que não coincide necessariamente com os eixos x e y . Quando a onda se propaga de um comprimento de onda ao longo do eixo do z , o campo $\mathbf{E}$ descreve um ciclo completo. Por outro lado, e inversamente, qualquer onda polarizada linearmente pode se decompor em duas ondas com polarizações ortogonais.

Quando Ψ é um múltiplo ímpar de $\pm\pi$, as duas ondas estão defasadas de 180° e

$$\mathbf{E} = (\hat{\mathbf{i}} E_{0x} - \hat{\mathbf{j}} E_{0y}) \cos(kz - \omega t) \quad (\text{B.17})$$

Trata-se ainda de uma onda polarizada linearmente, mas o seu plano de polarização rodou (não necessariamente de 90°) em relação ao da onda considerada anteriormente.

Luz Natural

Uma fonte de luz comum é constituída por um grande número de emissores atômicos orientados aleatoriamente. Cada átomo excitado irradia trens de ondas polarizados durante cerca de 10^{-8} s [2]. Todas as emissões com a mesma frequência se combinam e constituem uma única onda polarizada resultante, que sobrevive no máximo

10^{-8} s. Novos trens de ondas são continuamente emitidos e a polarização global muda de um modo imprevisível. Quando estas variações ocorrem demasiado frequentemente, o estado global da polarização não é discernível e a onda luminosa é referida como luz natural. Pode-se também designar por luz não polarizada, mas esta expressão induz em erro porque, na realidade, se trata de uma rápida sucessão de estados de polarização distintos. É, de fato, mais conveniente utilizar a expressão polarização aleatória.

A luz natural pode ser representada matematicamente em termos de duas ondas incoerentes e ortogonais, polarizadas linearmente e com iguais amplitudes (isto é, ondas cuja diferença de fase relativa varia rápida e aleatoriamente).

Uma onda plana monocromática ideal deve ser representada como um trem de ondas infinito. Quando esta perturbação é decomposta em duas componentes ortogonais, polarizadas perpendicularmente à direção de propagação, estas, por sua vez, devem ter a mesma frequência, não ser confinadas e, portanto, ser coerentes (isto é, $\psi = \text{constante}$). Assim, uma onda plana monocromática ideal, tal como a oriunda de um *laser*, é sempre polarizada. De fato, as **Eq. (B.13)** e **(B.14)** não são mais do que as componentes cartesianas de uma tal onda plana, harmônica e transversa ($E_z = 0$).

Seja de origem natural ou artificial, a luz nunca é completamente polarizada ou inteiramente não polarizada – estes são casos extremos. A situação mais frequente é aquela em que o vetor campo elétrico varia de um modo que não é nem regular nem completamente irregular. Uma perturbação óptica diz-se, então, parcialmente polarizada. Na prática, este comportamento pode ser considerado como resultante da sobreposição de quantidades bem definidas de luz polarizada e de luz natural.

Momento Angular e Fótons

Quando uma onda eletromagnética incide num objeto, pode transmitir-lhe energia ou momento linear. Se a onda incidente for polarizada linearmente, o campo pode ser considerado composto por dois estados ortogonais e defasados de 90° . Estes atuam simultaneamente no elétron, fazendo-o deslocar segundo duas direções perpendiculares e com uma diferença de fase de $\pi/2$. O movimento resultante será circular. De fato, o momento médio da força exercida pelo campo **B** ao longo de uma órbita é nulo e o campo **E** faz deslocar o elétron com uma velocidade angular, ω , igual à frequência da onda eletromagnética. O momento angular é assim transferido da onda para o meio através dos

seus elétrons. A potência que um sistema recebe é igual à energia transferida por unidade de tempo, $d\mathcal{E}/dt$. A potência gerada por um momento Γ num corpo em rotação é $\omega\Gamma$. Assim,

$$\frac{d\mathcal{E}}{dt} = \omega\Gamma \quad (\text{B.18})$$

Como o momento de uma força é igual à taxa de variação temporal do momento angular L , então, em média,

$$\frac{d\mathcal{E}}{dt} = \omega \frac{dL}{dt} \quad (\text{B.19})$$

Uma carga que absorva uma quantidade de energia $\mathcal{E}$ da onda incidente, absorve também uma quantidade de momento angular L tal que

$$L = \frac{\mathcal{E}}{\omega} \quad (\text{B.20})$$

De acordo com a mecânica quântica, uma onda eletromagnética transfere energia em pacotes discretos, os fótons, de energia $\mathcal{E} = h\nu$. Logo, $\mathcal{E} = \hbar\omega$ ($\hbar \equiv h/2\pi$) e o momento angular intrínseco ou spin de um fóton é $-\hbar$ ou $+\hbar$. Os sinais representam polarização direita ou esquerda, respectivamente. Note-se que o momento angular de um fóton é independente da sua energia. Sempre que uma partícula carregada emite ou absorve radiação eletromagnética, com conseqüentes mudanças no valor da sua energia e do seu momento linear, o momento angular varia de $\pm \hbar$.

Pode considerar-se que o processo de transferência de energia para um alvo sobre o qual incide uma onda eletromagnética monocromática se realiza através da absorção de fótons. Então, é de se esperar que a transferência de momento angular seja também quantificada. Uma onda plana com polarização circular esquerda pode ser vista como um conjunto de fótons com os spins alinhados segundo a direção de propagação. Uma mudança de polarização circular, de esquerda para direita, inverte a orientação dos spins dos fótons e o momento da força exercida por estes sobre o alvo.

Porém, para descrever a luz com polarização linear em termos de fótons, é preciso recorrer a um ponto de vista clássico. Luz num estado de polarização ortogonal e defasado de 90° pode ser vista como resultado da sobreposição coerente de quantidades iguais de luz nos estados tal como àqueles direita e esquerda da polarização circular, com uma diferença de fase adequada. O spin de qualquer fóton orienta-se paralela ou antiparalelamente a $\mathbf{k}$. Um feixe de luz polarizada linearmente interage com a matéria

como se, nesse instante, fosse constituída por igual número de fótons com spins de orientações contrárias. Mas há um pormenor: não se pode dizer, na realidade, que um feixe seja constituído por igual número de fótons de um tipo e de outro, pois os fótons são todos iguais. O que se passa é que cada fóton pode ser encontrado em qualquer destes estados de spin com igual probabilidade. Se fosse possível medir o momento angular dos fótons individuais, o valor $-\hbar$ apareceria tão freqüentemente quanto o valor $+\hbar$. É tudo o que se pode observar. No seu conjunto, um feixe luminoso polarizado linearmente não transfere, então, momento angular para um alvo [2].

Se, pelo contrário, as probabilidades dos dois estados de spin são diferentes, um dos valores do momento angular, $+\hbar$, por exemplo, ocorre com mais freqüência do que o outro, $-\hbar$, é transferido para o alvo um momento angular positivo. O resultado global é luz polarizada elipticamente, isto é, resultante da sobreposição de quantidades diferentes de luz nos estados direita e esquerda, com uma diferença de fase adequada.

APÊNDICE C - Birrefringência

Muitas substâncias cristalinas (sólidos cujos átomos se distribuem de uma maneira regular) são opticamente anisotrópicas, isto é, as suas propriedades ópticas não são as mesmas em todas as direções numa mesma amostra. Quando os átomos da rede cristalina não estão dispostos de um modo totalmente simétrico, as forças de ligação dos elétrons são igualmente anisotrópicas.

Conforme visto no **item 2.1.1**, quando a luz propaga-se através de uma substância transparente excitando os elétrons no interior do meio, estes são acelerados pelo campo **E** e irradiam. Estas ondas secundárias recombinaem-se e a onda refratada resultante progride. A velocidade da onda (e consequentemente, o índice de refração) depende da diferença entre a frequência do campo elétrico **E** e a frequência natural ou característica dos elétrons. Qualquer anisotropia nas forças de ligação é refletida numa anisotropia correspondente do índice de refração. Se o campo elétrico **E** for paralelo às ligações mais fortes, a frequência natural dos elétrons será elevada. Por outro lado, se o campo **E** se orientar segundo o eixo cujas ligações são mais fracas, a frequência natural será um pouco menor. Um material desta natureza, com dois índices de refração distintos, diz-se birrefringente.

Se, num cristal, a frequência da luz incidente for próxima da banda de absorção de uma dada direção, o cristal será fortemente absorvente para esta polarização e transparente para outra. Um material birrefringente que absorve um dos dois estados ortogonais e é transparente ao outro é, de fato, dicróico. Quando a simetria de um cristal é tal que as forças de ligação ao longo de dois eixos ortogonais são idênticas, um destes eixos define a direção do eixo óptico. Assim, se a luz se propaga ao longo do eixo óptico, ela é fortemente absorvida, se propaga perpendicularmente a esse eixo, emerge polarizada linearmente.

