

PINÇAS ÓPTICAS E APLICAÇÕES

Nathan Bessa Viana

Março de 2002

PINÇAS ÓPTICAS E APLICAÇÕES

Nathan Bessa Viana

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).

Navegar é preciso...

Agradecimentos

A meus pais, Domingos Macário Bessa e Elza Viana Bessa , pelo apoio incondicional e constante, pelas noites sem dormir, pelas orações, pelo carinho, pela atenção... Enfim, pela vida. Valeu mesmo!

À Erlinda por seu amor, por aquela força (sempre próxima) e pelas viagens de Viçosa (não tão próxima).

A todos lá em casa (irmãos, tios, tias, primos, primas...), não seria possível chegar aqui se vocês não estivessem lá.

Ao Prof. Oscar Nassif de Mesquita, “mateiro experiente”, pela orientação sempre parceira e firme e pela relação de amizade que construímos nesses 8 anos de convivência.

Aos amigos do laboratório: Aline, Bira, Coelho, Custela, Orlando e Rodrigo que além da amizade me fizeram sentir num time campeão.

Aos companheiros do “lama lar”: Kbelo, Steve e Jones pela boa recepção e ótima convivência. Em especial ao Steve pela ajuda com o LATEX.

Aos amigos do departamento de Física, anos e anos caminhando juntos. Foi muito bom e espero que continue sendo.

Ao Prof. Ricardo S. Schor pela resolução do problema do microcalorímetro.

Ao Prof. Vagner E. de Carvalho pelas medidas de condutividade térmica das lamínulas que usamos.

Aos funcionários do departamento de Física, em especial ao Messias que me aturou nos últimos quatro anos com os pedidos, quase diários, por água deionizada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e financiamento de parte deste projeto. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e FINEP-PRONEX pelo financiamento da infraestrutura e manutenção das atividades do laboratório.

Sumário

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 Introdução	1
2 Pinças Ópticas	3
2.1 Pinças Ópticas no Regime de Óptica Geométrica	6
2.1.1 Força Devido a um Raio	9
2.1.2 Força na Microesfera	11
2.2 Pinças Ópticas e Problemas em Biologia	17
3 Movimento Browniano	19
3.1 Equação de Langevin	19
3.2 Teorema da Flutuação-Dissipação para o Movimento Browniano	22
3.3 Movimento Browniano de uma Partícula em um Poço de Potencial Harmônico	28
4 Procedimentos e Técnicas Experimentais	30
4.1 Montagem Experimental	30
4.1.1 Perfil de Retroespalhamento	32
4.2 Intensidade de Luz Retroespalhada e Correlação de Intensidades	33
4.2.1 Perfil Gaussiano de Luz Retroespalhada	34
4.2.2 Perfil Arbitrário de Luz Retroespalhada	37

4.3	Método Diferencial e Método Integral	41
4.3.1	Método Diferencial	42
4.3.2	Método Integral	43
5	Resultados	44
5.1	Método Diferencial	44
5.2	Método Integral	47
6	Aplicações	51
6.1	Atrito Sobre uma Esfera Perto de Uma Parede	51
6.2	Elasticidade Entrópica de uma Molécula de DNA	52
6.3	Microcalorímetro e Teste Parcial de Uma Teoria Sobre Pinçamento Óptico	58
7	Conclusões	66
A	Relação Entre Correlações de Intensidade e Correlações de Posição para um Perfil Gaussiano	67
B	Solução do Problema de Condução de Calor para o Microcalorímetro	70
C	Artigos Submetidos	76

Lista de Figuras

2.1	Raio incidindo em uma esfera de vidro.	4
2.2	Esquema de forças na pinça óptica.	5
2.3	Perfil de intensidades.	7
2.4	Sistema de referência.	8
2.5	Múltiplas reflexões numa esfera.	9
2.6	Parâmetros em função dos quais a força na microesfera é calculada.	12
2.7	Direção da força na pinça óptica.	14
2.8	γ em função de $\Delta x/a$	15
2.9	Posição de equilíbrio em função de $\Delta x/a$	16
2.10	Componente x da força na pinça em função de $\Delta x/a$	17
3.1	Função de correlação $C(s)$	25
3.2	Região de integração de S	26
4.1	Montagem Experimental.	31
4.2	Perfil de retroespalhamento para uma microesfera produzida pela Polyscience, estoque #452308.	34
4.3	<i>Cruzes</i> - Medida semelhante à apresentada na FIG. 4.2 mas com microesferas de outro estoque #500816. <i>Diamantes</i> - Medida feita com o detector de fótons posicionado de modo a maximizar a intensidade do pico lateral esquerdo.	35
4.4	<i>Círculos</i> - Função de correlação normalizada pelo quadrado da intensidade média para uma microesfera na posição $x_0 = 0.3 \mu m$. <i>Quadrados</i> - Mesmo tipo de medida mas com $x_0 \sim 0$	36
4.5	Função de correlação típica normalizada.	42
5.1	Perfil de retroespalhamento típico.	45

5.2	Amplitudes A_x e tempos característico τ_x em função de x_0	46
5.3	$F_P \times F_S$	48
5.4	Perfil gaussiano.	49
5.5	Medida de correlação feita seguindo o procedimento usado no método integral (4.3.2).	50
6.1	γ/γ_0 em função de h	52
6.2	Representação esquemática de uma molécula de DNA.	54
6.3	Possibilidades de situações para microesferas e DNA numa amostra.	56
6.4	Critério para escolha de um conjunto DNA-microesfera.	57
6.5	$I \times x$	58
6.6	$F_x \times x$	59
6.7	Esquema do microcalorímetro.	60
6.8	Imagem da microesfera de Hg e gráfico de níveis de cinza ao longo do diâmetro, em função da distância.	63
6.9	$R \times P_E$	64
6.10	Constante de força da pinça em função da potência local chegando na microesfera.	65
B.1	Esquema para carga puntual q e dois meios dielétricos.	71
B.2	Esquema para carga puntual q e uma esfera metálica descarregada.	71
B.3	Esquema para uma esfera metálica e dois meios dielétricos.	72

Lista de Tabelas

6.1	Valores de índice de refração e condutividade térmica para os materiais usados nesta tese [25].	62
B.1	Valores das cargas imagens e das posições d	73

Resumo

Nesta tese apresentamos um estudo do pinçamento óptico de microesferas de poliestireno de $2.8 \mu m$ de diâmetro. Para isso, utilizamos a técnica de correlação de intensidades para caracterizar o movimento Browniano da microesfera presa no poço de potencial devido à pinça óptica. Mostramos que há dois modos independentes de caracterizar a pinça óptica usando a correlação de intensidades. Um medindo o tempo característico das flutuações Brownianas e o outro medindo a amplitude dessas flutuações. Encontramos equivalência entre os dois. Além disso, mostramos que ambos são consistentes com um terceiro método, o método da Força de Stokes. Como aplicações, apresentamos a medida do coeficiente de atrito sobre a microesfera em função da distância de seu centro de massa à interface vidro-água de nossas amostras. Medimos também o comprimento de persistência de uma molécula de DNA e a relação entre a constante de força da pinça óptica e a potência que chega à microesfera pinçada, medida com o microcalorímetro que desenvolvemos.

Abstract

In this thesis we present a study of optical tweezers made with $2.8\ \mu\text{m}$ diameter microspheres. We use for this the light intensity correlation technique to characterize the Brownian motion of the trapped microsphere. The sphere is in an harmonic energy potential due to the optical trap. There are two independent ways to characterize the tweezer using the correlation technique, one is measuring the characteristic time of the fluctuations and the other the amplitude of those fluctuations. We found good agreement between them. We also show that the two methods are consistent with the Stokes Force method. As application we measure the friction coefficient on the bead as a function of its distance from a surface. We also measure the persistence length of a DNA molecule and the relation between the trap stiffness and the power on the bead, measured using a micro-calorimeter developed in our lab.

Capítulo 1

Introdução

Um cientista é como um mateiro, cujo trabalho é explorar uma floresta sobre a qual pouco se sabe. Seu objetivo é descobrir as maravilhas naturais nela escondidas. Em seu dia-a-dia muitas vezes ele se perde, desvia do que acha ser o caminho certo. Mas isso também faz parte, ele é um explorador. Nesses desvios outras coisas podem ser encontradas, muitas das vezes tão ou mais interessantes do que as que desejava encontrar inicialmente.

Os primeiros trabalhos sobre pinçamento óptico surgiram por volta de 1969, nos laboratórios Bell, USA. O pioneiro, considerado o pai dessa área é Arthur Ashkin. Após resultados preliminares sobre o uso de lasers para prender pequenos objetos ele e colaboradores propuseram que resultado semelhante poderia ser obtido com átomos [1]. Esse passou a ser o principal alvo de seus trabalhos. Contudo, os progressos num laboratório geralmente não acontecem como esperamos. Eles foram levados a tomar um outro caminho: aprimorar a técnica de pinçamento óptico para partículas com diâmetro na faixa de micron e submicron. Nas palavras do próprio Ashkin [2]:

“Although the optical tweezers trap was originally designed as an atom trap and was used in the first optical atom trapping experiment, that experiment did not represent the first use of tweezers. During the atom trapping experiment, at a time of temporary difficulty, it was decided

to try the tweezers trap on simpler Rayleigh dipole particles such as submicron silica spheres.”

Isso possibilitou o desenvolvimento de técnicas de micro-manipulação que, quando aplicadas a objetos biológicos, como por exemplo células, despertaram um enorme interesse, devido à sua relativa simplicidade e grande potencial de aplicação. Uma de suas maiores vantagens é possibilitar a observação de um único objeto, seja ele uma microesfera de sílica ou uma célula.

Além de ser usada para a micro-manipulação, a pinça óptica funciona como sensor de força na escala de pN (10^{-12} *Newton*). Nessa escala de forças está, por exemplo, a força necessária para desenrolar uma molécula de DNA em solução aquosa e à temperatura ambiente. Experimentos de força por extensão da molécula de DNA são usados para obter informações sobre suas propriedades mecânicas [3]. Além disso, esse tipo de experimento pode ser utilizado para estudar interações DNA-Proteína [4], usando a flexibilidade da molécula de DNA como sonda.

Nesta tese apresentamos um estudo do pinçamento óptico visando usá-lo em algumas aplicações. Apesar de já existir muitos trabalhos sobre o assunto, não há ainda na literatura uma teoria completa, de primeiros princípios, sobre ele. Uma proposta nesse sentido foi feita recentemente por Maia Neto e Nussenzveig [5]. Embora, neste trabalho tenhamos feito um primeiro teste quantitativo dessa teoria (Seção 6.3), mais esforços experimentais e talvez teóricos sejam necessários para seu completo entendimento.

No Capítulo 2 discutimos os fundamentos físicos do pinçamento óptico.

No Capítulo 3 apresentamos um estudo do movimento Browniano que, como veremos, é a nossa sonda na caracterização do pinçamento óptico.

No Capítulo 4 descrevemos o aparato e os procedimentos experimentais que desenvolvemos.

No capítulo 5 discutimos os resultados e no Capítulo 6 algumas de suas aplicações.

Finalmente, no Capítulo 7, apresentamos as conclusões do trabalho.

