

# Relatório Final F 690 – Iniciação científica II

## Estudo das propriedades mecânicas de fibras de colágeno



Aluna: Mariana Zavarize Nica RA: 094171

zavarize.marianax(arroba)xgmail.com

Orientadora: Mônica A. Cotta

<http://portal.ifi.unicamp.br/pessoas/corpo-docente/392-142>

Colaboradores: Thalita Valverde e Gregory Thomas Kitten (UFMG)

### 1. Introdução

O colágeno [1] é uma das substâncias que compõem músculos, cartilagens e ossos nos animais e portanto, suas propriedades elásticas estão relacionadas à biomecânica do corpo humano. O colágeno se apresenta naturalmente em forma de fibrilas (com diâmetro da ordem de 144 nm); o estudo de suas propriedades elásticas é importante para o desenvolvimento de novos materiais com base em polímeros biológicos e também para a compreensão de várias doenças. Além disso, suas propriedades são muito importantes para a compreensão das estruturas e mecanismos de funcionamento de biocompostos, tais como ossos e cartilagem, em nível microscópico.

O objetivo deste trabalho é estudar as propriedades mecânicas de um biocomposto de colágeno produzido pela bióloga Thalita Valverde (aluna de doutorado da Universidade Federal de Minas Gerais), sob orientação do Professor Gregory Thomas Kitten. O estudo será feito através da análise das curvas de força medidas com o microscópio de força atômica (AFM) do Laboratório de Nano e Biosistemas do DFA/IFGW.

Para o estudo, realizaremos cerca de 10 curvas de força para cada região da amostra; para facilitar o processo de análise, foi desenvolvido um programa que permite a automatização de parte do processo de análise utilizando o software *Matlab*.

O relatório será dividido da seguinte forma: na seção 2 será discutido o funcionamento do microscópio de força atômica e das curvas de força. A seção 3 apresentará o procedimento experimental. A seção 4 consiste da apresentação e discussão dos dados coletados nas duas etapas do trabalho. A seção 5 contém a conclusão. Por fim, a seção 6 é um Apêndice, que contém o programa desenvolvido para a realização do trabalho.

## 2. Microscópio de força atômica

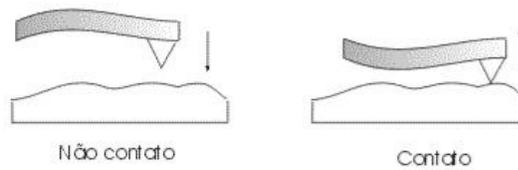


*Figura 1. Foto do microscópio de força atômica modelo Agilent 5500.*

O microscópio de força atômica fornece imagens de uma superfície com resolução espacial nanométrica. Seu funcionamento se baseia na medida das deflexões de uma alavanca (de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de comprimento) em cuja extremidade livre está montada uma ponta de prova. Estas deflexões são causadas pelas forças de caráter eletrostático que agem entre a ponta e a superfície da amostra. Um outro elemento importante no microscópio é o *scanner* piezoelétrico, que permite a varredura em x-y da amostra, além de poder se movimentar na direção vertical. Existem vários tipos de medida para fazer imagens de vários tipos de amostras.

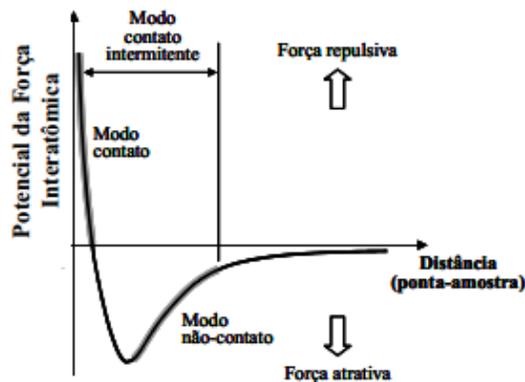
Os modos de obtenção das imagens de topografia (modos de varredura), referem-se basicamente a distância mantida entre a ponta de prova e a amostra.

Neste trabalho as medidas realizadas foram feitas no modo não contato. Quando operado nesse modo, a distância entre a ponta e superfície da amostra é da ordem de 10-100nm. Assim, a ponta trabalha no regime de forças atrativo, ou seja, para esta região a ponteira do AFM se enverga na direção da amostra.



**Figura 2.** Representação do regime de força aplicado sobre a ponta de prova.

Na figura 2 é mostrada a deflexão da alavanca em ambos os modos. No modo de não-contato, a alavanca é atraída pelas forças a que está submetida enquanto no modo contato a mesma sofre uma deflexão no sentido oposto (força repulsiva).



**Figura 3.** Comportamento qualitativo do potencial de força interatômica em função da distância entre ponta de prova e a superfície da amostra.

Como no modo não-contato a ponta trabalha no regime de forças atrativo, um oscilador faz a alavanca vibrar com uma frequência  $f$ , próxima da sua frequência de ressonância natural, com uma certa amplitude. Ao se aproximar da superfície, a interação entre ela e a ponta causam um amortecimento da amplitude de vibração.

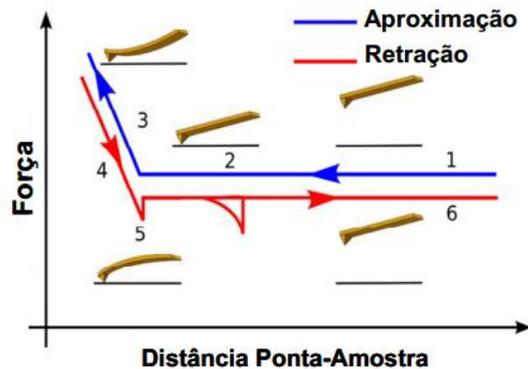
A variação na amplitude é medida pelo detector, que, na frequência selecionada, envia o sinal ao sistema de realimentação do microscópio; então a nova frequência  $f'$  é menor que  $f_0$ , e portanto a amplitude de vibração da alavanca diminui.

O sistema de realimentação trabalha para que se mantenha fixa uma certa diminuição dessa amplitude e assim a distância média entre a ponta de prova e a superfície da amostra permanece constante, através do movimento em  $z$  do *scanner* piezoelétrico. O número de passos do *scanner* para compensar a variação de amplitude é usado para gerar a imagem topográfica.

O objetivo deste estudo é analisar as propriedades mecânicas do biocomposto em questão. Para isso, utilizaremos curvas de força obtidas no microscópio de força atômica (AFM).

## I. Curvas de Força

Um dos modos de medida do AFM é a espectroscopia de força. Nele a deflexão da alavanca é monitorada durante o ciclo de aproximação e retração da ponta em relação à superfície da amostra (figura 6); conhecendo a constante de mola da alavanca, torna-se possível converter a deflexão sofrida pela alavanca em força, o que é feito pelo programa acima. Numa curva de força típica (figura 6), podemos observar um ou mais saltos no valor da força durante o ciclo de retração. Esse salto ocorre no momento que a ponta se desprende da superfície e corresponde à força de adesão ou ruptura entre os grupos funcionais na ponta e superfície.



**Figura 4.** Desenho esquemático para curva de força típica em líquido[2]: (1) Aproximação da ponta que ainda está longe da superfície; (2) A uma pequena distância, a ponta é atraída pela superfície; (3) A alavanca acompanha movimento linear da amostra sofrendo deflexão; (4) Retração da ponta em relação à amostra; (5) Ponta sofre desprendimento da superfície; (6) ponta totalmente afastada da superfície.

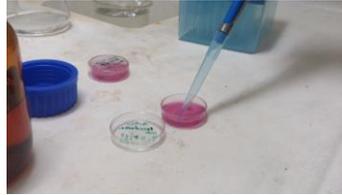
Neste trabalho, estamos interessados em calcular a rigidez da amostra. Como  $k = \frac{F}{d}$  sendo  $k$  a rigidez (*stiffness*) da amostra, então é possível obter este valor calculando o coeficiente angular da parte linear da curva de força.

Com os dados da rigidez da amostra podemos correlacionar os dados obtidos com os parâmetros de síntese do biocomposto.

## 3. Metodologia Experimental

A preparação das amostras foi feita pela bióloga Thalita Valverde em uma visita ao laboratório SPM; como a preparação das amostras faz parte de sua pesquisa, não será detalhado aqui o processo. Existem quatro tipos de amostras, Gel colágeno I, Gel colágeno I + MTA (cimento odontológico) 10%, Gel colágeno I + MTA (cimento odontológico) 40%, Gel colágeno I + NTC (nanotubos de carbono) 4% e + NTC (nanotubos de carbono) 20%, as amostras serão chamadas de amostra I, amostra II, amostra III e amostra IV, respectivamente. A idéia inicial era fazer as medidas de curva de força e imagens de topografia com a amostra ainda hidratada, como mostra a Figura 5, porém devido à baixa viscosidade e alta fluidez da amostra, não foi possível realizar as medidas no AFM. Acreditamos que a interação da amostra com a ponta não era grande o suficiente para que

fosse detectada e com isso o *scanner* fazia a ponta entrar no gel e só parava quando chegava à superfície da placa de petri.