As frequências características dos cristais birrefringentes estão frequentemente acima da gama do visível, razão pela qual estes cristais são incolores. Quando a luz incidente é constituída por frequências distantes da banda de absorção, são evidentes dois valores do índice de refração, mas a absorção para qualquer uma das polarizações é desprezível. Na **Eq. (2.15)** é possível verificar que $n(\omega)$ varia inversamente com a frequência natural, o que significa que uma ligação forte corresponde a baixa polarizabilidade, pequena constante dielétrica e baixo índice de refração.

Christian Huygens, em 1690, e ainda sem o benefício da teoria eletromagnética, utilizou a sua construção para explicar com sucesso muitos aspectos da dupla refração. Quando o campo elétrico $\mathbf{E}$ for perpendicular ao eixo óptico, pode-se presumir que cada ponto da frente de onda (que inicialmente se adapta perfeitamente à superfície), atua como uma fonte de ondas esféricas, todas em fase. Se o campo destas ondas puder ser considerado perpendicular ao eixo óptico, elas expandem-se no interior do cristal em todas as direções e com uma velocidade $v_{\perp}$, como se tratasse de um meio isotrópico. Como a onda ordinária não tem um comportamento anômalo, esta hipótese parece razoável. A envolvente das ondas é essencialmente uma porção de uma onda plana que, por sua vez, pode dar origem a fontes pontuais secundárias. O processo continua e a onda propaga-se através do cristal.

Considerando agora uma onda em que o campo elétrico $\mathbf{E}$ é paralelo à seção principal, este campo terá agora uma componente normal ao eixo óptico e uma que lhe é paralela. Como o meio é birrefringente, a luz de uma dada frequência polarizada paralelamente ao eixo óptico propaga-se com uma velocidade $v_{\parallel}$, sendo $v_{\parallel} \neq v_{\perp}$. Mas, por exemplo, para a calcita, $v_{\perp} < v_{\parallel}$, e para explicar isto cada onda extraordinária deve ser representada como uma pequena esfera. Mas se $v_{\parallel} > v_{\perp}$, logo esta onda irá alongar-se em todas as direções perpendiculares ao eixo óptico. Pode-se mesmo supor, como Huygens fez, que as ondas associadas à onda extraordinária têm a forma de elipsóides de revolução em torno do eixo óptico. A envolvente de todas estas elipsóides é essencialmente uma porção de uma onda plana paralela à onda incidente, mas que é desviada lateralmente ao atravessar o cristal. O feixe propaga-se segundo uma direção definida pela origem de cada onda e pelo ponto de tangência com a envolvente plana. Esta direção de propagação corresponde à direção ao longo da qual a energia se propaga. Eis um caso em que a direção de propagação não é normal à frente de onda.

Para um feixe incidente de luz natural, as duas situações descritas coexistem e o resultado é a separação do feixe incidente em dois feixes polarizados linearmente segundo direções perpendiculares (**FIG. C.7**).

FIGURA C.7: Feixe luminoso cujo campo se decompõe em duas componentes perpendiculares ao atravessar uma seção principal da calcita. Figura traduzida da fonte [2].

É possível ver dois feixes divergentes no interior de um cristal utilizando um feixe *laser* com a polarização convenientemente orientada (com o campo elétrico **E** nem paralelo, nem perpendicular ao plano principal). A luz é difundida por defeitos internos e a sua trajetória vê-se claramente.

Nos cristais cúbicos, os átomos estão dispostos de uma forma relativamente simples e bastante simétrica. Tal como nos sólidos amorfos, não existem direções preferenciais no material, caracterizado apenas por um único índice de refração, e portanto, opticamente isotrópico [41].

A disposição dos átomos em cristais dos sistemas hexagonal, tetragonal e trigonal é tal que a luz, ao propagar-se ao longo de qualquer direção, encontra sempre uma estrutura assimétrica. Tais substâncias são opticamente anisotrópicas e birrefringentes. O eixo óptico corresponde à direção em torno da qual os átomos se distribuem simetricamente. Cristais com um único eixo óptico, são designados por cristais uniaxiais [41].

Uma fonte pontual de luz natural no interior de um tal cristal, dá origem a ondas ordinárias esféricas e a ondas extraordinárias elipsoidais. A orientação do campo relativamente ao eixo óptico determina a velocidade com que estas ondas se propagam. O campo elétrico **E** da onda ordinária é sempre perpendicular ao eixo óptico, e propaga-se com velocidade $v_{\perp}$ em todas as direções. De um modo semelhante, a onda extraordinária só se propaga com velocidade $v_{\perp}$ ao longo do eixo óptico, mantendo-se sempre tangente à onda ordinária. Por seu lado, o campo elétrico **E** é paralelo ao eixo óptico, e a onda

expande-se com uma velocidade $v_{\parallel}$. Os materiais uniaxiais têm dois índices de refração principais, $n_o \equiv c/v_{\perp}$ e $n_e \equiv c/v_{\parallel}$ [41].

A diferença $\Delta n = (n_e - n_o)$ é uma medida da birrefringência. Para a calcita, $v_{\parallel} > v_{\perp}$, $(n_e - n_o)$ é $-0,172$ e o meio diz-se uniaxial negativo. Existem, todavia, outros cristais, tais como o quartzo, o gelo e o colágeno, para os quais $v_{\perp} > v_{\parallel}$. Neste caso, as ondas extraordinárias elipsoidais encontram-se no interior das ondas ordinárias, esféricas. Neste caso, $(n_e - n_o)$ é positivo e o cristal diz-se uniaxial positivo [41].

Nos restantes sistemas cristalográficos, nomeadamente nos sistemas ortorrômbico, monoclinico e triclínico, existem dois eixos ópticos e os cristais dizem-se biaxiais. Tais substâncias, como a mica, têm três índices de refração principais diferentes. A birrefringência dos cristais biaxiais mede-se pela diferença entre o maior e o menor desses índices [41].

Atividade Óptica

A forma como a luz interage com a matéria fornece inúmeras informações sobre a sua estrutura molecular. Serão examinados alguns aspectos deste processo de interação. Além do interesse que têm em óptica, têm também aplicações importantes em biologia e em química.

Em 1811, o físico francês Dominique F. J. Arago observou pela primeira vez o fenómeno hoje conhecido por atividade óptica [2]. Arago descobriu que o plano de vibração de um feixe de luz polarizada linearmente rodava continuamente à medida que a luz se propagava ao longo do eixo óptico de uma lâmina de quartzo (**FIG. C.8**).

FIGURA C.8: Atividade óptica do quartzo. Traduzido da fonte [2].

Na mesma época, Jean Baptiste Biot observou um efeito semelhante em várias substâncias naturais, tanto na fase vapor, como na fase líquida. Qualquer substância que provoque a rotação do campo elétrico de um feixe polarizado linearmente diz-se opticamente ativa. Biot descobriu ainda que é necessário distinguir a rotação no sentido dos ponteiros do relógio (direita) e no sentido contrário (retrógrado). Se, quando se olha para a fonte, o plano de vibração roda no sentido da direita, a substância diz-se dextrógira. Se o campo **E** roda no sentido retrógrado, a substância diz-se levógira [41].

Em 1822, o astrônomo inglês Sir John F. W. Herschel descobriu que os comportamentos dextrógiro e levógiro de um cristal de quartzo correspondem de fato a duas estruturas cristalográficas diferentes. Apesar de constituído pelas mesmas moléculas, o cristal de quartzo pode ser levógiro ou dextrógiro em função da orientação das moléculas. A aparência externa das duas formas é a mesma, mas uma é a imagem da outra refletida num espelho, ou seja, são enantiomórficas. Todas as substâncias transparentes enantiomórficas são opticamente ativas. O quartzo fundido não é cristalino e não é opticamente ativo. No quartzo, a atividade óptica está ligada à distribuição estrutural das moléculas. Existem muitas substâncias, tanto orgânicas como inorgânicas que, tal como o quartzo, só têm atividade óptica na forma cristalina. Por outro lado, muitos compostos orgânicos naturais, como o açúcar e o ácido tartárico, são opticamente ativos em solução ou no estado líquido. Nestes casos, o poder rotatório, como é muitas vezes designado, é uma característica das moléculas individuais. Há ainda substâncias mais complexas cuja atividade óptica está associada às moléculas e as suas disposições nos cristais – o tartarato de rubídio, por exemplo. Uma solução dextrógira deste composto passa a levógira após cristalização [41].

