

---

**PINÇAS ÓPTICAS: EXPERIMENTO,  
TEORIA E APLICAÇÃO NO ESTUDO  
DA INTERAÇÃO DNA-FÁRMACOS**

*Márcio Santos Rocha*

---

---

PINÇAS ÓPTICAS:  
EXPERIMENTO, TEORIA E  
APLICAÇÃO NO ESTUDO DA  
INTERAÇÃO DNA-FÁRMACOS

*Márcio Santos Rocha*

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências – Física**.

Belo Horizonte  
Março de 2008

---

---

*Outras frequências*  
(Humberto Gessinger)

*Seria mais fácil fazer como todo mundo faz:  
o caminho mais curto, produto que rende mais.  
Seria mais fácil fazer como todo mundo faz:  
um tiro certo, modelo que vende mais.  
Mas nós dançamos no silêncio...  
Choramos no carnaval...  
Não vemos graça nas gracinhas da tv...  
Morremos de rir no horário eleitoral...  
Seria mais fácil fazer como todo mundo faz:  
sem sair do sofá, deixar a Ferrari pra trás.  
Seria mais fácil, como todo mundo faz:  
o milésimo gol sentado na mesa de um bar.  
Mas nós vibramos em outra frequência...  
Sabemos que não é bem assim...  
Se fosse fácil achar o caminho das pedras,  
tantas pedras no caminho não seria ruim...*

---

---

# Sumário

<b>Agradecimentos</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Pinças Ópticas: uma comparação absoluta entre experimento e teoria</b>	<b>6</b>
2.1 Princípio de funcionamento de uma pinça óptica . . . . .	6
2.2 Teorias de pinças ópticas . . . . .	13
2.2.1 Teoria de óptica geométrica (OG) . . . . .	13
2.2.2 Teoria Rayleigh . . . . .	15
2.2.3 Teoria MDSA . . . . .	17
2.3 Técnicas experimentais . . . . .	18
2.3.1 Montagem experimental . . . . .	19
2.3.2 Preparação das amostras . . . . .	21
2.3.3 Medida do perfil de retroespalhamento das microesferas	22
2.3.4 Medida da função de autocorrelação de intensidades (ACF) . . . . .	23
2.3.5 Medida do raio das microesferas . . . . .	25
2.3.6 Determinação da constante de força da pinça óptica . .	27
2.3.7 Variação da constante de força em função do tamanho da microesfera pinçada e de sua altura em relação à lâmina . . . . .	27

---

---

2.4	Resultados obtidos . . . . .	28
<b>3</b>	<b>A molécula de DNA</b>	<b>33</b>
3.1	Aspectos biológicos . . . . .	33
3.1.1	Histórico e descrição da estrutura da molécula . . . . .	33
3.1.2	Desnaturação e renaturação . . . . .	36
3.1.3	Tipos de DNA . . . . .	39
3.1.4	Formas alternativas: superestiramento e supertorção . . . . .	39
3.1.5	O DNA do fago $\lambda$ . . . . .	43
3.2	Polímeros . . . . .	43
3.2.1	Varetas flexíveis . . . . .	44
3.2.2	O modelo de Kratky-Porod . . . . .	45
3.2.3	Elasticidade entrópica e comprimento de persistência . . . . .	46
3.2.4	O modelo Worm-Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme) . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Uso da pinça óptica no estudo da interação da molécula de DNA com fármacos intercalantes</b>	<b>56</b>
4.1	Fármacos . . . . .	57
4.1.1	Daunomicina . . . . .	57
4.1.2	Brometo de Etídio (EtBr) . . . . .	58
4.2	Características gerais da intercalação da molécula de DNA por um fármaco . . . . .	59
4.2.1	O Modelo de Exclusão de Vizinhos . . . . .	60
4.3	Preparação das amostras . . . . .	62
4.3.1	Construção do porta-amostras . . . . .	63
4.3.2	Preparação da solução DNA-microesferas . . . . .	63
4.3.3	Adição do fármaco na solução . . . . .	63
4.4	Procedimento experimental . . . . .	64
4.4.1	Busca de um bom conjunto DNA-microesfera para realizar as medidas . . . . .	65
4.4.2	Medida do perfil de retroespalhamento das microesferas . . . . .	65
4.4.3	Medida da constante de força da pinça óptica . . . . .	67
4.4.4	Medida do perfil de estiramento da molécula de DNA . . . . .	67

---

---

4.4.5	Determinação da curva de força $\times$ extensão da molé- cula de DNA . . . . .	69
4.5	Resultados . . . . .	72
4.5.1	Daunomicina . . . . .	72
4.5.2	Brometo de Etídio (EtBr) . . . . .	75
4.5.3	Comparações com o modelo de exclusão de vizinhos . .	75
4.5.4	Cálculo do parâmetro $r_c$ . . . . .	80
4.5.5	Interpretação e discussão dos resultados . . . . .	81
<b>5</b>	<b>Uso da pinça óptica no estudo da interação DNA-psoralen</b>	<b>85</b>
5.1	Psoralen . . . . .	85
5.2	Preparação das amostras e procedimento experimental . . . .	88
5.3	Resultados e discussão . . . . .	88
5.3.1	Medidas de equilíbrio . . . . .	88
5.3.2	Medidas cinéticas . . . . .	93
<b>6</b>	<b>Conclusões e perspectivas</b>	<b>108</b>
<b>A</b>	<b>Medida de <math>\langle \Delta r^2 \rangle</math> e do coeficiente de difusão <math>D</math> através da análise do movimento Browniano das microesferas</b>	<b>111</b>
<b>B</b>	<b>Parâmetros importantes na comparação absoluta entre ex- perimento e Teoria MDSA</b>	<b>115</b>
B.1	Potência local do laser na microesfera . . . . .	115
B.1.1	Método da objetiva dupla . . . . .	116
B.1.2	Método do microbolômetro de mercúrio . . . . .	118
B.2	Largura $\sigma$ do perfil de intensidade gaussiano do laser antes da objetiva . . . . .	121
B.3	Medida dos índices de refração das substâncias utilizadas . . .	122
<b>C</b>	<b>Cálculo de <math>\langle r_{ee}^2 \rangle</math> para um polímero nos limites rígido e flexível.</b>	<b>123</b>
<b>D</b>	<b>Cálculo do valor médio de <math> t_{\perp} ^2</math> (Modelo WLC)</b>	<b>126</b>
<b>E</b>	<b>O modelo de exclusão de vizinhos</b>	<b>128</b>

---

---

<b>F Artigos publicados</b>	<b>133</b>
Revista <i>Journal of Chemical Physics</i> . . . . .	134
Revista <i>American Journal of Physics</i> . . . . .	140
Revista <i>Proceedings of SPIE</i> . . . . .	145
Revista <i>Applied Physics Letters</i> . . . . .	154
Revista <i>Applied Optics</i> . . . . .	157
Revista <i>Physical Review E</i> . . . . .	164
Revista <i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i> . . . . .	178
Revista <i>Journal of Chemical Physics</i> . . . . .	190
<b>Lista de Figuras</b>	<b>197</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>205</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>206</b>

---

## Agradecimentos

Desde 1997, quando ingressei na graduação em Física na Universidade Federal do Ceará, até 2008, quando defendo agora meu doutorado na Universidade Federal de Minas Gerais, foram 11 anos de dedicação à Física e à vida acadêmica. Ao longo de todos esses anos, muitas pessoas foram importantes para que eu pudesse chegar até aqui sem nunca desistir. Aproveito este espaço para agradecer a estas pessoas.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Leandro e Teresa, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, e especialmente por terem sempre me dado a oportunidade de ter uma excelente educação. Agradeço também aos meus irmãos, Rodrigo e Clarissa, que mesmo de longe, sei que torcem pelas vitórias.

Agradeço à Dani, uma pessoa muito especial na minha vida, por todo amor, carinho, compreensão e companheirismo. Sem você ao lado as coisas seriam muito mais difíceis...

Agradeço ao Oscar, que além de toda a competência como orientador, se tornou também um grande amigo ao longo desses seis anos de convívio. Não poderia deixar de agradecer aqui também ao Léo e à Eda, por todas as festas e churrascos.

Agradeço aos muitos amigos que passaram pelo nosso laboratório (alguns ainda estão lá!) ao longo de todos estes anos: Aline, Bira, Camilla (mesmo você estando a cada dia mais chata, eu ainda gosto de você!), Clara (valeu pelo oitavo artigo!), Coelho, Giuseppe, Henrique, Léo (grandes farras...), Lívia e Nathan. Sem a convivência com vocês no dia a dia, este trabalho não teria saído...

Agradeço aos grandes amigos do departamento de Física de UFMG: Edson e Robson (seis anos de almoços, muito papo-furado e muita ralação!); Mário (it's not easy, my friend...), Léo Gabriel, Caio, Wendell, Daniel, Além-

---

Mar, Ive, Tiago e todos mais, pela amizade e pelos grandes momentos de diversão.

Agradeço aos professores do departamento de Física da UFMG, que muito contribuíram para a minha formação. Em especial, agradeço àqueles com dedicação ímpar à arte de lecionar: obrigado pelos excelentes cursos que tive a oportunidade de fazer!

Agradeço aos professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro Moysés Nussenzveig, Paulo Maia Neto e Nathan Viana, e também ao Mazolli, pela parceria de sucesso e pelos quatro artigos publicados em conjunto.

Agradeço aos amigos e colegas de Fortaleza, tanto dos tempos de colégio quanto dos tempos de graduação: Gustavo, Marcus, Felipe, Gustavo Dantas, Emidio, Ésio e todos mais, pela amizade ao longo de todos esses anos.

Agradeço aos colegas do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), pela força nesta reta final do doutorado e pelo incentivo para investir em pesquisa.

Agradeço aos institutos de financiamento: CAPES, CNPq, FAPEMIG, Instituto do Milênio de Nanotecnologia e Instituto do Milênio de Óptica Não-linear, Fotônica e Biofotônica - MCT. Agradeço também ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela bolsa de estudos.

Por fim, gostaria de deixar um agradecimento especial a todos aqueles que se dedicam à educação e à ciência neste país. É isto que faz um povo andar pra frente...

---

## Resumo

Iniciamos este trabalho estudando a física da pinça óptica. Trata-se de uma técnica de micromanipulação bastante utilizada para estudar partículas e sistemas biológicos com tamanho na escala de micrômetro. Analisamos teoricamente o fenômeno e aplicamos técnicas experimentais com a finalidade de comprovar experimentalmente uma recente teoria de pinçamento óptico, a chamada Teoria MDSA. Nossos resultados experimentais para a constante de força da pinça óptica em função do raio da microesfera presa em seu poço de potencial mostram uma boa concordância com a previsão da Teoria MDSA. Esta comparação não envolve parâmetros ajustáveis: todos os parâmetros relativos à nossa pinça óptica, necessários para gerar os resultados teóricos, foram medidos com precisão. Por esta razão, a comparação entre experimento e teoria é dita absoluta.

A seguir, aplicamos a técnica de pinçamento óptico, em conjunto com a técnica de espectroscopia de autocorrelação de intensidades, para estudar um dos sistemas biológicos de maior importância: a molécula de DNA. Com estas duas técnicas, foi possível estudar a interação da molécula de DNA com alguns fármacos importantes na medicina, largamente utilizados no tratamento de doenças humanas. Realizamos experimentos de estiramento da molécula de DNA, bem como dos complexos DNA-fármacos. Estes experimentos permitiram estudar as variações da elasticidade entrópica e do tamanho destes complexos. Encontramos uma nova transição estrutural na molécula de DNA, induzida por estes fármacos, medindo o comprimento de persistência dos complexos em função da concentração de fármaco em solução. Estes resultados contribuíram para entender melhor o mecanismo de interação DNA-fármacos, bem como os efeitos causados por estes sobre as propriedades mecânicas da molécula de DNA.

---

# Abstract

We started this work studying the physics of optical tweezers. This is a micromanipulation technique much used to study particles and biological systems with size in the micrometer range. We theoretically analyze the phenomenon and apply experimental techniques to verify the results of a recent theory of optical tweezers, the MDSA Theory. We measure the trap stiffness of the optical tweezers as a function of the trapped bead radius. These experimental results show a good agreement with the predictions of the MDSA Theory. This comparison does not involve any adjustable parameter: all parameters of our optical tweezers, necessary to obtain the theoretical results, were precisely measured. Therefore, the comparison between experiments and theory is called absolute.

Next, we apply the optical tweezers technique, combined with the intensity autocorrelation spectroscopy technique, to study one of the most important biological systems: the DNA molecule. With these two techniques, it was possible to study the interaction of the DNA molecule with some important medicinal drugs, much used in the treatment of human diseases. We have performed stretching experiments with DNA molecules and DNA-drugs complexes. These experiments allow us to study the entropic elasticity and size variations of these complexes. We found a new structural transition of the DNA molecule, induced by these drugs, measuring the persistence length of the complexes as a function of the drug concentration in solution. These results have contributed to clarify the DNA-drugs interaction, and also the mechanical properties changes of the DNA molecule induced by these drugs.

---

# Capítulo 1

## Introdução

A grosso modo, uma pinça óptica consiste em um feixe de laser fortemente focalizado através da objetiva de um microscópio [1]. Sob certas condições, que discutiremos no próximo capítulo, este feixe é capaz de aprisionar pequenas partículas dielétricas na região próxima ao foco do feixe, tornando este aparato uma poderosa ferramenta de micromanipulação, com aplicações não só em física, mas também em outras áreas, onde se destaca a área da biologia [2–7].

O fenômeno do pinçamento óptico foi descoberto em 1969 nos laboratórios Bell, Estados Unidos, por Arthur Ashkin e colaboradores [1]. Duas recentes revisões sobre o assunto podem ser encontradas nas referências [6] e [7].

Neste trabalho, estudamos primeiramente a física da pinça óptica, estabelecendo uma comparação absoluta, livre de parâmetros ajustáveis, entre uma nova teoria de pinças ópticas e os nossos resultados experimentais. A teoria em questão é a mais completa e realista no tratamento de pinças ópticas que temos conhecimento, e foi formulada na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo grupo de pesquisadores composto por H. M. Nussenzveig, P. A. Maia Neto e A. Mazolli [8,9].

O problema do pinçamento óptico de uma microesfera de raio arbitrário é bastante complicado, por isso existem muitos trabalhos com teorias limites, válidas para microesferas muito pequenas ou muito grandes comparadas com o comprimento de onda da luz do laser utilizado na pinça óptica. Para esferas com um raio  $a$  muito menor que o comprimento de onda do laser ( $a \ll \lambda$ ),

---

estamos no chamado Limite Rayleigh. Neste limite, a microesfera pode ser tratada como um dipolo induzido em um campo elétrico aproximadamente uniforme. Um tratamento matemático adequado deste limite pode ser encontrado na ref. [10]. No limite extremo, para esferas com um raio  $a$  muito maior do que o comprimento de onda do laser ( $a \gg \lambda$ ), estamos no Limite da Óptica Geométrica. Neste limite, o tratamento do laser como um conjunto de raios de luz\* é adequado. Na ref. [10] fizemos uma análise matemática rigorosa deste limite, determinando uma expressão para a força exercida pela pinça óptica sobre a microesfera presa.

Para uma microesfera com raio arbitrário, fora desses limites, o cálculo da força exercida pela pinça sobre a microesfera torna-se um problema bastante complexo. O tratamento usado pelo grupo da UFRJ é baseado na representação de Debye [8,9,11] para o feixe de laser focalizado além da objetiva e na teoria de espalhamento Mie<sup>†</sup> para a interação do feixe com a microesfera, além de incluir os efeitos da aberração esférica da luz devido à refração na interface vidro-água do nosso porta-amostras [8,9,12–14]. Nos referiremos a esta teoria no decorrer desse texto pelo nome proposto pelos autores, Teoria MDSA (iniciais de Mie-Debye Spherical Aberration).

Com o intuito de testar experimentalmente a Teoria MDSA, verificando sua validade, realizamos experimentos em parceria com o grupo da UFRJ. Nossas medidas consistem em obter o gráfico da variação da constante de força da pinça óptica<sup>‡</sup> em função do raio da microesfera presa, para uma dada distância fixa da microesfera em relação à lamínula do porta-amostras. Conforme mostraremos no próximo capítulo, uma boa concordância entre a

---

\*Estamos denotando por raio de luz uma porção do feixe com largura infinitesimal, seguindo a linguagem da óptica geométrica.

<sup>†</sup>Existem dois tipos de espalhamento de luz classificados quanto ao tamanho das partículas espalhadoras: o espalhamento Rayleigh e o espalhamento Mie. O espalhamento Rayleigh ocorre quando as dimensões das partículas espalhadoras são muito menores que o comprimento de onda da luz incidente. O espalhamento Mie ocorre quando o tamanho destas partículas é da mesma ordem de magnitude que o comprimento de onda do feixe incidente.

<sup>‡</sup>Conforme discutiremos no próximo capítulo, para uma microesfera de raio fixo situada a uma distância fixa em relação à lâmina do porta-amostras, a pinça óptica gera sobre esta microesfera uma força do tipo  $F = -\kappa x$ , ou seja, o potencial da pinça óptica neste caso é harmônico para pequenos deslocamentos  $x$ , com uma constante de força  $\kappa$  bem definida.

---

teoria e o experimento foi alcançada para as mais diversas faixas de tamanho das microesferas.

Nossas medidas são realizadas através de espalhamento de luz. Para tanto, utilizamos um segundo laser, colinear com aquele que gera o pinçamento óptico, para coletar a luz deste retroespalhada pela microesfera presa na pinça. Analisando as flutuações de intensidade retroespalhada devido ao movimento Browniano da microesfera, determinamos a constante de força da pinça óptica [15]. O raio da microesfera é medido usando-se videomicroscopia para analisar o movimento Browniano livre da mesma, ao ser solta da pinça óptica. Dessa forma, construímos o gráfico experimental da constante de força em função do raio da microesfera, que é então comparado com a previsão da teoria. Discutiremos em detalhes todas as técnicas no próximo capítulo. Os resultados desse trabalho foram recentemente publicados [13,14].

A segunda parte deste trabalho consiste em estudar a interação DNA-fármacos\* usando as técnicas de pinçamento óptico e espalhamento de luz. Uma vantagem deste método é possibilitar o estudo de moléculas individuais, evitando recorrer a médias e estatísticas. Muitos estudos de interação DNA-fármacos e DNA-proteínas já foram realizados utilizando experimentos similares de moléculas individuais [16–19].

O objetivo é determinar a variação da elasticidade entrópica da molécula de DNA na interação com alguns fármacos importantes, usados em tratamento de câncer e outras doenças humanas. Neste trabalho utilizamos três compostos diferentes: a daunomicina, largamente usada em alguns tipos de quimioterapia; o brometo de etídio<sup>†</sup>, usado como marcador fluorescente de DNA em experimentos de eletroforese; e o psoralen, usado em tratamento de doenças de pele como psoríase e vitiligo.

A motivação inicial para este trabalho é o fato de existir na literatura

---

\*Segundo a terminologia farmacêutica, um fármaco é qualquer substância química de estrutura conhecida usada em tratamento medicinal.

<sup>†</sup>Embora o brometo de etídio seja mais conhecido como corante fluorescente usado como marcador para identificar e visualizar o DNA em eletroforeses e outros métodos de separação de ácidos nucleicos, recentemente esta substância tem sido utilizada com fins medicinais, como por exemplo, para estudar a reação do sistema nervoso central frente a múltiplos episódios de desmielinização tóxica [20]. Desta forma, a substância pode ser considerada um fármaco de acordo com a definição acima.

---

diversos resultados contraditórios a respeito da interação destas substâncias com o DNA, conforme discutiremos nos Capítulos 4 e 5, além do fato destes compostos serem importantes na medicina.

Nossas medidas consistem em obter a curva de força  $\times$  extensão para a molécula de DNA e os complexos DNA-fármacos. Esta curva é ajustada ao modelo teórico derivado por Marko e Siggia [21] para polímeros semiflexíveis, que discutiremos no Capítulo 3. Deste ajuste extraímos o comprimento de persistência\* da molécula [22], um parâmetro diretamente relacionado com a elasticidade da mesma, além do seu comprimento de contorno<sup>†</sup>. Construimos então gráficos destas grandezas em função de parâmetros de interesse, como a concentração de fármaco na amostra, para os três fármacos, e o tempo de exposição a iluminação ultravioleta controlada<sup>‡</sup>, no caso do psoralen, a fim de estudar as variações na elasticidade entrópica dos complexos em função destes parâmetros de interesse em cada caso. Para realizar as medidas, fixamos uma ponta da molécula de DNA na lamínula do porta-amostras e a outra ponta a uma microesfera de poliestireno. Usamos a pinça óptica para capturar a microesfera de poliestireno, podendo assim manipular e esticar a molécula de DNA. Estudando a intensidade da luz retroespalhada pela microesfera a medida que esticamos a molécula de DNA com uma velocidade controlada, obtemos uma curva da intensidade retroespalhada em função do tempo. Fazendo a caracterização da pinça óptica, relacionamos facilmente a intensidade retroespalhada com a força exercida pela molécula de DNA a medida que esta é esticada. O tempo é relacionado trivialmente com a extensão da molécula conhecendo-se a velocidade de estiramento. A curva experimental obtida é então ajustada com a expressão de Marko e Siggia [21], conforme citado anteriormente. Todos os detalhes destes procedimentos serão discutidos nos Capítulos 3, 4 e 5.

---

\*O comprimento de persistência é o comprimento de correlação da cadeia polimérica e fornece informação sobre a elasticidade da molécula. A definição formal deste parâmetro será dada no Capítulo 3

<sup>†</sup>O comprimento de contorno é a distância ponta-a-ponta do polímero quando este se apresenta completamente esticado, ou seja, sem dobras.

<sup>‡</sup>Conforme discutiremos no Capítulo 5, a interação do psoralen com o DNA é bem mais complexa que no caso das outras duas substâncias estudadas. O psoralen é um fármaco fotossensível, e o tipo de interação com o DNA depende da iluminação fornecida à amostra.

---

Em resumo, no Capítulo 2, discutimos o funcionamento de uma pinça óptica, apresentando a Teoria MDSA e fazendo comparações entre esta teoria e nossos resultados experimentais.

No Capítulo 3, discutimos um pouco da biologia e da física da molécula de DNA. Começamos o capítulo com uma revisão básica da biologia da molécula. A seguir, fazemos o tratamento matemático da molécula de DNA como um polímero, introduzindo o Modelo Worm-Like Chain (Modelo Cadeia Vermiforme) e demonstrando a expressão de Marko e Siggia [21].

No Capítulo 4, apresentamos os métodos experimentais utilizados nas medidas envolvendo DNA e discutimos os resultados obtidos para a interação com os dois fármacos intercalantes\*: daunomicina e brometo de etídio.

No Capítulo 5, apresentamos os resultados e discutimos a interação do DNA com o fármaco psoralen.

Finalmente, no Capítulo 6, apresentamos as conclusões e perspectivas deste trabalho.

---

\*A intercalação é um dos possíveis tipos de interação DNA-fármacos, e será discutida no Capítulo 4.

---

## Capítulo 2

# Pinças Ópticas: uma comparação absoluta entre experimento e teoria

A técnica de pinçamento óptico vem sendo utilizada desde a década de 70 em muitas aplicações em física e biologia [1–7]. Apesar disso, somente recentemente foi formulada uma teoria completa, partindo de primeiros princípios, válida para microesferas em qualquer faixa de tamanho. Conforme relatado no Capítulo 1, esta teoria foi formulada na Universidade Federal do Rio de Janeiro pelos pesquisadores H. M. Nussenzveig, P. A. Maia Neto e A. Mazolli [8,9]. Neste capítulo faremos a comparação dos nossos resultados experimentais com os resultados previstos pela teoria. Apresentamos também uma pequena revisão de algumas teorias mais simples de pinças ópticas, ressaltando as vantagens e desvantagens de cada uma.

### 2.1 Princípio de funcionamento de uma pinça óptica

Com o desenvolvimento da teoria eletromagnética de Maxwell no século XIX, demonstrou-se que a luz é capaz de transferir momento para um meio ao incidir sobre este, exercendo assim uma força sobre este meio. Esta força depende da potência da luz incidente e da sua velocidade de propagação no

---

meio de incidência. Para um único raio\*, por exemplo, podemos escrever

$$F \propto \frac{P_r}{v}, \quad (2.1)$$

com

$$v = \frac{c}{n}, \quad (2.2)$$

onde  $P_r$  é a potência do raio e  $n$  é o índice de refração do meio de incidência.

Quanticamente, podemos entender a origem do fenômeno do pinçamento óptico no fato de que a luz transporta momento em seus fótons, e por isso é capaz de exercer força sobre um objeto ao transferir momento para este. Pelo fato desta força ter uma magnitude muito pequena, é mais fácil verificá-la experimentalmente utilizando feixes muito intensos, como o laser, e pequenos objetos com tamanho na escala de micrômetro.

A seguir, faremos uma análise simples para estimar a ordem de grandeza da força da pinça óptica. Esta análise usa a interpretação quântica da luz como um conjunto de fótons, que possuem um momento linear e uma energia bem definidos. Entretanto, é importante enfatizar que esta interpretação quântica não é necessária para entendermos a razão da luz exercer força sobre um objeto. Classicamente, podemos determinar a força de um feixe de laser sobre um objeto usando o tensor de *stress* de Maxwell. Este é o procedimento usado, por exemplo, na teoria MDSA de pinças ópticas [8,9].

Para termos idéia da ordem de grandeza da força que a luz é capaz de exercer ao incidir em um corpo, imagine um feixe de luz incidindo perpendicularmente em um espelho plano. Cada fóton do feixe possui um momento dado por  $\vec{p} = \hbar \vec{k}$ , sendo  $\vec{k}$  seu vetor de onda. Ao incidir no espelho, este fóton sofre reflexão total, adquirindo um momento final  $-\vec{p}$ . O momento transferido de cada fóton para o espelho é

$$\Delta \vec{p} = \hbar \vec{k} - (-\hbar \vec{k}) = 2\hbar \vec{k}. \quad (2.3)$$

Em módulo, podemos reescrever esta equação na forma

---

\*Conforme adiantado no Capítulo 1, chamaremos de raio uma porção do feixe de laser de largura infinitesimal, seguindo a linguagem da óptica geométrica.

---

$$\Delta p = 2\hbar k = 2\frac{\hbar\omega}{c} = 2\frac{E}{c}, \quad (2.4)$$

onde  $\omega$  é a frequência angular da luz incidente,  $c$  é a sua velocidade e  $E = \hbar\omega$  é a energia do fóton. Desta forma, para  $N$  fótons, teremos  $E_{tot} = N\hbar\omega = NE$ .

A força total exercida por um feixe com  $N$  fótons por segundo incidindo sobre o espelho pode ser obtida a partir da Eq. (2.4). Usando a 2ª Lei de Newton, teremos

$$F = 2\frac{1}{c}\frac{dE_{tot}}{dt} = 2\frac{P_{tot}}{c}, \quad (2.5)$$

onde  $P_{tot}$  é a potência do feixe incidente.

Para um feixe de laser utilizado em pinças ópticas, a potência típica é da ordem de alguns poucos mW. Deste modo, podemos estimar o valor da força da expressão anterior,

$$F_{tot} \approx \frac{2 \times 10^{-3} \text{W}}{3 \times 10^8 \text{m/s}} \approx 10^{-11} \text{N} = 10 \text{pN}. \quad (2.6)$$

De fato, as forças típicas obtidas com uma pinça óptica estão na escala de pico-Newton.

Paralelamente, a luz também é capaz de exercer um segundo tipo de força sobre um objeto quando refratada por este. A origem deste tipo de força está no fato de que o momento linear total do sistema isolado luz-objeto tem que ser o mesmo antes e depois da refração (Teorema da conservação do momento linear). Quando um raio de luz incide em um objeto pequeno, como uma esfera dielétrica, por exemplo, este raio é desviado de sua trajetória original se os índices de refração do meio de incidência e da esfera forem diferentes. Isto significa que o raio refratado terá um momento linear numa direção diferente da direção inicial. Em outras palavras, podemos dizer que o raio sofreu uma variação em seu momento linear, que está relacionada com a mudança de sua trajetória. Sendo assim, a 2ª Lei de Newton requer que a esfera sofra uma variação de momento de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio de luz. Como a esfera possui uma certa massa, isto implica que uma força atua sobre ela para fazer variar o seu momento.

---

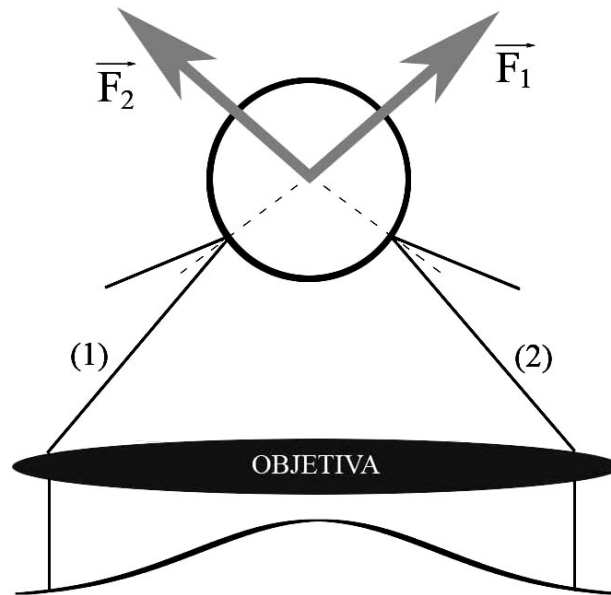
Imagine agora que, ao invés de um simples raio, temos um feixe de luz focalizado em um certo ponto. Se este feixe incidir em um pequeno objeto, como a esfera citada acima, cada raio do feixe dará origem inicialmente a um raio refletido e um raio refratado em sua superfície\*. A contribuição da reflexão para a força total do feixe sobre a esfera está na pressão de radiação. Os raios refratados, por outro lado, contribuirão com forças do tipo discutido no parágrafo anterior. Se o índice de refração da esfera for maior que o do meio que a cerca e se o perfil de intensidades do feixe de luz for gaussiano, os raios refratados deste feixe focalizado exercerão sobre a esfera uma força de gradiente, que tenderá a levá-la para o foco do feixe, conforme discutiremos em detalhes a seguir.

Para entendermos qualitativamente o pinçamento óptico, começaremos analisando o fenômeno sob o ponto de vista da óptica geométrica. A Fig. 2.1 mostra dois raios de extremidades opostas do feixe de laser gaussiano incidindo sobre uma microesfera dielétrica, bem como os raios refletidos na superfície desta microesfera. Devido a reflexão, ambos os raios exercem forças sobre a microesfera, que estão representadas na figura pelas setas de cor cinza. O raio da esquerda (1) exerce a força  $\vec{F}_1$  sobre a microesfera ao sofrer reflexão, enquanto o raio da direita (2) exerce a força  $\vec{F}_2$ , representadas na Fig. 2.1. Observe que a força resultante (pressão de radiação) neste caso tende a empurrar a microesfera para cima.

Agora vamos analisar o efeito da refração dos raios na microesfera. A Fig. 2.2 mostra uma microesfera situada na metade direita do perfil de intensidades do laser da pinça óptica e abaixo do foco do feixe. O raio central (1) é desviado de sua trajetória original, sofrendo portanto uma variação em seu momento. A microesfera sofrerá então uma variação de momento de mesmo módulo e sentido contrário devido a este raio, o que ocasiona o surgimento da força  $\vec{F}_1$  sobre esta, representada na figura. O mesmo acontece com um raio (2) proveniente da extremidade direita do feixe. Entretanto, conforme esquematizado na Fig. 2.2, o perfil de intensidades do laser é gaussiano, e portanto um raio proveniente da região central do feixe possui maior intensidade do que um raio proveniente das extremidades. Desta forma, a força  $\vec{F}_1$  será em módulo maior do que a força  $\vec{F}_2$ , e a força resultante apontará então

---

\*Considerando apenas a primeira interação entre o raio e a superfície da microesfera.

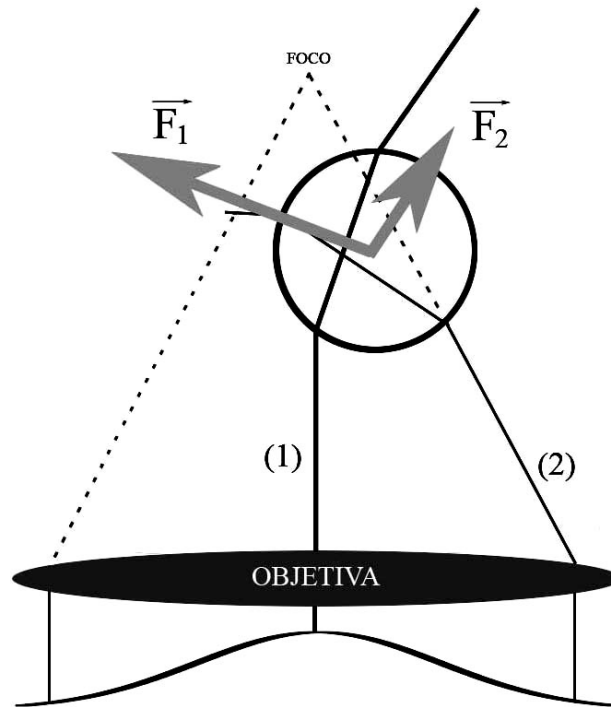


**Figura 2.1:** Pressão de radiação: parte da intensidade total incidente na microesfera é refletida em sua superfície. A força resultante neste caso tende a empurrar a microesfera para cima.

para a esquerda e para cima, deslocando a microesfera para a região do foco do feixe.

Após a microesfera passar pelo foco, teremos a situação representada na Fig. 2.3. Observe que agora os raios refratados causam sobre a microesfera uma força resultante que aponta para baixo, ou seja, para o foco do feixe de laser. Esta análise simplificada permite portanto entender o porquê da microesfera ficar aprisionada na região focal do laser.

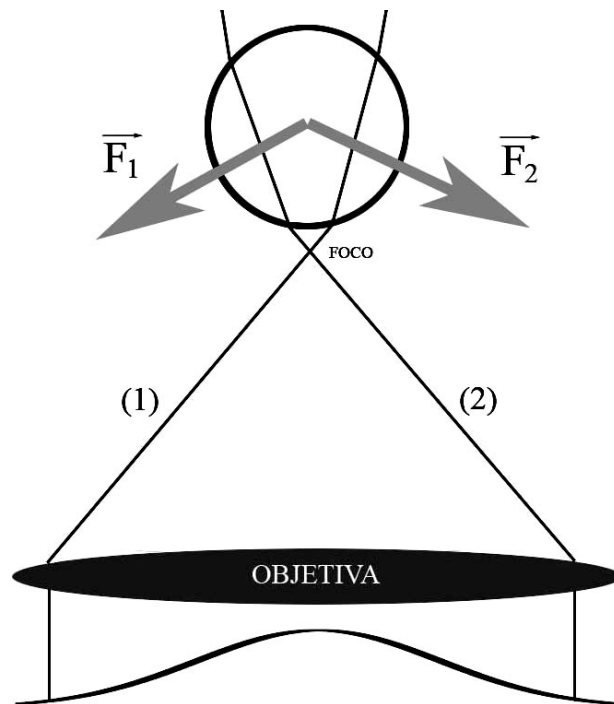
Em geral, o centro da esfera não coincide com o foco porque, além da refração, há também reflexão dos raios na superfície da esfera. De fato, cada raio incidente dá origem inicialmente a um raio transmitido e um raio refletido, cujas intensidades dependem dos coeficientes de reflexão e transmissão na interface meio-esfera. Em resumo, o efeito da refração é deslocar o centro da esfera para o foco do feixe (força de gradiente). Por outro lado, o efeito da reflexão é empurrar a esfera no sentido da incidência do raio (pressão de radiação). A competição entre estes dois efeitos é que faz com que a esfera fique presa com seu centro próximo ao foco do feixe. Toda esta análise, entre-



**Figura 2.2:** Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. Observe que a força resultante sobre a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe.

tanto, foi feita sob o ponto de vista da óptica geométrica, e portanto, válida apenas neste limite, que ocorre quando o raio da esfera é muito maior do que o comprimento de onda do laser usado na pinça óptica. Observe ainda que, ao desenharmos os raios refratados nas Figs. 2.2 e 2.3, estamos supondo que a microesfera possui um índice de refração maior que o do meio que a cerca. De fato, isto é fundamental para que ocorra o pinçamento óptico. É fácil perceber que se o índice de refração da esfera fosse menor que o do meio, o pinçamento não aconteceria.

Observe ainda que, nas Figs. 2.2 e 2.3, representamos apenas as refrações na interface meio-esfera, a fim de tornar mais clara a visualização destas figuras. Entretanto, é importante enfatizar que os raios refratados sofrem múltiplas reflexões no interior da esfera, o que deve ser levado em conta em qualquer teoria quantitativa de pinças ópticas.



**Figura 2.3:** Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada acima do foco do laser. Observe que a força resultante sobre a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe.

A competição entre esses dois efeitos, pressão de radiação e força de gradiente, dá origem ao fenômeno de pinçamento óptico. Ashkin [1,2] foi o primeiro a observar este fenômeno, em 1969, nos Estados Unidos. Em um experimento onde visavam estudar o movimento de pequenas microesferas devido à pressão de radiação, ele e colaboradores observaram que as microesferas se alinhavam ao eixo óptico, centro do feixe de laser, onde a intensidade é maior. Tiveram então a idéia de focalizar o feixe de laser usando uma objetiva. Com isso, observaram que as microesferas ficavam presas em uma região próxima ao foco do feixe.

Por outro lado, quando o raio da esfera é muito menor do que o comprimento de onda do laser, estamos no chamado limite Rayleigh, e esta análise de óptica geométrica não é mais válida. Neste limite, o que ocorre é que a esfera se comporta como um dipolo elétrico induzido e a força sobre esta é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico associado à onda

eletromagnética [10,12]. Esta força faz com que o centro da esfera, que representa o dipolo induzido, se desloque para o ponto de maior intensidade do campo, ou seja, o foco. Desta forma, o efeito resultante será o mesmo: aprisionar as microesferas na região focal.

Em resumo, podemos falar que, a grosso modo, uma pinça óptica consiste em um feixe de laser fortemente focalizado através da objetiva de um microscópio. Este feixe é capaz de aprisionar pequenos objetos na região próxima ao seu foco nas condições previamente discutidas, fazendo deste equipamento um poderoso objeto de micromanipulação.

## 2.2 Teorias de pinças ópticas

Nesta seção faremos uma breve revisão das principais teorias de pinças ópticas encontradas na literatura, discutindo os pontos positivos e negativos de cada uma delas.

### 2.2.1 Teoria de óptica geométrica (OG)

Para microesferas com raio  $a$  muito maior que o comprimento de onda da luz incidente ( $a \gg \lambda$ ), um tratamento baseado em óptica geométrica é adequado. Neste caso, o procedimento usado para calcular a força exercida pelo feixe de luz sobre uma microesfera é o seguinte:

(a) Calcula-se a força exercida por um único raio do feixe sobre a microesfera, levando-se em conta as múltiplas reflexões e refrações no interior da esfera.

(b) Integra-se esta força para todo o feixe, obtendo assim a força total exercida pela pinça óptica sobre a microesfera.

O primeiro a usar este procedimento para calcular a força de uma pinça óptica no regime da óptica geométrica foi Ashkin [3], partindo de resultados preliminares derivados por Roosen [23]. Na ref. [10] determinamos esta força analítica e numericamente, seguindo também este procedimento. A partir da expressão da força exercida pela pinça óptica sobre a microesfera, pode-se calcular a constante de força da pinça óptica numa determinada direção tomando a derivada parcial da componente da força nesta direção em relação

---

à posição, tomada no ponto de equilíbrio. Por exemplo, para a direção  $x^*$ , tem-se

$$\kappa_x = - \left( \frac{\partial F_x}{\partial x} \right)_{\vec{r}_{eq}}, \quad (2.7)$$

onde  $\vec{r}_{eq}$  é a posição de equilíbrio da microesfera presa na pinça.

Na ref. [10] calculamos esta constante de força analítica e numericamente, mostrando que, no regime OG, esta é inversamente proporcional ao raio  $a$  da microesfera presa,

$$\kappa_{OG} \propto \frac{1}{a}. \quad (2.8)$$

Em outras palavras, a curva  $\kappa_{OG} \times a$  neste caso é uma hipérbole.

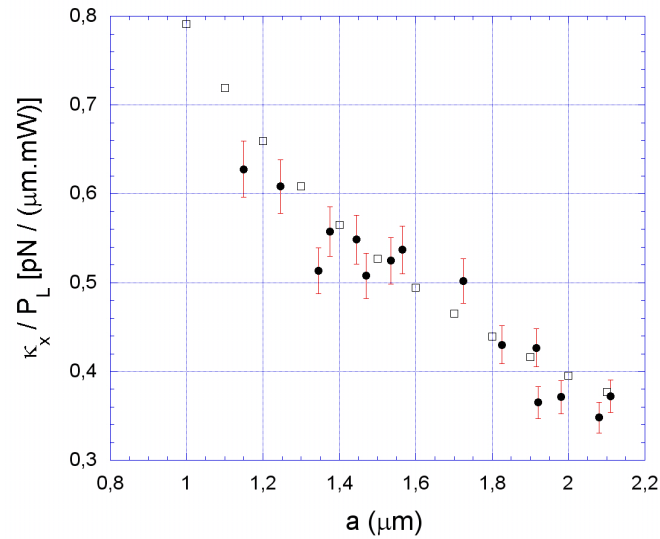
A grande vantagem desta teoria de óptica geométrica é sua relativa simplicidade se comparada, por exemplo, à Teoria MDSA. Entretanto, os resultados numéricos de OG só concordam bem com o experimento para microesferas com  $a \geq 1,2 \mu\text{m}$  no caso do nosso laser ( $\lambda = 832 \text{ nm}$ ). Na Fig. 2.4 representamos esta região, onde a concordância entre os resultados teóricos e experimentais é razoável. As microesferas usadas neste caso são constituídas de óleo mineral, fabricadas usando o procedimento que será descrito na seção 2.3.2. No eixo  $y$  representamos a constante de força da pinça óptica para a direção  $x$ , normalizada pela potência local do laser na microesfera<sup>†</sup>. No eixo  $x$  representamos o raio  $a$  da microesfera presa na pinça. As técnicas experimentais usadas para medir esta constante de força e o raio das microesferas serão discutidas nas seções 2.3 e 2.4.

---

\*Ao longo de todo este texto, usaremos o símbolo  $\kappa_x$  para denotar a constante de força transversa da pinça óptica, ou seja, a constante de força para deslocamentos perpendiculares à direção de incidência do laser (que é a direção  $z$ ). Como o sistema possui simetria radial, temos  $\kappa_x = \kappa_y$ , que são os dois eixos transversos, perpendiculares à direção de incidência do laser e paralelos à lamínula do porta-amostras (ver o sistema de eixos na Fig. 2.6).

<sup>†</sup>A constante de força da pinça óptica é uma grandeza diretamente proporcional à potência local do laser sobre a microesfera. Por este motivo, adotamos a normalização mostrada na Fig. 2.4 e assim não temos a preocupação de especificar a potência do laser usada em cada experimento.

---



**Figura 2.4:** Constante de força da pinça óptica (normalizada pela potência local do laser na microesfera) em função do raio da microesfera presa para microesferas de óleo mineral. *Círculos*: experimento; *quadrados*: teoria de óptica geométrica (OG) [10].

### 2.2.2 Teoria Rayleigh

Quando as microesferas possuem tamanho muito menor que o comprimento de onda do laser ( $a \ll \lambda$ ) o tratamento anterior, baseado em óptica geométrica, torna-se inadequado.

Neste caso, podemos aproximar a esfera por um dipolo induzido num campo elétrico aproximadamente uniforme [10,12]. De fato, como o comprimento de onda é muito grande comparado ao raio ( $\lambda \gg a$ ), podemos considerar que o campo elétrico varia (espacialmente) muito lentamente nas proximidades da esfera. Nestas condições, o procedimento usado para se determinar a constante de força da pinça é o seguinte:

(a) Usamos uma aproximação de campo praticamente uniforme para determinar o momento de dipolo induzido sobre a microesfera [10,12]. Este é um problema clássico presente em praticamente todos os livros de eletromagnetismo.

(b) Determina-se a força que o campo externo exerce sobre este dipolo induzido, ou seja, sobre a microesfera.

(c) Usando-se a Eq. 2.7, determina-se a constante de força da pinça óptica (neste caso representada pelo campo elétrico) sobre a microesfera (dipolo induzido).

Vários autores usaram este procedimento para determinar a constante de força da pinça óptica neste regime [12,24,25]. Também realizamos estes cálculos em detalhes na ref. [10]. A expressão encontrada para a constante de força é

$$\kappa_x = \frac{K - 1}{K + 2} a^3 \left( \frac{\partial^2 E^2}{\partial x^2} \right)_{\vec{r}_{eq}}, \quad (2.9)$$

com

$$K = \frac{\epsilon}{\epsilon_m}, \quad (2.10)$$

onde  $\epsilon$  e  $\epsilon_m$  são as permissividades elétrica do material que forma a esfera e do meio, respectivamente.

Observe que, rigorosamente falando, o campo elétrico não pode ser invariável espacialmente, pois isto resultaria em um valor nulo para a derivada parcial da Eq. 2.9. A aproximação de campo uniforme é usada somente para se determinar o momento de dipolo induzido na microesfera.

Observe ainda que a constante de força na direção  $x$  depende da componente  $x$  do Laplaciano de  $E^2$ , ou seja, esta constante de força é proporcional ao Laplaciano da intensidade do campo ( $I \propto E^2$ ). Pela Eq. 2.7, isto implica que a força deve ser então proporcional ao gradiente da intensidade do campo. Desta forma, fica fácil entender porque ocorre o pinçamento neste regime: a força sobre a microesfera aponta para o ponto de maior intensidade do campo, que é o foco.

Por fim, note que, neste regime, a constante de força da pinça óptica é proporcional ao cubo do raio da microesfera presa, isto é,

$$\kappa_{Rayleigh} \propto a^3, \quad (2.11)$$

um resultado bastante diferente do previsto pela óptica geométrica.

### 2.2.3 Teoria MDSA

Conforme discutimos, as teorias de óptica geométrica e Rayleigh funcionam apenas nos limites assintóticos: a primeira, para microesferas muito grandes ( $a \gg \lambda$ ) e a segunda, para microesferas muito pequenas ( $a \ll \lambda$ ). Entretanto, em grande parte das aplicações experimentais, as microesferas usadas possuem tamanho intermediário, comparável com o comprimento de onda do laser usado na pinça óptica. Desta forma, é fundamental existir uma teoria completa que preveja o comportamento da constante de força corretamente para microesferas em qualquer faixa de tamanho.

Recentemente, Mazolli, Maia Neto e Nussenzveig [8,9] calcularam teoricamente as forças axial e transversa que uma pinça óptica exerce em uma microesfera com raio e índice de refração arbitrários. O tratamento usado neste cálculo é baseado na representação de Debye\* [8,9,11] para o feixe de laser focalizado além da objetiva e na teoria de espalhamento Mie para a interação do feixe com a microesfera, além de levar em conta os efeitos da aberração esférica da luz<sup>†</sup> devido à refração na interface vidro-água do porta amostras [8–10,12–14]. Os autores sugerem para ela o nome de *Teoria MDSA* (iniciais de Mie-Debye Spherical Aberration). Através destas forças, pode-se calcular a constante de força da pinça óptica usando-se a Eq. 2.7.

A teoria MDSA de pinças ópticas é a mais geral que existe na atualidade, podendo ser usada para esferas em qualquer faixa de tamanho. Ela também

---

\*A representação de Debye é uma maneira exata de escrever a expressão para um feixe altamente convergente como uma superposição de ondas planas [11].

<sup>†</sup>A aberração esférica da luz é um fenômeno muito comum em montagens de pinças ópticas. Este fenômeno ocorre porque a luz sofre refração ao passar da lamínula do porta amostras (que é feita de vidro) para a água (geralmente o meio onde as microesferas se encontram). Como o feixe incidente na lamínula é cônico, devido a focalização pela objetiva do microscópio, diferentes raios do feixe possuem diferentes ângulos de incidência na lamínula, e conseqüentemente, diferentes ângulos de refração. Isto faz com que o foco não seja simplesmente um ponto, mas sim uma região espacial com certa extensão. O efeito da aberração esférica é então enfraquecer a força do laser sobre a microesfera, resultando numa menor constante de força para a pinça óptica. O fenômeno é mais acentuado quanto mais distante a microesfera estiver da superfície da lamínula, pois neste caso teremos uma extensão focal maior. Uma discussão detalhada sobre a aberração esférica pode ser encontrada na ref. [10].

---

leva em conta a condição seno de Abbe\* da objetiva do microscópio, uma característica singular das objetivas que é importante em qualquer cálculo quantitativo sobre o assunto.

É importante salientar que, nos limites assintóticos, a teoria MDSA se reduz aos casos anteriores (OG para microesferas grandes e Rayleigh para microesferas pequenas). Maiores detalhes sobre a teoria, bem como o detalhamento dos cálculos, podem ser encontrados nas refs. [8,9,12–14].

## 2.3 Técnicas experimentais

Nessa seção, descreveremos as técnicas experimentais usadas neste trabalho para medir a constante de força da pinça óptica e estabelecer comparações com os resultados previstos pela teoria MDSA.

A microesfera presa no poço de potencial da pinça óptica é um “oscilador harmônico Browniano”, devido ao movimento Browniano da mesma dentro deste poço de potencial, que é harmônico para pequenos deslocamentos em relação à posição de equilíbrio. Nossas medidas são realizadas através da análise da luz retroespalhada pelas microesferas presas na pinça, usando uma técnica conhecida como espectroscopia de autocorrelação de intensidades [15]. Para tanto, trabalhamos com dois feixes de laser. O primeiro, operando na região do infravermelho ( $\lambda = 832$  nm), é a pinça óptica propriamente dita. O segundo é um laser de He-Ne ( $\lambda = 632,8$  nm), que opera na região visível (vermelho). Fazemos este segundo laser também incidir sobre a microesfera, e usando um detector de fótons e um correlacionador digital, analisamos a luz retroespalhada, medindo as correlações de intensidade. Analisando as curvas de correlação com o auxílio do correlacionador digital e de um computador, conseguimos extrair as características do movimento Browniano

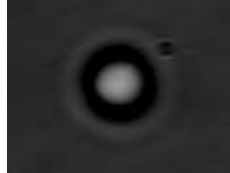
---

\*As objetivas modernas não são lentes simples, mas sim um conjunto de lentes associadas. Para melhorar a qualidade da imagem do sistema, essas objetivas são construídas de forma a satisfazer a chamada condição seno de Abbe. Segundo esta condição, o raio da abertura circular da objetiva ( $R$ ) está relacionado com a distância focal  $f$  através da expressão  $R = f \sin \theta$ , onde  $\theta$  é metade do ângulo de abertura do feixe (cônico), focalizado pela objetiva. Para uma lente convencional, esta relação seria  $R = f \tan \theta$ . Uma discussão mais detalhada sobre a condição seno de Abbe pode ser encontrada nas refs. [10,12].

---

da microesfera pinçada. Estes dados são fundamentais na determinação da constante de força da pinça óptica, como discutiremos ao longo desta seção.

Apenas a título de curiosidade, a Fig. 2.5 mostra a imagem real de uma microesfera de poliestireno, de raio  $1,4 \mu\text{m}$ , presa na pinça óptica.



**Figura 2.5:** Imagem real de uma microesfera de poliestireno com raio  $a = 1,4 \mu\text{m}$  presa na pinça óptica.

### 2.3.1 Montagem experimental

A Fig. 2.6 representa um esquema do equipamento utilizado em nossas medidas.

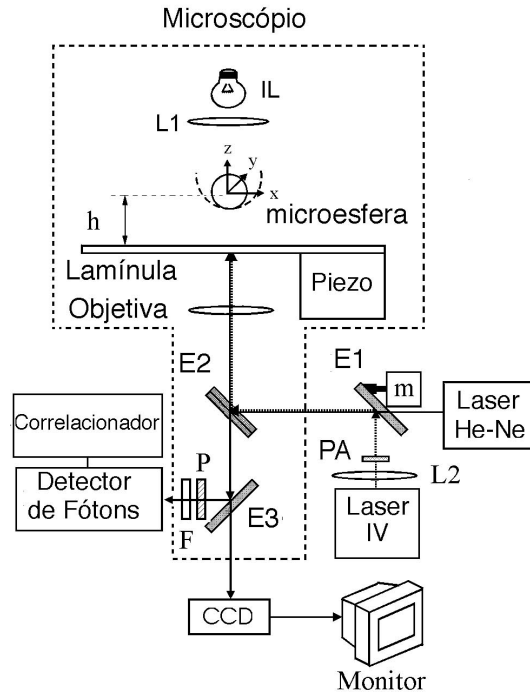
A aparelhagem situada entre as linhas pontilhadas da figura representa o microscópio usado (modelo Nikon TE 300, com objetiva de óptica corrigida no infinito, aumento de 100X e abertura numérica  $NA = 1,4$ ). A objetiva do microscópio é responsável por focalizar o feixe infravermelho, que é a pinça óptica propriamente dita. Esse feixe é cilíndrico ao emergir da fonte, mas se torna cônico após atravessar a objetiva. Além disso, a objetiva também é usada para coletar a intensidade de luz retroespalhada (laser He-Ne) e observar as microesferas.

Na parte direita inferior da figura estão os lasers visível de He-Ne (modelo SP-127,  $\lambda=632,8 \text{ nm}$ ) e infravermelho (IV), (modelo SDL 5422-H1,  $\lambda=832 \text{ nm}$ , potência máxima de 150 mW). O primeiro é utilizado para o estudo do movimento da microesfera através da luz retroespalhada. O segundo, como já comentamos, é a pinça óptica propriamente dita.

$L_1$  e  $L_2$  são lentes. A primeira representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio (IL) e a segunda é usada para colimar o feixe de laser IV.

Abaixo da lâmpada (IL) está a amostra utilizada (solução aquosa com as microesferas). Representamos ainda na figura o poço de potencial devido

---



**Figura 2.6:** Montagem experimental utilizada para as medidas.

à pinça e indicamos o sistema de referência. A lamínula é o nosso porta amostras. Indicamos por  $h$  a distância do centro da microesfera pinçada em relação à lâmina.

O translador digital piezoelétrico (modelo PI E-710.3CD) permite deslocar o estágio do microscópio, e conseqüentemente a lamínula, com precisão nanométrica ao longo dos três eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$ . Isto é importante na procura das microesferas e nos experimentos com DNA que discutiremos nos Capítulos 4 e 5.

$PA$  é um prisma anamórfico [26], usado para uniformizar a distribuição radial de potência do laser IV.

$E_1$  e  $E_2$  são espelhos. O primeiro é um espelho dicróico, que reflete o laser IV mas é transparente para o laser de He-Ne. Conectado a este espelho está o motor  $m$ , responsável por regular a inclinação de  $E_1$ . Mudando a inclinação deste espelho, deslocamos o feixe IV, e conseqüentemente mudamos a posição da microesfera em relação ao feixe visível (He-Ne). O segundo espelho é na verdade um espelho duplo: um outro dicróico para levar o feixe IV até a

objetiva e um semi-espelho para a luz visível.

Em uma das saídas do microscópio conectamos o detector de fótons (EG&G - Photon Count Module, SPCM-200-PQ-F500), com abertura de  $150 \mu\text{m}$  de diâmetro, montado em deslocadores Newport para ser posicionado com precisão. Para cada fóton que chega ao detector, um pulso TTL é enviado ao correlacionador digital (modelo Brookhaven BI9000AT). O correlacionador nos dá as funções de autocorrelação temporais das flutuações de intensidade da luz retroespalhada pela microesfera. Em frente ao detector de fótons usamos um polarizador  $P$  para coletar luz retroespalhada com polarização cruzada em relação a luz incidente, o que minimiza a luz vinda do espalhamento elástico na interface lamínula-água. Usamos ainda um filtro passa faixa  $F$  centrado em  $632 \text{ nm}$  e com largura de faixa de  $20 \text{ nm}$ . Deste modo, garantimos que a luz coletada no detector é proveniente apenas do laser de He-Ne.

Finalmente, em outra saída do microscópio conectamos uma câmera CCD (modelo CCD-72 DAGE-MTI) que leva a imagem da amostra até o monitor, permitindo assim uma ótima visualização do experimento.

### 2.3.2 Preparação das amostras

Neste trabalho, nossas amostras são formadas por uma solução de água deionizada (DI) com microesferas de óleo mineral, do tipo usado em microscopia. A escolha do óleo como material para fazer as microesferas se deve ao fato da emulsão ser altamente estável, já que o óleo é insolúvel em água. Além disso, a variedade de tamanho das microesferas obtidas com nosso procedimento é muito grande, o que é fundamental neste trabalho, já que queremos estudar o comportamento da constante de força em função do raio das microesferas.

A solução de microesferas de óleo é preparada da seguinte maneira:

- 1) Em um recipiente de vidro, colocamos uma pequena gota de óleo em  $1,0 \text{ ml}$  de água DI.
  - 2) Agitamos bem esta solução a fim de homogeneizá-la.
  - 3) Colocamos o recipiente com a solução num banho de ultrassom por cerca de  $15 \text{ minutos}$  para a formação das microesferas com diâmetro na escala
-

de  $\mu\text{m}$ .

4) Finalmente, pegamos 1  $\mu\text{l}$  desta solução e diluímos em 200  $\mu\text{l}$  de água DI. Esta nova solução é colocada no porta-amostras e utilizada nas medidas.

Nosso porta-amostra consiste em uma pequena lamínula de vidro de espessura aproximada 0,15 mm (Corning) com um *O-ring* de borracha de diâmetro 1,5 cm colado em sua superfície. Para colar o anel na superfície da lamínula, usamos parafina previamente derretida em um aquecedor. A solução de trabalho é colocada no interior do *O-ring*. Uma lamínula de vidro cortada é colocada então em cima do *O-ring*, servindo de “tampa” para evitar influências de vibrações externas e evaporação da solução.

### 2.3.3 Medida do perfil de retroespalhamento das microesferas

A medida da constante de força da pinça óptica é fundamental para a maioria dos experimentos realizados com este aparato. No nosso caso, esta constante de força é medida através das flutuações de intensidade da luz retroespalhada pela microesfera presa na pinça. Como a microesfera executa movimento Browniano na solução aquosa em que se encontra, sua posição  $x$  flutua no tempo. A intensidade de luz retroespalhada por uma microesfera presa na pinça óptica depende do seu tamanho e de sua posição relativa ao feixe incidente (He-Ne). Sendo, assim, as flutuações de posição da microesfera acarretam flutuações na intensidade retroespalhada pela mesma. Estas flutuações de intensidade permitem medir a constante de força da pinça porque, quanto mais forte a pinça estiver, menor o movimento Browniano da microesfera e conseqüentemente menores as flutuações de intensidade. Desta forma, existe uma relação entre a constante de força da pinça óptica e as flutuações da intensidade retroespalhada pela microesfera presa. Esta relação foi estudada em detalhes na ref. [27].

Como a intensidade média retroespalhada depende da posição da microesfera em relação ao feixe de He-Ne, é importante fazer uma calibração, medindo a intensidade retroespalhada enquanto deslocamos a microesfera em relação ao feixe espalhador. Esta calibração é chamada de perfil de retroespalhamento. Em resumo, este perfil é medido deslocando-se a esfera em

---

relação ao laser de He-Ne. O programa do correlacionador digital, juntamente com o detector de fótons, é capaz de medir esta intensidade em função do tempo, obtendo graficamente a curva do perfil de retroespalhamento da esfera presa na pinça. A medida deste perfil é importante em nosso trabalho porque, posteriormente, fazemos a medida da correlação de intensidades com a esfera situada em uma posição do perfil onde obtemos uma melhor relação sinal-ruído [15,27].

Primeiramente, posicionamos a esfera num ponto de intensidade mínima do perfil. Para deslocarmos a microesfera em relação ao laser de He-Ne, usamos o motor  $m$  (ver Fig. 2.6). Este motor desloca o espelho dicróico  $E_1$ , deslocando conseqüentemente o laser infravermelho e a esfera pinçada. Como  $E_1$  é transparente para o laser de He-Ne, este permanece imóvel, esteja o motor funcionando ou não. Quando a intensidade no perfil atinge novamente um mínimo, interrompemos o motor. Desta forma, obtemos o perfil completo da intensidade retroespalhada em função do tempo.

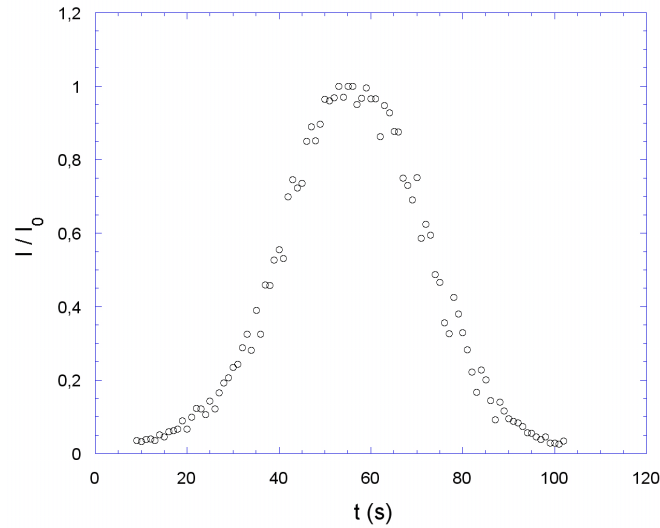
A Fig. 2.7 mostra um típico perfil de espalhamento obtido com o processo descrito acima. A simetria da curva pode ser controlada ajustando adequadamente a posição do detector de fótons.

No caso da medida da constante de força, necessitamos do perfil de retroespalhamento apenas para posicionar a microesfera na posição deste perfil onde obtemos uma melhor relação sinal-ruído da função de correlação, conforme comentado acima. No Capítulo 4, entretanto, discutiremos como relacionar diretamente a posição  $x$  da microesfera com a intensidade retroespalhada pela mesma.

### 2.3.4 Medida da função de autocorrelação de intensidades (ACF)

Tendo o perfil de retroespalhamento, posicionamos a microesfera em uma posição do perfil onde obtemos uma melhor relação sinal-ruído para a função de correlação. Esta posição corresponde aos pontos da curva do perfil onde a derivada é máxima [15,27]. Como estamos interessados no movimento da microesfera ao longo da direção  $x$ , paralela à lâmina (ver sistema de coordenadas na Fig. 2.6), centralizamos previamente a esfera em relação a direção

---



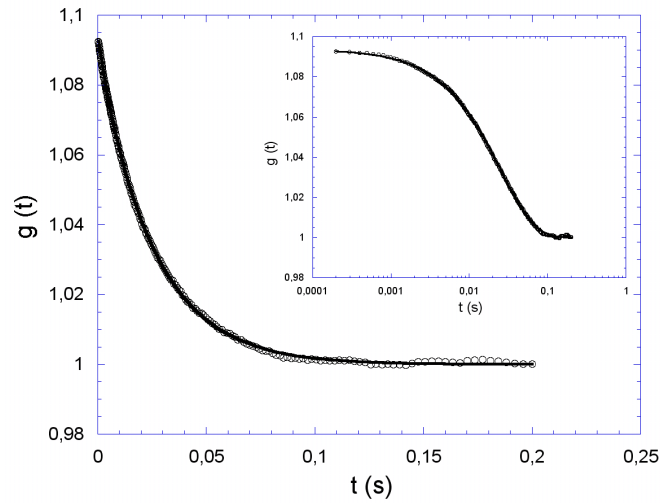
**Figura 2.7:** Perfil da intensidade retroespalhada por uma microesfera presa na pinça em função do tempo. Normalizamos a intensidade por seu valor máximo. Neste caso, a curva é uma gaussiana ligeiramente assimétrica.

$y$ , isto é, posicionamos a esfera nesta direção em um ponto do perfil onde a derivada é nula. Assim, garantimos que a contribuição para a função de correlação será máxima devido ao movimento na direção  $x$  e mínima devido ao movimento na direção  $y$  [15]. O correlacionador digital mede automaticamente as funções de correlação. A Fig. 2.8 mostra uma típica função de correlação normalizada pela intensidade média da medida.

Como a microesfera encontra-se presa em um poço de potencial harmônico devido à pinça óptica, a função de correlação de intensidades é dada por [15,27]

$$g(t) = 1 + A_x \exp(-t/\tau_x) + A_z \exp(-t/\tau_z), \quad (2.12)$$

onde  $A_x$  e  $A_z$  são as amplitudes e  $\tau_x$  e  $\tau_z$  os tempos característicos do movimento Browniano da microesfera nestas duas direções. Usamos esta equação para ajustar a curva experimental (ver Fig. 2.8). Para isso, usamos o programa *Kaleida Graph*. Através deste ajuste, conseguimos determinar as constantes  $A_x$ ,  $A_z$ ,  $\tau_x$  e  $\tau_z$ . Estamos particularmente interessados na constante de tempo  $\tau_x$ , pois queremos determinar a constante de força da pinça óptica nesta direção. A constante de tempo  $\tau_z$  é cerca de 6 a 10 vezes maior



**Figura 2.8:** Típico gráfico de uma função de correlação normalizada. *Inserção:* mesmo gráfico em escala logarítmica.

que  $\tau_x$  e varia muito de uma medida para outra. Este fato ocorre devido a nossa imprecisão em controlar a posição da microesfera na direção  $z$  [15,27]. Isto é uma característica intrínseca das pinças ópticas, devido ao fato da constante de força transversa ( $\kappa_x$ ) ser maior que a axial ( $\kappa_z$ ) [8,9].

### 2.3.5 Medida do raio das microesferas

Como queremos construir um gráfico da constante de força da pinça óptica em função do raio da microesfera presa, é fundamental que possamos medir o raio das microesferas com uma boa precisão. Seria muito mais fácil usar microesferas de poliestireno calibradas pelo fabricante, mas devido à pequena variedade de tamanhos disponíveis e o alto custo das mesmas, optamos por usar as microesferas de óleo e desenvolver um método preciso para medir o raio das mesmas.

O método utilizado consiste em analisar o movimento Browniano de uma microesfera livre em solução. Filmamos este movimento usando a câmera CCD, capturando a imagem diretamente em um computador. Com o auxílio dos programas *ImageJ* (para captura e análise digital da imagem) e *Kaleida Graph* (para o ajuste dos dados) determinamos o deslocamento quadrático médio  $\langle \Delta r^2 \rangle$  da esfera em função do tempo, para o movimento paralelo

à lamínula. Usamos então a relação para o movimento Browniano em duas dimensões [28],

$$\langle \Delta r^2 \rangle = 4Dt, \quad (2.13)$$

para determinar o coeficiente de difusão  $D$ . Este é diretamente relacionado com o atrito viscoso  $\gamma$  sobre a microesfera através da expressão

$$D = \frac{k_B T}{\gamma}, \quad (2.14)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta.

Sabemos que  $\gamma$  é uma função do raio  $a$  e da altura  $h$  da microesfera em relação à lamínula. A expressão aproximada para o atrito viscoso é dada por [29,30]

$$\gamma = \gamma_0 \left[ 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left( \frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1}, \quad (2.15)$$

onde  $a$  é o raio da microesfera,  $h$  é a distância de seu centro em relação à lâmina, e

$$\gamma_0 = 6\pi\eta_a a, \quad (2.16)$$

onde  $\eta_a$  é a viscosidade da água (meio onde as microesferas se encontram).

A viscosidade de um material depende fortemente da temperatura. Podemos determinar o valor da viscosidade da água como função da temperatura usando a equação empírica [27]

$$\eta_a = 10^{-3} \left[ 0,26 + 1,51 \exp \left( \frac{-t_c}{29} \right) \right], \quad (2.17)$$

onde  $t_c$  é a temperatura em graus Celsius e a viscosidade neste caso é encontrada na unidade Pa.s.

Dessa forma, determinando-se o atrito  $\gamma$  através do coeficiente de difusão  $D$ , resolvemos numericamente a Eq. 2.15 para uma altura  $h$  fixa e determinamos o raio  $a$  para cada microesfera utilizada. Detalhes sobre a análise do movimento Browniano das microesferas para obtenção do  $\langle \Delta r^2 \rangle$  e do coeficiente de difusão podem ser encontrados no Apêndice A.

---

Para testar a funcionalidade e a precisão deste método, realizamos testes com algumas esferas de poliestireno calibradas, comparando o valor do raio obtido com nosso método com o indicado pelo fabricante. Encontramos uma diferença máxima de 10% entre os resultados obtidos experimentalmente e os valores nominais dos raios, indicando uma boa eficiência do método.

Observe que a altura das microesferas é mantida fixa durante as medidas. Para determinar esta altura, primeiramente encostamos a microesfera presa na lamínula movimentando o estágio do microscópio na direção  $z$ . Nesta situação a altura é o próprio raio da microesfera. Visualmente, determinamos esta condição observando a mudança de imagem da microesfera ao ser pressionada contra a lamínula. Finalmente, movemos novamente o estágio, posicionando a esfera na altura  $h$  desejada em relação à lamínula. Esta altura pode ser medida usando-se o botão graduado do microscópio ou o translador digital piezoelétrico. No primeiro caso temos uma imprecisão de  $0,5 \mu\text{m}$  na determinação da altura, enquanto no segundo esta imprecisão é de  $10 \text{ nm}$ , tornando o segundo método muito mais preciso.

### 2.3.6 Determinação da constante de força da pinça óptica

Nas duas últimas seções, determinamos o tempo característico do movimento Browniano da microesfera na direção  $x$  e o atrito sobre ela nesta direção. De posse destes dois dados, a constante de força da pinça óptica é calculada facilmente através da relação [15,27]

$$\kappa_x = \frac{\gamma}{\tau_x}. \quad (2.18)$$

### 2.3.7 Variação da constante de força em função do tamanho da microesfera pinçada e de sua altura em relação à lâmina

Na Eq. 2.18, vemos que a constante de força  $\kappa$  da pinça óptica está relacionada com o tempo característico do movimento Browniano da microesfera e com o atrito sobre ela. O tempo característico depende do tamanho da

---

microesfera. O atrito, entre outras coisas, depende também do tamanho da microesfera e de sua distância em relação à lâmina. É de se esperar então que a constante de força da pinça dependa do tamanho da microesfera presa e de sua distância em relação à lâmina. Além disso, a aberração esférica da luz também contribui bastante para a variação de  $\kappa$  com  $h$ , conforme discutimos na seção 2.2.3 e na ref. [10].

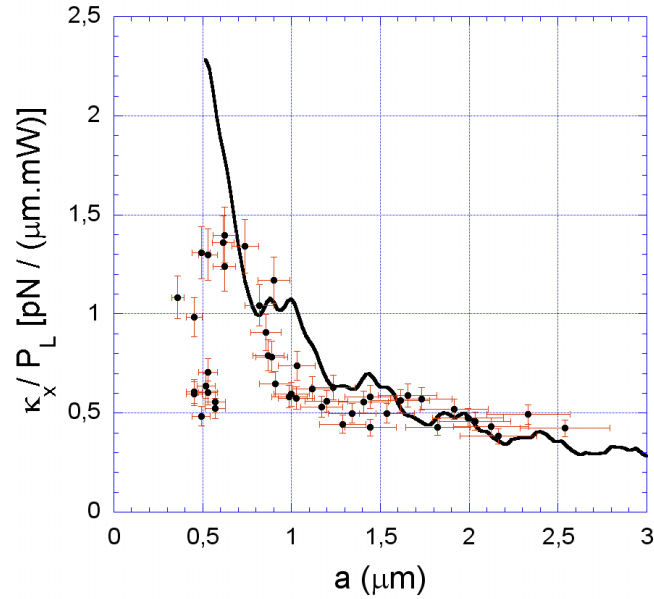
## 2.4 Resultados obtidos

Nas Figs. 2.9 e 2.10 apresentamos os gráficos da constante de força  $\kappa_x$  (normalizada pela potência local  $P_L$  no laser da pinça óptica sobre a microesfera) em função do raio  $a$  da microesfera presa na pinça, para duas alturas  $h$  distintas em relação à lamínula. Na primeira, Fig. 2.9, fixamos a altura em  $h = 3,1 \mu\text{m}$ . Na segunda, Fig. 2.10, fixamos a altura em  $h = 8,6 \mu\text{m}$ . Em ambas as figuras, os pontos experimentais estão representados por círculos com as respectivas barras de erro, enquanto a previsão da Teoria MDSA está representada pela linha sólida.

A normalização da constante de força pela potência local do laser na microesfera se deve ao fato da mesma ser diretamente proporcional à potência do laser [10]. Assim, podemos apresentar os dados sem a preocupação de especificar a potência utilizada. Uma discussão mais detalhada sobre a medição da potência local da pinça óptica na microesfera pode ser encontrada no Apêndice B.

Observe que o comportamento das duas curvas é bastante semelhante. Para  $h = 3,1 \mu\text{m}$ , a teoria prevê que o pinçamento não é estável para  $a < 0,52 \mu\text{m}$ . Por isto, a Fig. 2.9 não apresenta pontos teóricos na região  $a < 0,52 \mu\text{m}$ . Observe que os pontos experimentais nesta região estão espalhados por diversos valores da constante de força, possuindo inclusive esferas com mesmo raio e valores diferentes da constante de força. Verificamos experimentalmente que, nesta região, as microesferas tendem a escapar da pinça após certo tempo. Este fato é um forte indício de que a previsão teórica para um pinçamento não estável nessa região é correta. Um outro resultado interessante previsto pela teoria MDSA é a existência de mínimos locais no potencial da pinça óptica para microesferas de pequenos raios (regime

---



**Figura 2.9:** Constante de força  $\kappa_x$ , normalizada pela potência local na microesfera  $P_L$ , em função do raio  $a$  da microesfera presa, para uma altura fixa  $h = 3,1 \mu\text{m}$ . *Círculos:* pontos experimentais; *Linha sólida:* Teoria MDSA.