Capítulo 2

Pinças Ópticas

Em 1873, James Clerck Maxwell, em sua teoria sobre o eletromagnetismo, previu que se uma onda luminosa de energia E no vácuo, incidisse em um meio, ela transferiria momento p para esse meio:

$$p = \frac{E}{c}, \quad (2.1)$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo. A força que a luz exerce sobre o meio é denominada pressão de radiação. Ela depende da potência Pot da onda luminosa e pode ser escrita como:

$$F_R = \frac{Pot}{c}. \quad (2.2)$$

Para termos uma idéia da ordem de grandeza dessa força, consideremos, por simplicidade, óptica geométrica e uma situação na qual um raio de luz incide em uma esfera de vidro suspensa em água. Podemos desconsiderar a ação do raio refletido porque comparado ao coeficiente de transmissão o coeficiente de reflexão água-vidro é muito pequeno. Ao refratar na esfera, o raio sofre um desvio. Para haver conservação do momento do conjunto aparece uma força \vec{F}_R na esfera, como indicado na FIG. 2.1. O módulo de \vec{F}_R pode ser escrito como:

$$F_R(\alpha) = 2n_H \frac{Pot}{c} \text{sen}(\alpha - \beta), \quad (2.3)$$

com

$$n_H \text{sen}\alpha = n_v \text{sen}\beta, \quad (2.4)$$

onde n_H e n_v são os índices de refração da luz na água e no vidro, respectivamente. Para $n_H = 1.33$, $n_v = 1.50$, $\alpha = 45^\circ$ e $Pot = 1 \text{ mW}$, por exemplo, $F_R = 0.95 \text{ pN}$.

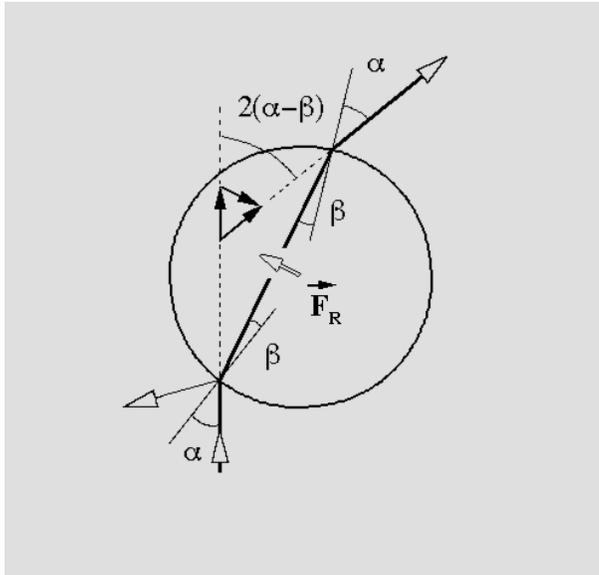


Figura 2.1: Raio incidindo em uma esfera de vidro.

Quando a esfera é bem iluminada, vários raios contribuem com parcelas $F_R(\alpha)$, originando nela uma resultante de forças dada pela soma vetorial dessas contribuições.

O pioneiro no estudo dos efeitos da pressão de radiação da luz sobre pequenos objetos foi Ashkin [2]. Em 1969 [1], a partir de uma análise da ordem de grandeza da força devido à pressão de radiação em uma microesfera (raio \sim comprimento de onda da luz visível), Ashkin e colaboradores propuseram um experimento para visualizar o movimento da microesfera sob a ação dessa força.

O experimento consistia em incidir sobre uma amostra feita com microesferas de poliestireno em solução de água, um laser suavemente focalizado, operando no modo TEM_{00} e estudar a ação do laser sobre as microesferas medindo as velocidades das mesmas.

Eles mediram velocidades próximas das velocidades estimadas, no entanto, observaram outro fenômeno que não haviam previsto. As esferas eram guiadas para a região central do feixe de laser onde no modo TEM_{00} a intensidade é maior e moviam segundo sua direção de propagação.

O surgimento do que hoje conhecemos por pinça óptica aconteceu quando o laser, nesse experimento, foi fortemente focalizado com uma lente. Nessa situação,

eles observaram que as microesferas ficavam presas numa região próxima ao foco dessa lente.

O confinamento numa pinça óptica pode ser entendido usando novamente óptica geométrica e o esquema de forças mostrado na FIG 2.2. Consideremos o

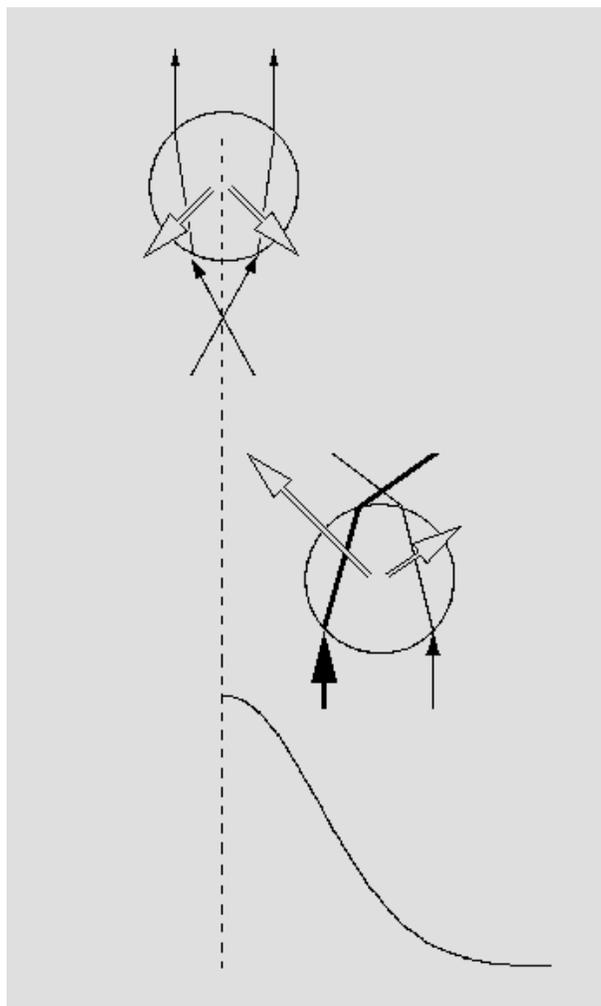


Figura 2.2: Esquema de forças na pinça óptica.

raio que incide à direita da esfera inferior. Para haver conservação do momento do sistema raio-esfera, a esfera sofre ação de uma força no sentido apontado pela seta clara menor na FIG.2.2. A mesma análise é feita com o raio incidindo à esquerda

da esfera inferior. Como o raio da esquerda é mais intenso que o da direita, a componente de força que aparece na esfera devido à ação desse raio é maior. Assim, a resultante de forças sobre a esfera faz com que ela mova em direção ao centro do feixe de laser e para cima. Após passar pela região do foco da lente, usando a mesma argumentação anterior, a força exercida sobre a microesfera é representada pelas setas claras na esfera superior. Ou seja, após passar pelo foco, a microesfera fica presa, próxima a ele.

Essa análise simplificada é útil por facilitar a compreensão do fenômeno do pinçamento óptico. No entanto, para um tratamento quantitativo adequado, mesmo no limite de óptica geométrica [6] devem ser considerados fatos como múltiplas reflexões dentro da esfera e variação dos coeficientes de reflexão e transmissão do feixe com o ângulo de incidência na mesma.

2.1 Pinças Ópticas no Regime de Óptica Geométrica

Para estabelecermos as condições necessárias para acontecer o aprisionamento óptico de micro-partículas consideraremos como a potência de luz na entrada de uma objetiva é levada a um ponto próximo à sua região focal onde as partículas a serem capturadas se encontram. Precisamos determinar a força que o feixe de luz faz numa dessas partículas [7].

Medimos a intensidade de luz na entrada da objetiva (FIG. 2.3).

Esse perfil de intensidades possui simetria radial e o representamos por:

$$I(r) = I_0 e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2}}. \quad (2.5)$$

A potência chegando a um elemento de área $dA = r dr d\phi$ da objetiva é:

$$dP = I_0 e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2}} dA. \quad (2.6)$$

Na FIG. 2.4 mostramos um esquema do sistema de referência que adotamos. Consideramos o feixe propagando ao longo de $-\hat{k}$.

A potência total do feixe que entra na objetiva é:

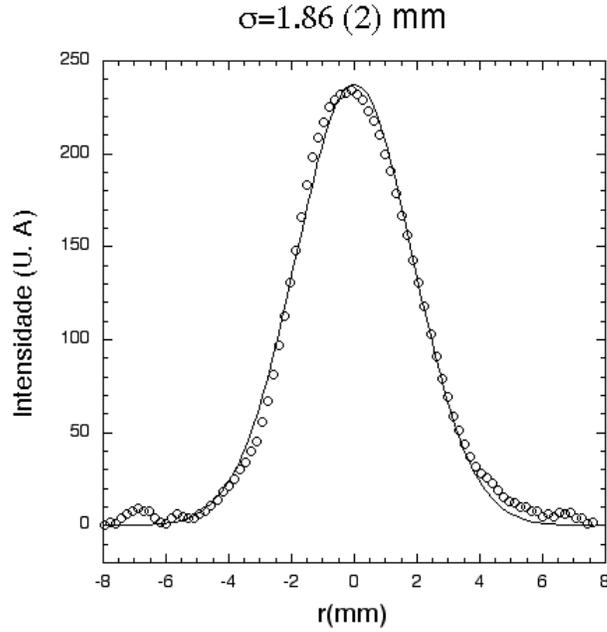


Figura 2.3: Perfil de intensidades.

$$P_{tot} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} I_0 e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2}} dA. \quad (2.7)$$

Em termos da potência do feixe temos:

$$I_0 = \frac{P_{tot}}{2\pi\sigma^2}, \quad (2.8)$$

assim:

$$dP = \frac{P_{tot}}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2}} dA. \quad (2.9)$$

Para a objetiva vale a condição seno de Abbe [5], que estabelece:

$$r = f \text{sen}\theta, \quad (2.10)$$

onde f é a distância focal da objetiva. A distância focal da objetiva é obtida a partir das relações:

$$n_v \text{sen}\theta_M = NA, \quad (2.11)$$

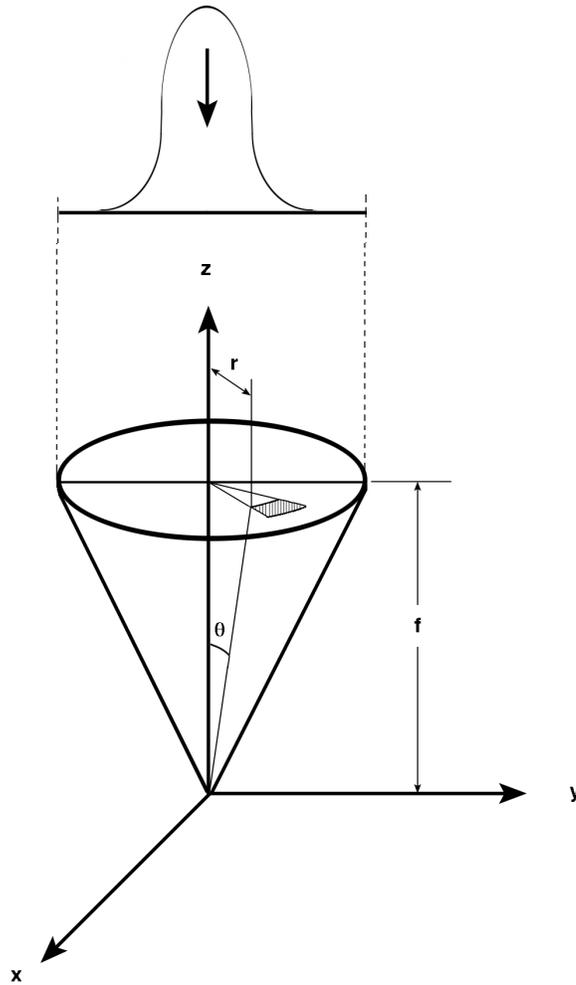


Figura 2.4: Sistema de referência.

$$R = f \text{sen} \theta_M, \quad (2.12)$$

onde R é o raio da abertura máxima da objetiva, n_v é o índice de refração da luz no vidro e NA a abertura numérica da objetiva. Para o microscópio que usamos $R = 0.5 \text{ cm}$ e $NA = 1.4$. Em termos desses parâmetros podemos escrever:

$$f = \frac{R}{NA} n_v. \quad (2.13)$$

Assim, para as condições de nosso experimento $f = 0.536 \text{ cm}$.