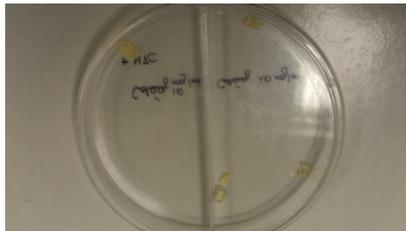


**Figura 5.** Foto da preparação das amostras no laboratório SPM do DFA/IFGW.

Como alternativa para solucionar o problema, tentamos colocar uma fina camada de água por cima da amostra, porém o equipamento detectava a força entre a água e a ponta e só conseguíamos medir a superfície da água. Tentativas de aproximação forçada (usando o movimento dos motores de passo, que controlam a distância média da ponta à amostra), também não deram resultado.

Em vista desses problemas e consultando a literatura, concluímos que era necessário secar as amostras para realizarmos as medidas. Contudo, o processo de secagem altera as propriedades da amostra, por isso apenas alguns métodos específicos de secagem são aceitos pela comunidade acadêmica.

O primeiro método de secagem testado foi realizado na UFMG. O processo foi realizado pelo biólogo Prof. Gregory Thomas Kitten, orientador da Thalita (este processo não será descrito aqui pois faz parte da pesquisa da colaboradora). Ao observarmos as amostras que chegaram para a análise, observou-se que elas tem a viscosidade muito alta (grudavam na pinça), além de serem muito irregulares.



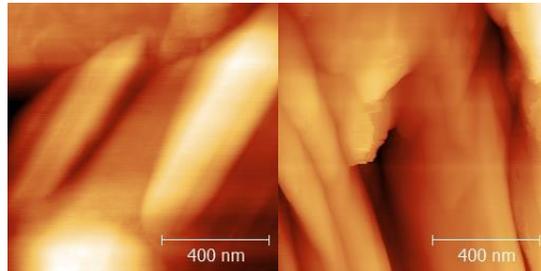
**Figura 6.** Foto das amostras do biocomposto de colágeno após a primeira tentativa de secagem.

Para tentar resolver o problema da irregularidade da amostra, aplicou-se pressão sobre a mesma no porta amostra do AFM, para que uma nova tentativa de medida fosse feita.



**Figura 7.** Foto da amostra após aplicação de pressão.

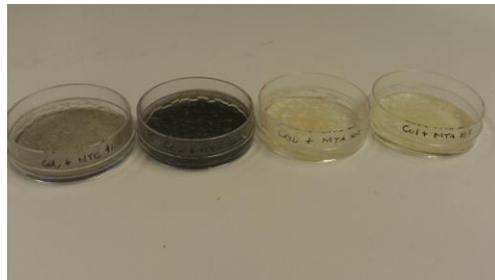
Após esse processo, a superfície da amostra ficou plana, porém a amostra ainda tinha o problema de ser pegajosa, o que dificulta a realização das medidas de curva de força, pois se a ponta fica grudada na amostra os dados ficam comprometidos.



**Figura 8.** *Imagens de topografia da amostra da figura 2 seca.*

As imagens topográficas da figura 8, mostram que o que está sendo detectado é uma superfície plana e nenhuma fibrila é observada. Nossa interpretação é que as fibrilas devem ter sido incorporadas no interior da matriz com cimento odontológico e por isso não aparecem na superfície.

Outra secagem foi realizada pela Thalita, dessa vez a amostra foi seca naturalmente sobre a placa de petri, como pode ser observada na imagem abaixo.

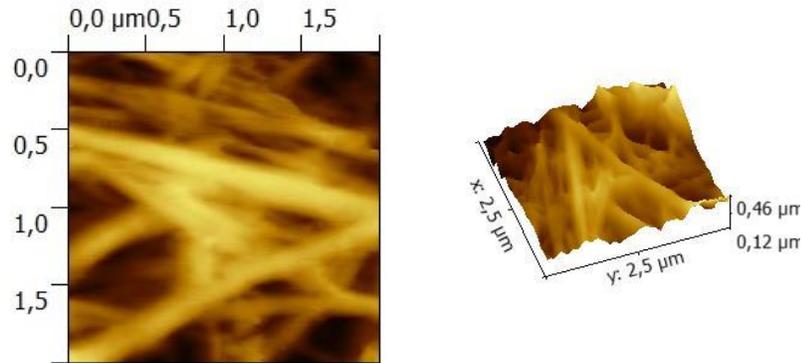


**Figura 9.** *Foto das amostras secas na placa de petri.*

As amostras da figura 9 são as amostras finais utilizadas para a realização do experimento. Os dados coletados serão apresentados na seção 4.

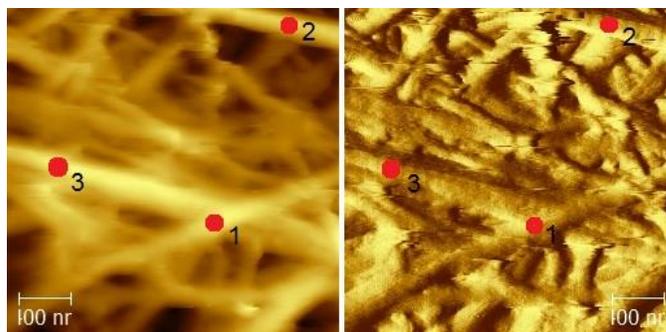
## 4. Análise e discussão dos dados

- Amostra I - Colágeno + MTA 10%



**Figura 10.** Imagem topográfica da amostra I (esquerda) e sua projeção 3D (direita).

A figura 10 apresenta uma imagem topográfica no modo não contato da amostra I. Na imagem observa-se uma grande quantidade de fibrilas de colágeno, desorientadas e entrelaçadas; que foram secas de forma que ficaram uma sobre a outra. Ainda é apresentada uma imagem 3D onde é possível observar a distribuição das fibrilas; é importante notar que na pesquisa da nossa colaboradora as amostras são utilizadas molhadas, e desse modo elas ficam distribuídas uniformemente na matriz de colágeno.



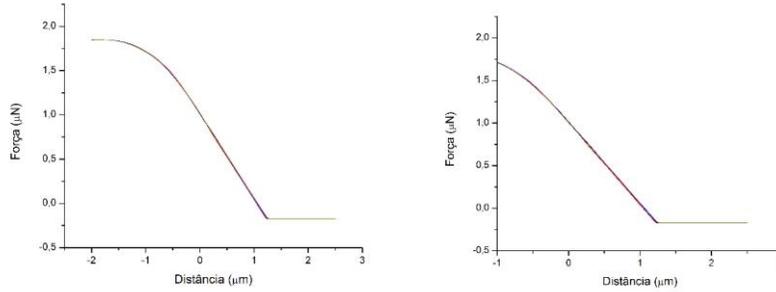
**Figura 11.** Imagem topográfica (esquerda) e de deflexão (direita) da amostra I com os pontos indicando onde as curvas de força foram medidas.

A figura 11 apresenta uma imagem topográfica e outra de deflexão da amostra I no modo contato, essas imagens foram feitas para identificarmos a localização das fibrilas; e assim pudéssemos medir as curvas de força.

Para isso, utilizamos a ponta MPP-21120-10 do fabricante Veeco, as dimensões dessa ponta funciona muito bem em materiais biológicos tanto para imagens no modo contato quanto no modo

contato. Com essa ponta e o software *PicoView 12* medimos a constante elástica da mola; o procedimento foi realizado 4 vezes e o valor obtido foi  $k=(1,11 \pm 0,04)N/m$ .

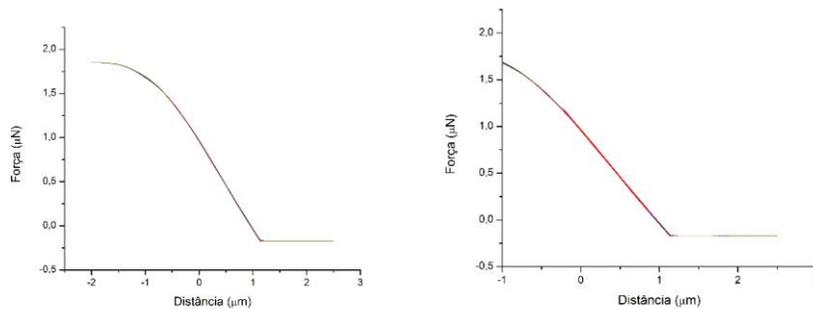
Na figura 11 ainda existem 3 pontos identificando onde as curvas de força foram medidas. Em cada ponto mediu-se 10 curvas e elas serão apresentadas a seguir para cada ponto da imagem.