Rayleigh), devido ao fenômeno da aberração esférica [13,14]. Estes mínimos locais ajudam a explicar a instabilidade do pinçamento nesta faixa de tamanho, já que uma microesfera inicialmente presa em um mínimo local de potencial escaparia com muito mais facilidade. Entretanto, pelo fato da nossa pinça óptica possuir um feixe mais paraxial, com largura menor que a abertura circular da objetiva, este efeito não é muito acentuado\* [14].

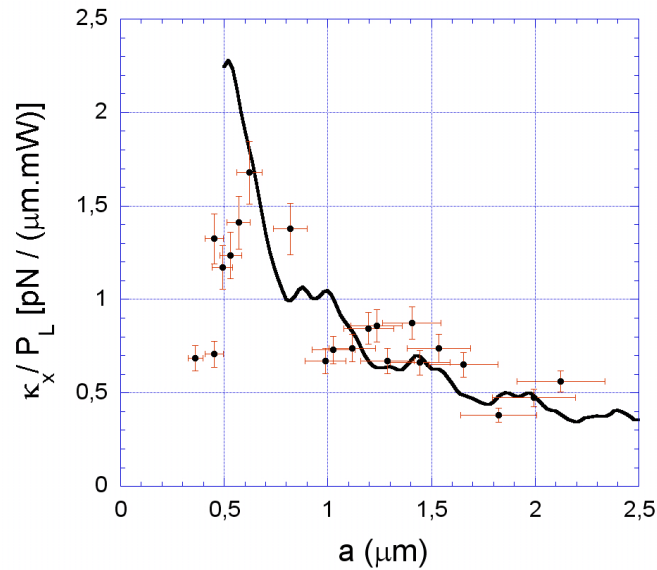
Para  $h = 8,6 \mu\text{m}$ , o comportamento é análogo, porém nesse caso a teoria prevê um pinçamento não estável para  $a < 0,50 \mu\text{m}$ .

Na Fig. 2.11 comparamos os resultados experimentais (círculos) e da teoria MDSA (linha sólida) com a previsão da óptica geométrica (linha pon-

---

\*Estes mínimos locais foram verificados experimentalmente com a pinça óptica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde este efeito é mais acentuado. Acompanhando-se a imagem de uma microesfera enquanto variamos sua altura em relação a lamínula, observou-se um salto da mesma entre dois mínimos, quando o segundo mínimo passa a ser mais estável do que aquele em que a microesfera se encontrava inicialmente. A distância entre os dois mínimos determinada experimentalmente coincide com a previsão da teoria MDSA. Maiores detalhes podem ser encontrados nos artigos anexados no Apêndice F.

---

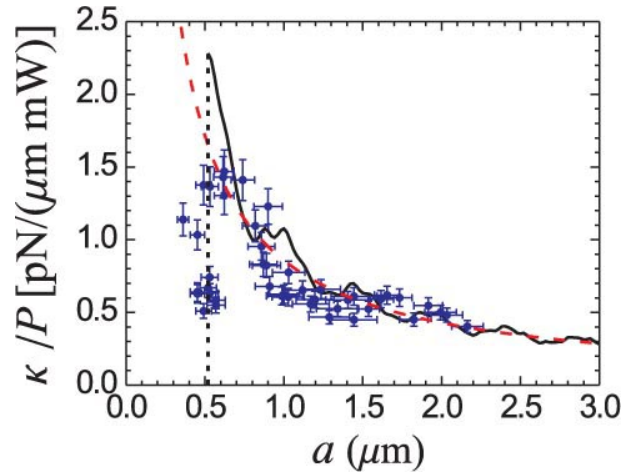


**Figura 2.10:** Constante de força  $\kappa_x$ , normalizada pela potência local na microesfera  $P_L$ , em função do raio  $a$  da microesfera presa, para uma altura fixa  $h = 8,6 \mu\text{m}$ . *Círculos:* pontos experimentais; *Linha sólida:* Teoria MDSA.

tilhada), cuja teoria foi discutida na seção 2.2.1, para a altura  $h = 3,1 \mu\text{m}$ . Observe que neste caso a concordância da teoria de óptica geométrica (OG) com o experimento não é muito diferente da concordância da teoria MDSA com o mesmo para  $a \geq 0,8 \mu\text{m}$ . Entretanto, a teoria OG não é capaz de prever a região instável de pinçamento ( $a < 0,52 \mu\text{m}$ ). Como pode ser visto na Fig. 2.11, a teoria OG prevê um aumento indefinido para a constante de força a medida que diminuimos o tamanho da microesfera. De fato, de acordo com a previsão desta teoria, teríamos uma constante de força infinita para  $a \rightarrow 0$ . Já a teoria Rayleigh prevê um aumento da constante de força com o cubo do raio da microesfera presa (seção 2.2.2). Esta teoria portanto não pode explicar a queda da constante de força observada experimentalmente para  $a \geq 0,8 \mu\text{m}$ . Destes argumentos, podemos concluir que a teoria MDSA é mais realista se comparada a estas outras teorias encontradas na literatura.

A única região onde a concordância entre o experimento e a teoria MDSA não é boa é a região correspondente aos picos das curvas (ver Figs. 2.9 e 2.10). Esta discrepância maior na região do pico se deve ao fato desta região ser mais sensível a aberrações ainda não incluídas na teoria, como por exemplo,

aberrações das objetivas na região do infravermelho (pois as mesmas são construídas para serem usadas com luz visível) e múltiplas reflexões entre a microesfera presa e a lamínula do porta amostras, além de impurezas e imperfeições possivelmente encontradas na superfície das microesferas [13, 14].



**Figura 2.11:** Constante de força  $\kappa_x$ , normalizada pela potência local na microesfera  $P_L$ , em função do raio  $a$  da microesfera presa, para uma altura fixa  $h = 3,1 \mu\text{m}$ . *Círculos:* pontos experimentais; *Linha sólida:* Teoria MDSA; *Linha pontilhada:* previsão da óptica geométrica.

Uma vantagem fundamental da teoria MDSA é que ela é inteiramente formulada em termos de parâmetros mensuráveis, por isso, a comparação com o experimento é dita absoluta, já que não utilizamos nenhum parâmetro ajustável. Os parâmetros da pinça óptica que precisamos medir para obter os resultados da teoria são: (a) a potência local do laser na microesfera, (b) a largura  $\sigma$  do feixe antes de atravessar a objetiva, e (c) os índices de refração da lamínula de vidro, da microesfera (no caso, do óleo) e do meio (água DI). No Apêndice B discutimos os métodos utilizados para realizar estas medições e apresentamos os resultados obtidos para nossa pinça óptica.

Nas refs. [13,14] também realizamos comparações da teoria MDSA com outra pinça óptica com uma configuração bastante diferente da nossa, confirmando a concordância entre experimento e teoria. Porém, como estas medidas não foram realizadas pelo autor desta tese, não serão apresentadas neste

texto, podendo entretando ser conferidas nos artigos refs. [13,14], anexados no Apêndice F.

Outras técnicas experimentais e resultados da medição da constante de força de pinças ópticas podem ser encontrados nas refs. [25,31–33]. Alguns desses autores [32] também usam técnicas de espalhamento de luz para medir a constante de força. Em outros casos [31,33], é feita uma calibração da força óptica colocando-se a amostra numa câmara com um líquido em escoamento. Desta forma, a força óptica é calibrada via força de Stokes, conhecendo-se a velocidade de escoamento do líquido. Em nenhum caso, entretanto, os autores citados apresentam uma quantidade de pontos experimentais comparável às Figs. 2.9 e 2.10.

---

## Capítulo 3

# A molécula de DNA

Iniciamos este capítulo fazendo uma descrição detalhada da molécula de DNA, ressaltando suas principais características biológicas. Faremos também o tratamento matemático da molécula de DNA como um polímero, usando como base o modelo Worm-Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme) [21,22]. Deduziremos a famosa expressão de Marko e Siggia [21] para a força entrópica em função da extensão da molécula, a base utilizada para analisar nossas medidas, que discutiremos nos dois próximos capítulos.

### 3.1 Aspectos biológicos \*

#### 3.1.1 Histórico e descrição da estrutura da molécula

A elucidação da estrutura da molécula de DNA ocorreu em 1953 por James Watson e Francis Crick, tendo se tornado uma das descobertas mais importantes da história da ciência moderna [36,37]. Esta descoberta deu aos dois cientistas o Prêmio Nobel de Medicina de 1962.

Hoje sabemos que o DNA é composto apenas de quatro moléculas básicas, chamadas nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por um grupo fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ), um açúcar do tipo pentose (no caso, a desoxirribose) e uma base nitrogenada. Esta última é a parte que difere os nucleotídeos entre si. As

---

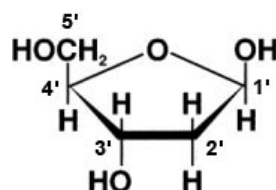
\*Esta seção é baseada nas refs. [34] e [35]

---

quatro bases nitrogenadas que ocorrem no DNA são a adenina (A), a timina (T), a guanina (G) e a citosina (C).

A Fig. 3.1 mostra a molécula de desoxirribose com a numeração dos átomos de carbono. As bases nitrogenadas se ligam ao carbono 1' da pentose através de uma ligação glicosídica\*, enquanto o grupo fosfato se liga ao carbono 5' também da pentose.

Na molécula de DNA, os nucleotídeos formam cadeias, ligados entre si através de pontes fosfodiéster† estabelecidas entre o grupo fosfato e um grupo hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) do nucleotídeo adjacente.



**Figura 3.1:** Desenho esquemático da pentose desoxirribose, mostrando a numeração dos carbonos da mesma.

Todos os nucleotídeos da molécula de DNA têm a mesma orientação relativa. Por exemplo, se o carbono 5' da pentose do primeiro nucleotídeo estiver voltado para cima, estará também em todos os demais nucleotídeos da cadeia polimérica. Esta característica permite especificar a molécula de DNA numa direção definida. Convencionalmente, representamos a cadeia polimérica na orientação  $5' \rightarrow 3'$ , especificando os nucleotídeos pelas letras correspondentes às bases nitrogenadas. Por exemplo:



A adenina e a guanina são similares em estrutura química, sendo chamadas de purinas. A timina e a citosina também são similares na estrutura, sendo chamadas de pirimidinas.

---

\*A ligação glicosídica é uma ligação química covalente que ocorre entre dois açúcares. Especificamente, o que ocorre é combinação entre hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) dos dois compostos, produzindo água.

†Esta ligação ocorre entre a hidroxila ligada ao carbono 3' da pentose de um nucleotídeo e o fosfato do nucleotídeo seguinte.

---

Watson e Crick fizeram sua descoberta partindo de dois indícios. Primeiro, analisaram os dados de difração de raios-X de Rosalind Franklin e Maurice Wilkins em moléculas de DNA. Estes dados sugeriram que a molécula de DNA é longa, fina e possui duas partes similares e paralelas uma à outra, correndo ao longo da molécula. Mais ainda, os dados de raio-X mostravam que a molécula é helicoidal. As desoxirriboses se localizam numa posição externa em relação às bases nitrogenadas, como se fossem os corrimões de uma escada espiral. Watson e Crick concluíram então que a molécula de DNA deveria ter uma estrutura de dupla hélice.

O segundo indício veio de um trabalho de Erwin Chargaff, que, analisando uma grande quantidade de DNA de organismos diferentes, estabeleceu algumas regras sobre a quantidade de bases na molécula:

(a) a quantidade total de pirimidinas (T + C) é sempre igual à quantidade total de purinas (A + G);

(b) a quantidade de timina é sempre igual a de adenina (T = A), e a quantidade de citosina é sempre igual a de guanina (C = G), mas a quantidade de A + T não é necessariamente igual a de C + G.

Este segundo indício permitiu entender o pareamento restrito das bases e, conseqüentemente, a replicação da molécula de DNA.

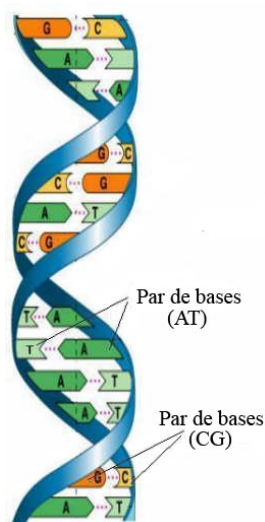
A molécula de DNA é formada por duas fitas, onde cada uma das fitas é uma cadeia de nucleotídeos, mantidos juntos por ligações fosfodiéster. As duas fitas são unidas através de pontes de hidrogênio entre as bases, assumindo uma forma helicoidal. As pontes de hidrogênio são uma ligação relativamente fraca (cerca de 3% da força de uma ligação química covalente\*), o que é uma característica fundamental para a replicação do DNA. As pontes de hidrogênio se formam sempre entre uma purina e uma pirimidina, sendo que G pareia-se sempre com C através de três pontes de hidrogênio, e A pareia-se sempre com T através de duas pontes de hidrogênio. As bases possuem basicamente dois tamanhos, sendo as pirimidinas menores que as purinas, garantindo que os pares AT e CG possuam aproximadamente as mesmas dimensões, o que resulta em um diâmetro uniforme ao longo da molécula de DNA.

---

\*Em termos de energia de ligação, uma ponte de hidrogênio possui entre 1 e 10 kJ/mol, enquanto uma ligação covalente possui entre 100 e 1000 kJ/mol.

---

A Fig. 3.2 é um desenho esquemático da molécula de DNA. A Fig. 3.3 mostra o pareamento das duas fitas, com as ligações de pontes de hidrogênio entre as bases.



**Figura 3.2:** Desenho esquemático de uma molécula de DNA, mostrando a dupla fita helicoidal, com a ligação das bases entre as duas fitas através de pontes de hidrogênio.

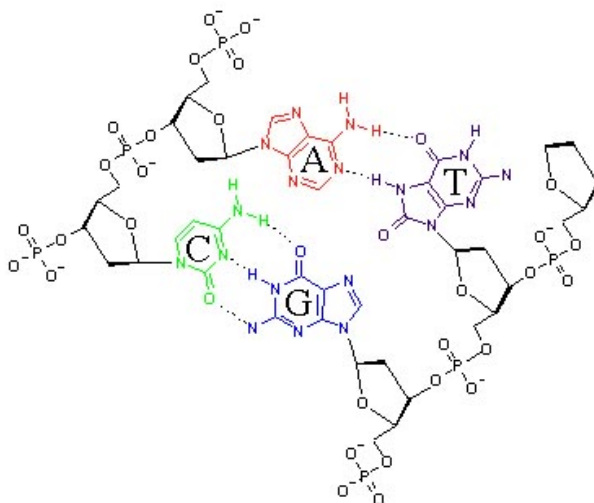
Este tipo de estrutura da molécula sugere um modo óbvio para a duplicação, ou replicação do DNA, já que cada base específica de imediato sua base complementar. O código genético, contendo todas as informações hereditárias sobre o ser vivo, está na sequência de nucleotídeos.

As ligações glicosídicas entre as desoxirriboses e as bases nitrogenadas não estão diretamente opostas na dupla-hélice, formando duas cavidades desiguais, as chamadas cavidade maior e cavidade menor (ou fenda maior e fenda menor). A Fig. 3.4 mostra ambas as cavidades.

### 3.1.2 Desnaturação e renaturação

Os termos desnaturação e renaturação são sinônimos de fusão (*melting*) e reanelamento, respectivamente. A desnaturação ocorre com o rompimento das pontes de hidrogênio entre as bases, e conseqüente separação das duas fitas. O processo inverso ocorre na renaturação.

---

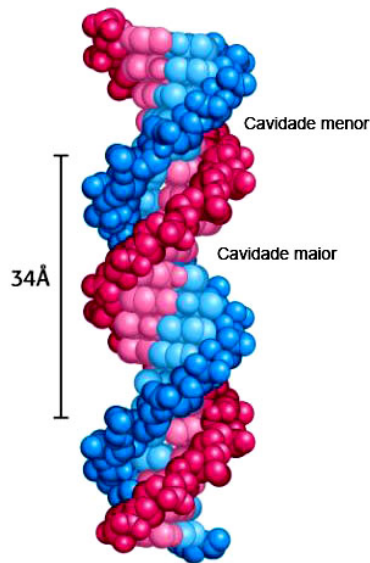


**Figura 3.3:** Desenho esquemático mostrando os quatro tipos de nucleotídeos e a ligação por pontes de hidrogênio entre as bases.

Estes dois processos são fundamentais na replicação da molécula de DNA. Durante este processo, a dupla fita se abre como um zíper, e cada fita individual funciona como molde para gerar dois novos DNAs idênticos, já que o pareamento de bases é restrito. Dessa forma, cada molécula “filha” de DNA possui uma fita da molécula original e uma outra fita nova, sintetizada a partir de nucleotídeos presentes na célula. Por causa dessa característica, a replicação do DNA é dita semiconservativa. Este processo de replicação é catalizado e controlado por enzimas, como as DNA-polimerases.

Em solução, a desnaturação da molécula de DNA pode ocorrer por motivos como aumento da temperatura, titulação com álcalis e por agentes desnaturantes como a formamida e o dimetil sulfóxido (DMSO). Alguns autores sugerem ainda que, em certas condições, o estiramento da molécula de DNA na presença de algumas substâncias intercalantes pode causar desnaturação da molécula [38]. Discutiremos esta situação nos dois capítulos seguintes.

Na prática, uma das maneiras de medir o “grau de desnaturação” da molécula de DNA é estudar a variação da absorbância da luz ultravioleta pela molécula. As bases nitrogenadas são as principais responsáveis por esta absorção, que é máxima a 260 nm. Quando as fitas da dupla hélice estão completamente separadas, a absorção é cerca de 37% maior que na



**Figura 3.4:** Desenho esquemático mostrando as duas cavidades encontradas na molécula de DNA: cavidade maior (ou fenda maior) e cavidade menor (ou fenda menor).

situação normal, onde as fitas estão completamente unidas [34]. Desta forma, estudando a absorvância da molécula neste comprimento de onda, podemos saber o quanto esta está desnaturada. Ao aumentarmos gradativamente a temperatura de uma solução contendo DNA, por exemplo, a absorvância aumenta até as fitas se separarem completamente, permanecendo constante a partir daí. A temperatura na qual 50% do DNA se encontra desnaturado é chamada de  $T_m$  (do inglês *melting*). Pelo fato da ligação CG ser mais forte que a AT (a primeira possui três pontes de hidrogênio, contra apenas duas da segunda), são necessárias temperaturas mais elevadas para romper um par CG. Dessa forma, a temperatura  $T_m$  de um DNA específico depende da porcentagem entre pares CG e AT. Experimentalmente, é possível determinar  $T_m$  conhecendo-se a porcentagem de pares CG do DNA ou vice-versa, através da fórmula empírica [34]

$$T_m(^{\circ}C) = 69,3 + 0,41 \times (\%CG), \quad (3.1)$$

onde  $(\%CG)$  é a porcentagem de pares CG da molécula.

---

### 3.1.3 Tipos de DNA

Existem três formas diferentes de encontrar a molécula de DNA em condições fisiológicas. A forma mais comum é a B, que também é a forma usada nos nossos experimentos. A forma A é menos hidratada e mais compacta, e a forma Z tem um arcabouço em ziguezague, e possui uma hélice com giro para a esquerda, enquanto as formas A e B têm hélices com giro para a direita. A definição da forma da molécula depende basicamente da composição de bases e do meio onde esta se encontra.

Na forma B, o DNA possui um comprimento médio de 0,34 nm por par de base, e uma densidade linear média de massa de 1900 Da/nm. O diâmetro médio da hélice é de 2,37 nm, e a molécula possui 10,4 pares de base por volta da hélice. O ângulo médio de rotação entre dois nucleotídeos adjacentes é de 34,6°.

Apenas para efeito de comparação, a forma A é mais curta e grossa em relação à forma B, possuindo em média 0,26 nm por par de base e um diâmetro médio de 2,55 nm. A forma Z, ao contrário, é mais longa e fina em relação à forma B, possuindo em média 0,456 nm por par de base e um diâmetro médio de 1,84 nm.

Observe que nos referimos a todos estes parâmetros como valores médios, obtidos com uma estatística sobre um número muito grande de moléculas diferentes. Entretanto, devido à variabilidade genética, é possível encontrar moléculas com parâmetros ligeiramente diferentes.

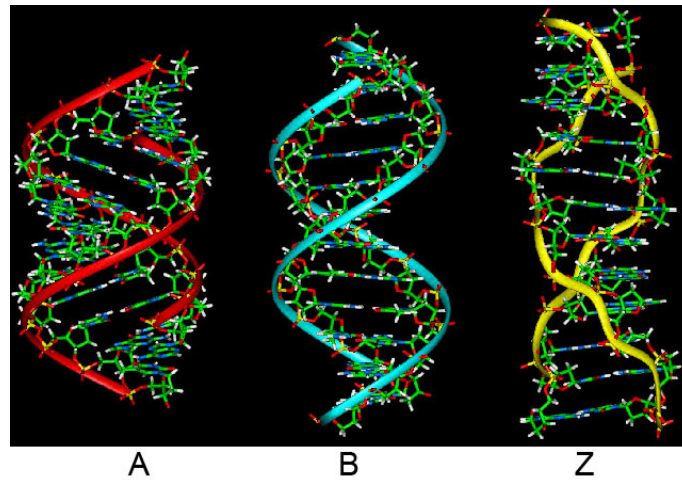
A Fig. 3.5 é uma comparação esquemática entre as três formas diferentes A, B e Z.

Existem ainda na natureza alguns organismos mais primitivos que possuem DNA de fita simples, como é o caso de alguns vírus animais, vegetais e bacteriófagos (fagos). Como exemplos, citamos dois fagos que infectam a *E. Coli*, o M13 e o  $\phi$ X174.

### 3.1.4 Formas alternativas: superestiramento e super-torção

O DNA pode apresentar-se em formas diferentes quando submetido a uma grande força de estiramento ou a um torque de rotação em torno do seu eixo.

---



**Figura 3.5:** Comparação entre as três formas de DNA: A, B e Z.

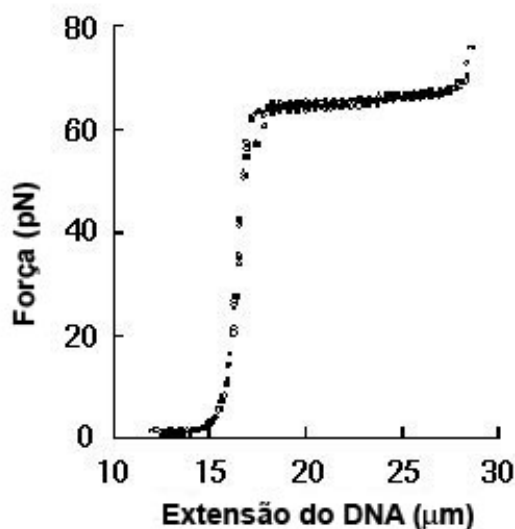
Estas situações levam, respectivamente, às chamadas formas superestirada (*overstretched*) e supertorcida (*overwound*).

### Superestiramento

A Fig. 3.6 mostra o típico comportamento da força em função da extensão para um experimento de estiramento da molécula, semelhante aos realizados neste trabalho, que apresentaremos nos Capítulos 4 e 5. Observe que, quando a força atinge a faixa dos 60 pN, a curva apresenta um platô, e a força permanece praticamente constante durante um certo intervalo onde a molécula continua sendo esticada. Este comportamento indica que, neste intervalo, a molécula pode ser alongada com uma força adicional muito pequena.

Nesta região está ocorrendo uma transição estrutural na molécula de DNA, conhecida como transição de superestiramento (*overstretch transition*). A transição dura até o DNA atingir aproximadamente 1,7 vezes o seu comprimento de contorno na forma B [39]. Alguns autores atribuem como causa desta transição a fusão do DNA, ou seja, a separação das fitas para aquela região de forças [40,41]. O valor exato da força onde a transição tem início depende do pH da solução. Para  $\text{pH} = 6,0$ , a transição começa em 67 pN e para  $\text{pH} = 3,1$ , começa em 47 pN [39], por exemplo.

Nos nossos experimentos de estiramento do DNA não observamos este



**Figura 3.6:** Curva de força em função da extensão para uma molécula de DNA. Observe que no regime de grandes forças ( $\sim 60$  pN) a curva apresenta um platô, onde ocorre a transição de superestiramento [39].

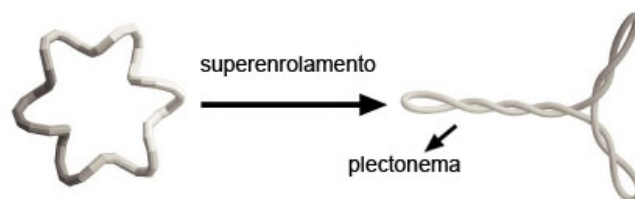
tipo de transição, pois nossa pinça óptica não tem potência suficiente para exercer forças da magnitude de 60 pN. De fato, as forças máximas que atingimos nos nossos experimentos estão na faixa dos 5 pN, conforme discutiremos nos Capítulos 4 e 5.

### Supertorção

Até aqui consideramos o DNA como uma molécula linear, que pode facilmente ser colocada na forma retilínea caso as duas pontas sejam suficientemente afastadas. Em alguns casos, entretanto, as duas pontas da molécula podem estar ligadas covalentemente, formando uma estrutura circular. Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA que estão separadas do DNA cromossômico. Geralmente ocorrem em bactérias e por vezes também em organismos eucarióticos. Outros exemplos onde ocorrem DNA na forma circular são nas mitocôndrias, nos cloroplastos e em alguns tipos de vírus e bacteriófagos.

Em DNAs circulares é relativamente fácil gerar um tipo de conformação tridimensional chamada de supertorcida, superenrolada ou super-hélice. Esta

estrutura é definida como o enrolamento da dupla hélice sobre si mesma. Embora seja mais comum em DNAs circulares, as super-hélices também podem ser geradas em DNAs lineares desde que as duas extremidades da molécula estejam fixas. Atualmente sabemos que este tipo de estrutura é extremamente importante para a funcionalidade da molécula. De fato, o grau de superenrolamento é importante em processos como a replicação e a transcrição. Na célula, o grau de superenrolamento é controlado e modificado por enzimas conhecidas como topoisomerases. O superenrolamento pode ser basicamente de dois tipos: plectonêmico e toroidal. O primeiro tipo, mais comum, ocorre quando o DNA encontra-se em solução. O segundo tipo ocorre com o DNA enrolado em proteínas, como as histonas, para formar os nucleossomos, assumindo assim a forma de um toróide. A Fig. 3.7 mostra as estruturas conhecidas como plectonemas, geradas devido ao superenrolamento numa molécula de DNA circular.



**Figura 3.7:** Formação das estruturas conhecidas como plectonemas numa molécula de DNA circular, devido ao superenrolamento.

Estruturas de super-hélices são bastante estudadas no ramo da Matemática conhecido como topologia. A maneira mais simples de gerar este tipo de estrutura é girar a molécula de DNA em torno do seu próprio eixo. A rotação pode ocorrer no sentido do giro da dupla hélice (superenrolamento positivo) ou no sentido contrário (superenrolamento negativo), sendo o segundo tipo mais comum na natureza.

Strick e colaboradores [42,43] realizaram experimentos onde geraram estruturas de super-hélice usando uma pinça magnética para manipular e girar moléculas de DNA em torno de seu próprio eixo. Para tanto, utilizaram microesferas feitas de material magnético no lugar do poliestireno. Estudos semelhantes também foram realizados recentemente por Gore *et al.* [44]. Uma pinça óptica convencional, do tipo usada em nosso trabalho, não pode ser

usada para estes tipos de estudo, onde estamos interessados em aplicar torques e girar a molécula de DNA em torno de seu próprio eixo. Isto acontece porque as microesferas empregadas possuem perfeita simetria e portanto não podem ser giradas por feixes de laser comuns, sem momento angular. Por outro lado, não podemos empregar neste caso microesferas de material magnético, pois uma pinça óptica não será capaz de aprisioná-la, uma vez que materiais magnéticos tendem a absorver grande parte da potência da luz incidente. Um trabalho interessante e recente, onde esta dificuldade foi contornada, foi realizado por Oroszi *et al.* em 2006 [45]. Neste trabalho, os autores usam uma prensa para transformar as microesferas de poliestireno em discos, quebrando assim a perfeita simetria do objeto. Com este procedimento, os autores mostraram que é possível girar estes discos, e conseqüentemente a molécula de DNA ligada a eles, simplesmente girando o plano de polarização do laser da pinça óptica.

### 3.1.5 O DNA do fago $\lambda$

Em nossos experimentos, o DNA usado é o do fago  $\lambda$ , um vírus que infecta a bactéria *E. coli*. Este DNA é ideal para os experimentos de estiramento, devido ao seu tamanho. Uma molécula de  $\lambda$ -DNA possui aproximadamente 48.500 pares de base, o que resulta em um comprimento de contorno médio de 16,5  $\mu\text{m}$ . Para efeito de comparação, o DNA humano possui da ordem de 3,4 bilhões de pares de base, com um comprimento de contorno médio da ordem de 1 m.

Conforme discutiremos no Capítulo 4, é relativamente fácil encontrar moléculas de  $\lambda$ -DNA com valores do comprimento de contorno até 30% maiores ou menores que este valor médio. Acreditamos que uma das causas disto seja a variabilidade genética dos organismos, conforme comentado na seção 3.1.3. Este fato será discutido em maiores detalhes no Capítulo 4.

## 3.2 Polímeros

Polímeros são cadeias formadas por várias unidades ligadas uma à outra, os chamados monômeros. Os monômeros não precisam ser necessariamente

---

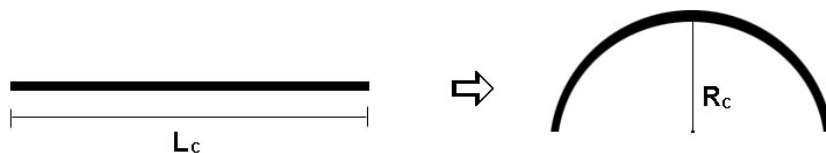
idênticos. De fato, este é o caso do DNA, onde os monômeros são os nucleotídeos.

Além do DNA, a célula possui inúmeros exemplos de polímeros (às vezes chamados de filamentos celulares). O RNA é o primeiro exemplo óbvio. A molécula de RNA, ao contrário do DNA, possui apenas uma fita simples, e a pentose é a ribose, ao invés da desoxirribose. Além disso, o RNA não possui a base nitrogenada timina (T), sendo esta substituída pela uracila (U). Outros exemplos são os diversos tipos de proteínas, cujos monômeros são os aminoácidos. Como exemplos de proteínas importantes, citamos a actina e a tubulina. A actina é uma proteína presente em muitos tipos diferentes de células e que desempenha diversos papéis no citoesqueleto. Os microtúbulos são estruturas formadas pela proteína tubulina e desempenham um papel na comunicação e no processamento de informação celular.

Estes polímeros biológicos podem sofrer uma grande variedade de deformações, dependendo na natureza da força aplicada sobre os mesmos e das propriedades mecânicas do filamento. Forças aplicadas ao longo do eixo causam estiramento ou compressão, enquanto forças aplicadas numa direção transversa ao eixo causam torção ou rotação dos polímeros. Em qualquer um dos casos, é necessário um gasto de energia para deformar o filamento de sua forma original.

### 3.2.1 Varetas flexíveis

Para começar a análise matemática, consideramos primeiramente o exemplo mais simples, uma vareta flexível. A Fig. 3.8 mostra uma vareta rígida de comprimento  $L_c$  que é deformada na forma de um semicírculo de raio  $R_c$ .



**Figura 3.8:** Vareta rígida de comprimento  $L_c$  que é deformada para um semicírculo de raio  $R_c$ .

O cálculo da energia requerida para realizar esta deformação é um problema clássico dos livros de mecânica do contínuo [46] e é dada por

$$E_{curvatura} = \frac{\kappa_f L_c}{2R_c^2}, \quad (3.2)$$

onde  $\kappa_f$  é a rigidez flexural da vareta, dada por

$$\kappa_f = YI, \quad (3.3)$$

onde  $Y$  é o módulo de Young da vareta e  $I$  é o momento geométrico de segunda ordem da seção reta, a ser definido.

O módulo de Young tem unidade de densidade de energia. Tipicamente, para metais, seu valor varia de  $10^9$  J/m<sup>3</sup> a  $10^{11}$  J/m<sup>3</sup>. O momento geométrico de segunda ordem da seção reta é definido de maneira similar ao momento de inércia convencional da massa. Em relação ao eixo  $x$ , por exemplo, temos

$$I_x = \int y^2 dA, \quad (3.4)$$

sendo o plano  $xy$  perpendicular ao eixo da vareta.

### 3.2.2 O modelo de Kratky-Porod

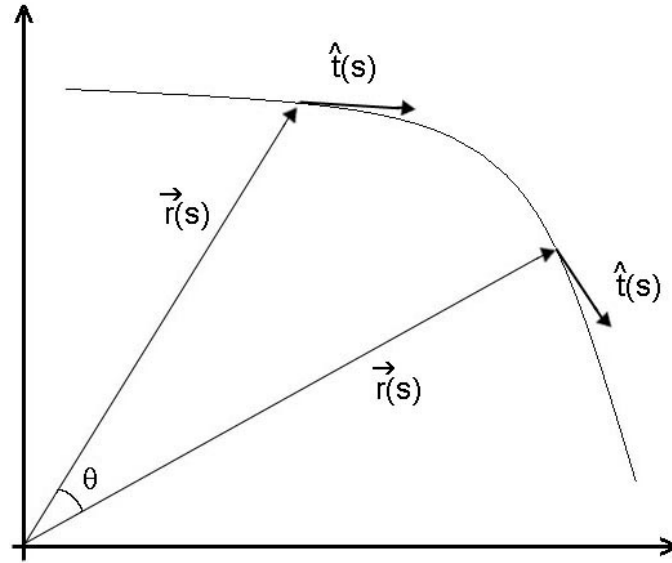
A expressão anterior para a energia de curvatura da vareta pode facilmente ser generalizada, resultando no que conhecemos como modelo de Kratky-Porod para a energia de curvatura de um polímero. Para tanto, observe que  $1/R_c$  é a curvatura do semicírculo. Logo, para uma curva arbitrária qualquer, podemos substituir  $1/R_c^2$  por  $C^2$ , onde  $C$  é a sua curvatura.

Para escrevermos a curvatura de uma maneira arbitrária e conveniente para nossos propósitos, observe a Fig. 3.9. Nesta figura,  $\vec{r}(s)$  é o vetor posição que localiza um ponto arbitrário da curva. Este vetor está parametrizado pelo comprimento de arco  $s$  ao longo da curva.  $\hat{t}(s)$  é o vetor unitário tangente à curva em cada ponto, também parametrizado por  $s$ .

Do cálculo elementar, temos a relação

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}, \quad (3.5)$$

e a curvatura é dada por



**Figura 3.9:** Desenho esquemático mostrando a variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária. Estes vetores estão parametrizados pelo comprimento  $s$  ao longo da curva.

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|. \quad (3.6)$$

Para generalizar a expressão da energia de curvatura para uma vareta rígida, devemos então fazer esta substituição para uma curvatura arbitrária  $C$ . Além disso, observe que a energia é proporcional ao comprimento  $L_c$  da vareta rígida. Para sermos mais gerais, devemos então integrar a energia por unidade de comprimento ao longo do comprimento de um polímero de forma arbitrária. O resultado dessa consideração nos dá de imediato a expressão

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds, \quad (3.7)$$

que é o modelo de Kratky-Porod.

### 3.2.3 Elasticidade entrópica e comprimento de persistência

Considere novamente a Fig. 3.9. Seja  $\hat{t}(0)$  o valor de  $\hat{t}(s)$  na origem do

polímero (ou seja, em  $s = 0$ ). Seja  $\theta$  o ângulo entre  $\hat{t}(0)$  e  $\hat{t}(s)$  para uma posição arbitrária  $s$  qualquer. Para um círculo de raio  $R_c$ ,  $\theta$  é o ângulo subtendido pelo arco de comprimento  $s$ . Assim:

$$E_{arc} = \frac{\kappa_f s}{2R_c^2} = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}. \quad (3.8)$$

Para ter idéia da magnitude das flutuações de curvatura, podemos avaliar o valor de  $\langle \theta^2 \rangle$ . Este valor quadrático médio é definido como

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E) d\Omega}{\int \exp(-\beta E) d\Omega}, \quad (3.9)$$

onde  $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$  é o elemento de ângulo sólido da integração e  $\beta = 1/k_B T$ , sendo  $k_B$  a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura absoluta.

Assumiremos agora pequenas curvaturas. Podemos então fazer as aproximações  $\sin \theta \sim \theta$  e  $E \sim E_{arc}$ . Uma mudança simples de variáveis (chame  $x^2 = \beta E_{arc}$ ) transforma o numerador e denominador da Eq. 3.9 em integrais conhecidas do tipo gaussiana (como as flutuações são pequenas, podemos realizar a integração de zero a infinito com erro pequeno). O resultado final é

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta \kappa_f}. \quad (3.10)$$

O comprimento de persistência  $A$  do polímero pode ser definido como

$$A = \beta \kappa_f. \quad (3.11)$$

Observe que  $A$  é diretamente proporcional à rigidez flexural  $\kappa_f$  e inversamente proporcional à temperatura  $T$ . Este parâmetro nos dá uma idéia imediata da rigidez da molécula. Quanto maior o valor de  $A$ , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras. Por outro lado, quando menor o valor de  $A$ , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras.

O valor médio do produto escalar  $\hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s)$  dá a interpretação geométrica do comprimento de persistência. Note que

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle, \quad (3.12)$$

que tem valor máximo unitário.

---

Para pequenas flutuações,  $\theta$  é pequeno, e podemos fazer a aproximação  $\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2$ . Logo, obtemos

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A}, \quad (3.13)$$

numa aproximação em primeira ordem.

Observe que o último termo da Eq. 3.13 é a expansão em primeira ordem da função exponencial. De fato, se considerarmos os outros termos da expansão, chegamos a conclusão de que

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{A}\right). \quad (3.14)$$

Observe então que o comprimento de persistência é o comprimento de correlação da cadeia polimérica, ou seja, é uma medida do alcance de perturbações locais na conformação da molécula.

Apenas a título de exemplificação, calculemos o valor da expressão  $\langle [\hat{t}(s) - \hat{t}(0)]^2 \rangle$ . Em primeira ordem, teremos

$$\langle [\hat{t}(s) - \hat{t}(0)]^2 \rangle \cong 1 - 2 \langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle + 1 = \frac{2s}{A}. \quad (3.15)$$

Numa vareta completamente rígida, os vetores  $\hat{t}(s)$  e  $\hat{t}(0)$  são paralelos, portanto  $\hat{t}(s) - \hat{t}(0) = 0$ . De acordo com a expressão anterior, devemos ter então neste caso  $A \rightarrow \infty$ ! Em outras palavras, o comprimento de persistência mede a distância ao longo do polímero sobre o qual a orientação da curva fica não-correlacionada.

Por fim, usando a Eq. 3.14, podemos estimar a distância quadrática média  $\langle r_{ee}^2 \rangle$  entre as extremidades do polímero em função do comprimento de persistência  $A$  e do comprimento de contorno  $L$ , nos limites onde ele é muito rígido ou muito flexível. Este cálculo está detalhado no Apêndice C. Os resultados são:

(a) Para  $L \gg A$  (limite flexível)

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL, \quad (3.16)$$

(b) Para  $L \ll A$  (limite rígido)

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong L^2. \quad (3.17)$$

Vale a pena enfatizar que, no limite rígido, a distância quadrática média entre as pontas do polímero é o comprimento de contorno ao quadrado, como era de se esperar, já que nesse limite o polímero é uma vareta rígida.

Quando um polímero flexível é colocado numa solução aquosa, ele se dobra até atingir um estado de equilíbrio termodinâmico com o meio. Isto ocorre devido aos choques com as moléculas constituintes do meio aquoso\*. Isto pode fazer com que as suas duas extremidades se aproximem ou se afastem, dependendo da forma inicial em que se encontrava. Esta distância dependerá, entre outras coisas, da rigidez do polímero e da temperatura em que o sistema se encontra.

Usualmente, se a temperatura é muito baixa ( $T \rightarrow 0$ ), a curvatura tende a zero e o raio do polímero tende para infinito. Em outras palavras, para baixas temperaturas, o polímero parece uma vareta retilínea, com comprimento de persistência tendendo ao infinito (ver Eq. 3.11)<sup>†</sup>. Nesta situação, o número de configurações possíveis é mínimo, e a entropia do sistema também é um mínimo. Quando a temperatura aumenta, o polímero tende a possuir cada vez mais dobras, aumentando o número de configurações possíveis e aumentando conseqüentemente a entropia, já que esta é proporcional ao logaritmo do número de configurações possíveis para o sistema,

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (3.18)$$

onde  $\Omega$  é o número de configurações possíveis para o polímero.

A Fig. 3.10 esclarece esta situação. Imagine que um polímero é colocado em um meio aquoso na forma mostrada na situação (a). Nesta situação, o polímero está praticamente retilíneo e o número de configurações possíveis é mínimo, minimizando a entropia. Na situação (b), o choque com as moléculas do meio aquoso aproximam as extremidades do polímero, aumentando o número de dobras e de configurações possíveis, aumentando assim a entropia. Finalmente, a situação (c) representa o equilíbrio termodinâmico com o meio,

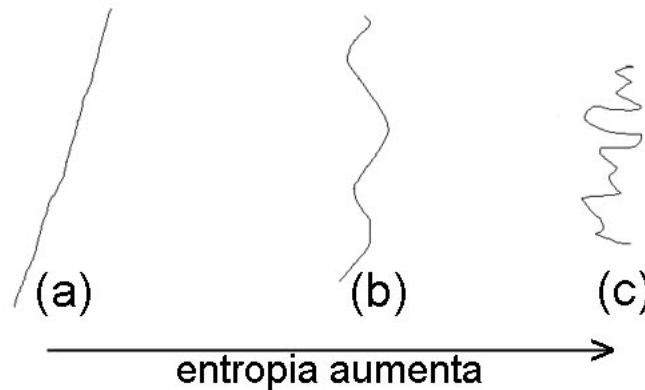
---

\*Numa análise mais rigorosa, devemos também considerar as interações do polímero com as moléculas do meio, bem como as interações entre partes diferentes deste polímero. Estas interações entretanto não são significativas no nosso caso experimental.

<sup>†</sup>Basicamente, o polímero terá curvatura pequena se sua rigidez flexural  $\kappa_f$  for grande ou se a temperatura ambiente for pequena.

---

onde os choques com as moléculas constituintes do meio não são mais capazes de mudar a distância média entre as extremidades do polímero. Nesta situação o número de configurações possíveis e a entropia são máximos.



**Figura 3.10:** Desenho esquemático mostrando o aumento do número de configurações possíveis para um polímero, com o consequente aumento da entropia do sistema.

A probabilidade de encontrar o polímero com uma dada energia  $E$  é proporcional ao fator  $\exp(-\beta E)$ . Logo, para uma temperatura fixa, quanto maior a energia, menor a probabilidade de se encontrar o polímero nesta configuração. Isto significa que quanto maior a energia necessária para distorcer o polímero, menor será a probabilidade de encontrá-lo nesta configuração.

Quando o polímero atinge o equilíbrio termodinâmico com o meio, se quisermos estirá-lo, devemos aplicar uma força às extremidades no sentido de afastá-las uma da outra. Neste trabalho, as forças usadas estão na escala de poucos picoNewton ( $\lesssim 5$  pN). Estas forças estão no regime chamado entrópico, isto é, no regime onde as forças são capazes apenas de esticar o polímero, mas não de deformá-lo a ponto por exemplo, de danificar ligações químicas. Trabalhar neste regime é fundamental para nossos objetivos, já que não queremos danificar a molécula de DNA, mas apenas estudar sua elasticidade. Neste regime, a elasticidade do polímero é chamada de elasticidade entrópica.

Uma discussão detalhada sobre a termodinâmica de sistemas “pequenos”, onde as flutuações de energia são de extrema importância, pode ser encontrada nas refs. [47,48]. Nesta classe que chamamos de sistemas “pequenos”,

encontra-se grande parte dos sistemas biológicos de interesse, incluindo a molécula de DNA.

### 3.2.4 O modelo Worm-Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme)

O modelo Worm-Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme) [21] descreve de maneira satisfatória o comportamento elástico do DNA tanto para estiramentos pequenos (próximos à conformação de equilíbrio) quanto longos (próximos à conformação retilínea). Faremos o tratamento desses dois limites separadamente, encontrando a seguir a expressão geral válida para qualquer estiramento.

#### Estiramentos próximos da conformação de equilíbrio

Para estiramentos pequenos, a força também é pequena, e pode ser aproximada pela Lei de Hooke,

$$F = -kz, \quad (3.19)$$

onde  $z$  é o estiramento da molécula.

A extensão  $z$  do polímero pode ser escrita como a distância quadrática média entre as duas extremidades do DNA,

$$z = \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle}. \quad (3.20)$$

Mas, para o limite flexível ( $L \gg A$ ), podemos usar a Eq. 3.16 para escrever

$$z \cong \sqrt{2AL}. \quad (3.21)$$

Usando o princípio da equipartição da energia para a energia potencial elástica do DNA, teremos

$$\frac{1}{2}kz^2 = \frac{3}{2}k_B T, \quad (3.22)$$

e usando a Eq. 3.21, achamos a constante de mola  $k$ ,

$$k = \frac{3k_B T}{2AL}. \quad (3.23)$$

Finalmente, podemos escrever a força aproximada neste regime como

$$F = -\frac{3k_B T}{2A} \frac{z}{L}. \quad (3.24)$$

### Estiramentos longe da conformação de equilíbrio

Neste caso, a molécula de DNA está muito esticada. Podemos escrever a energia aproximada como a energia do modelo de Kratky-Porod, excluindo o trabalho necessário, exercido pela força, para manter a molécula nesta configuração, isto é,

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz, \quad (3.25)$$

onde a força  $F$  aqui é um multiplicador de Lagrange para manter  $z$  constante.

Neste caso temos  $z \sim L$ , e o vetor  $\hat{t}$  é praticamente paralelo à curva  $\vec{r}(s)$ , que descreve a conformação da molécula. Dessa forma, a componente  $t_z$  é muito maior que  $t_x$  e  $t_y$ .

Temos:

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k} \quad (3.26)$$

e

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1, \quad (3.27)$$

onde  $|t_\perp|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2$ .

Como  $|t_z| = \sqrt{1 - |t_\perp|^2}$  e  $|t_\perp|^2 \ll 1$ , podemos fazer a aproximação em primeira ordem

$$|t_z| \cong 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2}. \quad (3.28)$$

Devido à mesma aproximação, podemos ainda escrever  $z = \int_0^L |t_z| ds$ . Substituindo estas relações na Eq. 3.25, obtemos

---

$$\begin{aligned}
E_{WLC} &= \frac{1}{2}k_B T A \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left( 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds = \\
&= \frac{1}{2}k_B T \int_0^L \left[ A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL, \quad (3.29)
\end{aligned}$$

onde usamos a aproximação  $\partial t / \partial s \cong \partial t_\perp / \partial s$  pelo fato de  $t_z$  ser praticamente constante ao longo da molécula.

A energia pode ser decomposta em modos normais usando a transformada de Fourier

$$\tilde{t}_\perp(q) = \int ds \exp(iqs) t_\perp(s), \quad (3.30)$$

obtendo o resultado final

$$E_{WLC} = \frac{1}{2}k_B T \int \frac{dq}{2\pi} \left[ Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp(q)|^2 - FL. \quad (3.31)$$

A partir desta expressão da energia, Eq. 3.31, podemos calcular o valor quadrático médio de  $|t_\perp|$ . Este cálculo está feito em detalhes no Apêndice D, e o resultado obtido é

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}, \quad (3.32)$$

Usando agora a aproximação  $z/L \cong |t_z| \cong 1 - |t_\perp|^2/2$ , teremos

$$\frac{z}{L} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}, \quad (3.33)$$

de onde, isolando  $F$ , obtemos finalmente a expressão para a força no regime de longos estiramentos,

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right]. \quad (3.34)$$

### Estiramentos arbitrários

Se a Eq. 3.34 fosse válida também para pequenos estiramentos ( $z \sim 0$ ), deveríamos recuperar a Eq. 3.24 fazendo a sua expansão em primeira ordem. No entanto, a expansão em primeira ordem da Eq. 3.34 nos dá

$$F^{(1)} \cong \frac{k_B T}{A} \left( \frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right), \quad (3.35)$$

que é diferente da Eq. 3.24.

Para contornar este problema, Marko e Siggia [21] fizeram uma interpolação, acrescentando dois termos de correção na expressão para grandes estiramentos que são insignificantes quando  $z \sim L$ , mas dão a forma correta da força para pequenos estiramentos quando fazemos a expansão em primeira ordem. A correção consiste em somar o termo  $z/L - 1/4$  dentro do colchete da Eq. 3.34. Com isso, obtemos finalmente a famosa expressão de Marko e Siggia [21] para a força entrópica da molécula de DNA em função da extensão,

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (3.36)$$

Vale a pena ressaltar que, apesar de ser válida para estiramentos arbitrários, a Eq. 3.36 ainda é uma expressão aproximada. A expressão diverge em  $z = L$ , portanto, seu limite de validade vai até cerca de  $z \sim 0,99L$  [21]. Além disso, a Eq. 3.36 é válida apenas no chamado regime entrópico, isto é, quando as forças aplicadas não são suficientemente grandes para deformar as ligações químicas entre os nucleotídeos.

Após a publicação desta expressão por Marko e Siggia em 1995, alguns autores realizaram tentativas de generalizar a Eq. 3.36, aumentando seu limite de validade.

Em 1999, por exemplo, Bouchiat e colaboradores [49] acrescentaram um somatório de seis termos dentro do colchete da Eq. 3.36, onde cada termo é uma constante multiplicada pela razão  $(z/L)^i$ , com  $i = 2, 3 \dots 7$ . Para determinar estes termos, os autores compararam os resultados da Eq. 3.36 com uma solução numérica exata do modelo WLC. Em nosso trabalho, realizamos alguns testes ajustando nossos dados experimentais com esta expressão

generalizada. Entretanto, a diferença entre os valores obtidos para os comprimentos de persistência e de contorno previstos por esta expressão e pela Eq. 3.36 estão dentro da barra de erro experimental.

Uma outra generalização, mais importante, foi feita em 1996 por Smith e colaboradores [50]. Neste trabalho, os autores acrescentam um termo na Eq. 3.36 que leva em conta o módulo elástico da molécula de DNA. Esta expressão pode então ser usada quando o comprimento das ligações químicas variarem, no chamado regime entálpico. De fato, segundo os autores, esta expressão generalizada pode ser usada para o regime de grandes forças aplicadas, da ordem de 50 pN, ao contrário da Eq. 3.36, que permanece válida apenas para forças de alguns poucos picoNewtons ( $\lesssim 10$  pN).

---

## Capítulo 4

# Uso da pinça óptica no estudo da interação da molécula de DNA com fármacos intercalantes

Neste capítulo apresentamos um estudo da interação da molécula de DNA com dois fármacos intercalantes: a daunomicina, utilizada em tratamento de câncer (quimioterapia) e o brometo de etídio (EtBr), um fármaco muito utilizado para visualizar a molécula de DNA em experimentos de fluorescência. Estamos interessados nas modificações das propriedades mecânicas da molécula de DNA ao interagir com estes fármacos. Para realizar as medidas utilizamos duas ferramentas experimentais: a pinça óptica e o espalhamento de luz. Ambas as técnicas foram descritas em detalhes no Capítulo 2. Uma recente revisão sobre interações DNA-fármacos, estudadas com o uso da pinça óptica, pode ser encontrada na ref. [51]. Outra revisão recente sobre experimentos em biofísica com moléculas únicas, incluindo DNA e RNA, pode ser encontrada na ref. [52].

Uma das motivações iniciais para este trabalho foi o fato de encontrarmos na literatura diversos resultados contraditórios, especialmente a respeito dos valores medidos para o comprimento de persistência dos complexos DNA-daunomicina e DNA-EtBr. Como exemplos, Smith *et al.* [16] em 1992 reportaram que o EtBr não modifica o comprimento de persistência do DNA, mas aumenta seu comprimento de contorno de  $\sim 40\%$ . Em 2003, Tessmer

---

*et al.* [53] publicaram que o mesmo EtBr causa um “grande aumento” do comprimento de contorno e um decréscimo do comprimento de persistência para uma concentração de 1  $\mu\text{M}$  do fármaco. Para concentrações menores que esta, os mesmos autores reportam um aumento tanto do comprimento de contorno quanto do comprimento de persistência. Em 2005, Sischka *et al.* [54] publicaram os valores de 28,1 nm e 20,5 nm para os comprimentos de persistência dos complexos DNA-daunomicina e DNA-EtBr, respectivamente, ambos abaixo do valor bem conhecido para o DNA puro, livre de fármacos, que é de 50 nm. Estes autores usaram em seu trabalho uma concentração de 1  $\mu\text{M}$  para ambos os fármacos e uma concentração de DNA de 15 pM. Recentemente, em 2007, Vladescu *et al.* [55] reportaram o valor de 5,7 nm para o comprimento de persistência de complexos DNA-EtBr altamente saturados. A fim de esclarecer estas discrepâncias, realizamos neste trabalho medidas sistemáticas dos comprimentos de persistência e contorno em função da concentração de fármaco, para uma concentração fixa de DNA, tanto para complexos DNA-daunomicina quanto para complexos DNA-EtBr. Os resultados deste trabalho foram recentemente publicados [56,57].

## 4.1 Fármacos

### 4.1.1 Daunomicina

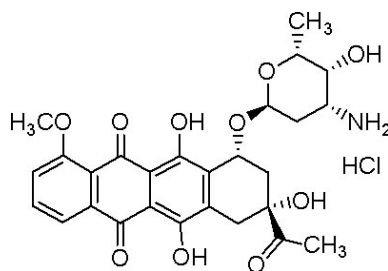
A daunomicina (também conhecida como daunorrubicina, devido à cor vermelha) é um antibiótico antraciclínico\* usado há muitos anos no tratamento de vários tipos de câncer (quimioterapia) [58], como por exemplo, no tratamento de leucemia.

O fármaco utilizado nesse trabalho foi adquirido juntamente à Sigma-Aldrich (*Cat. # D8809; Daunorubicin hydrochloride*). A Fig. 4.1 mostra a molécula de daunomicina.

---

\*Os compostos antraciclínicos são uma classe de substâncias químicas usadas em tratamento de vários tipos de câncer (quimioterapia). Como exemplos de tipos de câncer tratados com estas substâncias, citamos a leucemia, o linfoma, e também o câncer de útero, de ovário e de pulmão.

---



**Figura 4.1:** Molécula de daunomicina,  $C_{27}H_{29}NO_{10} \cdot HCl$ , massa molecular  $M = 563,98$  g/mol.

A ação do fármaco é intercalar entre os pares de base da molécula de DNA, impedindo assim a sua replicação e a conseqüente duplicação da célula. Esta propriedade é explorada no tratamento quimioterápico, evitando assim a duplicação celular indesejada e conseqüente crescimento de tumores. Um fato importante é que a daunomicina, assim como outros antibióticos semelhantes, apresenta uma preferência em interagir com células cancerosas [59]. Esta propriedade é fundamental para a eficácia do tratamento. Experimentos mostram que o fármaco intercala preferencialmente nos sítios C-G [58], ou seja, DNAs ricos em citosina e guanina tendem a possuir mais daunomicina intercalada.

#### 4.1.2 Brometo de Etídio (EtBr)

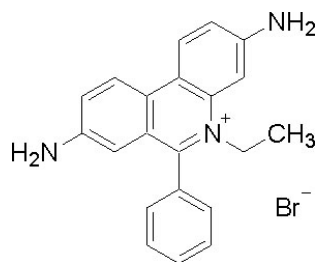
O brometo de etídio (EtBr) é um corante fluorescente, usado principalmente como marcador não-radioativo para identificar e visualizar o DNA em eletroforeses e outros métodos de separação de ácidos nucleicos. É também utilizado em alguns fins medicinais, como por exemplo, para estudar a reação do sistema nervoso central frente a múltiplos episódios de desmielinização\* tóxica [20].

O fármaco utilizado neste trabalho é o *3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide* (Sigma-Aldrich, *Cat. # E8751*), gentilmente fornecido pelo Dr. Antero Silva, do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) de Belo Horizonte. A Fig. 4.2 mostra a molécula de EtBr.

---

\*Desmielinização é o termo usado para descrever a perda de mielina, uma substância isolante presente nos axônios dos neurônios.

---



**Figura 4.2:** Molécula de EtBr,  $C_{21}H_{20}BrN_3$ , massa molecular  $M = 394,31$  g/mol.

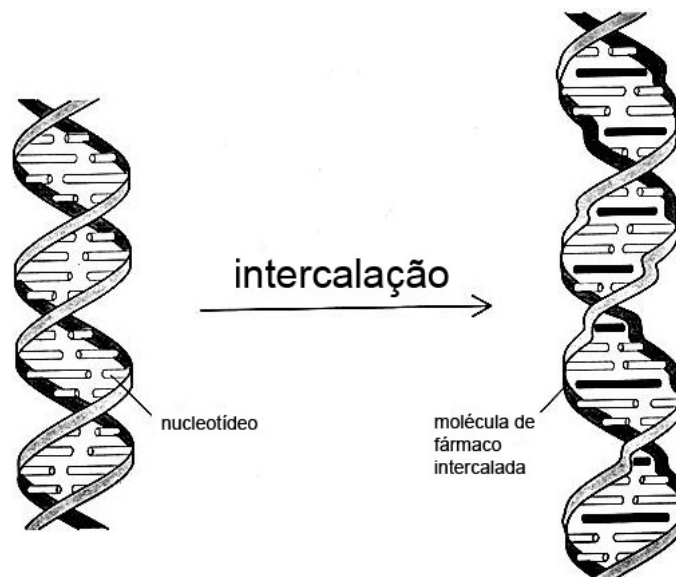
## 4.2 Características gerais da intercalação da molécula de DNA por um fármaco

Descreveremos nesta seção as principais características da interação DNA-fármaco conhecida como intercalação. A intercalação é apenas uma das diferentes maneiras que um fármaco pode interagir com a molécula de DNA. No caso da daunomicina e do brometo de etídio, este é o tipo de interação mais comum [54,58,60,61].

Outros tipos de interações DNA-fármaco possíveis são: (a) ligação com a fenda maior do DNA (fármaco  $\alpha$ -Helical) [54]; (b) ligação com a fenda menor do DNA (fármaco Distamicina-A) [54] e (c) ligação covalente com as bases (fármaco Psoralen quando iluminado com luz ultravioleta) [62–64].

A intercalação é caracterizada pelo “empilhamento” não-covalente das moléculas do fármaco entre pares de base adjacentes, via interação com os orbitais- $\pi$  destes pares de base, às vezes combinada com pontes de hidrogênio [54]. Entre as principais modificações causadas na molécula de DNA, está um aumento do comprimento de contorno (a fim de acomodar as moléculas do fármaco), que frequentemente é acompanhado por um giro da molécula de DNA em torno do próprio eixo, no sentido de desfazer a hélice [54]. No caso da daunomicina, em média, cada molécula do fármaco intercalada aumenta o comprimento de contorno do DNA de 0,31 nm e desenrola a hélice de 15,4° [60]. Já o brometo de etídio, em média, aumenta o comprimento de contorno do DNA de 0,34 nm e desenrola a hélice de 26° por molécula intercalada [54,60]. A Fig. 4.3 é um esquema mostrando a intercalação de moléculas de um fármaco qualquer no DNA. Observe o aumento no comprimento de

contorno da molécula de DNA.



**Figura 4.3:** Esquema mostrando a intercalação de moléculas de um fármaco qualquer entre as bases do DNA. Observe que, para acomodar as moléculas intercaladas, o DNA sofre um aumento no comprimento de contorno.

#### 4.2.1 O Modelo de Exclusão de Vizinhos\*

Em muitos trabalhos, os dados de interação para fármacos intercalantes são analisados usando o Modelo de Exclusão de Vizinhos [58,65]. A idéia física por trás deste modelo é a seguinte: ao colocarmos o DNA com o fármaco em solução, o número de moléculas intercaladas inicialmente aumenta de forma linear com a concentração de fármaco, pois a quantidade de sítios livres (pares de bases disponíveis para a intercalação) é grande. Entretanto, a medida que o complexo se aproxima da saturação, a taxa de intercalação diminui até o complexo atingir a saturação completa, ou seja, até que todas as intercalações possíveis ocorram.

---

\*O modelo possui este nome devido ao fato de levar em conta a exclusão de sítios livres nas proximidades de um sítio intercalado, quando consideramos a intercalação sucessiva de moléculas de fármaco ao longo da molécula de DNA. Maiores detalhes podem ser encontrados no Apêndice E.

---

A forma fechada deste modelo, de McGhee e von Hippel [65], que está demonstrada no Apêndice E, é dada pela expressão

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1}, \quad (4.1)$$

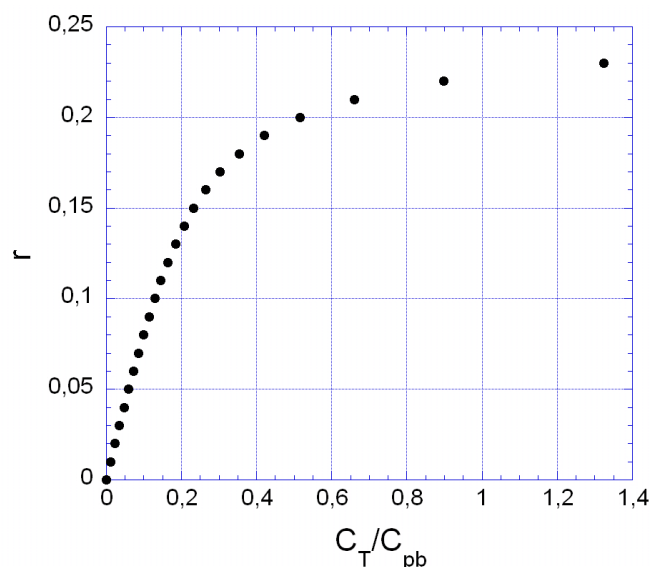
onde  $r$  é a razão entre a concentração de fármaco ligado ( $C_b$ , do inglês “bounded”) pela concentração de pares de base do DNA ( $C_{pb}$ );  $C_f$  (do inglês “free”) é a concentração de fármaco não ligado (em solução),  $K_i$  é a constante química da ligação e  $n$  é o parâmetro de exclusão (número de pares de base que uma molécula de fármaco intercalada ocupa até que outra molécula possa intercalar).

As concentrações do fármaco livre ( $C_f$ ) e ligada ( $C_b$ ) são facilmente relacionadas com a concentração total colocada em solução ( $C_T$ ), que é o parâmetro medido em nossos experimentos, pela expressão

$$C_T = C_f + C_b. \quad (4.2)$$

A título de ilustração, a Fig. 4.4 mostra o comportamento da Eq. 4.1, onde o eixo- $x$  do gráfico é a concentração total  $C_T$  de fármaco na solução, dividida pela concentração de pares de bases do DNA ( $C_{pb}$ ), e o eixo- $y$  é o parâmetro  $r$ . Observe que, inicialmente,  $r$  cresce linearmente com a concentração total de fármaco, mas sua taxa de crescimento diminui a medida que o complexo se aproxima da saturação. Este gráfico foi obtido usando-se os valores de  $K_i$  e  $n$  reportados na literatura para a daunomicina, que relataremos no próximo parágrafo. Uma discussão mais detalhada sobre o modelo de exclusão de vizinhos e a dedução da Eq. 4.1 podem ser encontradas no Apêndice E.

Os dados reportados na literatura para a daunomicina são  $K_i = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  e  $n = 3,5 \pm 0,5$  [58]. Para o brometo de etídio, temos  $K_i = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  e  $n = 2,01$  [66,67]. A constante química  $K_i$  depende fortemente da concentração de cloreto de sódio da solução. Ambos os dados reportados acima são referentes a uma concentração de  $[\text{NaCl}] = 140 \text{ mM}$  na amostra, que foi a concentração usada em todos os nossos experimentos.



**Figura 4.4:** Comportamento gráfico da Eq. 4.1. Inicialmente,  $r$  cresce linearmente com a concentração total de fármaco, mas esta taxa de crescimento diminui a medida que o complexo se aproxima da saturação. O gráfico foi obtido com os parâmetros da daunomicina,  $K_i = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  e  $n = 3,5 \pm 0,5$  [58].

### 4.3 Preparação das amostras

Nesse trabalho, as amostras consistem numa solução aquosa de PBS (Phosphate Buffer Saline) com  $[\text{NaCl}] = 140 \text{ mM}$ , contendo as moléculas de DNA ligadas a microesferas de poliestireno de  $2,8 \mu\text{m}$  de diâmetro, que são usadas como ferramenta para manipular o DNA com a pinça óptica. Através de um protocolo de solução desenvolvido por Shivashankar *et al.* [68], conseguimos prender uma ponta da molécula de DNA na lamínula do porta-amostras e a outra ponta numa microesfera de poliestireno. Estas ligações são controladas pela concentração iônica e pelo pH da solução [68]. A pinça óptica é então usada para capturar a esfera de poliestireno, e assim conseguimos facilmente manipular e esticar a molécula de DNA.

A seguir descrevemos em detalhes o procedimento usado na preparação das amostras.

### 4.3.1 Construção do porta-amostras

Nossos porta-amostras consistem em lamínulas de vidro de espessura aproximada 0,15 mm (Corning) com um *O-ring* de borracha de diâmetro 0,7 cm grudado em sua superfície. Para colar o anel na superfície da lamínula, usamos parafina previamente derretida em um aquecedor. A solução de trabalho é colocada no interior do *O-ring*, que é então tampado com uma outra lamínula de vidro cortada.

### 4.3.2 Preparação da solução DNA-microesferas

1) Em um microtubo limpo (M1), colocamos 1,5 mL de PBS pH 5,5. Em outro microtubo igual (M2), colocamos 136  $\mu\text{L}$  também de PBS pH 5,5.

2) No tubo M1, colocamos 1  $\mu\text{L}$  da solução estoque de microesferas de poliestireno com 2,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Polysciences, Cat. # 17134-15), agitando para homogeneizar.

3) Pegamos então 180  $\mu\text{L}$  da solução do tubo M1, colocando esta quantidade no tubo M2 e homogeneizando novamente.

4) Descongelamos a solução estoque de  $\lambda$ -DNA (Promega Corp., Cat. # D1501,  $C = 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) em um banho térmico a  $55^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Pegamos 5  $\mu\text{L}$  desta solução estoque, acrescentando no tubo M2.

5) Deixamos esta solução do tubo M2 descansar por 20 minutos, colocando-a a seguir no porta-amostras.

6) Tampamos o porta-amostras com outra lamínula de vidro cortada e aguardamos cerca de 12 horas para realizar as medidas com a amostra. Este tempo é necessário para que o DNA grude as pontas nas microesferas e na lamínula de vidro, por adsorção.

A concentração de DNA obtida ao final deste procedimento, para todas as amostras, é  $C_{DNA} = 6,81 \mu\text{g}/\text{mL}$ , que corresponde a uma concentração de pares de base de  $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ .

### 4.3.3 Adição do fármaco na solução

A adição do fármaco é feita na amostra cerca de 1 a 2 horas antes de realizarmos as medidas. Para tanto, preparamos previamente uma solução

---

do fármaco em PBS pH 7,4 e  $[\text{NaCl}] = 140 \text{ mM}$  com a concentração de fármaco desejada.

A seguir, tiramos cuidadosamente a tampa do porta amostras e, com o auxílio de uma pipeta de precisão, vamos retirando todo o PBS pH 5,5 e substituindo-o pela solução de PBS pH 7,4 com o fármaco. Este procedimento deve ser realizado muito lentamente e cuidadosamente, a fim de evitar que as moléculas de DNA sejam arrancadas da lamínula. Ao final do processo, temos uma solução de DNA com microesferas de poliestireno em PBS pH 7,4 com o fármaco na concentração desejada. A escolha do pH 7,4 para a solução de trabalho é porque este é o pH intracelular, onde o DNA se encontra *in vivo*.

Poderíamos então perguntar o porquê de se preparar a solução de trabalho inicialmente com o PBS pH 5,5. Segundo as refs. [68,69], este é o pH ideal onde o DNA gruda por adsorção apenas pelas extremidades, mas não pelo meio. Assim, para nossos propósitos, é conveniente preparar a solução de DNA inicialmente com o pH 5,5 e, após este estar grudado na microesfera e na lamínula, trocar para o pH 7,4 para simular melhor as condições onde este se encontra na célula.

A Tabela 4.1 mostra a composição química dos dois tipos de PBS usados na preparação da amostra.

PBS	pH 5.5	pH 7.4
$\text{NaCl}$	140 mM	140 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,5 mM	2,0 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1,5 mM	8,0 mM

**Tabela 4.1:** Composição química dos dois tipos de PBS usados na preparação das amostras de DNA.

## 4.4 Procedimento experimental

Nesta seção descrevemos em detalhes o procedimento experimental usado para realizar as medidas e construir a curva de força  $\times$  extensão para a molécula de DNA.

#### 4.4.1 Busca de um bom conjunto DNA-microesfera para realizar as medidas

Após colocar a amostra no microscópio, devemos procurar um bom conjunto DNA-microesfera para realizar as medidas. A Fig. 4.5a representa as diversas situações possíveis encontradas na amostra: microesferas grudadas na lâmina, microesferas grudadas em DNAs soltos em solução, DNAs grudados na lâmina mas sem microesferas, DNAs soltos em solução e etc. Devemos procurar um conjunto onde uma das pontas do DNA esteja grudada na lâmina e a outra ponta numa microesfera. Como não visualizamos o DNA com o microscópio óptico, esta procura é indireta. O procedimento usado é o seguinte:

1) Procuramos uma esfera de poliestireno que não esteja grudada na lâmina e a prendemos com a pinça óptica.

2) Movimentando a lamínula com os deslocadores do microscópio, observamos se a esfera escapa da pinça e volta à sua posição inicial quando deslocamos suficientemente a lamínula.

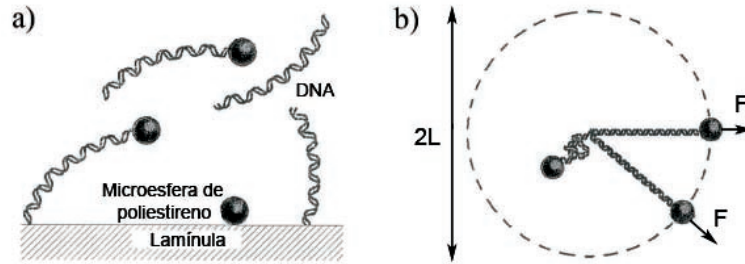
3) Caso isto aconteça, significa que existe uma molécula de DNA prendendo a esfera na lamínula, situação que desejamos.

4) Para verificar se existe somente uma molécula de DNA prendendo a esfera, deslocamos esta em diferentes direções, observando se acontece o mesmo do item (2). Devemos observar o perfil circular do deslocamento da esfera, isto é, o deslocamento máximo da molécula antes da esfera soltar da pinça em relação à posição de equilíbrio deve ser o mesmo para qualquer direção (ver Fig. 4.5b). Este procedimento não garante a existência de um único DNA ligando a microesfera à lamínula, mas é um forte indício de que isto seja verdade.

#### 4.4.2 Medida do perfil de retroespalhamento das microesferas

Esta medida é feita de maneira idêntica à descrita na seção 2.2.3 e serve para caracterizar a pinça óptica e o feixe espalhado pela microesfera (laser He-

---



**Figura 4.5:** (a) Diversas configurações possíveis encontradas na amostra. (b) Método usado para identificar um bom conjunto DNA-microesfera. Observe o perfil circular: o deslocamento máximo deve ser o mesmo em todas as direções. Os tamanhos da esfera de poliestireno e do DNA estão fora de escala para melhor entendimento da figura.

Ne). Neste caso, no entanto, fazemos o ajuste da curva por uma gaussiana\*, com a finalidade de extrair os parâmetros característicos do feixe espalhado.

Conforme discutido no Capítulo 2, medimos a intensidade retroespalhada pela microesfera em função do tempo. Primeiramente, transformamos o eixo dos tempos em posição. Para isso, filmamos com a câmera CCD o movimento da microesfera enquanto movemos a pinça óptica em relação ao feixe de He-Ne. Dessa forma, determinamos a posição inicial e final da microesfera, e como temos do gráfico o intervalo de tempo total deste movimento, achamos a velocidade de movimento desta. Com esta velocidade, convertamos facilmente o eixo dos tempos em posição.

A seguir, fazemos o ajuste do gráfico com uma função gaussiana usando para isso o programa *Kaleida Graph*. A Fig. 4.6 mostra um típico ajuste obtido com este procedimento. A forma da gaussiana usada é

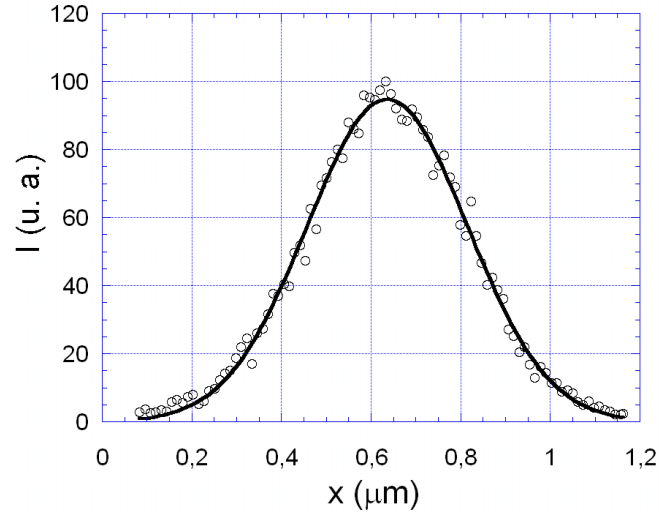
$$I = I_0 \exp \left[ \frac{-(x - \bar{x})^2}{2\sigma^2} \right], \quad (4.3)$$

e do ajuste determinamos o valor médio  $\bar{x}$ , o desvio padrão  $\sigma$  e a intensi-

---

\*Na realidade, o perfil de retroespalhamento não precisa ser necessariamente gaussiano. Conforme comentamos no Capítulo 2, este perfil é apenas uma calibração, que no caso das medidas com DNA é útil para relacionarmos a posição  $x$  da microesfera com a intensidade retroespalhada por esta em cada ponto. Em praticamente todas as nossas medidas, entretanto, procuramos alinhar o laser de He-Ne o detector de fótons para obter um perfil de retroespalhamento gaussiano, pois este pode ser ajustado com grande facilidade.

dade máxima  $I_0$ . Estes parâmetros serão importantes na análise do perfil de estiramento, que discutiremos a seguir.