Usando a condição seno de Abbe escrevemos a potência que chega no elemento

Consideramos também que o centro da esfera está no plano $x' = 0$.

Temos:

$$\frac{\Delta p_{z'}^f}{\Delta t} = -\frac{\Delta p_{z'}^b}{\Delta t}, \quad (2.15)$$

ou:

$$F_{z'}^b = -\frac{\Delta p_{z'}^f}{\Delta t} = \frac{p_{z'}^{fi} - p_{z'}^{ff}}{\Delta t}, \quad (2.16)$$

onde $\Delta p_{z'}^f$ é a variação de momento ao longo do eixo z' , sofrida pelo raio; $\Delta p_{z'}^b$ é a variação de momento sofrida pela esfera; $p_{z'}^{fi}$ é o momento do raio quando ele entra na esfera e $p_{z'}^{ff}$ é o momento do raio após passar pela esfera.

Temos:

$$p_{z'}^{fi} = \frac{n_H E}{c}, \quad (2.17)$$

onde E é a energia do raio. Temos também que:

$$p_{z'}^{ff} = \frac{n_H E}{c} \{R \cos(\pi + 2\alpha) + T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \cos(\varphi + n\zeta)\}. \quad (2.18)$$

Assim, podemos escrever:

$$F_{z'}^b = \frac{n_H E}{c \Delta t} \{1 + [R \cos(2\alpha) - T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \cos(\varphi + n\zeta)]\},$$

$$F_{z'}^b = \frac{n_H P_{tot}}{c} \{1 + [R \cos(2\alpha) - T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \cos(\varphi + n\zeta)]\}. \quad (2.19)$$

Do mesmo modo:

$$\frac{\Delta p_{y'}^f}{\Delta t} = -\frac{\Delta p_{y'}^b}{\Delta t}, \quad (2.20)$$

ou:

$$F_{y'}^b = -\frac{\Delta p_{y'}^f}{\Delta t} = \frac{p_{y'}^{fi} - p_{y'}^{ff}}{\Delta t}. \quad (2.21)$$

Temos:

$$p_{y'}^{fi} = 0, \quad (2.22)$$

e

$$p_{y'}^{ff} = \frac{n_H E}{c} \{R \sin(\pi + 2\alpha) + T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \sin(\varphi + n\zeta)\}. \quad (2.23)$$

Assim, podemos escrever:

$$F_{y'}^b = \frac{n_H E}{c \Delta t} \left\{ -R \sin(\pi + 2\alpha) - T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \sin(\varphi + n\zeta) \right\},$$

$$F_{y'}^b = \frac{n_H P_{tot}}{c} \left\{ R \sin(2\alpha) - T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \sin(\varphi + n\zeta) \right\}. \quad (2.24)$$

Definindo:

$$F_{tot} = F_{z'}^b + i F_{y'}^b, \quad (2.25)$$

temos:

$$F_{tot} = \frac{n_H P_{tot}}{c} \left\{ 1 + R e^{2\alpha i} - T^2 e^{i\varphi} \sum_{n=0}^{\infty} (R e^{i\zeta})^n \right\}. \quad (2.26)$$

A soma na Eq. (2.26) é a soma de uma série geométrica e pode ser escrita como:

$$\sum_{n=0}^{\infty} (R e^{i\zeta})^n = \frac{1}{1 - R e^{i\zeta}}. \quad (2.27)$$

Assim:

$$F_{tot} = \frac{n_H P_{tot}}{c} \left\{ 1 + R e^{2\alpha i} - T^2 \frac{e^{i\varphi}}{1 - R e^{i\zeta}} \right\}. \quad (2.28)$$

Definindo Q_{tot} por:

$$F_{tot} = \frac{n_H P_{tot}}{c} Q_{tot}, \quad (2.29)$$

e usando as relações:

$$\varphi = 2(\alpha - \beta) \quad (2.30)$$

e

$$\zeta = \pi - 2\beta, \quad (2.31)$$

escrevemos finalmente:

$$Q_{tot} = \left\{ 1 + R e^{2\alpha i} - T^2 \frac{e^{2i(\alpha-\beta)}}{1 + R e^{-2\beta i}} \right\}. \quad (2.32)$$

2.1.2 Força na Microesfera

Os coeficientes de reflexão R e transmissão T dependem do ângulo de incidência α e do ângulo de refração β . Dependem também do tipo de incidência do raio na esfera, TE ou TM. Fazendo uma média para os dois casos teremos:

$$R(\alpha, \beta) = \frac{1}{2} \left[\frac{\sin(\alpha - \beta)}{\sin(\alpha + \beta)} \right]^2 + \frac{1}{2} \left[\frac{\tan(\alpha - \beta)}{\tan(\alpha + \beta)} \right]^2 \quad (2.33)$$

e:

$$T(\alpha, \beta) = 1 - R(\alpha, \beta). \quad (2.34)$$

Considerando que o índice de refração da microesfera é n_p e o do meio no qual ela está imersa é n_H escrevemos a lei de Snell:

$$n_H \text{sen} \alpha = n_p \text{sen} \beta. \quad (2.35)$$

Precisamos agora escolher os parâmetros em função dos quais calcularemos a força total sobre a microesfera.

Consideremos como indicado na FIG. 2.6 que a microesfera se encontra com o centro no plano $y = 0$, mas com o centro deslocado da origem, na posição \vec{r} .

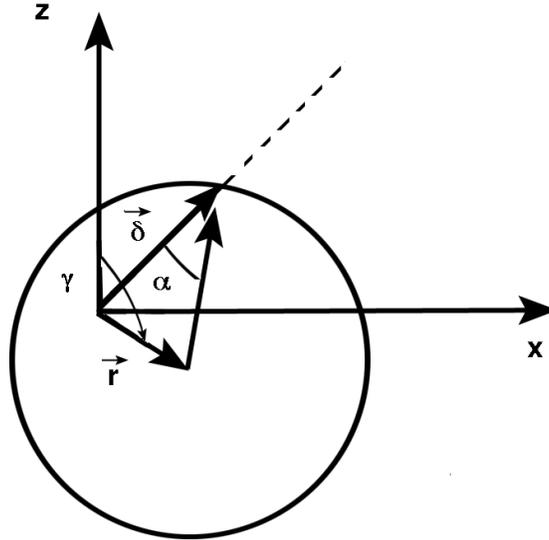


Figura 2.6: Parâmetros em função dos quais a força na microesfera é calculada.

Nesta figura, $\vec{\delta}$ é um vetor que indica a direção de incidência do raio no sistema de coordenadas da FIG. 2.4.

Definindo:

$$|\vec{\delta}| = d, \quad (2.36)$$

temos:

$$\vec{\delta} = (d \sin \theta \cos \phi, d \sin \theta \sin \phi, d \cos \theta) \quad (2.37)$$

e:

$$\vec{r} = (r \sin \gamma, 0, r \cos \gamma). \quad (2.38)$$

Podemos escrever d em função de r , γ , θ e ϕ usando a condição:

$$|\vec{\delta} - \vec{r}| = a, \quad (2.39)$$

onde a é o raio da esfera. Obtemos:

$$d^2 + r^2 - 2rd(\sin \gamma \sin \theta \cos \phi + \cos \gamma \cos \theta) = a^2. \quad (2.40)$$

Resolvendo a Eq. 2.40 para d :

$$d(r, \gamma, \theta, \phi) = [a^2 - r^2 + r^2(\sin \gamma \sin \theta \cos \phi + \cos \gamma \cos \theta)^2]^{\frac{1}{2}} + r(\sin \gamma \sin \theta \cos \phi + \cos \gamma \cos \theta). \quad (2.41)$$

Podemos também escrever α em função de r , γ , θ e ϕ . Usando a FIG. 2.6 vemos que:

$$r^2 = d^2 + a^2 - 2ad \cos \alpha, \quad (2.42)$$

de onde tiramos que:

$$\alpha = \arccos\left\{\frac{d(r, \gamma, \theta, \phi)^2 + a^2 - r^2}{2ad(r, \gamma, \theta, \phi)}\right\}. \quad (2.43)$$

E, tendo α temos β usando a Eq. (2.35).

Precisamos, finalmente, considerar a direção da força F_{tot} no sistema de referência da FIG. 2.4.

Observando a FIG. 2.7 vemos que $\hat{y}' \perp \hat{z}'$ e \hat{y}' está no plano p . Assim, $\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')$ tem a direção e o sentido de \hat{y}' . Temos então que:

$$\vec{F} = Re(F_{tot})\hat{z}' + Im(F_{tot})\hat{y}', \quad (2.44)$$

com:

$$\hat{z}' = (-\sin \theta \cos \phi, -\sin \theta \sin \phi, -\cos \theta) \quad (2.45)$$

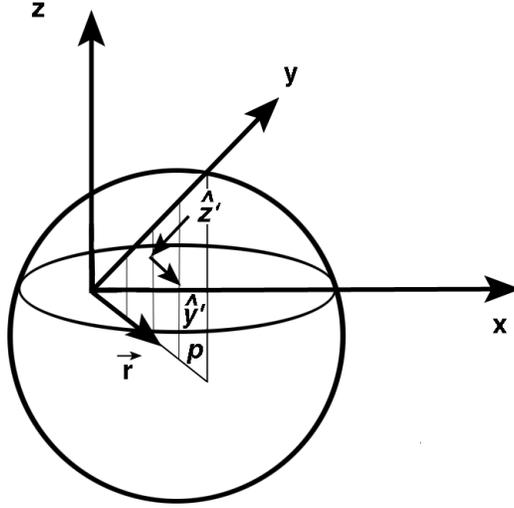


Figura 2.7: Direção da força na pinça óptica.

e

$$\hat{y}' = \frac{\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')}{|\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')|}. \quad (2.46)$$

Assim, para o cálculo da força em função de r e γ , temos:

$$\vec{dF} = \frac{n_H}{c} dP \{ \text{Re}(Q_{tot}) \hat{z}' + \text{Im}(Q_{tot}) \hat{y}' \} \quad (2.47)$$

e

$$\vec{F} = \int_{\substack{\theta \leq \theta_{max} \\ 0 \leq \phi \leq 2\pi}} \vec{dF}. \quad (2.48)$$

Sendo que dP é dado pela Eq. (2.14).