**Gráfico 1.** Curva de força no ponto 1 da amostra I (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 1.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 1.

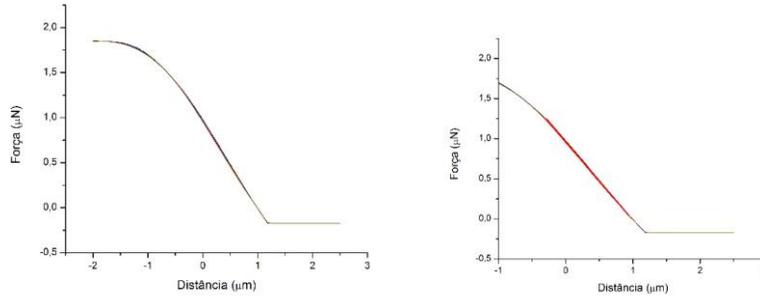
	A	B	C	B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
1	Equation	$Y = a + b \cdot X$									
2	Model	No. Measurements									
3	Model Sum of Squares	2.71207E-18	1.13919E-14	8.40382E-15	1.83330E-15	8.52012E-15	1.00915E-14	1.88895E-14	4.81742E-15	4.32779E-15	1.35017E-14
4	Parameters	-0.00000	-0.00002	-0.00007	-0.00005	-0.00005	-0.00003	-0.00003	-0.00007	-0.00007	-0.00005
5	Adj. R-Square	0.00007	0.00002	0.00004	0.00007	0.00009	0.00007	0.00007	0.00004	0.00004	0.00001
6		Value	Standard Error								
7	F	Intercept	1.00000E-05	2.71207E-18							
8	F	Slope	-0.00206	2.20840E-04							
9	F	Intercept	1.01100E-02	2.04105E-15							
10	F	Slope	-0.07207	4.87155E-04							
11	F	Intercept	1.00705E-02	1.80715E-15							
12	F	Slope	-0.04752	2.84865E-04							
13	F	Intercept	1.01040E-02	1.80715E-15							
14	F	Slope	-0.05227	1.93085E-04							
15	F	Intercept	1.01040E-02	1.80715E-15							
16	F	Slope	-0.06022	3.84370E-04							
17	F	Intercept	1.01777E-02	1.80715E-15							
18	F	Slope	-0.06020	4.20074E-04							
19	F	Intercept	1.02121E-02	1.80715E-15							
20	F	Slope	-0.06753	4.43891E-04							
21	F	Intercept	1.02038E-02	1.80715E-15							
22	F	Slope	-0.06158	2.72950E-04							
23	F	Intercept	1.02007E-02	1.80286E-15							
24	F	Slope	-0.06103	2.84330E-04							
25	F	Intercept	1.01322E-02	2.00215E-15							
26	F	Slope	-0.05070	1.40001E-04							



**Gráfico 2.** Curva de força no ponto 2 da amostra I (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 2.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 2.

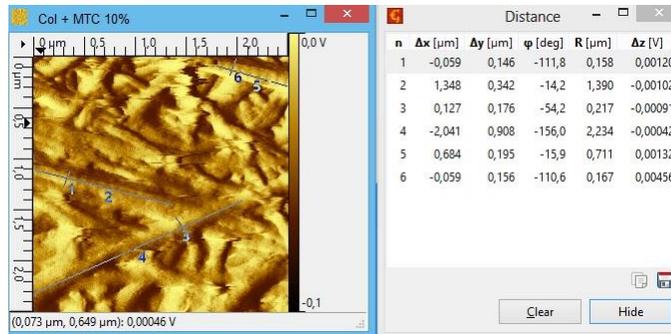
	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1	Equation	$y = a + b \cdot x$									
2	Weight	No Weighting									
3	Residual Sum of Squares	0,80906E-15	1,28953E-14	3,820E-15	1,05719E-14	8,66737E-15	2,32919E-15	3,85949E-15	1,8371E-14	6,8052E-15	9,7305E-15
4	Parameter 1	-0,99994	-0,99996	-0,99997	-0,99991	-0,99992	-0,99998	-0,99998	-0,99991	-0,99994	-0,99992
5	Adj. R-Square	0,99997	0,99991	0,99993	0,99992	0,99984	0,99996	0,99993	0,99992	0,99989	0,99994
6		Value	Standard Error								
7	F	Intercept	9,8298E-7	2,36915E-10							
8	Slope	-0,99979	5,3115E-4								
9	A	Intercept	9,8783E-7	3,1719E-10							
10	Slope	-1,00001	7,5384E-4								
11	D	Intercept	9,552E-7	1,5353E-10							
12	Slope	-1,0074E	3,5095E-4								
13	E	Intercept	9,5912E-7	2,5042E-10							
14	Slope	-1,0002	3,9304E-4								
15	F	Intercept	9,8326E-7	2,2545E-10							
16	Slope	-1,0014E	5,2243E-4								
17	G	Intercept	9,8206E-7	1,9462E-10							
18	Slope	-1,0043E	2,8446E-4								
19	H	Intercept	9,5429E-7	1,6481E-10							
20	Slope	-1,00294	3,3051E-4								
21	I	Intercept	9,8973E-7	2,4725E-10							
22	Slope	-1,0002E	4,4510E-4								
23	J	Intercept	9,5301E-7	1,9971E-10							
24	Slope	-1,00081	4,1748E-4								
25	K	Intercept	9,8598E-7	2,3747E-10							
26	Slope	-1,00121	5,0003E-4								



**Gráfico 3.** Curva de força no ponto 3 da amostra I (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 3.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 3.

	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1	Equation	$y = a + b \cdot x$									
2	Weight	No Weighting									
3	Residual Sum of Squares	1,45677E-14	1,30407E-14	1,3575E-14	9,97912E-15	1,0289E-14	1,06948E-14	9,98737E-15	1,22303E-14	1,28067E-14	
4	Parameter 1	-0,99993	-0,99998	-0,99992	-0,99991	-0,99994	-0,99993	-0,99994	-0,99994	-0,99991	-0,99993
5	Adj. R-Square	0,99998	0,99991	0,99992	0,99992	0,99998	0,99998	0,99998	0,99998	0,99997	0,99997
6		Value	Standard Error								
7	F	Intercept	9,7918E-7	2,46794E-10							
8	Slope	-0,9838E	5,4203E-4								
9	A	Intercept	9,9743E-7	2,8717E-10							
10	Slope	-0,9840E	5,5287E-4								
11	D	Intercept	9,8574E-7	2,3022E-10							
12	Slope	-0,9902E	5,3038E-4								
13	E	Intercept	9,8297E-7	2,4034E-10							
14	Slope	-0,9873E	5,4888E-4								
15	F	Intercept	9,5718E-7	1,9091E-10							
16	Slope	-0,9716E	4,1488E-4								
17	G	Intercept	9,5191E-7	2,1380E-10							
18	Slope	-0,9798E	4,4803E-4								
19	H	Intercept	9,5138E-7	1,8501E-10							
20	Slope	-0,9741E	4,0427E-4								
21	I	Intercept	9,5358E-7	2,0545E-10							
22	Slope	-0,9715E	4,1173E-4								
23	J	Intercept	9,4715E-7	1,9545E-10							
24	Slope	-0,9707E	4,1210E-4								
25	K	Intercept	9,4854E-7	2,0781E-10							
26	Slope	-0,9679E	4,1764E-4								

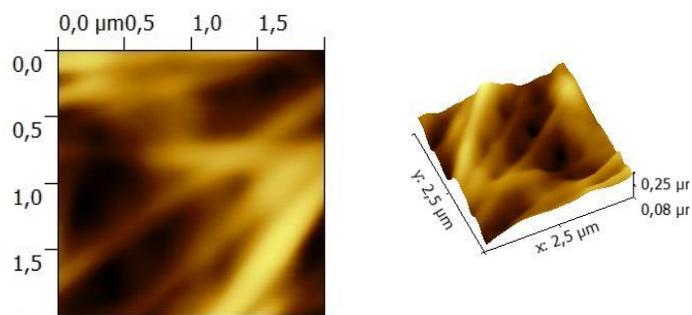


**Figura 12.** Imagem do cálculo do diâmetro e comprimento das fibrilas de colágeno que foram realizadas as curvas de força da amostra I.