**Figura 4.6:** Perfil típico de retroespalhamento mostrando a intensidade (em unidades arbitrárias) como função da posição da microesfera. Ajustando esta curva com Eq. 4.3, determinamos os parâmetros  $I_0$ ,  $\bar{x}$  e  $\sigma$ .

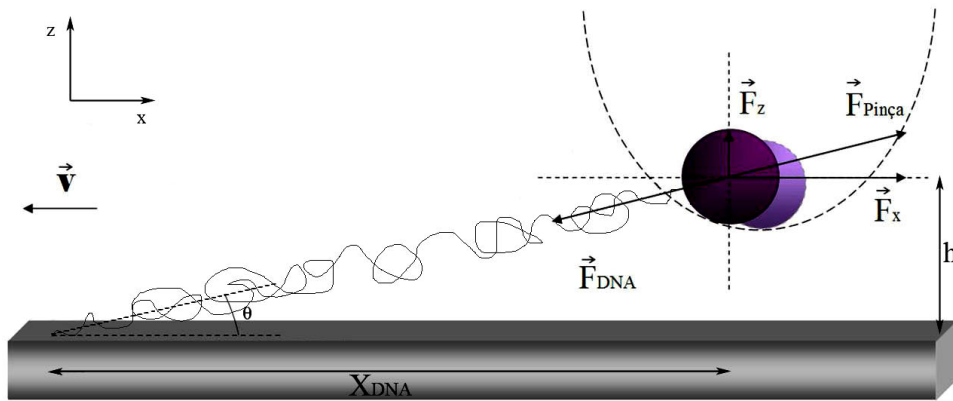
#### 4.4.3 Medida da constante de força da pinça óptica

Outro parâmetro que precisamos medir é a constante de força da pinça óptica. O procedimento usado é o mesmo descrito nas seções 2.3.4 e 2.3.6. Uma observação importante é que, em todas as medidas com DNA, não variamos a altura da microesfera de poliestireno em relação à lamínula. O valor da constante de força da pinça óptica será utilizado posteriormente na análise do perfil de estiramento da molécula de DNA.

#### 4.4.4 Medida do perfil de estiramento da molécula de DNA

O perfil de estiramento nada mais é do que uma medida da intensidade retroespalhada pela microesfera enquanto esticamos a molécula de DNA com uma velocidade controlada. Para tanto movimentamos o estágio do microscópio, e conseqüentemente a lamínula, com velocidade constante. A Fig. 4.7

mostra a geometria do experimento. A altura  $h$  da microesfera é mantida fixa\* em  $3,5 \mu\text{m}$  enquanto deslocamos o estágio do microscópio com velocidade constante ( $v = 0,058 \mu\text{m/s}$ ), usando para isto o deslocador piezo, que possui precisão nanométrica. A força que o DNA exerce sobre a microesfera é em módulo igual a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma, pois o experimento é realizado no regime quase-estático.



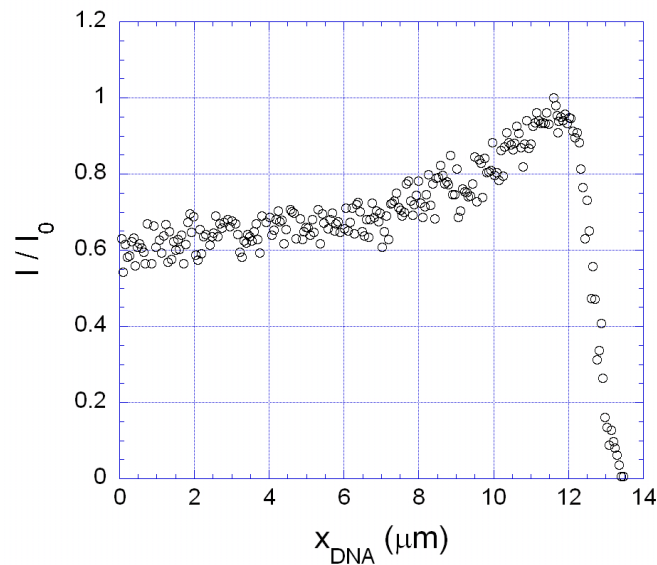
**Figura 4.7:** Geometria do experimento de estiramento da molécula de DNA. A altura  $h$  da microesfera é mantida fixa em  $3,5 \mu\text{m}$  enquanto deslocamos o estágio do microscópio com velocidade constante ( $v = 0,058 \mu\text{m/s}$ ). A força que o DNA exerce sobre a microesfera é em módulo igual a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma, pois o experimento é realizado no regime quase-estático.

Em todos os experimentos, a velocidade usada foi de  $0,058 \mu\text{m/s}$ . Esta velocidade é baixa o suficiente para garantir que a microesfera passa por estados de equilíbrio e para garantir que a força de Stokes sobre a microesfera é desprezível. Como a microesfera está presa na pinça óptica, uma das ex-

---

\*A altura é medida antes de iniciarmos o movimento da lamínula. Para o nosso experimento, o ângulo  $\theta$  da Fig. 4.7 é pequeno, e portanto a componente- $z$  da força que o DNA exerce sobre a microesfera é pequena se comparada à componente- $x$ . Desta forma, a altura da microesfera não varia significativamente durante a medida do perfil de estiramento. Isto é comprovado experimentalmente observando que a imagem da microesfera no monitor não sofre variações devido a mudanças em  $h$ .

tremidades do DNA fica fixa, enquanto a outra, ligada à lamínula, é puxada com velocidade constante. Dessa forma, a molécula de DNA é esticada até que a microesfera escape do poço de potencial da pinça óptica. Coletando a intensidade retroespalhada pela mesma durante este procedimento em função do tempo, obtemos o perfil de estiramento. O eixo dos tempos é facilmente convertido no estiramento da molécula de DNA ao longo da direção paralela à lamínula ( $x_{DNA}$ ) usando a velocidade do motor. A Fig. 4.8 mostra um típico perfil de estiramento obtido com este procedimento.



**Figura 4.8:** Típico perfil de estiramento da molécula de DNA, mostrando a intensidade (normalizada) em função do estiramento  $x_{DNA}$  da molécula.

#### 4.4.5 Determinação da curva de força $\times$ extensão da molécula de DNA

A partir da medida do perfil de estiramento, podemos obter a curva de força  $\times$  extensão para a molécula de DNA. Para tanto, devemos converter a intensidade retroespalhada em força, pois o tempo já foi convertido na extensão da molécula (ao longo do eixo  $x$ ) usando a velocidade do motor, como explicado na seção anterior.

A intensidade retroespalhada pode ser convertida facilmente na força exercida pelo DNA usando as características da pinça óptica, determinadas pelo perfil de retroespalhamento e pela medida da constante de força. Primeiramente, invertamos a Eq. 4.3 para escrever a posição  $x$  em função da intensidade  $I^*$ . Dessa forma, determinamos a posição da microesfera em cada instante no perfil de estiramento. Determinamos então a posição inicial  $x_0$  (correspondente à intensidade inicial no perfil de estiramento), e a variação de posição para cada ponto, dada por

$$\Delta x = x - x_0. \quad (4.4)$$

Finalmente, a força na direção  $x$  é determinada multiplicando-se a variação de posição pela constante de força da pinça óptica,

$$F_x = \kappa \Delta x. \quad (4.5)$$

Note que estamos denotando por  $x$  a posição do centro da microesfera no poço de potencial, e por  $x_{DNA}$  o estiramento da molécula de DNA.

Observe que esta é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada da posição de equilíbrio do poço de potencial. No entanto, conforme discutimos, esta é igual, em módulo, à força exercida pela molécula de DNA para afastar a microesfera da posição de equilíbrio do poço de potencial da pinça, visto que o experimento é realizado em regime quase-estático, com uma velocidade de deslocamento da lamínula muito baixa. Dessa forma, obtemos uma curva que mostra a força em função da extensão para a molécula de DNA. A Fig. 4.9 mostra uma típica curva obtida com este procedimento. Esta curva é ajustada usando-se a expressão de Marko e Siggia [21], e do ajuste determinamos o comprimento de contorno  $L$  e o comprimento de persistência  $A$  da molécula.

Na realidade, como estamos trabalhando experimentalmente na direção  $x$ , é mais conveniente usar a componente  $x$  da Eq. 3.36 para fazer o ajuste. Esta componente é facilmente determinada conhecendo-se a altura fixa da

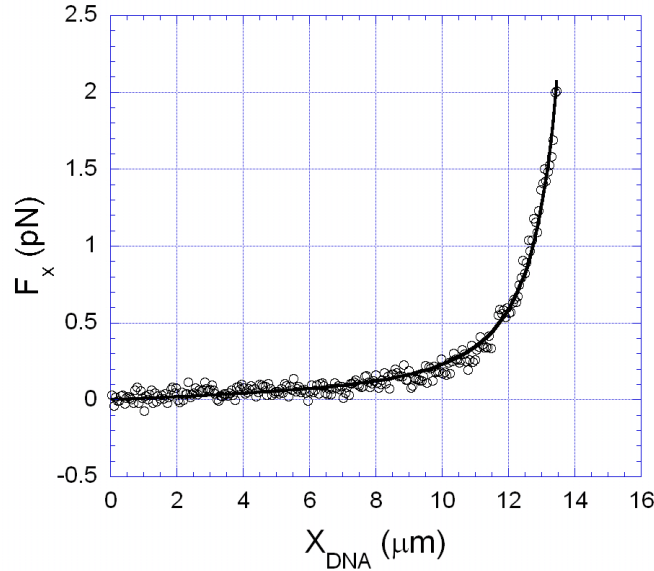
---

\*Esta é uma outra razão para escolhermos um perfil de retroespalhamento gaussiano, visto que este tipo de curva pode ser invertido com facilidade. A função inversa é um logaritmo, que possui variação lenta. Desta forma, o erro estimado neste processo de inversão é muito pequeno, situando-se dentro da barra de erro experimental.

---

microesfera em relação à lamínula, que no nosso caso é  $h = 3,5 \mu\text{m}$ . Na Fig. 4.7, observe que a extensão total do DNA é  $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$  e  $F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z)$ . Fazendo estas considerações na Eq. 3.36, a expressão final da componente  $x$  da força é

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left( 1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}. \quad (4.6)$$



**Figura 4.9:** Típica curva de força (componente  $x$ )  $\times$  extensão da molécula de DNA. Ajustando esta curva com a Eq. 4.6, determinamos o comprimento de contorno  $L$  e o comprimento de persistência  $A$  da molécula. Neste caso particular, obtivemos do ajuste  $L = 15,5 \mu\text{m}$  e  $A = 49,9 \text{ nm}$ .

Para a molécula de  $\lambda$ -DNA pura, na ausência de fármacos, obtemos com este procedimento os valores médios  $L = (16,5 \pm 1) \mu\text{m}$  e  $A = (50 \pm 3) \text{ nm}$ , obtidos através de uma média para cerca de 20 moléculas de DNA diferentes. Estes resultados estão em excelente acordo com dados reportados na literatura [17,27,63,70].

## 4.5 Resultados

A fim de estudar sistematicamente o comportamento do comprimento de persistência e do comprimento de contorno dos complexos DNA-fármaco em função da concentração do fármaco, repetimos todo o procedimento descrito na seção 4.4 usando diversas concentrações diferentes dos fármacos, porém mantendo fixa a concentração de DNA usada ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ).

### 4.5.1 Daunomicina

A Fig. 4.10a mostra o comportamento do comprimento de persistência  $A$  dos complexos DNA-daunomicina em função da concentração total de daunomicina na amostra  $C_D$ . Este comportamento pode ser descrito da seguinte maneira:  $A$  inicialmente cresce até atingir um valor máximo ( $\sim 280 \text{ nm}$ ) para uma concentração crítica  $C_D^c \sim 18,3 \mu\text{M}$ . A partir desta concentração,  $A$  cai abruptamente para cerca de  $75 \text{ nm}$  e permanece praticamente constante a partir daí, mesmo se continuarmos aumentando a concentração do fármaco (pelo menos nesta faixa de concentrações estudada). Os pontos da Fig. 4.10a são obtidos realizando uma média sobre os resultados de vários complexos diferentes. O procedimento detalhado é o seguinte: primeiramente, escolhemos um complexo DNA-fármaco e realizamos quatro experimentos de estiramento neste mesmo complexo. É então feita uma média sobre estes quatro resultados, de onde obtemos os valores de  $A$  e  $L$  para este complexo particular. Este procedimento é repetido para 5 a 7 complexos diferentes, e o resultado final é obtido como a média dos resultados para estes diferentes complexos. Finalmente, a barra de erro é estimada calculando-se o desvio padrão do conjunto de medidas em relação à média para os diferentes complexos.

A Fig. 4.10b mostra o comportamento do comprimento de contorno para os mesmos complexos. O comportamento do comprimento de contorno  $L$  é compatível com um crescimento monotônico, que inicia em  $16,5 \pm 1 \mu\text{m}$  e sobe até atingir o valor de  $21 \pm 1 \mu\text{m}$  na saturação. Este crescimento monotônico do comprimento de contorno está em acordo com o que esperamos para um fármaco intercalante, conforme discutido na seção 4.2. Observe ainda que o comportamento de  $L$  em função da concentração não apresenta nenhuma variação abrupta.

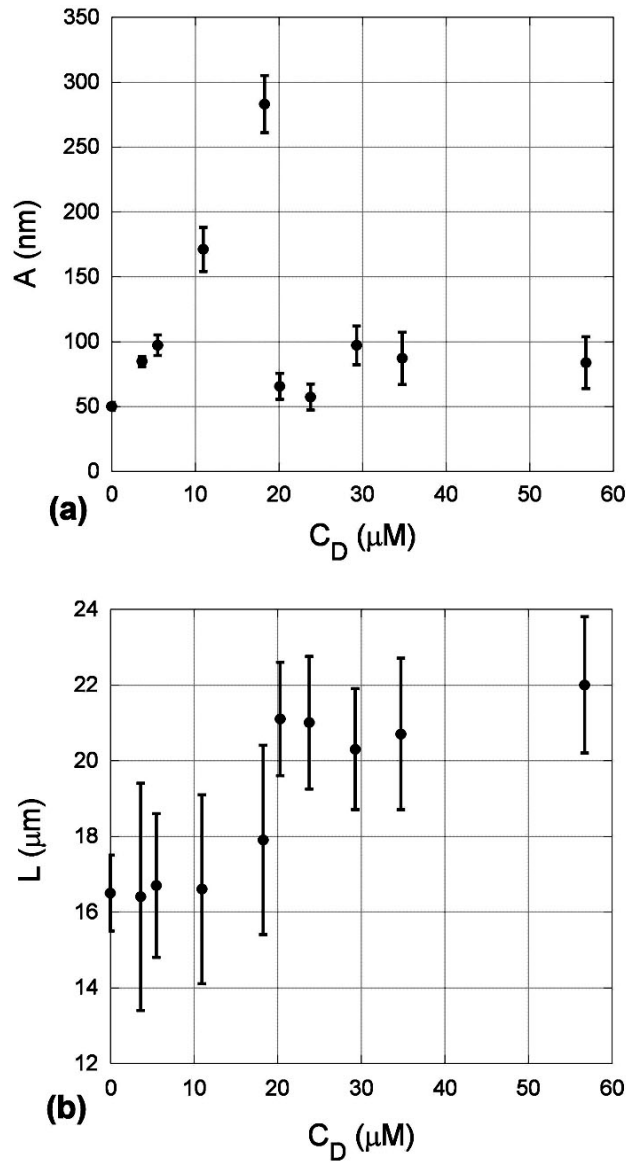
---

Os valores médios para os comprimentos de contorno também são obtidos fazendo-se uma média sobre complexos diferentes, usando o mesmo procedimento já descrito. Observe entretanto que a barra de erro neste caso é relativamente grande. Isto ocorre porque o valor de  $L$  pode variar de uma molécula de DNA para outra, fato que verificamos inclusive em medidas usando DNA puro, livre de fármacos, conforme adiantado nas seções 3.1.3 e 3.1.5. Verificamos que os valores do comprimento de contorno medidos para o  $\lambda$ -DNA puro estão distribuídos em torno do valor médio  $16,5 \mu\text{m}$ . Podemos encontrar com relativa facilidade moléculas até cerca de 30% maiores ou menores que este valor médio. Conforme discutido, acreditamos que isto ocorra devido à variabilidade genética dos organismos. De fato, é razoável supor que podemos ter variações no espaçamento médio entre pares de bases consecutivos da molécula de DNA. Este fato também é reportado na literatura por Mihailovic *et al.* [38].

Para efeito de comparação, podemos determinar o parâmetro de exclusão  $n$  diretamente dos dados experimentais. Note que o valor médio do comprimento de contorno aumenta cerca de 27% na saturação da daunomicina, relativo ao valor do DNA livre de fármacos. Isto significa que o comprimento de contorno do DNA aumentou cerca de  $4,5 \mu\text{m}$ . Sabendo que cada molécula de daunomicina intercalada aumenta o comprimento de contorno do DNA em  $0,31 \text{ nm}$  [60], determinamos o número total de moléculas intercaladas na saturação, que fica em torno de 14500 moléculas. Assim, o parâmetro de exclusão pode ser facilmente determinado dividindo-se o número total de pares de bases do  $\lambda$ -DNA (48500) pelo número de moléculas de daunomicina intercaladas. Obtemos assim  $n = 3,3 \pm 0,5$ , em bom acordo com o valor reportado na literatura (3,5) [58].

Também para efeito de comparação, mostramos na Fig. 4.11 as curvas de força  $\times$  extensão para dois complexos DNA-daunomicina com diferentes concentrações de daunomicina e para o DNA puro, livre de fármacos. Para uma melhor visualização, fizemos uma média sobre as flutuações Brownianas nas duas curvas usando a rotina *smooth* do programa *Kaleida Graph*. As concentrações escolhidas são  $20,1 \mu\text{M}$  (acima da concentração crítica), onde obtemos com o ajuste  $A = 61 \text{ nm}$  neste caso particular e a própria concentração crítica ( $\sim 18,3 \mu\text{M}$ ), onde obtemos neste caso particular  $A = 263 \text{ nm}$ .

---



**Figura 4.10:** (a) Comprimento de persistência  $A$  dos complexos DNA-daunomicina em função da concentração do fármaco  $C_D$  para uma concentração de DNA fixa ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ).  $A$  inicialmente cresce até atingir um valor máximo ( $\sim 280$  nm) para uma concentração crítica  $C_D^c \sim 18,3 \mu\text{M}$ . A partir desta concentração,  $A$  cai abruptamente para cerca de 75 nm e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração. (b) Comprimentos de contorno em função da concentração para os mesmos complexos da parte (a).  $L$  cresce monotonicamente de  $16,5 \pm 1 \mu\text{m}$  até  $21 \pm 1 \mu\text{m}$  na saturação.

A parte (a) da figura mostra as curvas normalizadas pelo comprimento de contorno, enquanto a parte (b) mostra as mesmas curvas não normalizadas. As curvas pontilhadas são os ajustes com o modelo WLC, Eq. 4.6.

### 4.5.2 Brometo de Etídio (EtBr)

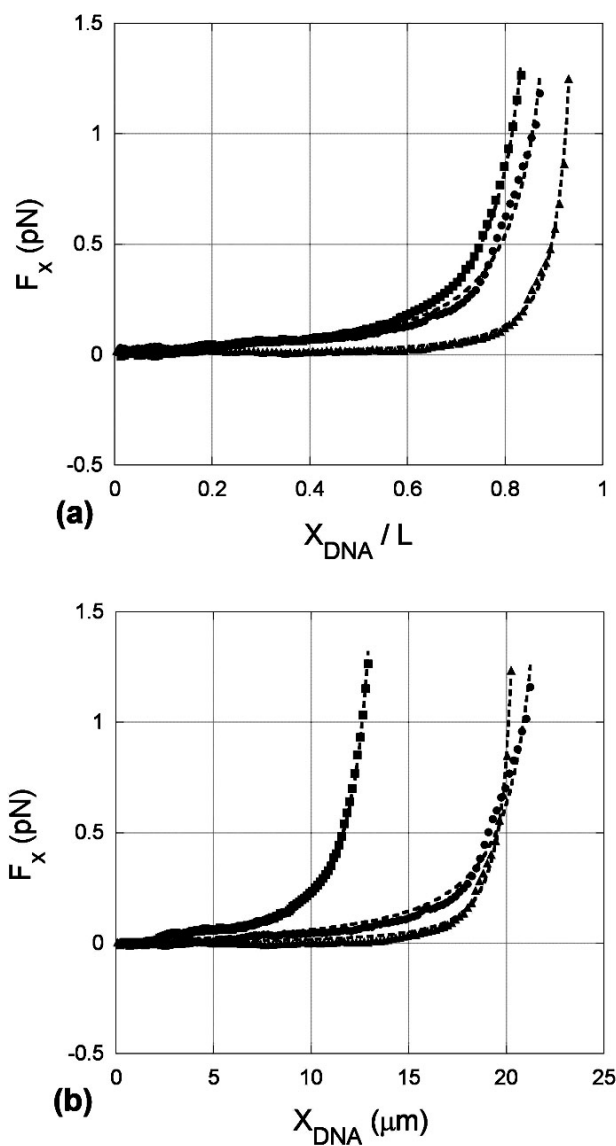
A Fig. 4.12a mostra o comportamento do comprimento de persistência para os complexos DNA-EtBr em função da concentração do fármaco, enquanto a Fig. 4.12b mostra o comportamento do comprimento de contorno destes mesmos complexos. Os valores dos pontos e as barras de erro foram obtidos com o mesmo procedimento descrito na seção 4.5.1. Observe que o comportamento qualitativo é o mesmo. Neste caso, a transição abrupta ocorre numa concentração crítica de  $C_E^c \sim 3,1 \mu\text{M}$ , com um comprimento de persistência máximo  $A \sim 150 \text{ nm}$ . A concentração de DNA usada aqui é a mesma do caso da daunomicina ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ).

O comprimento de contorno  $L$  neste caso cresce monotonicamente de  $16,5 \pm 1 \mu\text{m}$  até  $23 \pm 1 \mu\text{m}$  na saturação. Usando o mesmo procedimento descrito na seção 4.5.1 para estimar o parâmetro  $n$ , e sabendo que cada molécula de EtBr intercalada aumenta o comprimento de contorno de  $0,34 \text{ nm}$  [54], obtemos  $n = 2,5 \pm 0,5$ , em concordância não tão ruim com o valor reportado na literatura, que é  $2,01$  [66].

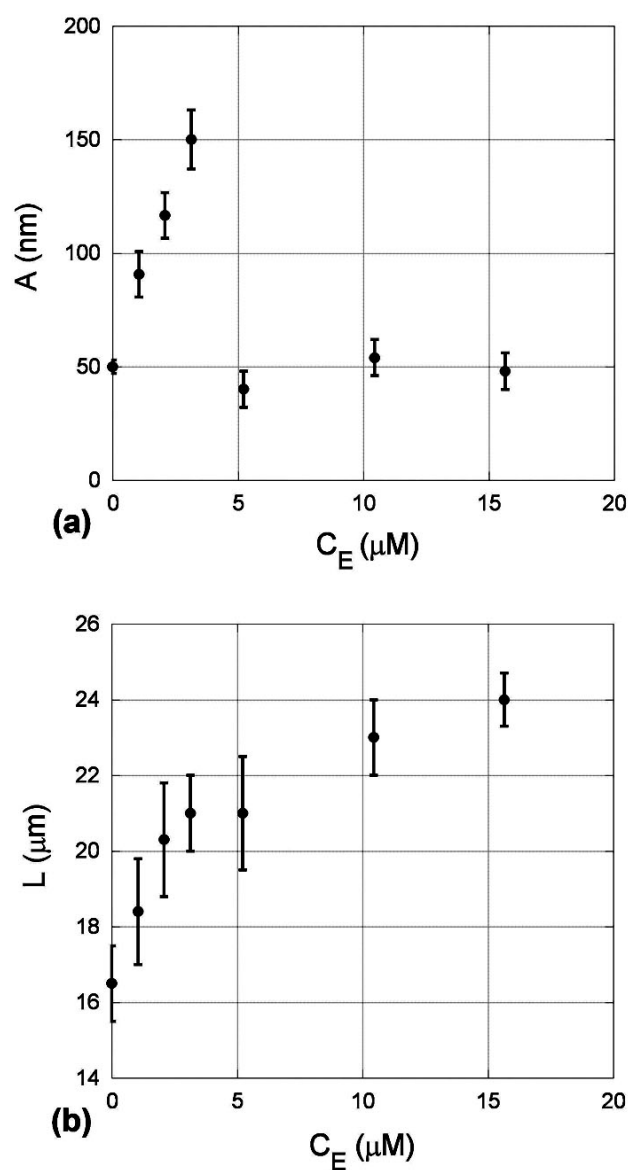
### 4.5.3 Comparações com o modelo de exclusão de vizinhos

Para comparar nossos dados experimentais diretamente com o modelo de exclusão de vizinhos, construímos um gráfico mostrando a variação relativa do comprimento de contorno ( $\Delta L/L_0 \equiv \ell$ ) em função da concentração total de fármaco. Por conveniência, escolhemos o eixo- $y$  para esta concentração e o eixo- $x$  para  $\ell$ . Este gráfico pode ser ajustado pelo modelo de exclusão de vizinhos usando o procedimento descrito a seguir. A Fig. 4.13 mostra o resultado para o EtBr.

A variação relativa do comprimento de contorno ( $\Delta L/L_0 \equiv \ell$ ) pode ser relacionada com o parâmetro  $r = C_b/C_{pb}$  da Eq. 4.1. Para tanto, escrevemos



**Figura 4.11:** (a) Curvas de força  $\times$  extensão normalizadas pelo comprimento de contorno para dois complexos DNA-daunomicina com concentrações diferentes e para o DNA puro. Para uma melhor visualização, fizemos uma média sobre as flutuações Brownianas nas duas curvas. *Círculos*: Complexo DNA-daunomicina com  $C_D = 20,1 \mu\text{M}$  e  $A = 61 \text{ nm}$ ; *Triângulos*: Complexo DNA-daunomicina com  $C_D = 18,3 \mu\text{M}$  e  $A = 263 \text{ nm}$ ; *Quadrados*: DNA puro com  $A = 49,9 \text{ nm}$ . As curvas pontilhadas correspondem aos respectivos ajustes com o modelo WLC. (b) Mesmas curvas, não normalizadas pelo comprimento de contorno.



**Figura 4.12:** (a) Comprimento de persistência  $A$  dos complexos DNA-EtBr em função da concentração do fármaco  $C_E$  para uma concentração de DNA fixa ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ).  $A$  inicialmente cresce até atingir um valor máximo ( $\sim 150$  nm) para uma concentração crítica  $C_E^c \sim 3,1 \mu\text{M}$ . A partir desta concentração,  $A$  cai abruptamente para cerca de 50 nm e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração. (b) Comprimentos de contorno em função da concentração para os mesmos complexos da parte (a).  $L$  cresce monotonicamente de  $16,5 \pm 1 \mu\text{m}$  até  $23 \pm 1 \mu\text{m}$  na saturação.

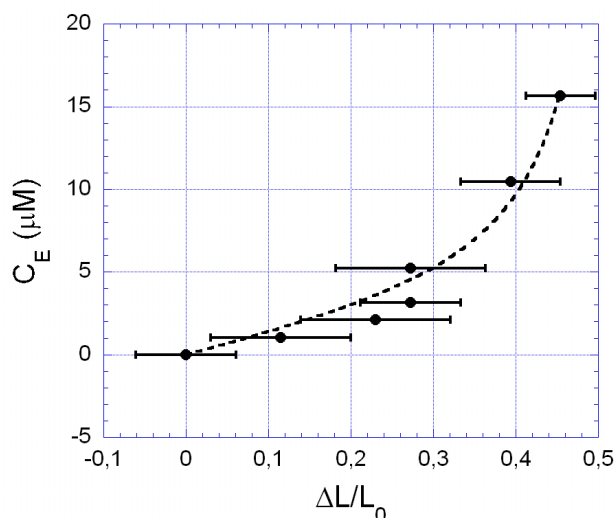
$L_0 = N_{pb}\Delta$ , onde  $N_{pb}$  é o número de pares de base e  $\Delta$  é a distância entre dois pares de base consecutivos. Para o  $\lambda$ -DNA puro, temos  $N_{pb} = 48500$  e  $\Delta = L_0/N_{pb} = 0,34$  nm. Quando  $N_b$  moléculas do fármaco intercalam o  $\lambda$ -DNA, o comprimento de contorno resultante pode ser escrito como  $L = L_0 + N_b\delta$ , onde  $\delta$  é o aumento do comprimento de contorno causado por cada molécula intercalada. Podemos então escrever  $\ell = N_b\delta/N_{pb}\Delta$ . O parâmetro  $r$  pode ser escrito como  $r = C_b/C_{pb} = N_b/N_{pb}$ , usando as concentrações em unidades de  $\mu\text{M}$ . Finalmente, podemos escrever  $\ell = r\delta/\Delta$ . Definindo  $\gamma = \delta/\Delta$ , escrevemos  $r = \ell/\gamma$ . Como já citado anteriormente, sabemos que  $\delta = 0,34$  nm para o EtBr [54] e  $\delta = 0,31$  nm para a daunomicina [60]. Desta forma, teremos  $\gamma = 1,00$  para o EtBr e  $\gamma = 0,91$  para a daunomicina.

Usando as Eqs. 4.1 e 4.2, e  $r = \ell/\gamma$ , é fácil mostrar que

$$C_T = \frac{C_{pb}}{\gamma}\ell + \frac{\ell(\gamma - n\ell + \ell)^{n-1}}{K_i(\gamma - n\ell)^n}. \quad (4.7)$$

Sabendo que  $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$  e  $\gamma = 1$  para o EtBr, ajustamos os dados da Fig. 4.13 usando a Eq. 4.7 com dois parâmetros livres:  $K_i$  e  $n$ . Deste ajuste (linha pontilhada na Fig. 4.13), determinamos a constante  $K_i$  e o parâmetro de exclusão  $n$ . Encontramos os valores  $K_i = (4,5 \pm 1,9) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  e  $n = 1,7 \pm 0,1$  para o EtBr, onde as barras de erro são dadas pelo ajuste. O valor determinado para  $K_i$  não está em acordo com o reportado por Gaugain *et al.* [67], que é  $K_i = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . O valor determinado para  $n$  concorda de maneira razoável com o valor reportado na literatura (2,01) [66], mas a concordância não é boa com o valor estimado anteriormente nesta seção (2,5). Entretanto, observe que a barra de erro dos dados da Fig. 4.13 é muito grande, fato que não nos permite ter uma grande confiança nos valores obtidos do ajuste, especialmente na constante química, onde o ajuste retorna um erro muito grande. Este problema ocorre devido à variabilidade encontrada no comprimento de contorno do  $\lambda$ -DNA, o que já foi discutido na seção 4.5.1.

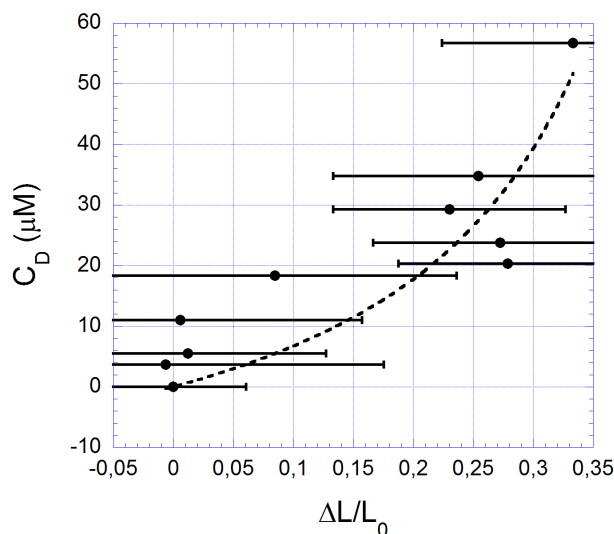
Fazendo o mesmo tipo de análise com os dados da daunomicina, o resultado obtido é pior, devido ao fato das barras de erros de  $L$  serem ainda maiores neste caso. A Fig. 4.14 mostra o resultado deste ajuste, que retorna os valores  $n = 1,7 \pm 0,4$  e  $K_i = (2,4 \pm 1,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , em total discordân-



**Figura 4.13:** Concentração total de EtBr  $C_E$  em função do aumento relativo do comprimento de contorno  $\Delta L/L_0$  para complexos DNA-EtBr. A linha pontilhada corresponde ao ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos (Eq. 4.7).

cia com os valores reportados na literatura ( $K_i = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  e  $n = 3,5 \pm 0,5$  [58]) e com o valor estimado anteriormente para  $n$  (3,3).

Desta análise, podemos afirmar que os ajustes com o modelo de exclusão de vizinhos não fornecem bons resultados no nosso caso experimental. Observe que estes ajustes são bastante afetados pelas barras de erro das Figs. 4.13 e 4.14, o que não nos permite ter uma confiança nos valores retornados por estes ajustes. Para contornar este problema, o experimento deveria ser feito usando-se uma única molécula de DNA ao invés de realizar médias sobre diferentes moléculas. Desta forma, evitaríamos as barras de erro tão grandes em  $L$ . Para realizar este experimento, entretanto, precisaríamos de uma câmara de fluxo para fazer variar a concentração na amostra sem perder a molécula escolhida para a medida. Infelizmente, este experimento ainda não pode ser feito na nossa atual montagem experimental.



**Figura 4.14:** Concentração total de daunomicina  $C_D$  em função do aumento relativo do comprimento de contorno  $\Delta L/L_0$  para complexos DNA-daunomicina. A linha pontilhada corresponde ao ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos (Eq. 4.7).

#### 4.5.4 Cálculo do parâmetro $r_c$

Na seção 4.2.1 apresentamos o modelo de exclusão de vizinhos. Conforme discutimos, este modelo é extremamente útil para se estudar as características gerais das moléculas intercalantes ao DNA. A forma fechada deste modelo é a Eq. 4.1, elaborada por McGhee e von Hippel. O parâmetro  $r$  desta equação é a razão entre a concentração de fármaco ligado ( $C_b$ , do inglês “bounded”) pela concentração de pares de base do DNA ( $C_{pb}$ ).

Utilizando as Eqs. 4.1 e 4.2, podemos calcular o valor deste parâmetro no ponto onde ocorre a transição abrupta do comprimento de persistência, ou seja, no ponto onde a concentração total de fármaco vale a chamada concentração crítica. Denotamos este valor de  $r$  por  $r_c$ . Usando nossos valores experimentais para o número de exclusão, os valores das concentrações críticas dos dois fármacos ( $C_D^c \sim 18,3 \mu\text{M}$  e  $C_E^c \sim 3,1 \mu\text{M}$ ),  $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ , os valores das constantes químicas  $K_i$  reportadas na literatura para os dois fármacos, obtemos  $r_c = 0,248$  para a daunomicina e  $r_c = 0,131$  para o brometo

de etídio. Discutiremos este resultado na próxima seção.

### 4.5.5 Interpretação e discussão dos resultados

Para pequenas concentrações do fármaco, ou seja, abaixo da concentração crítica, o comprimento de persistência aumenta com a concentração. Isso significa que a rigidez do complexo DNA-fármaco aumenta com a concentração do fármaco para esta faixa de concentração. Este fato está em acordo com os resultados de Vladescu *et al.* [71] para o brometo de etídio. Neste artigo, os autores realizaram experimentos de fusão do DNA, mostrando que o EtBr estabiliza a dupla-hélice para pequenas concentrações do fármaco (no caso, até  $2,5 \mu\text{M}$ ), usando uma concentração de DNA similar à usada em nossos experimentos. Observe na Fig. 4.12 que a concentração crítica obtida para os complexos DNA-EtBr está um pouco acima da concentração relatada por Vladescu *et al.* ( $2,5 \mu\text{M}$ ) [71] onde o fármaco estabiliza a dupla-hélice do DNA. Os autores observaram em seus experimentos um aumento do ponto de fusão do complexo com a concentração nesta faixa. Assim, é realmente de se esperar que o complexo esteja mais rígido, ou seja, que o comprimento de persistência aumente com a concentração nesta faixa, conforme observamos.

De acordo com as Figs. 4.10 e 4.12, o comprimento de persistência dos complexos DNA-EtBr crescem mais rapidamente com a concentração do que no caso dos complexos DNA-daunomicina. Este comportamento reflete o fato do EtBr ser um intercalante mais forte. O valor máximo do comprimento de persistência, entretanto, é maior no caso da daunomicina. Este fato pode ser explicado assumindo que o valor máximo obtido para o comprimento de persistência depende da competição de dois efeitos causados pela intercalação: enquanto o número de moléculas intercaladas tende a aumentar o comprimento de persistência, o fato da hélice ser desenrolada além de um certo limite tende a diminuir a rigidez da molécula porque causa um aumento da distância entre pares de base opostos, enfraquecendo assim as pontes de hidrogênio e diminuindo o valor do comprimento de persistência.

Acreditamos que o comportamento exemplificado nas Figs. 4.10 e 4.12 seja geral para fármacos que intercalam a molécula de DNA, visto que a intercalação em geral é um processo que ocorre de maneira semelhante para

---

fármacos diferentes, com os mesmos efeitos: aumenta o comprimento de contorno e desenrola a dupla-hélice da molécula.

Para altas concentrações de fármaco, acima da concentração crítica, o comprimento de persistência sofre uma queda abrupta e permanece praticamente constante a partir daí, mesmo com o aumento da concentração do fármaco, pelo menos na faixa de concentração estudada neste trabalho. Para explicar este comportamento, sabemos que os fármacos intercalantes em geral desenrolam a dupla-hélice do DNA. Desta forma, pode acontecer que, acima de uma certa concentração crítica, o DNA esteja desenrolado o suficiente para sofrer uma transição do tipo hélice-novelo (*helix-coil*)\*, causando mudanças nas características do enrolamento da hélice (ver seção 3.1.4). A diferença é que aqui, ao contrário da supertorção, a hélice seria desenrolada, e não superenrolada. Esta mudança na conformação da dupla-hélice pode causar desnaturação na molécula ao esticarmos o DNA, o que explicaria assim a queda abrupta no comprimento de persistência. Uma evidência desta hipótese está no fato de que o EtBr desenrola a dupla-hélice com um ângulo 1,7 vezes maior que a daunomicina [60], o que explicaria o fato da concentração crítica necessária para causar a desnaturação ser bem menor no caso do EtBr do que no caso da daunomicina.

Como suporte a esta hipótese, citamos os resultados reportados por Fritzsche *et al.* [60] em 1982. Os autores realizaram experimentos de sedimentação de complexos DNA-fármacos. Eles encontraram em seus resultados um mínimo no coeficiente de sedimentação  $S_{20}$  [60] em um valor  $r_c = 0,192$ , no caso da daunomicina. Os autores associam este mínimo no coeficiente de sedimentação a uma transição do tipo hélice-novelo (*helix-coil*), devido ao desenrolamento da hélice pela intercalação do fármaco. Este valor concorda em 30% com o valor de  $r_c$  obtido através de nossos experimentos (ver seção 4.5.4). No caso do EtBr, o valor reportado pelos autores é 0,114. Neste caso, a concordância é ainda melhor, cerca de 15%. Assim, é possível que a queda no comprimento de persistência observada em nossos experimentos seja causada por uma transição do tipo hélice-novelo (*helix-coil*), resultando

---

\*Esta transição pode ser definida como uma mudança da estrutura altamente ordenada do DNA para uma estrutura mais randômica, o que causa mudanças nos parâmetros de enrolamento da hélice, resultando em desnaturação da molécula de DNA.

---

em desnaturação da molécula de DNA.

Outra hipótese vem do fato de que a grande maioria dos fármacos intercalantes apresenta multimodalidade em sua interação com o DNA [61,72], isto é, o tipo de interação varia com a concentração do fármaco. Para uma dada faixa de concentração, por exemplo, o fármaco pode intercalar por fora da molécula de DNA [72]. Estes diferentes tipos possíveis de ligações poderiam explicar a queda do comprimento de persistência observada nas Figs. 4.10 e 4.12. Não existem dados muito esclarecedores na literatura sobre estas outras formas de interação para que possamos realizar comparações com nossos experimentos.

Por fim, é fundamental lembrar que todos os experimentos deste trabalho foram realizados no regime de forças baixas ( $\lesssim 5$  pN). Recentemente, Vladescu *et al.* [55] publicaram um trabalho onde reportam o valor de 5,7 nm para o comprimento de persistência dos complexos DNA-EtBr altamente saturados. Entretanto, este trabalho foi realizado no regime de forças grandes ( $\sim 100$  pN) e com uma concentração de fármaco muito maior que as nossas. Isto é um indício de que o comprimento de persistência deve diminuir ainda mais se continuarmos aumentando a concentração do fármaco muito além da faixa usada neste trabalho, além de ser modificado também pela força aplicada. Neste trabalho, foi usada uma forma modificada do modelo WLC que leva em conta o regime entálpico para analisar os dados experimentais. Os autores mostraram ainda neste mesmo trabalho que parâmetros como o número de exclusão  $n$  e a constante química  $K_i$  variam com a intensidade da força usada para esticar a molécula de DNA. Sendo assim, é de se esperar que os valores do comprimento de persistência dependam do regime de força usado para realizar os experimentos. Este é um dos motivos pelos quais esta transição abrupta do comprimento de persistência não foi observada antes. Quase todos os autores na área trabalham num regime de forças maior que o nosso, o que pode fazer com que a transição abrupta fique mascarada, visto que os valores medidos do comprimento de persistência dependem do regime de força usado, conforme discutimos.

A transição abrupta observada no comprimento de persistência em função da concentração depende, obviamente, além da concentração de fármaco, também da concentração usada de DNA, pois, quanto mais DNA na amos-

---

tra, mais fármaco é necessário para atingirmos a saturação. Neste trabalho, todas as medidas foram realizadas para uma concentração fixa de DNA ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ). Para concentrações  $C_{pb}$  diferentes, a transição ocorreria em outros valores de concentração do fármaco. Sendo assim, quando comparamos experimentos diferentes, devemos falar na razão  $C_T/C_{pb}$  usada, e não somente na concentração de fármaco  $C_T$ .

Nos trabalhos citados na introdução deste capítulo, por exemplo, Smith *et al.* [16] usa razões  $C_T/C_{pb}$  típicas entre 0,403 e 8,07 para complexos DNA-EtBr, que estão sempre acima da nossa razão determinada no ponto da transição abrupta,  $C_E^c/C_{pb} = 0,282$ . Estes autores reportam que o EtBr não modifica a elasticidade entrópica do DNA, mas somente aumenta o comprimento de contorno de  $\sim 40\%$ . Como as razões  $C_T/C_{pb}$  desses autores estão sempre acima da nossa razão determinada na concentração crítica, significa que estes estão trabalhando na região de concentrações após a transição crítica. Nesta região, vimos que os complexos DNA-EtBr possuem um comprimento de persistência em torno de 50 nm, muito próximos do valor do DNA puro, o que está portanto em concordância com o valor medido por estes autores. Mais ainda, o aumento máximo do comprimento de contorno para os complexos DNA-EtBr medido em nossos experimentos é  $\sim 39\%$ , também em concordância com estes autores. Tessmer *et al.* [53] e Sischka *et al.* [54] usam razões  $C_T/C_{pb}$  para complexos DNA-EtBr, respectivamente, de 169,5 e 1,37, bem acima portanto da transição. Os valores obtidos nestes dois trabalhos para o comprimento de persistência dos complexos DNA-EtBr estão abaixo do valor do DNA puro, o que sugere que o valor do comprimento de persistência pode realmente decrescer mais ainda se continuarmos a aumentar a concentração do fármaco além da região estudada neste trabalho.

---

## Capítulo 5

# Uso da pinça óptica no estudo da interação DNA-psoralen

Neste capítulo apresentamos um estudo da interação entre a molécula de DNA e o fármaco psoralen, utilizado em tratamento de doenças de pele como psoríase, vitiligo e alguns tipos de dermatite [73–75]. Estamos novamente interessados na modificação das propriedades mecânicas da molécula de DNA ao interagir com o fármaco. Para realizar as medidas, usamos basicamente o mesmo procedimento experimental do Capítulo 4.

### 5.1 Psoralen

Os chamados psoralens são compostos da família das furocoumarinas\*, extraídos de algumas plantas como a erva chinesa *Psorales corylifolia*, L.. As sementes desta planta contém uma grande variedade de furocoumarinas, incluindo psoralens. O psoralen, assim como seus derivados, é um fármaco fotossensível bastante conhecido e usado no tratamento de doenças de pele como psoríase, vitiligo, eczema e alguns tipos de dermatite [73–75]. A técnica utilizada no tratamento destes tipos de doença é conhecida como PUVA

---

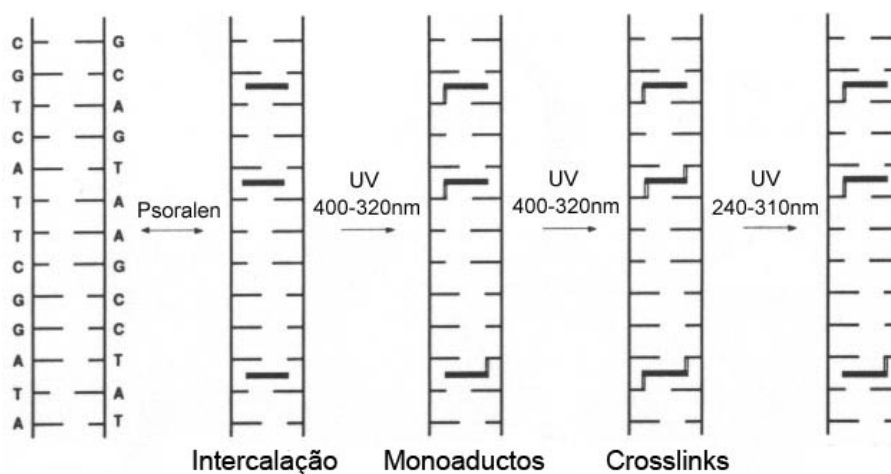
\*Furocoumarinas são compostos químicos orgânicos produzidos por várias plantas. Entre os exemplos mais comuns de compostos desta classe estão os vários tipos de psoralens e a angelicina. Muitas furocoumarinas são tóxicas e produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa contra vários tipos de predadores, de insetos a mamíferos.

---

(Psoralen + UVA) [76,77]. A técnica consiste basicamente em aplicar um medicamento contendo psoralen ao paciente, e a seguir expô-lo a doses controladas de luz ultravioleta do tipo A (UVA), que possui comprimento de onda na faixa de 320 a 400 nm. O fármaco tem como efeito aumentar a sensibilidade da pele à luz UVA, bem como o seu nível de melanina. Este tratamento tira vantagem da alta absorvância da luz UVA pelo psoralen. Primeiramente, o fármaco é aplicado para sensibilizar a pele, e em seguida, a radiação UVA é aplicada para eliminar ou ao menos minimizar a doença de pele. Os antigos egípcios foram os primeiros a utilizar psoralen no tratamento de doenças de pele, cerca de 2000 anos A. C.

Os psoralens também têm sido utilizados ao longo dos anos para estudar a estrutura das moléculas de DNA e RNA [62]. O mecanismo de interação do psoralen com o DNA é bem mais complexo do que o de um fármaco intercalante como a daunomicina ou o brometo de etídio. O psoralen e seus derivados sabidamente intercalam à molécula de DNA e formam ligação covalente com as bases quando o complexo é iluminado com luz ultravioleta. Uma revisão sobre o fármaco e sua interação com a molécula de DNA pode ser encontrada na ref. [78].

A Fig. 5.1 esquematiza a formação das ligações entre as moléculas de psoralen e o DNA. A ligação ocorre com as seguintes etapas [62,79]:



**Figura 5.1:** Esquema da interação DNA-psoralen.

- 1) O fármaco intercala na molécula de DNA, mas sem formar nenhum

tipo de ligação com esta. Esta é a única etapa que ocorre se a amostra não for iluminada.

2) Quando iluminado com luz UVA (320 - 400 nm), o fármaco absorve fótons, formando ligações com as pirimidinas, especialmente com as timinas. Ocorre assim a formação dos chamados monoadductos, resultados da ligação covalente entre uma molécula de psoralen e uma pirimidina.

3) Estes monoadductos causam mudanças na conformação da molécula de DNA: esta deforma para acomodá-los.

4) Um monoadducto pode então absorver um segundo fóton, formando um diadducto (mais conhecido como *crosslink*)\* na molécula de DNA, ligando assim as duas fitas. A formação do *crosslink* só ocorre se houver uma pirimidina na outra fita do DNA próxima do monoadducto, conforme mostrado na Fig. 5.1.

Isto é chamado na literatura de “processo de dois fótons” [79]. Tanto os monoadductos quanto os *crosslinks* formados desta maneira inibem a replicação da molécula de DNA. Eles podem ser reconhecidos e removidos por enzimas celulares. O mais importante para o nosso trabalho é o fato de que tanto os monoadductos quanto os *crosslinks*, assim como a intercalação, modificam as propriedades mecânicas da molécula de DNA, causando mudanças tanto no comprimento de persistência quanto no comprimento de contorno.

Outro fato interessante ocorre quando iluminamos o complexo DNA-psoralen contendo *crosslinks* com luz UVB (240 - 310 nm). Segundo Ussery *et al.* [62], este tipo de luz destrói os *crosslinks*, e a molécula volta a possuir apenas monoadductos. Segundo estes mesmos autores, a quebra dos *crosslinks* também pode ocorrer por desnaturação da molécula de DNA, quando este é submetido a agentes que causam desnaturação da molécula. Estas afirmações, entretanto, não são um consenso geral na literatura. De fato, outros autores, como Shi *et al.* [80], reportam que a luz UVB pode destruir também os monoadductos, ao contrário do que dizem os primeiros autores.

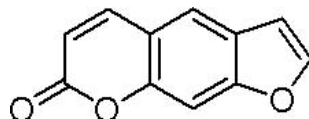
O tipo de psoralen utilizado neste trabalho é o *Furo[3,2-g]Coumarin* ( $C_{11}H_6O_3$ ), adquirido juntamente à Sigma-Aldrich (Cat. # P8399), com

---

\*Embora a palavra “*crosslink*” não tenha tradução direta para o português, vamos usá-la neste texto no lugar de “diadductos”, pois esta é a expressão mais conhecida na literatura.

---

massa molecular  $M = 186,16$  g/mol.



**Figura 5.2:** Molécula de psoralen,  $C_{11}H_6O_3$ , com massa molecular  $M = 186,16$  g/mol.

## 5.2 Preparação das amostras e procedimento experimental

A preparação das amostras é feita exatamente da mesma maneira que a descrita na seção 4.3. A única diferença é na preparação da solução de PBS pH 7,4, onde obviamente mudamos o fármaco adicionado ao PBS.

O procedimento experimental usado nas medidas é basicamente o mesmo descrito na seção 4.4. Apenas no caso das medidas cinéticas o procedimento é ligeiramente diferente e será descrito na próxima seção.

## 5.3 Resultados e discussão

### 5.3.1 Medidas de equilíbrio

Neste tipo de medida, o procedimento experimental usado é exatamente o mesmo descrito na seção 4.4, ou seja, realizamos medidas de estiramento dos complexos DNA-psoralen, obtendo a curva de força  $\times$  extensão do complexo. Para estudar a elasticidade dos complexos DNA-psoralen em cada situação distinta (intercalação, monoadductos e *crosslinks*), usamos o seguinte procedimento:

(a) Sem iluminar a amostra com luz ultravioleta, medimos o comprimento de persistência e de contorno dos complexos realizando um experimento de estiramento idêntico ao descrito na seção 4.4.

(b) Iluminamos a amostra com luz UVA durante um tempo suficiente para que todos os *crosslinks* possíveis sejam formados. Para a intensidade da luz usada, constatamos após alguns testes que esse tempo é de cerca de 30 minutos. A fonte de luz usada é uma lâmpada de mercúrio (Nikon LH-M100C-1). Para iluminar a amostra apenas com a componente UVA, usamos um filtro passa-faixa centrado em 365 nm e com largura de faixa de 10 nm (Edmund Optics). Repetimos então as medidas, obtendo os comprimentos de persistência e de contorno para esta situação.

(c) Após a etapa (b) iluminamos a amostra com luz UVB utilizando a mesma lâmpada e um filtro passa-faixa centrado em 266 nm e com largura de faixa de 10 nm (Newport). Neste caso, de acordo com a ref. [62], todos os *crosslinks* seriam destruídos e teríamos apenas monoadductos. Repetimos novamente as medidas, obtendo os novos valores dos comprimentos de persistência e de contorno para esta situação.

Repetimos este procedimento para duas concentrações diferentes de psoralen. Os resultados para o comprimento de persistência estão sumarizados na Tabela 5.1.

Iluminação	A ( $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ )	A ( $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ )
Luz verde ( $\lambda = 500 \pm 20$ nm)	$64 \pm 6$ nm	$86 \pm 8$ nm
Luz azul ( $\lambda = 450 \pm 20$ nm)	$67 \pm 7$ nm	-
UVA	$107 \pm 10$ nm	$116 \pm 13$ nm
UVB (após UVA)	$34 \pm 3$ nm	$93 \pm 9$ nm

**Tabela 5.1:** Resultados das medidas de equilíbrio para o comprimento de persistência dos complexos DNA-psoralen.

A situação de intercalação corresponde à iluminação com luz verde e azul. Usamos este tipo de iluminação apenas para visualizar a amostra e realizar as medidas, pois sabemos que a luz visível não tem influência na formação de monoadductos ou *crosslinks*. Para a primeira concentração de psoralen usada ( $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ ), obtemos um comprimento de persistência na faixa de  $\sim 65$  nm, ligeiramente maior que o da molécula de DNA livre de fármacos ( $\sim 50$  nm). Para a segunda concentração usada ( $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ ), o valor é da ordem de  $\sim 86$  nm, ainda maior. Desses resultados, concluímos que

a intercalação do psoralen aumenta a rigidez do complexo nesta faixa de concentração estudada.

Quando iluminamos a amostra por cerca de 30 minutos com luz UVA, obtemos um comprimento de persistência da ordem de  $\sim 107$  nm ( $C_P = 8,1$   $\mu$ M) e  $\sim 116$  nm ( $C_P = 13,4$   $\mu$ M), ou seja, mais de duas vezes maior que o valor do DNA puro. Observe que estes valores correspondem à situação onde todos os *crosslinks* possíveis foram formados. Em outras palavras, os *crosslinks* aumentam ainda mais a rigidez do complexo nesta faixa de concentração.

Finalmente, quando iluminamos a amostra com UVB (após UVA), segundo Ussery *et al.* [62], destruimos todos os *crosslinks*, obtendo apenas monoadductos. Em ambas as concentrações, o valor obtido é menor do que a situação com *crosslinks*. Se considerarmos correta a afirmação de Ussery *et al.* [62], isto implica que os monoadductos diminuem a rigidez do complexo em relação aos *crosslinks*. Para  $C_P = 8,1$   $\mu$ M, obtemos um comprimento de persistência extremamente baixo, da ordem de  $\sim 34$  nm. Para  $C_P = 13,4$   $\mu$ M, o valor é bem mais alto,  $\sim 93$  nm, porém ainda abaixo do valor medido para a situação com *crosslinks*. Entretanto, não temos certeza se a afirmação de Ussery *et al.* [62] é verdadeira, pois existem outros autores como Shi *et al.* [80] que afirmam que a luz UVB pode também destruir os monoadductos. Na realidade, estes autores afirmam que existem dois tipos possíveis de monoadductos: *Mfu* (furan-side monoadduct) e *Mpy* (pyrone-side monoadduct). A diferença entre os dois está na ligação química covalente entre a pirimidina e o anel do fármaco, que ocorre em átomos diferentes. Segundo Shi *et al.* [80] e Eichman *et al.* [81], apenas um dos tipos de monoadducto (o *Mfu*) forma *crosslinks* com facilidade. Ainda, segundo Shi *et al.* [80] e Cimino *et al.* [78], ambos os tipos de monoadductos podem ser revertidos com luz UVB (com preferência de reversão para o *Mpy*), contrariando Ussery *et al.* [62]. Talvez isto explique a grande discrepância observada entre os valores do comprimento de persistência dos complexos da última linha da Tabela 5.1: pode estar ocorrendo maior formação de um certo tipo de monoadducto num caso do que no outro.

A seguir, na Fig. 5.3, mostramos os resultados obtidos nas situações de intercalação (*círculos*) e de *crosslinks* (*quadrados*) para outras concentrações

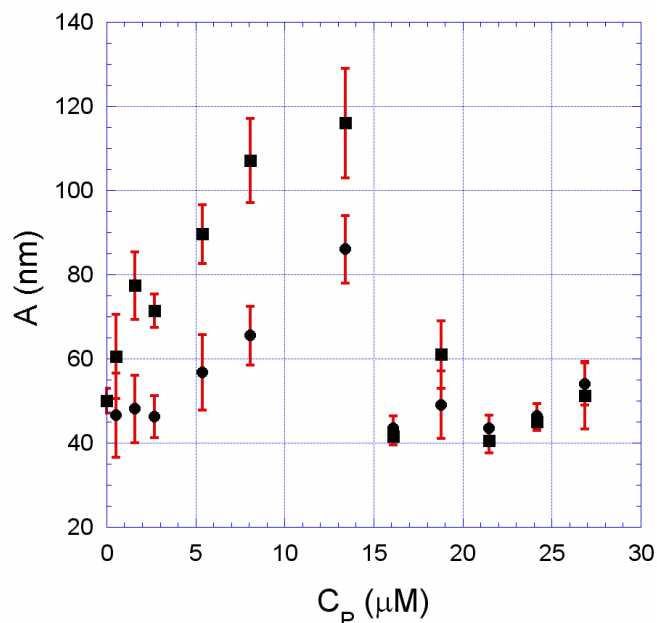
---

através do gráfico do comprimento de persistência em função da concentração total do fármaco em solução, de maneira semelhante ao apresentado no Capítulo 4 para os fármacos intercalantes. Observe que o comprimento de persistência sofre o mesmo tipo de transição abrupta discutida no Capítulo 4. É interessante notar que esta transição ocorre na mesma concentração ( $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ ) tanto para a situação de intercalação quanto para a situação de *crosslinks*. Esta concentração crítica corresponde à terceira coluna da Tabela 5.1. O comportamento do comprimento de persistência em função da concentração é qualitativamente idêntico para ambas as situações: cresce monotonicamente até atingir a concentração crítica, quando sofre uma queda abrupta e permanece praticamente constante a partir daí, no valor  $\sim 50 \text{ nm}$ . Observe que, antes da transição, o comprimento de persistência dos complexos com *crosslinks* é sempre maior que o dos complexos com o fármaco intercalado. Entretanto, após a transição, as duas situações possuem aproximadamente o mesmo valor do comprimento de persistência ( $\sim 50 \text{ nm}$ ), estando a pequena diferença situada dentro da barra de erro do experimento.

Na Fig. 5.4 apresentamos o comportamento do comprimento de contorno em função da concentração do fármaco para os mesmos complexos da Fig. 5.3, na situação de intercalação. Não apresentamos os resultados referentes aos complexos com *crosslinks* por causa da grande barra de erro do experimento na determinação de  $L$ , um problema já discutido no Capítulo 4. Neste caso, os valores de  $L$  para os complexos com *crosslinks* estariam dentro da barra de erro mostrada na Fig. 5.4.

Da mesma forma que fizemos no Capítulo 4 para os fármacos intercalantes, podemos usar os resultados da Fig. 5.4 para estimar o número de exclusão  $n$  para o psoralen no processo de intercalação. Na saturação, obtemos o valor do comprimento de contorno (média dos valores dos quatro últimos pontos da Fig. 5.4)  $L^s = 23,5 \mu\text{m}$ . O número de moléculas de psoralen intercaladas na saturação é então  $N_i^s = (23,5 - 16,5) \mu\text{m} / 0,34 \text{ nm} \sim 20590$  moléculas. Finalmente, teremos  $n = N_{pb} / N_i^s = 48500 / 20590 \sim 2,4$ . Para realizar este cálculo, usamos o dado de Ussery *et al.* [62], que afirma que cada molécula intercalada de psoralen aumenta o comprimento de contorno de  $0,34 \text{ nm}$ . Não encontramos na literatura o valor do número de exclusão para o nosso composto específico (*Furo[3,2-g]Coumarin*). Para outros

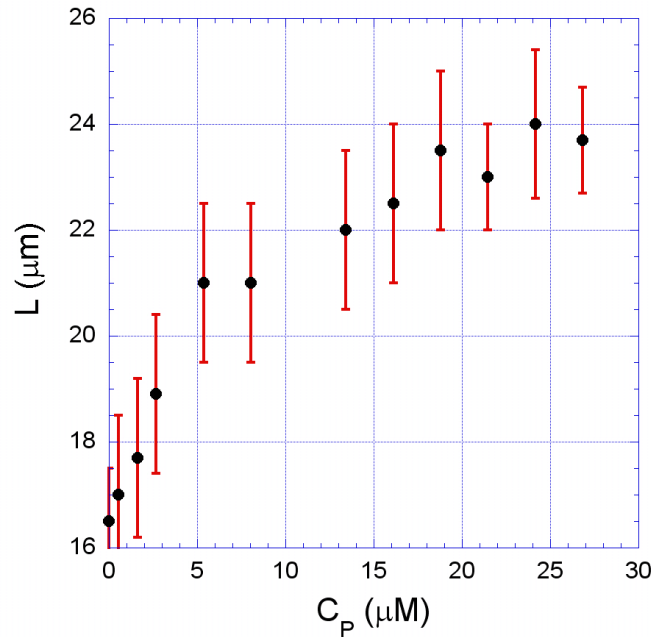
---



**Figura 5.3:** Comprimento de persistência em função da concentração do fármaco para complexos DNA-psoralen. Observe que a transição abrupta ocorre na mesma concentração ( $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ ) para ambas as situações. *Círculos:* complexos intercalados; *Quadrados:* complexos com *crosslinks*.

derivados do psoralen, são reportados valores de  $n$  que variam entre 1,0 e 3,5 [72,82].

Por fim, podemos usar o mesmo procedimento discutido no Capítulo 4 (seção 4.5.3) para ajustar nossos dados experimentais da Fig. 5.4 ao modelo de exclusão de vizinhos. A Fig. 5.5 mostra o resultado obtido. Nesta figura, os círculos correspondem aos dados experimentais, enquanto a linha pontilhada corresponde ao ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos, Eq. 4.7. Deste ajuste, determinamos o número de exclusão  $n = 1,4 \pm 0,2$  e a constante química  $K_i = 8,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Entretanto, devido às barras de erro relativamente grandes desta medida, precisaríamos realizar um experimento com uma única molécula de DNA, variando a concentração na amostra, para verificar estes números, conforme discutimos no Capítulo 4. Acreditamos que o valor de  $n$  determinado na estimativa anterior (2,4) seja mais confiável do que este determinado pelo ajuste.

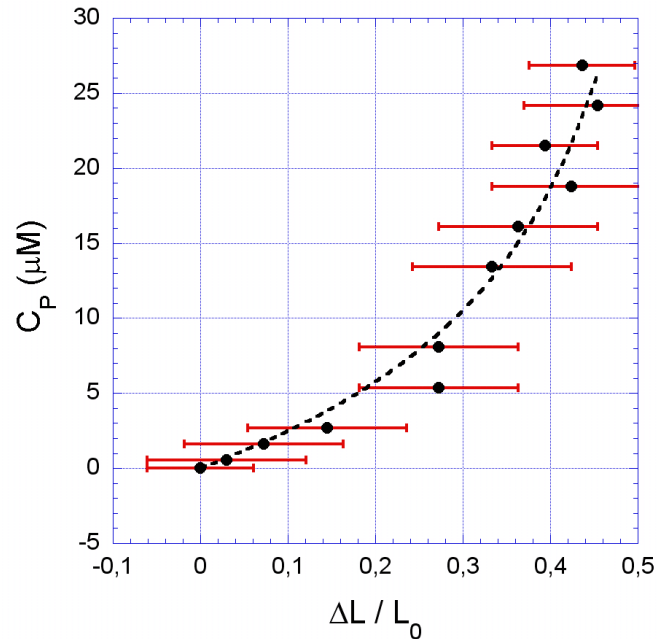


**Figura 5.4:** Comprimento de contorno em função da concentração do fármaco para os mesmos complexos DNA-psoralen da Fig. 5.3 na situação de intercalação.

### 5.3.2 Medidas cinéticas

Neste tipo de medida, estamos interessados em estudar a cinética do processo de modificação do comprimento de persistência quando a amostra é iluminada com luz UVA. Em outras palavras, queremos saber como varia no tempo o comprimento de persistência desde o valor inicial, correspondente à situação de intercalação (em  $t = 0$  a lâmpada UVA é ligada), até o valor final, quando todos os *crosslinks* possíveis são formados.

O procedimento realizado é o seguinte: primeiramente esticamos o DNA movimentando a lamínula do microscópio com o deslocador piezo, até atingirmos a extensão  $z \sim 0,90L$ . A seguir, posicionamos a microesfera na posição de derivada máxima do perfil de retroespalhamento (posição onde é feita a correlação), movendo esta em relação ao feixe de He-Ne. Obtemos com isso a molécula de DNA esticada, com a microesfera de poliestireno situada numa posição conhecida do perfil de retroespalhamento (que deve ser medido *a priori*). Ligando a iluminação UVA, observamos uma mudança



**Figura 5.5:** Dependência do aumento relativo do comprimento de contorno com a concentração do fármaco para os mesmos complexos DNA-psoralen da Fig. 5.4. *Círculos:* pontos experimentais; *Linha pontilhada:* ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos (Eq. 4.7).

na posição da microesfera de poliestireno ao longo no tempo no perfil de retroespalhamento. Isto ocorre porque os comprimentos de persistência e de contorno do complexo DNA-psoralen variam com o tempo ao ligarmos a iluminação UVA. Conseqüentemente, a força exercida pelo DNA na microesfera muda, causando assim um deslocamento desta ao longo do perfil de retroespalhamento. O sentido deste deslocamento depende do sinal da variação dos valores de  $A$  e  $L$ . O que fazemos então é medir a intensidade retroespalhada pela microesfera em função do tempo nesta configuração até o ponto onde esta intensidade estabiliza, ou seja, quando  $A$  e  $L$  param de variar, atingindo seus valores finais. Usando o mesmo método descrito na seção 4.4.5, transformamos a intensidade retroespalhada na força exercida pelo DNA sobre a microesfera, obtendo assim um gráfico desta força  $F(t)$  em função do tempo  $t$ . Para obter o comprimento de persistência em função do tempo,  $A(t)$ , invertemos a expressão de Marko e Siggia (Eq. 4.6) para

obter o comprimento de persistência em função da força,  $A(F(t))$ , e assim fazemos a transformação  $A(F(t)) = A(t)$ .

Existe entretanto uma aproximação neste método. Conforme discutiremos adiante, o comprimento de contorno diminui com o tempo quando iluminamos a amostra com UVA. Consideramos uma variação linear do comprimento de contorno  $L(t)$  em função do tempo para implementar numericamente a Eq. 4.6 e obter  $A(t)$ . Esta variação de  $L(t)$  com o tempo não é exatamente linear, mas a aproximação é razoável pelo fato da variação ser pequena. No final desta seção mostraremos alguns resultados para a variação do comprimento de contorno com o tempo.

Os valores iniciais  $A(0)$  e  $L(0)$  são medidos antes de ligarmos a iluminação UVA, realizando-se uma medida de equilíbrio no complexo.

Em síntese, o que fazemos neste procedimento é inverter a Eq. 4.6 para escrever

$$A(t) = \frac{k_B T}{F_x(t)} \left[ \frac{\sqrt{x_{DNA}^2(t) + h^2}}{L(t)} + \frac{1}{4 \left( 1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2(t) + h^2}}{L(t)} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}(t)}{\sqrt{x_{DNA}^2(t) + h^2}}, \quad (5.1)$$

onde

$$x_{DNA}(t) = x_{DNA}(0) + \Delta x(t), \quad (5.2)$$

sendo  $\Delta x(t)$  a variação de posição da microesfera de poliestireno no perfil de retroespalhamento ao longo do tempo, e

$$F_x(t) = F_x(0) + \kappa_x \Delta x(t), \quad (5.3)$$

onde  $\kappa_x$  é a constante de força da pinça óptica nesta direção.

Conforme comentamos no início desta seção, ajustamos  $z(0) \sim 0,90L(0)$ . Como  $x_{DNA} = z \cos \theta = z \sqrt{1 - \sin^2 \theta}$  (ver Fig. 4.7), podemos escrever

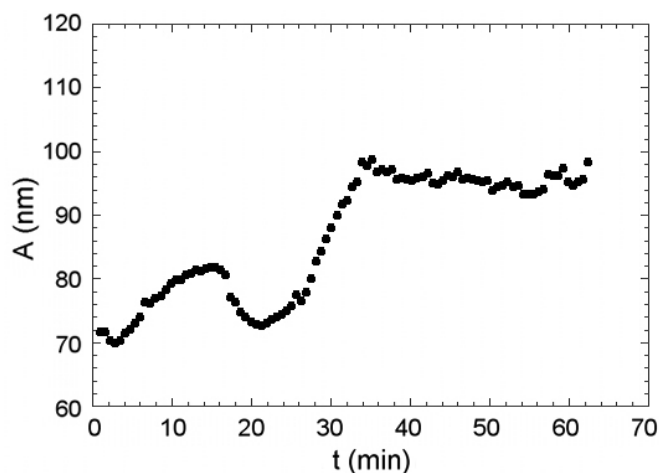
$$x_{DNA}(0) = z(0) \sqrt{1 - h^2/z^2(0)}. \quad (5.4)$$

Finalmente a força inicial  $F_x(0)$  é determinada através do gráfico de força  $\times$  extensão da medida de equilíbrio que realizamos no complexo antes da

---

medida cinética (para determinar os valores iniciais de  $A$  e  $L$ ), uma vez que conhecemos a extensão inicial da molécula  $x_{DNA}(0)$ . Esta extensão inicial é determinada com boa precisão ajustando-se adequadamente a posição do deslocador piezo.

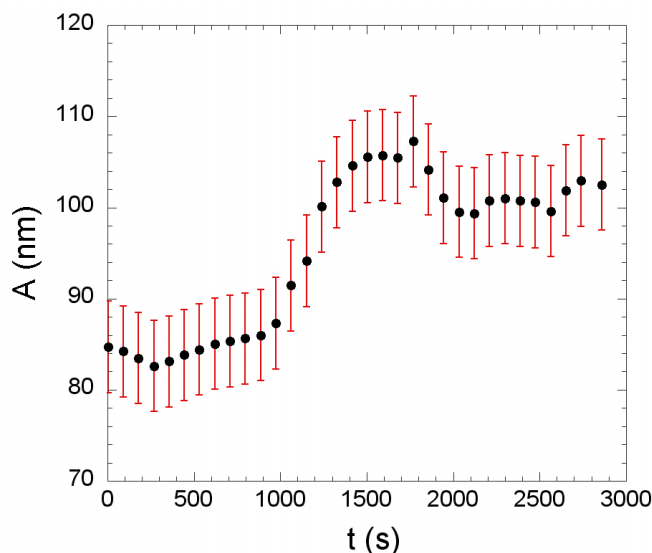
O resultado obtido com este procedimento para a variação do comprimento de persistência com o tempo está representado na Fig. 5.6, para a concentração  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ .



**Figura 5.6:** Comprimento de persistência em função do tempo para um complexo DNA-psoralen iluminado ininterruptamente com luz UVA. O comprimento de persistência parece inicialmente oscilar no tempo, mas estabiliza num valor estável ( $\sim 100$  nm) após  $\sim 35$  minutos. O gráfico foi obtido usando a concentração do fármaco  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ .

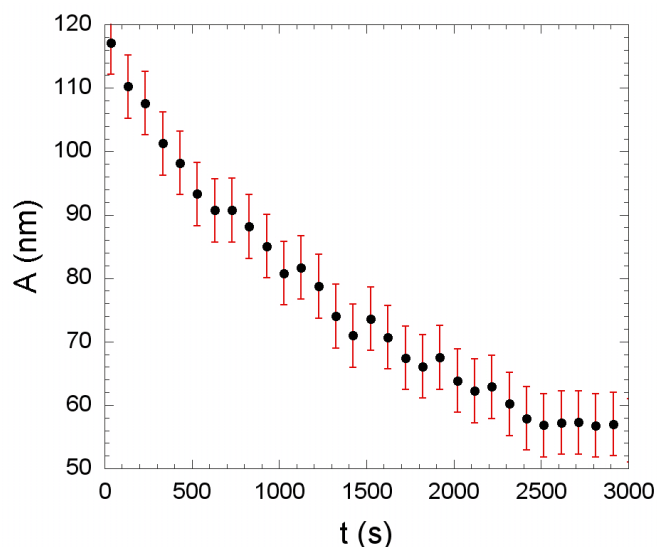
Observe que neste caso o comprimento de persistência parece inicialmente oscilar no tempo, mas após cerca de 35 minutos atinge o valor estável  $\sim 100$  nm. Alguns pontos são importantes de ressaltar. Primeiro, observe que os valores inicial ( $\sim 70$  nm) e final ( $\sim 100$  nm) do comprimento de persistência obtidos com este método estão próximos dos valores relatados na Tabela 5.1 para esta concentração do fármaco ( $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ ) nas situações de intercalação (linhas 2 e 3 da tabela) e após a aplicação de UVA (linha 4 da tabela). Como a Fig. 5.6 corresponde a um único DNA particular, estes valores obtidos estão dentro da barra de erro dos dados da Tabela 5.1, que correspondem a uma média sobre vários complexos distintos.