Na Eq. (2.48) θ_{max} é o ângulo limite para a interface vidro-água das amostras que usamos, $\theta_{max} = 62.5^\circ$.

Fizemos o cálculo da força numericamente usando um programa feito no MATHCAD.

Para um dado valor de r , ou seja, para um dado valor da distância entre o centro da microesfera e o foco geométrico da objetiva, calculamos a componente z da força na microesfera, em função do ângulo γ . Para que a microesfera fique presa, é necessário que essa componente de força seja nula. Nesta situação temos a condição de equilíbrio da microesfera na pinça óptica. Usando os parâmetros de nosso microscópio e considerando $P_{tot} = 6 \text{ mW}$ encontramos o ângulo de equilíbrio

$\gamma = 180^\circ$ e o valor da distância do centro da microesfera ao foco geométrico da lente nessa situação $r_e = -0.438a$, onde $a = 1.4 \mu m$.

Quando a microesfera é submetida a uma força externa no plano xy que a afasta do foco geométrico da lente aparece nela uma força restauradora F_x devido à pinça óptica. A força externa pode ser, por exemplo, a força de Stokes na microesfera quando o líquido da solução se move com velocidade v . Assim, uma nova condição de equilíbrio é estabelecida ao sistema, na qual a componente x da força da pinça é igual à força externa aplicada, mas tem sentido contrário e o ângulo de equilíbrio é menor que 180° . Na FIG. 2.8 mostramos os valores encontrados para o ângulo γ em função da componente x da distância r do centro da microesfera ao foco geométrico da objetiva, $\Delta x = r \text{sen} \gamma$.

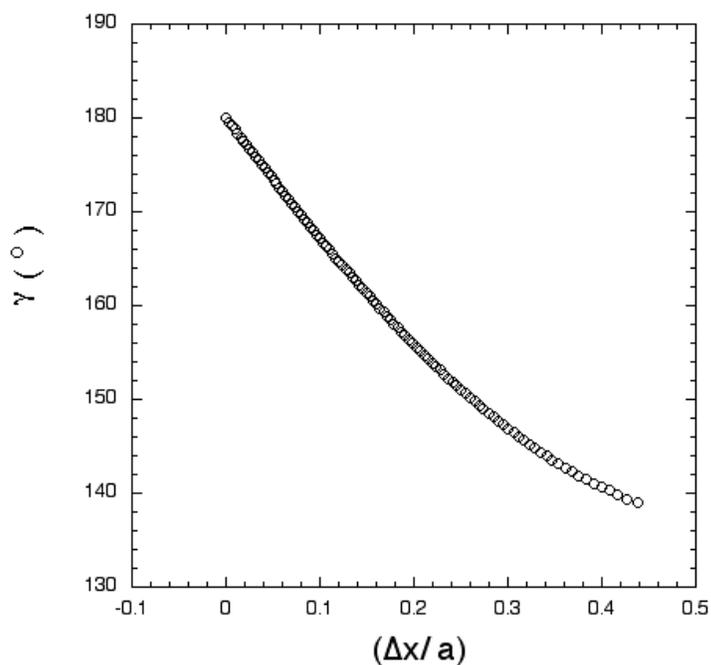


Figura 2.8: γ em função de $\Delta x/a$.

Como resultado desse cálculo obtemos também como variam a posição de equilíbrio (FIG. 2.9) e a componente x da força da pinça (FIG. 2.10) em função de

$\Delta x/a$.

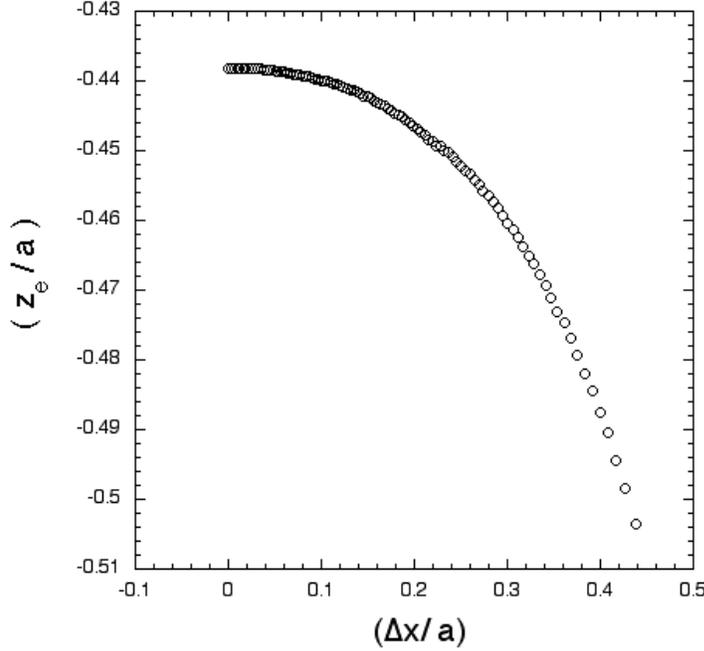


Figura 2.9: Posição de equilíbrio em função de $\Delta x/a$.

Na FIG. 2.10 apresentamos a componente x da força em função de $\Delta x/a$ porque em termos dessa variável a inclinação no gráfico de força corresponde à constante de força k_x da pinça óptica que, como veremos, é o parâmetro que a caracteriza e que medimos em nossos experimentos.

Para $P_{tot} = 6 \text{ mW}$ encontramos $k = 5.65 \text{ mdyn/cm}$. Considerando que a potência efetiva P chegando na amostra é devida a feixes que saem da objetiva com ângulos menores que θ_{max} temos $P = 5.77 \text{ mW}$, com isso $k/P = 0.98 \text{ dyn/cmW}$.

Recentemente, Maia Neto e Nussenzveig [5] resolveram esse problema de forma geral, usando teoria de espalhamento Mie em seus cálculos. Seus resultados se aplicam a esferas de qualquer diâmetro e podem vir a ser uma importante ferramenta no estudo e calibração de forças em pinças ópticas. No entanto, o detalhamento deste tratamento teórico não está nos objetivos desta tese.

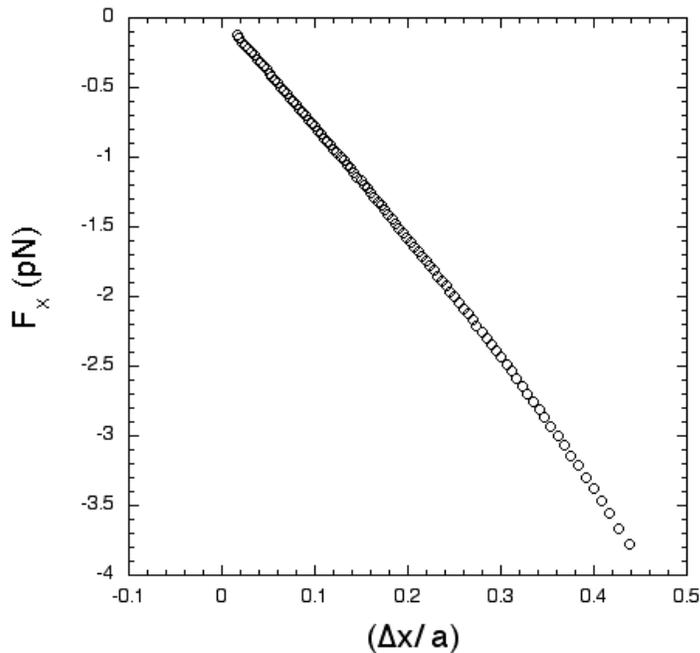


Figura 2.10: Componente x da força na pinça em função de $\Delta x/a$.

2.2 Pinças Ópticas e Problemas em Biologia

Em 1987 [8], um experimento com o vírus do mosaico do tabaco [9] revelou o que se tornaria uma das mais importantes utilidades da pinça óptica. Este vírus é constituído basicamente pelo seu RNA viral e uma capa proteica. Essa capa se orienta facilmente na pinça óptica. Nesse trabalho estavam tendo problemas com as medidas de espalhamento de luz e suspeitavam de contaminação bacteriana das amostras. Montaram então a pinça num microscópio óptico e confirmaram suas suspeitas. Além disso, perceberam que as bactérias também eram pinçadas e logo após morriam. O que fizeram então foi mudar o laser de argônio que usavam ($0.515 \mu m$) para um laser infravermelho de ítrio-alumínio ($1.06 \mu m$). Perceberam com essa mudança uma enorme diferença. Eles conseguiram aprisionar e isolar, por horas, a bactéria *E. Coli* [9], uma bactéria que vive no intestino humano. Também conseguiram observar reprodução celular em células presas na pinça. O resultado

foi que, com isso, haviam desenvolvido uma técnica para manipulação de células, *in vivo*. Desde então, a técnica tem sido utilizada no estudo de vários problemas biológicos.

Como as forças envolvidas no pinçamento óptico são da ordem de pN , mesma magnitude da força necessária para esticar ou dobrar macromoléculas como DNA e RNA, a pinça pode ser usada como sensor de força para o estudo das propriedades mecânicas dessas moléculas. Além disso, é possível com essa técnica, estudar uma única molécula, o que possibilitou o aparecimento de uma gama enorme de novos experimentos.

Capítulo 3

Movimento Browniano

Em 1828, ao estudar pólenes de diferentes plantas, o botânico Robert Brown [10] descreveu pela primeira vez o fenômeno que hoje conhecemos como movimento Browniano.

Ele observou que o pólen, quando colocado em água, dividia-se em pequenas partículas que passavam então a ter um movimento errático e ininterrupto.

No decorrer dos anos, várias hipóteses para o que causaria o movimento Browniano apareceram: forças elétricas e interações entre as partículas de pólen foram algumas delas. O primeiro a sugerir que ele teria como origem os choques entre as moléculas do líquido e a partícula foi Delsaux [11], em 1877.

Em 1905, Einstein resolveu o problema em um de seus mais conhecidos artigos. A idéia de Delsaux estava correta. As flutuações de posição de uma partícula se deviam a flutuações térmicas do líquido que se manifestavam através dos choques das moléculas do líquido com a partícula.

Há outros fenômenos similares ao movimento Browniano, como por exemplo as flutuações de corrente num resistor elétrico. O esclarecimento de suas origens abriu as portas para a compreensão desses outros fenômenos. Em 1951 [12] eles foram englobados de uma forma elegante e geral no Teorema da Flutuação-Dissipação.

3.1 Equação de Langevin

Por simplicidade, na descrição que segue, trataremos o problema em uma dimensão [13].

Consideremos uma partícula de massa m , cuja posição do centro de massa é $x(t)$, no instante de tempo t e a velocidade correspondente, $v \equiv dx/dt$. Consideremos também que essa partícula está imersa em um líquido cuja temperatura absoluta é T .