Em 1825, Fresnel, sem fornecer ainda uma explicação dos processos físicos que estão na base da atividade óptica, propôs uma descrição fenomenológica simples. Como qualquer estado de polarização pode ser considerado como polarizações circulares para direita e esquerda, Fresnel sugeriu que cada estado se propagava num meio opticamente ativo com uma velocidade própria, isto é, que o meio aparentaria possuir dois índices de refração, um para o estado com polarização para direita e outro para o estado de polarização para esquerda. Um meio opticamente ativo teria, então, uma birrefringência circular. Ao atravessar o meio opticamente ativo, as duas componentes da polarização circular apresentariam defasagem e o plano de polarização da onda emergente polarizada linearmente, rodaria [41]. Pode-se abordar analiticamente esta rotação recorrendo às

equações da propagação de luz com polarização circular direita **Eq. (C.21)** e esquerda **Eq. (C.22)** ao longo do eixo dos z :

$$\mathbf{E} = E_0 \left[\hat{\mathbf{i}} \cos(kz - \omega t) + \hat{\mathbf{j}} \sin(kz - \omega t) \right] \quad (\text{C.21})$$

e

$$\mathbf{E} = E_0 \left[\hat{\mathbf{i}} \cos(kz - \omega t) - \hat{\mathbf{j}} \sin(kz - \omega t) \right] \quad (\text{C.22})$$

A soma destas duas componentes é polarizada linearmente:

$$\mathbf{E} = 2E_0 \hat{\mathbf{i}} \cos(kz - \omega t) \quad (\text{C.23})$$

Modificando ligeiramente estas expressões de modo a eliminar o fator de dois na amplitude da **Eq. (C.23)**, obtém-se

$$\mathbf{E}_{\text{Direita}} = \frac{E_0}{2} \left[\hat{\mathbf{i}} \cos(k_{\text{Direita}} z - \omega t) + \hat{\mathbf{j}} \sin(k_{\text{Direita}} z - \omega t) \right] \quad (\text{C.24})$$

e

$$\mathbf{E}_{\text{Esquerda}} = \frac{E_0}{2} \left[\hat{\mathbf{i}} \cos(k_{\text{Esquerda}} z - \omega t) - \hat{\mathbf{j}} \sin(k_{\text{Esquerda}} z - \omega t) \right] \quad (\text{C.25})$$

que representam as duas componentes de polarização, direita e esquerda.

Como ω é constante, $k_{\text{Direita}} = k_0 n_{\text{Direita}}$ e $k_{\text{Esquerda}} = k_0 n_{\text{Esquerda}}$, sendo k_0 o vetor da onda incidente. O campo resultante é $\mathbf{E} = \mathbf{E}_{\text{direita}} + \mathbf{E}_{\text{Esquerda}}$, e após algumas manipulações trigonométricas obtém-se:

$$\begin{aligned} \mathbf{E} = E_0 \cos[(k_{\text{Direita}} + k_{\text{Esquerda}})z/2 - \omega t] \\ \left[\hat{\mathbf{i}} \cos(k_{\text{Direita}} - k_{\text{Esquerda}})z/2 + \hat{\mathbf{j}} \sin(k_{\text{Direita}} - k_{\text{Esquerda}})z/2 \right] \end{aligned} \quad (\text{C.26})$$

Ao incidir na amostra ($z = 0$), o campo é polarizado linearmente segundo o eixo dos x , isto é,

$$\mathbf{E} = E_0 \hat{\mathbf{i}} \cos \omega t \quad (\text{C.27})$$

É preciso notar que em qualquer parte do percurso, a dependência temporal das duas componentes do campo é a mesma, estando portanto, em fase. Isto significa que a onda resultante está sempre polarizada linearmente, embora a orientação do plano de polarização seja função de z . Quando $n_{\text{Direita}} > n_{\text{Esquerda}}$ ou $k_{\text{Direita}} > k_{\text{Esquerda}}$, $\mathbf{E}$ roda no sentido retrógrado. Quando $k_{\text{Direita}} < k_{\text{Esquerda}}$, a rotação é no sentido da direita (olhando de frente para a fonte). O ângulo de rotação de $\mathbf{E}$, β , define-se como positivo quando a rotação é

para direita. Com esta convenção de sinais, a **Eq. (C.26)** permite concluir que o campo, num ponto z qualquer, terá rodado de $\beta = - (k_{Direita} - k_{Esquerda})z/2$ em relação à orientação inicial. Se a espessura do meio for d , a rotação do plano de polarização é

$$\beta = \frac{\pi d}{\lambda_0} (n_{Esquerda} - n_{Direita}) \quad (C.28)$$

Quando $n_{Direita} < n_{Esquerda}$ o meio é dextrógiro e quando $n_{Direita} > n_{Esquerda}$, é levógiro. O poder rotatório específico, definido como β/d , do quartzo, é de $21,7^\circ/\text{mm}$ [41].

Microscopia de Polarização

O microscópio de polarização distingue-se dos outros microscópios devido sua óptica, cujos componentes devem ser isentos de tensão. Também, as objetivas devem ser do tipo Neofluar®, as quais permitem uma correção cromática e monocromática plena para o plano focal, um alto poder de resolução e imagens brilhantes, ricas em contraste e totalmente planas, para observação por intermédio do método de luz transmitida.

Este microscópio possui dois polarizadores, sendo um deles denominado analisador. O polarizador localiza-se imediatamente abaixo do condensador. O condensador é um conjunto de duas ou mais lentes convergentes que espalham regularmente a luz emitida pela fonte luminosa sobre o campo de visão do microscópio. O polarizador é montado de maneira que permita rotação e movimentação para ser removido ou colocado no trajeto da luz. O analisador situa-se acima das objetivas e abaixo das oculares. As oculares são lentes que permitem ampliação da imagem real fornecida pelas objetivas, formando uma imagem virtual. O analisador pode ser colocado perpendicularmente à direção do campo elétrico da luz linearmente polarizada proveniente do polarizador, absorvendo-a. Por outro lado, pode ser colocado paralelamente à direção do campo elétrico da luz linearmente polarizada advinda do polarizador. Neste caso, a luz será transmitida e não absorvida. Estas são duas posições extremas que podem ser ocupadas pelo analisador e nada impede que ele seja colocado de maneira a formar um ângulo qualquer (entre 0° e 90°) com relação ao vetor campo elétrico da luz linearmente polarizada advinda do polarizador. Desta forma, a intensidade de luz observada é proporcional ao ângulo formado entre os dois polarizadores, sendo a intensidade máxima quando posicionados paralelos (a 0°) entre si.

O brilho exibido pelo objeto birrefringente é devido à diferença de caminho óptico, ou retardo óptico $\Delta n = (n_e - n_o)$, conforme visto anteriormente. Um material birrefringente colocado entre dois polarizadores deve exibir um máximo de brilho quando um dos seus eixos de propagação é colocado a 45° em relação aos dois polarizadores. Assim, a luz polarizada sai do objeto em duas frentes de onda, após percorrê-lo. Estas duas frentes apresentam uma diferença de fase, δ , a qual se relaciona com o retardo óptico de acordo com a expressão:

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} L \Delta n \quad (\text{C.29})$$

Outra característica deste tipo de microscópio é a presença de um outro elemento óptico, o compensador. A função do compensador é introduzir uma diferença de fase conhecida entre as duas frentes de onda acima mencionadas, quando estas o atravessam. A maneira de determinar o retardo óptico da amostra depende do tipo de compensador utilizado, mas de acordo com a equação acima, quanto maior a diferença de fase da amostra, maior é o retardo óptico. Também, mais ordenada é a estrutura em torno dos eixos ordinário ou extraordinário, dependendo de qual dos dois foi colocado a 45° em relação aos dois polarizadores.

APÊNDICE D – Óptica Não-Linear

Com o desenvolvimento do *laser*, em 1960, a resposta não-linear da matéria nas frequências ópticas passou a ser estudada em diferentes sistemas, desde gases monoatômicos e vapores moleculares até líquidos e sólidos, incluindo efeitos que ocorrem no interior da matéria e também nas interfaces entre diferentes sistemas.