A seguir, apresentamos o mesmo tipo de medida realizado para a concentração  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$  (Fig. 5.7). Observe que o comportamento é bastante semelhante. Neste caso, entretanto, não existe a oscilação inicial de  $A$  observada para a outra concentração (Fig. 5.6). O valor inicial de  $A$  corresponde a situação de intercalação para esta concentração, e o valor final corresponde a situação onde todos os *crosslinks* possíveis estão formados. Observe que estes valores concordam com os valores relatados na Tabela 5.1 para esta concentração do fármaco ( $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ ), dentro das barras de erro do experimento.



**Figura 5.7:** Comprimento de persistência em função do tempo para um complexo DNA-psoralen iluminado ininterruptamente com luz UVA. O comprimento de persistência varia no tempo, mas estabiliza após  $\sim 30$  minutos. O gráfico foi obtido usando a concentração do fármaco  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .

Para verificar a reversibilidade deste processo, após a medição da figura 5.7, desligamos a lâmpada UVA e coletamos a intensidade espalhada pelo microsfera em função do tempo. Novamente, transformamos a intensidade em comprimento de persistência com o procedimento já descrito, obtendo com isso a Fig. 5.8. Observe que  $A$  agora diminuiu de um valor próximo ao valor da situação com *crosslinks* até um valor próximo ao valor da situação de intercalação, indicando que o processo é espontaneamente revertido.



**Figura 5.8:** Comprimento de persistência em função do tempo para o mesmo complexo DNA-psoralen da Fig. 5.7 após desligar a luz UVA. O comprimento de persistência diminui com o tempo, estabilizando num valor entre o valor do DNA puro, sem fármacos ( $\sim 50$  nm) e o valor de intercalação ( $\sim 86$  nm).

Interpretamos esta diminuição de  $A$  da seguinte maneira: segundo Ussery *et al.* [62] e Sinden *et al.* [83], a reatividade da ligação do psoralen com o DNA depende da conformação da molécula, sendo aproximadamente diretamente proporcional à densidade de superhélice. Sendo assim, é de se esperar que quanto mais “enrolada” esteja a molécula de DNA, maior deve ser o número de moléculas de fármaco ligadas. Por outro lado, quanto mais retilíneo o DNA estiver, menor deve ser o número de moléculas de fármaco ligadas. Dessa forma, é razoável supor que, ao mantermos a molécula de DNA esticada por muito tempo, ocorra quebra de alguns *crosslinks* do psoralen com o DNA, o que explicaria a queda observada no comprimento de persistência do complexo ao desligarmos a iluminação UVA (Fig. 5.8). De fato, se a iluminação UVA permanecer desligada e o DNA permanecer esticado por muito tempo, é razoável supor que as ligações do fármaco com as bases do DNA podem quebrar. Observe que o valor final de  $A$  obtido nesta figura ( $\sim 55$  nm) está abaixo da situação de intercalação para esta concentração ( $\sim 86$  nm) e próximo do valor obtido para o DNA puro ( $\sim 50$  nm), o que

indica que a reatividade cai também para a intercalação, e não só para os *crosslinks* e monoadductos. Nossa hipótese inicial para explicar este fato foi assumir que o número de moléculas intercaladas nesta situação final deve ser menor do que o valor máximo possível, o que explicaria a diferença obtida no valor do comprimento de persistência. Esta hipótese foi posteriormente confirmada realizando-se um experimento idêntico ao da Fig. 5.8, porém sem iluminar previamente a amostra com luz UVA. Este experimento mostrou que o comprimento de persistência cai do valor de intercalação ( $\sim 86$  nm) para um valor próximo ao do DNA puro ( $\sim 50$  nm), indicando que, quando mantemos a molécula esticada por muito tempo, podemos reverter também a intercalação.

A seguir, ainda usando o mesmo complexo DNA-psoralen das Figs. 5.7 e 5.8, religamos a iluminação UVA e observamos o comportamento da intensidade retroespalhada em função do tempo. Transformando novamente a intensidade retroespalhada em comprimento de persistência, observamos um comportamento análogo ao da Fig. 5.7, isto é, o valor do comprimento de persistência volta a aumentar, atingindo novamente a faixa dos 100 nm. Este fato não é nenhuma surpresa, pois, religando a iluminação UVA, os *crosslinks* serão novamente formados, aumentando assim novamente o comprimento de persistência do complexo.

Em síntese, os resultados mostrados nas Figs. 5.7 e 5.8 indicam que as ligações do psoralen com o DNA tendem a “quebrar” quando o DNA permanece distendido por muito tempo ( $\sim 30$  minutos). Observe que este processo é reversível, pois as ligações puderam ser refeitas após terem sido quebradas. Provavelmente este fato não foi observado nas medidas de equilíbrio pelo fato de que, neste caso, a lâmpada UVA é mantida ligada durante todo o experimento. Além disso, no caso das medidas de equilíbrio, o DNA permanece distendido por um tempo muito pequeno (menos de 10 s para a faixa de estiramento  $0,80L < z < L$ ) se comparado com as medidas cinéticas.

O procedimento utilizado na sequência de Figs. 5.7 e 5.8 foi repetido diversas vezes para outros complexos DNA-psoralen diferentes, e o comportamento qualitativo observado é sempre o mesmo, com os valores inicial e final do comprimento de persistência sempre próximos dos valores reportados na Tabela 5.1. A forma exata das curvas apresentadas nestas figuras,

---

entretanto, nem sempre é reprodutível. Por exemplo, observe que a Fig. 5.7 apresenta um pico em  $t \sim 1600$  s. A forma e localização deste pico dependem de fatores como a intensidade da luz UVA usada e as condições iniciais do experimento (especialmente a extensão inicial do complexo DNA-fármaco). Embora o comportamento apresentado nas Figs. 5.7 e 5.8 seja bem reprodutível de uma forma qualitativa, com valores inicial e final bem definidos para o comprimento de persistência, a reprodução quantitativa da forma exata da curva não foi conseguida com o controle atual que temos sobre o experimento.

Nossa interpretação a respeito da quebra das ligações entre o fármaco e o DNA quando este permanece esticado por muito tempo é reforçada por um outro tipo de medida cinética, descrita e discutida a seguir.

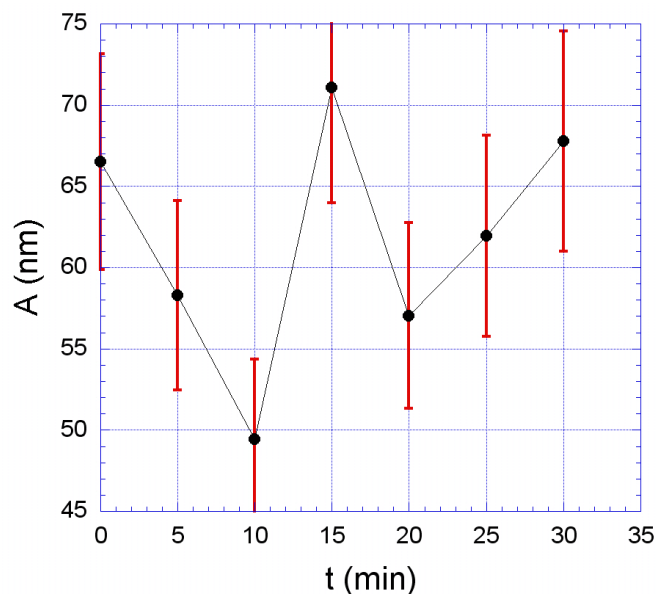
O procedimento utilizado neste segundo tipo de medida cinética é o seguinte: colocamos a amostra com o fármaco no microscópio e, sem usar iluminação UVA, medimos o comprimento de persistência e de contorno iniciais do complexo fazendo uma medida de equilíbrio, da mesma forma que a descrita na seção 5.3.1. Esta corresponde à situação de intercalação do fármaco. A seguir, ligamos a iluminação UVA durante um certo intervalo de tempo  $\delta$ . Após este intervalo, desligamos esta iluminação e repetimos as medidas com a mesma molécula de DNA, voltando a religar a lâmpada UVA após esta nova medida. Cada experimento de estiramento dura em média 4 minutos. Repetindo este processo várias vezes, obtemos uma curva que mostra a evolução temporal dos comprimentos de persistência e contorno em função do tempo para a mesma molécula de DNA.

A seguir apresentamos os resultados para duas concentrações  $C_P$  estudadas e diferentes valores de  $\delta$ . As linhas sólidas que aparecem ligando os pontos experimentais em todos os gráficos do comprimento de persistência em função do tempo deste tipo de medida são apenas “guias para os olhos”.

A Fig. 5.9 mostra o comprimento de persistência  $A$  em função do tempo para  $\delta = 5$  minutos. Observe que o comprimento de persistência oscila no tempo durante o intervalo analisado. A Fig. 5.10 mostra o correspondente comportamento do comprimento de contorno  $L$  (normalizado pelo valor inicial  $L_0$ ) para o mesmo complexo da Fig. 5.9. Observe que o comprimento de contorno decresce monotonicamente com o tempo.

As Figs. 5.11 e 5.12 mostram o mesmo comportamento para outro com-

---



**Figura 5.9:** Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 5$  minutos e  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ .

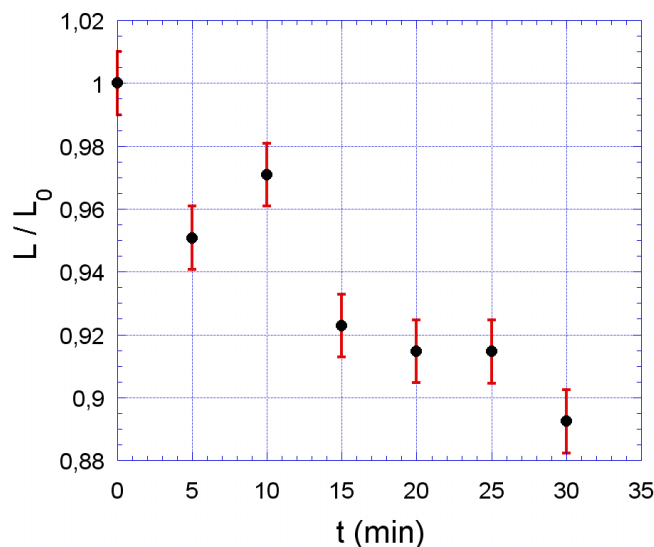
plexo DNA-psoralen e  $\delta = 5$  minutos. A diferença é que nestas figuras a intensidade da iluminação UVA foi diminuída em cerca de  $\sim 22\%$ , aumentando assim o “período” da oscilação. Isto era de se esperar, pois, quanto menor a intensidade da iluminação, maior o tempo necessário para a formação dos *crosslinks*. Este foi o único caso estudado onde variamos a intensidade padrão da iluminação. Todas as outras medidas foram realizadas com a mesma intensidade de iluminação UVA.

As Figs. 5.13 e 5.14 mostram o mesmo tipo de comportamento, agora para um  $\delta = 15$  minutos.

Para todas as Figs. de 5.9 à 5.14, a concentração do fármaco usada foi  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ . Os próximos gráficos são referentes à concentração  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .

As Figs. 5.15 e 5.16 mostram o comportamento do comprimento de persistência e de contorno para  $\delta = 10$  minutos e  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ . As Figs. 5.17 e 5.18 mostram os resultados para a mesma concentração e mesma intensidade de iluminação, porém para  $\delta = 5$  minutos.

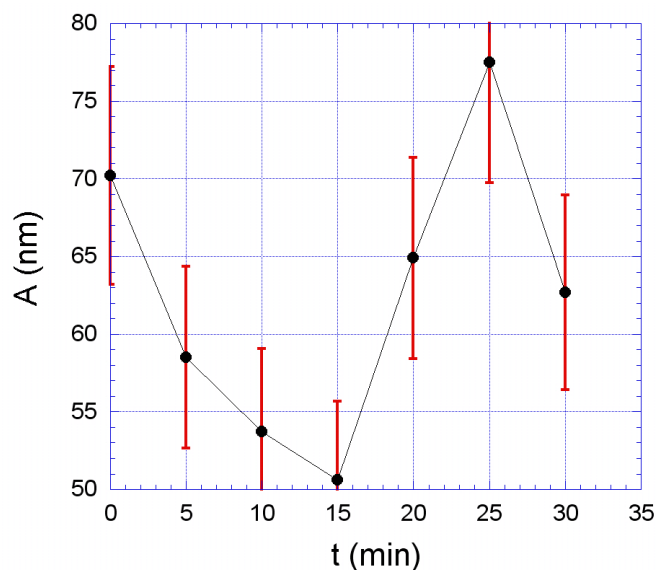
Observe que o comportamento geral dos comprimentos de persistência e



**Figura 5.10:** Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 5$  minutos e  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ .

contorno são os mesmos também para a concentração  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .

Estes resultados parecem mostrar que o comprimento de persistência oscila no tempo em todos os casos, ao menos num momento inicial, enquanto o comprimento de contorno decai monotonicamente com o tempo de iluminação UVA. Acreditamos que o fato do comprimento de persistência oscilar indefinidamente neste caso e não estabilizar se deve ao fato da lâmpada UVA ser desligada periodicamente. Neste tipo de medida, realizamos em cada caso 5 experimentos de estiramento no complexo DNA-fármaco cada vez que a lâmpada UVA é desligada, a fim de obtermos um valor médio mais confiável para  $A$  e  $L$ . Em outras palavras, cada ponto experimental das Figs. 5.9 à 5.18 é obtido realizando-se uma média sobre 5 medidas em um mesmo complexo DNA-psoralen. Como a lâmpada UVA permanece desligada durante estas medidas, é possível que alguns *crosslinks* do fármaco com o DNA sejam quebrados neste processo. Estes *crosslinks* só serão refeitos quando voltarmos a religar a lâmpada UVA. Este caráter periódico do método da medida pode então explicar o comportamento observado para o comprimento de persistência.

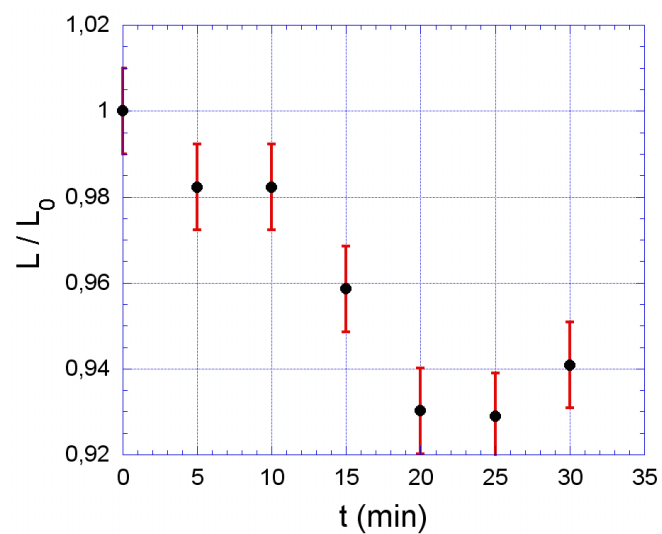


**Figura 5.11:** Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 5$  minutos e  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$  (intensidade de iluminação UVA  $\sim 22\%$  menor).

Por outro lado, o comportamento do comprimento de contorno pode ser explicado com esta interpretação se admitirmos que os *crosslinks* aproximam as bases adjacentes da molécula de DNA de uma forma irreversível. Entretanto, é necessário algum outro tipo de medida para confirmar esta hipótese.

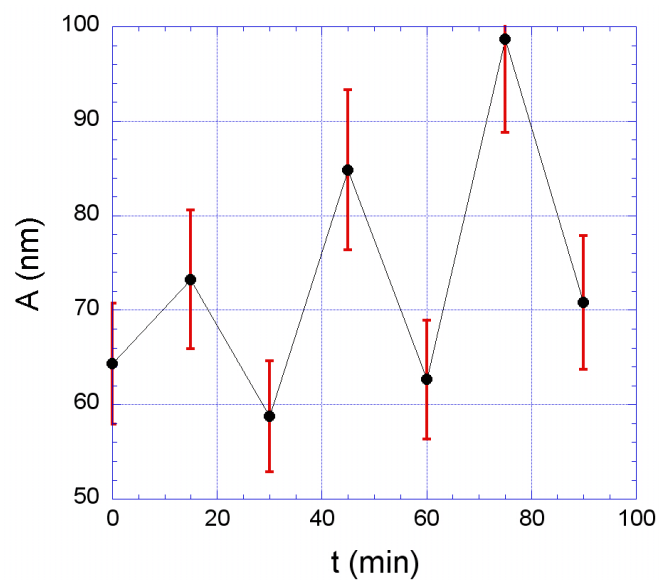
Apesar dos nossos resultados terem fornecido uma boa contribuição para esclarecer a complicada dinâmica de interação do psoralen com o DNA [63, 64], a compreensão total desta interação permanece longe de ser completamente esclarecida. Outros tipos diferentes de experimentos precisam ser feitos para que a interação DNA-psoralen seja completamente compreendida.

Outros autores já realizaram medidas e fizeram tentativas de formular modelos para estudar a cinética da interação DNA-psoralen quando a amostra é iluminada com UVA. Entretanto, estes trabalhos procuraram estudar as variações das concentrações de fármaco livre e ligado [84] ou as concentrações de *crosslinks* e monoadductos [80], sem preocupação com os comprimentos de persistência e de contorno dos complexos. Os modelos formulados por estes autores, entretanto, usam cinéticas simples, com equações diferenciais de primeira ordem, e não podem portanto explicar muitos dos nossos resultados

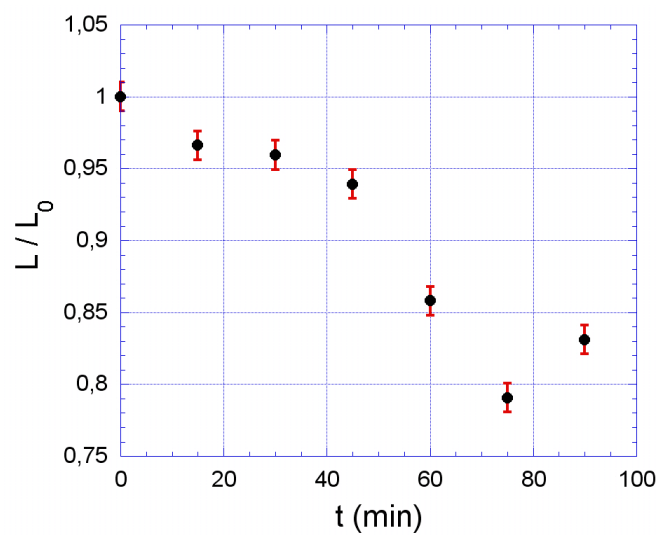


**Figura 5.12:** Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 5$  minutos e  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$  (intensidade de iluminação UVA  $\sim 22\%$  menor).

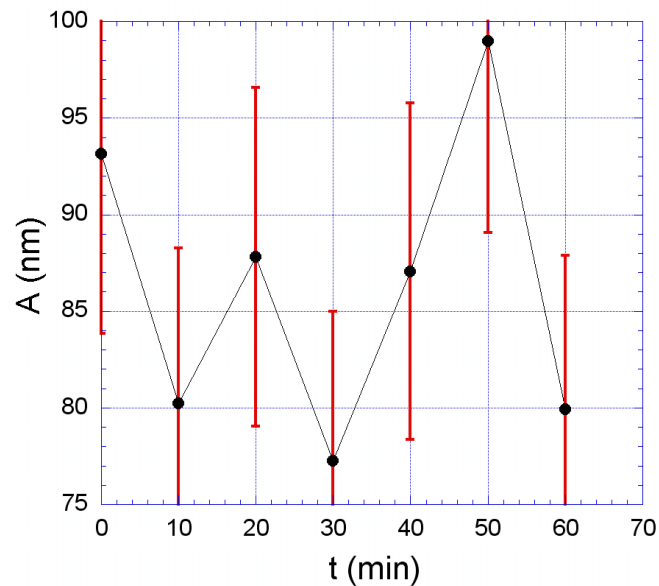
experimentais discutidos nesta seção.



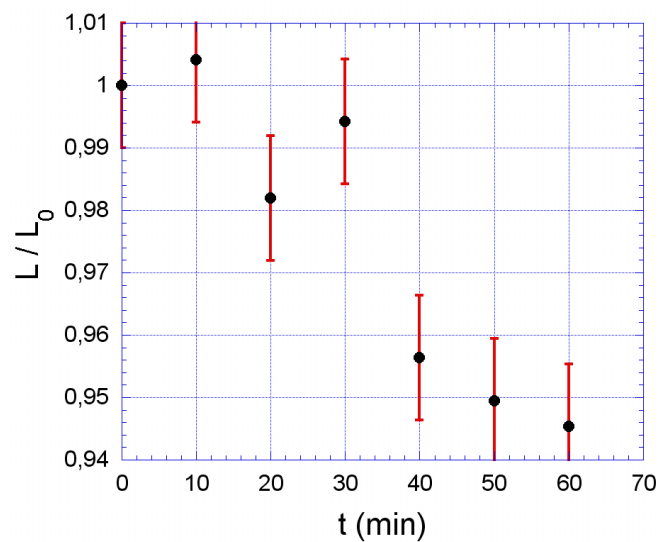
**Figura 5.13:** Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 15$  minutos e  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ .



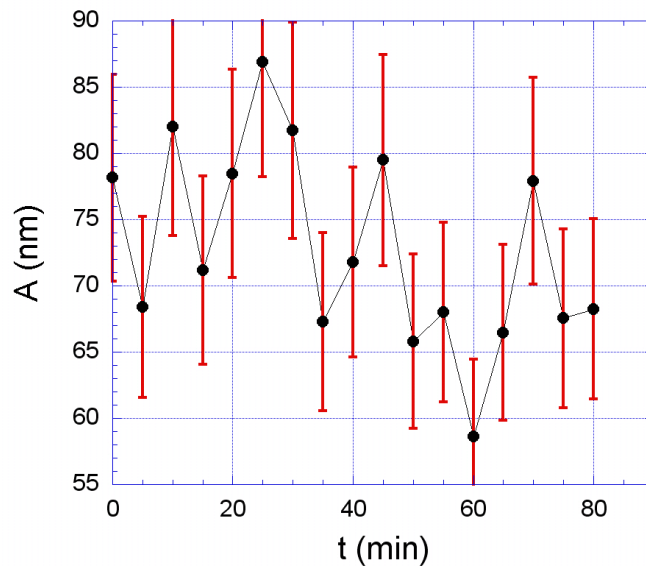
**Figura 5.14:** Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 15$  minutos e  $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ .



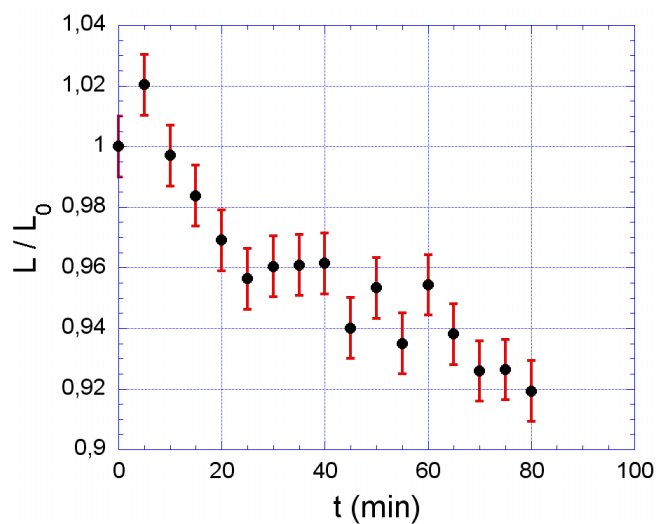
**Figura 5.15:** Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 10$  minutos e  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .



**Figura 5.16:** Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 10$  minutos e  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .



**Figura 5.17:** Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 5$  minutos e  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .



**Figura 5.18:** Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen,  $\delta = 5$  minutos e  $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ .

## Capítulo 6

### Conclusões e perspectivas

Neste trabalho de doutoramento, estudamos a técnica de pinçamento óptico partindo de seus primeiros princípios, desenvolvendo também aplicações desta técnica para o estudo da física de sistemas biológicos, no caso, a molécula de DNA.

Na primeira parte do trabalho, estudamos a física da pinça óptica. Iniciamos analisando o fenômeno teoricamente nos limites da óptica geométrica e Rayleigh. Em seguida realizamos experimentos com a finalidade de obter a comprovação experimental da teoria MDSA de pinças ópticas, que é a teoria mais realista de pinças ópticas encontrada atualmente na literatura. Como toda nova teoria física, a teoria MDSA também precisava de uma comprovação experimental para ser bem aceita na comunidade científica. Embora tanto a teoria quanto as técnicas experimentais possam ser aperfeiçoadas no futuro, acreditamos que a concordância entre os nossos experimentos e a teoria MDSA foi obtida de forma satisfatória neste trabalho, em face da grande complexidade deste problema e das inúmeras dificuldades e complicações encontradas, que foram discutidas no Capítulo 2. Devemos enfatizar que esta comparação entre experimento e teoria MDSA é absoluta, livre de parâmetros ajustáveis. Todos os parâmetros usados na teoria foram medidos. Quatro artigos foram publicados como resultado desta primeira parte do trabalho: as refs. [13,14,85,86].

Na segunda parte do trabalho, aplicamos a técnica de pinçamento óptico em conjunto com a técnica de espectroscopia de autocorrelação de intensi-

---

dades para estudar a interação da molécula de DNA com alguns fármacos importantes na medicina.

Em um primeiro momento, concentramos a atenção em dois fármacos intercalantes, a daunomicina e o brometo de etídio, pelo fato da interação destes compostos com o DNA ser mais simples. Esclarecemos muitos dos resultados divergentes sobre este assunto encontrados na literatura, e encontramos uma transição estrutural do comprimento de persistência da molécula de DNA para o regime de baixas forças ( $\lesssim 2$  pN), induzida por estes fármacos, que nunca havia sido reportada antes. Desta forma, acreditamos que este trabalho contribuiu bastante para esclarecer o mecanismo de interação da molécula de DNA com fármacos intercalantes. Um artigo foi publicado sobre o assunto: a ref. [56].

A seguir, aplicamos basicamente as mesmas técnicas experimentais para estudar a interação da molécula de DNA com outro fármaco: o psoralen. Conforme discutido no Capítulo 5, a interação deste fármaco com a molécula de DNA é bem mais complicada do que no caso dos fármacos intercalantes. Nossos resultados permitiram estabelecer comparações entre as propriedades mecânicas da molécula de DNA em cada etapa da interação com o fármaco, contribuindo assim para esclarecer alguns aspectos até então desconhecidos desta interação, onde destacamos a forte dependência do comprimento de persistência com a concentração do fármaco em solução e com o tipo de iluminação usada. Devido a alta complexidade deste problema, entretanto, acreditamos que outros tipos de experimentos ou cálculos e simulações teóricas sejam necessários para que o completo entendimento desta interação seja alcançado. Dois artigos foram publicados como resultado desta parte do trabalho: as refs. [63,64].

Finalmente, como algumas perspectivas futuras deste trabalho, podemos citar principalmente novos experimentos no campo da interação DNA-fármacos. De fato, as técnicas usadas neste trabalho podem ser aplicadas para obter informações sobre a interação com DNA com outros fármacos e compostos diferentes. Além disso, com a recente implementação de uma nova pinça óptica de maior potência em nosso laboratório, seremos também capazes de estudar a transição de superestiramento do DNA (discutida no Capítulo 3), e como esta transição é afetada pelos fármacos já estudados e

---

também por outros compostos de interesse científico.

## Apêndice A

# Medida de $\langle \Delta r^2 \rangle$ e do coeficiente de difusão $D$ através da análise do movimento Browniano das microesferas

Conforme comentamos no Capítulo 2, a medida do raio das microesferas utilizadas é fundamental para que possamos construir a curva da constante de força da pinça óptica em função do raio da microesfera presa.

Neste trabalho, usamos microesferas de óleo mineral obtidas com o auxílio de um banho de ultrassom. A emulsão final obtida, com as microesferas de óleo em água deionizada, apresenta microesferas com os mais variados raios, desde a faixa de sub-micrômetros até dezenas de micrômetros. Tornou-se necessário então o desenvolvimento de um método eficaz para medir o raio destas microesferas com boa precisão.

O método usado em nosso laboratório é baseado na observação do movimento Browniano da microesfera. Para tanto, utilizamos um sistema de captura de vídeo digital acoplado ao microscópio. Basicamente, o que fazemos é conectar a câmera CCD a uma placa de captura de vídeo localizada em um computador, e desta maneira fazemos um filme digital do movimento Browniano da microesfera. Este filme é analisado com o programa *ImageJ*. Este programa possui um aplicativo capaz de determinar a posição  $(x, y)$  do

---

centro da microesfera ao longo do tempo. Usamos uma taxa de captura de aproximadamente 28 *frames* por segundo.

Conhecendo-se a posição  $(x, y)$  do centro da microesfera ao longo do tempo, podemos determinar (numericamente) para cada instante de tempo o deslocamento quadrático médio da microesfera, dado por

$$\langle \Delta r^2 \rangle = \langle \Delta x^2 + \Delta y^2 \rangle, \quad (\text{A.1})$$

onde  $\Delta x$  e  $\Delta y$  são as diferenças entre as coordenadas do centro da microesfera calculadas em intervalos de tempos sucessivos.

Para garantir uma boa precisão do método na determinação de  $\langle \Delta r^2 \rangle$ , precisamos de um número razoável de medidas para aumentar a estatística do experimento. Esta estatística pode ser aumentada de maneira simples usando-se o seguinte procedimento. Inicialmente, mantemos a microesfera presa na pinça óptica. Desligando e religando a pinça em intervalos de tempos regulares, cada intervalo de tempo onde a pinça permanece desligada corresponde a um novo experimento, onde a microesfera executa movimento Browniano livre. A grande vantagem deste procedimento é que podemos calcular  $\Delta x$  e  $\Delta y$  também entre experimentos diferentes, já que a origem (posição fixa da pinça) é comum a todos eles e o número de *frames* capturados em cada experimento é o mesmo, pois o intervalo de tempo durante o qual desligamos periodicamente a pinça é fixo. Calculando  $\Delta x$  e  $\Delta y$  entre pontos do mesmo experimento e entre experimentos diferentes, aumentamos consideravelmente a estatística, obtendo um resultado final muito mais preciso. Além disso, o uso da pinça óptica tem a vantagem de controlar precisamente a altura  $h$  da microesfera. Maiores detalhes sobre este procedimento podem ser encontrados na ref. [14].

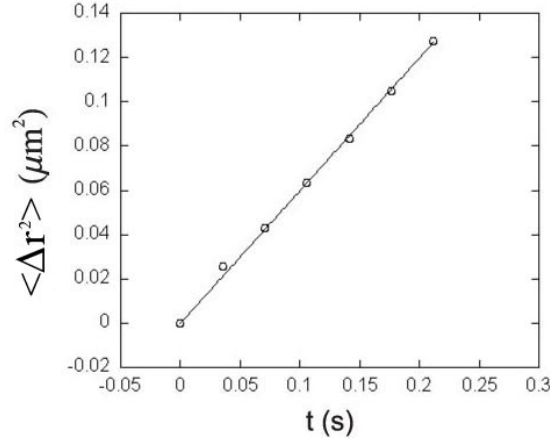
De posse dos valores de  $\langle \Delta r^2 \rangle$  para cada instante de tempo, construímos o gráfico  $\langle \Delta r^2 \rangle \times t$ . Este gráfico é uma reta e pode ser ajustado com a relação de Einstein discutida no Capítulo 2,

$$\langle \Delta r^2 \rangle = 4Dt, \quad (\text{A.2})$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão da microesfera.

Deste ajuste, determinamos o coeficiente de difusão. A Fig. A.1 mostra

um típico dado obtido usando-se este procedimento. Os círculos correspondem os pontos experimentais e a linha sólida ao ajuste com a Eq. A.2.



**Figura A.1:** Típico gráfico da análise do movimento Browniano ( $\langle \Delta r^2 \rangle \times t$ ) de uma microesfera livre em solução aquosa. *Círculos:* pontos experimentais; *Linha sólida:* ajuste com a Eq. A.2.

De posse do coeficiente de difusão, determinamos o coeficiente de atrito viscoso sobre a microesfera com a relação

$$\gamma = \frac{k_B T}{D}, \quad (\text{A.3})$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta.

Conforme discutido no Capítulo 2,  $\gamma$  é uma função do raio  $a$  e da altura  $h$  da microesfera em relação à lamínula. A altura da microesfera é determinada e mantida fixa usando-se o procedimento descrito no final da seção 2.3.5. Usando as Eqs. 2.15 e 2.16, determinamos então numericamente o raio  $a$  da microesfera. Observe que a viscosidade do meio (água) precisa ser conhecida, pois faz parte da Eq. 2.16. Usamos em cada experimento o valor conhecido da viscosidade da água corrigido para a temperatura ambiente.

Este método é bastante útil devido a sua relativa simplicidade. Ele também pode ser usado para se determinar a viscosidade de um certo líquido usando-se uma microesfera com raio conhecido.

Por fim, para testar a funcionalidade e a precisão do método, realizamos testes com algumas esferas de poliestireno calibradas, comparando o valor do

raio obtido com nosso método com o indicado pelo fabricante. Encontramos uma diferença máxima de 10% entre os resultados obtidos experimentalmente e os valores nominais dos raios, indicando uma boa eficiência do método. Como exemplo, para uma microesfera de poliestireno calibrada (Polysciences) com  $a = 1,52 \pm 0,02 \mu\text{m}$ , obtemos com este método  $a = 1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ .

---

## Apêndice B

# Parâmetros importantes na comparação absoluta entre experimento e Teoria MDSA

Para estabelecermos a comparação entre nossos dados experimentais e a teoria MDSA de pinças ópticas, é fundamental que possamos medir com precisão alguns parâmetros do sistema que discutiremos a seguir. A teoria MDSA é formulada inteiramente em termos de parâmetros mensuráveis, portanto, a comparação com nossos dados é dita absoluta, já que medimos todos os parâmetros necessários para obter os dados teóricos.

Os resultados obtidos, que mostram a comparação entre a teoria e o experimento, estão sumarizados nas Figs. 2.9 e 2.10, no Capítulo 2.

### B.1 Potência local do laser na microesfera

O primeiro parâmetro que precisamos conhecer para gerar os resultados teóricos é a potência local do laser da pinça óptica na microesfera presa (ou seja, no foco do feixe). Observe que não precisamos medir esta potência para determinar experimentalmente a constante de força da pinça óptica (ver Capítulo 2). Entretanto, o conhecimento do valor desta potência é necessário para o cálculo da constante de força com a teoria MDSA.

Medir a potência local do feixe de laser no foco não é um problema dos

---

mais simples. Não podemos simplesmente colocar um detector de fótons após a objetiva, pois a alta focalização do feixe causa um erro muito grande na medição, uma vez que os raios com maiores ângulos de incidência tendem a sofrer reflexão total. Empregamos então dois métodos diferentes para medir esta potência local: o método da objetiva dupla e um microbolômetro de mercúrio.

### B.1.1 Método da objetiva dupla

A Fig. B.1 mostra o esquema experimental usado no método da objetiva dupla. A objetiva 1 está conectada ao microscópio e é a responsável por focalizar o feixe de laser. Acima desta objetiva colocamos uma lamínula de vidro para servir de suporte, e acima da lamínula, colocamos uma segunda objetiva, idêntica à primeira. Entre as objetivas e a lamínula existem camadas de óleo mineral ( $n = 1,496$ ) para minimizar as perdas, visto que o óleo tem um índice de refração muito próximo do vidro ( $n = 1,5$ ). A segunda objetiva, situada numa posição invertida em relação à primeira, fará o feixe tornar-se novamente cilíndrico após atravessá-la. Desta forma, podemos colocar um detector de fótons após a segunda objetiva e medir a potência.

Construindo então um gráfico da potência de saída em função da potência de entrada nesta montagem, determinamos a transmitância do sistema de duas objetivas, que neste caso é basicamente a transmitância de uma objetiva ao quadrado [85]. O valor encontrado para a transmitância de uma única objetiva usando este método foi  $T_r = 0,45 \pm 0,03$ .

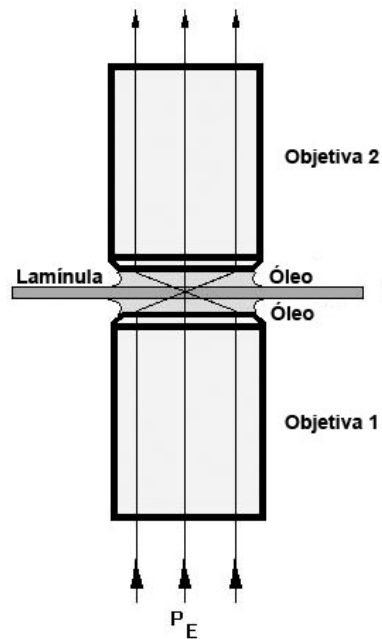
Determinada a transmitância da objetiva  $T_r$ , a potência local  $P_L$  é relacionada trivialmente com a potência de entrada  $P_E$  na objetiva através da expressão

$$P_L = T_r P_E, \quad (\text{B.1})$$

Desta forma, determinada a transmitância, só precisamos nos preocupar em medir a potência de entrada  $P_E$  com o detector de fótons, e assim a potência local  $P_L$  estará automaticamente determinada.

Recentemente, aplicamos este método da objetiva dupla para estudar a variação da transmitância de uma objetiva em função da largura  $\sigma$  do

---



**Figura B.1:** Montagem utilizada no método da objetiva dupla. A objetiva 1 está conectada ao microscópio. Como as duas objetivas são idênticas, o feixe emerge cilíndrico após a objetiva 2, e assim podemos medir a potência facilmente usando um detector de fótons.

perfil gaussiano de intensidade do laser que a atravessa [85]. Mostramos que a transmitância da objetiva não é uniforme, dependendo sensivelmente do valor de  $\sigma$ . No caso, as objetivas utilizadas no experimento foram da marca Nikon, com aumento de 100X e abertura numérica  $NA = 1,4$ . Entretanto, este efeito é pequeno para o valor de  $\sigma$  do nosso laser, usado em todos os experimentos deste trabalho. Isto acontece porque neste caso a largura do feixe de laser é muito menor que o raio da abertura da entrada da objetiva ( $\sigma \ll R_{objetiva}$ ) [85]. Desta forma, a transmitância medida no experimento, que é a transmitância média, coincide com a transmitância axial\* da objetiva, calculada em [85], com erro pequeno. Uma discussão mais detalhada desta característica singular das objetivas pode ser encontrada na ref. [85].

---

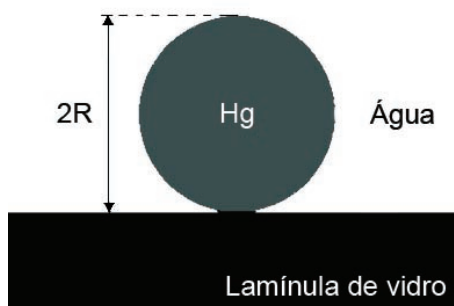
\*Esta seria a transmitância para um raio (feixe muito estreito) passando exatamente pelo centro da objetiva.

---

### B.1.2 Método do microbolômetro de mercúrio

O método do microbolômetro de mercúrio consiste usar a propriedade deste material de absorver grande parte da potência incidente sobre ele para medir a potência local do laser no foco.

Neste experimento, nossa amostra consiste em uma solução de água deionizada contendo muitas esferas de mercúrio de diversos tamanhos (escala de micrômetro). Para obter as microesferas de mercúrio nesta escala de tamanho, colocamos primeiramente uma pequena gota de mercúrio sobre uma folha de papel limpa, dobrando em seguida a folha e batendo com a mão sobre a gota de mercúrio. Esta então se espalha pela folha, formando microesferas com raio na faixa dos  $100 \mu\text{m}$ . Estas microesferas são então colocadas em nosso porta-amostras convencional, que é tampado inicialmente sem água. Fazemos então o feixe de laser incidir sobre uma destas microesferas para vaporizá-la, o que permite obter microesferas com raio na escala de poucos micrômetros. O porta-amostras é então finalmente enchido com água deionizada. A Fig. B.2 é um desenho esquemático da nossa amostra.



**Figura B.2:** Amostra utilizada no experimento do microbolômetro de mercúrio: microesferas feitas com este material, de diferentes raios  $R$ , localizadas em água deionizada.

A técnica consiste em focalizar o laser da pinça óptica sobre uma microesfera qualquer de mercúrio. Esta microesfera começa então a absorver energia, aumentando sua temperatura. Como a microesfera está mergulhada em água, esta também começa a absorver calor nas imediações da microesfera, atingindo após certo tempo a sua temperatura de ebulição ( $97,2^\circ\text{C}$  no nosso laboratório). Quando isto acontece, a água ao redor da microesfera

---

começa a entrar em ebulição, e observamos um “salto” da microesfera, que muda rapidamente de posição, tornando este ponto de fácil determinação. Nas refs. [87] e [86] a física deste problema é discutida com mais detalhes. Nestes artigos, é mostrado que a transmissão de calor se dá basicamente por condução (os efeitos de convecção são desprezíveis neste experimento). É mostrado ainda que o estado estacionário do processo é atingido muito rapidamente ( $\sim 1$  s), o que faz com que a potência usada no laser seja o fator determinante para que possamos observar o “salto” da microesfera. Como a condutividade térmica do mercúrio é muito maior que a da água, a temperatura da esfera rapidamente atinge o valor estacionário, permanecendo constante. Obviamente, esferas maiores precisam de uma potência maior incidindo sobre elas para que possam “saltar”.

O experimento é então realizado da seguinte maneira: primeiramente ajustamos a potência de entrada do laser na objetiva ( $P_E$ ) para um valor próximo de zero. Escolhemos então uma microesfera qualquer e focalizamos o laser sobre esta. Em seguida, vamos aumentando vagarosamente o valor de  $P_E$  até observar o “salto” da microesfera, que ocorre quando a água ao seu redor inicia o processo de ebulição, ou seja, quando a temperatura atingida é  $97,2^\circ\text{C}$ . Anotamos o valor de  $P_E$  quando isto ocorre (esta potência é medida usando-se um medidor de potência convencional, já que o feixe na entrada da objetiva é cilíndrico).

Nas refs. [87] e [86] é mostrado que existe uma relação linear entre o raio  $R$  da microesfera e a potência de entrada  $P_E$  na objetiva que causa o “salto” da microesfera,

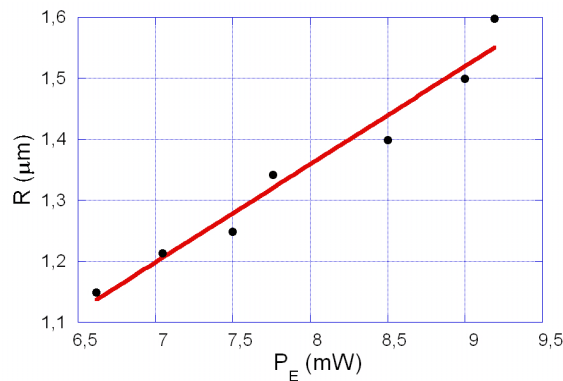
$$R = \frac{AT_r}{4\pi\kappa_{ef}(T_b - T_0)} P_E, \quad (\text{B.2})$$

onde  $A = 0,272$  é o coeficiente de absorção do mercúrio para  $\lambda = 832$  nm,  $T_r$  é a transmitância do sistema,  $\kappa_{ef} = 0,781$  W/mK é a condutividade térmica efetiva do sistema (ver refs. [87] e [86]),  $T_b$  é a temperatura de ebulição do meio (água deionizada) e  $T_0$  é a temperatura ambiente.

Para determinar o raio  $R$  das microesferas de mercúrio, não podemos usar a técnica descrita no Capítulo 2, visto que neste caso as microesferas permanecem encostadas na lamínula e não executam movimento Browniano.

Filmamos então a imagem de cada microesfera e usamos uma calibração para determinar seu raio através de uma análise digital das imagens (ver detalhes nas refs. [87] e [86]). Este método, entretanto, é menos preciso do que o método discutido no Capítulo 2 que usamos para determinar o tamanho das microesferas de óleo.

Repetindo o experimento para diversas microesferas de tamanhos diferentes, construímos um gráfico do raio  $R$  da esfera de mercúrio em função da potência de entrada  $P_E$  do laser. Ajustando os pontos experimentais com a Eq. B.2, determinamos a transmitância  $T_r$  da objetiva. O valor encontrado para a transmitância com este método foi  $T_r = 0,40 \pm 0,04$ . A Fig. B.3 mostra o resultado de um típico experimento realizado. Os círculos correspondem aos pontos experimentais e a linha sólida corresponde ao ajuste com a Eq. B.2.



**Figura B.3:** Resultado de um típico experimento realizado com o microbolômetro de mercúrio, mostrando o raio  $R$  das microesferas como função da potência  $P_E$  com a qual a microesfera “salta”. *Círculos:* pontos experimentais; *Linha sólida:* ajuste com a Eq. B.2.

Por fim, observe que as valores da transmitância  $T_r$  medidos pelos dois métodos diferentes (objetiva dupla e microbolômetro) concordam dentro das barras de erro experimentais.

Uma descrição completa da técnica, desde a preparação da amostra até a dedução matemática da Eq. B.2 pode ser encontrada nas refs. [87] e [86].

## B.2 Largura $\sigma$ do perfil de intensidade gaussiano do laser antes da objetiva

O segundo parâmetro fundamental, necessário para obter os resultados da teoria MDSA, é a largura  $\sigma$  do feixe de laser da pinça óptica antes de atravessar a objetiva. Conforme discutido no Capítulo 2, este feixe é cilíndrico antes da objetiva, e possui um perfil de intensidades gaussiano. A largura  $\sigma$  é o desvio padrão da gaussiana.

Para determinar  $\sigma$ , precisamos medir a intensidade  $I(\rho)$  do feixe em função distância radial  $\rho$  em relação ao centro do feixe. Para tanto, utilizamos novamente duas técnicas diferentes.

A primeira técnica consiste em capturar diretamente a imagem do laser da pinça usando a própria câmera CCD acoplada ao microscópio. Para tanto, retiramos a objetiva do microscópio e colocamos um espelho plano em seu lugar. O laser é dessa forma refletido de volta para dentro do microscópio, e sua imagem é então capturada com a câmera CCD. Através de uma análise digital desta imagem, o programa *ImageJ* fornece o gráfico de  $I(\rho) \times \rho$ . Ajustando a curva experimental com uma gaussiana do tipo

$$I(\rho) = I_0 \exp\left(\frac{-\rho^2}{2\sigma^2}\right), \quad (\text{B.3})$$

determinamos imediatamente  $\sigma$  deste ajuste. Obtemos com este método o valor  $\sigma = 1,1 \pm 0,1$  mm.

A segunda técnica consiste em utilizar um diafragma de abertura circular, concêntrico ao feixe. Após o diafragma, colocamos um detector de fótons (medidor convencional de potência). Desta forma, medimos a potência do feixe para diversas aberturas  $R$  do diafragma, obtendo o gráfico de  $P(R) \times R$ . Neste caso, o dado experimental é ajustado com uma curva do tipo

$$P(R) = P_T \left[ 1 - \exp\left(\frac{-R^2}{2\sigma^2}\right) \right], \quad (\text{B.4})$$

onde  $P_T$  é a potência total do laser incidente no diafragma. Deste ajuste, também determinamos o valor de  $\sigma$ . Obtemos com este método o valor  $\sigma = 1,3 \pm 0,1$  mm.

---

As duas técnicas fornecem valores para  $\sigma$  que estão em acordo dentro do erro experimental. O valor médio é então encontrado fazendo-se a média simples dos valores obtidos com as duas técnicas:  $\sigma = 1,2 \pm 0,1$  mm.

### B.3 Medida dos índices de refração das substâncias utilizadas

O último parâmetro que precisamos medir para obter os resultados da teoria MDSA são os índices de refração das substâncias utilizadas: água deionizada (meio onde as microesferas se encontram) e o óleo mineral usado na fabricação das microesferas.

Para medir os índices de refração destas substâncias, utilizamos o seguinte procedimento:

- 1) Construimos uma cubeta em forma de prisma triangular equilátero colando lâminas de vidro umas nas outras. Deixamos a parte superior do prisma aberta para colocar a substância que queremos medir o índice de refração.

- 2) Fazemos então o laser incidir sobre a cubeta contendo a substância e observamos o desvio sofrido por este raio devido a refração pela substância.

- 3) Analisando o quanto o raio desvia de sua trajetória original, conseguimos determinar o índice de refração da substância contida na cubeta. Para obter uma maior precisão nesta medida, usamos o método do desvio mínimo de um raio refratando em um prisma, que está descrito em detalhes na ref. [10].

Para o comprimento de onda do nosso laser ( $\lambda = 832$  nm), a  $24^\circ\text{C}$ , obtemos para a água deionizada um índice de refração de  $1,343 \pm 0,002$  e para o óleo mineral, um índice de refração de  $1,496 \pm 0,002$ .

---

## Apêndice C

### Cálculo de $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero nos limites rígido e flexível.

Seja  $\vec{r}(0)$  o vetor posição da primeira extremidade da cadeia polimérica e  $\vec{r}(L)$  o vetor posição da outra extremidade. Observe que estamos com isso colocando a primeira extremidade em  $s = 0$ , e conseqüentemente, a outra extremidade estará em  $s = L$ , o comprimento de contorno da molécula.

O vetor cujo módulo é a distância entre as duas extremidades é dado por

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}(L) - \vec{r}(0), \quad (\text{C.1})$$

e assim

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}(L) - \vec{r}(0)]^2 \rangle. \quad (\text{C.2})$$

Mas, sabemos que

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}, \quad (\text{C.3})$$

e assim

$$\int_0^s d\vec{r} = \int_0^s \hat{t}(s') ds', \quad (\text{C.4})$$

o que dá imediatamente

$$\vec{r}(s) = \vec{r}(0) + \int_0^s \hat{t}(s') ds', \quad (\text{C.5})$$

Assim, usando a Eq. C.2, teremos

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \left\langle \left[ \int_0^s \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[ \int_0^s \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \\ &= \int_0^L ds'' \int_0^L ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle. \end{aligned} \quad (\text{C.6})$$

Mas sabemos que

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{A}\right), \quad (\text{C.7})$$

e como a origem não muda a física do sistema, podemos escrever

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \exp\left(-\frac{|s' - s''|}{A}\right). \quad (\text{C.8})$$

Substituindo C.8 em C.6, podemos dividir a integral em duas partes iguais, onde uma variável permanece sempre menor que a outra, e assim podemos escrever

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2 \int_0^L \exp\left(\frac{-s''}{A}\right) ds'' \int_0^{s''} \exp\left(\frac{s'}{A}\right) ds'. \quad (\text{C.9})$$

Esta integral é trivial de ser resolvida, e o resultado é

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2AL - 2A^2 \left[ 1 - \exp\left(\frac{-L}{A}\right) \right]. \quad (\text{C.10})$$

Agora temos os dois limites opostos:

(a) Para  $L \gg A$  (limite flexível), obtemos imediatamente

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL, \quad (\text{C.11})$$

(b) Para  $L \ll A$  (limite rígido), expandindo a exponencial até segunda ordem, obtemos

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong L^2. \quad (\text{C.12})$$

Estes são os resultados apresentados no Capítulo 3, Eq. 3.16 e 3.17, para a distância quadrática média entre as duas extremidades do polímero nos limites rígido e flexível. Observe que no limite flexível a distância entre as extremidades depende fortemente do comprimento de persistência da molécula, como era de se esperar. Por outro lado, no limite rígido, esta distância é o próprio comprimento de contorno da molécula, já que neste caso o polímero se assemelha a uma vareta rígida.

---

## Apêndice D

### Cálculo do valor médio de $|t_{\perp}|^2$ (Modelo WLC)

Partiremos da Eq. 3.31. Para cada modo normal, teremos a energia

$$E_i = \frac{1}{2}k_B T \left( Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2. \quad (\text{D.1})$$

A função de partição do sistema será então

$$\begin{aligned} Z &= \int \exp\left(-\frac{E_i}{k_B T}\right) d|\tilde{t}_i(q)| = \\ &= \int \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right) |\tilde{t}_i(q)|^2\right] d|\tilde{t}_i(q)| = \\ &= \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{Aq^2 k_B T + F}} \end{aligned} \quad (\text{D.2})$$

Assim, podemos facilmente calcular o valor médio de  $|\tilde{t}_i(q)|^2$ , que por definição, é dado por

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{Z} \int |\tilde{t}_i(q)|^2 \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right) |\tilde{t}_i(q)|^2\right] d|\tilde{t}_i(q)|. \quad (\text{D.3})$$

Esta integral é da forma gaussiana e possui solução tabelada. Substituindo a função de partição  $Z$  no denominador pela Eq. D.3, chegamos ao resultado

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{Aq^2 k_B T + F} \quad (\text{D.4})$$

Finalmente, o valor médio de  $|t_\perp|^2$  pode ser calculado integrando-se o valor médio de  $|\tilde{t}_i(q)|^2$  sobre todos os modos e multiplicando o resultado final por um fator 2, que corresponde às duas componentes ( $x$  e  $y$ ) de  $\vec{t}_\perp$ . Dessa forma

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{\pi} \int dq \left( \frac{k_B T}{Aq^2 k_B T + F} \right) \quad (\text{D.5})$$

Com uma simples mudança de variável (chame  $x^2 = Ak_B T q^2 / F$ ), identificamos o resultado da integral como sendo a função arco-tangente, e nos limites de integração ( $-\infty$  a  $+\infty$ ), o resultado final é

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}, \quad (\text{D.6})$$

que é a Eq. 3.32.

## Apêndice E

### O modelo de exclusão de vizinhos

Para formular sua conhecida expressão fechada para o modelo de exclusão de vizinhos, Eq. 4.1, McGhee e von Hippel usaram o procedimento descrito a seguir.

(a) A molécula de DNA livre de fármacos é considerada uma rede unidimensional com muitos sítios livres ligáveis. Podemos considerar esta rede muito extensa, e assim desprezar os efeitos de borda na análise que virá a seguir.

(b) Os autores consideram primeiramente fenômenos não cooperativos, o que corresponde ao nosso caso experimental. Isto significa que a constante química  $K_i$  é independente do número de moléculas intercaladas [65].

(c) Em uma lacuna (*gap*) da rede, com  $g$  sítios livres, localizada entre duas moléculas ligadas (ver Fig. E.1), o número de sítios ligáveis *nesta lacuna* é  $s = g - n + 1$  para  $g \geq n$  ou  $s = 0$  for  $g < n$ , onde  $n$  é o número de exclusão, *i. e.*, o número de sítios ligáveis ocupados por uma molécula do fármaco ao intercalar. A Fig. E.1 esclarece esta situação para  $g = 5$  e  $n = 3$ , onde temos neste caso  $s = 3$ .

(d) O processo de intercalação pode ser sumarizado pela reação química



onde  $C_f$  é o número de moléculas de fármaco livres em solução,  $\bar{S}$  é o número médio total de sítios livres da molécula de DNA e  $C_b$  é o número de moléculas

---



**Figura E.1:** Uma lacuna (*gap*) com  $g = 5$  sítios ligáveis situado entre duas moléculas ligadas. Neste exemplo, temos  $n = 3$ , o que dá  $s = g - n + 1 = 3$ .

de fármaco ligadas\*.

No equilíbrio químico, podemos escrever

$$K_i = \frac{C_b}{C_f \bar{S}}. \quad (\text{E.2})$$

O número médio de sítios ligáveis *em uma lacuna* pode ser escrito como

$$\bar{s} = \sum_{g=n}^N (g - n + 1) P_g, \quad (\text{E.3})$$

onde  $P_g$  é a probabilidade de uma lacuna particular passar exatamente  $g$  sítios.

Observe que, devido à geometria da rede, quando tivermos  $C_b$  moléculas intercaladas, teremos  $C_b + 1$  lacunas. Desta forma, podemos escrever

$$\bar{S} = (C_b + 1) \bar{s}, \quad (\text{E.4})$$

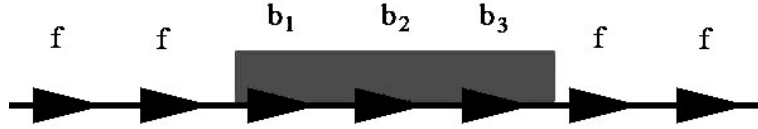
e assim, usando as Eqs. E.2 e E.3, escrevemos

$$\frac{C_b}{C_f} = K_i (C_b + 1) \sum_{g=n}^N (g - n + 1) P_g. \quad (\text{E.5})$$

O principal problema é então encontrar uma expressão para a probabilidade  $P_g$ . Para tanto, adotamos a seguinte notação:

---

\*O volume do sistema considerado é fixo. Desta forma, para simplificar a análise que virá a seguir, representamos as concentrações químicas simplesmente pelo número de moléculas em solução. A concentração real, em número de moléculas por volume, seria este número de moléculas dividida pelo volume da solução.



**Figura E.2:** Notação usada para calcular a probabilidade  $P_g$ .  $f$  é um sítio livre (ligável) da rede e  $b_i$  são os sítios ligados.

- $f$  é um sítio livre (ligável) da rede.
- $b_1, b_2, \dots, b_n$  são o primeiro, o segundo,  $\dots$  e o último sítio ligado por uma única molécula. A Fig. E.2 esquematiza esta notação para  $n = 3$ . Observe que chamamos de  $b_1$  a extremidade esquerda da molécula, enquanto  $b_n$  é a extremidade direita desta mesma molécula.

Usando esta notação, definimos as probabilidades condicionais:

- $P\{f|f\}$  é a probabilidade de encontrar um sítio livre qualquer, se o sítio imediatamente anterior a este for também livre.
- $P\{f|b_1\}$  é a probabilidade de encontrar um sítio qualquer ligado, se o sítio imediatamente anterior a este for livre.

De acordo com esta notação, devemos ter sempre  $P\{b_1|b_2\} = P\{b_2|b_3\} = \dots = P\{b_{n-1}|b_n\} = 1$  para uma molécula com número de exclusão  $n$ . Além disso, devemos ter  $P\{f|b_2\} = P\{f|b_3\} = \dots = P\{f|b_n\} = 0$ , pois um sítio livre só pode ser um vizinho (situado à esquerda) de outro sítio livre ou do primeiro sítio ligado ( $b_1$ ) de uma molécula intercalada.

Usando esta notação, podemos escrever a probabilidade  $P_g$  como

$$P_g = P\{b_n|f\} \times [P\{f|f\}]^{g-1} \times P\{f|b_1\}. \quad (\text{E.6})$$

O número total de sítios ligados da rede é  $C_b n$ , e a fração de sítios ligados por número total de sítios da rede (número de pares de base no caso do DNA) é

$$\frac{C_b n}{C_{pb}} = r n, \quad (\text{E.7})$$

onde  $r = C_b/C_{pb}$  e  $C_{pb}$  é o número de pares de base (sítios da rede).

Dessa forma, a fração de sítios livres é  $1 - nr$ , que é também a probabilidade de encontrar livre um resíduo da rede qualquer, escolhido de forma aleatória.

Assim, a probabilidade de escolher um sítio livre é  $1 - nr$ . O sítio anterior, situado imediatamente à esquerda deste, pode estar livre (com probabilidade  $1 - nr$ ) ou ocupado (com probabilidade  $nr/n = r$ ). Podemos então escrever

$$1 - nr = (1 - nr)P\{f|f\} + rP\{b_n|f\}. \quad (\text{E.8})$$

Observe agora que, necessariamente, devemos ter  $P\{f|f\} = P\{b_n|f\}$ , pois não existe qualquer preferência para um sítio de estar livre ou ocupado. Assim, usando a Eq. E.8, podemos escrever

$$P\{f|f\} = P\{b_n|f\} = \frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \quad (\text{E.9})$$

e

$$P\{f|b_1\} = P\{b_n|b_1\} = 1 - P\{f|f\} = \frac{r}{1 - (n - 1)r}. \quad (\text{E.10})$$

Substituindo as Eqs. E.9 e E.10 na Eq. E.6, obtemos finalmente

$$P_g = \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^g \left[ \frac{r}{1 - (n - 1)r} \right]. \quad (\text{E.11})$$

Com esta expressão para a probabilidade  $P_g$ , podemos calcular facilmente o somatório da Eq. E.3 fazendo  $N \rightarrow \infty$  (assumindo que a rede é muito extensa). Chamando  $x = (1 - nr)/[1 - (n - 1)r]$  e  $a = r/[1 - (n - 1)r]$ , teremos

$$\begin{aligned} \bar{s} &= \sum_{g=n}^{\infty} (g - n + 1)P_g \\ &= \sum_{g=n}^{\infty} (g - n + 1)ax^g \\ &= ax \frac{\partial}{\partial x} \sum_{g=n}^{\infty} x^g + a(1 - n) \sum_{g=n}^{\infty} x^g \\ &= ax \frac{\partial}{\partial x} \left( \frac{x^n}{1 - x} \right) + a(1 - n) \left( \frac{x^n}{1 - x} \right) \end{aligned}$$

$$= \left( \frac{1 - nr}{r} \right) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1}. \quad (\text{E.12})$$

Finalmente, usamos a Eq. E.5 para obter a famosa expressão de McGhee e von Hippel. Como a rede é muito extensa, é razoável fazer a aproximação  $C_b + 1 \sim C_b$  na Eq. E.5, e assim obtemos

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1}, \quad (\text{E.13})$$

que é a Eq. 4.1.

Observe que, para  $n = 1$ , temos  $r/C_f = K_i(1 - r)$ , uma expressão mais simples, derivada por Scatchard [88] em 1949, válida apenas para moléculas pequenas que ocupam apenas um sítio da rede.

Por fim, observe que, de acordo com a Fig. E.2, deveríamos esperar sempre um valor inteiro para  $n$ . Entretanto, a maioria dos resultados encontrados na literatura reportam valores não inteiros para  $n$  [56,58,66,72,82]. Acreditamos que isto ocorre devido ao fato da expressão fechada de McGhee e von Hippel (Eq. E.13) ser ainda uma aproximação. Outros detalhes sobre o modelo de exclusão de vizinhos podem ser encontrados nas refs. [57,65].

## Apêndice F

### Artigos publicados

Neste apêndice apresentamos os artigos publicados durante o período de doutorado do autor desta tese (Março de 2004 a Março de 2008). Começamos citando as referências completas e a seguir incluímos a versão completa de todos os artigos, em ordem cronológica.

- Revista *Journal of Chemical Physics*

**M. S. Rocha, N. B. Viana, and O. N. Mesquita**, “DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment”. *J. Chem. Phys.* 121 (19), 9679-9683 (2004).

- Revista *American Journal of Physics*

**N. B. Viana, M. S. Rocha, and O. N. Mesquita**, “In situ laser power measurement at the focus of microscope objectives used in optical tweezers”. *Am. J. Phys.* 73 (3), 201-205 (2005).

- Revista *Proceedings of SPIE*

**M. S. Rocha and O. N. Mesquita**, “Variation of entropic elasticity of DNA-Psoralen complexes under UV light”. *P. SPIE - Optical Trapping and Optical Micromanipulation II* 5930 (593011), 265-273 (2005).

- Revista *Applied Physics Letters*

**N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. M. Neto, and H. M. Nussenzeig**, “Absolute calibration of optical tweezers”. *Appl. Phys. Lett.* 88 (13), Art. No. 131110 (2006).

---

- 
- Revista *Applied Optics*  
N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, and P. A. M. Neto, “Characterization of objective transmittance for optical tweezers”. *Appl. Optics* 45 (18), 4263-4269 (2006).
  - Revista *Physical Review E*  
N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. M. Neto, and H. M. Nussenzveig, “Towards absolute calibration of optical tweezers”. *Phys. Rev. E* 75 (2), Art. No. 021914 (2007).
  - Revista *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (artigo convidado)  
M. S. Rocha and O. N. Mesquita, “New tools to study biophysical properties of single molecules and single cells”. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79 (1), 17-28 (2007).
  - Revista *Journal of Chemical Physics*  
M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita, “Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules”. *J. Chem. Phys.* 127 (10), Art. No. 105108 (2007).
-

## DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment

M. S. Rocha, N. B. Viana, and O. N. Mesquita

*Departamento de Física, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte, CEP 30123-970 Minas Gerais, Brazil*

(Received 20 May 2004; accepted 24 August 2004)

By attaching one end of a single  $\lambda$ -DNA molecule to a microscope coverslip and the other end to a polystyrene microsphere trapped by an optical tweezers, we can study the entropic elasticity of the  $\lambda$ -DNA by measuring force versus extension as we stretch the molecule. This powerful method permits single molecule studies. We are particularly interested in the effects of the photosensitive drug psoralen on the elasticity of the DNA molecule. We have illuminated the sample with different light sources, studying how the different wavelengths affect the psoralen-DNA linkage. To do this, we measure the persistence length of individual DNA-psoralen complexes. © 2004 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.1806817]

### I. INTRODUCTION

A single laser beam focused by a high numerical aperture microscope objective is able to trap small dielectric particles near the lens focus. Such an arrangement is called an optical tweezer<sup>1-3</sup> and has a wide range of applications in Physics, Chemistry, and Biology.<sup>2,4,5</sup> Optical tweezers have the great advantage to permit manipulation and observation of a single individual object, such as a microsphere, a macromolecule, or even a live cell.

In this work we have studied entropic elasticity variations of a  $\lambda$ -DNA molecule in a solution with the photosensitive drug psoralen (*Furo 3,2-g Coumarin*,  $C_{11}H_6O_3$ ) using optical tweezers and intensity autocorrelation spectroscopy. To do this, we attach a polystyrene microsphere to one end of the molecule. The other end of the molecule is then attached to a microscope coverslip, so we can manipulate and stretch the molecule using the optical tweezers, which trap the polystyrene bead, to obtain a force versus extension curve. Displacements are measured by analyzing the backscattered light from the polystyrene bead attached to the DNA molecule.<sup>6</sup> We use a SDL infrared laser ( $\lambda=832$  nm) to trap the sphere and a He-Ne laser ( $\lambda=632.8$  nm) as the scattering probe, which is used in two ways: to measure the sphere Brownian fluctuations and the deviation of its trap equilibrium position when attached to DNA. With the first measurement we calibrate the trap and with the second measurement we determine the DNA stretching force. We describe this procedure in detail in Sec. II.

Psoralen is the effective ingredient extracted from a Chinese herb (*Psorales corylifolia*, *L.*). It is a well-known photosensitive drug used to treat some skin diseases by a technique called PUVA (psoralen followed by ultraviolet-A light).<sup>7,8</sup> PUVA therapy is a treatment that consists in taking a medicine containing psoralen and exposing the patient to UVA light. The drug effectively increases the skin sensitivity to UVA and the skin melanin level. Psoriasis, vitiligo, and some dermatitis are examples of diseases which can be treated using psoralen.<sup>9-11</sup>

Psoralen has also been used during the last years to study the structure of DNA and RNA molecules. Its derivatives are

known to bind to DNA and RNA and covalently attach when exposed to light of appropriate wavelength. The psoralen-DNA structure prevents the passage of polymerase or transcriptase enzymes, impeding DNA replication.<sup>12</sup> The drug links to DNA modifying its elasticity. It has been also speculated that a psoralen-DNA linkage changes the local elasticity of DNA, making this site recognizable by correction enzymes.<sup>13</sup> If this is true, we should see some effect due to psoralen-DNA linkage on the entropic elasticity of the complex. In fact, we observe a great change in the persistence length of the DNA as it interacts with psoralen.

The psoralen-DNA linkage can be explained in a few steps.<sup>13,14</sup>

(a) Intercalation: Psoralen intercalates the DNA basis, without linking to them. This intercalation is already capable of modifying the elasticity of the molecule, as we discuss in Sec. III. If the sample is not illuminated with UVA light, the drug does not link to the basis.

(b) Monoadducts formation: If one illuminates the sample with UVA light ( $\lambda=320-400$  nm), an intercalated drug molecule absorbs a photon and covalently attaches to a pyrimidine basis, specially to a thymine, forming a monoadduct.

(c) Cross links formation: If the UVA illumination continues, the drug can absorb another photon and form a cross link on the DNA molecule. For this, there must exist a pyrimidine in the other strand of the DNA molecule near the pyrimidine which the drug has formed the monoadduct.

(d) Cross links break: If one illuminates the sample after step (c) with UVB light ( $\lambda=240-310$  nm), the cross links break and we will have only monoadducts.

As we discuss in Sec. III, our results show that the intercalation increases the rigidity of the DNA molecule while the monoadduct formation decreases it. The crosslink formation, finally, increases again the molecule rigidity.

### II. EXPERIMENTAL PROCEDURE

#### A. Sample preparation

In this work, the samples consist of a PBS (phosphate buffer saline) solution with  $pH=7.4$  and  $[Na]=150$  nM con-

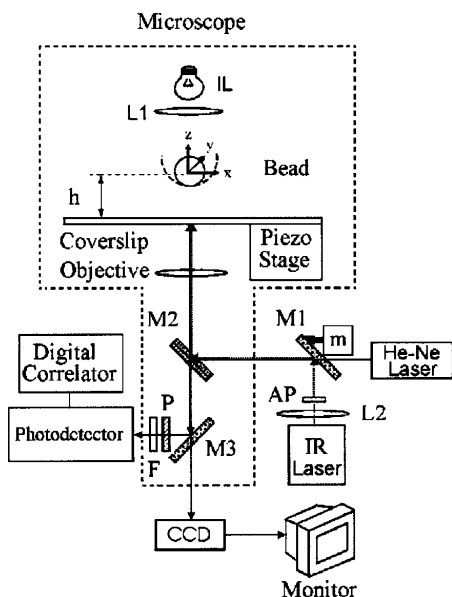


FIG. 1. Experimental setup around the Nikon TE300. AP is an anamorphic prim,  $M1$  and  $M2$  are dichroic mirrors for maximizing IR reflections,  $m$  is a dc motor to move the IR beam,  $M3$  is a movable prism inside the microscope to switch different paths,  $P$  is a polarizer,  $F$  is a 632.8 nm line filter, the Photodetector is an EGG SPCM-200-PQ-F500, and the digital correlator is a Brookhaven BI-9000AT.

taining the DNA molecules and polystyrene beads with 2.8  $\mu\text{m}$  diameter. In this solution, we add psoralen immediately before the measurements. Since psoralen is insoluble in PBS, we first prepare an ethanol-psoralen solution with concentration 0.5 g/L (solution A). We then mix 1  $\mu\text{l}$  of solution A in 1 ml of PBS, obtaining the final solution ready for the experiments. As we have previously commented, we have to attach one end of the DNA molecule to the polystyrene bead and the other end to the coverslip, so we can stretch and manipulate the molecule moving the bead or the coverslip. These attachments are controlled by the solution pH and ionic concentration. The solution is prepared following the procedure described in Ref. 15. To guarantee that we have only one single molecule attached between the coverslip and the bead, we stretch the DNA along different directions using the optical tweezers to trap the polystyrene bead. We observe that the elongation of the molecule from the equilibrium position until the position that the bead escapes from the tweezers is the same along each direction, indicating that there is only one DNA molecule attached to the bead. A more detailed discussion about this question can be found in Ref. 16.

**B. Experimental setup**

In Fig. 1 we show the schematic drawing of our experimental setup.<sup>6</sup> An inverted optical microscope Nikon TE300 with infinite corrected objective (100 $\times$ , N.A.=1.4) is used to make the optical tweezers, observe the microspheres and collect the scattered light. In one port of the microscope we use

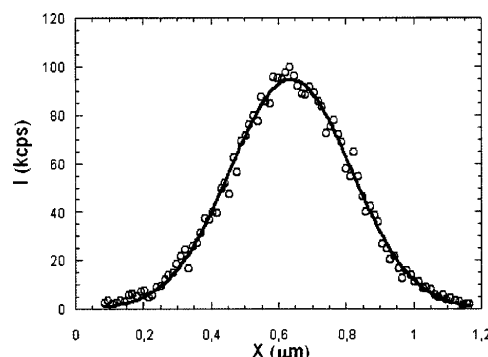


FIG. 2. Typical backscattering profile showing intensity (in units of kilo-counts per second—kcps) as a function of the bead position. Fitting this curve to Eq. (1) we can determine the constants  $I_0$ ,  $\bar{x}$ , and  $\sigma$ .

a charge-coupled device (CCD) camera (CCD-72 DAGE-MTI) for visualization, and in the other port we use a photodetector (EGG—Photon Counting Module, SPCM-200-PQ-F500), with collection diameter of 150  $\mu\text{m}$  mounted in Newport XY stages for precise positioning. The photodetector delivers TTL pulses ready to be fed into a Brookhaven BI-9000AT digital correlator. An infrared (IR) laser (SDL, 5422-H1) operating at 832 nm is used for the optical tweezers. A He-Ne laser (SP-127), operating at 632.8 nm, is the scattering probe. A 20 nm width line filter is put in front of the photodetector to eliminate IR and any other light than the He-Ne laser light. A half-wave plate and polarizers are used to control the intensity and polarization of the He-Ne incident and scattered light. A motor  $m$  is connected to mirror  $M1$ , which drives the IR laser on the objective. The purpose of this motor is to move the IR beam and, consequently, move the trapped bead in relation to the fixed He-Ne laser beam to obtain the backscattering profile. By knowing the backscattering profile and measuring the backscattered light intensity autocorrelation function (ACF), one can obtain the decay time of the Brownian position fluctuations, and finally get the trap stiffness. This procedure is described in detail by Viana *et al.*<sup>6</sup>

By knowing the bead speed, one can easily convert time into position and obtain the backscattered intensity as a function of the bead position. We measure the bead speed recording the motion with the CCD camera and analyzing the images.