Seria muito complicado descrever todas as interações entre a partícula e o líquido, uma vez que para cada molécula do líquido considerada um novo grau de liberdade seria adicionado ao sistema. Ao invés de uma descrição detalhada podemos considerar o líquido um reservatório de calor, cujas interações com a partícula podem ser substituídas por uma força efetiva que denominaremos $F(t)$. Além disso, a partícula pode interagir com sistemas externos, como campo gravitacional e campos eletromagnéticos, através de uma força F_{ext} . Podemos, assim, escrever a segunda lei de Newton para o movimento da partícula:

$$m \frac{dv}{dt} = F_{ext} + F(t). \quad (3.1)$$

Como a força efetiva $F(t)$ representa as interações do líquido com a partícula, ela deve depender das posições de muitos átomos que estão em constante movimento. $F(t)$ deve flutuar rapidamente no tempo e de forma irregular. Essa dependência, no entanto, não pode ser explicitada e o problema tem que ser tratado estatisticamente.

Definimos por *ensemble* um conjunto de sistemas igualmente preparados, consistindo cada um deles de uma partícula e do meio que a envolve. Definimos a média no *ensemble*, de uma grandeza, por exemplo F , no instante de tempo t , por:

$$\bar{F}(t) \equiv \langle F(t) \rangle \equiv \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N F^{(i)}(t), \quad (3.2)$$

onde a soma é feita sobre todos os sistemas do *ensemble*.

Sobre F podemos dizer que sua taxa de variação é caracterizada por um intervalo de tempo característico ξ^* , denominado tempo de correlação. Esse intervalo corresponde ao tempo médio entre sucessivos máximos ou mínimos da função $F(t)$. ξ^* é um intervalo de tempo muito pequeno. Grosseiramente falando, ele é da ordem da separação média entre as moléculas dividida pela velocidade média das moléculas do líquido. Para líquidos comuns esse número é cerca de 10^{-13} s. Além disso, se estamos tratando de situações em que não há direção preferencial no espaço para o movimento da partícula, F deve ser tantas vezes positiva quanto negativa, num

intervalo de tempo suficientemente grande comparado a ξ^* . Nesse caso, a média de F é nula e F é denominada uma variável estacionária.

De acordo com a Eq. (3.1), a função $v(t)$ também deve flutuar no tempo. v pode ser decomposta em duas partes, uma de variação lenta e outra de variação rápida:

$$v = \bar{v} + v', \quad (3.3)$$

onde v' representa a variação rápida.

Integrando a Eq. (3.1) no intervalo de tempo entre t e $t + \xi$, com ξ macroscopicamente muito pequeno mas microscopicamente muito grande, de modo que $\xi \gg \xi^*$:

$$m[v(t + \xi) - v(t)] = F_{ext}(t)\xi + \int_t^{t+\xi} F(t')dt', \quad (3.4)$$

onde assumimos que a força externa, F_{ext} , também possui variação lenta no tempo.

Devido ao caráter aleatório de F , a integral da Eq. (3.4) é muito pequena. Baseados nessa informação, esperaríamos que a parte de v que possui variação lenta não dependesse dessa integral, assumindo que:

$$m \frac{d\bar{v}}{dt} = F_{ext}. \quad (3.5)$$

Mas essa relação não descreve a situação física real. Para a força externa nula, $F_{ext} = 0$, a situação de equilíbrio para a partícula é $\bar{v} = 0$. A interação, F , com o meio, deve ser tal que levará a partícula para o equilíbrio se $v \neq 0$. A Eq. (3.5) não nos permite concluir isso. O erro está em não considerar a dependência de F com o movimento da partícula.

F também pode ser decomposta em duas partes:

$$F = \bar{F} + F'. \quad (3.6)$$

A parcela \bar{F} , de variação lenta, é a responsável por levar a partícula de volta ao equilíbrio. \bar{F} deve ser uma função de \bar{v} satisfazendo à condição $\bar{F}(\bar{v}) = 0$ quando $\bar{v} = 0$. Expandindo \bar{F} em série de potências de \bar{v} , o primeiro termo não nulo satisfazendo à condição acima é o linear. E, desde que o intervalo de tempo ξ não seja muito grande, podemos escrever:

$$\bar{F} = -\gamma\bar{v}, \quad (3.7)$$

onde γ é uma constante positiva, denominada coeficiente de fricção ou atrito da partícula em relação ao meio no qual está imersa. O sinal negativo na Eq. (3.7) mostra que \bar{F} atua no sentido de levar a partícula de volta ao equilíbrio, $\bar{v} = 0$.

Nossa argumentação não nos permite determinar o valor de γ . É possível, no entanto, expressá-lo em termos de F . Essa relação é conhecida como Teorema da Flutuação-Dissipação para o movimento Browniano.

Usando a Eq. (3.7), podemos escrever para a parte de variação lenta da velocidade da partícula:

$$m \frac{d\bar{v}}{dt} = F_{ext} + \bar{F} = F_{ext} - \gamma\bar{v}. \quad (3.8)$$

Ao incluirmos as partes de variação rápida de v e F , teremos:

$$m \frac{dv}{dt} = F_{ext} - \gamma v + F'(t), \quad (3.9)$$

onde fizemos $\gamma\bar{v} \approx \gamma v$. Isso porque, como a massa da partícula é muito maior que a massa de líquido que interage efetivamente com ela, para produzir uma pequena variação $\gamma v'$ deve haver uma enorme variação em F' . F' é o termo dominante na escala de tempo das flutuações rápidas. A Eq. (3.9) é conhecida como a equação de Langevin para o movimento Browniano.

3.2 Teorema da Flutuação-Dissipação para o Movimento Browniano

Consideremos novamente um intervalo de tempo ξ que é macroscopicamente muito pequeno mas microscopicamente muito grande, de modo que $\xi \gg \xi^*$. Assumindo que F_{ext} varia pouco no intervalo de tempo ξ , desejamos encontrar uma relação entre o coeficiente de atrito, γ , e a força estocástica F .

Realizando a média em um *ensemble* de sistemas sobre as variáveis dos dois membros da Eq. (3.4) chegamos a:

$$m \langle v(t + \xi) - v(t) \rangle = F_{ext}(t)\xi + \int_t^{t+\xi} \langle F(t') \rangle dt'. \quad (3.10)$$

Para continuarmos nossa análise precisamos encontrar uma expressão para $\langle F(t') \rangle$. Consideremos que a partícula seja um sistema, P , imerso em um reservatório de calor, R , com temperatura absoluta T . Denominaremos por ζ os possíveis estados

de P , para os quais a partícula tem velocidade v . Nesses estados a força F assume o valor F_ζ .

Suponhamos que num instante arbitrário, t , a partícula tenha velocidade $v(t)$. Numa primeira aproximação podemos assumir que P está em equilíbrio com R , onde $\langle F \rangle = 0$. Nessa situação definiremos a probabilidade de P estar no estado ζ como $W_\zeta^{(0)}$. Nosso próximo passo é considerar uma situação um pouco adiante no tempo, num instante $t' = t + \xi'$, quando a partícula tem velocidade $v = v(t + \xi')$. Seu movimento perturba o equilíbrio interno do meio à sua volta, mas após um intervalo de tempo ξ^* o equilíbrio é restaurado nas novas condições, para as quais $v = v(t + \xi')$.

Suponhamos que no intervalo de tempo ξ' , com $\xi \gg \xi' \gg \xi^*$, a velocidade da partícula mude de $\Delta v(\xi')$. Com essa mudança, a energia do reservatório R muda de E' para $E' + \Delta E'(\xi')$ e o número de estados acessíveis ao reservatório muda de $\Omega(E')$ para $\Omega(E' + \Delta E')$. A probabilidade de ocorrência de um determinado estado ζ de P é proporcional ao número de estados acessíveis a R :

$$W_\zeta = \text{Const} \Omega(E'). \quad (3.11)$$

Denotando a probabilidade de ocorrência do estado em $t' = t + \xi'$ por $W_\zeta(t + \xi')$ teremos que:

$$\frac{W_\zeta(t + \xi')}{W_\zeta^{(0)}} = \frac{\Omega(E' + \Delta E')}{\Omega(E')}. \quad (3.12)$$

Usando a relação de Boltzman:

$$S(E) = k_B \ln \Omega(E), \quad (3.13)$$

a relação termodinâmica:

$$\frac{1}{T} = \frac{dS}{dE} \quad (3.14)$$

e a definição:

$$\beta = \frac{1}{k_B T}, \quad (3.15)$$

podemos escrever:

$$W_\zeta(t + \xi') = W_\zeta^{(0)} e^{\beta \Delta E'}. \quad (3.16)$$

Como a variação $\Delta E'$ pode ser considerada pequena, teremos:

$$W_\zeta(t + \xi') = W_\zeta^{(0)} (1 + \beta \Delta E'). \quad (3.17)$$

O valor médio da força F , no instante $t + \xi'$ pode então ser calculado:

$$\begin{aligned}\langle F \rangle &= \sum_{\zeta} W_{\zeta}(t + \xi') F_{\zeta}, \\ \langle F \rangle &= \sum_{\zeta} W_{\zeta}^{(0)}(1 + \beta \Delta E') F_{\zeta}, \\ \langle F \rangle &= \langle (1 + \beta \Delta E') F \rangle_0.\end{aligned}\tag{3.18}$$

No último passo o símbolo $\langle \rangle_0$ significa fazer uma média usando a distribuição de probabilidades de equilíbrio, $W_{\zeta}^{(0)}$.

Como $\langle F \rangle_0 = 0$:

$$\langle F \rangle = \beta \langle F \Delta E' \rangle_0.\tag{3.19}$$

Para utilizarmos a Eq. (3.19) na Eq. (3.10), vamos primeiramente escrevê-la em termos das variáveis usadas para descrever a partícula P . O aumento de energia do reservatório no intervalo $t' - t$ é dado por:

$$\Delta E' = - \int_t^{t'} v(t'') F(t'') dt'',\tag{3.20}$$

que corresponde a menos o valor do trabalho realizado pela força F sobre a partícula. Como a velocidade v varia pouco no intervalo de tempo ξ' , podemos escrever:

$$\Delta E' = -v(t) \int_t^{t'} F(t'') dt''.\tag{3.21}$$

Assim, usando a Eq. (3.19):

$$\begin{aligned}\langle F(t') \rangle &= -\beta \langle F(t') v(t) \int_t^{t'} F(t'') dt'' \rangle_0 \\ \langle F(t') \rangle &= -\beta \bar{v}(t) \int_t^{t'} \langle F(t') F(t'') \rangle_0 dt'',\end{aligned}\tag{3.22}$$

onde a média de v foi realizada separadamente da média de F , pois sua variação é muito menor que a de F no intervalo de tempo em questão.

É conveniente escrever a Eq. (3.22) em termos da variável s , definida por:

$$s \equiv t'' - t'.\tag{3.23}$$

Usando a definição acima a Eq. (3.10) pode ser reescrita como:

$$m\langle v(t + \xi) - v(t) \rangle = F_{ext}\xi - \beta\bar{v}(t) \int_t^{t+\xi} dt' \int_{t-t'}^0 ds \langle F(t')F(t' + s) \rangle_0. \quad (3.24)$$

Definimos a função de correlação, C , da variável F por:

$$C(s) = \langle F(t')F(t'') \rangle_0 = \langle F(t')F(t' + s) \rangle_0. \quad (3.25)$$

A função de correlação $C(s)$ possui as seguintes propriedades:

$$C(0) = \langle F^2 \rangle > 0, \quad (3.26)$$

se $\langle F \rangle = 0$:

$$\lim_{s \rightarrow \infty} C(s) = 0, \quad (3.27)$$

$$|C(s)| \leq C(0) \quad (3.28)$$

e:

$$C(s) = C(-s). \quad (3.29)$$

A FIG. 3.1 mostra um diagrama ilustrando o comportamento de $C(s)$ com s .