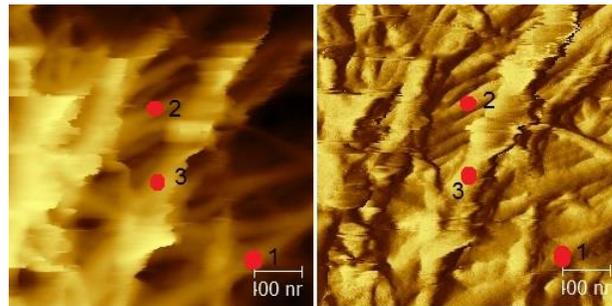
Os gráficos 1, 2 e 3 apresentam as curvas de força medidas nos pontos 1, 2 e 3 da amostra I; eles ainda apresentam a regressão linear calculada para cada uma das 10 curvas medidas em cada ponto. Os dados da regressão linear estão nas tabelas 1, 2 e 3, referentes ao gráficos 1, 2 e 3 respectivamente.

Ainda com a imagem de deflexão da figura 11, medimos os diâmetros e comprimentos (visíveis) das fibrilas dos pontos medidos a fim de acharmos uma possível correlação com a rigidez medida, como pode ser visto na figura 12. Os dados obtidos para as amostras II, III e IV serão apresentados da mesma maneira.

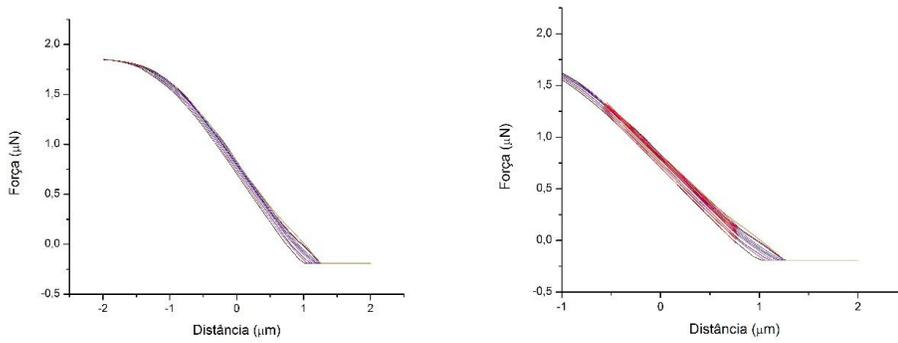
- **Amostra II – Colágeno + MTA 40%**



**Figura 13.** Imagem topográfica da amostra II (esquerda) e sua projeção 3D (direita).



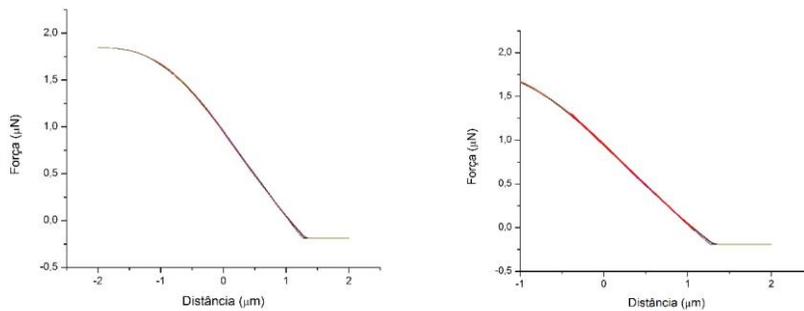
**Figura 14.** Imagem topográfica e de deflexão da amostra II com os pontos indicando onde as curvas de força foram medidas.



**Gráfico 4.** Curva de força no ponto 1 da amostra II (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 4.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 4.

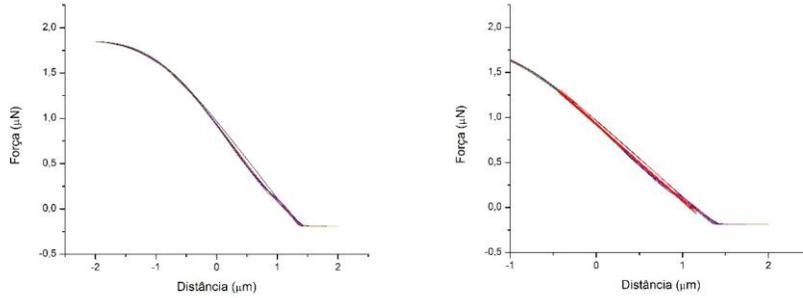
	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Equation	y = a + b*x										
Weight	No Weighting										
Residual Sum of Squares	1.13053E-14	1,63888E-14	8,45586E-15	7,11629E-15	1,40142E-14	1,76151E-14	3,42522E-14	4,15672E-14	8,88726E-14	8,34371E-14	
Phi-coeff's 1	-0,99998	-0,99993	-0,99998	-0,99997	-0,99994	-0,99992	-0,99994	-0,99979	-0,99998	-0,99994	
Avg. R-Square	0,99999	0,99998	0,99999	0,99994	0,99999	0,99993	0,99999	0,99998	0,99998	0,99992	
	Value	Value	Standard Error								
F	Intercept	7,52428E-7	1,30027E-10								
F	Slope	-0,99773	3,25038E-4								
A	Intercept	7,30832E-7	1,55943E-10								
A	Slope	-0,94607	3,95232E-4								
B	Intercept	7,55237E-7	1,12486E-10								
B	Slope	-0,94489	2,78187E-4								
C	Intercept	7,79078E-7	1,64532E-10								
C	Slope	-0,80396	2,5718E-4								
D	Intercept	7,86036E-7	1,44332E-10								
D	Slope	-0,83512	3,5521E-4								
E	Intercept	7,98071E-7	1,67831E-10								
E	Slope	-0,90353	4,21508E-4								
F	Intercept	8,07916E-7	2,21151E-10								
F	Slope	-0,82182	4,72413E-4								
G	Intercept	8,26137E-7	2,83348E-10								
G	Slope	-0,82619	6,6599E-4								
H	Intercept	8,38172E-7	3,26399E-10								
H	Slope	-0,81934	8,0717E-4								
I	Intercept	8,31652E-7	3,79512E-10								
I	Slope	-0,81991	9,19057E-4								



**Gráfico 5.** Curva de força no ponto 2 da amostra II (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 5.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 5.

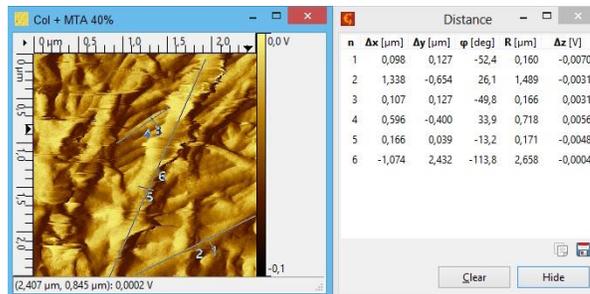
A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1	Equation $y = a + b \cdot x$									
2	Weight No Weighting									
3	Residual Sum of Squares 1,1007E-14 2,02307E-14 3,46556E-14 2,47277E-14 1,76179E-14 1,06448E-14 3,30135E-14 2,88031E-14 4,00459E-14 2,2751E-14									
4	Pearson's r -0,99995 -0,99992 -0,99996 -0,99991 -0,99994 -0,99992 -0,99987 -0,99988 -0,99985 -0,99981 -0,99981									
5	Adj. R-Square 0,99991 0,99994 0,99994 0,99992 0,99991 0,99987 0,99984 0,99975 0,99978 0,99971 0,99981									
6	Value Standard Error									
7	Força Intercept 9,3263E-7 1,33835E-10									
8	Slope -0,89369 2,8517E-4									
9	A Intercept 9,0367E-7 2,04369E-10									
10	Slope -0,91307 3,81375E-4									
11	D Intercept 9,3872E-7 2,87431E-10									
12	Slope -0,88666 4,99532E-4									
13	E Intercept 9,3662E-7 2,21077E-10									
14	Slope -0,89353 4,0878E-4									
15	F Intercept 9,4082E-7 1,81395E-10									
16	Slope -0,88429 3,32487E-4									
17	G Intercept 9,4211E-7 1,98785E-10									
18	Slope -0,85348 3,75137E-4									
19	H Intercept 9,4922E-7 2,88723E-10									
20	Slope -0,89315 4,91454E-4									
21	I Intercept 9,3592E-7 2,40067E-10									
22	Slope -0,90352 4,44029E-4									
23	J Intercept 9,4836E-7 2,56291E-10									
24	Slope -0,90229 5,08913E-4									
25	K Intercept 9,4743E-7 2,22016E-10									
26	Slope -0,89581 4,20151E-4									



**Gráfico 6.** Curva de força no ponto 3 da amostra II (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

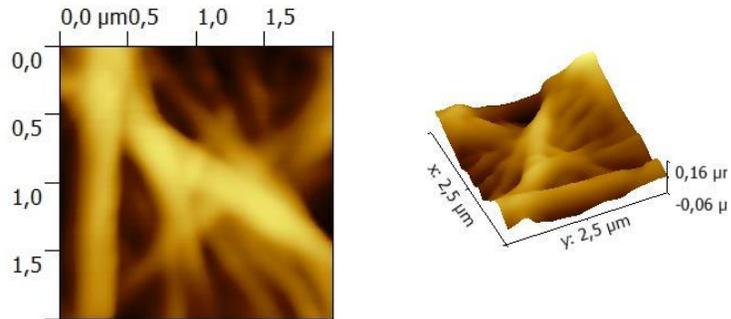
**Tabela 6.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 6.