**C. Backscattering profile**

The incidence direction of both lasers is the  $z$  axis. The backscattering profile is obtained moving the trapped bead in relation to the fixed He-Ne laser beam along a direction perpendicular to the  $z$  axis, i.e., in the plane of the coverslip indicated in Fig. 1. Since we are interested in the force of the DNA molecule along the  $x$  axis, the axis of motion of the microscope stage, we also choose this direction to measure the backscattering profile. To move the trapped bead, we use the motor  $m$ , as described in Ref. 6. This motor moves the IR beam, and consequently the trapped bead. In Fig. 2 we show

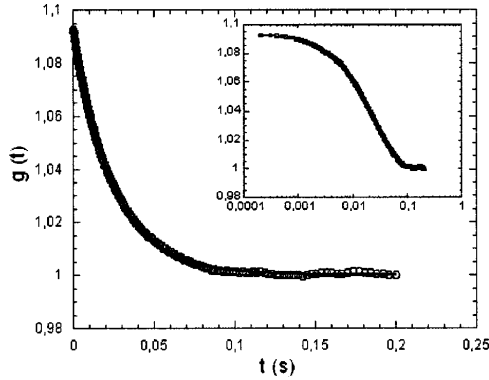


FIG. 3. Typical normalized ACF fitted to Eq. (2). *Inset:* same ACF in a semilog plot.

a typical backscattering profile fitted to Eq. (1),

$$I = I_0 \exp\left[-\frac{(x - \bar{x})^2}{2\sigma^2}\right]. \quad (1)$$

#### D. Temporal-intensity autocorrelation functions (ACFs)

Since the bead attached to the DNA molecule is trapped by the potential well of the optical tweezers, it is essential to measure the trap stiffness  $\kappa$  of the tweezers in order to be able to measure the force exerted by the DNA molecule. We use the technique described in Ref. 6. Since the bead performs a Brownian motion in this potential well, the backscattered light fluctuates accordingly. Therefore, by measuring the time intensity ACF, one can obtain the Brownian relaxation time of the bead. The digital correlator returns the ACFs, which after normalization can be fitted to the equation below,<sup>6</sup>

$$g(t) = 1 + A_{\parallel} \exp(-t/\tau_{\parallel}) + A_z \exp(-t/\tau_z), \quad (2)$$

where  $A_{\parallel}$  and  $A_z$  are the amplitudes, and  $\tau_{\parallel}$  and  $\tau_z$  are the decay times of the Brownian motion of the bead in the respective directions. We can determine the constants  $A_{\parallel}$ ,  $A_z$ ,  $\tau_{\parallel}$ , and  $\tau_z$  from this fitting. Since we are interested in the motion in the plane parallel to the coverslip, we just use the results related to the short decay time exponential, since  $\kappa_{\parallel} \gg \kappa_z$ .<sup>6</sup> Figure 3 shows a typical normalized ACF fitted to Eq. (2).

#### E. Trap stiffness

From the ACFs, we can determine the stiffness of the optical tweezers in  $x$  direction with the relation

$$\kappa_x = \kappa_y = \gamma_{\parallel} / \tau_{\parallel}, \quad (3)$$

where  $\gamma_{\parallel}$  is the friction on the bead for motion parallel to the coverslip, which depends on the microsphere radius, the distance from its center to the coverslip and the medium viscosity. The transverse  $\gamma_{\perp}$  can be written as<sup>17,18</sup>

$$\frac{\gamma_{\parallel}}{\gamma_0} = \left[ 1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h}\right)^5 \right]^{-1}, \quad (4)$$

where  $a$  is the radius of the microsphere and  $h$  is the distance from its center to the coverslip. In this work, we have  $a = 1.4 \mu\text{m}$  and  $h = 3.5 \mu\text{m}$ . Finally,

$$\gamma_0 = 6 \pi \eta a, \quad (5)$$

where  $\eta$  is the medium viscosity. In our work, the medium is the PBS solution, with basically water viscosity. For  $T = 26 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\eta = 9 \times 10^{-3}$  poise.

#### F. Stretching intensity profile

The next step is to measure the backscattering profile while stretching the DNA molecule, which we call stretching intensity profile. To do this, we position the center of the trap with the bead and the unstretched DNA at a particular position  $x_e$  of the backscattering profile. Next, we move the coverslip along  $x$  direction with a constant velocity ( $0.055 \mu\text{m/s}$ ) using a second motor  $m_2$ . Then, the molecule is stretched along  $x$  direction. The DNA molecule applies a force on the bead, trying to pull it out from the potential well of the optical tweezers. In the equilibrium situation, this force will be equal, in modulus, to the force that the optical tweezers do on the bead. If we measure the backscattered intensity as a function of time until the bead escapes from the tweezers, we can determine the force exerted by the molecule as a function of its elongation.

#### G. Contour and persistence lengths of the DNA molecules

The contour and persistence length of the DNA molecules can be obtained if we know the force exerted by the molecule as a function of  $x_{\text{DNA}}$ , where  $x_{\text{DNA}}$  is the DNA length projection along the  $x$  axis. We determine  $x_{\text{DNA}}$  by measuring the displacement of the coverslip imposed by the motor  $m_2$ , which moves the coverslip with constant velocity. The “ $F$  versus  $x_{\text{DNA}}$ ” data can be obtained from the stretching profile. First, we transform time into position by knowing the velocity of the coverslip. Next, we determine the variation of the bead position in the potential well as the DNA molecule is stretched, given by  $\Delta x = x - x_e$ , where  $x_e$  is the equilibrium position of the bead, where the DNA molecule is not stretched, and  $x$  is the position of the bead when the DNA is stretched.

The force of the tweezers is given by

$$F_{op} = \kappa_x \Delta x. \quad (6)$$

$\Delta x$  can be determined from Eq. (1), since we have measured the intensities while stretching the DNA molecule. Notice that  $x_e$  is not the same as  $\bar{x}$  of Eq. (1), since the center of the trap can be in a different position of the backscattering profile.

Finally, we plot the force as a function of  $x_{\text{DNA}}$ . The  $F$  versus  $x_{\text{DNA}}$  curves can be fitted to the approximate expression derived by Marko and Siggia,<sup>19</sup>

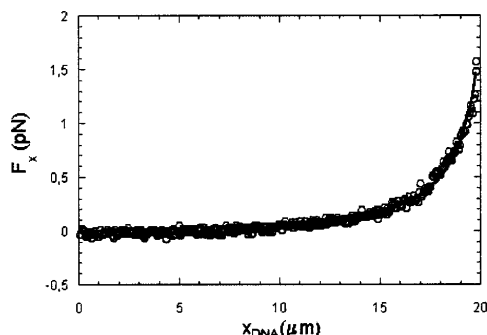


FIG. 4. Force as a function of elongation for a DNA molecule. Fitting this curve to Eq. (7), we determine the persistence length  $A$  and the contour length  $L$ .

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left( 1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)} - \frac{1}{4} \right] \times \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}, \quad (7)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $A$  is the DNA persistence length, and  $L$  is the DNA contour length. So, we determine  $A$  and  $L$  from this fitting. Figure 4 shows a typical  $F$  versus  $x_{DNA}$  curve fitted to Eq. (7).

### III. RESULTS AND DISCUSSION

In this section we discuss the results obtained, showing how the parameter  $A$  varies in the psoralen solution when lights of different wavelengths are used to illuminate the sample.

#### A. Equilibrium measurements

Since we do not directly measure the actual light intensity on the sample, we wait enough time for the complex to achieve a constant persistence length for a given light intensity. For the intensity used in our experiments, we can perform the measurements after illuminating the sample for 30 min. The illuminating lamp is turned off during the measurements.

Table I shows the results obtained. The values obtained for  $A$  are averages over results for different molecules. Since

TABLE I. Equilibrium measurements results for the persistence length of DNA and DNA-psoralen complexes.

Sample	Illumination	$A$ (nm)
DNA	Any light (including UVA+UVB)	$45 \pm 5$
DNA-Psoralen	Green light ( $\lambda = 500 \pm 20$ nm)	$64 \pm 6$
DNA-Psoralen	Blue light ( $\lambda = 450 \pm 20$ nm)	$67 \pm 7$
DNA-Psoralen	UVA light	$107 \pm 10$
DNA-Psoralen	UVB light (after UVA)	$34 \pm 4$

the contour length varies from one molecule to another in an uncontrollable way, it is not worth to average values obtained from different molecules. We have also measured the persistence length of the molecules in a psoralen-free solution. In this case, we simply use a PBS  $pH = 7.4$  solution. This result is in very good agreement with results reported in the literature.<sup>20,21</sup> We also illuminate the psoralen-free DNA with a strong UV light, including both UVA and UVB range. Even though it is known that such light can cause damage to DNA, apparently this damage does not change the entropic elasticity of DNA. The persistence length obtained after illuminating the psoralen-free DNA with UVA+UVB light, at least within the error bars of our measurements, is around 45 nm.

When we illuminate the DNA-psoralen sample with visible light (green or blue), neither monoadducts or cross links can be formed. Therefore, the value obtained for the persistence length of  $64 \pm 6$  nm corresponds to the intercalation situation. This value is about 45% above the psoralen-free situation, indicating that intercalation increases the molecule rigidity. When we illuminate the sample with UVA light for 30 min, the persistence length stabilizes at the value  $107 \pm 10$  nm, reported in Table I. In this situation, all possible cross links have been formed. This result indicates therefore that crosslinks increase drastically the rigidity of the molecule. Finally, when we illuminate the sample with UVB light, we destroy the crosslinks, obtaining only monoadducts, which cannot be destroyed by UVB light. In this situation, the persistence length decreases to  $34 \pm 4$  nm. Therefore, the monoadducts decrease the molecule rigidity. This result is in agreement with kinetics measurements, i.e., measurements performed in the same DNA molecule as a function of time. We discuss these measurements in Sec. III B. The UV light source used in our measurements is a Nikon LH-M100C-1. To illuminate the sample with only UVA or UVB wavelengths, we use band-pass filters.

#### B. Persistence length kinetics

Kinetics measurements of the persistence length are performed using the same DNA molecule. Without illuminating the sample, we first move the microsphere to an arbitrary position on the backscattering profile using the motor  $m$ . Then, we turn on the UVA light and collect the backscattered light intensity by the microsphere. Since the UVA light activates DNA-psoralen linkage, we should see variation on the backscattered intensity as a function of time. This fact occurs because the rigidity of the sample is modified by the linkage, and consequently, the force exerted by the DNA on the microsphere varies, moving the microsphere along the backscattering profile. Using the methods described in Sec. II G, we transform backscattered intensity into force, obtaining the force exerted by the DNA molecule as a function of time while the sample is illuminated. To obtain the persistence length as a function of time, we use Eq. (7) supposing that the contour length does not vary so much during the illumination, i.e., we use a constant value of  $L$ , since the experiment is performed in the low-stretching regime. The value of  $L$  can be determined by the method described in Sec. III A.

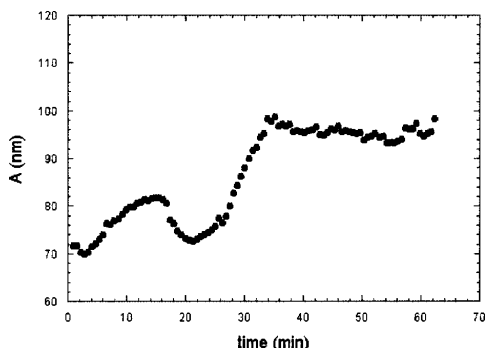


FIG. 5. Persistence length as a function of time while illuminating the sample with UVA light.

Figure 5 is a typical result obtained with this procedure, showing how the persistence length varies on time when the sample is illuminated with UVA light.

Observe that the persistence length initially oscillates and then stabilizes at a value close to the reported in Table I after  $\approx 35$  min. This result confirms the value of the persistence length obtained by equilibrium measurements using UVA light. Observe also that the initial value of the persistence length in Fig. 5 is close to those reported in lines 3 and 4 of Table I, which correspond to the intercalation situation. In fact, before turning on the UVA light, psoralen can only intercalate the DNA molecule, as discussed in Sec. I. So, this result also confirms the value of the persistence length corresponding to the intercalation situation.

Finally, we remember that the kinetics result showed in Fig. 5 corresponds to a unique DNA-psoralen complex, while the values reported in Table I refer to averages over many different molecules. The persistence length values of the particular DNA-psoralen complex showed in Fig. 5 agrees with Table I within 8%.

The first oscillation presented in Fig. 5 shows that the persistence length initially decreases when we turn on the UVA light. This suggests that the monoadducts formation decreases the molecule rigidity, since the monoadducts must be formed before the cross links. Again, this is in agreement with equilibrium measurements, as we discuss in Sec. III A. Possibly, this result may be caused by the fact that monoadducts deform locally the DNA structure within three base pairs,<sup>14</sup> and do not link the two strands. Finally, we speculate that the second oscillation may be caused by differences in the monoadducts and cross-links formation times for different pyrimidine basis. We are currently addressing this question.

IV. CONCLUSION

We employ optical tweezers and intensity autocorrelation spectroscopy to study the interaction of  $\lambda$ -DNA mol-

ecules with the photosensitive drug psoralen. The results obtained show that psoralen can modify greatly the rigidity of DNA molecules, depending on the light chosen to illuminate the sample.

From the results, we conclude the following.

(a) Intercalation increases the rigidity of DNA-psoralen complex. The persistence length increases about 45% relative to DNA psoralen-free sample.

(b) Monoadducts formation decreases the complex rigidity. The persistence length decreases about 25% relative to DNA psoralen-free sample.

(c) Cross links formation increases drastically the molecule rigidity. The persistence length in this case increases about 135% relative to DNA psoralen-free sample.

The experimental technique described in this work can be used to study the rigidity modifications of the DNA molecules when interacting with other drugs. It is a powerful method to investigate DNA-drug interaction and can provide new data for modeling such interaction.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FAPEMIG, FINEP-PRONEX, and Instituto do Milênio de Nanociência—MCT.

<sup>1</sup>A. Ashkin, Phys. Rev. Lett. **24**, 156 (1970).  
<sup>2</sup>A. Ashkin and J. M. Dziedzic, Science **235**, 1517 (1987).  
<sup>3</sup>A. Ashkin, Biophys. J. **61**, 569 (1992).  
<sup>4</sup>K. Svoboda and S. M. Block, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **23**, 247 (1994).  
<sup>5</sup>D. G. Grier, Nature (London) **424**, 810 (2003).  
<sup>6</sup>N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, Phys. Rev. E **65**, 041921 (2002).  
<sup>7</sup>T. R. Coven, F. P. Murphy, and P. Gillette, Arch. Dermatol. **134**, 1263 (1998).  
<sup>8</sup>D. Tran, Y. K. Kwok, and C. L. Goh, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. **17**, 164 (2001).  
<sup>9</sup>A. E. Peritz and F. P. Gasparro, J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. **4**, 11 (1999).  
<sup>10</sup>W. McNeely and K. L. Goa, Drugs **56**, 667 (1998).  
<sup>11</sup>J. W. Petrozzi and A. M. Kligman, Arch. Dermatol. **114**, 387 (1978).  
<sup>12</sup>M. Lufil, M. Rocken, G. Plewig, and K. Degitz, J. Invest. Dermatol. **111**, 399 (1998).  
<sup>13</sup>D. W. Ussery, R. W. Hoepfner, and R. R. Sinden, Methods Enzymol. **212**, 13 (1992).  
<sup>14</sup>H. P. Spielmann, T. J. Dwyer, S. S. Sastry, J. E. Hearst, and D. E. Wemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**, 2345 (1995).  
<sup>15</sup>G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky, and A. J. Libchaber, Appl. Phys. Lett. **73**, 291 (1998).  
<sup>16</sup>J. F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, and V. Croquette, Biophys. J. **73**, 2064 (1997).  
<sup>17</sup>H. Faxen, Ann. Phys. (Paris) **68**, 89 (1922).  
<sup>18</sup>M. I. M. Feitosa and O. N. Mesquita, Phys. Rev. A **44**, 6677 (1991).  
<sup>19</sup>J. F. Marko and E. D. Siggia, Macromolecules **28**, 8759 (1995).  
<sup>20</sup>T. Strick, J. F. Allemand, and D. Bensimon, Prog. Biophys. Mol. Biol. **74**, 115 (2000).  
<sup>21</sup>M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, Biophys. J. **72**, 1335 (1997).

## ***In situ* laser power measurement at the focus of microscope objectives used in optical tweezers**

N. B. Viana, M. S. Rocha, and O. N. Mesquita

*Departamento de Física, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte, CEP 30123-970, MG, Brazil*

(Received 26 March 2004; accepted 24 September 2004)

We discuss measurements of the laser power at the focus of high numerical aperture objectives used in optical microscopy and optical tweezers. For a given power, the focused incident laser beam heats a small mercury bead that jumps when it reaches the boiling temperature of water, the medium used in the experiments. From the size of the mercury beads, the heat conductivities of water and glass-slide, and the absorption coefficient of mercury for the laser wavelength used, the incident power can be obtained using the solution of the associated heat problem. This problem is mapped onto the problem of a charged conducting sphere embedded in a semi-infinite medium of dielectric constant  $\epsilon_1$ , separated from another semi-infinite medium of dielectric constant  $\epsilon_2$ . © 2005

*American Association of Physics Teachers.*

[DOI: 10.1119/1.1819930]

### **I. INTRODUCTION**

A laser beam focused by a high numerical aperture objective is able to trap dielectric particles near the objective focus. This arrangement is called an optical tweezer and has been used in biological applications to exert forces in the pico-Newton range.<sup>1-5</sup> The exact calculation of the force and trap stiffness of optical tweezers is a challenging problem which was recently solved.<sup>6,7</sup>

The theory has no adjustable parameters and all the parameters must be measured independently to compare with experiment. One of the important parameters for such a comparison is the local laser power on the trapped particle. Measurements of laser power at the focus of high numerical aperture (NA) objective (NA > 1.3) cannot be done by simply placing a power meter in front of the objective. Power meters have glass-air interfaces, such that light rays entering them at large angles (larger than the limit angle for glass-air total internal reflection) will be reflected, and the measured power underestimated.

We have developed a simple microbolometer to measure the local laser power “*in situ*.”<sup>8</sup> Our microbolometer consists of a standard Corning microscope-glass-slide (170  $\mu\text{m}$  thickness), with an O-ring of 1 cm diameter and height 0.5 cm glued on it, filled with water and mercury droplets with sizes in the  $\mu\text{m}$  range. The microbolometer is placed in a Nikon TE 300 inverted microscope equipped with a 100 $\times$  and NA 1.4 objective. Because we use an oil immersion microscope objective, the microbolometer does not have glass-air interfaces. Moreover, because the oil refractive index (1.496) is very close to the glass refractive index (1.50), we can ignore refraction due to this interface in the calculations. The major practical applications for the microbolometer involve samples that also are imbedded in water, as in many optical tweezers applications.<sup>10</sup> Therefore, water is the ideal medium to use for the construction of the bolometer. Because the typical radii of the mercury droplets are in the micrometer range, the medium can be considered semi-infinite, limited below by the glass-slide. This is an example of a sphere embedded in two semi-infinite media. Figure 1 shows a schematic representation of the bolometer. The construction details of this microbolometer are provided in Ref. 8.

The incident laser is focused by the objective on the mercury bead. The bead absorbs the laser light. The mercury heat conductivity is about 13 times larger than the heat conductivity of water and a steady state situation is achieved in a time of the order of 0.1 s.<sup>8</sup> Therefore we can assume that the temperature across the mercury droplet remains constant for a given laser power. The laser power is then slowly increased until the mercury bead jumps when its temperature reaches the water boiling temperature ( $T_b = 97.2^\circ\text{C}$  in our laboratory), making the determination of this point very easy and accurate. By knowing the size of the bead, the heat conductivities of the medium ( $\kappa_1 = 0.6791\text{ W/mK}$  at  $100^\circ\text{C}$ ) and the glass-slide ( $\kappa_2 = 1.13\text{ W/mK}$  at  $100^\circ\text{C}$ ), and the absorption coefficient of mercury for the laser wavelength used ( $A = 0.272$ ), we can determine the local laser power. The details of our microscopy setup and the laser are described in Refs. 9 and 8.

Our problem is to determine the relationship between the local laser power at the focus of the objective and the temperature of the mercury bead in our microbolometer. We show that this simple microbolometer, which can be built in a student laboratory, can be modeled using the method of images to solve Poisson’s equation for this set of boundary conditions.

### **II. HEAT CONDUCTION AND ELECTROSTATICS**

We analyze the steady state heat conduction problem. To estimate a typical time for achieving the steady state, we consider 170  $\mu\text{m}$  as the typical length of our system and because the thermal diffusivity of water is  $D = 1.4 \times 10^{-3}\text{ cm}^2/\text{s}$ , the typical time to achieve steady state is of the order of 0.1 s. Thus, after any change of laser power, the system will be in the steady state if we wait for a few seconds. As we discussed in Sec. I, the heat conductivity of mercury is about 13 times larger than that of water, and, therefore, the temperature of the mercury droplet remains constant for a given laser power.

In a steady state the heat produced by a source in a region enclosed by a boundary surface is equal to the heat that flows across the surface. For an isotropic medium, this statement can be written as a continuity equation,

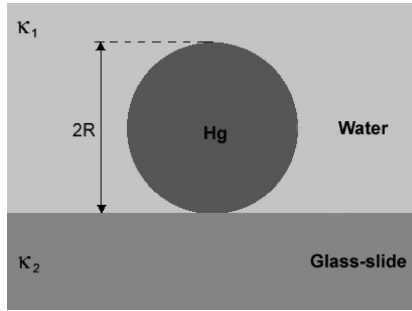


Fig. 1. A mercury bead and two different media.

$$\int_V p dV = - \int_S k \vec{\nabla} T \cdot d\vec{A}, \quad (1)$$

where  $p$  is the heat source density,  $T$  is the temperature field, and  $k$  is the thermal conductivity of the medium. We evaluate the integrals over the volume  $V$  containing the heat source and over its boundary surface  $S$ . By using the divergence theorem on the right-side term, we can write

$$\nabla^2 T = - \frac{p}{k}, \quad (2)$$

that is, the temperature field  $T$  satisfies Poisson's equation at steady state. We conclude that the behavior of the temperature field  $T$  is analogous to the behavior of the electrostatic potential  $\varphi$  due to a conducting sphere with charge density  $\rho$  in an isotropic medium with dielectric constant  $\epsilon$ ,

$$\nabla^2 \varphi = - \frac{\rho}{\epsilon}. \quad (3)$$

We assume the temperature to be constant in the mercury bead because  $\kappa_{\text{bead}} \gg \kappa_{\text{medium}}$ . Therefore, to solve the steady state heat conduction problem, we need only to solve the analogous electrostatic problem and replace  $\varphi$  by  $T$ ,  $\epsilon$  by  $k$  and  $\rho$  by  $p$ . (Recall that  $\varphi$  is constant in the conducting sphere.) The electrostatic problem analogous to a uniform spherical heat source in two different isotropic media is a charged conducting sphere in two different dielectric media.

To compare the heat conduction problem with the analogous electrostatic problem with fixed  $\epsilon$ , we neglect the temperature variation of  $\kappa$ . In the Appendix we demonstrate that we can use an effective  $\kappa$  to express this temperature variation. We estimate that this effective  $\kappa$  varies about 12% when the temperature varies from 25 °C to 100 °C.<sup>8</sup>

In Sec. IV we present our data for the radius  $R$  of the mercury bead as a function of the laser power. A reasonably good linear dependence is obtained, which is consistent with our model, which assumes uniform thermal conductivities in both media. The systematic error introduced by this assumption is smaller than the overall experimental error.

### III. A CHARGED SPHERE AND TWO SEMI-INFINITE MEDIA

The system of interest consists of a conducting sphere with charge  $Q$  and radius  $R$  imbedded in a semi-infinite me-

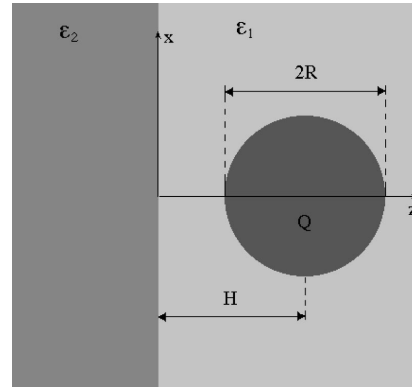


Fig. 2. A conducting charged sphere and two different dielectric media.

diuum with dielectric constant  $\epsilon_1$ . This medium is in contact with another semi-infinite medium with dielectric constant  $\epsilon_2$ , as shown in Fig. 2.

To determine the potential  $\varphi$  due to the charged conducting sphere, we use the method of images. We start with an image point charge  $q_0$  at  $z=H$  (see Fig. 2), which accounts for any charge excess that makes the sphere potential different from zero. To satisfy the boundary conditions at the surface between the two media, we use an image charge  $q'_0$  at  $z=-H$  and  $q''_0$  at  $z=H$ . However, these image charges disturb the potential on the sphere. To satisfy the boundary condition (constant potential on the sphere), we use another image charge  $q_1$  at  $z=H-d_1$ , which again disturbs the potential at the boundary surface between the two media. We have to use another image charge  $q'_1$  at  $z=-H+d_1$  and another image charge  $q''_1$  at  $z=H-d_1$ . This process goes on indefinitely, leading to an infinite number of image charges.

The magnitude of the image charges  $q_n$  and the distances  $d_n$  are calculated in the Appendix. The general solution can be written as

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q_n}{\sqrt{(z-H+d_n)^2 + x^2 + y^2}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q'_n}{\sqrt{(z+H-d_n)^2 + x^2 + y^2}} \quad (z > 0), \quad (4a)$$

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q''_n}{\sqrt{(z-H+d_n)^2 + x^2 + y^2}} \quad (z < 0). \quad (4b)$$

The potential  $\varphi_P$  depends on the values of  $q_n$ . However,  $q_n$  depends on the value of  $q_0$ . To write the potential as a function of the sphere charge  $Q$ , we use Gauss' law for a spherical Gaussian surface centered at the sphere center and very close to its surface. Therefore, we can write

$$\sum_{n=0}^{\infty} q_n = Q. \quad (5)$$

In the Appendix we show that, for our geometry ( $H=R$ ), the sphere potential can be written as

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_{\text{eff}}} \frac{Q}{R}, \quad (6)$$

where

$$\epsilon_{\text{eff}} = -\frac{\epsilon_1}{\delta} \ln(1 - \delta), \quad (7)$$

and

$$\delta = \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1}. \quad (8)$$

#### IV. MEASUREMENT OF LOCAL LASER POWER

For the geometry of Fig. 1, the temperature of the mercury bead can be written, in analogy with Eq. (6), as

$$T(R) = T_0 + \frac{P_a}{4\pi\kappa_{\text{eff}}R}, \quad (9)$$

with

$$\kappa_{\text{eff}} = -\frac{\kappa_1}{\delta} \ln(1 - \delta), \quad (10)$$

and

$$\delta = \frac{\kappa_2 - \kappa_1}{\kappa_2 + \kappa_1}. \quad (11)$$

$P_a$  is the laser power absorbed by the mercury bead and  $T_0$  is the ambient temperature. The local laser power that we want to measure is  $P_L = P_a/A$ , where  $A$  is the absorption coefficient of mercury for  $\lambda = 832$  nm.

To solve the heat transport problem, we consider diffusion as the only heat transport mechanism. However, the mercury droplet is immersed in water, which changes its temperature in the region near the droplet. The water temperature goes from the ambient temperature up to the local boiling point as the droplet heats. It is well known that in this situation there is water convection.<sup>12</sup> Convection is another heat transport mechanism and increases the heat transport efficiency. To account for convection, we must modify the analysis. Convective effects can be neglected if the advection term in the heat transport equation is much smaller than the diffusion term, that is,  $|(\vec{V} \cdot \vec{\nabla})T| \ll |D\nabla^2 T|$ , where  $\vec{V}$  is the fluid velocity and  $D$  is the thermal diffusivity of water.<sup>12</sup> If we consider  $\ell = 170$   $\mu\text{m}$  as the typical length of our system, this criterion results in  $V \ll D/\ell = 824$   $\mu\text{m/s}$ .

We inserted 1  $\mu\text{m}$  polystyrene microspheres near the mercury droplet which is being heated and observed their Brownian motion. As convection increases, the microspheres begin to move toward the mercury droplet. We measured the drift velocities of the microspheres with videomicroscopy and found the largest drift velocities were  $\approx 20$   $\mu\text{m/s}$ , which is much smaller than 824  $\mu\text{m/s}$ . Therefore, it is reasonable to neglect convective effects in our analysis.

To verify Eq. (9) we measured the power  $P_E$  at the entrance of the objective with a standard power meter. We have  $P_L = T_r P_E$ , where  $T_r$  is the transmission coefficient of the system (objective+glass-slide/water interface). When the temperature of the mercury bead is the boiling temperature of water (jumping condition), Eq. (9) can be rearranged as

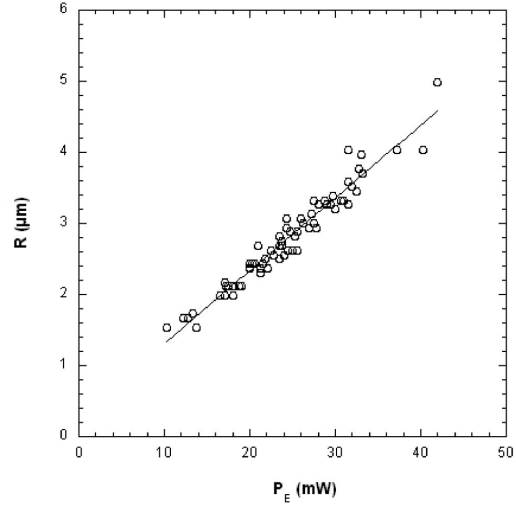


Fig. 3. The radius  $R$  of the mercury bead as a function of the power  $P_E$  at the entrance of the objective. The experimental error is the same order of magnitude as the statistical uncertainty in the fit to the data.

$$R = \frac{AT_r}{4\pi\kappa_{\text{eff}}(T_b - T_0)} P_E. \quad (12)$$

In Fig. 3 we show a plot of  $R$  as a function of  $P_E$ , which is a reasonably straight line as predicted by the model. With  $A = 0.272$ ,  $\kappa_{\text{eff}} = 0.781$  W/mK,  $T_b = 97.2$   $^\circ\text{C}$ , and  $T_0 = 25.1$   $^\circ\text{C}$ , we obtain a transmission coefficient of  $T_r = 0.26 \pm 5\%$  from the slope of the straight line of  $RP_E$ . Because Eq. (9) has been verified, we no longer need a power meter. Therefore the local laser power  $P_L$  can be directly obtained from  $P_L = 4\pi\kappa_{\text{eff}}(T_b - T_0)R/A$ , which in our case is given by  $P_L = 2.60R$ , with  $P_L$  in mW and  $R$  in  $\mu\text{m}$ . Therefore, it is possible to calibrate the local power at the focus of the objective as a function of laser current, or any other parameter that is proportional to the laser power. The details of how to build our sample cell and how to prepare mercury beads in the  $\mu\text{m}$  range are provided in Ref. 8.

For practical purposes, the local power  $P_L$  can be measured in the laboratory by two methods. By using a power meter, we can easily measure the power at the entrance of the objective  $P_E$ . The local power  $P_L$  is then calculated using the transmission coefficient of the system, which is obtained from Fig. 3. Alternatively, by knowing the radius of the mercury droplet,  $P_L$  can be obtained directly from the relation  $P_L = 2.60R$ . In Ref. 8 we discuss a method to measure the droplet radii using video microscopy and digital image analysis.

#### V. CONCLUSION

We have described a simple microbolometer that can be used to measure the laser power at the focus of a high numerical aperture microscope objective. To obtain the local power we have to solve the heat equation with the appropriate boundary conditions. We find the solution by mapping the heat equation onto an electrostatic problem which is

solved by the method of images. This problem is a beautiful application of the method of images and an example of a heat conduction problem that can be mapped onto an electrostatic problem.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We acknowledge R. S. Schor for helping with the solution of the electrostatic problem. This work was supported by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FINEP-PRONEX, Instituto do Milênio de Nanociência—MCT.

**APPENDIX: THE ANALOGOUS ELECTROSTATIC PROBLEM**

We discuss the calculations of the equivalent electrostatic problem using the method of images. We are interested in two cases that can be solved by this method:<sup>11</sup> a point charge and two semi-infinite media, and a grounded conducting sphere and a point charge. These two cases and their relation to the original problem are discussed.

*A point charge and two semi-infinite media.* Consider a system analogous to that shown in Fig. 2, where the charged sphere is replaced by a point charge  $q$ . This charge induces a surface of polarization charges at the boundary, which can be represented by image charges. We need only two image charges  $q'$  and  $q''$  placed at  $d' = -H$  and  $d'' = H$ . The electrostatic potential at the point  $P$  can be written as

$$\varphi_P = \frac{q}{4\pi\epsilon_1 R_1} + \frac{q'}{4\pi\epsilon_1 R_2} \quad (z > 0), \tag{A1a}$$

$$\varphi_P = \frac{q''}{4\pi\epsilon_2 R_1} \quad (z < 0), \tag{A1b}$$

where  $R_1$  and  $R_2$  are the distances from  $q'$  and  $q''$  to the point  $P$ . By applying the boundary conditions,<sup>11</sup> we obtain

$$q' = -\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1} q, \quad q'' = \frac{2\epsilon_2}{\epsilon_2 + \epsilon_1} q. \tag{A2}$$

*Grounded conducting sphere and a point charge.* Consider a grounded conducting sphere with radius  $R$ . We let  $a$  be the distance between its center and a point charge  $q_s$  located inside the sphere. The charge induced on the sphere by the point charge  $q_s$  can be replaced by an image charge  $q'_s$  at the axis joining  $q_s$  and the sphere center. The image charge  $q'_s$  and its distance from the sphere center,  $a'$ , are chosen to satisfy the boundary conditions, that is, to give  $\varphi = 0$  on the sphere surface. We obtain  $q'_s = -Rq_s/a$  and  $a' = R^2/a$ . The potential outside the sphere is the sum of the potentials due to  $q_s$  and  $q'_s$ .

We now return to the original problem. We start by using an image charge  $q_0$  at  $z = H$  (see Fig. 2), which accounts for the charge excess that makes the sphere potential different from zero. To satisfy the boundary conditions at the surface between the two media, we use an image charge  $q'_0$  at  $z = -H$  (medium  $\epsilon_2$ ),

$$q'_0 = -\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1} q_0, \tag{A3}$$

and  $q''_0$  at  $z = H$  (medium  $\epsilon_1$ ),

$$q''_0 = \frac{2\epsilon_2}{\epsilon_2 + \epsilon_1} q_0. \tag{A4}$$

As we have discussed,  $q'_0$  accounts for the potential in medium  $\epsilon_1$  and  $q''_0$  accounts for the potential in medium  $\epsilon_2$ . However, these image charges disturb the potential on the sphere. To satisfy the boundary condition (constant potential on the sphere), we use another image charge  $q_1$  at  $z = H - d_1$ ,  $q_1 = -Rq'_0/2H$  with  $d_1 = R^2/2H$ .

However, the charge  $q_1$  again disturbs the potential at the boundary surface between the two media. We have to use another image charge  $q'_1$  at  $z = -H + d_1$  (in medium  $\epsilon_2$ ),

$$q'_1 = -\left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1}\right) q_1, \tag{A5}$$

and another image charge  $q''_1$  at  $z = H - d_1$  (in medium  $\epsilon_1$ ),

$$q''_1 = \frac{2\epsilon_2}{\epsilon_2 + \epsilon_1} q_1. \tag{A6}$$

This process continues indefinitely. By defining

$$\delta = \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1}, \tag{A7}$$

we can write the following general relations,

$$q_{n+1} = -\frac{R}{2H - d_n} q'_n = \frac{d_{n+1}}{R} \delta q_n, \tag{A8}$$

$$d_{n+1} = \frac{R^2}{2H - d_n}, \tag{A9}$$

$$q'_n = -\delta q_n, \tag{A10}$$

and

$$q''_n = \frac{2\epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} q_n. \tag{A11}$$

With these relations, we can determine the potential at any point  $P$ . If we use cylindrical coordinates ( $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}, z$ ), we can write the potential  $\varphi_P$  as in Eq. (4).

*The sphere potential.* We can now use these results to find the potential on the sphere. We take  $P$  to be at  $(0, H - R)$ , a point on the surface of the sphere. At this point,

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \left[ \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q_n}{R - d_n} + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q'_n}{2H - R - d_n} \right] \tag{A12a}$$

$$= \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \sum_{n=0}^{\infty} \left( \frac{q_n}{R - d_n} - \frac{q_{n+1}}{R - d_{n+1}} \right), \tag{A12b}$$

where Eq. (A12b) is obtained using Eqs. (A8)–(A10).

The expression in Eq. (A12b) is a telescopic series, and only the first and last terms survive after the summation. Therefore,

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \left( \frac{q_0}{R} - \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{q_n}{R - d_n} \right). \tag{A13}$$

To write the potential  $\varphi_P$ , we have to know the infinite limits of  $q_n$  and  $d_n$ . When  $n \rightarrow \infty$  in Eq. (A9), we have

$$d = \lim_{n \rightarrow \infty} d_n = \frac{R^2}{2H - d} = H - \sqrt{H^2 - R^2}. \tag{A14}$$

And when  $n \rightarrow \infty$  in Eq. (A8), we obtain

$$q = \lim_{n \rightarrow \infty} q_n = \frac{d}{R} \delta q. \quad (\text{A15})$$

Equation (A15) can be satisfied only if  $q = 0$ . Thus the second term in Eq. (A13) vanishes when  $n \rightarrow \infty$ , and  $\varphi_P$  can be written as

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{q_0}{R}. \quad (\text{A16})$$

To find  $q_0$  as a function of the sphere charge  $Q$ , we use Eq. (5) and the following relation, which comes from Eq. (A8),

$$q_n = \delta^n \prod_{j=1}^n \left( \frac{d_j}{R} \right) q_0 \quad (n \geq 1). \quad (\text{A17})$$

Therefore,

$$Q = q_0 \left[ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \delta^n \prod_{j=1}^n \left( \frac{d_j}{R} \right) \right], \quad (\text{A18})$$

and

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{Q}{R} \left[ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \delta^n \prod_{j=1}^n \left( \frac{d_j}{R} \right) \right]^{-1}. \quad (\text{A19})$$

When  $H = R$ , the series in Eq. (A19) has a closed form. To determine this form, we use Eq. (A9) to obtain the relation

$$d_n = \frac{n}{n+1} R. \quad (\text{A20})$$

By using Eq. (A20) we can write

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{Q}{R} \left[ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \delta^n \prod_{j=1}^n \left( \frac{j}{j+1} \right) \right]^{-1}. \quad (\text{A21})$$

Finally, we use the relation

$$\prod_{j=1}^n \frac{j}{j+1} = \frac{1}{n+1} \quad (\text{A22})$$

to express the potential

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{Q}{R} \left[ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\delta^n}{n+1} \right]^{-1}. \quad (\text{A23})$$

Because  $|\delta| < 1$ , the series in Eq. (A23) converges to

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{\delta^n}{n+1} = -\frac{1}{\delta} [\delta + \ln(1 - \delta)]. \quad (\text{A24})$$

With these results, we can write the sphere potential as Eq. (6). To write the solution of the heat conduction problem, we let  $\varphi_P \rightarrow T - T_0$ , where  $T_0$  is the temperature far away from the sphere,  $\epsilon_1 \rightarrow k_1$ ,  $\epsilon_2 \rightarrow k_2$  and  $Q \rightarrow P$ , where  $P = 4/3\pi R^3 p$  is the total heat power created in the region enclosed by the sphere.

<sup>1</sup>A. Ashkin, "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156–159 (1970).

<sup>2</sup>A. Ashkin and J. M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science* **235**, 1517–1520 (1987).

<sup>3</sup>A. Ashkin, "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime," *Biophys. J.* **61**, 569–582 (1992).

<sup>4</sup>K. Svoboda and S. M. Block, "Biological applications of optical forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247–285 (1994).

<sup>5</sup>D. G. Grier, "A revolution in optical manipulation," *Nature (London)* **424**, 810–816 (2003).

<sup>6</sup>P. A. Maia Neto and H. M. Nussenzveig, "Theory of optical tweezers," *Europhys. Lett.* **50**, 702–708 (2000).

<sup>7</sup>A. Mazzoli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, "Theory of trapping forces in optical tweezers," *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **459**, 3021–3041 (2003).

<sup>8</sup>N. B. Viana, O. N. Mesquita, and A. Mazzoli, "In situ measurement of laser power at the focus of a high numerical aperture objective using a microbolometer," *Appl. Phys. Lett.* **81**(10), 1765–1767 (2002).

<sup>9</sup>N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, "Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere," *Phys. Rev. E* **65**, 041921–1–11 (2002).

<sup>10</sup>H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasaki, N. Kitamura, and H. Masuhara, "Three-dimensional optical trapping and laser ablation of a single polymer latex particle in water," *J. Appl. Phys.* **70**, 3829–3836 (1991).

<sup>11</sup>J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics* (Wiley, New York, 1962).

<sup>12</sup>D. J. Tritton, *Physical Fluid Dynamics*, 2nd ed. (Oxford Science, Oxford, 1988).

**NOW AVAILABLE: 23 ADDITIONAL YEARS OF BACK ISSUES**

The contents of the *American Journal of Physics* are available online. AJP subscribers can search and view full text of AJP issues from 1975 to the present. Browsing abstracts and tables of contents of online issues and the searching of titles, abstracts, etc. back to 1975 is unrestricted. For access to the online version of AJP, please visit <http://aapt.org/ajp>.

Institutional and library ("nonmember") subscribers have access via IP addresses to the full text of articles that are online; to activate access, these subscribers should contact AJP, Circulation & Fulfillment Division, 800-344-6902; outside North America 516-576-2270 or [subs@aip.org](mailto:subs@aip.org).

Individual ("member") subscribers to the print version who wish (for an additional fee) to add access to the online version should contact AAPT or go to the AAPT website: <https://www.aapt.org/Membership/secure/agreement.cfm>.

Full text back to the first issue of AJP is scheduled to be available online sometime in 2005.

## Variation of entropic elasticity of DNA-Psoralen complex under UV light

M. S. Rocha and O. N. Mesquita

Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais,  
Caixa Postal 702, Belo Horizonte, CEP 30123-970, MG, Brazil

### ABSTRACT

We measure the entropic elasticity of a single  $\lambda$ -DNA molecule and of a single DNA-Psoralen complex by doing stretching experiments with an optical tweezers. Psoralen is a photosensitive drug used in the treatment of many skin diseases, by impeding DNA replication. Psoralen intercalates the DNA and can form cross-links with pyrimidine basis in opposite strands of DNA, when illuminated with UVA light. As cross-links form the persistence length of the complex increases, indicating an increase in rigidity of the complex. We study the kinetics of DNA-Psoralen cross-link formation via changes in entropic elasticity of the complex.

**Keywords:** optical tweezers, psoralen, DNA, persistence length.

### 1. INTRODUCTION

Optical tweezers<sup>1,2,3</sup> are mounted by passing a single laser beam through a high numerical aperture microscope objective. The focused laser is able to trap small dielectric particles near the lens focus, giving to this arrangement the great advantage to permit manipulation and observation of a single individual object, like a microsphere, a macromolecule or even a live cell. Actually, optical tweezers have a wide range of applications in Physics, Chemistry and Biology<sup>2,4,5</sup>.

In this work we study entropic elasticity variations of a  $\lambda$ -DNA molecule in a solution with the photosensitive drug psoralen, used to treat some skin diseases. The measurements are performed using optical tweezers and intensity autocorrelation spectroscopy. To do this, we attach a polystyrene microsphere to one end of the DNA molecule. The other end of the molecule is then attached to a microscope coverslip, so we can manipulate and stretch the molecule using the optical tweezers, which trap the polystyrene bead, to obtain a force versus extension curve. Displacements are measured by analyzing the backscattered light from the polystyrene bead attached to the DNA molecule<sup>6,7</sup>. We use a SDL infrared laser ( $\lambda = 832\text{nm}$ ) to trap the sphere and a He-Ne laser ( $\lambda = 632.8\text{nm}$ ) as the scattering probe, which is used in two ways: to measure the sphere brownian fluctuations and the deviation of its trap equilibrium position when attached to DNA. With the first measurement we calibrate the trap and with the second measurement we determine the DNA stretching force. We describe this procedure in detail in Ref. 7.

Psoralen is a medicinal drug used to treat some skin diseases by a technique called PUVA (psoralen followed by ultraviolet-A light)<sup>8,9</sup>. PUVA therapy is a treatment that consists in taking a medicine containing psoralen and exposing the patient to UVA light. The drug effectively increases the skin sensitivity to UVA and the skin melanin level. Psoriasis, vitiligo and some dermatitis are examples of diseases which can be treated using psoralen<sup>10,11,12</sup>.

Psoralen has also been used along the last years to study the structure of DNA and RNA molecules. Its derivatives are known to bind to DNA and RNA and covalently attach when exposed to UVA light, modifying the elasticity of the complex. The drug impedes the action of polymerase or transcriptase enzymes, impeding DNA replication<sup>13,14</sup>. The psoralen-DNA linkage can be explained in a few steps<sup>14,15</sup>:

a) Intercalation: psoralen intercalates the DNA basis, without linking to them. This intercalation is already capable of modifying the elasticity of the molecule, as we discuss in Section 3. If the sample is not illuminated with UVA light, the drug does not link to the basis.

b) Monoadducts formation: if one illuminates the sample with UVA light ( $\lambda = 320\text{-}400\text{nm}$ ), an intercalated drug molecule absorbs a photon and covalently attaches to a pyrimidine basis, specially to a thymine, forming a monoadduct.

c) Crosslinks formation: if the UVA illumination continues on, the drug can absorb another photon and form a crosslink on the DNA molecule. For this, there must exist a pyrimidine in the other strand of the DNA molecule near the pyrimidine which the drug has formed the monoadduct.

d) Crosslinks break: if one illuminates the sample after step (c) with UVB light ( $\lambda = 240\text{-}310\text{nm}$ ), the crosslinks break and we will have only monoadducts.

As we discuss in Section 3, our results show that the intercalation increases the rigidity of the DNA molecule while the monoadduct formation decreases it. The crosslink formation, finally, increases again the molecule rigidity.

## 2. METHODOLOGY

### 2.1 Sample preparation

In this work, the samples consist of a PBS (Phosphate Buffer Saline) solution with  $\text{pH} = 7.4$  and  $[\text{Na}] = 150\text{nM}$  containing the DNA molecules and polystyrene beads with  $2.8\mu\text{m}$  diameter. In this solution, we add the drug immediately before the measurements. As we have previously commented, we have to attach one end of the DNA molecule to the polystyrene bead and the other end to the coverslip, so we can stretch and manipulate the molecule moving the bead or the coverslip. These attachments are controlled by the solution pH and ionic concentration. The solution is prepared following the procedure described in Ref. 16. To guarantee that we have only one single molecule attached between the coverslip and the bead, we stretch the DNA along different directions using the optical tweezers to trap the polystyrene bead. We observe that the elongation of the molecule from the equilibrium position until the position that the bead escapes from the tweezers is the same along each direction, indicating that there is only one DNA molecule attached to the bead. A more detailed discussion about this question can be found in Ref. 17.

### 2.2 Experimental procedure

Since the bead attached to the DNA molecule is trapped by the potential well of the optical tweezers, it is essential to measure the trap stiffness of the tweezers in order to be able to measure the force exerted by the optical tweezers on the bead. We describe the details about our experimental setup and the procedure used to measure the trap stiffness in Ref. 6 and 7.

To determine the force *versus* extension curve for the DNA molecule, we need to measure the stretching intensity profile, *i. e.*, the backscattering profile while stretching the DNA molecule<sup>7</sup>. To do this, we position the center of the trap with the bead and the unstretched DNA at a particular position of the backscattering profile. Next, we move the coverslip along a direction parallel to its plane with a constant velocity ( $0.058\mu\text{m/s}$ ) using a motor. Then, the molecule is stretched along this direction. The DNA molecule applies a force on the bead, trying to pull it out from the potential well of the optical tweezers. In the equilibrium situation, this force will be equal, in modulus, to the force that the optical tweezers do on the bead. If we measure the backscattered intensity as a function of time until the bead escapes from the tweezers, we can determine the force exerted by the molecule as a function of its elongation. Finally, the force *versus* extension curve can be fitted to the approximate expression derived by Marko and Siggia<sup>20</sup> to determine the persistence and contour length of the molecule,

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{\sqrt{x^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left( 1 - \frac{\sqrt{x^2 + h^2}}{L} \right)} - \frac{1}{4} \right] \times \frac{x}{\sqrt{x^2 + h^2}}, \quad (1)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $h$  is the height of the bead relative to the coverslip,  $A$  is the DNA persistence length and  $L$  is the DNA contour length. In all experiments, we use a constant value for the height,  $h = 3.5\mu\text{m}$ . We use the optical tweezers to maintain the bead at the desired height.

Figure 1 shows a typical force *versus* extension curve, fitted to the expression above.

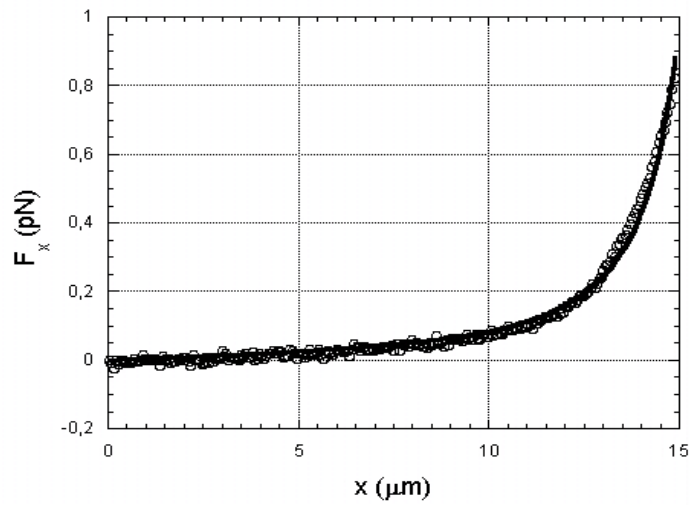


Fig. 1: Force as a function of extension for a DNA molecule. Fitting this curve to Eq. (1), we determine the persistence and contour length of the molecule.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

In this section we discuss the results obtained. We show results for different drug concentrations and also results for  $A$  and  $L$  as a function of illumination time

#### 3.1 Equilibrium measurements

Since we do not measure the light intensity used to illuminate the sample, we wait enough time for the complex to achieve a constant persistence length for a given light intensity. For the intensity used in our experiments, we can perform the measurements after illuminating the sample for 30 minutes. The illuminating lamp is turned off during the measurements. Table 1 shows the results obtained for two different concentrations of the drug. The values obtained for  $A$  are averages over results for different molecules. Since the contour length varies from one molecule to another, it is not worth to average values obtained from different molecules.

Illumination	A (nm) ( $C_p = 1.5 \mu\text{g/ml}$ )	A (nm) ( $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ )
Green light ( $500 \pm 20\text{nm}$ )	$64 \pm 6$	$86 \pm 8$
Blue light ( $450 \pm 20\text{nm}$ )	$67 \pm 7$	-
UVA light ( $320\text{-}400\text{nm}$ )	$107 \pm 10$	$116 \pm 13$
UVB light (after UVA) ( $240\text{-}310\text{nm}$ )	$34 \pm 3$	$93 \pm 9$

Table 1: Equilibrium measurements results for the persistence length of DNA-Psoralen complexes.  $C_p$  is the drug concentration in the sample. Notice that we have not performed yet all possible measurements for the second concentration.

We also measure the persistence length for a DNA molecule in a PBS  $pH 7.4$  solution free of drugs. In this case, we obtain  $A = 45 \pm 5$  nm. This result is in agreement with results reported in the literature<sup>19,20</sup>. Also, if we illuminate this drug-free solution with UVA or UVB light, the persistence length obtained, at least within the error bars of our experiments, is around 45nm. This result is important because it shows that the light intensity used in our experiments can not damage DNA, and we can attribute the variations shown in Table I to the interaction of the DNA molecule with the drug.

When we illuminate the DNA-psoralen sample with visible light (green or blue), neither monoadducts or crosslinks can be formed. Therefore, the value obtained for the persistence length corresponds to the intercalation situation. Notice that intercalation increases the molecule rigidity, and this increment depends strongly on the drug concentration, as shown in the second line of Table I. When we illuminate the sample with UVA light for 30 minutes, the persistence length stabilizes at the value reported in the fourth line of Table I for each concentration. In this situation, all possible crosslinks have been formed. This result indicates therefore that crosslinks increase drastically the rigidity of the molecule. Notice that the value obtained is practically independent on the drug concentration. Finally, when we illuminate the sample with UVB light, we destroy the crosslinks, obtaining only monoadducts, which cannot be destroyed by UVB light. In this situation, the persistence length decreases. Therefore, the monoadducts decrease the molecule rigidity. This result is in agreement with kinetics measurements, *i. e.*, measurements performed in the same DNA molecule as a function of time. We discuss these measurements in Section 3.2. The UV light source used in our experiments is a Nikon LH-M100C-1. To illuminate the sample with only UVA or UVB wavelengths, we use bandpass filters.

### 3.2 Persistence and contour length kinetics

These measurements are performed using the same DNA molecule. We use the following procedure: without turning on the UVA light, we measure the initial contour and persistence length of the DNA-psoralen complex. Then, we turn on the UVA light during a certain time interval, say,  $\delta t$ . After this time, we turn off the illuminating lamp and we measure again the new persistence and contour length. We then repeat this procedure many times, obtaining curves that show the persistence and contour length as a function of the illuminating time. We present some examples below. Figures 2a and 3a shows the persistence length as a function of time for  $\delta t = 10$  and 5 minutes and  $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ , respectively. Figures 2b and 3b are the corresponding curves showing the contour length as a function of time for the same molecules in figures 2a and 3a, respectively. Observe that the persistence length oscillates in time, while the contour length decreases.

The behavior of the contour length can be understood if we suppose that the DNA-psoralen linkage approximate adjacent basis. Then, we expect that the contour length becomes smaller as more crosslinks are formed. The behavior of the persistence length is not understood yet. This kind of measurement does not show a stabilization of the value of  $A$  after a certain time, as equilibrium measurements indicate.

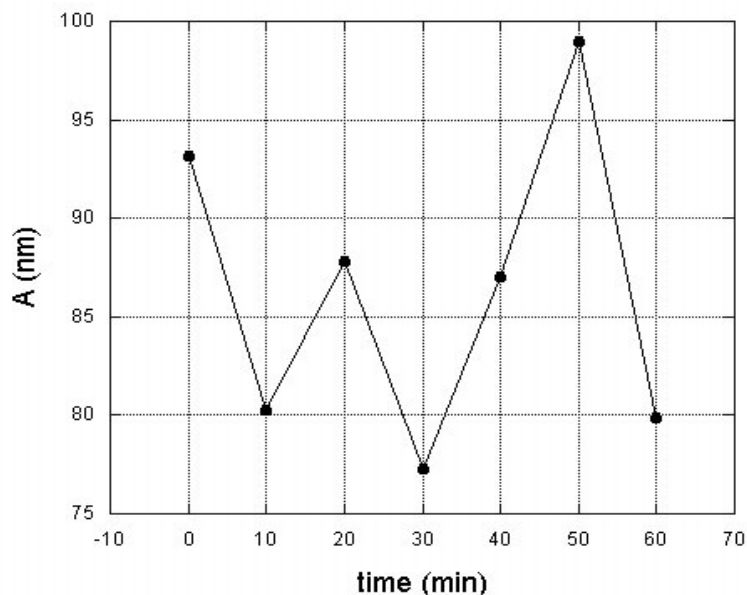


Fig. 2a: Persistence length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex,  $\delta t = 10$  minutes and  $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ .

Figures 4a and 4b show the persistence and contour length kinetics for an individual DNA molecule in a solution with  $C_p = 1.5 \mu\text{g/ml}$ . Observe that the behavior of these curves are the same as for the concentration of  $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ . We do not understand yet the cause of the persistence length oscillations present in all curves.

Besides, another kind of kinetics measurements shows that the persistence length stabilizes after a certain time<sup>7</sup>. It consists in leaving the microsphere in an arbitrary position on the backscattering profile. Then, we turn on the UVA light and collect the backscattered light intensity by the microsphere continuously. Since UVA light activates DNA-psoralen linkage, we should see variation on the backscattered intensity as a function of time. This fact occurs because the rigidity of the sample is modified by the linkage, and consequently, the force exerted by the DNA molecule on the microsphere varies, moving the microsphere along the backscattering profile. Using the methods described in Ref. 7, we transform backscattered intensity into force, obtaining the force exerted by the DNA molecule as a function of time while the sample is illuminated. To obtain the persistence length as a function of time, we use Eq. (1) neglecting the variation of the contour length, *i. e.*, we use a constant value of  $L$ , since the experiment is performed in the low-stretching regime. The value of  $L$  can be determined by the method described in Section 2.2. Figure 5 shows a typical result of this kind of measurement. Observe that the persistence length oscillates two times and then stabilizes at a value close to the reported in Table I. Also, the initial value obtained for  $A$  agrees with Table I within 8%. The concentration used in these experiments was  $C_p = 1.5 \mu\text{g/ml}$ .

These two kinds of measurements are contradictory. These results show that the fact to turn off the illumination lamp during the experiments interfere in the kinetics of the process.

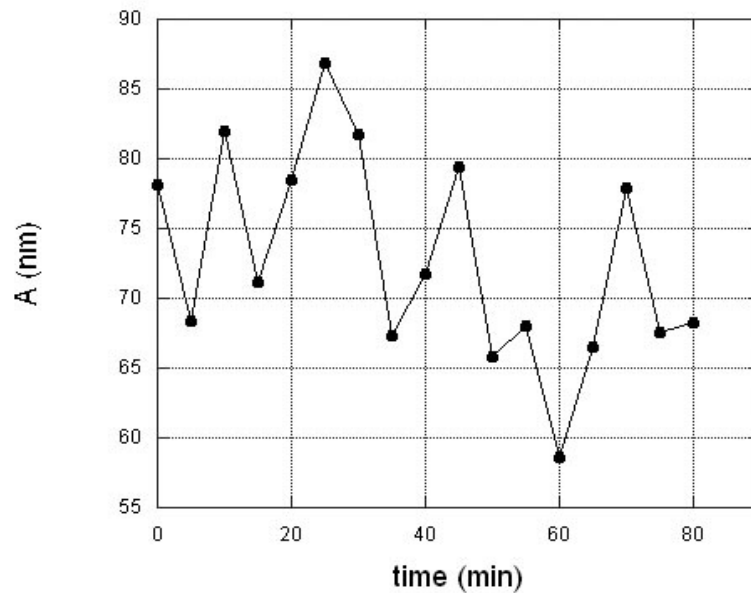


Fig. 3a: Persistence length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex,  $\delta t = 5$  minutes and  $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ .

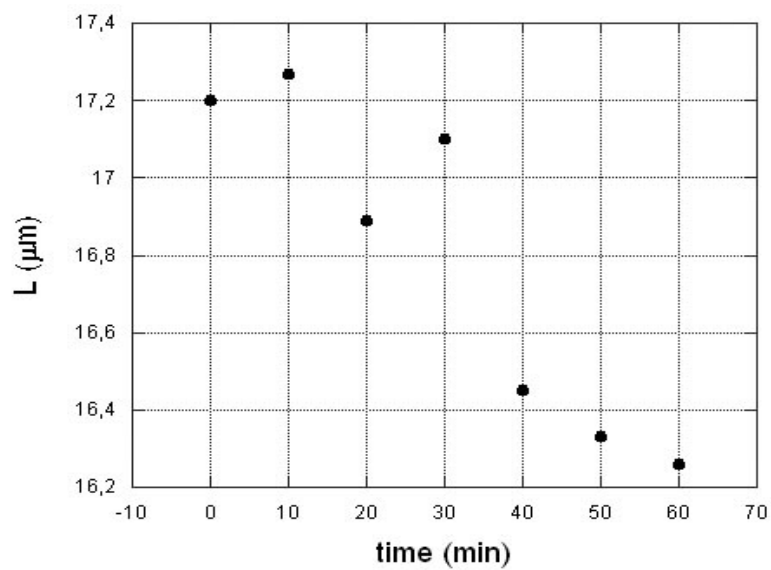


Fig. 2b: Contour length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex,  $\delta t = 10$  minutes and  $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ .

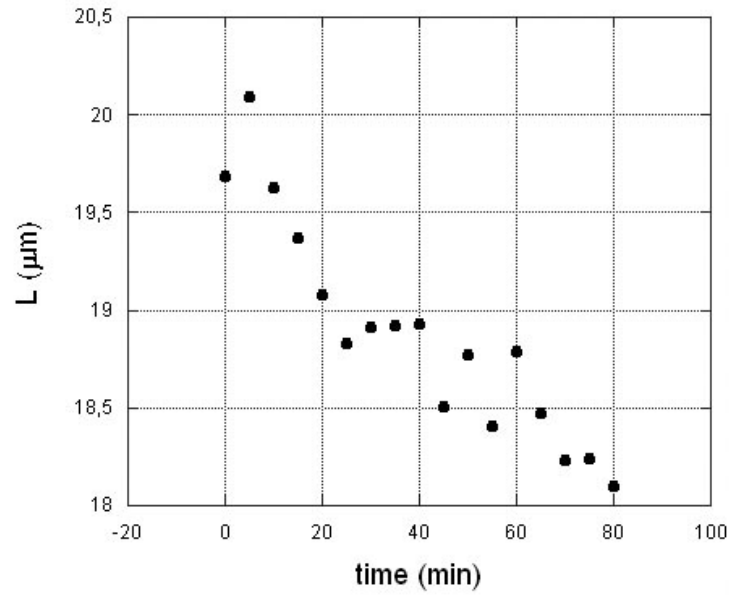


Fig. 3b: Contour length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex,  $\delta t = 5$  minutes and  $C_p = 2.5 \mu\text{g/ml}$ .

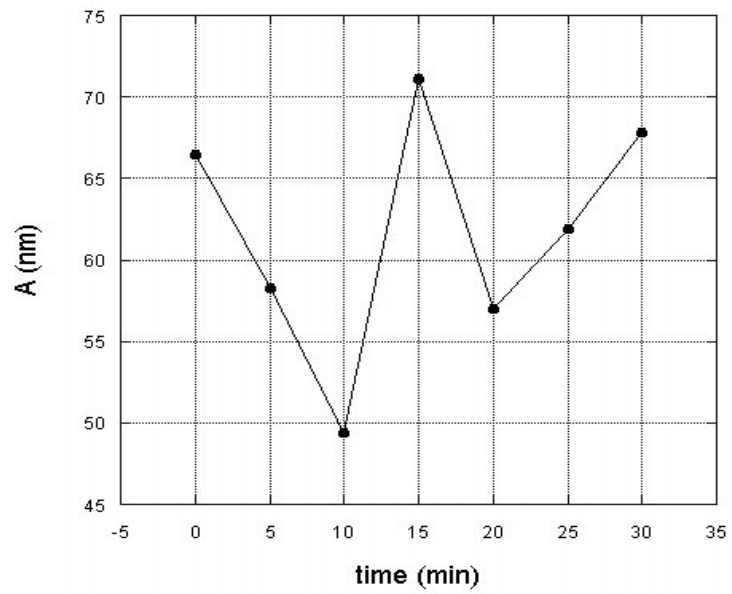


Fig. 4a: Persistence length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex,  $\delta t = 5$  minutes and  $C_p = 1.5 \mu\text{g/ml}$ .

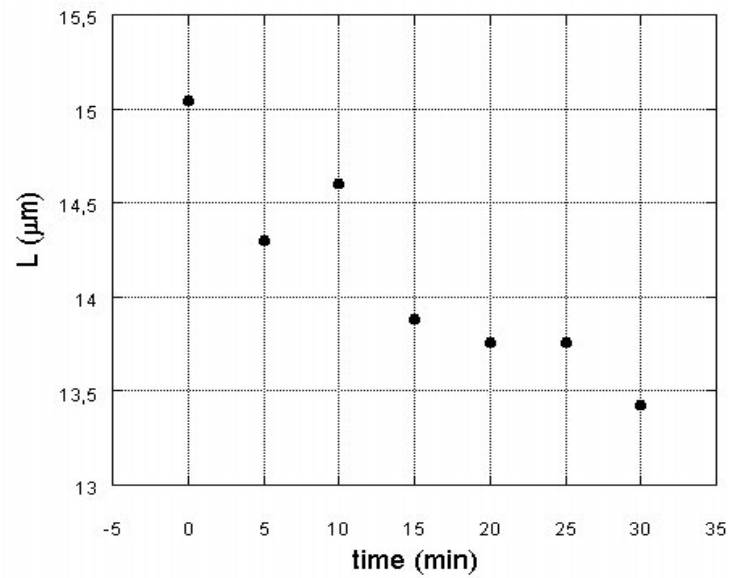


Fig. 4b: Contour length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex,  $\delta t = 5$  minutes and  $C_p = 1.5 \mu\text{g/ml}$ .

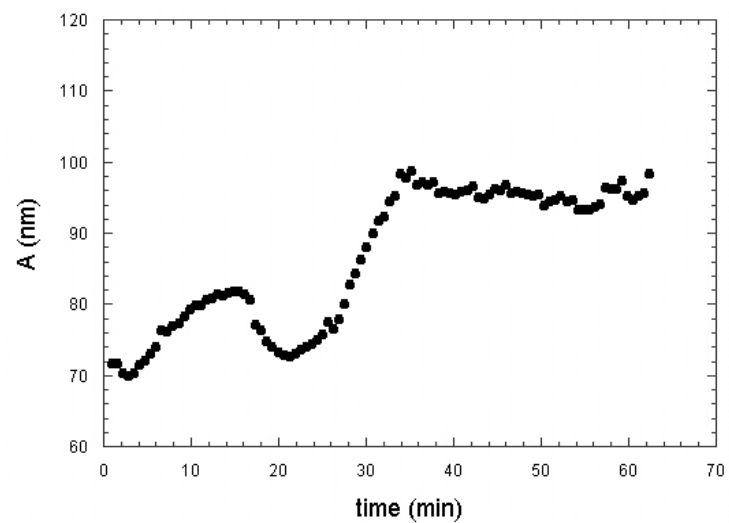


Fig. 5: Persistence length as a function of time for a particular DNA-psoralen complex. This kind of measurement is performed without turning off the illuminating lamp, and indicates that the value of  $A$  stabilizes after a certain period of time.

#### 4. CONCLUSION

We employ optical tweezers and intensity autocorrelation spectroscopy to study the interaction of  $\lambda$ -DNA molecules with the photosensitive drug psoralen. The results obtained show that the drug can modify greatly the rigidity of DNA molecules. The effects depend on the light used to illuminate the sample, as discussed in Section 3. We do not understand yet the kinetics of the DNA-psoralen interaction. The two different kinds of kinetics measurements are contradictory. This indicates that the fact to turn off the illuminating lamp interfere in the process. We are currently performing new experiments that we expect to help understanding the process.

The experimental technique used in this work can be used to study the rigidity modifications of the DNA molecules when interacting with other drugs. It is a powerful method to investigate DNA-drug interaction and can provide new data for modeling such interaction.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FAPEMIG, FINEP-PRONEX, and Instituto do Milênio de Nanociências – MCT. M.S.R. acknowledges support by Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

#### REFERENCES

1. A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* 24, 156 (1970).
2. A. Ashkin, and J. M. Dziedzic, *Science* 235, 1517 (1987).
3. A. Ashkin, *Biophys. J.* 61, 569 (1992).
4. K. Svoboda and S. M. Block, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 247 (1994).
5. D. G. Grier, *Nature* 424, 810 (2003).
6. N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. E* 65, 041921 (2002).
7. M. S. Rocha, N. B. Viana, and O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys.* 121, 19 (2004).
8. T. R. Coven, F. P. Murphy, and P. Gilleaudeau, *Arch. Dermatol.* 134, 1263 (1998).
9. D. Tran, Y. K. Kwok, and C. L. Goh, *Photodermatol. Photo.* 17, 164 (2001).
10. A. E. Peritz and F. P. Gasparro, *J. Invest. Derm. Symp. P.* 4, 11 (1999).
11. W. McNeely and K. L. Goa, *Drugs* 56, 667 (1998).
12. J. W. Petrozzi and A. M. Kligman, *Arch. Dermatol.* 114, 387 (1978).
13. M. Luftl, M. Rocken, G. Plewig, and K. Degitz, *J. Invest. Dermatol.* 111, 399 (1998).
14. D. W. Ussery, R. W. Hoepfner, and R. R. Sinden, *Met. in Enzimol.* 212, 13 (1992).
15. H. P. Spielmann, T. J. Dwyer, S. S. Sastry, J. E. Hearst, and D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2345 (1995).
16. G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky, and A. J. Libchaber, *Appl. Phys. Lett.* 73, 291 (1998).
17. J. F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, and V. Croquette, *Biophys. J.* 73, 2064 (1997).
18. J. F. Marko and E. D. Siggia, *Macromolecules* 28, 8759 (1995).
19. T. Strick, J. F. Allemand, and D. Bensimon, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 115 (2000).
20. M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, *Biophys. J.* 72, 1335 (1997).

## Absolute calibration of optical tweezers

N. B. Viana, A. Mazolli, P. A. Maia Neto,<sup>a)</sup> and H. M. Nussenzveig  
*LPO-COPEA and Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590 Brazil*

M. S. Rocha and O. N. Mesquita  
*Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 30123-970 Brazil*

(Received 6 October 2005; accepted 23 February 2006; published online 31 March 2006)

As a step toward absolute calibration of optical tweezers, a first-principles theory of trapping forces with no adjustable parameters, corrected for spherical aberration, is experimentally tested. Employing two very different setups, we find generally very good agreement for the transverse trap stiffness as a function of microsphere radius for a broad range of radii, including the values employed in practice, and at different sample chamber depths. The domain of validity of the WKB (“geometrical optics”) approximation to the theory is verified. Theoretical predictions for the trapping threshold, peak position, depth variation, multiple equilibria, and “jump” effects are also confirmed. © 2006 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2189148]

Optical tweezers have become very important tools in molecular cell biology and in physics.<sup>1</sup> Forces exerted on transparent microspheres, employed as handles and force transducers, are usually calibrated indirectly, by comparison with Stokes-like forces in fluid flow. Here we aim at absolute calibration through extensive, carefully controlled experimental tests of a first-principles theory of trapping forces<sup>2</sup> corrected for spherical aberration, formulated entirely in terms of measurable parameters.

In usual applications, the microsphere radius  $a$  is  $\sim \lambda$  (laser wavelength), so that Rayleigh or geometrical optics approximations cannot be applied: one must employ the Mie theory.<sup>3</sup> Realistic modeling of the strongly focused laser beam beyond the microscope objective requires the electromagnetic generalization<sup>4</sup> of Debye’s exact scalar representation. We refer to the combined model<sup>2</sup> as the MD (Mie-Debye) theory.

The interface between the microscope glass slide and the water in the sample chamber produces spherical aberration, which is incorporated into the MD theory by employing the associated aberration function.<sup>5</sup> The result, employed for the tests, is denoted as the MD spherical aberration (MDSA) theory. Other required parameters (all measurable) are: the waist  $w_0$  of the Gaussian incident beam *before* the objective of numerical aperture NA; the power  $P$  of the beam *locally* incident on the microsphere; refractive indices  $n_3$ ,  $n_2$ , and  $n_1$  of glass slide, microsphere, and surrounding fluid, respectively; the height  $h$  of the microsphere center relative to the sample chamber bottom (in the typical inverted microscope arrangement). Because of spherical aberration, the trapping force tends to decrease<sup>6</sup> with  $h$ .

Tests were independently performed at UFMG lab and COPEA lab, reproducibly at intervals of several months. Both employ Nikon TE300 microscopes and 100 $\times$  NA 1.4 Plan Appo CFI objectives, but with very different setups. The UFMG setup has been described elsewhere.<sup>7</sup> The laser is a diode one at  $\lambda=832$  nm. To circularize the beam, an anamorphic prism is used, with a 2 mm radius diaphragm, underfill-

ing the objective. The COPEA setup, similar to most widely adopted ones, has  $\lambda=1064$  nm and moderate objective overfilling.

Calibrated beads are available only for a restricted variety of sizes. To circumvent this, at UFMG, microscope immersion oil droplets in de-ionized water were employed. A sonicator yields droplet sizes ranging almost continuously from submicrometer to tens of micrometers. To obtain  $a$  for them, especially below  $2.5 \mu\text{m}$  where diffraction affects their CCD image, one measures their hydrodynamic drag  $\beta$  at a fixed height  $h$ , which, in terms of the known viscosity  $\eta$  of water, determines  $a$  by Faxen’s extension of the Stokes law.<sup>8</sup> The value of  $\beta$  is determined from the diffusion coefficient  $D$  for two-dimensional free Brownian microsphere motion, employing the Einstein relation. A check for calibrated polystyrene beads with  $a=(1.52\pm 0.03) \mu\text{m}$  yielded  $a=(1.5\pm 10\%) \mu\text{m}$ .

At COPEA, only polystyrene beads were employed. For  $a > 2.5 \mu\text{m}$ , using polydispersions, radii were measured by videomicroscopy and digital image analysis. For smaller  $a$ , calibrated beads were employed: the Brownian fluctuation method agreed with nominal manufacturer radius within 10%.

To set the height  $h$ , the microscope objective is moved down until the trapped bead touches the coverslip ( $h=a$ ), and the desired value is obtained by moving up the objective through a known distance  $d$ . At UFMG,  $h$  was kept constant for all  $a$ . At COPEA,  $d$  was kept constant for all  $a$ , corresponding to approximately constant  $h-a$ . Corrections for refraction in the relationship between  $d$  and  $h-a$  were taken into account. Refractive indices of oil and water were measured by the minimum deviation method; for polystyrene, the measured value<sup>9</sup> at 1064 nm is  $1.576+0.001i$ . We neglect absorption (to be included in a more detailed publication). For the COPEA setup, the effective opening angle  $\theta_0$  is the critical angle; for the UFMG setup, it follows from geometry and the sine condition.