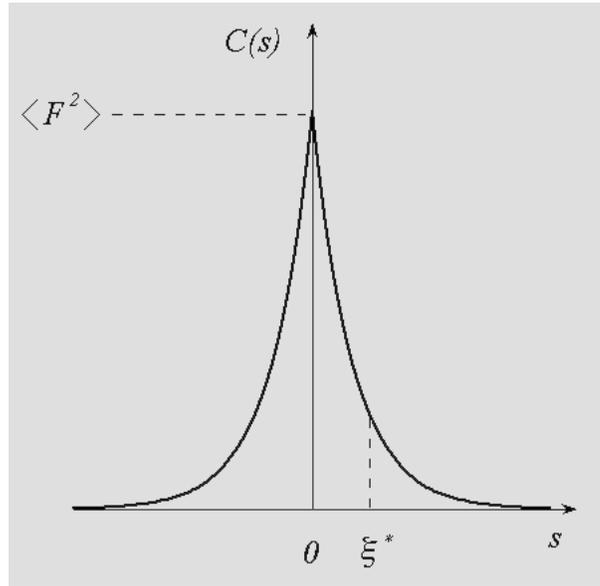


Figura 3.1: Função de correlação $C(s)$.

Em termos da função de correlação, escrevemos a integral da Eq. (3.24) como:

$$Int = \int_t^{t+\xi} dt' \int_{t-t'}^0 C(s) ds.$$

A FIG. 3.2, mostra a região de integração de S .

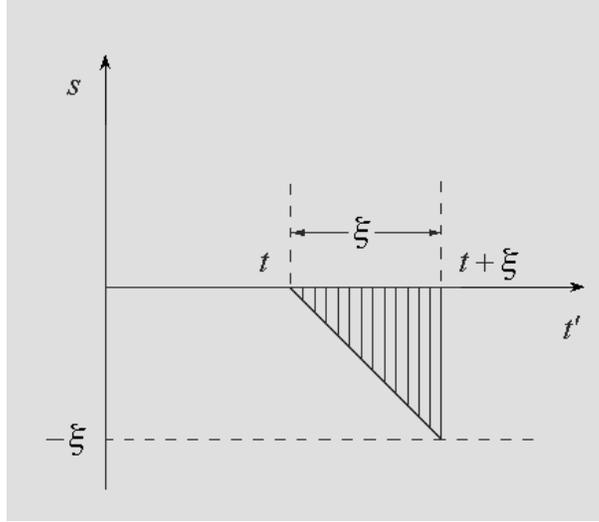


Figura 3.2: Região de integração de S .

Invertendo a ordem de integração:

$$\begin{aligned} Int &= \int_{-\xi}^0 C(s) ds \int_{t-s}^{t+\xi} dt', \\ Int &= \int_{-\xi}^0 C(s)(\xi + s) ds. \end{aligned} \quad (3.30)$$

Como $\xi \gg \xi^*$ e $C(s) \rightarrow 0$ quando $|s| \gg \xi^*$ podemos desprezar s na Eq. (3.30). Além disso, pelos mesmos motivos, podemos substituir o limite inferior $-\xi$ por $-\infty$. Assim:

$$Int \approx \xi \int_{-\infty}^0 C(s) ds. \quad (3.31)$$

Devido à propriedade de $C(s)$ descrita pela Eq. (3.29) podemos escrever:

$$Int = \frac{1}{2} \xi \int_{-\infty}^{+\infty} C(s) ds. \quad (3.32)$$

Voltando agora à Eq. (3.24) e substituindo a expressão para S dada pela Eq. (3.32):

$$m\langle v(t + \xi) - v(t) \rangle = F_{ext}\xi - \gamma\bar{v}(t)\xi, \quad (3.33)$$

onde a constante γ é:

$$\gamma = \frac{1}{2k_B T} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle F(t')F(t' + s) \rangle_0 ds. \quad (3.34)$$

Como $\bar{v} \equiv \langle v \rangle$ varia pouco no intervalo de tempo ξ :

$$m \frac{d\bar{v}}{dt} = F_{ext} - \gamma\bar{v}. \quad (3.35)$$

A expressão descrita na Eq. (3.34) é conhecida como o Teorema da Flutuação-Dissipação para o movimento Browniano.

Usando o formalismo de Transformadas de Fourier podemos encontrar uma expressão para a função de correlação da força aleatória, $\langle F(0)F(s) \rangle$.

Definindo:

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} C(s)e^{i\omega s} ds, \quad (3.36)$$

$$C(s) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} J(\omega)e^{-i\omega s} d\omega. \quad (3.37)$$

Substituindo na Eq. (3.34) a Eq. (3.37):

$$2k_B T \gamma = \int_{-\infty}^{+\infty} ds \left[\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} J(\omega)e^{-i\omega s} d\omega \right].$$

Invertendo a ordem de integração:

$$\begin{aligned} 2k_B T \gamma &= \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega J(\omega) \left[\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-i\omega s} ds \right], \\ 2k_B T \gamma &= \int_{-\infty}^{+\infty} J(\omega)\delta(\omega) d\omega, \\ J(0) &= 2k_B T \gamma. \end{aligned} \quad (3.38)$$

A escala de tempo na qual F flutua é muito menor que a escala de tempo na qual observamos o movimento browniano. Isso faz com que a densidade espectral de F possa ser considerada uma constante para todas as frequências pois uma distribuição muito concentrada no tempo tem uma transformada de Fourier muito larga nas frequências. Usando essa aproximação podemos escrever:

$$J(\omega) = 2k_B T \gamma. \quad (3.39)$$

Usando a Eq. (3.37) novamente, obtemos $C(s)$:

$$\begin{aligned} C(s) &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} 2k_B T \gamma e^{-i\omega s} d\omega \\ C(s) &= 2k_B T \gamma \delta(s), \end{aligned}$$

ou,

$$\langle F(0)F(s) \rangle = 2k_B T \gamma \delta(s). \quad (3.40)$$

Como F é estacionária, ou seja, seu comportamento no tempo não depende de uma origem específica, podemos escrever:

$$\langle F(t')F(t'') \rangle = 2k_B T \gamma \delta(t'' - t'). \quad (3.41)$$

3.3 Movimento Browniano de uma Partícula em um Poço de Potencial Harmônico

Para uma partícula num poço de potencial harmônico escrevemos a equação de Langevin, fazendo $F_{ext} = -kx$:

$$m \frac{dv}{dt} + \gamma v + kx = F(t), \quad (3.42)$$

onde k é a curvatura do poço de potencial no qual a partícula está confinada.

O movimento de uma partícula descrito pela Eq. (3.42) pode ser investigado em três escalas de tempo diferentes:

1) $t_1 = \xi^* \sim 10^{-13} s$, nessa situação são observadas as flutuações da força estocástica, v e x não variam significativamente.

2) $t_2 = \gamma/m$, tipicamente $t_2 \sim 10^{-6} s$ para partículas na escala de comprimento da ordem de μm . Esse é o tempo característico para a partícula alcançar sua velocidade de equilíbrio.

3) $t_3 = \gamma/k$, nos casos de nosso interesse $t_3 \sim 10^{-3} s$. Esse é o tempo característico para a partícula alcançar sua posição de equilíbrio.

Ao investigarmos o movimento Browniano de uma partícula confinada num poço de potencial estaremos interessados nas flutuações de sua posição. Nessa situação observamos o movimento na escala de tempo t_3 . Nessa escala, a partícula está

todo o tempo com sua velocidade de equilíbrio e podemos simplificar a Eq. (3.42) escrevendo:

$$\frac{dx}{dt} + \frac{x}{\tau} = \frac{F(t)}{\gamma}, \quad (3.43)$$

onde $\tau = \gamma/k$.

Podemos resolver a equação diferencial acima, explicitando a dependência de x com F :

$$x(t) = x(t_0)e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau}} + \int_{t_0}^t \frac{F(t')}{\gamma} e^{-\frac{(t-t')}{\tau}} dt'. \quad (3.44)$$

E, para $t_0 = -\infty$:

$$x(t) = \int_{-\infty}^t \frac{F(t')}{\gamma} e^{-\frac{(t-t')}{\tau}} dt'. \quad (3.45)$$

Denominando $C_x(s)$ a função de correlação de x , podemos escrever:

$$C_x(s) = \langle x(0)x(s) \rangle = \frac{1}{\gamma^2} \int_{-\infty}^0 dt' \int_{-\infty}^s dt'' \langle F(t')F(t'') \rangle e^{-\frac{(s-t'-t'')}{\tau}}. \quad (3.46)$$

Usando o resultado descrito na Eq. (3.41):

$$\begin{aligned} C_x(s) &= \frac{2k_B T}{\gamma} \int_{-\infty}^0 dt' \int_{-\infty}^s dt'' \delta(t'' - t') e^{-\frac{(s-t'-t'')}{\tau}}, \\ C_x(s) &= \frac{2k_B T}{\gamma} \int_{-\infty}^0 dt' e^{-\frac{(s-2t')}{\tau}}, \\ C_x(s) &= \frac{k_B T}{k} e^{-\frac{s}{\tau}}, \end{aligned} \quad (3.47)$$

ou:

$$\langle x(0)x(s) \rangle = \frac{k_B T}{k} e^{-\frac{s}{\tau}}. \quad (3.48)$$

Capítulo 4

Procedimentos e Técnicas Experimentais

Um de nossos objetivos neste trabalho é estudar o movimento Browniano de uma partícula presa numa pinça óptica. Como partícula usamos uma microesfera de poliestireno de $2.8 \mu m$ de diâmetro. Para descrevê-la assumimos que ela é rígida e desprezamos seus graus de liberdade internos. Assim, são necessárias apenas três variáveis para sua descrição, correspondentes à posição de seu centro de massa.

Flutuações de posição do centro de massa de uma partícula podem ser usadas para caracterizar seu movimento, Eq. (3.48). Para nosso caso, o desvio quadrático médio dessas flutuações é da ordem de $10^{-4} \mu m^2$ e a amplitude média de flutuação $10 nm$.

Para medir amplitudes tão pequenas usamos um laser para iluminar a microesfera e estudamos a intensidade de luz por ela espalhada. Em nossa geometria observamos a luz retroespalhada, com a intensidade de luz retroespalhada em função da posição do centro de massa da microesfera, relacionamos as flutuações de posição com as flutuações da intensidade que medimos.