A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
1	Equation $y = a + b \cdot x$									
2	Weight No Weighting									
3	Residual Sum of Squares 4,95077E-14 3,80566E-13 4,40088E-13 3,59121E-13 2,95111E-13 4,47244E-13 2,82851E-13 2,3671E-13 1,3438E-13 1,1014E-13									
4	Pearson's r -0,99984 -0,99981 -0,99984 -0,99974 -0,99988 -0,99988 -0,99981 -0,99921 -0,99950 -0,99984 -0,99984									
5	Adj. R-Square 0,99980 0,99972 0,99981 0,99747 0,99796 0,99711 0,99601 0,99641 0,99913 0,99923									
6	Value Standard Error									
7	Força Intercept 9,01891E-7 2,8102E-10									
8	Slope -0,88187 4,8645E-4									
9	A Intercept 9,1478E-7 8,1597E-10									
10	Slope -0,82507 0,00141									
11	D Intercept 5,1257E-7 8,7119E-10									
12	Slope -0,82066 0,0015									
13	E Intercept 9,15131E-7 7,7423E-10									
14	Slope -0,83363 0,00134									
15	F Intercept 9,1125E-7 8,864E-10									
16	Slope -0,85942 0,00121									
17	G Intercept 9,1468E-7 8,47787E-10									
18	Slope -0,85238 0,00148									
19	H Intercept 9,1702E-7 8,83197E-10									
20	Slope -0,854 0,00123									
21	I Intercept 9,2453E-7 9,2144E-10									
22	Slope -0,84427 0,00108									
23	J Intercept 9,30781E-7 4,49723E-10									
24	Slope -0,82787 2,8745E-4									
25	K Intercept 9,3291E-7 4,1810E-10									
26	Slope -0,84558 7,0958E-4									

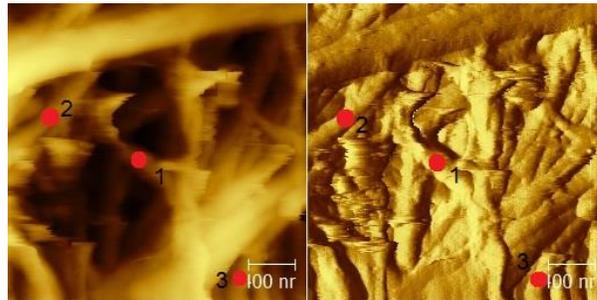


**Figura 15.** Imagem do cálculo do diâmetro e comprimento das fibrilas de colágeno que foram realizadas as curvas de força da amostra II.

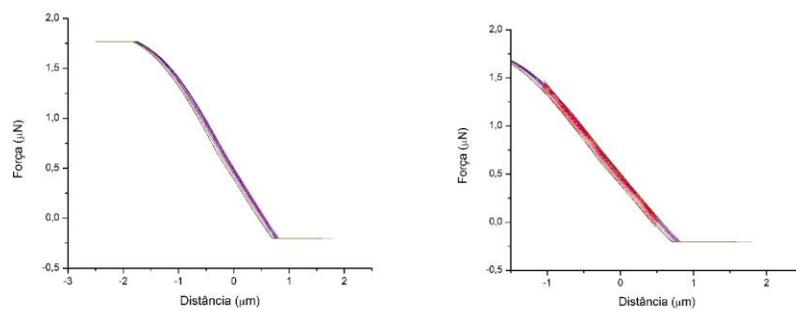
- Amostra III – Colágeno + NTC 4%



**Figura 16.** Imagem topográfica da amostra III (esquerda) e sua projeção 3D (direita).



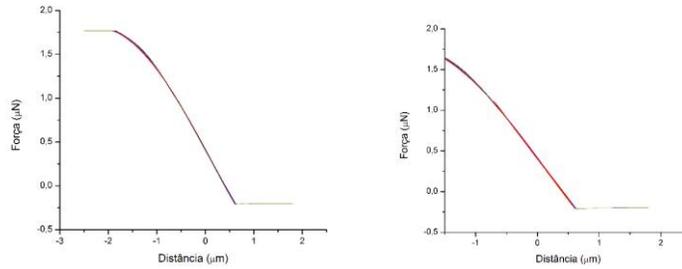
**Figura 17.** Imagem topográfica e de deflexão da amostra III com os pontos indicando onde as curvas de força foram medidas.



**Gráfico 7.** Curva de força no ponto 1 da amostra III (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 7.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 7.

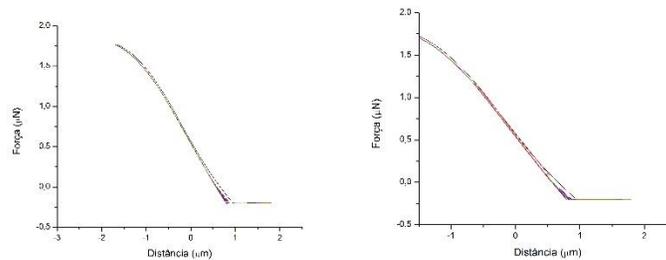
	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Equation	y = a + b/x										
Weight	No Weighting										
Residual Sum of Squares	1.12074E+13	8.40779E+14	6.54144E+14	6.68877E+14	8.091E+14	7.28205E+14	5.02732E+14	4.3433E+14	5.0888E+14	5.45424E+14	
Parameter 1	-0.89665	-0.89873	-0.89878	-0.89877	-0.8988	-0.89878	-0.89883	-0.89885	-0.89884	-0.89883	
Adj. R-Square	0.99929	0.99948	0.99955	0.99955	0.99955	0.99956	0.99967	0.99967	0.99967	0.99965	
	Value Standard Error										
Força	Intercept	3.93334E-7	4.4319E-10								
	Slope	-0.82848	8.29603E-4								
A	Intercept	5.12522E-7	3.73146E-10								
	Slope	-0.91556	7.15386E-4								
B	Intercept	5.0015E-7	3.35204E-10								
	Slope	-0.92031	6.58878E-4								
C	Intercept	5.03145E-7	3.38445E-10								
	Slope	-0.92379	6.58549E-4								
D	Intercept	4.92916E-7	3.11631E-10								
	Slope	-0.92585	6.14098E-4								
E	Intercept	4.90481E-7	3.36795E-10								
	Slope	-0.92276	6.45427E-4								
F	Intercept	4.79039E-7	2.96733E-10								
	Slope	-0.92144	5.63056E-4								
G	Intercept	4.49038E-7	2.77158E-10								
	Slope	-0.92212	5.36307E-4								
H	Intercept	4.69956E-7	2.96798E-10								
	Slope	-0.91848	5.52068E-4								
I	Intercept	4.23887E-7	3.06758E-10								
	Slope	-0.92291	5.12184E-4								



**Gráfico 8.** Curva de força no ponto 2 da amostra III (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 8.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 8.