Profile and waist of the Gaussian beam before the objective were measured by two different methods. One of them employs the CCD image of the laser beam and a ruler cali-

<sup>a)</sup>Electronic mail: pamn@if.ufrj.br

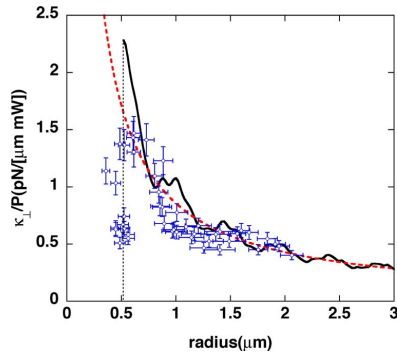


FIG. 1. (Color online) Transverse trap stiffness (divided by the local power) as a function of bead radius for oil beads ( $n_2=1.496$ ) in de-ionized water ( $n_1=1.343$ ) at height  $h=3.1 \mu\text{m}$ . Laser wavelength  $\lambda=0.832 \mu\text{m}$ , objective underfilling. Circles: experimental points (with error bars). Solid line: MDSA theory. Dashed line: geometrical optics. The threshold for trapping is indicated by a dotted vertical line.

bration. The other one measures laser power going through a diaphragm as a function of its radius. Results agree within 10% uncertainty.

Two independent techniques were employed at UFMG to determine *in situ* power  $P$  at the microsphere. One is a mercury microbolometer method.<sup>10</sup> The other one, also employed at COPEA, measures the beam power  $P_0$  reaching the objective and its transmittance, employing the dual objective method.<sup>8</sup> Care must be taken, however; objective transmittance in the infrared is not radially uniform.<sup>11</sup>

Trap stiffness is obtained at UFMG by dynamic light scattering,<sup>7</sup> employing a He-Ne probe laser. Measurements of backscattering profile and intensity autocorrelation function (ACF) of backscattered light determine decay times of Brownian bead position fluctuations. The ACF yields a long decay time  $\tau_{\parallel}$ , associated with axial stiffness, and a short decay time  $\tau_{\perp}$ , related to trap transverse stiffness  $\kappa_{\perp}$  by  $\kappa_{\perp}=\beta/\tau_{\perp}$ , where  $\beta$  is the previously determined hydrodynamic drag. At COPEA, stiffness is obtained by videomicroscopy and Faxen law calibration.<sup>8</sup>

Thus, one determines the ratio  $\kappa_{\perp}/P$  of trap stiffness to local power as a function of  $a$  and  $h$ , as well as all other parameters required for comparison with the MDSA theory. Results are shown in Figs. 1 and 2.

Figure 1 shows results from UFMG for oil beads at  $h=(3.1\pm 0.5) \mu\text{m}$ . The full line curve is the MDSA theory prediction. Objective underfilling reduces effective numerical aperture to  $\sim 0.8$ . For  $0.04 \mu\text{m} < a < 0.52 \mu\text{m}$ , the MDSA theory predicts no stable trapping; this is indicated by the vertical dotted line break. Correspondingly, experimental points cluster around different values.

The dashed line hyperbola in Fig. 1 is the GO (“geometrical optics,” i.e., WKB: interference of field amplitudes is preserved) result, the average<sup>2</sup> of oscillations of the exact theoretical result over a size parameter range  $\Delta(ka) \sim \pi$ . That WKB still provides fairly good estimates of stiffness down to  $ka \sim 2\pi$  is understandable: contributing incident rays are unaffected by the dominant diffraction and resonance effects in Mie scattering.<sup>3</sup> Good agreement with experiment in the GO limit is also a nontrivial test of the MDSA results, since there are no free parameters.

Downloaded 31 Mar 2006 to 150.164.15.146. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://apl.aip.org/apl/copyright.jsp

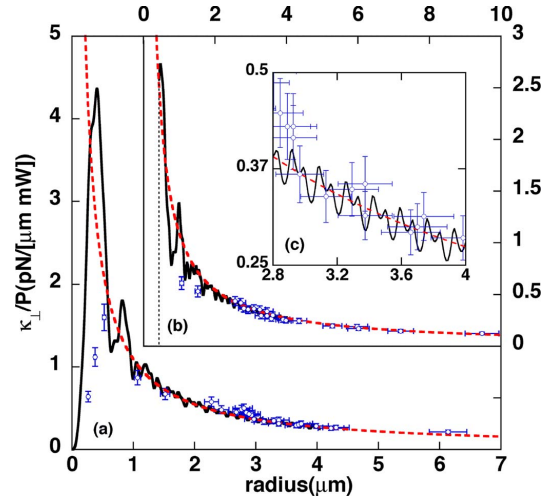


FIG. 2. (Color online) Same conventions as Fig. 1, for polystyrene beads ( $n_2=1.576$ ) in de-ionized water ( $n_1=1.332$ ), (a) at  $h-a=2.7 \mu\text{m}$ ; (b) at  $h-a=13.2 \mu\text{m}$ ; (c) amplification of (a) in the region  $2.8 \mu\text{m} \leq a \leq 4.0 \mu\text{m}$ . Laser wavelength  $\lambda=1.064 \mu\text{m}$ , moderate objective overfilling.

Figure 2(a) shows corresponding results for the COPEA setup at  $h-a=(2.7\pm 0.5) \mu\text{m}$ . Moderate objective overfilling in this setup allows stable trapping below the peak of the curve. For the lowest measured  $a$ , theory predicts two equilibrium points (see further discussion of multiple equilibria below), but only the most stable one is considered.

The amplified scale in Fig. 2(c) reveals the persistence of oscillations in the tail of the theoretical curve: they arise from interference among multiple reflections at upper and lower microsphere interfaces. Their period, as predicted,<sup>2</sup> is  $\Delta a = \frac{1}{4} \lambda / n_2 \approx 0.169 \mu\text{m}$ . For the UFMG setup, the oscillations are distorted (Fig. 1) by the beam aperture constraint.

Figure 2(b) shows corresponding COPEA data at  $h-a=(13.2\pm 0.5) \mu\text{m}$ . Spherical aberration degrades stiffness values, thus also producing a trapping “threshold,” indicated by the vertical dotted line. To the left of it, the number of possible equilibrium points rapidly increases and many become unstable, so that trapping in this Rayleigh regime, while not excluded (as it is for Fig. 1), is very hard to achieve and detect.

Data from UFMG at  $h=(8.6\pm 0.5) \mu\text{m}$  (not shown) differ very little from those in Fig. 1, as predicted by theory, because of the reduced effects of spherical aberration for a more paraxial beam.

Multiple equilibria situations occur in the near-Rayleigh regime, when paraxial trapping can be described by an optical potential. The interference fringes bordering the focal region in the diffraction theory of spherical aberration<sup>5</sup> produce axial oscillations in this potential, minima of which represent equilibria. For the COPEA parameters, the MDSA optical potential  $V(z)$  along the beam axis (with origin at the paraxial focus) for  $a=0.265 \mu\text{m}$  and local power  $P=20 \text{ mW}$  is plotted in Fig. 3 at three different objective displacements.

The plots show, besides the equilibrium point nearest to the paraxial focus, additional ones competing with it in stability (measured by the well depth) as  $d$  varies. In particular,

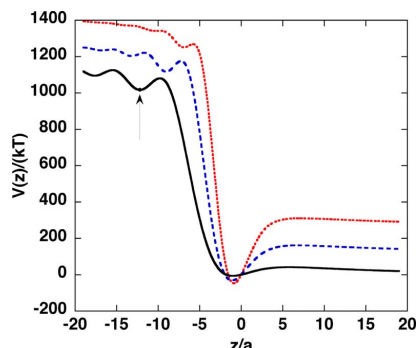


FIG. 3. (Color online) Optical potential along the  $z$  axis (in units of  $kT$ ) for the COPEA parameters, with  $a=0.265 \mu\text{m}$  and a local power of  $P=20 \text{ mW}$ . Objective displacement:  $d=15 \mu\text{m}$  (solid line),  $6.5 \mu\text{m}$  (dashed line), and  $3.0 \mu\text{m}$  (dotted line). The arrow points to the most stable equilibrium point for  $d=15 \mu\text{m}$ .

for  $d=15 \mu\text{m}$ , an equilibrium point far from the focus is the most stable one. Its well depth remains close to  $60 \text{ kT}$  as  $d$  decreases to  $d=6.5 \mu\text{m}$ , but below this value of  $d$  it begins decreasing faster, reaching  $17 \text{ kT}$  for  $d=3.0 \mu\text{m}$ . At  $d=6.5 \mu\text{m}$ , the potential well near the focus is already much deeper, and the distance between those two predicted equilibrium points is  $2.1 \mu\text{m}$ .

These predictions were tested by video microscopy, by following the image of the trapped bead as the objective was displaced downwards, from  $d=15 \mu\text{m}$  down to  $d=3.0 \mu\text{m}$ . A sudden “jump” of the image was observed around  $d=6.5 \mu\text{m}$ , and calibration of the bead positions relative to the respective paraxial focal planes led to a measured value of  $(2.2 \pm 0.5) \mu\text{m}$  for the distance between the two equilibrium points, in good agreement with the MDSA prediction.

The largest deviation from theoretical predictions occurs within the stiffness peak (Fig. 2), where the steeply changing curve is most sensitive to additional perturbations. As the microsphere radius decreases in this region, one enters the domain of multiple equilibria, and Brownian fluctuations are

enhanced. Effects not taken into account in MDSA theory include objective aberrations in the infrared, multiple beam reflections between the bead and the glass slide and the effects of evanescent waves beyond the critical angle, as well as possible bead surface distortions or contaminations. In applications requiring accurate force measurements, in view of these perturbations, it seems advisable to stay at least a couple of wavelengths away from the glass slide. Accounting for deviations may yield new insights concerning bead-surface interactions.

In conclusion, we have demonstrated that the MDSA *ab initio* theory of trapping forces in optical tweezers, formulated solely in terms of experimentally accessible parameters, can be taken as a basis for absolute calibration, by verifying in detail its consequences concerning trap stiffness and trapping thresholds for different setups, peak locations, relationship with and domain of validity of the WKB approximation, size and height dependence all the way from the Rayleigh regime to the geometrical optics one, and description of multiple equilibria and “jump” effects.

This work was supported by the Brazilian agencies CNPq, FAPEMIG, FAPERJ, FUJB, and Institutos do Milênio de Nanociências e de Informação Quântica. M.S.R. acknowledges support by LNLS.

- <sup>1</sup>Molecular Motors, edited by M. Schliwa (Wiley-VCH, Weinheim, 2003).
- <sup>2</sup>A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, Proc. R. Soc. London, Ser. A **459**, 3021 (2003).
- <sup>3</sup>H. M. Nussenzveig, *Diffraction Effects in Semiclassical Scattering* (Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1992).
- <sup>4</sup>B. Richards and E. Wolf, Proc. R. Soc. London, Ser. A **253**, 358 (1959).
- <sup>5</sup>C. J. R. Sheppard and P. Török, J. Microsc. **185**, 366 (1997).
- <sup>6</sup>H. Felgner, O. Muller, and M. Schliwa, Appl. Opt. **34**, 977 (1995).
- <sup>7</sup>N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, Phys. Rev. E **65**, 041921 (2002).
- <sup>8</sup>K. C. Neuman and S. M. Block, Rev. Sci. Instrum. **75**, 2787 (2004).
- <sup>9</sup>X. Ma, J. Q. Lu, R. S. Brock, K. M. Jacobs, P. Yang, and X.-H. Hu, Phys. Med. Biol. **48**, 4165 (2003).
- <sup>10</sup>N. B. Viana, O. N. Mesquita, and A. Mazolli, Appl. Phys. Lett. **81**, 1765 (2002).
- <sup>11</sup>N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, and P. A. Maia Neto, Appl. Opt. (to be published).

## Characterization of objective transmittance for optical tweezers

N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, and P. A. Maia Neto

We have measured the overall transmittance of a laser beam through an oil immersion objective as a function of the transverse size of the laser beam, using the dual-objective method. Our results show that the objective transmittance is not uniform and that its dependence on the radial beam's position can be modeled by a Gaussian function. This property affects the intensity distribution pattern in the sample region and should be taken into account in theoretical descriptions of optical tweezers. Moreover, one must consider this position dependence to determine the local laser power delivered at the sample region by the dual-objective method, especially when the beam overfills the objective's back entrance. If the transmittance is assumed to be uniform, the local power is overestimated. © 2006 Optical Society of America

OCIS codes: 120.0120, 140.7010, 110.0180, 120.4640.

### 1. Introduction

Optical tweezers are single-beam optical traps of microparticles.<sup>1</sup> They provide a unique tool for measuring displacements and forces at the single-molecule level, leading to remarkable progress in several important fields in physics and biology, for instance, in the study of molecular motors.<sup>2</sup>

One usually achieves trapping by shining a laser beam on the back entrance of a high-magnification and high-numerical-aperture microscope objective. The microscope objective brings the laser beam to a diffraction-limited focal spot, producing the strong intensity gradients that are responsible for trapping. The samples are often aqueous solutions of the objects that we want to trap. With this scheme it is possible to trap transparent particles in the micrometer range with refractive indices slightly higher than the medium's refractive index.

For most quantitative applications, transparent

microspheres are employed as handles. They may be employed as force transducers after the trapping force is calibrated (for instance, against the Stokes dragging force).

The microspheres usually have radius  $a$  of the order of the trapping laser's wavelength  $\lambda$ . This is outside the range of validity of the geometrical optics (GO) approximation. Recently a realistic theoretical model for the optical force was developed.<sup>3</sup> It is based on Mie scattering calculation and on the Debye-type representation for the focused trapping beam developed by Richards and Wolf.<sup>4</sup> When the spherical aberration produced at the glass-water interface<sup>5</sup> is taken into account,<sup>6</sup> this model is referred to as the Mie-Debye spherical aberration (MDSA) theory. The MDSA allows for absolute calibration of optical tweezers<sup>7</sup> if all experimental parameters are carefully and independently measured.

Trapping properties depend on the relative importance of the radiation pressure compared with the gradient force. In terms of GO language, paraxial rays contribute mostly to radiation pressure, whereas wide-angle rays provide the dominant contribution to the gradient force. Hence a realistic description of the focused beam is essential to achieve quantitative agreement between theory and experiment. The Richards-Wolf (RW) model provides such a description, as it is intrinsically nonparaxial and takes polarization into account.

In addition, the RW model provides a natural connection between the GO picture and wave optics, because the focused beam is written as a superposition of plane waves, with each component corresponding

N. B. Viana (nathan@ifufrj.br), P. A. Maia Neto, and A. Mazolli are with Laboratório de Pinças Óticas-COPEA, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil, and with Instituto de Física, UFRJ, Caixa Postal 68528, Rio de Janeiro, RJ, 21941-972, Brazil. M. S. Rocha and O. N. Mesquita are with the Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte, MG, 20123-970, Brazil.

Received 24 August 2005; revised 17 October 2005; accepted 18 November 2005; posted 15 February 2006 (Doc. ID 64395).

0003-6935/06/184263-07\$15.00/0

© 2006 Optical Society of America

to a given ray of the focused beam, which, in its turn, is associated with a given ray at the entrance port of the objective by the sine condition.

For our purposes it is necessary to incorporate the following additional ingredients into the RW model to have the correct intensity distribution over the focused beam:

- the intensity profile at the entrance port of the objective, which is defined by the transverse propagation mode of the incoming laser beam,
- the refraction at the interface separating the glass slide from the aqueous solution (and the corresponding spherical aberration effect), and
- the variation of the transmittance with distance  $\rho$  between a given ray at the entrance port and the symmetry axis (we assume that the rays are parallel to the axis).

In this paper we investigate in detail the last-named effect by measuring the transmittance function of a  $100\times$  numerical aperture (NA) 1.4, Plan Apo CFI objective of an inverted Nikon TE300 microscope. This microscope is an infinity-corrected optical system, so the rays of the incoming laser beam must be parallel at the objective entrance, in agreement with our model. Such is also the case for the majority of modern microscopes.

We have employed two independent setups with different laser sources. The first setup employs a diode laser (SDL, 5422-H1) operating at  $\lambda = 832$  nm. To make the beam circular, an anamorphic prism is used, followed by a beam expander. For the second setup, similar to the most widely adopted one, the beam is delivered by a Nd:YAG laser (Quantronix) operating at  $\lambda = 1064$  nm.

The results for the transmittance function allow us to revise the values for local laser power  $P_L$  delivered at the sample obtained by the dual-objective method.<sup>8</sup> We show that the assumption of uniform objective transmittance leads to overestimated values for  $P_L$ .

As a side result, our method also provides the value for the waist of the input laser beam.

## 2. Transmittance Function

We measured the overall transmittance of the objective as a function of the transverse size of the beam by using the dual-objective method.

In Fig. 1 we present a schematic representation of the dual-objective method. On top of the microscope stage, with the inverted objective below, we mounted a second, identical objective, in the upright position.  $P_E$  is the power at the entrance of the inverted objective, and  $P_{out}$  is the power transmitted by the composed system. We assume that the transmittance is the same for both objectives. The objectives are positioned by three Newport actuators and the microscope stage to produce a collimated beam emerging from the second objective, with the same axis of the beam entering the first objective.

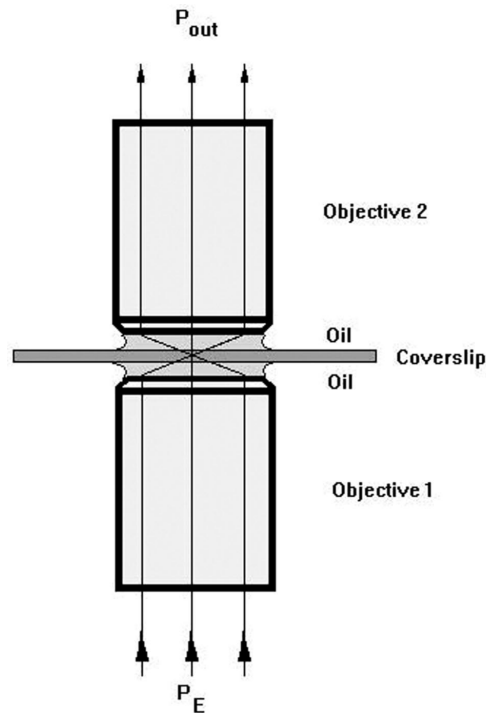


Fig. 1. Schematic representation of the dual-objective method.

We put in front of the beam, before it enters the first objective, a diaphragm with aperture radius  $R$ . Changing  $R$  allows us to control the transverse size of the beam.

We assume that both  $R$  and  $R_{obj}$ , the radius of the objective's back entrance, are much larger than  $\lambda$ . This allows us to neglect diffraction when we are analyzing the relation among the power transmitted by diaphragm,  $P_E$ , power  $P_t$  delivered by the source, and waist  $\sigma$  of the Gaussian beam profile. Then we calculate  $P_E$  by integrating the beam intensity over the area of the diaphragm:

$$P_E = \int_0^R \frac{P_t}{\sigma^2} \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho. \quad (1)$$

We find that

$$P_E(R) = A(R, \sigma)P_t, \quad (2)$$

where

$$A(R, \sigma) = 1 - \exp\left(-\frac{R^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3)$$

is the filling factor of the beam entering the dia-

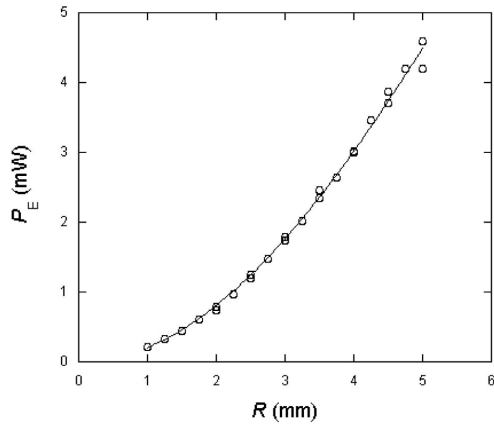


Fig. 2. Power transmitted by diaphragm  $P_E$  as a function of its radius  $R$  for the diode laser beam.

phragm.<sup>9</sup> In case of underfilling ( $\sigma \ll R$ ),  $A \rightarrow 1$ , whereas for overfilling ( $\sigma \gg R$ ),  $A \rightarrow 0$ .

In Figs. 2 and 3 we plot  $P_E$  as a function of  $R$  for the diode and Nd:YAG beams, respectively.

By fitting the measured  $P_E$  values as a function of  $R$  to Eq. (2), we obtain the parameters  $\sigma$  and  $P_t$  that characterize each beam. For the diode beam we find that  $\sigma = (6.6 \pm 0.7)$  mm and  $P_t = (18 \pm 3)$  mW. For the Nd:YAG beam we find that  $\sigma = (1.9 \pm 0.1)$  mm and  $P_t = (940 \pm 13)$  mW. We have also measured  $\sigma$  from the CCD image of the beam, using a ruler calibration. The results agree within the error bars.

In considering the transmittance through the dual-objective system, we analyze only the range  $0 < R < R_{\text{obj}}$ , allowing us to neglect losses at the objective's back entrance. For the objective used in this work we have  $R_{\text{obj}} = (3.5 \pm 0.1)$  mm. In Fig. 4 the points

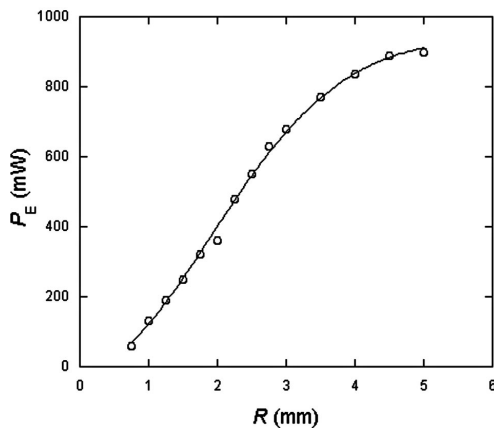


Fig. 3. Same conventions as for Fig. 2, for the Nd:YAG laser beam.

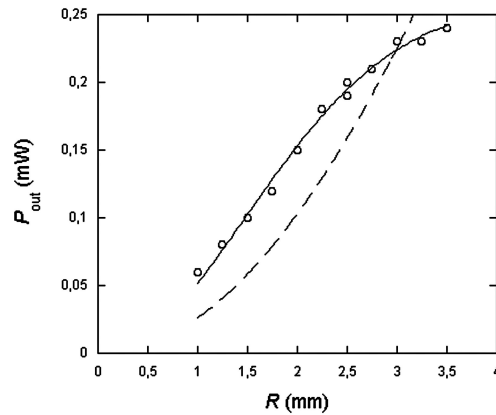


Fig. 4. Power emerging from the dual-objective system as a function of radius  $R$  of the diaphragm, for the diode laser beam. Dashed curve, best fit when a uniform objective transmittance is assumed; solid curve, best fit with a nonuniform transmittance.

represent the experimental values of  $P_{\text{out}}$  as a function of  $R$  for the diode laser beam. The figure indicates that  $P_{\text{out}}$  saturates for  $R > 3$  mm. The value of the waist,  $\sigma = 6.6$  mm, is too large to account for this saturation (cf. Fig. 2) and thus indicates that the transmittance of the objective decreases as the transverse size of the beam increases.

In fact, it is not possible to fit the experimental data shown in Fig. 4 if we assume that objective transmittance  $T$  is uniform. In this case we would have

$$P_{\text{out}} = T^2 A(R, \sigma) P_t. \quad (4)$$

The dashed curve in Fig. 4 corresponds to the best fit with this equation (yielding transmittance  $T = 0.36 \pm 0.01$ ).

To incorporate the variation of the transmittance with distance  $\rho$ , we take the Gaussian function

$$T(\rho) = T_A \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\xi^2}\right) \quad (5)$$

for the range  $\rho < R_{\text{obj}}$ .  $T_A$  is the transmittance at the symmetry axis. The transmittance decreases as the beam is displaced away from the axis of a typical distance  $\xi$ .

We assume that the scale of variation  $\xi$  is, as expected, also much larger than  $\lambda$ . This assumption, which will be verified by the analysis of the experimental data, allows us to employ GO when we are considering the overall transmittance of the laser beam.

In analogy with Eq. (1), we calculate  $P_{\text{out}}$  by integrating

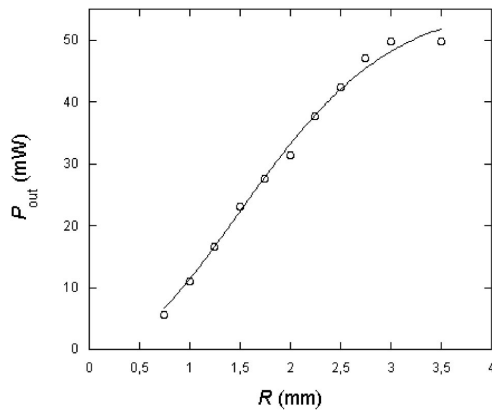


Fig. 5. Same conventions as for Fig. 4, for the Nd:YAG laser beam.

$$P_{out} = \int_0^R T(\rho)^2 \frac{P_t}{\sigma^2} \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho. \quad (6)$$

After substituting Eq. (5) into this equation, we find that

$$P_{out} = T_A^2 \frac{\xi^2}{2\sigma^2 + \xi^2} A\left(R, \frac{\sigma\xi}{\sqrt{2\sigma^2 + \xi^2}}\right) P_t, \quad (7)$$

where  $A(R, \zeta)$  is the filling factor function defined by Eq. (3), with  $\sigma$  replaced by an arbitrary length  $\zeta$ .

The solid curve in Fig. 4 represents the best fit with the function given by Eq. (7) for the diode laser beam. We conclude that compared with the uniform transmittance approximation the Gaussian transmittance function provides a much better model for our objective, especially for large values of  $\sigma$ . As shown in Fig. 5, good fitting is also obtained with Eq. (7) for the Nd:YAG beam.

From the fittings and the values of  $\sigma$  measured for each beam, we obtain the parameters  $T_A$  and  $\xi$  listed in Table 1.

The values for  $T_A$  at both wavelengths agree (within the error bars) with the measurements reported in Ref. 2 for the overall transmittance of the same objective.

As the objective is optimized for the visible, it is not surprising that we find a smaller transmittance at

Table 1. Parameters that Characterize the Gaussian Transmittance Function Given by Eq. (5) for Two Wavelengths<sup>a</sup>

Type of Laser	Wavelength	$T_A$	$\xi$ (mm)
Diode laser	$\lambda = 0.832 \mu\text{m}$	$0.53 \pm 0.01$	$2.2 \pm 0.1$
Nd:YAG laser	$\lambda = 1.064 \mu\text{m}$	$0.31 \pm 0.01$	$3.3 \pm 0.1$

<sup>a</sup> $T_A$  is the axial transmittance and  $\xi$  is the transverse length scale associated with the transmittance variation.

Table 2. Index of Symbols

Symbol	Meaning
$\rho$	Radial distance from axis
$R$	Radius of diaphragm
$\sigma$	Beam waist
$\xi$	Length that characterizes the radial variation of transmittance
$A(R, \sigma)$	Filling factor: fraction of power transmitted by the diaphragm

$\lambda = 1.064 \mu\text{m}$  (note, however, that the decay of the transmittance function is smoother for this  $\lambda$ ). The widespread use of antireflection coatings in the design of modern objectives may explain the strong  $\lambda$  dependence shown in Table 2, which was also reported in Ref. 2.

### 3. Local Power at the Sample Region

In quantitative applications of optical tweezers it is important to determine the local laser power  $P_L$  delivered at the trapping region. Different methods, for instance the use of an integrating sphere or a mercury microbolometer,<sup>10</sup> have been employed. However, the dual-objective method is usually considered to be the most reliable technique for determining  $P_L$ . In this section we show that this method overestimates  $P_L$  in the case of overfilling if one assumes, as in Refs. 2 and 8, that the objective's transmittance is uniform. We calculate the corresponding correction factor in terms of length parameter  $\xi$  that characterizes the variation of the objective transmittance function (see Table 1) and of laser beam waist  $\sigma$ .

In the usual optical tweezers setup, the beam is limited by the entrance aperture of the objective (of radius  $R_{obj}$ ) rather than by a diaphragm with radius  $R < R_{obj}$  as in the setup discussed in Section 2. Hence the power  $P_{out}$  transmitted by the dual-objective setup (see Fig. 1) is given in terms of input power  $P_t$  by Eqs. (6) and (7), with the substitution of  $R_{obj}$  for  $R$ .<sup>11</sup>

To disentangle the separate effects of the entrance aperture and of the objective itself, we write the output power as

$$P_{out} = \langle T^2 \rangle A(R_{obj}, \sigma) P_t, \quad (8)$$

where  $\langle T^2 \rangle$  is the average of the squared intrinsic transmittance. From Eqs. (6) and (8), it is given by

$$\langle T^2 \rangle = \frac{1}{\sigma^2 A(R_{obj}, \sigma)} \int_0^{R_{obj}} T(\rho)^2 \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho. \quad (9)$$

According to Eq. (9), we average  $T(\rho)^2$  over the transverse intensity variation of the laser beam that probes the transmittance function. For instance, if  $\sigma \ll \xi$ , then  $T(\rho)$  is approximately constant over the beam's cross section, and Eqs. (5) and (9) yield  $\langle T^2 \rangle \approx T_A^2$ .

If filling factor  $A(R_{obj}, \sigma)$  is known [either by direct

measurement or from the values of  $R_{\text{obj}}$  and  $\sigma$  and by use of Eq. (3)], one finds  $\langle T^2 \rangle$  by measuring  $P_{\text{out}}$  and  $P_t$ . Thus the experiments reported in Refs. 2 and 8 actually determine the squared average  $\langle T^2 \rangle$  and calculate the local power from its square root as follows:

$$P_L^{\text{rms}} = \sqrt{\langle T^2 \rangle} A(R_{\text{obj}}, \sigma) P_t. \quad (10)$$

However, the local power is given by the average (or overall)  $\langle T \rangle$  rather than by the root-mean-square (rms) transmittance:

$$P_L = \langle T \rangle A(R_{\text{obj}}, \sigma) P_t, \quad (11)$$

with

$$\langle T \rangle = \frac{1}{\sigma^2 A(R_{\text{obj}}, \sigma)} \int_0^{R_{\text{obj}}} T(\rho) \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho. \quad (12)$$

As  $\sqrt{\langle T^2 \rangle} \geq \langle T \rangle$ , the local power is overestimated if one follows the usual procedure and calculates the local power from Eq. (10) instead of Eq. (11). This procedure is accurate only if the transmittance is uniform for the rays entering the objective. Such is the case if the laser beam underfills the objective aperture ( $\sigma \ll \xi$ ), because in this situation the beam probes only the axial transmittance:  $\sqrt{\langle T^2 \rangle} \approx \langle T \rangle \approx T_A$ . However, usually optical tweezers setups employ overfilling of the objective entrance aperture so as to favor the gradient force and optimize the trapping conditions.

The systematic error is quantified by the relative discrepancy

$$\Delta = \frac{P_L^{\text{rms}} - P_L}{P_L} = \frac{\sqrt{\langle T^2 \rangle}}{\langle T \rangle} - 1. \quad (13)$$

In other words, the results of Refs. 2 and 8 should be corrected by the factor  $1/(1 + \Delta) \leq 1$ .

We calculate the average transmittance by substituting Eq. (5) into Eq. (12). The spatial variation associated with transmittance function  $T(\rho)$  may be combined with the beam profile variation. Then the effect of the transmittance variation amounts to reducing beam waist  $\sigma$  to the effective value  $\sigma_{\text{eff}}$  given by

$$\frac{1}{\sigma_{\text{eff}}^2} = \frac{1}{\sigma^2} + \frac{1}{\xi^2}. \quad (14)$$

The rms transmittance can likewise be computed by substituting Eq. (5) into Eq. (9), or more directly from Eqs. (7) and (8). The resultant relative discrepancy is written in terms of the filling factor function defined by Eq. (3):

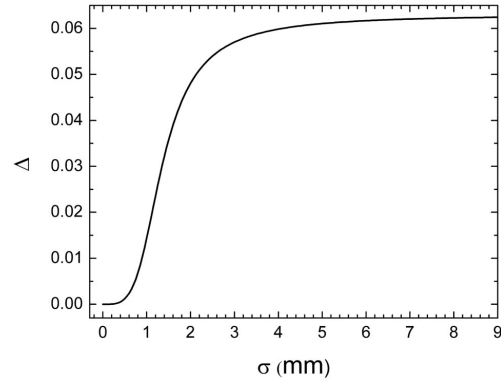


Fig. 6. Relative discrepancy  $\Delta$  as a function of  $\sigma$  for  $R_{\text{obj}} = 3.5$  mm and  $\xi = 2.2$  mm.

$$\Delta = \frac{\sigma^2 + \xi^2}{\xi \sqrt{2\sigma^2 + \xi^2}} \left\{ \frac{A(R_{\text{obj}}, \sigma) A\left[R_{\text{obj}}, \left(\frac{\sigma \xi}{\sqrt{2\sigma^2 + \xi^2}}\right)\right]}{A(R_{\text{obj}}, \sigma_{\text{eff}})} \right\}^{1/2} - 1. \quad (15)$$

The effective waist  $\sigma_{\text{eff}}$  is a function of  $\sigma$  for a given objective and wavelength (and the corresponding values of  $R_{\text{obj}}$  and  $\xi$ ). When  $\sigma \ll \xi$ ,  $\sigma_{\text{eff}} \approx \sigma$ , yielding, according to Eq. (15), a vanishing discrepancy, as expected for the uniform-transmittance limit.

In the opposite limit, corresponding to objective overfilling,  $\sigma \gg \xi$  and  $\sigma \gg R_{\text{obj}}$ , the discrepancy goes asymptotically to the value

$$\Delta_{\text{over}} = \frac{R_{\text{obj}}}{2\xi} \frac{\{1 - \exp[-(R_{\text{obj}}^2/\xi^2)]\}^{1/2}}{1 - \exp[-(R_{\text{obj}}^2/2\xi^2)]} - 1, \quad (16)$$

which we obtain by expanding  $A(R_{\text{obj}}, \sigma)$  in powers of  $R_{\text{obj}}/\sigma$  in Eq. (15).

In Fig. 6 we plot  $\Delta$  as a function of beam waist  $\sigma$  for  $R_{\text{obj}} = 3.5$  mm and  $\xi = 2.2$  mm, which corresponds to the wavelength of the diode laser (Table 1). As expected, the systematic error increases with  $\sigma$  because the laser beam probes larger ranges of radial distance  $\rho$  as the waist increases. For  $\sigma = 6.6$  mm, corresponding to our setup, we find that  $\Delta = 0.062$ , which is very close to the asymptotic value  $\Delta_{\text{over}} = 0.063$  at  $\xi = 2.2$  mm. Hence the standard rms calculation overestimates the local power by 6.2% in this case.

For the Nd:YAG beam, however, the error is negligible ( $\Delta = 0.010$ ), mainly because of the larger value of  $\xi$  at this wavelength. We analyze below how the asymptotic value for overfilling  $\Delta_{\text{over}}$  varies with  $\xi$ , especially for smaller values of this length, which correspond to less-uniform transmittance functions. For the objective analyzed here, it is unlikely that values considerably below 2.2 mm will be found in the range of wavelengths useful for trapping (for instance, a nearly constant overall transmittance was found from the near-infrared through the visible

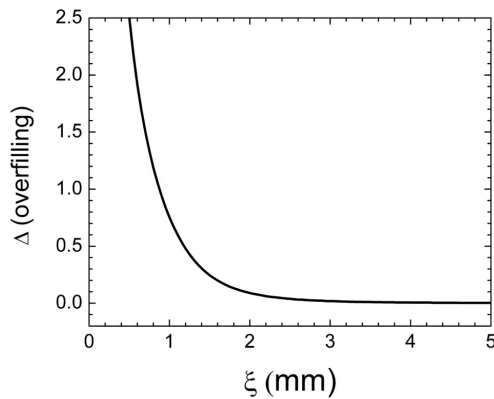


Fig. 7. Asymptotic value  $\Delta_{\text{over}}$  for large  $\sigma$  (overfilling) as a function of  $\xi$ .

range<sup>2</sup>). However, other objectives may eventually correspond to less-uniform transmittance functions, and thus it is interesting to analyze how large the correction factor could be in these cases.

In Fig. 7 we plot  $\Delta_{\text{over}}$  as a function of  $\xi$ , taking  $R_{\text{obj}} = 3.5$  mm. As expected, the discrepancy increases for smaller values of  $\xi$ . For instance, we find that  $\Delta_{\text{over}} = 0.25$  at  $\xi = 1.5$  mm.

So far, we have analyzed dual-objective experiments such that the squared transmittance is determined with the same beam waist used for trapping. A larger error results, however, if the transmittance is measured with beam waist  $\sigma_{\text{exp}}$  smaller than beam waist  $\sigma$  employed for trapping. If  $\sigma_{\text{exp}} \ll \xi$ , then the rms transmittance  $\sqrt{\langle T^2 \rangle} \approx T_A$ , whereas the average transmittance  $\langle T \rangle$  that gives the actual laser power at the trapping region is much smaller and is given by Eq. (12) in terms of  $\sigma$ . In this case, the relative discrepancy is given by

$$\Delta = \left( \frac{\sigma}{\sigma_{\text{eff}}} \right)^2 \frac{A(R_{\text{obj}}, \sigma)}{A(R_{\text{obj}}, \sigma_{\text{eff}})} - 1. \quad (17)$$

For our experimental parameters, and according to Eq. (17), the errors are 74% and 21% for the diode and Nd:YAG laser beams, respectively.

4. Trapping Stiffness

The variation of transmittance is easily included in MDSA theory<sup>3,7</sup> when this effect is modeled by a Gaussian transmittance function  $T(\rho)$  as in Eq. (5). As discussed in Section 4, this effect is equivalent to considering the reduced effective waist  $\sigma_{\text{eff}}$  defined by Eq. (14).

For quantitative applications of optical tweezers, the most important parameter that characterizes the trap is its transverse stiffness  $\kappa_p$ . We calculate the transverse trap's stiffness as a function of sphere radius  $a$  for the diode laser beam.

As the trapped beads, we use immersion oil (spher-

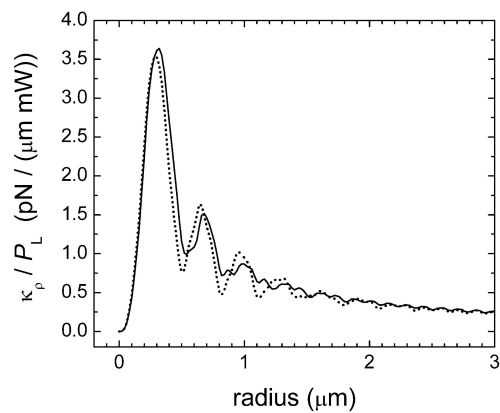


Fig. 8. Stiffness of transverse trap (divided by the local power) as a function of bead radius, for the diode laser beam, calculated by the MDSA theory. Dotted curve, transmittance assumed to be uniform; solid curve, measured transmittance function used.

ical) droplets (refractive index, 1.496) in water (refractive index, 1.332). Because the glass slide's index (1.51) does not match the water's index, spherical aberration is important in this numerical example, especially because the laser beam overfills the objective entrance aperture.<sup>6</sup> As a consequence, the stiffness depends on the height of the paraxial focus with respect to the glass slide. Usually, one sets the height by moving up the objective through a known distance  $d$  from the position in which the trapped bead touches the coverslip.

The numerical results shown in Fig. 8 simulate this experimental procedure, with  $d = 3$   $\mu\text{m}$ . In this figure we plot the ratio between  $\kappa_p$  and local laser power  $P_L$  as a function of  $a$ . The dotted curve corresponds to the uniform transmittance limit, calculated with the experimental waist  $\sigma = 6.6$  mm.

To take the transmittance variation into account, the solid curve presents the same calculation with  $\sigma$  replaced by  $\sigma_{\text{eff}} = 2.1$  mm obtained from Eq. (14). The main peak is displaced toward higher values of radius  $a$ , and the oscillations in the intermediate range  $a \sim \lambda$  are considerably damped.

5. Conclusions

We have measured the transmittance function of an immersion oil high-NA objective. We employed two laser sources with two wavelengths:  $\lambda = 0.832$   $\mu\text{m}$  (diode laser) and  $\lambda = 1.064$   $\mu\text{m}$  (Nd:YAG laser). For the first wavelength, the axial transmittance is considerably higher, but the transmittance function decays faster (smaller  $\xi$ ).

The dual-objective method overestimates the local power at the sample region if the transmittance is assumed to be uniform, as the rms is larger than the average transmittance. The corresponding systematic error depends on radius  $R_{\text{obj}}$  of the entrance aperture of the objective, the wavelength-dependent

length  $\xi$  that characterizes the scale of variation of the transmittance function, and waist  $\sigma$  of the laser beam. For the objective and the diode laser beam analyzed in this paper the relative error is 6%. The error increases considerably for smaller values of  $\xi$ .

If the transmittance is measured with a beam waist smaller than that employed for trapping, the local power is overestimated by as much as 74% if the trapping beam is our diode laser beam.

We have also analyzed the effect of variation of the transmittance on transverse trap stiffness  $\kappa_p$ , calculated as a function of the radius of the trapped beads. The oscillations of  $\kappa_p$  are considerably damped by this effect.

These results indicate that the variation of the objective's transmittance should be taken into account when one is comparing theory and experiments. On the theoretical side, the transmittance function modifies the effective waist of the laser beam. On the experimental side, it should be taken into account when one is determining the local power at the sample region by the dual-objective method.

We thank H. Moysés Nussenzveig for discussions. This research was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Projeto Milênio de Nanociências, Projeto Milênio de Informação Quântica, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB). M. S. Rocha acknowledges support from the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

#### References and Notes

1. A. Ashkin and J. M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science* **235**, 1517–1520 (1987).
2. K. C. Neuman and S. M. Block, "Optical trapping," *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 2787–2809 (2004).
3. A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, "Theory of trapping forces in optical tweezers," *Proc. R. Soc. London Ser. A* **459**, 3021–3041 (2003).
4. B. Richards and E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems. 2. Structure of the image field in an aplanatic system," *Proc. R. Soc. London Ser. A* **253**, 358–379 (1959).
5. C. J. R. Sheppard and P. Török, "Effects of specimen refractive index on confocal imaging," *J. Microsc.* **185**, 366–374 (1997).
6. D. Ganic, X. Gan, and M. Gu, "Exact radiation trapping force calculation based on vectorial diffraction theory," *Opt. Express* **12**, 2670–2675 (2004).
7. N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, "Absolute calibration of optical tweezers," *Appl. Phys. Lett.* **88**, 131110 (2006).
8. H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasak, N. Kitamura, and H. Masuhara, "3-Dimensional optical trapping and laser ablation of a single polymer latex particle in water," *J. App. Phys.* **70**, 3829–3836 (1991).
9. A. Ashkin, "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime," *Biophys. J.* **61**, 569–582 (1992).
10. N. B. Viana, O. N. Mesquita, and A. Mazolli, "In situ measurement of laser power at the focus of a high numerical aperture objective using a microbolometer," *Appl. Phys. Lett.* **81**, 1765–1767 (2002).
11. If the refractive index of sample chamber  $n_s$  is smaller than the numerical aperture NA, then the rays at a distance  $\rho \geq R_c = n_s R_{\text{obj}} / \text{NA}$  from the axis are eliminated by total internal reflection. This is the case for water samples ( $n_s = 1.33$ ) with objectives of 1.4 NA. In this case we could substitute  $R_c$  for  $R_{\text{obj}}$  throughout this section. However, the effect of this replacement is negligible because of the transmittance decay for large radial distances. For instance, Eq. (9) would yield, with  $R_c$  instead of  $R_{\text{obj}}$ , an output power smaller by only 2%.

PHYSICAL REVIEW E 75, 021914 (2007)

## Towards absolute calibration of optical tweezers

N. B. Viana,<sup>1,2</sup> M. S. Rocha,<sup>3</sup> O. N. Mesquita,<sup>3</sup> A. Mazolli,<sup>2</sup> P. A. Maia Neto,<sup>1,2</sup> and H. M. Nussenzveig<sup>1,2</sup><sup>1</sup>LPO-COPEA, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil<sup>2</sup>Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68528, Rio de Janeiro, RJ, 21941-972, Brazil<sup>3</sup>Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

(Received 31 August 2006; revised manuscript received 31 October 2006; published 23 February 2007)

Aiming at absolute force calibration of optical tweezers, following a critical review of proposed theoretical models, we present and test the results of Mie-Debye-spherical aberration (MDSA) theory, an extension of a previous (MD) model, taking account of spherical aberration at the glass-water interface. This first-principles theory is formulated entirely in terms of experimentally accessible parameters (none adjustable). Careful experimental tests of the MDSA theory, undertaken at two laboratories, with very different setups, are described. A detailed description is given of the procedures employed to measure laser beam waist, local beam power at the transparent microspheres trapped by the tweezers, microsphere radius, and the trap transverse stiffness, as a function of radius and height in the (inverted microscope) sample chamber. We find generally very good agreement with MDSA theory predictions, for a wide size range, from the Rayleigh domain to large radii, including the values most often employed in practice, and at different chamber heights, both with objective overfilling and underfilling. The results asymptotically approach geometrical optics in the mean over size intervals, as they should, and this already happens for size parameters not much larger than unity. MDSA predictions for the trapping threshold, position of stiffness peak, stiffness variation with height, multiple equilibrium points, and “hopping” effects among them are verified. Remaining discrepancies are ascribed to focus degradation, possibly arising from objective aberrations in the infrared, not yet included in MDSA theory.

DOI: 10.1103/PhysRevE.75.021914

PACS number(s): 87.80.Cc, 07.60.-j

## I. INTRODUCTION

Optical tweezers have become invaluable tools for measuring forces and displacements at the single molecule level in cell biology [1]. Transparent microspheres are employed as handles and force transducers. In the usual domain of application, the trapping force is well-described by Hooke’s law, so that force calibration amounts to determining the trap stiffness. Commonly applied methods rely on comparisons with fluid drag forces or on the detection of thermal fluctuation features [2].

Absolute calibration should be based on a theoretical expression for the stiffness in terms of measurable parameters. In the most widely employed optical tweezer setup, an incident TEM<sub>00</sub> laser beam of vacuum wavelength  $\lambda$ , typically in the near infrared, is focused by a high numerical aperture oil immersion objective of an inverted microscope through a glass slide onto a transparent microsphere immersed in water inside a sample chamber. One finds that high trapping efficiency requires a beam waist that slightly overfills the objective. The radius  $a$  of the microsphere usually ranges between  $0.1\lambda$  and  $10\lambda$ . Thus an accurate theoretical model should ideally satisfy several requirements.

(i) It should realistically model the strongly focused laser beam produced by the objective. Since most microscope objectives are corrected for the visible, there may be objective aberrations to account for in the infrared.

(ii) With oil immersion, the index discontinuity between the glass slide and the water gives rise to spherical aberration, which degrades the focus and must be included in the beam description.

(iii) The direct interaction between the focused beam and the microsphere spans the full range between Rayleigh scat-

tering and the ray optics limit, so that it should be described in terms of Mie scattering.

(iv) At the upper end of the range of microsphere radii, the results should approach the ray optics approximation. However, as is typical of “semiclassical” approximations [3], this is not to be understood as a pointwise limit, but rather as a size average over rapid interference oscillations.

(v) The directly scattered beam undergoes multiple reflections between the microsphere and the walls of the sample chamber (reverberation). Usually, only the glass slide may be close enough to have a possibly significant effect.

A brief critical review of proposed theoretical models, as far as possible in chronological order, follows.

A ray-optics model was formulated by Ashkin [4] from preliminary results derived by Roosen [5]. It did not take into account that high numerical aperture (NA) objectives are designed to satisfy the Abbe sine condition, which was later incorporated into the model by Gu *et al.* [6].

A widely employed wave-theoretical model is based on so-called generalized Lorentz-Mie theory (GLMT), developed by Gouesbet *et al.* [7]. The laser beam is represented by an attempted improvement on the paraxial Gaussian TEM<sub>00</sub> model, including fifth-order corrections in powers of the ratio between wavelength and beam waist [8]. However, it has been shown [9] that such an approximation does not correctly represent the field near the focus of a high NA objective.

A new approach was taken by Tlustý *et al.* [10]. They proposed to approximate the trapping force by the gradient of the dipole interaction energy integrated over the trapped particle, taken with respect to an unperturbed incident Gaussian beam around the focal point. This leads to a Gaussian fall-off of the transverse stiffness as a function of  $a$  for

VIANA *et al.*

PHYSICAL REVIEW E 75, 021914 (2007)

$a \gg \lambda$ , a result that is incompatible with the hyperbolic fall-off implied by dimensional arguments [11], and which is reflected in the large inconsistency they find with experimental data in this region.

Already in Ashkin's work [4] it was remarked that the proper wave description of a highly convergent beam is not a Gaussian, but rather the electromagnetic generalization [12] of Debye's classic exact scalar representation formulated by Richards and Wolf. This representation, with proper accounting for the sine condition, was adopted by Maia Neto and Nussenzveig [11] to evaluate the axial trapping force, with scattering described by Mie theory. The force at the geometrical focus shows rapid near-sinusoidal oscillations, accounted for by a simple interferometer picture. The axial stiffness approaches the Rayleigh limit for  $ka \ll 1$  ( $k = 2\pi n_1/\lambda$  is the wave number in the sample region, of index  $n_1$ ) and shows attenuated interference oscillations for  $ka \gg 1$ , with size average approaching the ray optics result.

In a new treatment by Rohrbach and Stelzer [13], an angular spectrum (Fourier) representation of the incident beam [14] analogous to the Richards-Wolf representation is employed. However, instead of the exact Mie theory, they extend the approach of Tlustý *et al.* by splitting the trapping force into a gradient force and a scattering force. The gradient force is given by an expression similar to that of Tlustý *et al.* (apart from the modified incident beam). The scattering force is obtained in the Rayleigh-Gans approximation, in terms of extinction and scattering efficiencies. While the result would suffer from a similar incompatibility with the ray optics limit, this problem does not arise because use of the Rayleigh-Gans approximation already restricts the domain of applicability to the range

$$2(n_2 - n_1)a \lesssim \lambda, \quad (1)$$

where  $n_2$  is the refractive index of the sphere.

The Mie-Debye (MD) theory was extended to transverse trapping forces by Mazolli *et al.* [15]. It was explicitly demonstrated that the exact partial-wave result approaches the ray optics one for large  $ka$ , in the sense of a size average, as it should. Besides the transverse trap stiffness, the equilibrium position with an external applied force and the maximum transverse force were also evaluated, taking due account of the interplay between axial and transverse equilibrium. As remarked by Merenda *et al.* [16], it is the only wave-theoretical treatment where this effect was correctly incorporated in the evaluation. Only a few experimental points were available for comparisons, and discrepancies were attributed to the effects of spherical aberration at the water-glass slide interface [effect (ii) above], not included in the MD theory.

A recent contribution by Rohrbach [17] does not properly refer to optical tweezers, but to a proposed new instrument, the photonic force microscope [18], which employs an upright microscope with a water-immersion objective, thereby avoiding this spherical aberration effect. The theory is the same as in Ref. [13], and therefore it is also inconsistent with the ray-optic limit, although the author asserts that it delivers reasonable results even when condition (1) is not satisfied.

An improved version of MD theory, including the effects of spherical aberration at the water-glass slide interface, denoted as Mie-Debye-spherical aberration (MDSA) theory and described in Sec. II, was experimentally tested and the results were briefly reported by Viana *et al.* [19]. The present work is a detailed presentation and discussion of these results.

## II. MDSA THEORY

The effect on a focused beam of spherical aberration produced by refraction at the interface between two transparent media, extending the Richards-Wolf solution, has been treated by Török *et al.* [20]. We follow the same procedure to incorporate this effect into the MD theory. Since the refractive index  $n$  of the glass slide is larger than the refractive index  $n_1$  of the water in the sample chamber, part of the incident beam angular spectrum of plane waves may exceed the critical angle. However, we shall neglect possible contributions from evanescent waves, expected to be negligible at distances from the interface larger than the wavelength, as will be assumed. Thus for each plane wave component of the incident beam, the transmission amplitude is

$$T(\theta) = \frac{2 \cos \theta}{\cos \theta + N \cos \theta_1}, \quad (2)$$

where  $N = n_1/n$ ,  $\theta$  is the angle between the wave-vector component  $\mathbf{k}$  and the  $z$ -axis at the glass slide, and  $\theta_1 = \arcsin(\sin \theta/N)$  is the corresponding angle in the sample chamber [21].

The refraction also (and more importantly) modifies the phases of the different plane-wave components of the laser beam. This is quantified by the spherical aberration function [20]

$$\Psi(z, \theta) = k \left[ -\frac{L}{N^2} \cos \theta + (L+z) \cos \theta_1 \right], \quad (3)$$

where  $L$  is the distance between the interface and the paraxial focal plane (Fig. 1).

The position of the center of the sphere with respect to the paraxial focus is  $(\rho, \phi, z)$  in cylindrical coordinates. For simplicity, we take circular polarization. In this case, the optical potential does not depend on  $\phi$ . With respect to the ideal case considered in Ref. [15], the multipole coefficients of the incident beam are modified by multiplying each plane-wave component by  $T(\theta)e^{i\Psi(z, \theta)}$ :

$$G_{jm} = \int_0^{\theta_0} d\theta \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \exp(-\gamma^2 \sin^2 \theta) T(\theta) \times d_{m,1}^j(\theta_1) J_{m-1}(k\rho \sin \theta_1) e^{i\Psi(z, \theta)}, \quad (4)$$

where  $d_{m,m'}^j(\theta)$  are the matrix elements of finite rotations [22], and  $J_m$  are the Bessel functions of integer order. The parameter  $\gamma = f/w$  is the ratio of the focal length to the beam waist at the entrance aperture of the objective (*not* at the sample). It determines the fraction of available beam power that fills the objective aperture (filling factor [4]). The frac-

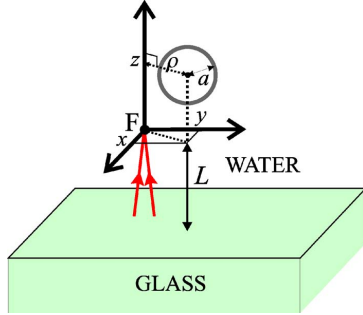


FIG. 1. (Color online) Schematic representation of the dielectric microsphere (radius  $a$ ) in the water solution. The paraxial focus  $F$  corresponds to the intersection of paraxial rays. Nonparaxial rays, not represented for clarity, intersect the symmetry  $z$ -axis between  $F$  and the glass-water plane interface, which is at a distance  $L$  from the paraxial focal plane. The microsphere position is measured with respect to  $F$ .

tion of available power transmitted into the sample chamber is given by

$$A = 16\gamma^2 \int_0^{\sin \theta_0} ds s \exp(-2\gamma^2 s^2) \frac{\sqrt{(1-s^2)(N^2-s^2)}}{(\sqrt{1-s^2} + \sqrt{N^2-s^2})^2}. \quad (5)$$

In the absence of the interface ( $N=1$ ),  $A$  coincides with the filling factor  $1 - \exp(-2\gamma^2 \sin^2 \theta_0)$  defined in Refs. [11,15].

Additional transmission losses through the objective, if any, must be taken into account to evaluate the actual power  $P$  at the sample (rather than the power at the entrance aperture). Investigation of the microscope objective employed in the present work has revealed that its transmittance at the infrared laser wavelength is not radially uniform [23]. This affects not only the power, but also the intensity gradients in the sample region. The objective transmission amplitude can be accurately modeled by a Gaussian function:

$$T_{\text{obj}}(\theta) = T_A \exp\left(-\frac{f^2 \sin^2 \theta}{4\xi^2}\right), \quad (6)$$

where  $T_A$  is the axial transmittance amplitude, and  $\xi$  is a length scale characterizing the objective for a given wavelength. This effect can readily be incorporated in terms of an effective reduced beam waist  $w_{\text{eff}}$  given by

$$\frac{1}{w_{\text{eff}}^2} = \frac{1}{w^2} + \frac{1}{4\xi^2}. \quad (7)$$

We represent the optical force by an efficiency factor in the usual way [4]:

$$\mathbf{Q} = \frac{\mathbf{F}}{n_1 P / c}, \quad (8)$$

where  $P$  is the local laser power at the sample and  $c$  is the velocity of light. The evaluation of the trapping force in terms of a partial-wave series is similar to that described in

[15]. We derive two separate contributions:  $\mathbf{Q} = \mathbf{Q}_s + \mathbf{Q}_e$ .  $\mathbf{Q}_e$  represents the rate of removal of momentum from the incident beam. Its axial component is

$$Q_{ez} = \frac{4\gamma^2}{AN} \text{Re} \sum_{j,m} (2j+1)(a_j + b_j) G_{j,m} G'_{j,m}^*, \quad (9)$$

where  $j$  ranges from one to infinity and  $m$  ranges from  $-j$  to  $j$ , the asterisk denotes complex conjugation,  $a_j$  and  $b_j$  are the Mie coefficients [24],  $G_{j,m}$  is given by Eq. (4), and

$$G'_{j,m} = \int_0^{\theta_0} d\theta \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \cos \theta_1 \exp(-\gamma^2 \sin^2 \theta) \times T(\theta) d_{m,1}^j(\theta_1) J_{m-1}(k\rho \sin \theta_1) e^{i\nu(\theta)}. \quad (10)$$

The transverse components in cylindrical coordinates are

$$Q_{e\rho} = \frac{2\gamma^2}{AN} \text{Im} \sum_{j,m} (2j+1)(a_j + b_j) G_{j,m} (G_{j,m+1}^{(-)} - G_{j,m-1}^{(+)*})^* \quad (11)$$

and

$$Q_{e\varphi} = -\frac{2\gamma^2}{AN} \text{Re} \sum_{j,m} (2j+1)(a_j + b_j) G_{j,m} (G_{j,m+1}^{(-)} + G_{j,m-1}^{(+)*})^*, \quad (12)$$

with

$$G_{j,m}^{\pm} = \int_0^{\theta_0} d\theta \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \sin \theta_1 \exp(-\gamma^2 \sin^2 \theta) \times T(\theta) d_{m\pm 1,1}^j(\theta_1) J_{m-1}(k\rho \sin \theta_1) e^{i\nu(\theta)}. \quad (13)$$

$\mathbf{Q}_s$  represents minus the rate of momentum transfer to the scattered field. Its components are given in the Appendix.

In this paper, we are particularly interested in the axial component (in order to derive the trapping threshold and the stable equilibrium positions, if any) and in the transverse trapping stiffness

$$\kappa_{\perp} = -\frac{n_1 P}{c} \frac{\partial Q_{\rho}}{\partial \rho},$$

where the derivative is taken at the equilibrium position  $z_{\text{eq}}$ , which lies along the  $z$ -axis ( $\rho=0$ ). To obtain  $\kappa_{\perp}$ , we first perform termwise differentiation of the partial-wave series for  $Q_{\rho}$  and then perform the summation numerically. Similarly,  $z_{\text{eq}}$  is computed numerically as the root of  $Q_z(z_{\text{eq}}) = 0$ . When multiple equilibrium positions are found, we take the most stable root, corresponding to the deepest potential well.

The distance  $L$  between the interface and the paraxial focus in Eq. (3) is not experimentally accessible. In the experiments, the (inverted) microscope objective is first moved down until the trapped microsphere just touches the interface, and then the desired height in the sample chamber is obtained by moving up the objective through a known distance  $d$  (for additional experimental details, see the next section). In order to mimic the experimental conditions, we adopt the following procedure. We first compute the critical distance  $L_c$ , for which the equilibrium position is such that

VIANA *et al.*

PHYSICAL REVIEW E 75, 021914 (2007)

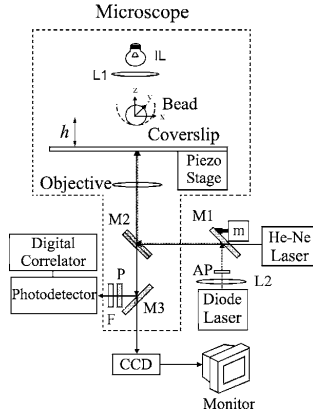


FIG. 2. Schematic representation of the diode laser setup (DLS).

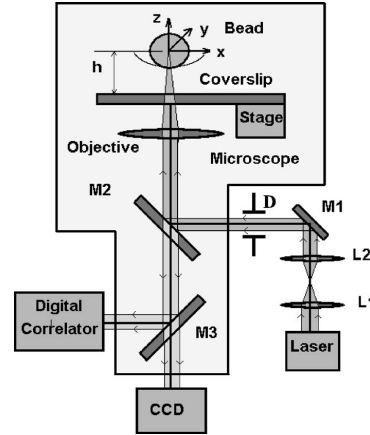


FIG. 3. Schematic representation of the YAG laser setup (YLS).

the sphere touches the interface, by numerically solving the equation  $Q_z(z_{\text{eq}}=a-L_c)=0$  for  $L_c$ . This determines the paraxial focal plane for the initial configuration. By moving up the objective through a distance  $d$ , the paraxial focal plane is displaced by  $Nd$ . Accordingly, we evaluate the equilibrium position and the transverse stiffness taking

$$L = L_c + Nd.$$

### III. EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### A. Experimental setups

The most important force calibration data for practical applications are the values of the transverse stiffness per unit local power as functions of microsphere radius and height in the sample chamber. Aiming at absolute calibration, we propose to make a blind comparison between theory and experiment, with no fitting parameter. Hence the relevant trap parameters, such as the power  $P$  at the sample and the beam waist  $w$  at the entrance aperture of the objective, were measured directly, and the resulting values were plugged into the MDSA model. Whenever possible, two different techniques were employed for measuring each parameter, and the results were checked against each other for consistency. The experiments were performed independently at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and Coordenação de Programas de Estudos Avançados (COPEA), reproducibly at intervals of several months.

The two laboratories employed very different setups, representative of those most often found in practice. Figure 2 is a schematic drawing of the diode laser setup (DLS), employed at UFMG laboratory.

A Nikon TE300 inverted optical microscope (infinity corrected) with  $100\times$  NA 1.4 Plan Apo CFI objective is employed for trapping, microsphere observation, and scattered light collection. To one port is attached a charge coupled device (CCD) camera (CCD-72 DAGE-MTI) for visualization; in the other port, we use a photodetector (EGG - Photon

Counting Module, SPCM-200-PQ-F500), with a collection diameter of  $150\ \mu\text{m}$ , mounted in Newport XY stages for precise positioning. The photodetector delivers pulses (amplitude 5 V and width 25 ns) ready to be fed into a Brookhaven BI-9000AT digital correlator. An infrared (ir) diode laser (SDL, 5422-H1) operating at 832 nm is used for trapping. A He-Ne laser (SP-127), operating at 632.8 nm, is the scattering probe. A 20 nm width line filter is placed in front of the photodetector to eliminate ir and any light other than that of the He-Ne laser. A half-wave plate and polarizers are used to control the intensity and polarization of the He-Ne incident and scattered light. A motor (m) is connected to mirror M1, which drives the ir beam onto the objective. The purpose of this motor is to move the ir beam and, consequently, move the trapped bead in relation to the fixed He-Ne laser beam, to obtain the backscattering profile. By determining the backscattering profile and measuring the backscattered light intensity autocorrelation function (ACF), one can obtain the decay time of the Brownian position fluctuations, and finally get the trap stiffness. This procedure is described in detail by Viana *et al.* [25].

The YAG laser setup (YLS), employed at COPEA laboratory, is shown in Fig. 3.

The YAG laser beam is expanded by the lenses  $L_1$  and  $L_2$  to a diameter of 10 mm. The microscope and objective are the same model as in the DLS setup. The expanded beam is led to the objective by mirrors  $M_1$  and  $M_2$ . Before the microscope epi-illumination port a diaphragm  $D$  is employed to control the beam radius. The microscope stage is moved by step motors in the  $x$  and  $y$  directions, and a Prior motion controller is used to get precise positioning ( $1\ \mu\text{m}$  accuracy). We use a CCD camera (Hamamatsu C2400) to observe the samples. In front of the CCD is placed a line filter that blocks light at the wavelength  $1.064\ \mu\text{m}$  to prevent scattered and reflected laser light from entering the view field. The signal from the CCD is fed to a Scion Digital Frame Grabber. The digitized images are analyzed with the NIH ImageJ program.

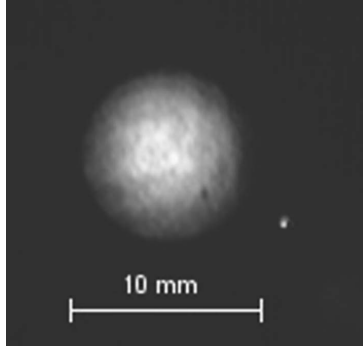


FIG. 4. YAG laser beam image.

**B. Measurement of beam waist**

To test MDSA theory, it is not necessary to measure the waist at the sample region, which is not an input parameter. On the other hand, the beam waist at the entrance aperture of the objective (or more generally the beam transverse intensity profile) is an important theoretical ingredient, which was measured independently by two different techniques: the CCD and the diaphragm methods.

In the CCD method, the objective of the microscope is removed and the sample is replaced by a mirror. After taking off the line filter, the reflected beam is imaged by the CCD. To get a ruler calibration, we first increase the laser power so as to saturate the image and obtain a good definition of the diaphragm border, and then we measure the corresponding diaphragm aperture (see Fig. 3). Figure 4 shows an image of the expanded YAG beam (10 mm diameter) and Fig. 5 shows the radial intensity profile obtained from Fig. 4. The intensity profile is fitted to a Gaussian function,

$$I(\rho) = I_0 e^{-\rho^2/2\sigma^2}. \quad (14)$$

The beam waist radius is  $w=2\sigma$ .

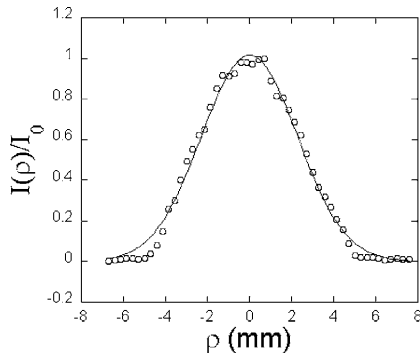


FIG. 5. Beam waist measurement with the CCD method: YAG beam intensity variation in the transverse plane. The Gaussian fitting (solid line) yields  $\sigma_{YLS}=2.3\pm 0.2$  mm.

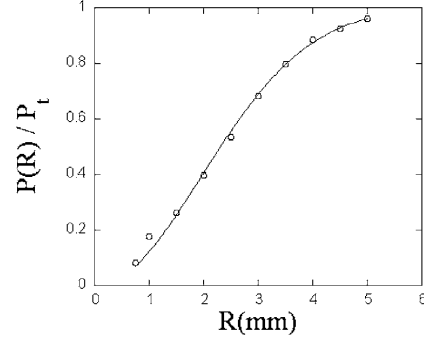


FIG. 6. Beam waist measurement with the diaphragm method: variation of transmitted power vs diaphragm radius  $R$  for the YAG beam.

From the fit we get  $\sigma_{YLS}=2.3\pm 0.2$  mm for the YAG beam. The error bar was obtained from the statistics of five experiments performed over a period of 1 year. The same method was applied to the diode laser beam, yielding  $\sigma_{DLS}=1.1\pm 0.1$  mm.

In the diaphragm method, we vary the diaphragm aperture  $R$  and measure, as a function of  $R$ , the transmitted laser power  $P(R)$ . With the Gaussian beam profile fit, we have

$$P(R) = P_t(1 - e^{-R^2/2\sigma^2}), \quad (15)$$

where  $P_t$  is the total power of the beam incident on the diaphragm.

Figure 6 is a plot of  $P(R)$  for the YAG laser. Adjusting the measured values to Eq. (15), we found a beam half-waist  $\sigma_{YLS}=2.1\pm 0.2$  mm. Here again, the error bar was obtained from the statistics of five experiments performed over a period of 1 year. Applying the same method to the diode laser we found a beam half waist  $\sigma_{DLS}=1.3\pm 0.1$  mm. Therefore the two methods agree to within the error bars.

**C. Measurement of power at the objective focus**

To measure local power at the sample for the DLS setup, two different methods were used: the dual objective method [26] and a mercury microbolometer method [27].

Figure 7 schematizes the dual objective method. On top of the microscope stage, with the inverted objective below, is mounted a second, identical objective, in the upright position.  $P_E$  is the power at the entrance of the inverted objective, and  $P_{out}$  is the power transmitted by the compound system. The transmittance is assumed the same for both objectives. The objectives are positioned using three Newport actuators and the microscope stage in order to get a collimated beam emerging from the second objective, coaxial with the beam entering the first objective.

From  $P_E$  and  $P_{out}$  we obtain a value for the overall transmittance of the compound system. However, care must be taken, since the objective transmittance in the infrared is usually not uniform: it is smaller for rays at larger distances from the axis (corresponding to larger angles in the sample

VIANA *et al.*

PHYSICAL REVIEW E 75, 021914 (2007)

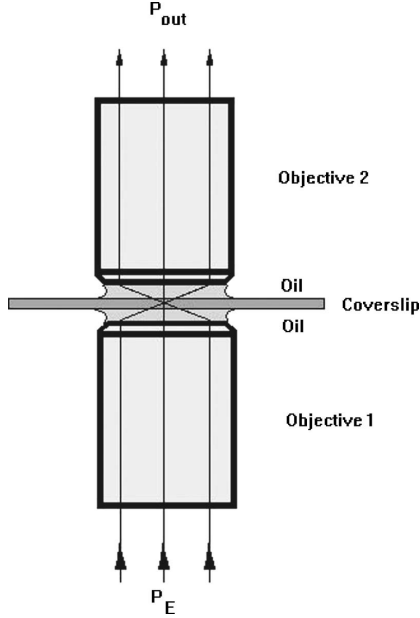


FIG. 7. Schematic representation of the dual objective method.

region) [23]. Thus the root-mean-square overall transmittance overestimates the average objective transmittance and the power at the sample (see Ref. [23] for details).

The Gaussian transmission amplitude model (6) yields the transmittance function (with  $\rho = f \sin \theta$ )

$$t_{\text{obj}}(\rho) = t_A \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\xi^2}\right), \quad (16)$$

where  $t_A = T_A^2$  represents the axial transmittance [28].

Table I shows the measured values for the parameters defining the Gaussian transmittance function (16), for the YLS and DLS laser wavelengths. The entrance aperture radii of the objectives were 3.5 mm for both the DLS and the YLS. From these values and the laser beam waists at the entrance port, we computed the average objective transmittance  $t$  for each setup. We found  $t = 0.20 \pm 0.02$  for the YLS and  $t = 0.45 \pm 0.03$  for the DLS. As expected, both values are below the respective axial transmittances shown in Table I.

TABLE I. Parameters characterizing the Gaussian transmittance function given by Eq. (6), for two different wavelengths.  $t_A$  is the axial transmittance and  $\xi$  is the transverse length scale associated to the transmittance radial variation.

	$t_A$	$\xi$ (mm)
DLS ( $\lambda = 0.832 \mu\text{m}$ )	$0.53 \pm 0.01$	$2.2 \pm 0.1$
YLS ( $\lambda = 1.064 \mu\text{m}$ )	$0.31 \pm 0.01$	$3.3 \pm 0.1$

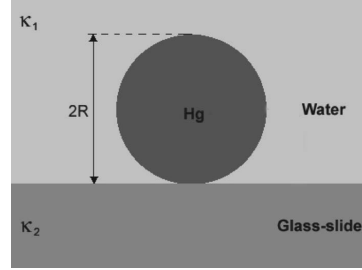


FIG. 8. Schematic representation of the microbolometer.

To evaluate the error bars, we considered the propagation of the errors in the measured beam waists.

The value for the DLS setup was checked with the help of a mercury microbolometer method [27]. The microbolometer, inserted into the DLS setup, consists of a standard Corning microscope glass slide (thickness  $170 \mu\text{m}$ ), with an O-ring of 1 cm diameter and 0.5 cm height glued onto it, filled with water, and containing mercury droplets with sizes in the  $\mu\text{m}$  range. Since we use an oil immersion objective, the microbolometer does not have any glass-air interface. Moreover, since the oil refractive index (1.496) is very close to the glass refractive index (1.51), we can ignore refraction at this interface in the analysis. Since the typical radii of the mercury droplets are in the micrometer range, each droplet may be modeled as a sphere embedded within two semi-infinite media (Fig. 8).

The incident laser beam is focused by the objective onto the mercury bead, heating it. A steady-state situation is achieved in a time scale of the order of 1 s. The mercury heat conductivity is about 13 times larger than the water conductivity. Therefore temperature at the surface of the mercury droplet remains constant for a given laser power. The laser power is then slowly increased until the mercury bead jumps. This occurs when its surface temperature reaches the boiling point of water ( $T_b = 97.2 \text{ }^\circ\text{C}$  at the laboratory), making the determination of this point very easy and accurate. Knowing the mercury droplet radius, the heat conductivities of the medium ( $\kappa_1 = 0.6791 \text{ W/mK}$  for  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ), and glass slide ( $\kappa_2 = 9.43 \text{ W/mK}$  for  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ), the absorption coefficient of mercury for the laser wavelength used ( $\text{Abs} = 0.272$ ), one can determine the local laser power  $P$ . The objective transmittance is obtained by measuring the mercury droplet radius as a function of the input power producing the “jump” (see [27] for details). We found  $t = 0.40 \pm 0.04$ , in agreement with the dual-objective result within error bars.

#### D. Measurement of bead radius

A thorough test of MDSA theory requires covering a broad range of microsphere radii. Precision calibrated commercial beads are available only for a restricted size range. The DLS setup employs uncalibrated immersion oil droplets in deionized water, produced by a sonicator, yielding an almost continuous range of sizes, from submicrometers to tens of micrometers. The radius of the droplets employed for testing needs to be directly measured.