A maior parte dos efeitos não-lineares conhecidos pode ser descrita em termos da teoria eletromagnética clássica com susceptibilidades não-lineares incluídas nas relações constitutivas que relacionam a polarização elétrica com as amplitudes de campo eletromagnético. O tratamento teórico semiclássico destes efeitos foi desenvolvido há cerca de trinta anos motivado, principalmente, pelas experiências pioneiras de geração de segundo harmônico e efeito Raman estimulado. Uma rápida sucessão de novos efeitos foi evidenciada em experiências realizadas da década de sessenta por diversos pesquisadores. Dentre estes foram observados os efeitos de absorção multifotônica, efeitos de casamento de fase em processos paramétricos, geração de harmônicos e mistura de ondas [76].

Como consequência natural, a Física, por intermédio da espectroscopia óptica, se beneficiou da descoberta dos efeitos não-lineares. A Física Atômica, por exemplo, sofreu uma revolução sem precedentes. Surgiu a nova área da espectroscopia de alta resolução em gases que utiliza efeitos não-lineares, por exemplo, a absorção saturada e a absorção de dois fótons para eliminar a influência do alargamento *Doppler* em linhas espectrais [76].

O aparecimento das fontes de luz sintonizáveis (*lasers* de corantes, *lasers* de centro de cor, sintonizadores Raman, *lasers* de semicondutores, etc.) permitiu utilizar efeitos não-lineares para a investigação das características microscópicas da matéria desde o infravermelho até o ultravioleta.

Uma nova área, a espectroscopia não-linear resolvida no tempo, surgiu com o aparecimento dos *lasers* de cavidade chaveada (*Q-switched*) e está atualmente ativa mediante o emprego dos *lasers* de pulsos ultra-curtos (pico e femtosegundos). Neste caso, desde que a energia do pulso é concentrada em um curto intervalo de tempo, as intensidades podem ser muito altas possibilitando, assim, a identificação de novos e variados fenômenos. O comportamento da matéria submetida simultaneamente a *lasers* de diferentes frequências permitiu o desenvolvimento de várias técnicas espectroscópicas.

Várias aplicações destas técnicas são conhecidas atualmente e novas aplicações continuam surgindo [57].

Para exemplificar numericamente a magnitude do campo eletromagnético que se obtém facilmente com a tecnologia *laser* atual, supõe-se um *laser* pulsado de energia modesta que possa produzir energia de pulso $\approx 1\text{mJ}$, com duração de pulso de $T = 10\text{ns}$. A potência pico será da ordem de $P = \approx/T = 100\text{kW}$. Se este feixe for focalizado numa área de raio $w_0 = 100\mu\text{m}$, a intensidade do pulso será $I = P/\pi w_0^2 \cong 3\text{TW/m}^2 = 0,3\text{GW/cm}^2$. No sistema MKS, a intensidade do campo é dada por:

$$I = 2n \left(\frac{\epsilon_0}{\mu_0} \right)^{1/2} |E|^2 = \frac{2n}{Z_0} |E|^2 \quad (\text{D.30})$$

Ou, isolando o campo elétrico,

$$|E| = \sqrt{\frac{IZ_0}{2n}} \quad (\text{D.31})$$

Sendo:

n , o índice de refração do meio;

Z_0 , a impedância do vácuo, $(\mu_0/\epsilon_0)^{1/2} = 377\Omega$.

Então, a magnitude do campo elétrico para a intensidade calculada no exemplo, utilizando $n=1$ (ar), é $\cong 23\text{MV/m}$. Neste caso particular, obtêm-se um valor suficiente para ionizar o ar (basta atingir cerca de $3 \cdot 10^6\text{V/m}$), sendo apenas inferior em algumas ordens de grandeza aos campos internos típicos de um cristal, que são da mesma ordem de grandeza dos campos que ligam o elétron ao núcleo do átomo de hidrogênio ($5 \cdot 10^{11}\text{V/m}$) [2].

Como se viu anteriormente, o campo eletromagnético de uma onda luminosa que se propaga num determinado meio sujeita os elétrons de valência a uma força. Estas forças são, normalmente, pouco intensas e, em meios lineares e isotrópicos, a polarização resultante é paralela e proporcional ao campo aplicado, isto é, a polarização segue diretamente o campo. Se este é harmônico, a polarização também será. Pode-se, então, escrever:

$$P = \epsilon_0 \chi E \quad (\text{D.32})$$

em que χ é uma constante de proporcionalidade, conhecida como susceptibilidade elétrica linear. O gráfico de P em função de E é uma linha reta. No caso extremo de campos muito intensos é de se esperar que P sature, isto é, P não deve aumentar indefinidamente com E

de um modo linear. Pode-se, então, prever que a importância dos termos não-lineares do campo elétrico E – presentes, mas quase sempre desprezíveis – aumente. Como as direções de $\mathbf{P}$ e de $\mathbf{E}$ coincidem no caso simples de meios isotrópicos, a polarização pode ser desenvolvida em série de potências de E :

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 (\chi \mathbf{E} + \chi_2 \mathbf{E}^2 + \chi_3 \mathbf{E}^3 + \dots) \quad (\text{D.33})$$

As quantidades χ_2 e χ_3 são conhecidas como susceptibilidades não-lineares de segunda e terceira ordem, respectivamente.

A susceptibilidade linear, χ , é muito maior do que os coeficientes dos termos não-lineares χ_2 e χ_3 , etc., e, conseqüentemente, estes últimos termos só serão significativos no caso de campos de amplitude muito elevada. Considere-se agora uma onda luminosa da forma abaixo, propagando-se no meio:

$$E = E_0 \sin \omega t \quad (\text{D.34})$$

Neste caso, a polarização elétrica é:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \chi E_0 \sin \omega t + \varepsilon_0 \chi_2 E_0^2 \sin^2 \omega t + \varepsilon_0 \chi_3 E_0^3 \sin^3 \omega t + \dots \quad (\text{D.35})$$

E pode ser escrita na forma:

$$P = \varepsilon_0 \chi E_0 \sin \omega t + \frac{\varepsilon_0 \chi_2}{2} E_0^2 (1 - \cos 2\omega t) + \frac{\varepsilon_0 \chi_3}{4} E_0^3 (3 \sin \omega t - \sin 3\omega t) + \dots \quad (\text{D.36})$$

À medida que a onda harmônica progride, gera-se também uma onda de polarização, isto é, dá-se uma redistribuição das cargas no material em resposta ao campo aplicado. Se apenas o termo linear fosse relevante, esta onda de polarização elétrica estaria associada a uma corrente propagando-se ao longo da direção da onda incidente. A luz propagada no decorrer de um tal processo constitui a onda refratada habitual, propagando-se com uma velocidade mais reduzida, v , e com a mesma frequência da luz incidente. Todavia, a presença de termos de ordem mais elevada na **Eq. (D.35)** implica que a onda de polarização tenha o mesmo perfil harmônico do campo incidente. Na realidade, a **Eq. (D.36)** pode ser interpretada como a representação em série de Fourier da polarização, $P(t)$.

Para simplificar, a abordagem de $P(t)$ e $E(t)$ está sendo escalar. Mas há uma descrição com tratamento vetorial dos campos e, neste caso, as susceptibilidades tornam-se grandezas tensoriais. Também assume-se, ao escrever as equações acima, que a polarização no tempo t depende somente dos valores instantâneos da amplitude do campo elétrico. Assumir que o meio responde instantaneamente implica em assumir, também, que o meio é isento de perda e dispersão (segundo as relações de Kramers-Kronig) [57].

A razão do porquê a polarização desempenha papel importante na descrição do fenômeno óptico não-linear é que a polarização variante no tempo atua como uma fonte de novos componentes do campo eletromagnético. Usando as equações de Maxwell, a equação da onda propagando-se num meio na presença de interações não-lineares, é descrita por

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = \frac{4\pi}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2} \quad (\text{D.37})$$

é possível interpretar que a polarização $\mathbf{P}$ direciona o campo elétrico $\mathbf{E}$. Esta equação expressa o fato de que, toda vez que $\frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2}$ é diferente de zero, cargas são aceleradas e, de acordo com o eletromagnetismo, cargas aceleradas geram radiação eletromagnética. Para os detalhes do desenvolvimento da **Eq. (D.37)** recomenda-se a referência [57].

Há dois tipos básicos de processos físicos que geram não-linearidades: processos de alteração de polarizabilidade e de alteração de densidade do meio. O primeiro processo é constituído pelos mecanismos de reorientação molecular e redistribuição eletrônica. Já o segundo processo é constituído pelos mecanismos de eletrostricção e térmico [77].