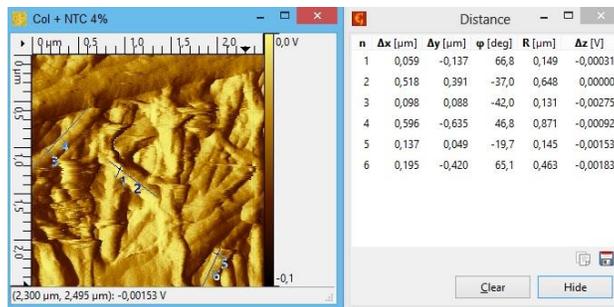
	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Equation	y = a + b/x										
Weight	No Weighting										
Residual Sum of Squares	8.83006E+10	2.16274E+14	3.13303E+14	2.4591E+14	2.6616E+14	3.06846E+14	4.36512E+14	4.19047E+14	3.86336E+14	1.06132E+14	
Parameter 1	-0.89966	-0.89968	-0.89968	-0.89968	-0.89968	-0.89968	-0.89968	-0.89968	-0.89968	-0.89967	
Adj. R-Square	0.99989	0.99987	0.99985	0.99987	0.99987	0.99988	0.99985	0.99983	0.99983	0.99985	
	Value Standard Error										
Força	Intercept	4.5362E-7	1.49167E-10								
	Slope	-0.91503	4.3479E-4								
A	Intercept	4.97379E-7	2.92376E-10								
	Slope	-0.89402	6.82028E-4								
B	Intercept	4.16889E-7	3.17084E-10								
	Slope	-0.89184	6.98338E-4								
C	Intercept	4.09007E-7	3.33098E-10								
	Slope	-0.89625	6.36014E-4								
D	Intercept	4.11121E-7	4.40819E-10								
	Slope	-0.89371	7.4208E-4								
E	Intercept	4.11616E-7	3.21016E-10								
	Slope	-0.89371	7.4208E-4								
F	Intercept	4.11762E-7	3.86035E-10								
	Slope	-0.89371	7.4208E-4								
G	Intercept	4.11762E-7	3.86035E-10								
	Slope	-0.89371	7.4208E-4								
H	Intercept	4.09337E-7	2.8880E-10								
	Slope	-0.89662	6.53268E-4								
I	Intercept	4.0904E-7	2.81943E-10								
	Slope	-0.89703	7.638E-4								
J	Intercept	3.96791E-7	2.13238E-10								
	Slope	-0.89203	8.24817E-4								



**Gráfico 9.** Curva de força no ponto 3 da amostra III (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

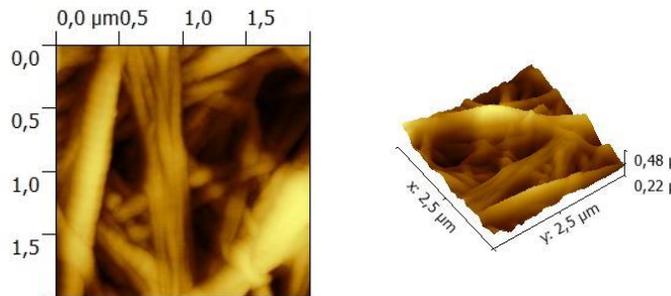
**Tabela 9.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 9.

	A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Equation	$z = a + b \cdot x$										
Weight	1	No Weighting									
Standard Error of Coefficients	4,41029E-14	1,02479E-13	1,80258E-13	1,20473E-13	2,26335E-13	2,82719E-13	2,68232E-13	2,25461E-13	1,24647E-13	2,18113E-13	
Standard Error	-0,30365	-0,00093	-0,30356	-0,30360	-0,00099	-0,00099	-0,00099	-0,00099	-0,30360	-0,30360	-0,00099
Adj. R Square	0,94525	0,99999	0,99999	0,99997	0,99999	0,99997	0,99999	0,99999	0,99997	0,99999	0,99999
n											
Force	Microgr	1,74022E-11	0,70524E-10								
	Slope	-0,24999	0,30142								
	Intercept	6,49322E-7	8,17952E-11								
A	Slope	2,01420E-7	1,80048E-4								
	Intercept	1,46078E-7	0,34621E-11								
B	Slope	-0,07000	0,28930E-4								
	Intercept	6,41722E-7	8,95265E-11								
C	Slope	2,61715E-7	1,80048E-4								
	Intercept	1,44413E-7	7,42006E-11								
D	Slope	-0,07490	0,28930E-4								
	Intercept	6,40000E-7	8,92217E-11								
E1	Slope	3,81717E-7	2,58275E-4								
	Intercept	1,43171E-7	7,75266E-11								
E2	Slope	-0,07490	0,28930E-4								
	Intercept	6,43746E-7	8,97915E-11								
E3	Slope	-0,07490	0,28930E-4								
	Intercept	1,44203E-7	8,27562E-11								
E4	Slope	-0,07490	0,28930E-4								
	Intercept	1,44179E-7	7,95040E-11								
E5	Slope	-0,07295	2,36643E-4								
	Intercept	1,44179E-7	7,95040E-11								



**Figura 18.** Imagem do cálculo do diâmetro e comprimento das fibrilas de colágeno que foram realizadas as curvas de força da amostra III.

- Amostra IV – Colágeno + NTC 20%**

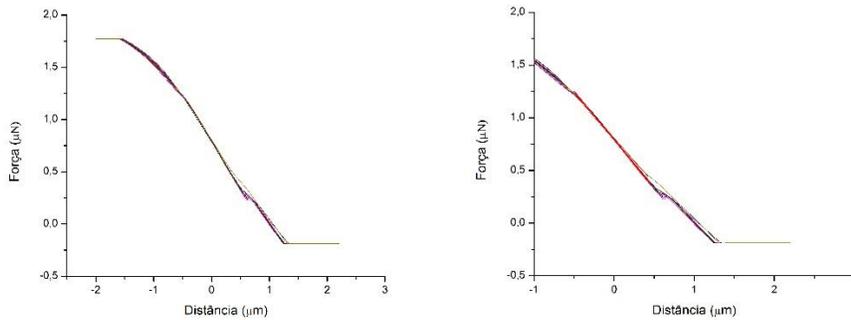


**Figura 19.** Imagem topográfica da amostra IV (esquerda) e sua projeção 3D (direita).



**Tabela 11.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 11.

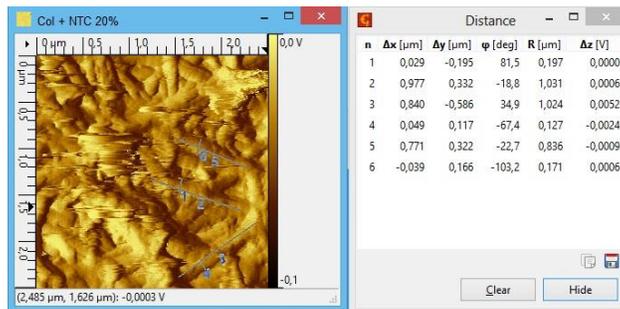
A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Equation	$y = a + b \cdot x$									
Weight	No Weighting									
Method of Moments		1,0079E-04	1,0423E-03	1,0754E-04	1,1464E-04	1,1333E-05	1,7423E-05	1,2384E-04	1,9105E-04	1,1033E-04
Intercept		-0,0002	-0,0006	-0,0004	-0,0002	-0,0004	-0,0001	-0,0002	-0,0001	-0,0003
Adj. R-Square		0,9985	0,9985	0,9985	0,9989	0,9988	0,9985	0,9984	0,9989	0,9987
	Value	Intercept	Slope							
F	Intercept	1,1459E-04	1,0385E-03							
Slope		0,341(3)	2,1722E-04							
A	Intercept	1,1338E-04	1,0625E-03							
Slope		0,376(1)	2,0822E-04							
D	Intercept	1,1723E-04	1,3077E-03							
Slope		0,376(1)	1,4171E-04							
C	Intercept	1,1442E-04	1,0448E-03							
Slope		-0,372(1)	2,6718E-04							
F	Intercept	1,2062E-04	1,4092E-03							
Slope		-0,372(1)	1,6917E-04							
A	Intercept	1,2462E-04	1,6005E-03							
Slope		-0,361(1)	1,5457E-04							
C	Intercept	1,1894E-04	1,0991E-03							
Slope		-0,367(1)	1,7101E-04							
H	Intercept	1,2122E-04	1,1712E-03							
Slope		1,710(1)	1,4171E-04							
F	Intercept	1,1711E-04	1,2238E-03							
Slope		1,099(1)	1,5457E-04							
H	Intercept	1,2062E-04	1,1459E-03							
Slope		1,039(1)	1,3077E-04							



**Gráfico 12.** Curva de força no ponto 3 da amostra IV (esquerda) e com a escala modificada (direita) para o cálculo do coeficiente angular (stiffness).