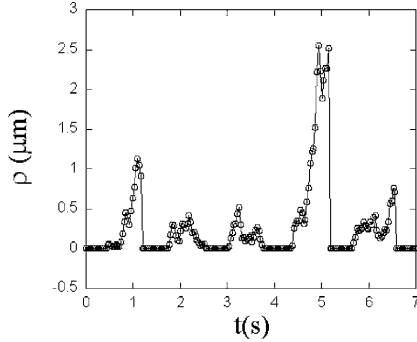


FIG. 9. Radial distance to the beam axis as a function of time when the optical trap is periodically switched on and off. When the trap is off, the bead undergoes free Brownian motion.

Up to a few  $\mu\text{m}$ , diffraction precludes reliable size determination by videomicroscopy. To measure radii in the range from 0.5 to 2.5  $\mu\text{m}$ , we employed an alternative method, based on the properties of the free Brownian motion performed by the beads when the optical trap is turned off. We infer the hydrodynamic drag coefficient  $\beta$  from the diffusion coefficient  $D$  by using the Einstein relation, and then obtain the radius from Faxen's extension of Stokes's law [2].

To check the method, we first applied it to a deionized water solution of polystyrene spheres of radius  $a = 1.52 \pm 0.03 \mu\text{m}$ . A  $10^{-4}\%$  solution is placed within a chamber built from an O-ring with  $\sim 1$  cm diameter and  $\sim 0.3$  cm width, glued on a coverslip with candle wax, and covered by another coverslip to avoid evaporation.

To control the bead height  $h = z + L$  (see Fig. 1), we first trap it with the optical tweezers and, employing the microscope knob, we move it towards the coverslip. When the bead touches the coverslip we see a change in its image. This is our reference height ( $h = a$ ) and we use it to place the bead at a desired height by acting again on the microscope knob. This procedure allows height determination with an uncertainty of 0.5  $\mu\text{m}$ .

After positioning the bead, we choose a small image area ( $\sim 50$  pixels  $\times$   $\sim 50$  pixels) in order to get a good frame capture rate, 27 to 28 frames per second. Then the position  $\boldsymbol{\rho} = \rho \hat{\boldsymbol{\rho}}(\phi)$  of the bead center-of-mass on the  $xy$  plane (the three-dimensional position is  $\mathbf{r} = \boldsymbol{\rho} + z\hat{\mathbf{z}}$ ) is measured at every 1/28 s. We turn the optical potential periodically on ( $\sim 0.5$  s) and off ( $\sim 0.5$  s) by shutting the beam. In Fig. 9 we show a typical result for the radial distance  $\rho(t)$  as a function of time. Note that  $\rho = 0$ , corresponding to the location of the trapping beam, also represents the trapping position on the  $xy$  plane.

The mean-square displacement is given by

$$\langle (\delta\rho)^2(t) \rangle = 4Dt, \quad (17)$$

where the diffusion coefficient is given, for temperature  $T$ , by the Einstein relation ( $k_B =$  Boltzmann constant) [30]

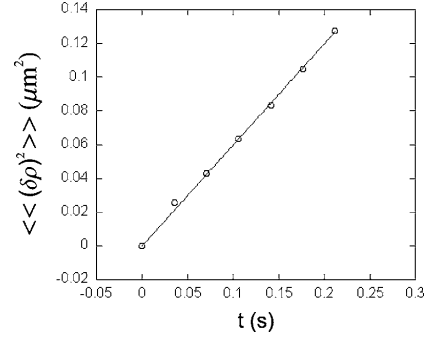


FIG. 10. Mean-square bead displacement as a function of time.

$$D = \frac{k_B T}{\beta}. \quad (18)$$

The drag coefficient  $\beta$  (for motion parallel to the glass interface) is given by Faxen's extension of the Stokes law in terms of the bead radius  $a$  and the height  $h$  [29]:

$$\beta = \frac{6\pi\eta a}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{a}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{a}{h}\right)^5}. \quad (19)$$

From the data illustrated in Fig. 9, we calculate  $\langle (\delta\rho)^2 \rangle$ , excluding the regions where  $\delta\rho < 0.01 \mu\text{m}$ , the precision limit for determination of the bead center of mass using usual centroid-finding algorithms [2]. Such regions correspond to the time intervals with the trap turned on. The time interval  $t$  in Eq. (17) is an integer multiple of the inverse frame acquisition rate  $\delta t$ .

In view of the time translation symmetry of free Brownian motion, we may combine data from different time intervals, allowing us to improve our statistics in computing  $\langle (\delta\rho)^2 \rangle$ . The data in Fig. 9 represents an ensemble of which each time window with the trap switched off is a realization. For each realization, we compute the average mean square displacements  $\langle (\delta\rho)^2 \rangle$  between nearest neighbors (separated by  $\delta t$ ), between next nearest neighbors (separated by  $2\delta t$ ), and so on, according to the formula

$$\langle (\delta\rho)^2(k\delta t) \rangle = \frac{k}{N} \sum_{j=0}^{N-k} \{ \boldsymbol{\rho}[j+k]\delta t - \boldsymbol{\rho}[j]\delta t \}^2, \quad (20)$$

where  $N$  is the total number of frames in a given time window and  $\boldsymbol{\rho}$  is the radial position vector of the bead center of mass on the  $xy$  plane (note that only  $\rho = |\boldsymbol{\rho}|$  is plotted in Fig. 9). The final result  $\langle \langle (\delta\rho)^2(k\delta t) \rangle \rangle$ , the ensemble average over all time windows, is plotted in Fig. 10 as a function of time  $t = k\delta t$ . From the linear fitting to Eq. (17), we obtain the diffusion coefficient  $D$ .

From the experimental value for  $D$ , we evaluate the drag coefficient  $\beta$  using Eq. (18). This procedure is repeated at various heights. Figure 11 shows the resulting values of  $\beta$  as a function of  $h$ .

VIANA *et al.*

PHYSICAL REVIEW E 75, 021914 (2007)

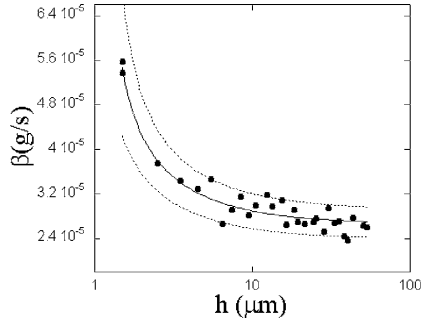


FIG. 11. Measured drag coefficient  $\beta$  as a function of bead height  $h$ . The nominal bead radius is  $1.52 \pm 0.02 \mu\text{m}$ , whereas the value measured from the Brownian motion is  $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ .

The continuous line in Fig. 11 represents the curve fit to Eq. (19). Near the coverslip wall, a small variation in  $h$  generates a substantial variation [cf. Eq. (19)] in the corresponding value of  $\beta$ . To account for this source of error in height determination, we introduce an offset  $h_0$  in the curve fitting function. From the fit we get  $h_0 = 0.3 \mu\text{m}$  and  $a = 1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ . The latter is in good agreement with the nominal radius  $1.52 \pm 0.02 \mu\text{m}$  of the calibrated bead.

The dashed lines in Fig. 11 correspond to the calculated values of  $\beta$  for a variation of  $\pm 10\%$  in the sphere radius  $a$ . We see that the data points are spread out between the two dashed lines, showing that the sphere radius is measured with 10% uncertainty. For droplets with  $a > 2.5 \mu\text{m}$ , the radius was measured by videomicroscopy and ruler calibration. Figure 12 shows the image of a polystyrene sphere of measured radius  $5.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$  and Fig. 13 shows the corresponding gray-level profile. We take the sphere diameter to be the distance between the centers of the sigmoid branches in Fig. 13, and the error bar as 1 pixel ( $\sim 0.1 \mu\text{m}$ ).

For the YLS setup, we employed a few available calibrated beads in the range below  $2 \mu\text{m}$ , and a polydispersion

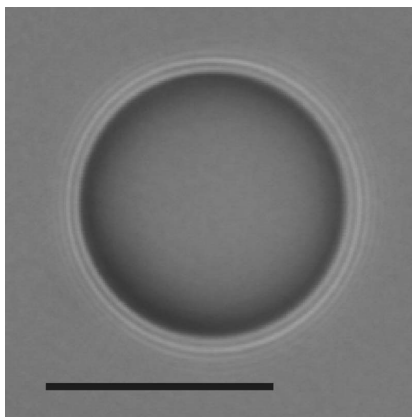


FIG. 12. Bead image: radius equal to  $5.8 \mu\text{m}$ , scale bar  $10 \mu\text{m}$ .

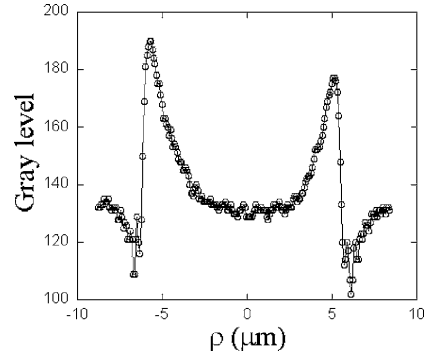


FIG. 13. Radial gray level of the bead image shown in Fig. 12. The bead diameter, defined by the distance between the side hills, equals  $11.6 \mu\text{m}$ .

of uncalibrated beads above this value, with radii measured by videomicroscopy.

#### E. Measurement of trap stiffness

For the DLS, trap stiffness is measured by analyzing Brownian motion in the optical potential well (as opposed to the free Brownian motion employed for bead size measurement) [25]. A He-Ne laser is used to probe the bead motion by detecting the intensity fluctuations of backscattered light. By measuring their time intensity autocorrelation function (ACF) with a digital correlator, one obtains the Brownian relaxation time of the bead (see Fig. 14).

After normalization, the ACF can be fitted to the following equation:

$$g(t) = 1 + A_{\perp} \exp(-t/\tau_{\perp}) + A_z \exp(-t/\tau_z), \quad (21)$$

where  $A_{\perp}$  and  $A_z$  are the amplitudes and  $\tau_{\perp}$  and  $\tau_z$  are the Brownian motion decay times in the radial and axial directions, respectively. From the resulting value of  $\tau_{\perp}$ , we get the transverse stiffness from (see Ref. [25] for details)

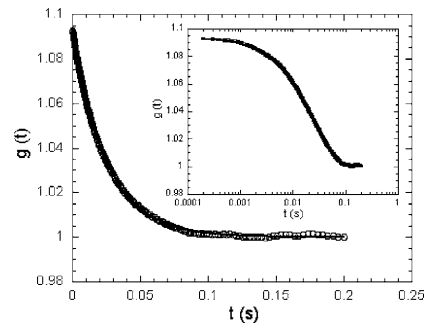


FIG. 14. Typical normalized ACF fitted to Eq. (21). Inset: same ACF in a semilog plot.

$$\kappa_{\perp} = \frac{\beta}{\tau_{\perp}}, \quad (22)$$

where the drag coefficient  $\beta$  is known from the measurement of the bead radii (see Sec. III D).

The trap stiffness in the YLS was measured using Faxen's law and videomicroscopy. After trapping a bead and positioning it at the desired height, the microscope stage is set to move laterally with a known velocity  $v$ . The Stokes force displaces the bead to a new off-axis equilibrium position. The entire process is recorded, digitizing the images with a Scion frame grabber. The procedure is repeated until one has 5–10 different values for the stage velocity in each direction. Velocities are taken small enough to probe only the harmonic sector of the potential well (linear regime). The images are analyzed in order to infer the displacement from the equilibrium position  $\delta\rho_{eq}$  as a function of  $v$ , checking that the dependence is linear, of the form  $\delta\rho_{eq} = \alpha v$ . The trap stiffness is then obtained from the angular coefficient  $\alpha$  by the relation

$$\kappa_{\perp} = \frac{\beta}{\alpha}. \quad (23)$$

#### IV. RESULTS

Following the procedures discussed in Sec. III, we have measured the ratio  $\kappa_{\perp}/P$  as a function of  $a$ , at different heights  $h$  above the glass interface. Measurements of all relevant data allowed for a direct comparison with MDSA theory, with no adjustable parameters. In addition to the measurements of beam waist and bead radii discussed in Sec. III, we also measured the refractive indices of immersion oil ( $n_2=1.496$ ) and deionized water ( $n_1=1.343$ ) at the diode laser wavelength  $\lambda=832$  nm by the minimum deviation method.

For the polystyrene beads employed in the YLS, we have taken the value  $n_2=1.576$  reported in Ref. [31] for the YAG laser wavelength  $\lambda=1064$  nm, and we measured the refractive index of water to be  $n_1=1.332$  at this wavelength. Much less important is the refractive index of the glass slide, which is relevant for the spherical aberration effect, but not for Mie scattering:  $n=1.51$ .

For the DLS, the objective vertical displacement  $d$  was adjusted to have (approximately) the same height  $h$  for all bead sizes. If the equilibrium position of the bead with respect to the paraxial focus were independent of  $L$  (distance between focus and glass wall), we would have a height

$$h = a + Nd \quad (24)$$

after displacing the objective by a distance  $d$ . A different displacement  $d$  was taken for each  $a$ , so as to keep a constant  $h$ , as given by Eq. (24). Because the optical potential depends on  $L$ , the actual height differs from Eq. (24) by an amount  $<a$ . This difference is negligible with regard to the Faxen correction of Stokes law (see Sec. III D), but it might be important for a quantitative evaluation of the optical force and stiffness. Thus it is taken into account when computing the force and the trap stiffness.

However, the dependence with  $L$  and  $h$  turns out to be negligible for the DLS because the laser beam underfills the objective entrance aperture. Thus the objective produces a more paraxial beam in the sample chamber, rendering the aberration effect irrelevant. Indeed, the laser beam waist is rather small ( $\sigma_{DLS}=1.1\pm 0.1$  mm, see Sec. III B) in this setup. Moreover, a diaphragm (radius  $r_c=2.0$  mm) was employed, cutting off the tails of the transverse intensity profile. This translates into a reduced effective numerical aperture  $NA_{\text{eff}}=n \sin \theta_{\text{eff}}$ , where  $\sin \theta_{\text{eff}}=r_c/f$ , where  $f$  is the objective focal length. In terms of the entrance aperture radius  $r_e$ , the sine condition also yields  $f=r_e/\sin \theta_0$ , where  $\theta_0$  represents the semiaperture angle for plane-wave illumination. Therefore

$$NA_{\text{eff}} = \frac{r_c}{r_e} NA, \quad (25)$$

where  $NA=1.4$  is the objective numerical aperture. For our objective, we have  $r_e=3.5$  mm, yielding  $NA_{\text{eff}}=0.8$ , which corresponds to  $\theta_{\text{eff}}=32^\circ$ . Thus we replace  $\theta_0$  by this value in Eqs. (4) and (5) when computing the theoretical values for the DLS.

For the YLS, on the other hand, the aberration effect is important, since the laser beam overfills the entrance aperture. Plane-wave components at angles  $\theta \geq \arcsin(N)$  are refracted into evanescent waves in the sample chamber. Since we perform the experiments at a distance of several wavelengths from the glass interface, the contribution of evanescent waves is neglected. When using the MDSA model presented in Sec. II, we replace  $\theta_0$  by  $\arcsin(N)=61.9^\circ$ , corresponding to an effective numerical aperture  $NA_{\text{eff}}=n_1=1.332$ .

As discussed in Sec. II, the radial variation of the objective transmittance is taken into account by using the effective waist defined by Eq. (7). From the values measured for the beam waist (Sec. III B) and the length  $\xi$  characterizing the transmittance variation (Table I of Sec. III C), we find  $w_{\text{eff}}=2.2$  mm and  $w_{\text{eff}}=3.5$  mm for the DLS and the YLS, respectively.

##### A. Trap stiffness

Figure 15 displays the results for the DLS at  $h=(3.1\pm 0.5)\mu\text{m}$ . Data points are averages of four independent measurements (each one lasting 100 s) for every microsphere; vertical error bars show the associated standard deviations. Full and dashed lines correspond to MDSA and GO (geometrical optic, i.e., WKB) theories, respectively. For  $0.04\mu\text{m} < a < 0.52\mu\text{m}$ , the former predicts that no stable trapping is possible because no equilibrium position is found in this range [32]. This is indicated by the vertical dotted line break. Correspondingly, experimental points cluster around different values in the neighborhood of the threshold at  $a=0.52\mu\text{m}$ . In this range, the microspheres often escaped from the trap during the measurement interval. Scattered data points closely below threshold arise from microspheres that stayed in the trap for at least three measurements (around 300 s). Since the harmonic potential well approximation breaks down in this metastable region, such data should be

VIANA *et al.*

PHYSICAL REVIEW E 75, 021914 (2007)

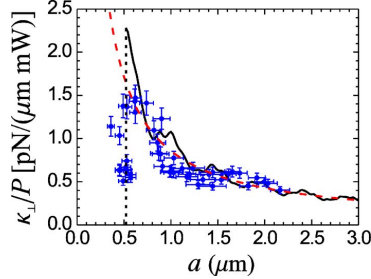


FIG. 15. (Color online) Transverse trap stiffness (divided by the local power) as a function of bead radius for oil beads ( $n_2=1.496$ ) in deionized water ( $n_1=1.343$ ) at height  $h=3.1 \mu\text{m}$ , for the DLS ( $\lambda=0.832 \mu\text{m}$ , objective underfilling). Circles: experimental points (with error bars). Solid line: MDSA theory. Dashed line: geometrical optics. The threshold for trapping is indicated by a dotted vertical line.

regarded mainly as confirmation of unstable below-threshold behavior.

As shown analytically in Ref. [15], the GO values correspond to size averages over the oscillations of the exact curve for sufficiently large values of the size parameter  $2\pi n_1 a/\lambda$ . Figure 15 shows that GO still provides not too bad estimates of stiffness for sizes down to  $a \sim \lambda$ . This is not surprising, since incident rays that contribute when the sphere center is axially located are unaffected by the dominant diffraction and resonance effects in Mie scattering, which are most important for rays incident near the edge of the microsphere, and WKB is a good approximation down to size parameters of order unity outside of this edge domain [3]. Prior estimates of the domain of applicability of GO [2] placed it beyond size parameter 30 ( $a > 5\lambda$ ). Our present theoretical and experimental extension of that domain has obvious practical relevance.

Figure 16 shows the results for the YLS setup with  $d=(3.0 \pm 0.5)\mu\text{m}$ , which corresponds to sphere heights  $h-a \approx (2.7 \pm 0.5)\mu\text{m}$  according to Eq. (24). Polydispersions allowed taking many data points for larger  $a$ , but only a few

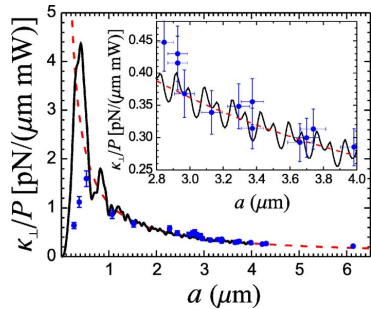


FIG. 16. (Color online) Same conventions as in Fig. 15, for polystyrene beads ( $n_2=1.576$ ) in deionized water ( $n_1=1.332$ ) at  $d=3 \mu\text{m}$ , for the YLS ( $\lambda=1.064 \mu\text{m}$ , moderate objective overfilling). Inset: amplification of the region  $2.8 \mu\text{m} \leq a \leq 4.0 \mu\text{m}$ .

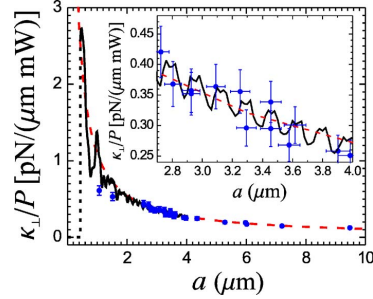


FIG. 17. (Color online) Same as Fig. 16, at  $d=15 \mu\text{m}$ .

(calibrated) polystyrene sizes were available for smaller  $a$ . For such microspheres, at least four independent measurements were taken (vertical bars represent the corresponding standard deviations). Here we find (both experimentally and theoretically) stable trapping below the peak of the stiffness curve. As compared to the DLS, the major difference is the use of (moderate) objective overfilling in this setup.

The amplified scale in the inset of Fig. 16 reveals the persistence of oscillations around the GO curve in the tail of the theoretical curve. They arise from interference among multiple reflections at the upper and lower microsphere interfaces. As shown in [11], these oscillations can be derived analytically from the partial-wave series. The corresponding period is given by  $\Delta a = \frac{1}{4}\lambda/n_2 \approx 0.169 \mu\text{m}$ , in very good agreement with the solid line curve in the inset of Fig. 16. For the DLS setup, on the other hand, the oscillations are distorted (Fig. 15) by the beam aperture constraint.

Our measurement accuracy is not sufficient to verify the presence of the interference oscillations, a very demanding experimental challenge. However, the inset shows that theory already predicts a band of halfwidth of the order of 5%, about half our measurement uncertainty, around the GO average, within which data points are expected to fall.

For the lowest measured  $a$ , theory predicts two equilibrium points, but only the most stable one, closer to the paraxial focus, is considered. We have checked the numerical results against the Rayleigh limit (very small  $a$ ). In this regime, the force is proportional to the intensity gradient of the incident field alone, allowing us to compare our results with those of [33]. Spherical aberration leads to the appearance of two local intensity maxima along the axis, which correspond to stable equilibrium positions in the Rayleigh limit. Outside the Rayleigh regime, but with small values of  $a$ , there are still multiple equilibria. This is clearly connected with the spherical aberration effect (thus explaining why no such effect takes place in the DLS).

We may enhance the effect of spherical aberration by increasing the vertical displacement  $d$  of the objective. In Fig. 17, we show the YLS results for  $d=15 \mu\text{m}$ , corresponding to  $h-a \approx (13.2 \pm 0.5)\mu\text{m}$ . The inset shows that the period of oscillation for large  $a$  is not modified by the aberration effect, as expected. In the Rayleigh regime, on the other hand, we find seven stable equilibrium points. They correspond to local intensity maxima lying along the axis, between the glass

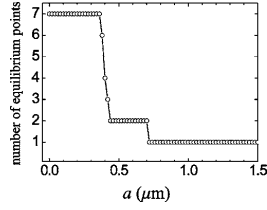


FIG. 18. Number of stable equilibrium points as a function of sphere radius, for the YLS with  $d=15\ \mu\text{m}$ .

slide and the paraxial focus, that result from interference fringes bordering the focal region in the diffraction theory of spherical aberration [33]. As we decrease  $a$ , starting from the value  $a=0.44\ \mu\text{m}$ , the number of equilibrium points rapidly increases and then saturates in the Rayleigh regime, as shown in Fig. 18. In this regime of multiple equilibria, it is very difficult to achieve trapping and to measure the stiffness. Moreover, the potential well around the equilibrium point near the paraxial focus is usually very shallow in this case (see, for instance, the solid line in Fig. 19 for  $a=0.265\ \mu\text{m}$ ). Thus spherical aberration degrades trapping efficiency for small  $a$ , producing a “threshold” for stable trapping at  $a=0.44\ \mu\text{m}$ . This is indicated by the vertical dotted line in Fig. 17 (further discussion of multiple equilibrium points is given in Sec. IV B). By comparing this figure with Fig. 16, we conclude that spherical aberration decreases the peak stiffness value and slightly displaces the peak towards larger values of  $a$ . On the other hand, the effect on stiffness is very small for larger  $a$  values (GO limit).

Increasing the height above the glass slide does not change the stiffness in the DLS, as expected for a more paraxial beam. Measured and computed stiffness results at  $h=(8.6\pm 0.5)\ \mu\text{m}$  (not shown) differ very little from those of Fig. 15.

### B. Bead hops

As discussed in Sec. IV A, the optical potential for small sphere radii contains several equilibrium points because of the spherical aberration effect. In the course of Brownian motion of the bead, it may hop from some local minimum of the optical potential to a more stable neighboring minimum. We have observed this effect and measured the size of the hop.

In Fig. 19, we plot the optical potential along the  $z$ -axis in units of  $k_B T$  as a function of  $z/a$ , for three different values of the objective vertical displacement:  $d=15\ \mu\text{m}$  (solid line),  $d=6.5\ \mu\text{m}$  (dashed line), and  $d=3.0\ \mu\text{m}$  (dotted line). We take parameters corresponding to the YLS, with  $a=0.265\ \mu\text{m}$  and  $P=20\ \text{mW}$ .

Besides the equilibrium point nearest to the paraxial focus ( $z=0$ ), Fig. 19 shows additional equilibrium points, located between  $z=0$  and the glass slide. They decrease in number and in degree of stability (as measured by the corresponding well depth) as  $d$  decreases.

The arrow in Fig. 19 indicates the most stable equilibrium position when  $d=15\ \mu\text{m}$ . As  $d$  decreases to  $6.5\ \mu\text{m}$ , its well

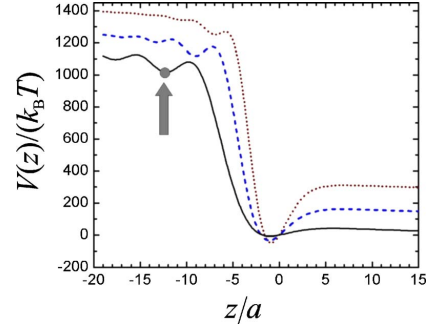


FIG. 19. (Color online) Optical potential along the  $z$ -axis (in units of  $k_B T$ ) for the YLS, with  $a=0.265\ \mu\text{m}$  and local power  $P=20\ \text{mW}$ . Objective displacement:  $d=15\ \mu\text{m}$  (solid line),  $d=6.5\ \mu\text{m}$  (dashed line), and  $d=3.0\ \mu\text{m}$  (dotted line). The arrow points to the most stable equilibrium point for  $d=15\ \mu\text{m}$ .

depth remains close to  $60k_B T$ , and then starts to decrease much faster below this point (this local minimum also approaches the paraxial focus, as expected, because the interval between this point and the glass slide, which contains all local intensity maxima, becomes shorter as  $d$  decreases). At  $d=6.5\ \mu\text{m}$ , the potential well near the focus is already much deeper, and the distance between the two equilibrium points is  $2.1\ \mu\text{m}$ .

These predictions were tested by video microscopy, following the image of the trapped bead as the objective was displaced downwards (thus bringing the paraxial focus closer to the glass slide), from  $d=15\ \mu\text{m}$  down to  $d=3.0\ \mu\text{m}$ . The image sharpness depends essentially on the bead position with respect to the paraxial focus. Initially, the bead is trapped at the position indicated by the arrow in Fig. 19. As we bring down the objective, at first the image does not change, indicating that the bead follows the displacement of the paraxial focus, keeping an approximately constant distance to this point (“tweezer” effect). Hence in this first stage the bead remains in the same potential well. However, at

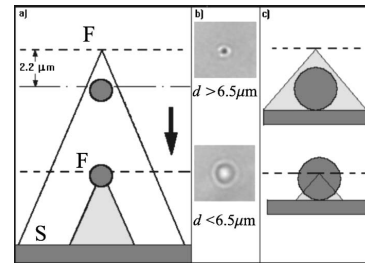


FIG. 20. Bead hop in the optical potential. (a) Schematic representation of the position of the trapped bead, paraxial focus  $F$  (origin of the  $z$  axis) and glass slide  $S$  for  $d>6.5\ \mu\text{m}$  (top, bead below  $F$ ) and  $d<6.5\ \mu\text{m}$  (bottom, bead close to  $F$ ). (b) Image images for  $d>6.5\ \mu\text{m}$  (top) and  $d<6.5\ \mu\text{m}$  (bottom). (c) Calibration of bead-focus distance with bead attached to the glass slide.

$d=6.5 \mu\text{m}$ , we observed a sudden change in the image (see Fig. 20 and video data [35]). Since the bead size is a fraction of the wavelength, the image behaves approximately like the diffraction pattern of a point source by the circular objective aperture. On the focal plane (bottom image), this approaches the standard Airy pattern. Away from the focal plane (top image), it corresponds to a Fresnel diffraction pattern, with central spot brightness (in this case, dark) related to the number of Fresnel zones within the aperture [34].

In order to calibrate the bead-focus distance, we repeated the experiment with the bead attached to the glass slide. In this case, the distance between the bead and paraxial focus is known for each position of the objective. By comparing the resulting images with those obtained with the optically trapped bead, we derive the length of the (upward) hop to be  $2.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , in good agreement with the MDSA prediction for the distance between the two equilibrium points at  $d=6.5 \mu\text{m}$ , shown in Fig. 19 (dashed line).

When the objective is moved upwards, we do not observe a reverse hop. Instead, the initially trapped bead is lost as  $d$  approaches  $15 \mu\text{m}$ . This is also consistent with the solid line in Fig. 19: as the well near the focus becomes shallower, the bead cannot climb the optical potential barrier and reach the deeper well below the focus (indicated by the arrow in Fig. 19). This is in line with our previous discussion about the difficulty of trapping small beads when the paraxial focus is too far from the glass slide (“threshold” of Fig. 17).

## V. CONCLUSIONS

We have demonstrated that the MDSA *ab initio* theory of trapping forces in optical tweezers, formulated solely in terms of experimentally accessible parameters, already comes close to achieving a basis for absolute calibration. Indeed, we have verified in detail its consequences concerning trap stiffness and trapping thresholds for two very different setups, peak locations, relationship with and domain of validity of geometrical optics, size and height dependence resulting from interface spherical aberration, covering the whole range from the Rayleigh regime to the geometrical optic one, and including the description of multiple equilibria and “hop” effects.

Among many attempts (Sec. I), it is the only treatment that satisfies requirement (iv) of Sec. I, asymptotically approaching geometrical optics in the mean. This is specially important in view of our finding that geometrical optics is already a reasonable approximation, as far as trapping stiffness is concerned, for radii of the order of the wavelength (a consequence of the absence of near-edge diffraction effects).

The combined experimental procedures and experimental results reported here, with well-defined and accurately measured parameters, far outnumber all previously available optical tweezers stiffness data. Comparison with MDSA theory shows that, within the typical 10% order of magnitude of the error bars, theory and experiment are generally in very good agreement, for a broad size range and two very different (and often employed) setups, one with underfilling and the other one with moderate overfilling of the objective. The theory accurately predicts the trapping threshold and the location of

the stiffness peak, which is extremely sensitive to beam shape, as well as the effects of spherical aberration arising from refraction at the interface, including multiple equilibria situations.

The largest deviation from theoretical predictions occurs within the stiffness peak, where the steeply changing curve is most sensitive to additional perturbations, for the YAG laser setup. As the microsphere radius decreases in this region, one enters the domain of multiple equilibria and Brownian fluctuations are enhanced. Note (Fig. 16) that the experimental result lies below the MDSA prediction, indicating that missing effects presumably arise from degradation of the focal region. Natural candidates are objective aberrations in the infrared [effect (i) in Sec. I]. In fact, agreement is better for the diode laser setup, which employs a more paraxial beam and a wavelength closer to the visible range.

Other effects not taken into account in MDSA theory include reverberation (multiple beam reflections between the bead and the glass slide) and the effects of evanescent waves beyond the critical angle, as well as possible bead surface distortions or contaminations. In applications requiring accurate force measurements, in view of these perturbations, it seems advisable to stay at least a couple of wavelengths away from the glass slide. Accounting for the deviations may yield new insights concerning bead-surface interactions at close range.

Polarization effects were not discussed in the present work: we found the transverse stiffness to be practically independent of polarization. Polarization effects might be relevant, on the other hand, when the sphere is at a distance from the axis larger than or of the order of the radius [36]. They will be discussed in a forthcoming work.

It has sometimes been argued that absolute calibration is an impossible aim, in view of the multiplicity of effects that need to be taken into account, as well as the errors in parameter determination. We do not share this pessimistic outlook. Mie scattering, the basic interaction involved, is understood and verified at a level of precision approaching that of quantum electrodynamics [3]. While we had to employ uncalibrated microspheres to cover a wide size range, NIST-traceable calibrated microspheres are commercially available. Achieving an understanding and control over additional perturbing effects can turn out to be relevant not only to improving the performance of conventional optical tweezers, but may have potential applications to a variety of new techniques in precision microscopy.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Projeto Milênio de Nanotecnologia, Projeto Milênio de Informação Quântica, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB). M.S.R. acknowledges support by Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

APPENDIX: MOMENTUM TRANSFER RATE TO THE SCATTERED FIELD

In this appendix, we write the explicit partial-wave series for the cylindrical components of  $\mathbf{Q}_s$ , which represents minus the momentum transfer rate to the scattered field:

$$Q_{sz} = -\frac{8\gamma^2}{AN} \operatorname{Re} \sum_{j,m} \left[ \frac{\sqrt{j(j+2)(j-m+1)(j+m+1)}}{j+1} (a_j a_{j+1}^* + b_j b_{j+1}^*) G_{j,m} G_{j+1,m}^* + \frac{2j+1}{j(j+1)} m a_j b_j^* |G_{j,m}|^2 \right], \quad (\text{A1})$$

$$Q_{s\rho} = \frac{4\gamma^2}{AN} \operatorname{Im} \sum_{j,m} \left[ \frac{\sqrt{j(j+2)(j+m+1)(j+m+2)}}{j+1} (a_j a_{j+1}^* + b_j b_{j+1}^*) (G_{j,m} G_{j+1,m+1}^* + G_{j,-m} G_{j+1,-m-1}^*) - 2 \frac{2j+1}{j(j+1)} \sqrt{(j-m)(j+m+1)} \operatorname{Re}(a_j b_j^*) G_{j,m} G_{j,m+1}^* \right], \quad (\text{A2})$$

and

$$Q_{s\varphi} = -\frac{4\gamma^2}{AN} \operatorname{Re} \sum_{j,m} \left[ \frac{\sqrt{j(j+2)(j+m+1)(j+m+2)}}{j+1} (a_j a_{j+1}^* + b_j b_{j+1}^*) (G_{j,m} G_{j+1,m+1}^* - G_{j,-m} G_{j+1,-m-1}^*) - 2 \frac{2j+1}{j(j+1)} \sqrt{(j-m)(j+m+1)} \operatorname{Re}(a_j b_j^*) G_{j,m} G_{j,m+1}^* \right]. \quad (\text{A3})$$

---

[1] D. G. Grier, *Nature (London)* **424**, 810 (2003).  
 [2] K. C. Neuman and S. M. Block, *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 2787 (2004).  
 [3] H. M. Nussenzveig, *Diffraction Effects in Semiclassical Scattering* (Cambridge University Press, Cambridge, England, 1992).  
 [4] A. Ashkin, *Biophys. J.* **61**, 569 (1992).  
 [5] G. Roosen, *Can. J. Phys.* **57**, 1260 (1979).  
 [6] M. Gu, P. C. Ke, and X. S. Gan, *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 3666 (1997).  
 [7] G. Gouesbet, G. Gréhan, and B. Maheu, *J. Opt. (Paris)* **16**, 83 (1985).  
 [8] J. P. Barton and D. R. Alexander, *J. Appl. Phys.* **66**, 2800 (1989).  
 [9] D. Ganic, X. Gan, and M. Gu, *Opt. Express* **12**, 2670 (2004).  
 [10] T. Tlustý, A. Meller, and R. Bar-Ziv, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 1738 (1998).  
 [11] P. A. Maia Neto and H. M. Nussenzveig, *Europhys. Lett.* **50**, 702 (2000).  
 [12] B. Richards and E. Wolf, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **253**, 358 (1959).  
 [13] A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer, *J. Opt. Soc. Am. A* **18**, 839 (2001).  
 [14] C. W. McCutchen, *J. Opt. Soc. Am.* **54**, 240 (1964).  
 [15] A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **459**, 3021 (2003).  
 [16] F. Merenda, G. Boer, J. Rohner, G. Delacrétaz, and R.-P. Salathé, *Opt. Express* **14**, 1685 (2006).  
 [17] A. Rohrbach, *Phys. Rev. Lett.* **95**, 168102 (2005).  
 [18] A. Rohrbach, H. Kress, and E. H. K. Stelzer, *Appl. Opt.* **43**, 1827 (2004).  
 [19] N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, *Appl. Phys. Lett.* **88**, 131110 (2006).  
 [20] P. Török, P. Varga, Z. Laczik, and G. R. Booker, *J. Opt. Soc. Am. A* **12**, 325 (1995).  
 [21] We have neglected the dependence of the transmission amplitude on polarization, since  $N$  is very close to unity. In this approximation, circular polarization as well as the angle between the direction of linear polarization and the scattering plane (containing the symmetry axis and the wave vector  $\mathbf{k}$ ) are conserved by refraction. The electromagnetic Debye-type representation for the focused beam developed by Richards and Wolf is itself based on this approximation [12]. Hence it would be inconsistent to take the polarization dependence of transmittance at the glass-water interface within the context of this model for the focused beam. Polarization effects will be discussed in a forthcoming publication.  
 [22] A. R. Edmonds, *Angular Momentum in Quantum Mechanics* (Princeton University Press, Princeton, 1957).  
 [23] N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, and P. A. Maia Neto, *Appl. Opt.* **45**, 4263 (2006).  
 [24] C. F. Bohren and D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley, New York, 1983).  
 [25] N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. E* **65**, 041921 (2002).  
 [26] H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasak, N. Kitamura, and H. Masuhara, *J. Appl. Phys.* **70**, 3829 (1991).  
 [27] N. B. Viana, O. N. Mesquita, and A. Mazolli, *Appl. Phys. Lett.* **81**, 1765 (2002).  
 [28] Our notation differs from the one employed in Ref. [23], where  $T_A$  represents the axial transmittance itself rather than the axial transmission amplitude.  
 [29] M. I. M. Feitosa and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. A* **44**, 6677 (1991).  
 [30] A. Einstein, *Investigations on the Theory of the Brownian*

VIANA *et al.*

PHYSICAL REVIEW E **75**, 021914 (2007)

- Movement* (Dover, New York, 1956).
- [31] X. Ma, J. Q. Lu, R. S. Brock, K. M. Jacobs, P. Yang, and X.-H. Hu, *Phys. Med. Biol.* **48**, 4165 (2003).
- [32] On the other hand, an equilibrium position very close to the focus is found for any radius in the range  $a < 0.04 \mu\text{m}$ , as expected for the Rayleigh regime. Of course, this is of little practical value.
- [33] C. J. R. Sheppard and P. Török, *J. Microsc.* **185**, 366 (1997).
- [34] F. A. Jenkins and H. E. White, *Fundamentals of Optics*, 1st ed. (McGraw-Hill, New York, 1976), p. 180. A less qualitative discussion of these patterns should include the effects of aberrations.
- [35] See EPAPS Document No. E-PLLEE8-75-064702 for video file showing the bead hop. For more information on EPAPS, see <http://www.aip.org/pubservs/epaps.html>.
- [36] A. Fontes, A. A. R. Neves, W. L. Moreira, A. A. de Thomaz, L. C. Barbosa, and C. L. Cesar, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 221109 (2005).



## New tools to study biophysical properties of single molecules and single cells

MÁRCIO S. ROCHA and OSCAR N. MESQUITA

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Física, ICEx, Av. Antônio Carlos, 6627  
Caixa Postal 702, 30123-970 Belo Horizonte, MG, Brasil

*Manuscript received on February 2, 2006; accepted for publication on September 9, 2006;  
presented by LUIZ DAVIDOVICH*

### ABSTRACT

We present a review on two new tools to study biophysical properties of single molecules and single cells. A laser incident through a high numerical aperture microscope objective can trap small dielectric particles near the focus. This arrangement is named optical tweezers. This technique has the advantage to permit manipulation of a single individual object. We use optical tweezers to measure the entropic elasticity of a single DNA molecule and its interaction with the drug Psoralen. Optical tweezers are also used to hold a kidney cell MDCK away from the substrate to allow precise volume measurements of this single cell during an osmotic shock. This procedure allows us to obtain information about membrane water permeability and regulatory volume increase. Defocusing microscopy is a recent technique invented in our laboratory, which allows the observation of transparent objects, by simply defocusing the microscope in a controlled way. Our physical model of a defocused microscope shows that the image contrast observed in this case is proportional to the defocus distance and to the curvature of the transparent object. Defocusing microscopy is very useful to study motility and mechanical properties of cells. We show here the application of defocusing microscopy to measurements of macrophage surface fluctuations and their influence on phagocytosis.

**Key words:** optical tweezers, defocusing microscopy, single molecules, macrophages, water transport, cell motility.

### INTRODUCTION

Physics can contribute to understand biological phenomena in many ways. One of the ways is by developing new quantitative tools to investigate biological phenomena. In this article we will describe the use of two recently developed techniques: optical tweezers and defocusing microscopy. Optical tweezers were invented in the 70s by A. Ashkin (Ashkin 1970) and have become an important tool to manipulate single biological molecules like DNA and single cells. It can exert forces in the pico Newton range being appropriate to perform elasticity measurements in single molecules and single cells, measurements of stall forces of molecular motors, among other applications (Ashkin and Dziedzic 1987, Ashkin 1992, Svoboda and Block 1994, Grier 2003). Here we

will show the use of optical tweezers both as a force sensor to measure DNA and DNA/drug elasticity and also as a micromanipulation tool to study osmotic transport through a single kidney cell. Defocusing microscopy is a new light microscopy technique invented in our laboratory that allows us to observe transparent objects (phase objects), like cytoskeleton and cell membranes, without requiring phase plates, polarizing prisms, etc., used in phase contrast and DIC microscopy techniques. While the image contrast in phase contrast microscopy is proportional to the phase object thickness and in DIC microscopy proportional to the thickness gradient, defocusing microscopy image contrast is proportional to the curvature of the observed phase object. Since curvature is the most important and energy costing deformation of cell surfaces, defocusing microscopy gives us a parameter (cell surface curvature) from which one can

Correspondence to: Oscar N. Mesquita  
E-mail: mesquita@fisica.ufmg.br

directly assess cell motility. We use defocusing microscopy to measure surface fluctuations and ruffling activity of macrophages. With the combination of optical tweezers and defocusing microscopy we are able to control and promote single phagocytosis events and simultaneously measure phagocytosis time and motility of macrophages. We hope with these experiments to have a better understanding of the underlying mechanisms of cell motility and their relation to phagocytosis.

NEW TOOLS

OPTICAL TWEEZERS

A single laser beam focused by a high numerical aperture objective is able to trap small dielectric particles near the lens focus. Such an arrangement is called optical tweezers (Ashkin 1970, 1992, Ashkin and Dziedzic 1987). The trapped particle is in a potential energy well, similar to a mass-spring system. To pull the particle away from the equilibrium position a force has to be applied on the particle. If one knows the tweezers spring constant (stiffness) and by measuring the displacement of the particle in relation to its equilibrium position, one can obtain the applied force, since the force is the product of the stiffness times the displacement. In general, in most practical cases, optical tweezers are able to exert forces in the piconewton ( $10^{-12}$  N) range. Even though optical tweezers have been widely used during the last decade, only recently an exact theory has been put forward (Maia Neto and Nussenzveig 2000, Mazolli et al. 2003). We have developed, in our laboratory, a method based on dynamic light scattering for measuring both the tweezers stiffness and the displacement of particles in relation to their equilibrium position, with nanometer resolution (Viana et al. 2002). Therefore, optical tweezers can be used to manipulate small objects and to measure forces in the pN range. Later, we will show applications where both capabilities are used.

DEFOCUSING MICROSCOPY

Most biological samples of interest are nearly transparent to visible light. The standard light microscopy techniques to visualize such transparent objects (phase objects) are phase-contrast microscopy (PhC) and differential interference contrast microscopy (DIC), in addition to fluorescence techniques. Phase-contrast returns im-

age contrast that is proportional to the phase difference, while DIC returns values proportional to the gradient of phase difference introduced by the phase object. While they are good techniques for visualization and for measuring transverse dimensions, other quantitative information is difficult to obtain from the images. In addition, the use of phase plates, filters and prisms makes these techniques more elaborate requiring a good expertise to work with them. We recently developed a new simple bright-field microscopy technique, which we believe is a break-through in this field, because it is easy to use and provides good quality quantitative data on cell motility. It is known that phase objects become visible in a slightly defocused bright-field light microscope (Fig. 1).



Fig. 1 – Stains on a microscope coverglass. a) For positive defocusing, b) in focus (object invisible) and c) for negative defocusing.

We have made a mathematical model for a defocused microscope and showed that the image contrast observed in this case is proportional to the defocus distance and to the curvature of the object, for objects with uniform index of refraction (Agero et al. 2003). In simple words, our mathematical model predicts that phase objects play the role of thin lenses that converge or diverge light depending on their curvatures, which causes light and dark contrast images that can be measured and quantitatively studied, with image processing techniques (Agero et al. 2003). In Fig. 2 we show a schematic drawing of a phase object, as well as the important variables to understand what we named by “defocusing microscopy” (DM).

Defocusing microscopy is very useful to study motility and mechanical properties of cells, since, in general, cells are in a state of zero surface tension, therefore the most energy costing fluctuations and dynamics are related to curvature deformations, the parameter directly measured with DM. The basic equation of DM is shown below,

$$C(x, y) = \frac{I(x, y) - I_0}{I_0} = \Delta n [\Delta f - h(x, y)] \nabla^2 h(x, y), \tag{1}$$

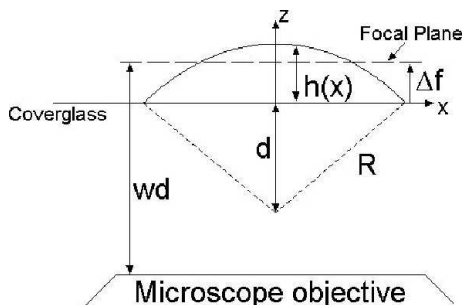


Fig. 2 – Schematic drawing of a cap-shaped phase object, as well as the important variables to understand the defocusing microscopy technique.

where  $C(x, y)$  is image contrast,  $I(x, y)$  is image intensity at the position  $(x, y)$ ,  $I_0$  is the background image intensity out of the object,  $\Delta n$  is the difference in refractive index between the object and the medium,  $\Delta f$  is the defocus distance measured in relation to the coverslip where the object lies,  $h(x, y)$  is the thickness profile of the phase object in relation to the coverslip, and  $\nabla^2 h(x, y)$  is the 2D-Laplacian of the thickness profile which is equal to the local object curvature. In this expression we assume also that the microscope depth of focus is smaller than the object thickness. In our experiments, with an objective of numerical aperture equal to 1.4 the depth of focus is of the order of  $0.3 \mu\text{m}$ .

We built artificial phase objects to test Eq. 1, which consisted of spherical caps made out of polystyrene. An example is shown in Fig. 3a, b.

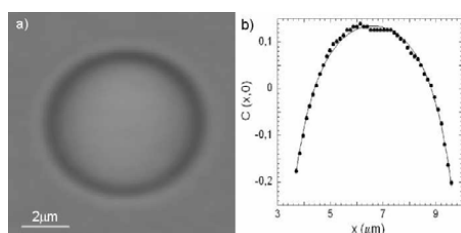


Fig. 3 – a) Image of a defocused spherical cap of polystyrene in air; b) contrast along the horizontal diameter fitted with Eq. 1; from the fit  $R = 8.09 \pm 0.03 \mu\text{m}$ , and  $\Delta n = 0.61 \pm 0.02$ , resulting in a polystyrene refractive index equal to 1.61, which agrees with the table value.

In Fig. 3a it is displayed a spherical cap image observed under a defocused microscope. In Fig. 3b it is displayed the contrast profile along a diameter together with a theoretical fit using Eq. 1. The agreement is excellent and we can quantitatively determine the curvature radius of the spherical cap and its refractive index. The details of these tests and sample preparation can be found in our references (Agero et al. 2003, 2004). It is important to mention that the contrast profile in Fig. 3b has positive and negative values even though the object curvature does not change. It means that the focal plane of the microscope lies inside of the object as in the scheme showed in Fig. 2. For thin objects compared to the defocus distance ( $\Delta f \gg h(x, y)$ ), Eq. 1 can be simplified to read,

$$C(x, y) = \Delta f \Delta n \nabla^2 h(x, y). \quad (2)$$

APPLICATIONS

Below we show some applications of the techniques described above, which have been carried out in our laboratory. All applications are made with the use of an inverted infinity corrected microscope from Nikon (Eclipse TE300), with a SDL (5422-H1) infrared laser for the optical tweezers and a He-Ne laser whose back-scattered light by the trapped beads is the probe to measure bead displacement and Brownian motion. A scheme of our apparatus is shown in Fig. 4.

ENTROPIC ELASTICITY OF SINGLE DNA MOLECULES AND SINGLE DNA COMPLEXES

Optical tweezers have the great advantage to permit manipulation and observation of a single individual object, like a microsphere, a macromolecule or even a live cell.

In this section we study the entropic elasticity variation of a  $\lambda$ -DNA molecule in a solution with the photosensitive drug psoralen (*Furo 3,2-g Coumarin*,  $C_{11}H_6O_3$ ) using optical tweezers and intensity autocorrelation spectroscopy. To do this, we attach a polystyrene microsphere of diameter  $2.8 \mu\text{m}$  to one end of the molecule. The other end of the molecule is then attached to a microscope coverslip, so we can manipulate and stretch the molecule using optical tweezers, which trap the polystyrene bead, to obtain a force versus extension curve. Displacements are measured by analyzing the backscattered light from the polystyrene bead attached

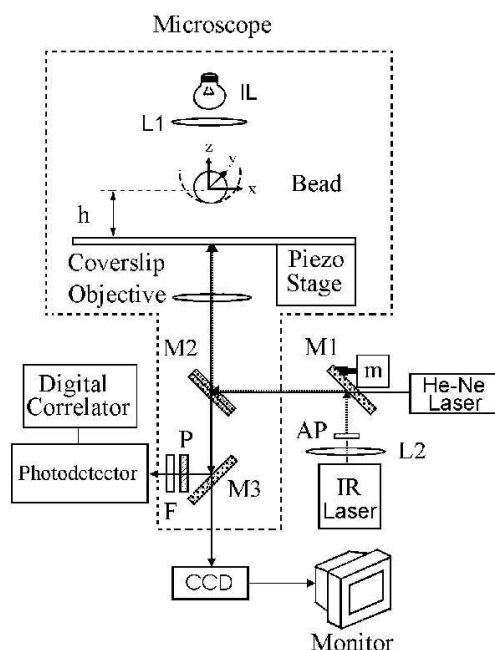


Fig. 4 – Experimental setup around the Nikon TE300. *AP* is an anamorphic prism, *M1* and *M2* are dichroic mirrors for maximizing IR reflections, *m* is a d.c. motor to move the IR beam, *M3* is a movable prism inside the microscope to switch different paths, *P* is a polarizer, *F* is a 632.8 nm line filter, the Photodetector is an EGG SPCM-200-PQ-F500, and the Digital Correlator is a Brookhaven BI-9000AT.

to the DNA molecule (Rocha et al. 2004). To do this, we use a He-Ne laser ( $\lambda = 632.8$  nm) as the scattering probe, in addition to the trapping laser ( $\lambda = 832$  nm).

Long molecules like DNA are very good polymers. One can use the impressive amount of knowledge accumulated along the years known as “Polymer Physics”, to explain some of the physical properties of DNA and other biological molecules. Polymers in solution tend to become coiled due to collision with the molecules of the solution medium. The coiled equilibrium configuration is the one that maximizes entropy.

Therefore, an external force has to be applied to uncoil a polymer out from its equilibrium configuration. For small displacements the polymer behaves as a mass-spring system, such that the force applied is equal to the end-to-end distance multiplied by a constant, the entropic stiffness of the polymer. For larger displacements up

to about the contour length of the polymer, the Marko-Siggia (Marko and Siggia 1995) approximate expression for the entropic force gives a reasonably good description of this effect, namely,

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right], \quad (3)$$

where  $F$  is the entropic force,  $k_B$  is Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $A$  is the persistence length of the polymer,  $L$  is the contour length of the polymer and  $z$  is the average end-to-end distance. The persistence length  $A$  gives a measure of the polymer flexibility, since it is the average distance between consecutive folded regions of the polymer. If  $A$  is of the order of  $L$ , the polymer does not have folded regions and behaves as a rigid rod. On the other hand, if  $A$  is much smaller than  $L$  the polymer is very flexible with many folded regions.

A curious result is that if a polymer is very flexible, with small persistence length, a larger force has to be applied to uncoil it as expressed by Eq. 3. As the end-to-end distance  $z$  approaches the contour length  $L$ , the value of  $F$  increases considerably. Naturally, the model is no longer valid for  $z = L$  when the entropic force diverges. During the entropic regime there is no, or very little, stretching of chemical bonds of the polymer. In the limit where  $z$  approaches  $L$ , chemical bonds start to be stretched and the entropic model is no longer valid. Therefore, Eq. 3 is valid up to about  $z = 0.95L$ .

In our laboratory, using optical tweezers and video-microscopy techniques we are able to stretch single DNA molecules and measure their persistence lengths. We also study the interaction between the photosensitive drug psoralen and DNA by measuring the change in persistence length of the complex formed when illuminated with UVA light. Psoralen is used in the treatment of some skin diseases with the technique named PUVA: Psoralen followed by UVA light (Coven et al. 1998, Tran et al. 2001). In order to measure the entropic elasticity of DNA and DNA+Psoralen, a polystyrene bead of diameter  $2.8 \mu\text{m}$  is linked at one end of a DNA molecule, and the other end of the DNA is linked to the coverslip of the sample cell. The bead is trapped by the optical tweezers. As one moves the microscope stage, the DNA single molecule is stretched. The bead, originally at the equilibrium position in the trap, is also displaced from it. By measuring the displacement of the bead and knowing the stiffness of the tweezers one can then obtain the entropic force. The details of sample preparation, as well as the experimental procedure of these stretching experiments can be found in our references (Rocha et al. 2004, Viana et al. 2002). A typical result of a stretching experiment with a single DNA molecule of  $\lambda$ -phage is shown in Fig. 5.

#### Equilibrium Measurements

Typically, the persistence length for a single DNA molecule is of the order of  $45 \text{ nm}$ . When we add the drug psoralen, which intercalates the DNA, the persistence length increases to around  $70 \text{ nm}$ . When the complex is illuminated with UVA light (like in PUVA treatment for vitiligo and psoriasis), psoralen makes cross-links with opposite strands pyrimidines increasing the persistence length up to about  $110 \text{ nm}$ . After that, by illuminating the

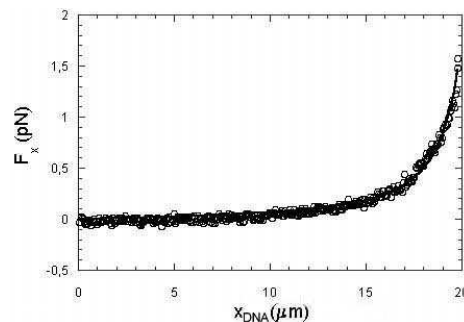


Fig. 5 – Force (x-component) as a function of elongation for a DNA molecule. Fitting this curve to Eq. 3, we determine the persistence length  $A$  and the contour length  $L$ .

complex with UVB light, the crosslinks are broken, remaining only monoadducts, with a consequent decrease in persistence length, down to  $35 \text{ nm}$ . These results are shown in Table I. Therefore, this technique can be used to study drug-DNA interaction and protein-DNA interaction. Since we do not directly measure the actual light intensity on the sample, we wait enough time for the complex to achieve a constant persistence length for a given light intensity. For the intensity used in our experiments, we can perform the measurements after illuminating the sample for 30 minutes. The illuminating lamp is turned off during the measurements.

In Table I the results using different lights are displayed. These results and the details of sample preparation are described in our article ref. (Rocha et al. 2004). The drug concentration used in these experiments was  $C = 1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

The UV light source used in our measurements is a Nikon LH-M100C-1. To illuminate the sample with only UVA or UVB wavelengths, we use bandpass filters.

#### Persistence Length Kinetics

Kinetics measurements of the persistence length are performed using the same DNA molecule. Without illuminating the sample, we first move the microsphere to an arbitrary position on the backscattering profile using a motor. Then, we turn on the UVA light and collect the backscattered light intensity by the microsphere. Since the UVA light activates DNA-psoralen linkage, we

**TABLE I**  
**Equilibrium measurements results for the persistence length of DNA and DNA-psoralen complexes.**

Sample	Illumination	A (nm)
DNA	Any light (including UVA + UVB)	45 ± 5
DNA-Psoralen	Green light ( $\lambda = 500 \pm 20$ nm)	64 ± 6
DNA-Psoralen	Blue light ( $\lambda = 450 \pm 20$ nm)	67 ± 7
DNA-Psoralen	UVA light	107 ± 10
DNA-Psoralen	UVB light (after UVA)	34 ± 4

should see variation on the backscattered intensity as a function of time. This fact occurs because the rigidity of the sample is modified by the linkage, and consequently, the force exerted by the DNA on the microsphere varies, moving the microsphere along the backscattering profile. We then transform backscattered intensity into force, obtaining the force exerted by the DNA molecule as a function of time while the sample is illuminated. To obtain the persistence length as a function of time, we suppose that the contour length does not vary so much during the illumination, *i.e.*, we use a constant value of  $L$ , since the experiment is performed in the low-stretching regime (Rocha et al. 2004). Figure 6 is a typical result obtained with this procedure, showing how the persistence length varies on time when the sample is illuminated with UVA light.

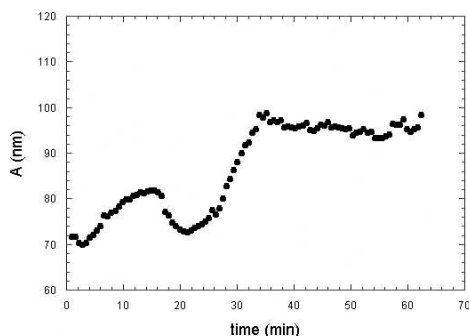


Fig. 6 – Persistence length as a function of time while illuminating the sample with UVA light.

Observe that the persistence length initially oscillates and then stabilizes at a value close to the reported in Table I after approximately 35 minutes. We do not un-

derstand yet the cause of such oscillations. Observe also that the initial value of the persistence length on Fig. 6 is close to those reported in lines 3 and 4 of Table I, which correspond to the intercalation situation.

Finally, we remember that the kinetics result showed in Fig. 6 corresponds to a unique DNA-psoralen complex, while the values reported in Table I refer to averages over many different molecules. The persistence length values of the particular DNA-psoralen complex showed in Fig. 6 agrees with Table I within 8%.

WATER TRANSPORT THROUGH A SINGLE KIDNEY CELL

Pure lipid biological membranes are poorly permeable to water ( $10^{-5}$  to  $10^{-4}$  cm/s), while water permeability of plasma membranes of epithelial cells involved in fluid transport can be much higher ( $10^{-3}$  to  $10^{-1}$  cm/s) (Zeidel 1998). This observation led to the identification of a family of molecular water channels (aquaporins) that mediate and regulate water transport across plasma membranes (Agre 2000, Verkman and Mitra 2000). In order to determine whether water channels can account quantitatively for the water permeability observed in epithelial cell plasma membranes several model systems and different techniques have recently been developed to measure water permeability (Farinas et al. 1995, 1997, Timbs and Spring 1996, Zelenina and Brismar 2000, Maric et al. 2001). Water transport is ubiquitous in cells; therefore the technique described here is of general applicability in cell biology. In particular, precise measurements of water permeability in kidney cells are important as part of the understanding of renal disorders, hypertension, and how drugs can affect them. The central idea of most experiments is to submit layer of cells or tissues to an osmotic up or down shock and measure variation of cell

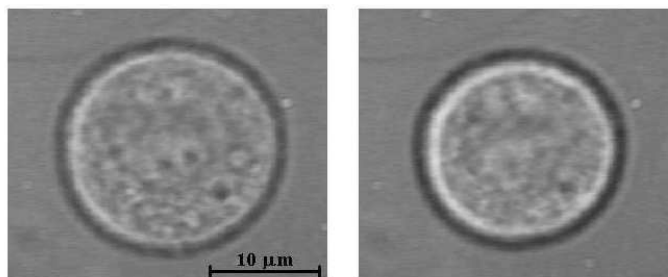


Fig. 7 – Left: Bright-field image of an optically trapped MDCK cell in equilibrium in a medium of 300 mOsm. Right: Image of the same cell 15s after a hyperosmotic shock of 200 mOsm.

volume as a function of time. From the fit of the data to some model function one can obtain water permeability (Farinas et al. 1995). The main difference between the various techniques is how cell volume change as a function of time is measured. The experiments made up to now were performed on layers of kidney cells or on tissues and use light interference, fluorescence and other optical techniques where assumptions about the shape of the cells have to be done in order to obtain the variation of cell volume (Farinas et al. 1995, 1997, Timbs and Spring 1996, Zelenina and Brismar 2000, Maric et al. 2001).

One of the greatest difficulties in measuring water transport through cells is an accurate measurement of cell volume and volume variations. When cells adhere to a substrate they change their shape. Then, from 2D-images it is impossible to obtain an accurate value for cell volume. To circumvent such problem, with an optical tweezers, we hold a single MDCK kidney cell suspended in the solution medium, without touching the substrate or other cells. The single MDCK cell stays reasonably rounded such that its volume can be obtained from the video-image. We then, add to the external medium NaCl provoking a hyperosmotic shock. Water starts to leave the cell, and the volume decreases as can be seen in Figs. 7a, b.

A plot of normalized volume as a function of time is shown in Fig. 8.

After a while, the cell inflates again because of the increase in NaCl content inside the cell due to the slow flow through the semi-permeable biological membrane,

and possibly also due to inner-cell electrolytes that flow into the osmotically active volume of the cell. In ref. (Lúcio et al. 2003) we made a simple phenomenological model to consider both the water transport and NaCl increase inside the cell, such that the data could be reasonably well described by this model. From our model we predict that the cell volume  $V$  as a function of time  $t$  varies as,

$$V(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau_1}} - Be^{-\frac{t}{\tau_2}} + V_R, \quad (4)$$

where  $A$  and  $B$  are constants related to water and NaCl permeabilities and osmotic shock load,  $\tau_1$  is a characteristic time for water transport,  $\tau_2$  a characteristic time for NaCl increase, and  $V_R$  is what we called the regulation volume, which is the new equilibrium volume after the osmotic shock. In ref. (Lúcio et al. 2003) it is shown how to relate  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $A$  and  $B$  from Eq. 4 to the water permeability  $P$ , to electrolyte influx  $\alpha$ , to the osmotically inactive volume  $b$  and to the initial volume  $V_0$ .

In Fig. 9 we show the results when one adds the anti-diuretic hormone vasopressin. Water transport is faster and  $V_R$  decreases. Water transport is mediated by water channels (aquaporins) embedded in the cell surface membrane. Vasopressin increases their number on the surface of the cell increasing water permeability. Recently, Ateshian et al. (2006) made a more thermodynamically consistent model. They only consider passive loading of NaCl, *i.e.*, the NaCl increase inside the cell is only due to transport of NaCl from the external medium through the semi-permeable cell membrane. In

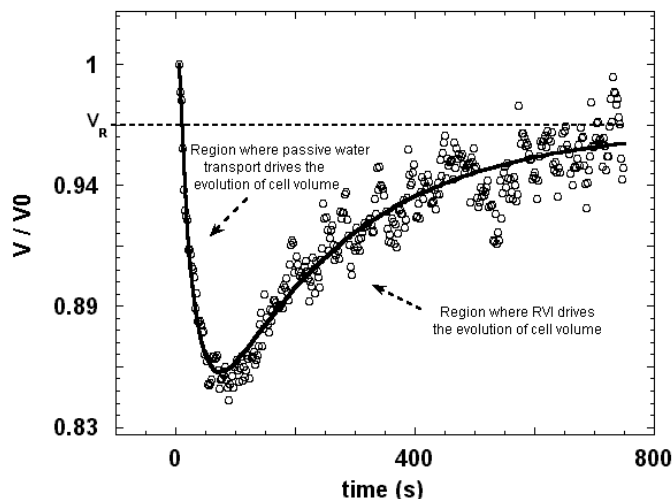


Fig. 8 – Time evolution of the normalized volume of the single MDCK cell of Figure 7, under osmotic up-shock from 300 mOsm to 500 mOsm. Circles are the experimental points and continuous curve is the fit using Equation 4. The fit returns  $P = 6.6 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{s}$ ,  $\alpha = (8.5 \pm 0.4) \times 10^{-10} \text{mol}/\text{s}\cdot\text{cm}^2$ ,  $V_R/V_0 = 0.95 \pm 0.04$  and  $b/V_0 = 0.52 \pm 0.02$ .

this model  $V_R$  is determined by the equilibrium NaCl partition coefficient, which is the ratio of equilibrium NaCl concentration in the cytoplasm and the concentration in the medium. Their model involves nonlinear differential equations that can only be solved numerically. Our data of Fig. 9 was used in their article in support of their model. Why vasopressin changes the NaCl partition coefficient is yet to be explained.

MACROPHAGE MOTILITY AND PHAGOCYTOSIS

We are interested on how changes in macrophage cytoskeleton mechanical properties and motility can affect its phagocytic capacity. With the use of defocusing microscopy we are able to visualize the spreading plasma membrane of murine bone marrow macrophages adhered on glass slides, and make real-time observation and quantification of their membrane surface dynamics. Macrophage surface fluctuations are filmed with a CCD camera for posterior image analysis. Analysis of surface fluctuations indicate two main types of fluctuations: large coherent structures (ruffles) that move on the surface with some speed and small random fluctuations that

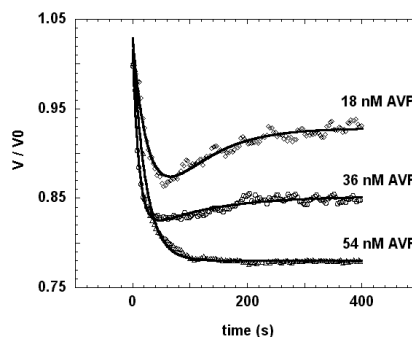


Fig. 9 – Time evolution of the normalized volume of trapped MDCK cells under an osmotic up-shock from 300 mOsm to 500 mOsm: lozenges are the data for vasopressin concentration of 18 nM, circles for 36 nM and triangles for 54 nM. Continuous curves are the fits using Eq. 4.

permeate the whole cell surface, as shown in Fig. 10.

We are able to measure height, width and speed of ruffles, time and spatial correlation functions and root

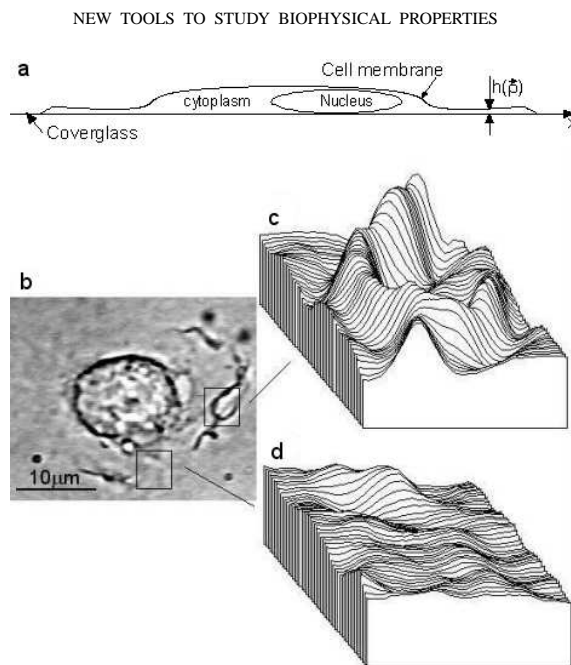


Fig. 10 – a) Sketch of a macrophage adhered on glass. b) Image of a macrophage obtained with microscope defocusing of  $\Delta f = 1\mu m$ . A movie of the macrophage 16.2 times faster can be seen at the site <http://www.fisica.ufmg.br/~estatexp/macrophage.mpg>. c) Contrast profile (proportional to  $\nabla^2 h(x, y)$ ) of kink-like structure propagating from the edge toward the nucleus of the cell. d) Contrast profile of small random fluctuations.

mean square values for curvature of the random fluctuations, either in presence of drugs or as a function of temperature. The elastic energy involved in these deformations is proportional to the square of curvature. Therefore, by measuring curvatures one can have one assessment of the energies involved to create small random fluctuations and ruffles. We estimate the energy to cause small random fluctuations and found it to be of the order of the thermal energy for  $T = 37^\circ C$ . On the other hand to form a ruffle the energy cost is of the order of 100 times the thermal energy. Therefore, non-thermal energy is required to form ruffles. One can do a statistical analysis of the small random fluctuations by determining the time and spatial correlation functions of contrast fluctuations, which are related to cell surface curvature fluctuations. In Fig. 11 is shown time and spatial correlation functions of contrast fluctuations.

Performing this analysis on about 30 different macrophages we obtain a relaxation time of  $\tau = 6 \pm 2$  s and a correlation length of  $\xi = 0.24 \pm 0.02 \mu m$ . From these results we obtain that the average amplitude of the small fluctuations is of the order of 3 nm, which is coincidentally, the size of actin subunits that form actin filaments, the bending modulus ( $\sim 3.2 \times 10^{-19}$  J) and viscosity ( $\sim 460$  Pa.s) for the composite system membrane-plus-cytoskeleton. It seems then that the plasmatic membrane can fluctuate and make room for the addition of actin subunits into filaments that press the membrane. After some time the membrane can relax back by the removal of actin subunits. This picture is consistent with Brownian ratchet models of cytoskeleton motility (Peskin et al. 1993, Mogilner and Oster 1996). In a most recent model (Gov and Gopinathan 2006), surface proteins that trigger actin polymerization have been in-

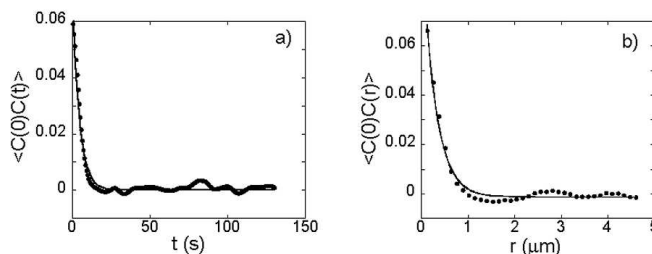


Fig. 11 – a) Temporal contrast autocorrelation function of random fluctuations with relaxation time  $t = 4.5\text{s}$ . b) Spatial contrast correlation function of random fluctuations with correlation length  $\xi = 0.26\mu\text{m}$ , which corresponds to the optical resolution of our microscope, indicating that the fluctuations are confined to regions with linear dimensions smaller than that.

incorporated into the model and cause cell surface fluctuations and motility. The model predicts small height and curvature fluctuations, as well as ruffles, depending upon local protein concentrations. Our recent data (Coelho Neto et al. 2005) have been used by Gov and Gopinathan (Gov and Gopinathan 2006) in support of their model. We have also tried to correlate macrophage surface activity and phagocytic capacity. With the optical tweezers we grab a single *Leishmania Amazonensis* amastigote parasite and put it in contact with the membrane of a macrophage. As the macrophage starts to phagocytose the parasite, the optical tweezers is turned-off. This allows single phagocytosis events to be recorded and analyzed using defocusing microscopy. Our results indicate that in most of the events ( $\sim 80\%$ ) the parasite can induce macrophage cell activity, by producing local ruffling around the phagocytic site. In this case the parasite is engulfed more rapidly than when there are no ruffling activity ( $\sim 20\%$  of the events). Since *Leishmania* is an obligatory intracellular parasite that resides inside macrophage lysosomes, the increase in ruffling activity could be induced by the parasite as an attempt to accelerate engulfment and facilitate infection. Our results for surface fluctuations relaxation time, speed of ruffles and phagocytosis time as a function of temperature, indicate that the dependence of all three parameters follow an Arrhenius-plot with activation energy around  $34 k_B T$ , indicating a strong correlation between cytoskeleton motility and phagocytic capacity (Coelho Neto et al. 2005).

#### CONCLUSIONS

Optical tweezers are important tools for manipulating small objects (molecules or cells) and a very sensitive force sensor working in the piconewton range. It has been used to study mechanical properties of a variety of bio-molecules and cells. In this work we showed that it can be used to study DNA-drug interaction in solution. In particular, we studied the interaction of the drug Psolaren with DNA, used in treatments of many skin diseases, since this interaction changes the entropic elasticity of DNA. With optical tweezers we are able to grab and suspend a single kidney cell in its medium and are able to measure its volume and volume variations during osmotic shocks to obtain important parameters related to osmotic transport through cell membrane.

Recently we introduced a new light microscopy technique that we named “defocusing microscopy” (DM), for visualization of transparent objects. The image contrast is proportional to the defocused distance and to the curvature of the object. We demonstrate that DM is able to provide quantitative data on macrophage surface motility and phagocytosis. We believe that it can be applied to many different cells for visualization and study of their mechanical properties. The wealth of data obtained is useful both to cell biologists and physicists interested in modeling biological phenomena.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues N.B. Viana, U. Agero, J. Coelho Neto, A.D. Lúcio, L.G. Mesquita and R.T. Gazzinelli,

for sharing with us their results. This work was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Financiadora de Estudos e Projetos – Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (FINEP-PRONEX), Instituto do Milênio de Nanotecnologia – Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). M.S.R. acknowledges support by Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

## RESUMO

Apresentamos uma revisão de duas novas técnicas para estudar propriedades biofísicas de moléculas únicas e células únicas. Um laser incidindo em uma objetiva de microscópio de grande abertura numérica é capaz de aprisionar pequenas partículas dielétricas na região próxima ao foco. Este aparato é chamado de pinça óptica. Esta técnica tem a grande vantagem de permitir a manipulação de um objeto individual. Usamos a pinça óptica para medir a elasticidade entrópica de uma molécula única de DNA em sua interação com o fármaco Psoralen. A pinça óptica também é usada para segurar uma célula renal MDCK fora do substrato, permitindo medidas precisas do volume dessa célula única durante um choque osmótico. Este processo nos permite obter informações sobre a permeabilidade osmótica da membrana e o crescimento do volume regulatório. A microscopia de desfocalização é uma técnica recente inventada em nosso laboratório, que nos permite observar objetos transparentes simplesmente desfocalizando o microscópio de uma maneira controlada. Nosso modelo físico de um microscópio desfocalizado mostra que o contraste da imagem observado neste caso é proporcional à distância da desfocalização e à curvatura do objeto transparente. A microscopia de desfocalização é muito útil para estudar a motilidade e as propriedades mecânicas das células. Mostramos aqui a aplicação da microscopia de desfocalização em medidas de flutuações na superfície de macrófagos e sua influência na fagocitose.