4.1 Montagem Experimental

Na FIG. 4.1 mostramos um esquema da montagem experimental que usamos. A região entre linhas pontilhadas representa um microscópio Nikon TE 300, com objetiva de óptica corrigida no infinito, aumento 100X e abertura numérica, $N.A. = 1.4$. Essa objetiva é usada para fazer a pinça óptica, observar as microesferas e para

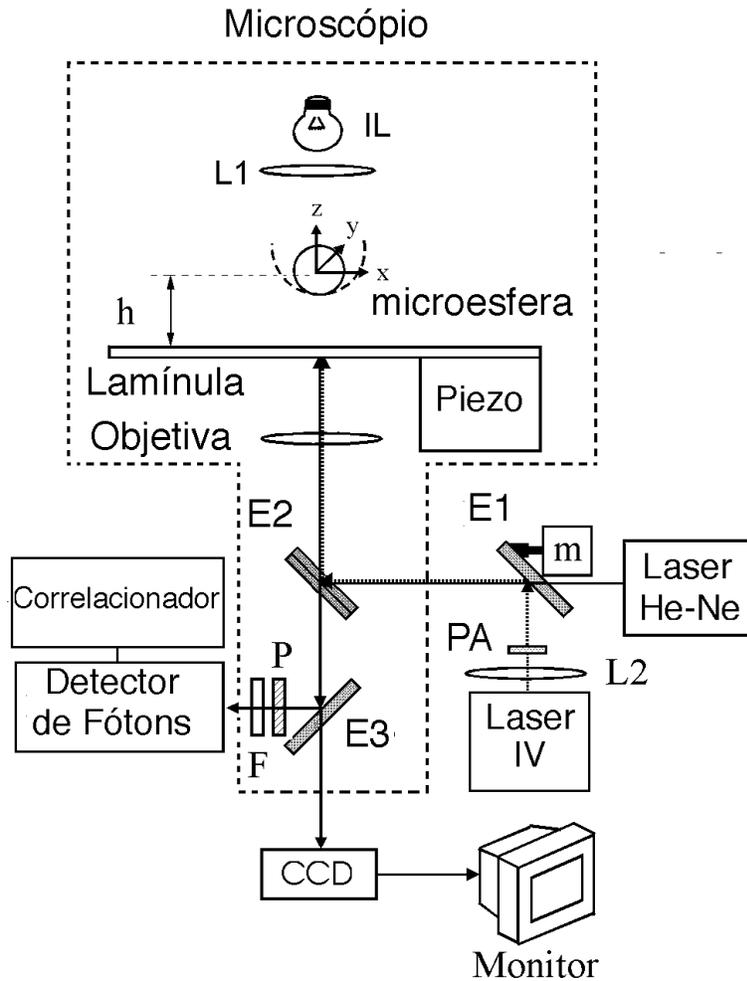


Figura 4.1: Montagem Experimental.

coletar a intensidade de luz retroespalhada.

Em uma das saídas do microscópio usamos uma câmera CCD (CCD-72 DAGE-MTI) para visualização e na outra um detector de fótons (EG&G - Photon Counting Module, SPCM-200-PQ-F500), com abertura de $150\mu\text{m}$ de diâmetro, montado em deslocadores Newport de modo a serem posicionados com precisão. Para cada fóton que chega no detector um pulso TTL de 10 ns de largura é enviado a um correlacionador digital Brookhaven BI9000AT, que mede as correlações temporais entre os pulsos originados da intensidade de luz retroespalhada.

Para fazermos a pinça óptica, além da objetiva do microscópio usamos um

laser infravermelho (SDL, 5422-H1), *laser IV* na FIG. 4.1, operando em 832 nm , com potência máxima de 150 mW .

Para estudarmos o movimento da microesfera com espalhamento de luz usamos, como fonte, um laser He-Ne (SP-127), $\lambda = 632.8\text{ nm}$.

Com o objetivo de eliminar luz espúria de nossas medidas observamos, com o auxílio do polarizador P , a luz retroespalhada em polarização cruzada à polarização da luz incidente. Além disso, usamos também um filtro passa faixa F , centrado em 632 nm e com largura de faixa de 20 nm , em frente ao detector de fótons, de modo a garantir que apenas a luz espalhada proveniente do laser He-Ne seja observada.

Os transladores do microscópio foram substituídos por transladores Newport com atuadores piezo-elétricos (*Piezo*, na Fig. 4.1), calibrados com um interferômetro Fabri-Perot construído com um semi-espelho montado sobre um dos transladores e o outro fixo no microscópio.

A lente $L2$ é usada para colimar o feixe de laser infravermelho e o prisma anamórfico PA , para uniformizar sua distribuição radial de potência.

O motor m está conectado a um espelho dicróico $E1$, cuja inclinação pode ser regulada. Esse espelho reflete praticamente toda a luz do laser infravermelho e é transparente para a luz visível. Ao atuar no espelho $E1$, o motor muda a posição do feixe infravermelho fazendo com que uma microesfera presa pela ação do feixe também se mova acompanhando seu movimento. A velocidade desse deslocamento é medida usando a CCD e o gravador de vídeo acoplados ao sistema.

$E2$ corresponde a dois espelhos, um outro dicróico para levar a luz do laser infravermelho à objetiva e um semi-espelho para a luz visível. Esse arranjo permite que chegue à entrada da objetiva potência suficiente para criar a pinça óptica sem comprometer o sistema de visualização.

Nossas amostras são feitas com microesferas de poliestireno de $2.8\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro (Polysciences) em solução de água deionizada.

4.1.1 Perfil de Retroespalhamento

Para obtermos o perfil de retroespalhamento movemos o espelho $E1$ com o motor m e com isso deslocamos o feixe infravermelho e a microesfera presa na pinça óptica, por exemplo na direção x . Como veremos, a intensidade retroespalhada depende da posição relativa entre o detector e a microesfera. Após posicionarmos

o detector de fótons convenientemente (Seção 4.2) e considerando $x_0 = 0$ para a posição de máxima intensidade retroespalhada, deslocamos a microesfera para a posição $0.6 \mu m$ à esquerda de x_0 e com o sistema de vídeo gravamos a imagem da microesfera nessa posição. Em seguida iniciamos a medida do perfil de retroespalhamento deslocando a microesfera com velocidade controlada ($\sim 0.014 \mu m/s$) até a posição $0.6 \mu m$ à direita de x_0 medindo simultaneamente a intensidade retroespalhada. Novamente, com o sistema de vídeo, gravamos a imagem da microesfera na posição final. Com as imagens gravadas e o tempo de medida obtemos a velocidade de deslocamento da microesfera para cada perfil. E com isto, a relação entre intensidade retroespalhada e posição da microesfera no perfil de retroespalhamento.

4.2 Intensidade de Luz Retroespalhada e Correlação de Intensidades

Na FIG. 4.2 mostramos um gráfico da intensidade retroespalhada em função da posição do centro de massa de uma microesfera produzida pela Polysciences, estoque #452308. Esse perfil de luz retroespalhada depende da microesfera e da posição relativa entre o seu centro de massa e o detector de fótons usado para medir a intensidade de luz.

Na FIG. 4.3 mostramos o mesmo tipo de medida feita com uma microesfera de outro estoque #500816.

Nas FIG. 4.2 e FIG. 4.3 (cruzes) observamos a existência de três picos no perfil de retroespalhamento. Para essas duas situações o detector foi posicionado de modo a maximizar a intensidade do pico central. No entanto, há uma enorme diferença entre os dois resultados. Isso se deve ao fato das microesferas serem de estoques diferentes. O interessante é que apenas o pico central foi afetado. Nos dois casos discutidos não houve grandes mudanças em relação aos picos laterais. O perfil representado por diamantes na FIG. 4.3, corresponde à mesma microesfera do perfil representado pelas cruzes, mas ele foi obtido com o detector posicionado de modo a maximizar a intensidade do pico lateral esquerdo. Devido à grande reproducibilidade dos perfis de retroespalhamento obtidos com o detector posicionado dessa forma passamos a realizar os experimentos nessa configuração.

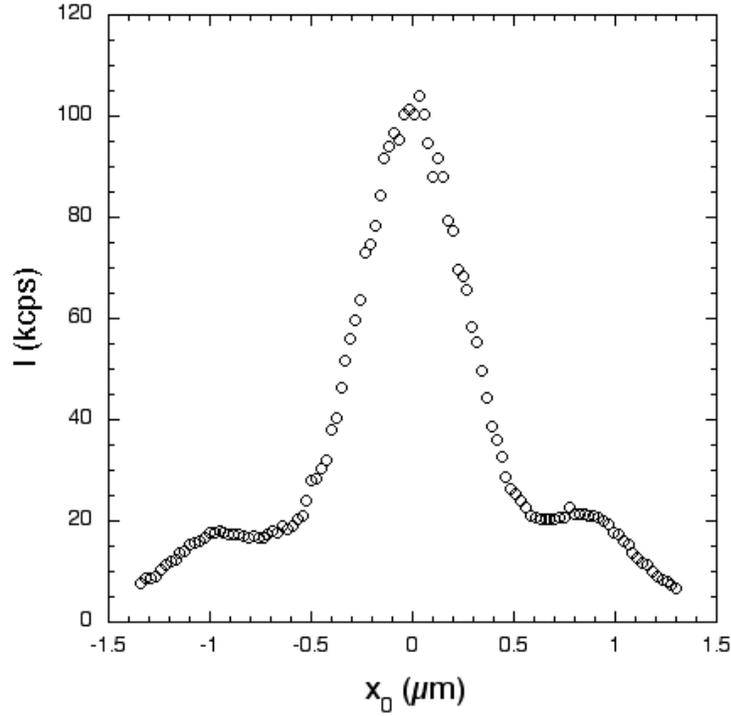


Figura 4.2: Perfil de retroespalhamento para uma microesfera produzida pela Polyscience, estoque #452308.

Como discutimos anteriormente, o perfil de retroespalhamento depende das posições do detector e do centro de massa da microesfera. Veremos que a técnica que desenvolvemos pode ser aplicada a perfis arbitrários e que uma escolha adequada da posição do detector leva à obtenção de perfis que são gaussianas simples.

4.2.1 Perfil Gaussiano de Luz Retroespalhada

No caso de perfis gaussianos é possível encontrar uma relação exata envolvendo a função de correlação das intensidades e a função de correlação de posições do centro de massa da microesfera.

Podemos descrever a intensidade de luz retroespalhada como um produto de três gaussianas [14], uma em cada eixo cartesiano:

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2}\right) \exp\left(-\frac{y^2}{2\sigma_y^2}\right) \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma_z^2}\right). \quad (4.1)$$

Como a microesfera está confinada em um poço de potencial, devido à pinça

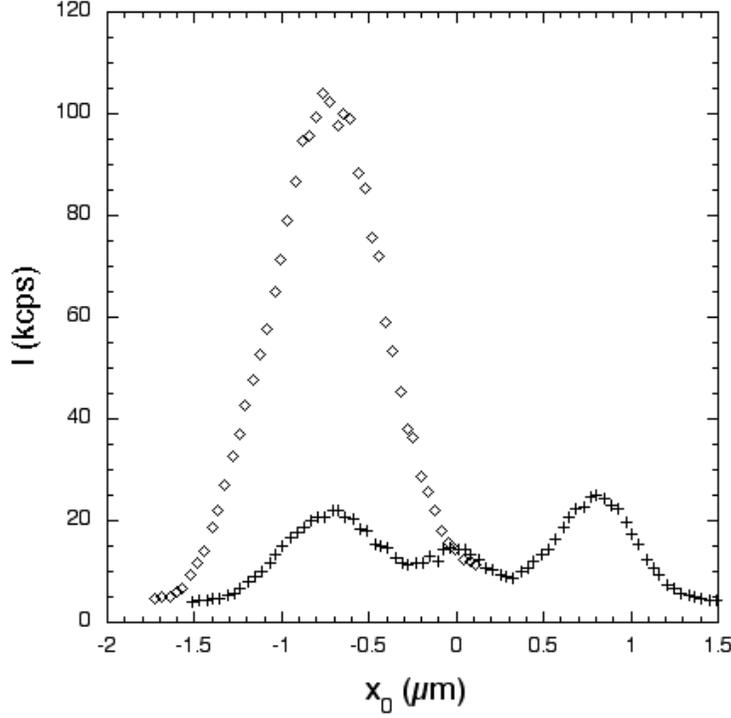


Figura 4.3: *Cruzes* - Medida semelhante à apresentada na FIG. 4.2 mas com microesferas de outro estoque #500816. *Diamantes* - Medida feita com o detector de fótons posicionado de modo a maximizar a intensidade do pico lateral esquerdo.