**Tabela 12.** Valores do coeficiente angular das linearizações do gráfico 12.

A	B	C	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Equation	$y = a + b \cdot x$									
Weight	No Weighting									
Method of Moments		1,6127E-04	1,9173E-04	2,1424E-04	1,4032E-04	1,3047E-04	1,1337E-04	1,0373E-04	1,0172E-04	1,0442E-04
Intercept		-0,0003	-0,0004	-0,0003	-0,0004	-0,0004	-0,0004	-0,0004	-0,0004	-0,0003
Adj. R-Square		0,9986	0,9985	0,9981	0,9989	0,9989	0,9941	0,9988	0,9974	0,9989
	Value	Intercept	Slope							
F	Intercept	1,8722E-04	1,6200E-03							
Slope		-0,356(2)	1,1512E-04							
A	Intercept	1,8613E-04	1,5748E-03							
Slope		-0,370(1)	9,1200E-04							
D	Intercept	1,5233E-04	2,0000E-03							
Slope		0,325(1)	9,3689E-04							
E	Intercept	1,8842E-04	1,2746E-03							
Slope		0,312(2)	6,5011E-04							
F	Intercept	1,8162E-04	1,2790E-03							
Slope		0,311(2)	6,2603E-04							
A	Intercept	1,9171E-04	1,5472E-03							
Slope		0,317(1)	9,3407E-04							
H	Intercept	1,9100E-04	1,5819E-03							
Slope		-0,303(1)	7,3129E-04							
F	Intercept	1,9100E-04	1,6526E-03							
Slope		-0,303(1)	6,7619E-04							
J	Intercept	1,9870E-04	1,2113E-03							
Slope		-0,304(2)	7,8351E-04							
H	Intercept	1,8025E-04	1,1554E-03							
Slope		-0,358(1)	1,4511E-04							



**Figura 21.** Imagem do cálculo do diâmetro e comprimento das fibrilas de colágeno que foram realizadas as curvas de força da amostra IV.

**Tabela 13.** Valores calculados do stiffness para as amostras I, II, III e IV.

	Stiffness (N/m)	
1.1	-0,960	± 0,007
1.2	-1,003	± 0,003
1.3	-0,978	± 0,007
Média 1	-0,98	± 0,02
2.1	-0,931	± 0,018
2.2	-0,903	± 0,006
2.3	-0,844	± 0,010
Média 2	-0,89	± 0,04
3.1	-0,923	± 0,003
3.2	-1,001	± 0,007
3.3	-0,970	± 0,007
Média 3	-0,96	± 0,04
4.1	-0,960	± 0,028
4.2	-0,965	± 0,011
4.3	-0,908	± 0,022
Média 4	-0,94	± 0,03

A tabela 13 apresenta os valores calculados da rigidez da amostra em cada ponto e a média para cada amostra. Ao observar os valores médios da amostra I e II, vemos que há uma diferença significativa (~10%) na rigidez. Porém a diferença entre os valores médios da amostra III e IV não apresentam grande variação sendo que a diferença observada se encontra dentro da margem de erro das medidas.

**Tabela 14.** Valores do diâmetro, comprimento e stiffness para as fibrilas 1, 2 e 3 medidas na amostra I.

	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Stiffness (N/m)
1	0,158	1,390	-0,960 ± 0,007
2	0,217	2,234	-1,003 ± 0,003
3	0,167	0,711	-0,978 ± 0,007

**Tabela 15.** Valores do diâmetro, comprimento e stiffness para as fibrilas 1, 2 e 3 medidas na amostra II.

	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Stiffness (N/m)
1	0,160	1,489	-0,931 ± 0,018
2	0,166	0,718	-0,903 ± 0,006
3	0,171	2,658	-0,844 ± 0,010

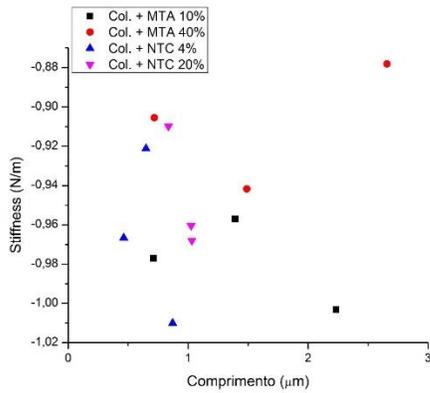
**Tabela 16.** Valores do diâmetro, comprimento e stiffness para as fibrilas 1, 2 e 3 medidas na amostra III.

	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Stiffness (N/m)
1	0,149	0,648	-0,923 ± 0,003
2	0,131	0,871	-1,001 ± 0,007
3	0,145	0,463	-0,970 ± 0,007

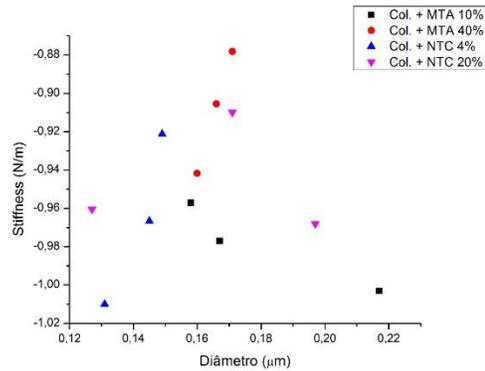
**Tabela 17.** Valores do diâmetro, comprimento e stiffness para as fibrilas 1, 2 e 3 medidas na amostra IV.

	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Stiffness (N/m)
1	0,197	1,031	-0,960 $\pm$ 0,028
2	0,127	1,024	-0,965 $\pm$ 0,011
3	0,171	0,836	-0,908 $\pm$ 0,022

Utilizando os dados das figuras 12, 15, 18 e 21 montamos as tabelas 14, 15, 16 e 17. Elas apresentam os dados do diâmetro e comprimento observado da fibrila e a rigidez.



**Gráfico 13.** Valores da rigidez em função do comprimento observado da fibrila.



**Gráfico 14.** Valores da rigidez em função do diâmetro observado da fibrila.

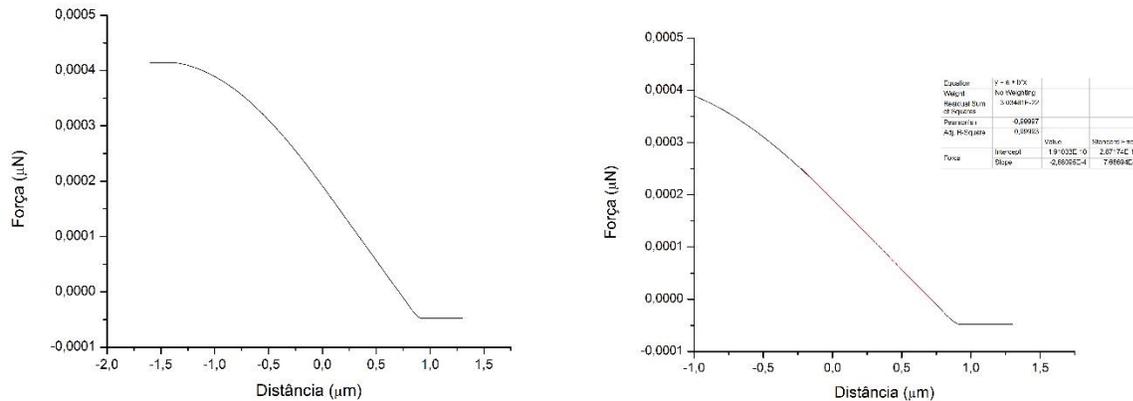
Os gráficos 13 e 14 mostram o comportamento da rigidez de cada ponto das 4 amostras em função do seu diâmetro e comprimento. Pelos gráficos 13 e 14 não é possível relacionar nenhum dos parâmetros com a rigidez. Por se tratar de uma medida elástica, é necessário levarmos em conta seu diâmetro, comprimento pontos de apoio etc. Como é difícil determinar o comprimento livre real e seus pontos de apoio pelas imagens de topografia, vamos levar em conta apenas os dados das tabelas 14 a 17 e compararmos a rigidez entre as fibrilas de comprimentos e diâmetros mais próximos.

**Tabela 18.** Valor da rigidez em de cada amostra para as fibrilas com diâmetro  $\sim 170\mu\text{m}$  e comprimento  $\sim 0,8\mu\text{m}$

Amostra I	$(-0,978 \pm 0,007) \text{ N/m}$
Amostra II	$(-0,903 \pm 0,006) \text{ N/m}$
Amostra III	$(-0,923 \pm 0,003) \text{ N/m}$
Amostra IV	$(-0,908 \pm 0,022) \text{ N/m}$

Comparando a rigidez de fibrilas de dimensões próximas, observamos que a amostra I é cerca de 10% mais rígida que as fibrilas da amostra II. Em relação as amostras III e IV não observamos diferenças, pois a margem de erro engloba a variação entre as duas.

A fim de comparar os valores obtidos até agora com o da primeira amostra medida, plotamos o gráfico 13.



**Gráfico 13.** Curva de força realizada na amostra da figura 8 (direita) e a regressão linear para o cálculo da rigidez (esquerda).