**Palavras-chave:** pinça óptica, microscopia de desfocalização, moléculas únicas, macrófagos, transporte de água, motilidade celular.

## REFERENCES

- AGERO U, MONKEN CH, ROBERT C, GAZZINELLI RT AND MESQUITA ON. 2003. Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy. *Phys Rev E* 67: 051904.
- AGERO U, MESQUITA LG, NEVES BRA, GAZZINELLI RT AND MESQUITA ON. 2004. Defocusing microscopy. *Microscopy Res Tech* 65: 159–165.
- AGRE P. 2000. Aquaporin water channels in kidney. *J Am Soc Nephrol* Apr 11: 764–777.
- ASHKIN A. 1970. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys Rev Lett* 24: 156–&.
- ASHKIN A. 1992. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys J* 61: 569–582.
- ASHKIN A AND DZIEDZIC JM. 1987. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235: 1517–1520.
- ATESHIAN GA, LIKHITPANICHKUL N AND HUNG CT. 2006. A mixture theory analysis for passive transport and osmotic loading cells. *J Biomech* 39: 464–475.
- COELHO NETO J, OLIVEIRA DCP, GAZZINELLI RT AND MESQUITA ON. 2005. Real-time measurements of membrane surface dynamics on macrophages and the phagocytosis of *Leishmania* parasites. *Exp Cell Res* 303: 207–217.
- COVEN TR, MURPHY FP AND GILLEAUDEAU P. 1998. Trimethylpsoralen bath PUVa is a remittive treatment for psoriasis vulgaris – Evidence that epidermal immunocytes are direct therapeutic targets. *Arch Dermatol* 134: 1263–1268.
- FARINAS J, SIMANEK V AND VERKMAN AS. 1995. Cell-volume measured by total internal-reflection microfluorimetry – application to water and solute transport in cells transfected with water channel homologs. *Biophys J* 68: 1613–1620.
- FARINAS J, KNEEN M, MOORE M AND VERKMAN AS. 1997. Plasma membrane water permeability of cultured cells and epithelia measured by light microscopy with spatial filtering. *J Gen Physiol* 10: 283–296.
- GOV NS AND GOPINATHAN A. 2006. Dynamics of membranes driven by actin polymerization. *Biophys J* 90: 454–469.
- GRIER DG. 2003. A revolution in optical manipulation. *Nature* 424: 810–816.
- LÚCIO AD, SANTOS RAS AND MESQUITA ON. 2003. Measurements and modeling of water transport and osmoregulation in a single kidney cell using optical tweezers and videomicroscopy. *Phys Rev E* 68: 041906.
- MAIA NETO PA AND NUSSENZVEIG HM. 2000. Theory of optical tweezers. *Europhys Lett* 50: 702–708.
- MARIC K, WIESNER B, LORENZ D, KLUSSMANN E AND ROSENTHAL W. 2001. Cell volume kinetics of adherent

- epithelial cells measured by laser scanning reflection microscopy: Determination of water permeability changes of renal principal cells. *Biophys J* 80: 1783–1790.
- MARKO JF AND SIGGIA ED. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules* 28: 8759–8770.
- MAZOLLI A, MAIA NETO PA AND NUSSENZVEIG HM. 2003. Theory of trapping forces in optical tweezers. *Proc Royal Soc London A* 459: 3021–3041.
- MOGILNER A AND OSTER GF. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* 71: 3030–3045.
- PESKIN CS, ODELL GM AND OSTER GF. 1993. Cellular motion and thermal fluctuations: The brownian ratchet. *Biophys J* 65: 316–324.
- ROCHA MS, VIANA NB AND MESQUITA ON. 2004. DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment. *J Chem Phys* 121: 9679–9683.
- SVOBODA K AND BLOCK SM. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 247–285.
- TIMBS MM AND SPRING KR. 1996. Hydraulic properties of MDCK cell epithelium. *J Membrane Biol* 153: 1–11.
- TRAN D, KWOK YK AND GOH CL. 2001. A retrospective review of PUVA therapy at the National Skin Centre of Singapore. *Photodermatol Photo* 17: 164–167.
- VERKMAN S AND MITRA AK. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol – Renal Physiol* 278: F13–F28.
- VIANA NB, FREIRE RTS AND MESQUITA ON. 2002. Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere. *Phys Rev E* 65: 041921.
- ZEIDEL ML. 1998. Recent advances in water transport. *Seminars in Nephrology* 18: 167–177.
- ZELENINA M AND BRISMAR H. 2000. Osmotic water permeability measurements using confocal laser scanning microscopy. *Eur Biophys J* 29: 165–171.

## Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules

M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita

*Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte, CEP 31270-901 Minas Gerais, Brazil*

(Received 29 December 2006; accepted 12 July 2007; published online 13 September 2007)

We use optical tweezers to perform stretching experiments on DNA molecules when interacting with the drugs daunomycin and ethidium bromide, which intercalate the DNA molecule. Our results show that the persistence length of the DNA-drug complexes increases strongly as the drug concentration increases up to some critical value. Above this critical value, the persistence length decreases abruptly and remains approximately constant for larger drug concentrations, at least in the concentration range used in our experiments. Measured intercalators critical concentrations for the persistence length transition coincide with the reported values for the helix-coil transition of DNA-drug complexes obtained from sedimentation experiments. The contour length of the molecules increases monotonically and saturates as the drug concentration increases. The neighbor exclusion model fits to our results for the total drug concentration as a function of the relative increase of the contour length. © 2007 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2768945]

### I. INTRODUCTION

DNA-drug interactions have been much studied for the past years. An important motivation for these studies is the fact that many of the studied drugs are used for treatment of human diseases, particularly, in cancer chemotherapy.

Single molecule stretching experiments using optical tweezers have yielded a great amount of information about DNA-protein and DNA-drug interactions.<sup>1-6</sup>

Recently, we studied the interaction between psoralen and DNA when illuminated with ultraviolet light A (UVA). Psoralen is a drug used to treat some skin diseases, such as psoriasis and vitiligo. This drug intercalates the DNA molecule and can form covalent linkages with the thymines if the complex is illuminated with ultraviolet light, modifying drastically its elasticity and impeding the DNA replication and transcription. The persistence length of the DNA-psoralen complexes formed after UVA illumination was measured in Ref. 7.

Daunomycin and ethidium bromide (EtBr) are other examples of drugs which intercalate the DNA molecule and can modify its elasticity, depending on the drug concentration. Both drugs unwind the DNA double helix when intercalating.<sup>8</sup> Daunomycin is an anthracycline antibiotic used in the treatment of various cancers. It inhibits DNA replication and transcription when intercalating, impeding cell duplication.<sup>9</sup> Ethidium bromide (EtBr) is commonly used as a nonradioactive marker for identifying and visualizing nucleic acid bands in electrophoresis and in other methods of nucleic acid separation.

Several works have reported different results for the effects of these drugs on the entropic elasticity of DNA molecules. In those works, the measured parameter used to study elasticity modifications is the persistence length of the DNA-drug complex. Smith *et al.*<sup>2</sup> reported that ethidium bromide does not modify the elasticity of the DNA molecule; it only

increases its contour length by ~40%. Tessmer *et al.*<sup>10</sup> reported that ethidium bromide causes a large increase in the contour length and a decrease in the persistence length of the complex for 1  $\mu$ M of the drug, and at lower concentrations, an increase in both persistence and contour lengths. Sischka *et al.*<sup>11</sup> reported the value of 28.1 nm for the persistence length of DNA-daunomycin complexes and 20.7 nm for DNA-EtBr complexes, smaller than the bare DNA persistence length of about 50 nm. The authors in this work have used a concentration of 1  $\mu$ M for both drugs, and a DNA concentration of 15 pM. Recently, Vladescu *et al.*<sup>12</sup> reported the value of 5.7 nm for the persistence length of highly saturated DNA-EtBr complexes. In the present work, in order to clearly establish the effect of these intercalating drugs on the persistence length of the DNA complexes, we performed stretching experiments at various drug concentrations, from zero up to saturation of the complexes. We show that the values obtained for the persistence length depend strongly on the concentration ratio between drug and DNA base pairs. Our results show that the persistence length of the complexes increases as we increase the drug concentration until certain critical concentration is reached. Above this critical concentration the persistence length decreases abruptly and remains practically constant for larger drug concentrations.

### II. EXPERIMENTAL PROCEDURE

To measure the persistence and contour length of DNA molecules and DNA-drug complexes, we use optical tweezers<sup>1-6</sup> and intensity autocorrelation spectroscopy.<sup>13</sup>

The samples consist of  $\lambda$ -DNA molecules in a phosphate buffered saline pH 7.4 with [NaCl]=140 mM solution. We attach one end of the molecule to a microscope coverslip, and the other end is attached to a polystyrene bead. To do this, we use the procedure described in Ref. 14. The DNA concentration used in all experiments was  $C_{DNA}$

=6.81  $\mu\text{g/ml}$ , which corresponds to a base pairs concentration of  $C_{\text{bp}}=11 \mu\text{M}$ . In the procedure used to prepare the samples, only 5%–10% of DNA attach simultaneously both to the coverslip and to one bead (this is the condition that we needed to perform the measurements). The sample is always prepared with bare DNAs and incubated for  $\sim 12$  h. The drug is added to the sample after this time and we waited for at least 1 h to start the measurements. The concentration of free DNA in the solution (which is not attached at least to one bead or to the coverslip) is very low, since the incubation time is very long.

Our optical tweezers is mounted in a Nikon TE300 microscope with an infinite corrected objective (100 $\times$ , numerical aperture=1.4). The trapping laser is an infrared (IR) laser with  $\lambda=832$  nm (SDL, 5422-H1). The optical tweezers is used to trap a polystyrene bead of 2.8  $\mu\text{m}$  diameter attached to the end of the DNA molecule, so we can manipulate and stretch the DNA molecule.

In addition, we use a He–Ne laser ( $\lambda=632.8$  nm) as the scattering probe. The backscattered light by the polystyrene bead is collected by a photodetector, which delivers pulses to a digital correlator. We, then, obtain the autocorrelation function of the backscattered light, which allows us to determine the stiffness of the optical trap, due to the Brownian motion of the trapped bead.

The next step in the experimental procedure is to obtain the force versus extension curves for the DNA molecules and DNA-drug complexes. To do this, we use the optical tweezers to trap the bead with the DNA while pulling the microscope slide, stretching the DNA. The backscattered light is collected over time while stretching the DNA. From the backscattered light intensity, one obtains the displacement of the trapped bead in relation to its equilibrium position, and by multiplying it by the tweezers' stiffness, the force exerted by the DNA molecule while it is stretched is obtained. The DNA extension is obtained knowing the pulling velocity of the coverslip (58 nm/s). This velocity is low enough to guarantee that the DNA passes through equilibrium configurations and low enough such that the Stokes force on the bead is negligible. Therefore, we transform time from the data into absolute extension along the  $x$  axis (parallel to the coverslip), which we call  $x_{\text{DNA}}$ . This procedure is done for all measurements, even on repeated measurements with the same molecule. The bead center is maintained at a fixed distance ( $h=3.5 \mu\text{m}$ ) from the coverslip during all measurements. The end-to-end distance  $z$  of the DNA molecule is related to  $x_{\text{DNA}}$  by  $z=\sqrt{x_{\text{DNA}}^2+h^2}$ .

Finally, with the force versus extension curves, we use the approximate expression derived by Marko and Siggia<sup>15</sup> [Eq. (1)] to obtain the persistence and contour length of the DNA molecules and DNA-drug complexes,

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4[1 - (\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2})/L]} - \frac{1}{4} \right] \times \frac{x_{\text{DNA}}}{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}, \quad (1)$$

where  $F_x$  is the  $x$  component of the force,  $k_B$  is the Boltz-

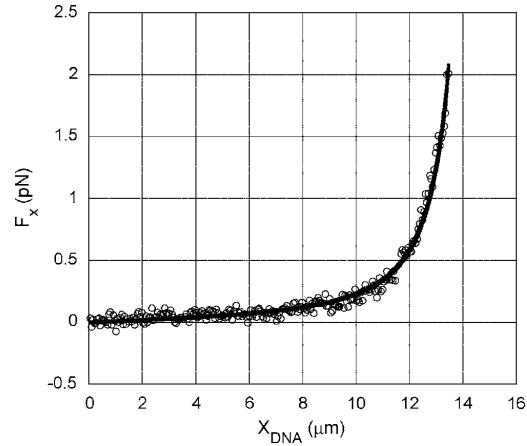


FIG. 1. Force as a function of extension for a drug-free DNA molecule. By fitting this curve to Eq. (1), we determine the persistence length  $A=49.9$  nm and the contour length  $L=15.5 \mu\text{m}$  for this particular  $\lambda$ -DNA.

mann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $A$  is the DNA persistence length,  $L$  is the DNA contour length,  $x_{\text{DNA}}$  is the projection of DNA molecule end-to-end distance along the  $x$  axis (parallel to the coverslip), and  $h$  is the height of the bead relative to the coverslip (distance between the center of the bead and the coverslip). The height is fixed in all experiments at  $h=3.5 \mu\text{m}$ , and we measure  $x_{\text{DNA}}$ .

The details about our experimental setup and experimental procedure can be found in Refs. 7 and 13.

Figure 1 is a typical force versus extension curve obtained with this procedure, for a bare DNA molecule. By fitting this curve with Eq. (1), we extract the persistence length and the contour length for the  $\lambda$ -DNA. For the particular DNA molecule shown in Fig. 1, we find  $A=49.9$  nm and  $L=15.5 \mu\text{m}$ .

Observe that we limit the range of forces used to  $\leq 2$  pN. We have limited our measurements to low forces because higher forces may change the chemical equilibrium of the DNA-drug complex. Also, lower forces avoids enthalpic effects which are not taken into account in Eq. (1). To show that the forces used in our experiments are sufficient for determining the persistence length, we repeat several times the measurement of the persistence length for a single bare DNA molecule over time. The values obtained in several different runs and different DNAs are  $A=50\pm 3$  nm and  $L=16.5\pm 1 \mu\text{m}$ . These values correspond to the well-known values reported in the literature.<sup>3,16,17</sup> This result indicates the accuracy of our method, and shows that the experimental apparatus do not exhibit significant drifts.

To determine the error bars of both persistence and contour lengths, we use the following procedure. We first perform five measurements (different force  $\times$  extension curves) with the same DNA molecule (or DNA-drug complex). The data of these curves are summed and averaged to a single curve for this complex. The fit to Eq. (1) then gives the values of both  $A$  and  $L$  for the complex, as in Fig. 1 for a bare DNA. We then repeat the same procedure for five dif-

ferent complexes, obtaining the values for both  $A$  and  $L$  for each complex. The presented values of  $A$  and  $L$  are averages over the different values obtained for each complex. We then determine the error bars by calculating the standard deviation from the mean value. The variability of  $L$  for different complexes is relatively large, but the resulting  $A$  varies very little, indicating that  $L$  and  $A$  are little correlated for  $L \gg A$ . This fact occurs because the contour length of bare  $\lambda$ -DNA molecules is not always  $16.5 \mu\text{m}$ . Performing several measurements, one can find different results around this value. Such distribution of contour length values was also observed by Mihailovic *et al.*<sup>18</sup>

### III. RESULTS

In this section we show the results obtained for the two drugs used: daunomycin and ethidium bromide.

#### A. Daunomycin

We have performed experiments with DNA-daunomycin complexes for several drug concentrations. In Fig. 2(a) we show the persistence length ( $A$ ) of the complexes as a function of total daunomycin concentration ( $C_D$ ) for fixed DNA base pair concentration of  $C_{bp} = 11 \mu\text{M}$ . We denote by  $C_D$  the total daunomycin concentration used to prepare the sample, which is the sum of both the bounded to DNA and the free drug concentration in the solution.

The point which the drug concentration is zero corresponds to the drug-free DNA situation with  $A = 50 \pm 3 \text{ nm}$ .

The behavior of the persistence length  $A$  as a function of daunomycin concentration  $C_D$  can be described as follows: it initially increases with  $C_D$  until it reaches a maximum value ( $\sim 280 \text{ nm}$ ) at the critical concentration  $C_D^{\text{critical}} = 18.3 \mu\text{M}$ . Then, it decays abruptly to around  $75 \text{ nm}$  and remains approximately constant at this value for the concentration range used.

The contour length, otherwise, increases monotonically from  $16.5 \pm 1 \mu\text{m}$  up to the saturation value of  $21 \pm 1.8 \mu\text{m}$ . In Fig. 2(b) we plot the corresponding values of the contour length of the same DNA-drug complexes of Fig. 2(a) as a function of the total drug concentration  $C_D$ . As we have pointed out in Sec. II, the error bars of the contour length are relatively large as a consequence of the contour length distribution around  $16.5 \mu\text{m}$ .<sup>18</sup>

In addition, we can estimate the exclusion parameter  $n$  (number of total base pairs divided by the number of total intercalated drug molecules) from our experimental data. The average value of the contour length for DNA-daunomycin complexes obtained when using a saturated concentration of the drug increases about 27% relative to drug-free DNA contour length ( $16.5 \mu\text{m}$ ). This means that when all possible drug molecules are intercalated, the DNA increases its contour length by  $4.5 \mu\text{m}$ . Knowing that each intercalated daunomycin molecule increases the contour length of the complex by  $0.31 \text{ nm}$ ,<sup>8</sup> we determine the total number of intercalated daunomycin molecules, which is around 14 500. Finally, the exclusion parameter can be obtained by dividing the number of base pairs of the  $\lambda$ -DNA (48 500) by the num-

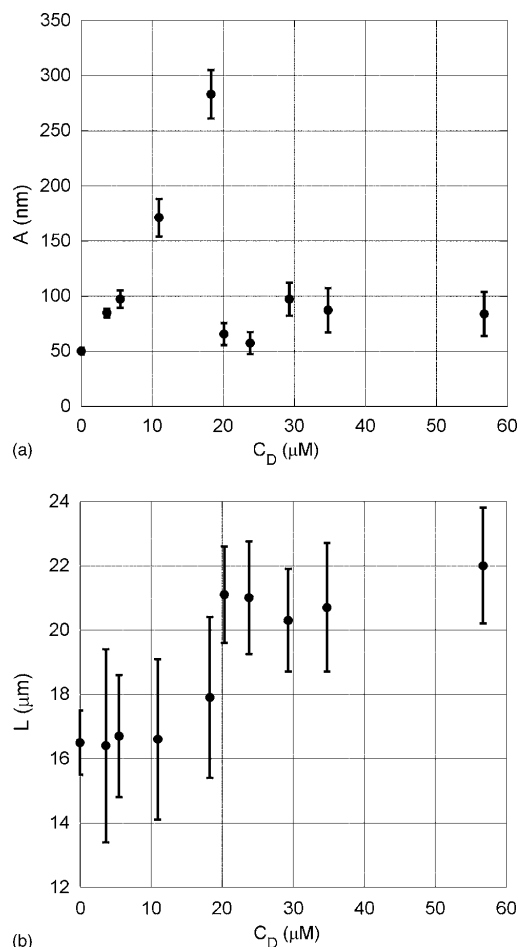


FIG. 2. (a) Persistence length  $A$  of DNA-daunomycin complexes as a function of drug concentration for fixed DNA concentration ( $C_{bp} = 11 \mu\text{M}$ ).  $A$  initially increases with  $C_D$  until it reaches a maximum value ( $\sim 280 \text{ nm}$ ) at the critical concentration  $C_D^{\text{critical}} = 18.3 \mu\text{M}$ . Then, the persistence length decays abruptly to around  $75 \text{ nm}$  and remains approximately constant at this value for the concentration range used. (b) Corresponding contour lengths  $L$  of the DNA-daunomycin complexes shown in Fig. 2(a) as a function of drug concentration.  $L$  increases monotonically with  $C_D$  up to the saturation value of  $21 \pm 1.8 \mu\text{m}$ .

ber of total intercalated drug molecules (14 500). We obtain  $n = 3.3$ , which is in good agreement with the value of 3.5 reported in Ref. 9.

For comparison purposes, Fig. 3(a) shows three force versus extension curves (normalized by the contour length) for a bare DNA and two different daunomycin concentrations, before and after the transition. The data points in this figure are smoothed out. The purpose of this smoothing process is only to diminish the Brownian fluctuations, and therefore, to make the data easier and clearer to visualize in a plot. This process is done using the smooth routine of the software KALEIDA GRAPH (Synergy Software). We emphasize, however, that all fittings and values for  $A$  and  $L$  are obtained

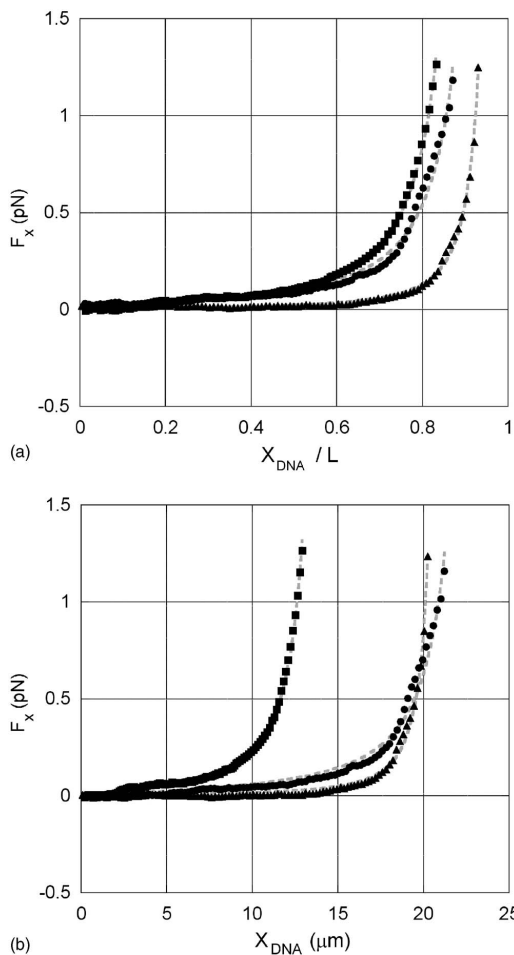


FIG. 3. (a) Force vs extension curves (normalized by the contour length) for a bare DNA molecule and two DNA-daunomycin complexes with different concentrations. The Brownian fluctuations are averaged out for better visualization of the data using a smoothing routine. (b) The same curves of Fig. 3(a) (unscaled). Squares: bare DNA; circles:  $C_D = 20.1 \mu M$  (above the critical concentration) and  $A \sim 61$  nm; triangles:  $C_D = 18.3 \mu M$  and  $A \sim 263$  nm. Dashed lines are fittings using Eq. (1).

from the raw data. Figure 3(b) shows the same curves unscaled. In general smoothed data for lower drug concentrations (smaller than the critical concentration) fit better to Eq. (1) than the data for higher drug concentration, as can be seen in Figs. 3(a) and 3(b).

**B. Ethidium bromide (EtBr)**

The behavior of the persistence length as a function of the drug concentration for DNA-EtBr complexes is very similar to the DNA-daunomycin complexes. The difference is that in this case the transition occurs at a lower drug concentration [see Fig. 4(a)] for the same DNA base pair con-

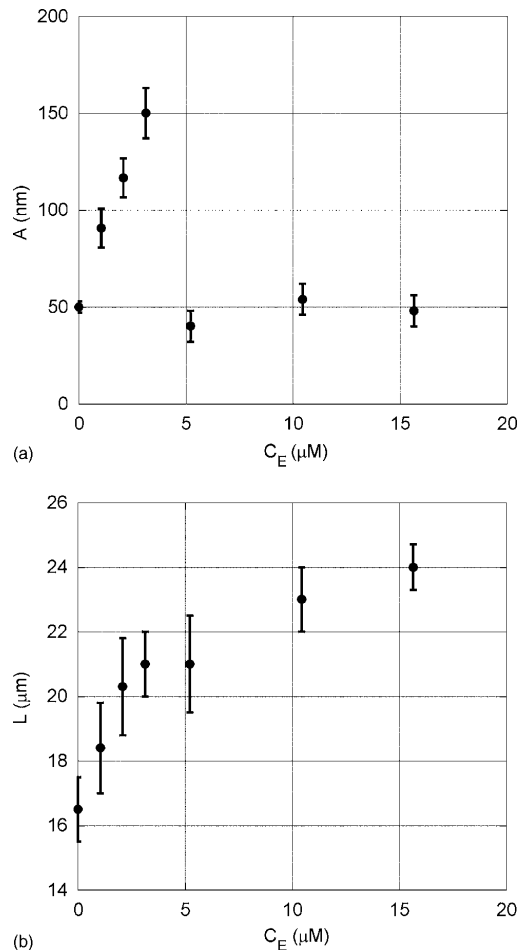


FIG. 4. (a) Persistence length of DNA-EtBr complexes as a function of drug concentration for fixed DNA concentration ( $C_{bp} = 11 \mu M$ ). In this case, the transition occurs at a lower drug concentration. The maximum value measured for the persistence length of DNA-EtBr complexes is  $\sim 150$  nm, at the critical concentration  $C_E^{critical} = 3.1 \mu M$ . (b) Corresponding contour lengths  $L$  of the DNA-EtBr complexes shown in Fig. 4(a) as a function of drug concentration.  $L$  increases monotonically with  $C_E$  up to the saturation value of  $23 \pm 1 \mu m$ .

centration  $C_{bp} = 11 \mu M$ . The maximum value measured for the persistence length of DNA-EtBr complexes is  $\sim 150$  nm, at the critical concentration  $C_E^{critical} = 3.1 \mu M$ .

The contour length again increases monotonically from  $16.5 \pm 1 \mu m$  up to the saturation value of  $23 \pm 1 \mu m$ . In Fig. 4(b) we plot the corresponding values of the contour length of the same DNA-drug complexes of Fig. 4(a) as a function of total drug concentration  $C_E$ .

Repeating the same calculation for the exclusion parameter of EtBr, which increases the DNA contour length by  $0.34$  nm per intercalated molecule,<sup>11</sup> we obtain  $n = 2.5$ , which is in reasonable agreement with the value of  $2.01$  reported in Ref. 19. In Sec. III C we will show a better estimation for  $n$ .

**C. Equilibrium binding constants**

In our experiments we control the total drug concentration  $C_T$  and the total concentration of DNA base pairs  $C_{bp}$ . To discuss the elastic properties of the DNA complex formed the important parameter to consider is the ratio  $r$  between the concentration of bounded drug ( $C_b$ ) per concentration of DNA base pairs ( $C_{bp}$ ). In order to obtain  $r$ , the binding of molecules to DNA is analyzed using the neighbor exclusion model.<sup>9</sup> A closed form for this model was obtained by McGhee and von Hippel<sup>20</sup> and can be expressed by the equation

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1} \quad (2)$$

where  $r$  is the ratio between the concentration of bounded drug ( $C_b$ ) per concentration of DNA base pairs ( $C_{bp}$ ),  $C_f$  is the concentration of free drug (not bounded),  $K_i$  is the intrinsic binding constant, and  $n$  is the exclusion parameter in base pairs. For a more detailed discussion about the neighbor exclusion model, see Ref. 20.

The concentration of free drug ( $C_f$ ) can be simply related to the concentration of bounded drug ( $C_b$ ) and the total drug concentration ( $C_T$ ) through the equation

$$C_T = C_f + C_b. \quad (3)$$

Using Eqs. (2) and (3) with the determined exclusion parameter ( $n=3.3$ ), the intrinsic binding constant reported in Ref. 9 for daunomycin,  $K_i=7 \times 10^5 M^{-1}$ , the critical daunomycin concentration measured in this work ( $C_D^{critical} = 18.3 \mu M$ ), and the concentration of DNA base pair used in our experiments ( $C_{bp}=11 \mu M$ ), we can determine the critical ratio  $r_c$ , which we define as the value of  $r$  at the abrupt transition for the value of the persistence length. We then obtain the value  $r_c=0.248$ .

Similarly, for EtBr, we use the parameters  $n=2.5$ ,  $K_i=1.5 \times 10^5 M^{-1}$ ,<sup>21</sup> and  $C_E^{critical}=3.1 \mu M$  determined again from the abrupt change in persistence length. We obtain  $r_c=0.131$ . In Sec. III D we compare the values obtained for  $r_c$  with those reported in the literature for a sedimentation experiment.

It is important to mention that  $K_i$  varies with the ionic strength of the solution. The values used here are the values for the ionic concentrations used in our experiments.

To study the variation of the contour length of the DNA-drug complexes when increasing the drug concentration, we plot the total EtBr concentration  $C_E$  as a function of the relative increase of the contour length  $\Delta L/L_0$  for DNA-EtBr complexes (Fig. 5), where  $L_0$  is the contour length for bare DNA molecules ( $16.5 \pm 1 \mu m$ ). Observe that this curve does not exhibit any abrupt changes, indicating that the abrupt change of the persistence length [Fig. 2(a)] is not an artifact.

The relative increase of the contour length ( $\Delta L/L_0 \equiv \ell$ ) can be related to the parameter  $r=C_b/C_{bp}$  from Eq. (2). To do this, we write  $L_0=N_{bp}\Delta$ , where  $N_{bp}$  is the number of base pairs and  $\Delta$  is the distance between two consecutive base pairs. For the bare  $\lambda$ -DNA, we have  $N_{bp}=48\,500$  and  $\Delta=L_0/N_{bp}=0.34$  nm. When  $N_b$  drug molecules intercalate the  $\lambda$ -DNA, the final resulting contour length can be written as

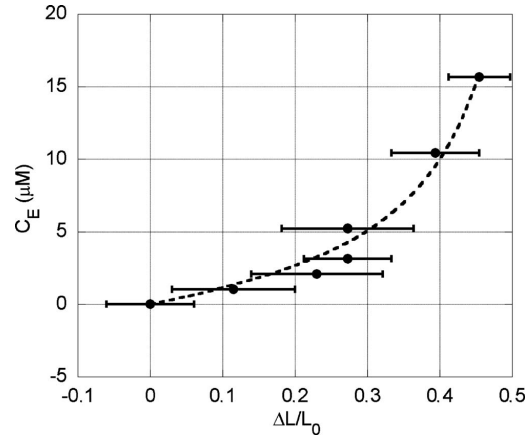


FIG. 5. Total drug concentration  $C_E$  as a function of the relative increase of the contour length  $\Delta L/L_0$  for DNA-EtBr complexes. Fitting this curve to the neighbor exclusion model (dashed line), Eq. (4), we determine the intrinsic binding constant  $K_i=(1.4 \pm 0.4) \times 10^5 M^{-1}$  and the exclusion parameter  $n=2.35 \pm 0.15$ .

$L=L_0+N_b\delta$ , where  $\delta$  is the increase of the contour length caused by each intercalated molecule. From the literature, we know that  $\delta=0.34$  nm for EtBr (Ref. 11) and  $\delta=0.31$  nm for daunomycin.<sup>8</sup> We can then write  $\ell=N_b\delta/N_{bp}\Delta$ . The parameter  $r$  can be written as  $r=C_b/C_{bp}=N_bM_b/N_{bp}M_{bp}$ , where  $M_b$  and  $M_{bp}$  are, respectively, the molar weight of the drug and of a base pair. Finally, we can write  $N_b/N_{bp}=rM_{bp}/M_b$  and  $\ell=rM_{bp}\delta/M_b\Delta$ . Defining  $\gamma=M_{bp}\delta/M_b\Delta$  we write  $r=\ell/\gamma$ . Using  $M_b=394.3$  g/mol for EtBr,  $M_b=564$  g/mol for daunomycin, and  $M_{bp}=646.4$  g/mol, we determine  $\gamma=1.64$  for EtBr and  $\gamma=1.04$  for daunomycin.

Using Eqs. (2) and (3) and  $r=\ell/\gamma$ , one can show that

$$C_T = \frac{C_{bp}\ell}{\gamma} + \frac{\ell(\gamma - n\ell + \ell)^{n-1}}{K_i(\gamma - n\ell)^n}. \quad (4)$$

Since  $C_{bp}=11 \mu M$  and  $\gamma=1.64$  for EtBr, we fit the data of Fig. 5 to Eq. (4) with two free parameters:  $K_i$  and  $n$ . From this fit (dashed line in Fig. 5), we determine the intrinsic binding constant  $K_i$  and the exclusion parameter  $n$ . We have found the values  $K_i=(1.4 \pm 0.4) \times 10^5 M^{-1}$  and  $n=2.35 \pm 0.15$  for EtBr, where the error bars are given by the fit. The value determined for  $K_i$  is in good agreement with the result from Gaugain *et al.*<sup>21</sup> The value determined for  $n$  is in good agreement with the value estimated in Sec. III B, and in reasonable agreement with the value of 2.01 reported in Ref. 19.

For DNA-daunomycin complexes, we find similar results. The values of  $K_i$  and  $n$  determined from the fit to Eq. (4) are, however, affected by large error bars.

**D. Interpretation and discussion of the results**

For low drug concentrations, drug intercalation in the DNA molecule increases the rigidity of the complex [see Figs. 2(a) and 4(a)]. This is consistent with the results of Vladescu *et al.*,<sup>22</sup> which shows that EtBr stabilizes the DNA double helix for low drug concentrations. They have per-

formed melting experiments with various EtBr concentrations, from 0 to 2.5  $\mu\text{M}$ , showing that EtBr intercalation stabilizes the DNA double helix in this concentration range. Therefore, we expect an increase of the persistence length of DNA-drug complexes in this low concentration range, in agreement with our data. Figure 4(a) shows this increase for EtBr, and Fig. 2(a) shows similar result for daunomycin.

For high drug concentrations, i.e., above the critical concentration [peak of Figs. 2(a) and 4(a)], the persistence length of the complexes decays abruptly and remains approximately constant in the concentration range studied.

It is well known that intercalation unwinds the DNA double helix.<sup>8</sup> Due to unwinding and above some drug critical concentration, the complexes can have a helix-coil transition, which can cause DNA denaturing as the DNA is stretched, decreasing the persistence length of DNA-drug complexes, as seen in Figs. 2(a) and 4(a). The unwinding angle per intercalated EtBr drug molecule is approximately 1.7 times greater than that for daunomycin intercalation.<sup>8</sup> Therefore, we expect that the transition occurs for EtBr at a lower drug concentration as compared with daunomycin, if the same DNA concentration is used. This is confirmed experimentally in our data of Figs. 2(a) and 4(a). The persistence length of DNA-EtBr complexes increases more rapidly with concentration than the DNA-daunomycin complexes. This behavior reflects the fact that EtBr is the stronger intercalator. The maximum value reached for the persistence length, however, is greater for DNA-daunomycin complexes. This might be explained assuming that the maximum value obtained for the persistence length depends on the competition between two effects caused by the intercalator. While the number of intercalated molecules increases the value of  $A$ , the angle unwound by each intercalated molecules may decrease it.

Sedimentation experiments performed with circular DNA as a function of daunomycin and ethidium bromide concentrations display a minimum in the sedimentation coefficient  $S_{20}$  at  $r_c=0.192$ , for daunomycin and  $r_c=0.114$  for ethidium bromide.<sup>8</sup> The minimum in the sedimentation coefficient  $S_{20}$  is associated with a helix-coil transition, due to unwinding of the DNA double helix by the intercalating drugs.<sup>8</sup> These numbers agree within 15%–30% with the values of  $r_c$  determined from our DNA persistence length measurements. This indicates that the abrupt change of the DNA persistence length for both drugs might be also caused by a helix-coil transition due to the unwinding of the DNA double helix as the drugs intercalate into it.

In addition, it is known that EtBr (and also most intercalating drugs) exhibits multimodality at their interaction with DNA.<sup>23,24</sup> The kind of interaction varies with the drug concentration. The abrupt transition shown in Figs. 2(a) and 4(a) might as well be caused by different ways of drug binding to DNA. If this is true, we should see a variation on the persistence length of the complex for concentrations above the critical value. In our data [Figs. 2(a) and 4(a)], the persistence length appears to remain constant in the concentration range used, but perhaps it will not remain at this value if we continue to increase the drug concentration. This may explain the difference observed in our value of the persis-

tence length at this concentration range and some values reported in the literature, while in most cases the ratio  $C_T/C_{bp}$  is much higher than our ratio for the critical concentration of the drugs.

The abrupt change in the persistence length observed here depends on the ratio used for the drug concentration and base pair concentration  $C_T/C_{bp}$ . In our experiments, we use a constant base pair concentration  $C_{bp}=11 \mu\text{M}$  to study the persistence length as a function of total drug concentration. However, if we change  $C_{bp}$ , we will get other values for the critical concentrations of each studied drug, because the binding depends on both DNA and drug concentrations.

In the works cited in the Introduction (Sec. I), for example, Smith *et al.*<sup>2</sup> use typical ratios  $C_T/C_{bp}$  from 0.403 to 8.07, which are above the critical ratio  $C_E^{\text{critical}}/C_{bp}=0.282$  determined for DNA-EtBr complexes from our data, at the critical concentration. These authors report that EtBr does not modify the elasticity of the DNA molecule, only increasing its contour length by  $\sim 40\%$ . Since their  $C_T/C_{bp}$  ratio is above the critical one, we can conclude that their results agree with ours because the value obtained for the persistence length of DNA-EtBr complexes above the critical concentration is very close to the value for bare DNA molecules. Also, the increase for the contour length determined from our data is about 39%, in agreement with Ref. 2. Tessmer *et al.*<sup>10</sup> use a  $C_T/C_{bp}$  ratio of  $\sim 169.5$ , while Sischka *et al.*<sup>11</sup> use a  $C_T/C_{bp}$  ratio of  $\sim 1.37$  for DNA-EtBr complexes. In these two works, this ratio is well above the value at the critical concentration we measured, therefore, both groups worked at a concentration range above the critical transition. The values obtained for the persistence length in the two works are lower than those for the bare DNA, which suggest that  $A$  should decrease if we continue to increase the drug concentration in the region with concentrations greater than the critical one. Our data do not show this effect probably because we use a maximum concentration value of approximately three times the critical one for both drugs. Recently, Vladescu *et al.*<sup>12</sup> reported the value of 5.7 nm for the persistence length of saturated DNA-EtBr complexes. These authors work in a much higher force regime than ours ( $\sim 100$  pN) and use a much higher drug concentration. The results reported by these authors also indicate that  $A$  may decrease if we continue to increase the drug concentration above the critical one. Also, the values of  $A$  may depend on the force regime used to stretch the DNA molecules. The authors have shown in Ref. 12 that parameters such as the exclusion number  $n$  and the binding constant  $K_i$  depend on the force used to stretch the molecule. Then, it is reasonable to suppose that  $A$  also depend on the force used because the characteristics of the drug intercalation are changed.

In our work, we perform the experiments in a low-force regime ( $\sim 2$ – $3$  pN), i.e., the values reported in our work correspond approximately to the zero-force intercalation situation.

Because most authors uses a  $C_T/C_{bp}$  ratio greater than the value determined from our data for the critical concentration, they have missed the transition of the persistence length which we report in this work.

#### IV. CONCLUSION

We have made systematic measurements of the entropic elasticity variation of a  $\lambda$ -DNA molecule when interacting with two drugs, daunomycin and ethidium bromide, as a function of their concentrations. Our results show that the persistence length of the DNA-drug complexes increases strongly as the drug concentration increases, for low concentrations. Above certain critical drug concentration the persistence length decreases abruptly and remains approximately constant for the range of drug concentrations used above the critical concentration. This behavior is quite similar for both daunomycin and EtBr, as shown in Figs. 2(a) and 4(a). Our results suggests that the abrupt transition observed in the persistence length might be due to a helix-coil transition and denaturing of DNA-drug complexes above the critical concentration, resulting in a decrease of the persistence length. The measured results of the contour length for both DNA-drug complexes fits well to the neighbor exclusion model and do not exhibit any abrupt changes as the drug concentration is varied.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPEMIG, FINEP-PRONEX, Instituto do Milênio de Nanotecnologia e Instituto do Milênio de Óptica Não-linear, and Fotônica e Biofotônica-MCT. One of the authors (M.S.R.) acknowledges support by LNLS.

<sup>1</sup>A. Ashkin, Phys. Rev. Lett. **24**, 156 (1970).

<sup>2</sup>S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, Science **258**, 1122 (1992).

<sup>3</sup>M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, Biophys. J.

**72**, 1335 (1997).

<sup>4</sup>G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, and A. Libchaber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 7916 (1999).

<sup>5</sup>C. G. Baumann, V. A. Bloomfield, S. B. Smith, C. Bustamante, M. D. Wang, and S. M. Block, Biophys. J. **78**, 1965 (2000).

<sup>6</sup>D. G. Grier, Nature (London) **424**, 810 (2003).

<sup>7</sup>M. S. Rocha, N. B. Viana, and O. N. Mesquita, J. Chem. Phys. **121**, 9679 (2004).

<sup>8</sup>H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta, and D. M. Crothers, Biochemistry **21**, 3940 (1982).

<sup>9</sup>J. B. Chaires, N. Dattagupta, and D. M. Crothers, Biochemistry **21**, 3933 (1982).

<sup>10</sup>I. Tessler, C. G. Baumann, G. M. Skinner, J. E. Molloy, J. G. Hoggett, S. J. B. Tendler, and S. Allen, J. Mod. Opt. **50**, 1627 (2003).

<sup>11</sup>A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios, and D. Anselmetti, Biophys. J. **88**, 404 (2005).

<sup>12</sup>I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nunez, I. Rouzina, and M. C. Williams, Nat. Methods **4**, 517 (2007).

<sup>13</sup>N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, Phys. Rev. E **65**, 041921 (2002).

<sup>14</sup>G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky, and A. J. Libchaber, Appl. Phys. Lett. **73**, 291 (1998).

<sup>15</sup>J. F. Marko and E. D. Siggia, Macromolecules **28**, 8759 (1995).

<sup>16</sup>T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon, Prog. Biophys. Mol. Biol. **74**, 115 (2000).

<sup>17</sup>J. C. Neto, R. Dickman, and O. N. Mesquita, Physica A **345**, 173 (2005).

<sup>18</sup>A. Mihailovic, I. Vladescu, M. McCauley, E. Ly, M. C. Williams, E. M. Spain, and M. E. Nunez, Langmuir **22**, 4699 (2006).

<sup>19</sup>J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams, and L. A. Bottomley, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 12283 (1996).

<sup>20</sup>J. D. McGhee and P. H. von Hippel, J. Mol. Biol. **86**, 469 (1974).

<sup>21</sup>B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques, and J. L. Pecq, Biochemistry **17**, 5078 (1978).

<sup>22</sup>I. D. Vladescu, M. J. McCauley, I. Rouzina, and M. C. Williams, Phys. Rev. Lett. **95**, 158102 (2005).

<sup>23</sup>P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, G. A. Manukyan, and A. T. Karapetyan, Exp. Mol. Med. **33**, 205 (2001).

<sup>24</sup>A. Arabzadeh, S. Z. Bathaie, H. Farsam, M. Amanlou, A. A. Saboury, A. Shockravi, and A. A. Moosavi-Movahedi, Int. J. Pharm. **237**, 47 (2002).

## Lista de Figuras

- 2.1 Pressão de radiação: parte da intensidade total incidente na microesfera é refletida em sua superfície. A força resultante neste caso tende a empurrar a microesfera para cima. . . . . 10
- 2.2 Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. Observe que a força resultante sobre a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe. . . . . 11
- 2.3 Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada acima do foco do laser. Observe que a força resultante sobre a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe. . . . . 12
- 2.4 Constante de força da pinça óptica (normalizada pela potência local do laser na microesfera) em função do raio da microesfera presa para microesferas de óleo mineral. *Círculos*: experimento; *quadrados*: teoria de óptica geométrica (OG) [10]. 15
- 2.5 Imagem real de uma microesfera de poliestireno com raio  $a = 1,4 \mu\text{m}$  presa na pinça óptica. . . . . 19
- 2.6 Montagem experimental utilizada para as medidas. . . . . 20
- 2.7 Perfil da intensidade retroespalhada por uma microesfera presa na pinça em função do tempo. Normalizamos a intensidade por seu valor máximo. Neste caso, a curva é uma gaussiana ligeiramente assimétrica. . . . . 24
- 2.8 Típico gráfico de uma função de correlação normalizada. *Inserção*: mesmo gráfico em escala logarítmica. . . . . 25

2.9	Constante de força $\kappa_x$ , normalizada pela potência local na microesfera $P_L$ , em função do raio $a$ da microesfera presa, para uma altura fixa $h = 3,1 \mu\text{m}$ . <i>Círculos</i> : pontos experimentais; <i>Linha sólida</i> : Teoria MDSA. . . . .	29
2.10	Constante de força $\kappa_x$ , normalizada pela potência local na microesfera $P_L$ , em função do raio $a$ da microesfera presa, para uma altura fixa $h = 8,6 \mu\text{m}$ . <i>Círculos</i> : pontos experimentais; <i>Linha sólida</i> : Teoria MDSA. . . . .	30
2.11	Constante de força $\kappa_x$ , normalizada pela potência local na microesfera $P_L$ , em função do raio $a$ da microesfera presa, para uma altura fixa $h = 3,1 \mu\text{m}$ . <i>Círculos</i> : pontos experimentais; <i>Linha sólida</i> : Teoria MDSA; <i>Linha pontilhada</i> : previsão da óptica geométrica. . . . .	31
3.1	Desenho esquemático da pentose desoxirribose, mostrando a numeração dos carbonos da mesma. . . . .	34
3.2	Desenho esquemático de uma molécula de DNA, mostrando a dupla fita helicoidal, com a ligação das bases entre as duas fitas através de pontes de hidrogênio. . . . .	36
3.3	Desenho esquemático mostrando os quatro tipos de nucleotídeos e a ligação por pontes de hidrogênio entre as bases. . . . .	37
3.4	Desenho esquemático mostrando as duas cavidades encontradas na molécula de DNA: cavidade maior (ou fenda maior) e cavidade menor (ou fenda menor). . . . .	38
3.5	Comparação entre as três formas de DNA: A, B e Z. . . . .	40
3.6	Curva de força em função da extensão para uma molécula de DNA. Observe que no regime de grandes forças ( $\sim 60 \text{ pN}$ ) a curva apresenta um platô, onde ocorre a transição de superestiramento [39]. . . . .	41
3.7	Formação das estruturas conhecidas como plectonemas numa molécula de DNA circular, devido ao superenrolamento. . . . .	42
3.8	Vareta rígida de comprimento $L_c$ que é deformada para um semicírculo de raio $R_c$ . . . . .	44

---

---

3.9	Desenho esquemático mostrando a variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária. Estes vetores estão parametrizados pelo comprimento $s$ ao longo da curva. . . . .	46
3.10	Desenho esquemático mostrando o aumento do número de configurações possíveis para um polímero, com o conseqüente aumento da entropia do sistema. . . . .	50
4.1	Molécula de daunomicina, $C_{27}H_{29}NO_{10} \cdot HCl$ , massa molecular $M = 563,98$ g/mol. . . . .	58
4.2	Molécula de EtBr, $C_{21}H_{20}BrN_3$ , massa molecular $M = 394,31$ g/mol. . . . .	59
4.3	Esquema mostrando a intercalação de moléculas de um fármaco qualquer entre as bases do DNA. Observe que, para acomodar as moléculas intercaladas, o DNA sofre um aumento no comprimento de contorno. . . . .	60
4.4	Comportamento gráfico da Eq. 4.1. Inicialmente, $r$ cresce linearmente com a concentração total de fármaco, mas esta taxa de crescimento diminui a medida que o complexo se aproxima da saturação. O gráfico foi obtido com os parâmetros da daunomicina, $K_i = 7 \times 10^5$ M <sup>-1</sup> e $n = 3,5 \pm 0,5$ [58]. . . . .	62
4.5	(a) Diversas configurações possíveis encontradas na amostra. (b) Método usado para identificar um bom conjunto DNA-microesfera. Observe o perfil circular: o deslocamento máximo deve ser o mesmo em todas as direções. Os tamanhos da esfera de poliestireno e do DNA estão fora de escala para melhor entendimento da figura. . . . .	66
4.6	Perfil típico de retroespalhamento mostrando a intensidade (em unidades arbitrárias) como função da posição da microesfera. Ajustando esta curva com Eq. 4.3, determinamos os parâmetros $I_0$ , $\bar{x}$ e $\sigma$ . . . . .	67

---

- 
- 4.7 Geometria do experimento de estiramento da molécula de DNA. A altura  $h$  da microesfera é mantida fixa em  $3,5 \mu\text{m}$  enquanto deslocamos o estágio do microscópio com velocidade constante ( $v = 0,058 \mu\text{m/s}$ ). A força que o DNA exerce sobre a microesfera é em módulo igual a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma, pois o experimento é realizado no regime quase-estático. 68
- 4.8 Típico perfil de estiramento da molécula de DNA, mostrando a intensidade (normalizada) em função do estiramento  $x_{DNA}$  da molécula. . . . . 69
- 4.9 Típica curva de força (componente  $x$ )  $\times$  extensão da molécula de DNA. Ajustando esta curva com a Eq. 4.6, determinamos o comprimento de contorno  $L$  e o comprimento de persistência  $A$  da molécula. Neste caso particular, obtivemos do ajuste  $L = 15,5 \mu\text{m}$  e  $A = 49,9 \text{ nm}$ . . . . . 71
- 4.10 (a) Comprimento de persistência  $A$  dos complexos DNA-daunomicina em função da concentração do fármaco  $C_D$  para uma concentração de DNA fixa ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ).  $A$  inicialmente cresce até atingir um valor máximo ( $\sim 280 \text{ nm}$ ) para uma concentração crítica  $C_D^c \sim 18,3 \mu\text{M}$ . A partir desta concentração,  $A$  cai abruptamente para cerca de  $75 \text{ nm}$  e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração. (b) Comprimentos de contorno em função da concentração para os mesmos complexos da parte (a).  $L$  cresce monotonicamente de  $16,5 \pm 1 \mu\text{m}$  até  $21 \pm 1 \mu\text{m}$  na saturação. . . . . 74
-

4.11 (a) Curvas de força $\times$ extensão normalizadas pelo comprimento de contorno para dois complexos DNA-daunomicina com concentrações diferentes e para o DNA puro. Para uma melhor visualização, fizemos uma média sobre as flutuações Brownianas nas duas curvas. <i>Círculos</i> : Complexo DNA-daunomicina com $C_D = 20,1 \mu\text{M}$ e $A = 61 \text{ nm}$ ; <i>Triângulos</i> : Complexo DNA-daunomicina com $C_D = 18,3 \mu\text{M}$ e $A = 263 \text{ nm}$ ; <i>Quadrados</i> : DNA puro com $A = 49,9 \text{ nm}$ . As curvas pontilhadas correspondem aos respectivos ajustes com o modelo WLC. (b) Mesmas curvas, não normalizadas pelo comprimento de contorno. . . . .	76
4.12 (a) Comprimento de persistência $A$ dos complexos DNA-EtBr em função da concentração do fármaco $C_E$ para uma concentração de DNA fixa ( $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$ ). $A$ inicialmente cresce até atingir um valor máximo ( $\sim 150 \text{ nm}$ ) para uma concentração crítica $C_E^c \sim 3,1 \mu\text{M}$ . A partir desta concentração, $A$ cai abruptamente para cerca de $50 \text{ nm}$ e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração. (b) Comprimentos de contorno em função da concentração para os mesmos complexos da parte (a). $L$ cresce monotonicamente de $16,5 \pm 1 \mu\text{m}$ até $23 \pm 1 \mu\text{m}$ na saturação. . . . .	77
4.13 Concentração total de EtBr $C_E$ em função do aumento relativo do comprimento de contorno $\Delta L/L_0$ para complexos DNA-EtBr. A linha pontilhada corresponde ao ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos (Eq. 4.7). . . . .	79
4.14 Concentração total de daunomicina $C_D$ em função do aumento relativo do comprimento de contorno $\Delta L/L_0$ para complexos DNA-daunomicina. A linha pontilhada corresponde ao ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos (Eq. 4.7). . . . .	80
5.1 Esquema da interação DNA-psoralen. . . . .	86
5.2 Molécula de psoralen, $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_3$ , com massa molecular $M = 186,16 \text{ g/mol}$ . . . . .	88

---

---

5.3	Comprimento de persistência em função da concentração do fármaco para complexos DNA-psoralen. Observe que a transição abrupta ocorre na mesma concentração ( $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ ) para ambas as situações. <i>Círculos</i> : complexos intercalados; <i>Quadrados</i> : complexos com <i>crosslinks</i> . . . . .	92
5.4	Comprimento de contorno em função da concentração do fármaco para os mesmos complexos DNA-psoralen da Fig. 5.3 na situação de intercalação. . . . .	93
5.5	Dependência do aumento relativo do comprimento de contorno com a concentração do fármaco para os mesmos complexos DNA-psoralen da Fig. 5.4. <i>Círculos</i> : pontos experimentais; <i>Linha pontilhada</i> : ajuste com o modelo de exclusão de vizinhos (Eq. 4.7). . . . .	94
5.6	Comprimento de persistência em função do tempo para um complexo DNA-psoralen iluminado ininterruptamente com luz UVA. O comprimento de persistência parece inicialmente oscilar no tempo, mas estabiliza num valor estável ( $\sim 100 \text{ nm}$ ) após $\sim 35$ minutos. O gráfico foi obtido usando a concentração do fármaco $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ . . . . .	96
5.7	Comprimento de persistência em função do tempo para um complexo DNA-psoralen iluminado ininterruptamente com luz UVA. O comprimento de persistência varia no tempo, mas estabiliza após $\sim 30$ minutos. O gráfico foi obtido usando a concentração do fármaco $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ . . . . .	97
5.8	Comprimento de persistência em função do tempo para o mesmo complexo DNA-psoralen da Fig. 5.7 após desligar a luz UVA. O comprimento de persistência diminui com o tempo, estabilizando num valor entre o valor do DNA puro, sem fármacos ( $\sim 50 \text{ nm}$ ) e o valor de intercalação ( $\sim 86 \text{ nm}$ ). . . . .	98
5.9	Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 5$ minutos e $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ . . . . .	101
5.10	Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 5$ minutos e $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ . . . . .	102

---

5.11	Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 5$ minutos e $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ (intensidade de iluminação UVA $\sim 22\%$ menor). . . . .	103
5.12	Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 5$ minutos e $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ (intensidade de iluminação UVA $\sim 22\%$ menor). . . . .	104
5.13	Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 15$ minutos e $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ . . . . .	105
5.14	Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 15$ minutos e $C_P = 8,1 \mu\text{M}$ . . . . .	105
5.15	Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 10$ minutos e $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ . . . . .	106
5.16	Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 10$ minutos e $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ . . . . .	106
5.17	Comprimento de persistência em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 5$ minutos e $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ . . . . .	107
5.18	Comprimento de contorno (normalizado pelo valor inicial) em função do tempo para complexos DNA-psoralen, $\delta = 5$ minutos e $C_P = 13,4 \mu\text{M}$ . . . . .	107
A.1	Típico gráfico da análise do movimento Browniano ( $\langle \Delta r^2 \rangle \times t$ ) de uma microesfera livre em solução aquosa. <i>Círculos</i> : pontos experimentais; <i>Linha sólida</i> : ajuste com a Eq. A.2. . . . .	113
B.1	Montagem utilizada no método da objetiva dupla. A objetiva 1 está conectada ao microscópio. Como as duas objetivas são idênticas, o feixe emerge cilíndrico após a objetiva 2, e assim podemos medir a potência facilmente usando um detector de fótons. . . . .	117
B.2	Amostra utilizada no experimento do microbolômetro de mercúrio: microesferas feitas com este material, de diferentes raios $R$ , localizadas em água deionizada. . . . .	118

---

- 
- B.3 Resultado de um típico experimento realizado com o microbolômetro de mercúrio, mostrando o raio  $R$  das microesferas como função da potência  $P_E$  com a qual a microesfera “salta”.  
*Círculos*: pontos experimentais; *Linha sólida*: ajuste com a Eq. B.2. . . . . 120
- E.1 Uma lacuna (*gap*) com  $g = 5$  sítios ligáveis situado entre duas moléculas ligadas. Neste exemplo, temos  $n = 3$ , o que dá  $s = g - n + 1 = 3$ . . . . . 129
- E.2 Notação usada para calcular a probabilidade  $P_g$ .  $f$  é um sítio livre (ligável) da rede e  $b_i$  são os sítios ligados. . . . . 130
-

## Lista de Tabelas

- 4.1 Composição química dos dois tipos de PBS usados na preparação das amostras de DNA. . . . . 64
- 5.1 Resultados das medidas de equilíbrio para o comprimento de persistência dos complexos DNA-psoralen. . . . . 89

## Referências Bibliográficas

- [1] **Ashkin, A.**, “Acceleration and trapping of particles by radiation pressure.” *Phys. Rev. Lett.* 24 (4), 156& (1970).
  - [2] **Ashkin, A. and Dziedzic, J. M.**, “Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria.” *Science* 235 (4795), 1517–1520 (1987).
  - [3] **Ashkin, A.**, “Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime.” *Biophys. J.* 61 (2), 569–582 (1992).
  - [4] **Ashkin, A.**, “Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers.” *P. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4853–4860 (1997).
  - [5] **Svoboda, K. and Block, S. M.**, “Biological applications of optical forces.” *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 23, 247–285 (1994).
  - [6] **Neuman, K. C. and Block, S. M.**, “Optical trapping.” *Rev. Sci. Instrum.* 75 (9), 2787–2809 (2004).
  - [7] **Grier, D. G.**, “A revolution in optical manipulation.” *Nature* 424 (6950), 810–816 (2003).
  - [8] **Mazolli, A., Neto, P. A. M., and Nussenzeig, H. M.**, “Theory of trapping forces in optical tweezers.” *Proc. R. Soc. Lon. A* 459 (2040), 3021–3041 (2003).
  - [9] **Neto, P. A. M. and Nussenzeig, H. M.**, “Theory of optical tweezers.” *Europhys. Lett.* 50 (5), 702–708 (2000).
-

- 
- [10] **Rocha, M. S.**, Pinças Ópticas: Experimento e Teoria. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2004).
- [11] **Richards, B. and Wolf, E.**, “Electromagnetic diffraction in optical systems .2. Structure of the image field in an aplanatic system.” *Proc. R. Soc. Lon. A* 253 (1274), 358–379 (1959).
- [12] **Mazolli, A.**, Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento Mie. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (2003).
- [13] **Viana, N. B., Rocha, M. S., Mesquita, O. N., Mazolli, A., Neto, P. A. M., and Nussenzveig, H. M.**, “Absolute calibration of optical tweezers.” *Appl. Phys. Lett.* 88 (13), Art. No. 131110 (2006).
- [14] **Viana, N. B., Rocha, M. S., Mesquita, O. N., Mazolli, A., Neto, P. A. M., and Nussenzveig, H. M.**, “Towards absolute calibration of optical tweezers.” *Phys. Rev. E* 75 (2), Art. No. 021914 (2007).
- [15] **Viana, N. B., Freire, R. T. S., and Mesquita, O. N.**, “Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere.” *Phys. Rev. E* 65 (4), Art. No. 041921 (2002).
- [16] **Smith, S. B., Finzi, L., and Bustamante, C.**, “Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads.” *Science* 258 (5085), 1122–1126 (1992).
- [17] **Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S. M.**, “Stretching DNA with optical tweezers.” *Biophys. J.* 72 (3), 1335–1346 (1997).
- [18] **Shivashankar, G. V., Feingold, M., Krichevsky, O., and Libchaber, A.**, “RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis.” *P. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (14), 7916–7921 (1999).
-

- 
- [19] **Baumann, C. G., Bloomfield, V. A., Smith, S. B., Bustamante, C., Wang, M. D., and Block, S. M.**, “Stretching of single collapsed DNA molecules.” *Biophys. J.* 78 (4), 1965–1978 (2000).
- [20] **Fernandes, C. G., Graça, D. L., and Pereira, L. A. V. D.**, “Demyelination and remyelination after multiple intramedullary injections of ethidium bromide in Wistar rats.” *Arq. Neuro-psiquiat.* 55 (3), 452–459 (1997).
- [21] **Marko, J. F. and Siggia, E. D.**, “Stretching DNA.” *Macromolecules* 28 (26), 8759–8770 (1995).
- [22] **Boal, D.**, *Mechanics of the cell*. Cambridge University Press (2002).
- [23] **Roosen, G.**, “La lévitation optique de sphères.” *Can. J. Phys.* 57 (9), 1260–1279 (1979).
- [24] **Rohrbach, A. and Stelzer, E. H. K.**, “Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations.” *Appl. Optics* 41 (13), 2494–2507 (2002).
- [25] **Rohrbach, A.**, “Stiffness of optical traps: Quantitative agreement between experiment and electromagnetic theory.” *Phys. Rev. Lett.* 95 (16), Art. No. 168102 (2005).
- [26] *Laser Optics and Coatings*. CVI Laser Corporation, pág. 161 (1997).
- [27] **Viana, N. B.**, *Pinças ópticas e aplicações*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2002).
- [28] **Reif, F.**, *Fundamentals of statistical and thermal physics*. Mc Graw-Hill, New York (1965).
- [29] **Faxen, H.**, “The resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers.” *Ann. Phys.* 68 (10), 89–119 (1922).
- [30] **Feitosa, M. I. M. and Mesquita, O. N.**, “Wall-drag effect on difusion of colloidal particles near surfaces - a photon-correlation study.” *Phys. Rev. A* 44 (10), 6677–6685 (1991).
-

- [31] Ghislain, L. P., Switz, N. A., and Webb, W. W., “Measurement of small forces using an optical trap.” *Rev. Sci. Instrum.* 65, 2762–2768 (1994).
- [32] Friese, M. E. J., Rubinsztein-Dunlop, H., Heckenberg, N. R., and Dearden, E. W., “Determination of the force constant of a single-beam gradient trap by measurement of backscattered light.” *Appl. Optics* 35, 7112–7116 (1996).
- [33] Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S., and Spudich, J. A., “Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap.” *Biophys. J.* 70, 1813–1822 (1996).
- [34] Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., and Gelbart, W. M., *Introdução à genética*. Guanabara Koogan, 7th ed. (2002).
- [35] Schrank, A., *Biologia Molecular Básica (Capítulo 2)*. Mercado Aberto, 3rd ed. (2003).
- [36] Watson, J. D. and Crick, F. H. C., “Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid.” *Nature* 171 (4356), 737–738 (1953).
- [37] Watson, J. D. and Crick, F. H. C., “Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid.” *Nature* 171 (4361), 964–967 (1953).
- [38] Mihailovic, A., Vladescu, L., McCauley, M. J., Ly, E., Williams, M. C., Spain, E. M., and Nunez, M. E., “Exploring the interaction of ruthenium(II) polypyridyl complexes with DNA using single-molecule techniques.” *Langmuir* 22 (10), 4699–4709 (2006).
- [39] Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I., and Bloomfield, V. A., “Effect of on on the overstretching transition of double-stranded DNA: Evidence of force-induced DNA melting.” *Biophys. J.* 80 (2), 874–881 (2001).
-

- 
- [40] **Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.**, “Force-induced melting of the DNA double helix - 1. Thermodynamic analysis.” *Biophys. J.* 80 (2), 882–893 (2001).
- [41] **Rouzina, I. and Bloomfield, V. A.**, “Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions.” *Biophys. J.* 80 (2), 894–900 (2001).
- [42] **Strick, T., Allemand, J. F., Bensimon, D., Lavery, R., and Croquette, V.**, “Phase coexistence in a single DNA molecule.” *Physica A* 263 (1-4), 392–404 (1999).
- [43] **Strick, T., Allemand, J. F., Croquette, V., and Bensimon, D.**, “Twisting and stretching single DNA molecules.” *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 74 (1-2), 115–140 (2000).
- [44] **Gore, J., Bryant, Z., Nollmann, M., Le, M. U., Cozzarelli, N. R., and Bustamante, C.**, “DNA overwinds when stretched.” *Nature* 442, 836–839 (2006).
- [45] **Oroszi, L., Galajda, P., Kirei, H., Bottka, S., and Ormos, P.**, “Direct measurement of torque in an optical trap and its application to double-strand DNA.” *Phys. Rev. Lett.* 97 (5), 058301 (2006).
- [46] **Landau, L. D. and Lifshitz, E. M.**, Theory of elasticity. Pergamon Press, Oxford (1986).
- [47] **Bustamante, C., Liphardt, J., and Ritort, F.**, “The nonequilibrium thermodynamics of small systems.” *Phys. Today* 58 (7), 43–48 (2005).
- [48] **Ritort, F.**, “Work fluctuations, second law and free energy recovery methods: perspectives in theory and experiments.” In *Anée Mondiale de la Physique - Seminaire Poincaré*, pp. 193–226 (2005).
- [49] **Bouchiat, C., Wang, M. D., Allemand, J. F., Strick, T., Block, S. M., and Croquette, V.**, “Estimating the persistence length of a Worm-Like Chain molecule from force-extension measurements.” *Biophys. J.* 76 (1), 409–413 (1999).
-

- [50] **Smith, S. B., Cui, Y. J., and Bustamante, C.**, “Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules.” *Science* 271 (5250), 795–799 (1996).
- [51] **McCauley, M. J. and Williams, M. C.**, “Mechanisms of DNA binding determined in optical tweezers experiments.” *Biopolymers* 85 (2), 154–168 (2007).
- [52] **Ritort, F.**, “Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications.” *J. Phys. - Condens. Mat.* 18, R531–R583 (2006).
- [53] **Tessmer, I., Baumann, C. G., Skinner, G. M., Molloy, J. E., Hoggett, J. G., Tendler, S. J. B., and Allen, S.**, “Mode of drug binding to DNA determined by optical tweezers force spectroscopy.” *J. Mod. Optic.* 50 (10), 1627–1636 (2003).
- [54] **Sischka, A., Toensing, K., Eckel, R., Wilking, S. D., Sewald, N., Rios, R., and Anselmetti, D.**, “Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands.” *Biophys. J.* 88 (1), 404–411 (2005).
- [55] **Vladescu, I. D., McCauley, M. J., Nunez, M. E., Rouzina, I., and Williams, M. C.**, “Quantifying force-dependent and zero-force DNA intercalation by single-molecule stretching.” *Nat. Methods* 4 (6), 517–522 (2007).
- [56] **Rocha, M. S., Ferreira, M. C., and Mesquita, O. N.**, “Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules.” *J. Chem. Phys.* 127 (10), Art. No. 105108 (2007).
- [57] **Ferreira, M. C.**, Estudo da transição entrópica do DNA induzida por intercalantes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2007).
- [58] **Chaires, J. B., Dattagupta, N., and Crothers, D. M.**, “Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid - equilibrium binding-studies on interaction of Daunomycin with deoxyribonucleic-acid.” *Biochemistry* 21 (17), 3933–3940 (1982).
-

- [59] Hurley, L. H., "DNA and its associated processes as targets for cancer therapy." *Nature* 2, 188–200 (2002).
- [60] Fritzsche, H., Triebel, H., Chaires, J. B., Dattagupta, N., and Crothers, D. M., "Interaction of anthracycline antibiotics with bio-polymers .6. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic-acid - geometry of intercalation of Iremycin and Daunomycin." *Biochemistry* 21 (17), 3940–3946 (1982).
- [61] Vardevanyan, P. O., Antonyan, A. P., Manukyan, G. A., and Karapetyan, A. T., "Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA." *Exp. Mol. Med.* 33 (4), 205–208 (2001).
- [62] Ussery, D. W., Hoepfner, R. W., and Sinden, R. R., "Probing DNA-structure with Psoralen in vitro." *Method. Enzymol.* 212, 242–262 (1992).
- [63] Rocha, M. S., Viana, N. B., and Mesquita, O. N., "DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment." *J. Chem. Phys.* 121 (19), 9679–9683 (2004).
- [64] Rocha, M. S. and Mesquita, O. N., "Variation of entropic elasticity of DNA-Psoralen complex under UV light." In P. SPIE 5930 (593011), pp. 265–273 (2005).
- [65] McGhee, J. D. and von Hippel, P. H., "Theoretical aspects of DNA-protein interactions - cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice." *J. Mol. Biol.* 86 (2), 469–489 (1974).
- [66] Coury, J. E., McFail-Isom, L., Williams, L. D., and Bottomley, L. A., "A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: Scanning force microscopy." *P. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (22), 12283–12286 (1996).
- [67] Gaugain, B., Barbet, J., Capelle, N., Roques, B. P., and Pecq, J. L., "DNA bifunctional intercalators .2. Fluorescence properties and
-

- DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer.” *Biochemistry* 17 (24), 5078–5088 (1978).
- [68] **Shivashankar, G. V., Stolovitzky, G., and Libchaber, A. J.**, “Backscattering from a tethered bead as a probe of DNA flexibility.” *Appl. Phys. Lett.* 73 (3), 291–293 (1998).
- [69] **Allemand, J. F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A., and Croquette, V.**, “pH-dependent specific binding and combing of DNA.” *Biophys. J.* 73 (4), 2064–2070 (1997).
- [70] **Neto, J. C., Dickman, R., and Mesquita, O. N.**, “Recoiling DNA molecule: simulation and experiment.” *Physica A* 345 (1-2), 173–184 (2005).
- [71] **Vladescu, L., McCauley, M. J., Rouzina, I., and Williams, M. C.**, “Mapping the phase diagram of single DNA molecule force-induced melting in the presence of ethidium.” *Phys. Rev. Lett.* 95, Art. No. 041921 (2005).
- [72] **Arabzadeh, A., Bathaie, S. Z., Farsam, H., Amanlou, M., Saboury, A. A., Shockravi, A., and Moosavi-Movahedi, A. A.**, “Studies on mechanism of 8-metoxypsoralen-DNA interaction in the dark.” *Int. J. Pharm.* 237, 47–55 (2002).
- [73] **Peritz, A. E. and Gasparro, F. P.**, “Psoriasis, PUVA, and skin cancer-molecular epidemiology: The curious question of T → A transversions.” In *J. Invest. Derm. Symp.* P. 4 (1), pp. 11–16 (1999).
- [74] **McNeely, W. and Goa, K. L.**, “5-methoxypsoralen - A review of its effects in psoriasis and vitiligo.” *Drugs* 56 (4), 667–690 (1998).
- [75] **Petrozzi, J. W. and Kligman, A. M.**, “Photochemotherapy of Psoriasis (PUVA) without specialized equipment.” *Arch. Dermatol.* 114 (3), 387–390 (1978).
- [76] **Coven, T. R., Murphy, F. P., Gilleaudeau, P., Cardinale, I., and Krueger, J. G.**, “Trimethylpsoralen bath PUVA is a remittive
-

- treatment for psoriasis vulgaris - Evidence that epidermal immunocytes are direct therapeutic targets." *Arch. Dermatol.* 134 (10), 1263–1268 (1998).
- [77] **Tran, D., Kwok, Y. K., and Goh, C. L.**, "A retrospective review of PUVA therapy at the National Skin Centre of Singapore." *Photodermatol. Photo.* 17 (4), 164–167 (2001).
- [78] **Cimino, G. D., Gamper, H. B., Isaacs, S. T., and Hearst, J. E.**, "Psoralens as photoactive probes of nucleic-acid structure and function - organic-chemistry, photochemistry, and biochemistry." *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1151–1193 (1985).
- [79] **Spielmann, H. P., Dwyer, T. J., Sastry, S. S., Hearst, J. E., and Wemmer, D. E.**, "DNA structural reorganization upon conversion of a psoralen furan-side monoadduct to an interstrand cross-link - implications for DNA-repair." *P. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (6), 2345–2349 (1995).
- [80] **Shi, Y. B. and Hearst, J. E.**, "Wavelength dependence for the photoreactions of DNA-Psoralen monoadducts .1. Photoreversal of monoadducts." *Biochemistry* 26 (13), 3786–3792 (1987).
- [81] **Eichman, B. F., Mooers, B. H. M., Alberti, M., Hearst, J. E., and Ho, P. S.**, "The crystal structures of psoralen cross-linked DNAs: Drug-dependent formation of Holliday junctions." *J. Mol. Biol.* 308 (1), 15–26 (2001).
- [82] **Viola, G., Salvador, A., Vedaldi, D., Fortunato, E., Disaro, S., Basso, G., and Queiroz, M. J. R. P.**, "Induction of apoptosis by photoexcited tetracyclic compounds derivatives of benzo[b]thiophenes and pyridines." *J. Photoch. Photobio. B* 82 (2), 105–116 (2006).
- [83] **Sinden, R. R., Bat, O., and Kramer, P. R.**, "Psoralen cross-linking as probe of torsional tension and topological domain size in vivo." *Methods* 17 (2), 112–124 (1999).
-

- 
- [84] **Via, L. D., Noto, V. D., Gia, O., and Magno, S. M.**, “Photoaddition of thienocoumarin derivatives to DNA: stoichiometry and kinetics of binding.” *J. Photoch. Photobio. B* 79 (1), 59–65 (2005).
- [85] **Viana, N. B., Rocha, M. S., Mesquita, O. N., Mazolli, A., and Neto, P. A. M.**, “Characterization of objective transmittance for optical tweezers.” *Appl. Optics* 45 (18), 4263–4269 (2006).
- [86] **Viana, N. B., Rocha, M. S., and Mesquita, O. N.**, “In situ laser power measurement at the focus of microscope objectives used in optical tweezers.” *Am. J. Phys.* 73 (3), 201–205 (2005).
- [87] **Viana, N. B., Mesquita, O. N., and Mazolli, A.**, “In situ measurement of laser power at the focus of a high numerical aperture objective using a microbolometer.” *Appl. Phys. Lett.* 81 (10), 1765–1767 (2002).
- [88] **Scatchard, G.**, “The attractions of proteins for small molecules and ions.” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (4), 660–672 (1949).
-