A redistribuição eletrônica pode ser vista como uma alteração da nuvem eletrônica do meio, devido às intensidades dos campos elétricos incidentes. Se o fóton incidente é ressonante com dois níveis eletrônicos do meio, sua absorção ocasiona uma grande mudança eletrônica, conduzindo íons para o estado excitado. Neste caso, quando não existe mais campo elétrico sobre o material, ainda existe uma população no estado excitado, que retorna ao estado fundamental com um tempo característico próprio (tempo de vida do nível), tempo este no qual persiste a redistribuição eletrônica. As não-linearidades geradas desta forma geralmente são bastante intensas, pois a configuração eletrônica do meio é fortemente distorcida, possuindo tempos de resposta na faixa de microssegundos a milissegundos.

Quando o fóton não é ressonante com absorções do meio, a redistribuição eletrônica ocorre sem grandes mudanças de estado eletrônico, sendo gerada, então, uma pequena não-linearidade. Não sendo um processo de população, ocorre apenas na presença de campo elétrico. Os tempos de resposta vão de femtosegundos a picossegundos.

A reorientação molecular também é denominada efeito Kerr reorientacional. A reorientação molecular ocorre em líquidos e gases com moléculas eletronicamente

anisotrópicas (polares). Os valores das susceptibilidades originadas deste efeito, assim como no caso da redistribuição eletrônica, podem variar de muitas ordens de grandeza, porém os tempos de resposta encontram-se na faixa de nanossegundos e picossegundos, pois envolvem uma movimentação da molécula como um todo.

Nos processos térmicos, a contribuição para as susceptibilidades provém da absorção óptica dos fótons incidentes, que causa aquecimento do meio. Este aquecimento resulta numa expansão do meio e consequentemente numa diminuição de sua densidade, que na maioria dos casos origina uma susceptibilidade negativa. Tempos de resposta encontram-se na faixa de microssegundos a milissegundos, sendo dependentes da difusividade térmica do meio, e as susceptibilidades originadas deste mecanismos são de grande importância no caso de *lasers* operando em regime contínuo.

Eletrostricção é a deformação do meio sob ação de um campo elétrico. Esta deformação cria um gradiente de pressão nas cargas elétricas, originando alterações em sua densidade. Contribuições às susceptibilidades podem ser positivas ou negativas, sendo obtidas a partir da equação de onda acústica do meio. Sua contribuição é bastante importante no caso de sólidos, chegando, às vezes, a ser dominante. Tempos de resposta típicos estão na faixa de nanossegundos.

Geração de Segundo Harmônico (GSH)

Tipicamente, somente luz *laser* é suficientemente intensa para modificar as propriedades ópticas de um sistema material. Tanto é que o início da óptica não-linear deu-se logo após a demonstração do primeiro *laser* - quando Franken *et al.*, em 1961, descobriram a geração de segundo harmônico.

Como em todos os demais casos, a origem física da não-linearidade quadrática depende da natureza microscópica do meio e das posições relativas dos átomos na rede cristalina.

A interação óptica não-linear por meio do processo de geração de segundo harmônico pode ser ilustrada de acordo com a figura **D.9**:

FIGURA D.9: (a) Geometria da geração de segundo harmônico. (b) Diagrama de nível de energia descrevendo a geração de segundo harmônico.

Considerando o campo elétrico de um *laser* representado pela **Eq. (D.34)**, incidindo num cristal para o qual a susceptibilidade elétrica χ_2 é diferente de zero, a polarização não-linear criada no cristal é dada de acordo com a **Eq. (D.36)**. O segundo termo desta equação contém duas componentes particularmente importantes. A primeira, $\frac{\epsilon_0 \chi_2}{2} E_0^2$, é uma componente constante, um valor contínuo da polarização que varia com E_0^2 . Deste modo, quando o feixe intenso associado a uma onda plana polarizada linearmente atravessa um cristal piezelétrico, a presença desta componente quadrática manifesta-se por intermédio de uma polarização elétrica constante no meio. Surge então no cristal uma diferença de potencial proporcional à densidade de fluxo do feixe. Este efeito, em analogia com o que se passa com as ondas de radiofrequência, é conhecido como retificação óptica.

Já a componente $\cos 2\omega t$ da **Eq. (D.36)** representa variações da polarização com uma frequência dupla da frequência fundamental, isto é, da frequência da onda incidente. A luz radiada pelos osciladores assim excitados contém igualmente uma componente com a frequência 2ω . Este é o processo de geração de segundo harmônico ou, abreviando, GSH. De acordo com a **FIGURA D.9(b)**, dois fótons de frequência ω são destruídos e um fóton de frequência 2ω é simultaneamente criado em um processo condizente com a mecânica quântica. A linha sólida na figura representa o estado fundamental e as linhas pontilhadas representam os chamados níveis virtuais. É importante notar que quando as não-linearidades são induzidas por campos cujas frequências estão fora de ressonância com transições permitidas, o meio não absorve energia. A luz é convertida de uma frequência para outra sem que ocorra troca de energia com o material [76].

Para um dado material, quando $P(E)$ é uma função ímpar, isto é, $\mathbf{P}$ se inverte quando o campo $\mathbf{E}$ muda de sentido, as potências pares de $\mathbf{E}$ na **Eq. (D.33)** devem ser nulas. É o que se passa, aliás, em meios isotrópicos, tal como o vidro ou a água – não existem direções preferenciais num líquido. Por outro lado, em cristais como a calcita, dotados de centro de simetria, a inversão do sentido dos eixos coordenados não deve alterar as relações entre as grandezas físicas. Nestes materiais não se produzem, então, harmônicos pares, não sendo todavia incompatíveis com a geração da terceira harmônica que pode existir e foi efetivamente observada, por exemplo, na calcita. A inexistência de centro de simetria é condição necessária para a geração do segundo harmônico num cristal, bem como para a manifestação de características piezelétricas. Quando sujeito a uma pressão exterior, a distribuição de cargas num cristal piezelétrico, tal como o quartzo, o fosfato di-hidrogenado de potássio (KDP), o fosfato di-hidrogenado de amônia (ADP), deforma-se assimetricamente e surge uma diferença de potencial. Das 32 classes de cristais, 20 são deste tipo e podem por isso ser utilizados na GSH [41]. A expressão escalar (**Eq. D.33**) não é na realidade adequada para descrever um cristal dielétrico típico. O problema é mais complexo, pois as diversas componentes do campo podem contribuir para a polarização elétrica ao longo de qualquer direção. Assim, como já mencionado no início do capítulo, o tratamento rigoroso deste assunto exige que a relação entre $\mathbf{P}$ e $\mathbf{E}$ se estabeleça, não por meio de uma constante escalar, mas sim de um conjunto de quantidades organizadas sob a forma do tensor susceptibilidade.

A maior dificuldade na geração significativa do segundo harmônico decorre da dependência do índice de refração com a frequência, isto é, da dispersão. Considere-se, num ponto arbitrário do espaço, a onda incidente (onda- ω) e a segunda harmônica de frequência 2ω (onda- 2ω), coerentes entre si. À medida que a onda- ω progride ao longo do cristal, vai gerando (continuamente) contribuições adicionais para o segundo harmônico, mas estas contribuições só se combinam construtivamente se tiverem entre si relações de fase adequadas. A onda- ω propaga-se, todavia, com uma velocidade v_ω diferente da velocidade de fase do harmônico, $v_{2\omega}$. Deste modo, as últimas contribuições para a onda- 2ω estão defasadas relativamente às contribuições precedentes (**FIG. D.10**).

FIGURA D.10: Intensidade do segundo harmônico em função de θ . Os máximos de intensidade ocorrem quando a espessura efetiva é um múltiplo par de L_c .

É possível calcular a irradiância do segundo harmônico, $I_{2\omega}$, quando emerge de uma placa de espessura L . O resultado final, de acordo com a referência [78], é:

$$I_{2\omega} \propto \frac{\sin^2 [2\pi(n_{\omega} - n_{2\omega})L / \lambda_0]}{(n_{\omega} - n_{2\omega})^2} \quad (D.38)$$

O valor máximo de $I_{2\omega}$ ocorre para $L = L_c$, em que:

$$L_c = \frac{1}{4} \frac{\lambda_0}{|n_{\omega} - n_{2\omega}|} \quad (D.39)$$

L_c é freqüentemente referido como comprimento de coerência e o seu valor é normalmente da ordem de $20\lambda_0$ [57].