Na seção 3 (figura 8), foi apresentada a primeira amostra que tentamos medir, mas o processo de secagem para essa amostra não foi fornecido pela nossa colaboradora. Porém sabemos que o processo envolve liofilização, sendo assim, fizemos uma medida para compararmos com os dados obtidos com as novas amostras (Amostra I, II, III e IV).

A rigidez calculada foi  $k = (-2,6809 \pm 0,0008) \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$ , valor que não está de acordo com os valores medidos com as novas amostras. Isso comprova que o processo de secagem utilizado é inadequado e o fato da amostra ser pegajosa impossibilita fazer medidas de curva de força na mesma.

## 5. Conclusão

Inicialmente utilizamos uma amostra seca que utilizava liofilização no processo de secagem; essa amostra apresentou alguns problemas que impossibilitaram suas medidas, então recebemos novas amostras para continuar o trabalho.

O estudo realizado com as novas amostras, mostrou que há variações da rigidez entre elas. A amostra I (Colágeno I + MTA 10%) com  $k_I = (-0,98 \pm 0,02) \text{ N/m}$ , a amostra II (Colágeno I + MTA 40%) com  $k_{II} = (-0,89 \pm 0,04) \text{ N/m}$ , amostra III (Colágeno I + NTC 4%) com  $k_{III} = (-0,96 \pm 0,04) \text{ N/m}$  e amostra IV (Colágeno I + NTC 20%) com  $k_{IV} = (-0,94 \pm 0,03) \text{ N/m}$ .

Ambas as amostras I e II contém colágeno e cimento odontológico (MTA), porém a amostra com menor concentração de MTA se mostrou a mais rígida. Visto que o MTA é um agregado de trióxido mineral, esperava-se que com uma maior concentração a amostra ficasse mais rígida.

Nossa interpretação sobre o problema é que, com o aumento da concentração de MTA, há um aumento na densidade na matriz de colágeno da amostra. Como a amostra passou por um longo período de secagem (a noite toda), acreditamos que devido a diferença de densidade, durante o período de secagem as fibras migraram para a superfície e por isso observamos um resultado com menor rigidez para a amostra II. E como a amostra I possuía

menor concentração de colágeno, a diferença de densidade era menor e portanto a quantidade de fibrilas que migraram até a superfície foi menor, sendo assim a rigidez seria maior, pois em torno dela haveria mais material com MTA do que na amostra II.

Isso explicaria também o porquê não conseguimos observar as fibrilas de colágeno na primeira amostra medida, pois inicialmente as fibrilas estão uniformemente distribuídas no gel de colágeno e como o processo de liofilização faz com que a secagem seja muito rápida, as fibrilas não migraram para a superfície e foram secas uma longe da outra; assim, na superfície o que medimos foi o gel que encobriu qualquer possível fibrila que estivesse próxima da superfície.

Para as amostras III e IV, compostas por gel de colágeno e nanotubos de carbono (NTC), não observamos diferença significativa no valor da rigidez, pois a variação observada é englobada pela margem de erro da medida.

Para uma melhor caracterização da amostra precisaríamos de mais pontos medidos por amostra, pois estatisticamente, 3 pontos não são satisfatórios para uma análise mais quantitativa. Além disso, era importante termos medido a rigidez de uma amostra contendo apenas colágeno para podermos compará-las entre si com um valor de referência conhecido, porém não tivemos acesso a esta amostra.

## 6. Apêndice

### I. Script para a quebra das curvas

```
filename = 'C:\Users\Mari\Desktop\Amostras Thalita\Col+NTC20%\3-10.txt';
delimiter = {'\t', ' '};
startRow = 157;
endRow = 2657;

formatSpec = '%f%f%f*s*s*s*s*s*s*s%[\n\r]';

fileID = fopen(filename, 'r');
dataArray = textscan(fileID, formatSpec, endRow-startRow+1, 'Delimiter',
delimiter, 'MultipleDelimsAsOne', true, 'EmptyValue', NaN, 'HeaderLines',
startRow-1, 'ReturnOnError', false);

fclose(fileID);
fileType = dataArray(:, 1);
Spectroscopy = dataArray(:, 2);
VarName3 = dataArray(:, 3);

clearvars filename delimiter startRow endRow formatSpec fileID dataArray ans;

time = fileType;
distance = Spectroscopy;
force = VarName3;

filename = 'C:\Users\Mari\Desktop\Amostras Thalita\Col+NTC20%\3-10.txt';
delimiter = {'\t', ' '};
startRow = 28;
endRow = 28;
```

```

formatSpec = '%s%[\n\r]';

fileID = fopen(filename, 'r');

dataArray = textscan(fileID, formatSpec, endRow-startRow+1, 'Delimiter',
delimiter, 'MultipleDelimsAsOne', true, 'HeaderLines', startRow-1,
'ReturnOnError', false);

fclose(fileID);

raw = repmat({''}, length(dataArray{1}), length(dataArray)-1);
for col=1:length(dataArray)-1
    raw(1:length(dataArray{col}), col) = dataArray{col};
end
numericData = NaN(size(dataArray{1},1), size(dataArray,2));

rowData = dataArray{1};
for row=1:size(rowData, 1);
    regexstr = '(?<prefix>.*?)(?<numbers>([-
]*(\d+[\,]*)+[\.]{0,1}\d*[eEdD]{0,1}[-+]*\d*[i]{0,1})|([-
]*(\d+[\,]*)*\.[\,]{1,1}\d+[eEdD]{0,1}[-+]*\d*[i]{0,1})) (?<suffix>.*?);
    try
        result = regexp(rowData{row}, regexstr, 'names');
        numbers = result.numbers;

        invalidThousandsSeparator = false;
        if any(numbers==' ');
            thousandsRegExp = '^(\d+?(\, \d{3}))*\.[\,]{0,1}\d*$';
            if isempty(regexp(thousandsRegExp, '\, ', 'once'));
                numbers = NaN;
                invalidThousandsSeparator = true;
            end
        end
        if ~invalidThousandsSeparator;
            numbers = textscan(strrep(numbers, '\, ', ''), '%f');
            numericData(row, 1) = numbers{1};
            raw{row, 1} = numbers{1};
        end
    catch me
    end
end

fileType = cell2mat(raw(:, 1));

a=fileType;

clearvars filename delimiter fileType Spectroscopy VarName3 startRow endRow
formatSpec fileID dataArray ans raw col numericData rowData row regexstr
result numbers invalidThousandsSeparator thousandsRegExp me;

```

```

k = 1.1088;

Forca = k * a * force ;

f1_10 = dataset( Forca);

D = distance - ( a * force );

C = horzcat ( time, distance, Forca, D);

header = { 'Tempo', 'Distancia', 'Forca', 'Deflexao' };

a1_10 = dataset ( {C, header{:} } );

export (a1_10);
export (f1_10);

```

## 7. Referências

1. Thomas Gutschmann, Georg E. Fantner, Johannes H. Kindt, et al, *Force spectroscopy of collagen fibers to investigate their mechanical properties and structural organization. Biophysical journal*, Vol. 86, No. 5. (1 May 2004), pp. 3186-3193
2. Ver JPK Instruments (www.jpk.com/) AG, Germany.
3. Samia DHAHRI, Michel RAMONDA, Christian MARLIERE, *In-situ determination of the mechanical properties of gliding or non-motile bacteria by Atomic Force Microscopy under physiological conditions without immobilization*, PLoS ONE 03/2013.
4. Gabriela Lorite, *Investigação de processos físico-químicos na adesão e desenvolvimento de biofilmes de Xylella fastidiosa*, 2011. Tese (Doutorado) - Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas.

## 8. Opinião da orientadora

Mariana realizou um trabalho excelente. Dedicou-se ao trabalho de preparação de amostras, aquisição de imagens e curvas de força e à elaboração do programa de identificação de curvas, que servirá para outros alunos no laboratório. Cabe notar que a preparação das amostras não fazia parte de seu trabalho, porém considero que meus alunos devem entender e participar do processo, para ganhar experiência na análise dos dados

posteriormente obtidos. Porém os obstáculos encontrados com as amostras não permitiram uma análise estatística como deveria ser feita, com um maior número de medidas e a interpretação da rigidez como variável extensiva, isto é, dependente da geometria local da amostra. Apesar disso, Mariana fez uma análise detalhada, embora ainda inconclusiva, principalmente por não termos tido acesso a uma amostra controle.

De modo geral, porém, Mariana cresceu muito como aluna de IC nos últimos meses. Reitero minha opinião de que sua postura profissional e envolvimento no trabalho são as esperadas de um aluno de pós-graduação. Espero que ela siga este caminho após se graduar.