É, contudo, possível produzir eficientemente o segundo harmônico por intermédio de um procedimento conhecido como casamento de fase, insensível aos efeitos indesejáveis da dispersão e com o qual se garante a igualdade entre índices, isto é, $n_{\omega} = n_{2\omega}$. O KDP é o material utilizado mais freqüentemente para gerar segundo harmônico e, portanto, será dado como exemplo da utilização do casamento de fase. O KDP é um material piezelétrico, transparente e com birrefringência uniaxial negativa. No KDP, quando a onda- ω é a onda ordinária, polarizada linearmente, o segundo harmônico é a onda extraordinária. Como se pode ver na figura **D.11**, quando a luz se propaga no interior de um cristal de KDP fazendo um ângulo θ_0 relativamente ao eixo óptico, o índice de refração $n_{o\omega}$ em que a onda ordinária se propaga é exatamente igual ao índice de refração, $n_{e2\omega}$, onde o segundo harmônico se propaga. As ondas- 2ω de Huygens (ver **APÊNDICE B**) interferem então construtivamente e a eficiência da conversão aumenta de várias ordens de grandeza.

FIGURA D.11: Superfícies dos índices de refração para o cristal KDP.

O terceiro termo da **Eq. (D.36)** descreve a contribuição não-linear da polarização na frequência do campo incidente. Este termo implica na contribuição não-linear do índice de refração sentido por uma onda com frequência ω . O índice de refração na presença deste tipo de não-linearidade pode ser representado por

$$N = n + n_2 I \quad (\text{D.40})$$

onde n é o índice de refração usual, isto é, linear ou sob baixa intensidade (**item 2.1.1**).

Materiais orgânicos que são compostos por moléculas anisotrópicas, isto é, por moléculas dotadas de um tensor de polarizabilidade anisotrópica, tipicamente possuem índice de refração imaginário, n_2 , elevado. O colágeno é uma destas moléculas e a origem desta não-linearidade será abordada na discussão do presente trabalho. O fato é que a susceptibilidade de segunda ordem é sensível às mudanças estruturais sofridas pela molécula, sendo a técnica de geração de segundo harmônico uma metodologia apropriada para analisar esta susceptibilidade.

APÊNDICE E – Ângulos lidos no microscópio de polarização para medição da birrefringência de forma

TABELA E: Valores do ângulo α (grau) para cada tendão analisado.

C1	L1	C2	L2	C3	L3	C4	L4	C5	L5	C6	L6	C7	L7	C8	L8	C9	L9	C10	L10	C11	L11	C12	L12
15,2	19,5	23,5	19,2	15,2	22,2	17,5	15,6	19,6	18,4	18,6	25,5	17,5	27,2	20,1	24,3	18,0	20,2	17,3	29,0	17,0	19,1	17,2	32,2
12,8	19,7	20,0	19,0	19,7	19,4	17,4	15,0	19,5	21,6	18,6	21,2	17,2	27,7	19,6	24,0	18,2	23,2	16,7	28,0	16,0	20,7	17,2	33,5
16,5	17,1	21,0	20,0	9,4	20,0	17,8	15,0	22,3	16,8	19,0	25,5	16,8	32,5	20,4	23,7	17,8	23,0	14,3	28,2	20,0	20,9	17,1	28,3
14,3	21,7	16,0	26,0	16,5	21,5	17,2	19,4	21,7	16,0	18,4	21,5	17,2	25,0	19,8	25,5	19,3	23,2	20,3	21,1	19,5	19,7	17,6	21,2
14,7	22,1	18,6	32,0	16,0	17,0	17,4	20,1	20,6	20,5	18,9	24,1	17,2	32,1	20,0	23,3	18,2	23,2	18,4	21,5	20,5	21,0	18,1	25,5
17,5	22,3	22,0	30,9	19,0	20,4	16,3	18,7	20,7	20,3	21,7	22,0	16,9	25,3	19,8	25,5	18,3	20,1	19,3	22,0	20,8	19,7	18,6	22,7
16,8	22,8	16,6	32,7	15,4	18,0	15,3	15,6	21,3	21,5	19,0	22,0	17,8	20,5	20,3	24,0	18,0	18,2	19,9	21,0	19,6	20,2	18,0	28,1
19,8	34,8	17,9	31,1	17,8	20,2	21,0	16,1	21,8	20,0	18,3	29,4	17,7	22,7	20,7	23,0	18,7	19,6	18,5	20,3	20,6	21,6		22,3
19,5	30,4	16,6	33,5	17,1	27,3	16,7	21,0	19,3	20,4	18,2	26,0	15,7	23,1	20,6	24,2	17,3	20,3	19,1	20,3	18,7	21,0		23,6
19,8	25,7	18,1	22,3	19,0	25,3	16,4	26,7	19,4	21,4	18,5	23,8	17,6	24,2	19,6	25,0	17,8	20,0	19,8	20,4	19,5	21,3		22,2
16,3	15,0	18,5	25,0	15,7	23,2	17,4	45,0	22,4	21,0	19,4	23,0	17,8	24,7	20,1	23,4	18,1	19,8	20,5	19,0	19,2	20,9		21,8
17,0	32,3	16,9	24,8	12,8	32,4	17,1	34,0	21,1	22,0	20,3	19,0	17,3	23,0	19,9	23,3	18,0	18,4	19,2	21,1	18,7	19,6		23,2
13,7	24,5	17,3	20,2	15,0	25,8		44,6	21,0	22,0	18,6	20,6	17,6	21,4	20,1	24,2	18,6	19,0	20,0	22,0		20,1		21,2
15,2	21,8	20,0	25,3		27,4		21,3	19,6	21,0	18,7	29,5	18,6	21,7	18,8	24,2	19,5	19,9	19,7	21,0		21,6		24,0
23,6	22,3	25,0	29,0		30,0		18,5	21,3		18,6	22,1	16,5	20,7	19,9	25,7	17,2	18,5	19,6	21,1		22,1		
24,2	22,5	17,3	27,5		29,2		20,7	20,1		17,2	23,6	17,1	21,0	20,6	24,0	19,0	18,5	20,1	20,0		22,0		
18,5	26,6	22,0	23,0		31,1		20,8	21,3		18,0	28,7	18,3	23,5	20,2	24,5	20,5	19,0	19,7	21,3		21,5		
24,1	23,0	18,0	22,0		31,2		23,5	20,5		17,5	20,3	18,0	22,6	19,6	25,6	20,6	18,0		22,0		23,1		
24,1	20,1	18,0	26,7		30,7		17,5	19,6		15,5	20,5	17,7	22,2	19,3	25,5	20,6	18,5		20,5		22,5		
23,5	21,4	18,0	28,4		26,2		25,0	20,0		15,4	23,3	17,6	21,8	18,5	24,3	20,7	18,3		19,0		22,0		

C: controle (não irradiada);

L: *laser* (irradiada);

Os números após as letras C e L representam a identificação dos animais.

Em alguns cortes não foi possível fazer todas as leituras, por isso os espaços vazios.

APÊNDICE F – Ângulos lidos no microscópio de polarização para medição da birrefringência intrínseca

TABELA F: Valores do ângulo α (grau) para cada tendão analisado.

C1	L1	C2	L2	C3	L3	C4	L4	C5	L5	C6	L6	C7	L7	C8	L8	C9	L9	C10	L10	C11	L11	C12	L12
35,4	31,9	35,1	32,1	35,2	28,1	35,7	36,7	33,7	31,7	35,2	30,2	38,4	35,0	35,5	19,5	33,2	35,2	39,9	34,7	36,4	36,8	36,4	34,7
34,3	33,7	33,3	31,2	35,6	24,2	39,7	35,4	32,7	32,1	35,4	31,0	36,9	35,4	34,4	16,5	32,3	34,8	40,1	35,1	36,0	35,6	36,8	34,4
35,3	31,9	34,0	25,0	32,5	26,0	37,6	34,8	32,1	32,7	34,5	29,5	36,5	36,0	34,0	10,4	35,8	32,8	28,8	34,8	35,7	35,6	36,4	34,0
35,0	32,9	33,9	32,4	34,4	26,4	36,6	34,5	32,3	31,7	34,1	31,7	37,0	35,7	33,5	12,3	33,5	32,7	29,4	27,7	36,1	35,7	36,3	31,1
33,2	34,0	35,3	35,0	34,2	26,3	37,6	34,8	32,4	32,7	34,2	31,7	36,9	35,8	34,4	10,4	33,1	33,5	34,8	28,4	35,2	35,6	35,5	35,1
34,4	35,4	34,5	33,0	34,8	27,8	34,3	35,8	32,0	32,2	33,8	30,3	37,3	34,7	34,3	10,7	37,0	33,6	34,3	29,6	35,4	35,7	35,5	33,0
36,5	33,1	34,5	32,5	35,6	26,5	38,0	35,6	31,0	32,4	34,3	30,5	37,3	34,1	34,7	9,3	38,0	33,5	29,0	29,8	35,6	34,3	36,5	34,5
36,5	35,7	34,1	26,2	34,3	26,7	36,0	35,2	32,5	33,0	34,1	31,8	38,5	34,0	33,8	10,2	38,2	32,9	32,1	23,7	35,8	35,7	35,1	31,1
35,6	36,1	35,2	33,0	34,7	27,5	35,7	34,2	33,0	32,6	33,3	32,1	37,4	34,4	33,5	7,8	38,7	32,8	36,2	29,4	37,0	35,3	35,8	33,1
36,0	31,8	35,1	34,0	34,6	31,3	35,6	33,5	32,4	32,5	34,0	31,6	37,1	34,3	33,3	12,3	39,0	30,0	41,2	29,4	37,4	35,2	36,6	32,1
35,0	31,1	35,4	28,1	34,6	30,4	33,7	33,2	31,7	33,3	33,4	32,1	37,4	35,0	33,7	19,3	38,1	30,5	40,3	24,5	38,6	35,8		34,1
34,7	30,4	35,0	33,5	34,6	29,6	39,3	33,4	33,1	33,2	33,0	30,6	36,7	34,2	34,7	19,4	38,4	31,8	40,5	35,0	38,6	34,6		34,2
38,7	31,0	35,5	33,2	33,3	29,5	39,8	35,2	32,0	33,6	33,5	32,6	37,1	35,4	33,7	18,8	38,0	32,8	32,4	34,5	38,9	35,0		34,0
37,6	30,4	34,2	32,8	34,6	29,3	39,1	34,0	32,7	35,5	34,7	32,5	37,6	34,3	33,4	20,7	38,8	33,0	39,4	35,0	39,6	34,6		32,2
38,2	30,5	35,9	27,5		32,8	38,6	33,2	32,6	33,8	34,5	31,0	36,5	34,3	33,1	20,0	38,6	32,8	39,7	35,2		35,9		32,1
37,0	32,8	34,5	26,1		32,7	40,5	33,7	32,6	34,1	34,0	30,6	36,2	33,1	34,0	11,9	38,3	31,3	39,6	34,7		34,0		31,1
36,7	32,1	34,7	25,2		21,8	38,7	36,0	32,2	33,2	34,0	29,8	36,6	34,2	35,2	12,1	38,4	32,6	37,3	35,6		33,7		34,3
38,8	31,0	36,8	26,2		23,6	38,7	35,3	32,7	34,7	33,2	31,3	36,6	35,5	34,6	11,7	38,9	32,3	30,4	34,7		33,2		35,4
37,8	31,1	36,3	27,1		21,2	39,8	36,3	32,6	34,5	34,1	30,7	37,8	34,2	35,1	12,4	38,3	33,1		35,6		33,3		33,4
36,7	35,4	35,6	30,0		26,8	39,7	35,3	32,3	33,7	33,1	32,3	38,6	34,0	35,1	11,1	38,0	33,1		35,6		33,3		34,5

C: controle (não irradiada);

L: laser (irradiada);

Os números após as letras C e L representam a identificação dos animais.

Em alguns cortes não foi possível fazer todas as leituras, por isso os espaços vazios.

APÊNDICE G – Sinal do segundo harmônico medido.

TABELA G: Valores obtidos para o sinal do segundo harmônico, em mV, quando a polarização do feixe incidente foi 0° e 90°, e a polarização do analisador foi 0°.

	Z(0°)	Z(90°)
C1	65	147
L1	96	110
C2	76	65
L2	47	15
C3	90	24
L3	58	15
C4	41	13,5
L4	28	13
C5	30	21
L5	52	55
C6	140	106
L6	200	9,7
C7	27	35
L7	11	51
C8	37	32
L8	28	16
C9	23	96
L9	17	58
C10	22,7	3,5
L10	16,6	3,3
C11	29,6	1,8
L11	42,2	2,2
C12	22,7	3,5
L12	42,9	2,2

C: controle (não irradiada);

L: *laser* (irradiada);

Os números após as letras C e L representam a identificação dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McGregor, J.M., *The History of Human Photobiology*, in *Photodermatology*, J.L.M. Hawk, Editor. 1999, Hodder Arnold: London. p. 328.
2. Hecht, E., *Optics*. 3 ed. 1997, New York: Addison Wesley Publishing Company. 694.
3. Blabla, J. and J. John, *The saturation effect in retina measured by means of He-Ne laser*. Am J Ophthalmol, 1966. **62**(4): p. 659-63.
4. Kubasova, T., et al., *Biological effect of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes, in vitro*. Lasers Surg Med, 1984. **4**(4): p. 381-8.
5. Ditrichova, D. and P. Jansa, *Effect of He-Ne laser on early phase of reparation*. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med, 1990. **125**: p. 209-14.
6. Maiya, G.A., P. Kumar, and L. Rao, *Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics*. Photomed Laser Surg, 2005. **23**(2): p. 187-90.
7. Silva, D.F.T., et al., *Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy*. J Biomed Opt, 2006. **11**(2): p. 024002.1 - 024002.6.
8. Puustjarvi, K., et al., *Do more highly organized collagen fibrils increase bone mechanical strength in loss of mineral density after one-year running training?* J Bone Miner Res, 1999. **14**(3): p. 321-9.
9. Provenzano, P.P. and R. Vanderby, Jr., *Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon*. Matrix Biol, 2006. **25**(2): p. 71-84.
10. Aspden, R.M., Y.E. Yarker, and D.W. Hukins, *Collagen orientations in the meniscus of the knee joint*. J Anat, 1985. **140** (Pt 3): p. 371-80.
11. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Amino Acids and Proteins*, in *Principles of Biochemistry*. 2004, Palgrave Macmillan: New York. p. 1200.
12. Ker, R.F., R.M. Alexander, and M.B. Bennet, *Why are mammalian tendons so thick?* J Zool (Lond), 1988. **216**: p. 309-324.

13. Cox, R.W., R.A. Grant, and R.W. Horne, *The structure and assembly of collagen fibrils. I. Native-collagen fibrils and their formation from tropocollagen*. J R Microsc Soc, 1967. **87**: p. 123-142.
14. Geday, M.A., *A Novel Method for Quantifying Birefringence: Analysis of an Equine Radius Bone*, in *The Americas Microscopy and Analysis*. 2003. p. 17.
15. Roth, S. and I. Freund, *Second harmonic generation in collagen*. J Chem Phys, 1979. **70**(4): p. 1637-1643.
16. Kim, B.-M., et al., *Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity*. Lasers Surg Med, 2000. **27**: p. 329-335.
17. Milch, R.A., L.J. Frisco, and E.A. Szymkowiak, *Solid-state dielectric properties of aldehyde-treated goatskin collagen*. Biorheology, 1965. **3**: p. 9-20.
18. Ramshaw, J.A., N.K. Shah, and B. Brodsky, *Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides*. J Struct Biol, 1998. **122**(1-2): p. 86-91.
19. Samouillan, V., A. Lamure, and C. Lacabanne, *Dielectric relaxations of collagen and elastin in the dehydrated state*. Chem Phys, 2000. **255**: p. 259-271.
20. Melacini, G., et al., *Hydration dynamics of the collagen triple helix by NMR*. J Mol Biol, 2000. **300**: p. 1041-1048.
21. Beck, K. and B. Brodsky, *Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil*. J Struct Biol, 1998. **122**(1-2): p. 17-29.
22. Lazarev, Y.A., B.A. Grishkovsky, and T.B. Khromova, *Amide I Band of IR Spectrum and Structure of Collagen and Related Polypeptides*. Biopolymers, 1985. **24**: p. 1449-1478.
23. Wess, T.J., et al., *A consensus model for molecular packing of type I collagen*. J Struct Biol, 1998. **122**(1-2): p. 92-100.
24. Baranauskas, V., B.C. Vidal, and N.A. Parizotto, *Observation of geometric structure of collagen molecules by atomic force microscopy*. Appl Biochem Biotechnol, 1998. **69**(2): p. 91-7.
25. Ikoma, K., et al., *Evaluation of collagen fiber maturation and ordering in regenerating tendons employing H-1 double quantum filtered NMR spectroscopy*. J Orthop Res, 2003. **21**: p. 149-156.

26. Fechete, R., et al., *Anisotropy of collagen fiber orientation in sheep tendon by ^1H double-quantum-filtered NMR signals*. J Magn Reson, 2003. **162**: p. 166-175.
27. Walrafen, G.E. and Y.-C. Chu, *Nature of collagen-water hydration forces: a problem in water structure*. Chem Phys, 2000. **258**: p. 427-446.
28. Tsuboi, Y., et al., *Pulsed laser deposition of collagen and keratin*. J Photochem Photobiol A, 2001. **145**: p. 209-214.
29. Neto, V.O.S., et al., *Study of the electrical conductivity and piezoelectricity in iron doped collagen films*. Solid State Sci, 2002. **4**: p. 43-51.
30. Kadler, K.E., et al., *Collagen fibril formation*. Biochem J, 1996. **316** (Pt 1): p. 1-11.
31. Silver, D., et al., *Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: A special example of self-assembly of rod-like monomers*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**: p. 9860-9864.
32. Vidal, B.D., *Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy*. Micron, 2003. **34**(8): p. 423-432.
33. Vidal, B.d.C. and M.L.S. Mello, *Chirality and helicity of poly-benzyl-L-glutamate in liquid crystals and a wave structure that mimics collagen helicity in crimp*. Mater Res, 2001. **4**(3): p. 169-173.
34. Sasaki, N. and S. Odajima, *Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique*. J Biomech, 1996. **29**(5): p. 655-8.
35. Fratzl, P., et al., *Fibrillar structure and mechanical properties of collagen*. J Struct Biol, 1998. **122**(1-2): p. 119-22.
36. Ottani, V., M. Raspanti, and A. Ruggeri, *Collagen structure and functional implications*. Micron, 2001. **32**(3): p. 251-60.
37. Cameron, G.J., et al., *Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: An X-ray diffraction study*. J Struct Biol, 2002. **137**(1-2): p. 15-22.
38. Vidal, B.d.C., *Collagen bundle regulation and control (biocybernetics)*. Rev Bras de Pesquisas Méd Biol, 1969. **2**(5-6): p. 356-359.
39. Nicola, J.H. and E.M. Nicola, *Wavelength, frequency, and color: absolute or relative concepts?* J Clin Laser Med Surg, 2002. **20**(6): p. 307-11.
40. Yariv, A., *Quantum Electronics*. 3 ed. 1988, New York: John Wiley & Sons. 675.

41. Glusker, J.P., M. Lewis, and M. Rossi, *Chirality and absolute structure*, in *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*. 1994, VCH: New York. p. 854.
42. Taylor, E.W. and W. Cramer, *Birefringence of protein solutions and biological systems. II. Studies on TMV, tropocollagen, and paramyosin*. Biophys J, 1963. **3**: p. 143-54.
43. Vidal Bde, C. and L. Bozzo, *[Variation of birefringence of the collagen fibers]*. Rev Biol Oral, 1966. **4**: p. 1-7.
44. Koster, S., et al., *Visualization of Flow-Aligned Type I Collagen Self-Assembly in Tunable pH Gradients*. Langmuir, 2007. **23**(2): p. 357-9.
45. Yoshioka, K. and C.T. O'Konski, *Electric properties of macromolecules. IX. Dipole moment, polarizability, and optical anisotropy factor of collagen in solution from electric birefringence*. Biopolymers, 1966. **4**(5): p. 499-507.
46. Vidal, B.d.C., *The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen*. Protoplasma, 1964. **Bd.LIX**(3-4): p. 472-479.
47. Vidal, B.d.C., *Macromolecular desorientation in detached tendons*. Protoplasma, 1966. **LXII**(2-3): p. 121-132.
48. Vidal, B.d.C., *Interferometric and histochemical investigation on collagen bundles: refractive indices and dry masses prior and after staining with orange G*. Ann Histochem, 1970. **15**: p. 191-205.
49. Mello, M.L.S. and B.d.C. Vidal, *Evaluation of dichroism and anomalous dispersion of the birefringence on collagen subjected to metal impregnations*. Ann Histochem, 1972. **17**: p. 333-340.
50. Vidal, B.d.C., et al., *Anisotropic properties of silver plus gold-impregnated collagen bundles: ADB and form birefringence curves*. Ann Histochem, 1975. **20**: p. 15-26.
51. Vidal, B.d.C., *The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles*. Cell Mol Biol, 1980. **26**: p. 415-421.
52. Vidal, B.d.C., *Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence*. Cell Mol Biol, 1986. **32**(5): p. 527-535.
53. Vidal, B.d.C. and H.F.d. Carvalho, *Aggregational state and molecular order of tendons as a function of age*. Matrix, 1990. **10**: p. 48-57.

54. Király, K., et al., *Specimen preparation and quantification of collagen birefringence in unstained sections of articular cartilage using image analysis and polarizing light microscopy*. Histochem J, 1997. **29**: p. 317-327.
55. Strasswimmer, J., et al., *Polarization-sensitive optical coherence tomography of invasive basal cell carcinoma*. J Biomed Opt, 2004. **9**(2): p. 292-8.
56. Srinivas, S.M., et al., *Determination of burn depth by polarization-sensitive optical coherence tomography*. J Biomed Opt, 2004. **9**(1): p. 207-12.
57. Boyd, R.W., *Nonlinear optics*. 1 ed. 1992, New York: Academic Press. 439.
58. Roth, S. and I. Freund, *Second harmonic generation and orientational order in connective tissue: a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon*. J Appl Cryst, 1982. **15**: p. 72-78.
59. Georgiou, E., et al., *Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region*. Opt Commun, 2000. **176**: p. 253-260.
60. Stoller, P., et al., *Polarization-modulated second harmonic generation in collagen*. Biophys J, 2002. **82**(6): p. 3330-3342.
61. Cox, G., et al. *Characterization of the second harmonic signal from collagen*. in *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences III*. 2003. Massachusetts: SPIE.
62. Pena, A.M., et al., *Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV*. J Am Chem Soc, 2005. **127**: p. 10314-10322.
63. Shcheslavskiy, V.I., G.I. Petrov, and V.V. Yakovlev, *Nonlinear optical properties of collagen in solution*. Chem Phys Lett, 2005. **402**: p. 170-174.
64. Castronuovo, G., G. Fava, and S. Giavelli, *The skin role during a low level laser therapy*, in *Lasers Applications in Medicine*. 1992, Monduzzi: Bologna. p. 19-24.
65. Tuchin, V.V., *Fundamentals of the interaction of low-intensity laser radiation with biotissues: dosimetric and diagnostic therapeutics*. Bull Russian Acad Soc, 1995. **59**: p. 1031-1053.
66. Tanaka, S., et al., *Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen*. J Mol Biol, 1988. **203**: p. 495-505.
67. Verbiest, T., et al., *Strong enhancement of nonlinear optical properties through supramolecular chirality*. Science, 1998. **282**(5390): p. 913-5.

68. Na, G.C., *Monomer and oligomer of type I collagen: molecular properties and fibril assembly*. Biochemistry, 1989. **28**(18): p. 7161-7.
69. Holde, K.E.V., W.C. Johnson, and P.S. Ho, *Biological Macromolecules*, in *Principles of Physical Biochemistry*. 1998, Prentice-Hall: New Jersey. p. 657.
70. de Araujo, C.E., et al., *Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds*. J Photochem Photobiol B, 2007. **86**(2): p. 87-96.
71. Carrinho, P.M., et al., *Comparative study using 685-nm and 830-nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse*. Photomed Laser Surg, 2006. **24**(6): p. 754-8.
72. Bayat, M., et al., *Low-level laser therapy improves early healing of medial collateral ligament injuries in rats*. Photomed Laser Surg, 2005. **23**(6): p. 556-60.
73. Elwakil, T.F., *An in-vivo experimental evaluation of He-Ne laser photostimulation in healing Achilles tendons*. Lasers Med Sci, 2006.
74. Andrade, C., et al., *Compêndio de Nomenclatura Macromolecular*. 1 ed. 2002, Rio de Janeiro: e-papers. 206.
75. Wataghin, G., *Eletromagnetismo e Óptica*. 1974, Campinas: Universidade de Campinas. 333.
76. Araújo, C.B.d. *Óptica não-linear*. in *IV Escola de Verão Jorge André Swieca - Óptica Quântica e Óptica Não-Linear*. 1994. Campinas: UNICAMP.
77. Samad, R.E., *Determinação do índice de refração não-linear de cristais de BaLiF₃:Ni²⁺ por meio da técnica da varredura-z para absorvedores saturáveis*, in *Instituto de Física*. 1997, Universidade de São Paulo: São Paulo.
78. Yariv, A., *Introduction to Nonlinear Optics - Second Harmonic Generation*, in *Quantum Electronics*. 1989, John Wiley & Sons: New York. p. 675.