óptica, ela se move em torno de sua posição média de equilíbrio (x_0, y_0, z_0) . Assim, a posição da microesfera em função do tempo pode ser escrita como $(x_0 + \Delta x(t), y_0 + \Delta y(t), z_0 + \Delta z(t))$. As variáveis $\Delta x(t)$, $\Delta y(t)$ e $\Delta z(t)$ são variáveis estocásticas gaussianas e têm média nula.

Seguindo o mesmo procedimento de Bar-Ziv *et al.* [15] encontramos a dependência da função de correlação das intensidades com a função de correlação de posições do centro de massa da microesfera (Apêndice A):

$$\langle I(\Delta x_i) I(\Delta x'_i) \rangle = I^2(x_{0i}) \prod_i \frac{\sigma_i^2}{\sqrt{(\langle \Delta x_i^2 \rangle + \sigma_i^2)^2 - \langle \Delta x_i \Delta x'_i \rangle^2}} e^{-\frac{x_{0i}^2}{\langle \Delta x_i^2 \rangle + \sigma_i^2 + \langle \Delta x_i \Delta x'_i \rangle}}, \quad (4.2)$$

onde $x_{01} = x_0$, $x_{02} = y_0$, $x_{03} = z_0$, $\sigma_1 = \sigma_x$, $\sigma_2 = \sigma_y$, $\sigma_3 = \sigma_z$, $\Delta x_1 = \Delta x$, $\Delta x_2 = \Delta y$, $\Delta x_3 = \Delta z$, $\Delta x_i \equiv \Delta x_i(0)$ e $\Delta x'_i \equiv \Delta x_i(s)$. Fazendo $x_0 = 0$, $y_0 = 0$, e $z_0 = 0$ obtemos a expressão de Bar-Ziv *et al.* [15].

Segundo a Eq. (4.2) quando a microesfera não está na posição de máxima intensidade no perfil de retroespalhamento a função de correlação das intensidades depende da função de correlação de posições de seu centro de massa em primeira ordem (dependência linear) e segunda ordem (dependência quadrática). Como a função de correlação de posições é uma exponencial com tempo característico τ , Eq. (3.48), isso quer dizer que a função de correlação das intensidades possui termos que são exponenciais com tempos de decaimento diferentes por um fator 2. Essa mistura de dependências em primeira e segunda ordens pode causar problemas na determinação experimental dos tempos característicos.

Na FIG. 4.4 mostramos duas funções de correlação de intensidades obtidas a partir do movimento de uma microesfera pinçada, sujeita à uma força externa senoidal, com frequência de 100 Hz , imposta à amostra. $g(t)$ é a função de correlação

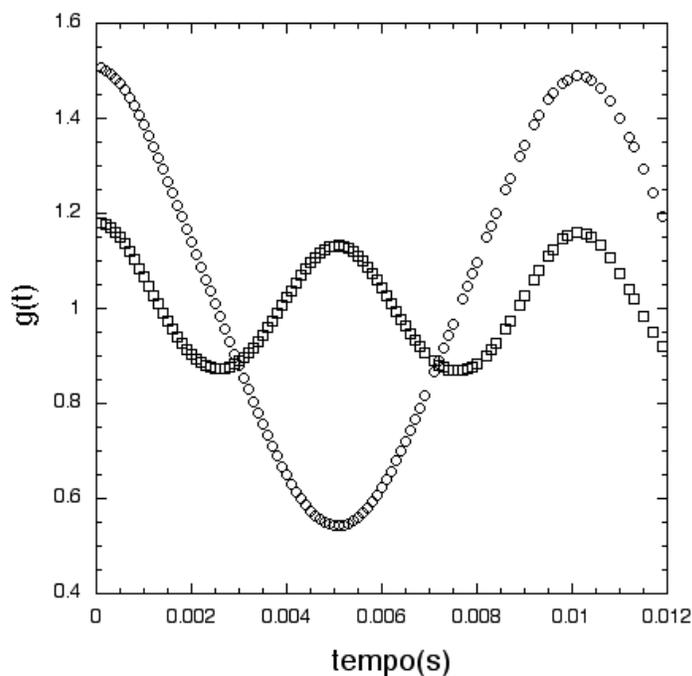


Figura 4.4: *Círculos* - Função de correlação normalizada pelo quadrado da intensidade média para uma microesfera na posição $x_0 = 0.3\ \mu\text{m}$. *Quadrados* - Mesmo tipo de medida mas com $x_0 \sim 0$.

das intensidades dividida pelo quadrado da intensidade média durante a medida. A amplitude do movimento da microesfera pinçada nesse caso é $0.3 \mu m$. Para a situação representada por círculos a posição da microesfera no perfil é $x_0 = 0.3 \mu m$, que corresponde à meia largura da gaussiana do perfil de retroespalhamento. Já para a situação representada por quadrados a posição da microesfera é $x_0 \sim 0$. Esses resultados podem ser explicados usando uma argumentação simples. Quando a microesfera está longe da posição de máxima intensidade no perfil (círculos) e se movimenta com amplitude ($0.3 \mu m$) no máximo igual à meia largura do perfil gaussiano ($0.3 \mu m$), é preciso um ciclo completo de seu movimento para que a intensidade retorne ao valor inicial. Já, quando ela está próxima da posição de máxima intensidade é preciso apenas meio ciclo para que o mesmo aconteça. Assim, controlando a posição da microesfera no perfil de retroespalhamento é possível escolher entre medir funções de correlação de posição de primeira ou segunda ordens e evitar o problema mencionado anteriormente.

4.2.2 Perfil Arbitrário de Luz Retroespalhada

A amplitude média das flutuações de posição típicas do centro de massa de uma microesfera pinçada, nas situações de nosso interesse, são da ordem de $10 nm$. A meia largura dos perfis gaussianos é de cerca de $0.3 \mu m$. Como a amplitude média das flutuações é muito menor que a meia largura do perfil de retroespalhamento, podemos considerar perfis mais gerais expandindo as funções que os representam em séries de Taylor em torno de um posição de equilíbrio, x_{0i} , da microesfera no perfil.

De forma geral escrevemos a intensidade retroespalhada como:

$$I(x, y, z) = I_0 \exp[-f(x, y, z)]. \quad (4.3)$$

Expandindo a Eq. (4.3) em série de Taylor em torno da posição (x_0, y_0, z_0) :

$$I(\Delta x_i) = I(x_{0i}) \left\{ 1 + \sum_i (\alpha_i \Delta x_i + \beta_i \Delta x_i^2) \right\}, \quad (4.4)$$

onde:

$$I(x_{0i}) = I_0 \exp[-f(x_{0i})], \quad (4.5)$$

$$\alpha_i = \left(-\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)_{x_{0i}} \quad (4.6)$$

e

$$\beta_i = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)_{x_{0i}}^2 - \left(\frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} \right)_{x_{0i}} \right]. \quad (4.7)$$

Como $\langle \Delta x_i \rangle = 0$ e $\langle \Delta x_i \Delta x_j \rangle = 0$, se $i \neq j$, obtemos uma função de correlação aproximada para a intensidade retroespalhada:

$$\langle I(\Delta x_i) I(\Delta x'_i) \rangle = I(x_{0i})^2 \left[1 + \sum_i (\beta_i \langle (\Delta x_i)^2 \rangle + \alpha_i^2 \langle \Delta x_i \Delta x'_i \rangle + \beta_i^2 \langle (\Delta x_i)^2 (\Delta x'_i)^2 \rangle) \right]. \quad (4.8)$$

Essa equação pode ser simplificada ainda mais. Para vermos como, consideraremos novamente perfis gaussianos para fazermos algumas estimativas numéricas. Nesse caso:

$$\alpha_i = -\frac{x_{0i}}{\sigma_i^2}$$

e

$$\beta_i = \frac{1}{2} \left[\left(\frac{x_{0i}}{\sigma_i^2} \right)^2 - \frac{1}{\sigma_i^2} \right].$$

Para a microesfera na posição $x_{0i} = 0$, $\alpha_i = 0$ e dizemos que a função de correlação das intensidades é de segunda ordem apenas. Para a microesfera na posição $x_{0i} = \sigma_i$, $\beta_i = 0$ e dizemos que a função de correlação das intensidades é de primeira ordem apenas. Para outros valores de x_{0i} há uma mistura de funções de correlação de primeira e segunda ordens.

É possível encontrar uma região de posições no perfil de retroespalhamento para a qual a amplitude da função de correlação das intensidades de primeira ordem é muito maior que a de segunda ordem. Para acharmos essa região, consideremos apenas a variável x e definamos r como a razão entre a amplitude da segunda ordem $Am^{(2)}$ e a amplitude da primeira ordem $Am^{(1)}$ na função de correlação das intensidades, Eq. (4.8):

$$r = \frac{Am^{(2)}}{Am^{(1)}}, \quad (4.9)$$

onde

$$Am^{(2)} = \beta^2 \langle \Delta x^2 \rangle^2 \quad (4.10)$$

e

$$Am^{(1)} = \alpha^2 \langle \Delta x^2 \rangle. \quad (4.11)$$

A Eq. (4.10) foi obtida usando o fato conhecido [15] para variáveis gaussianas:

$$\langle \Delta x^2(0)\Delta x^2(t) \rangle = \langle \Delta x^2 \rangle^2 + 2\langle \Delta x(0)\Delta x(t) \rangle^2, \quad (4.12)$$

e a Eq. (3.48), de modo que:

$$\langle \Delta x^2(0)\Delta x^2(t) \rangle = \langle \Delta x^2 \rangle^2 \left(1 + 2e^{-\frac{t}{2\tau}} \right). \quad (4.13)$$

Assim, para perfis gaussianos podemos escrever:

$$r = \frac{1}{4} \langle \Delta x^2 \rangle \frac{(x_0^2 - \sigma^2)^2}{x_0^2 \sigma^4}. \quad (4.14)$$

Procuramos a região de valores de x_0 para a qual $r < r_m$. r_m é o valor máximo da razão entre as amplitudes de segunda e primeira ordens de modo que a função de correlação das intensidades possa ser considerada, com boa aproximação, de primeira ordem apenas. Considerando $x_0 > 0$, sem perda de generalidade, os valores de x_0 devem ser tais que:

$$\begin{aligned} \frac{1}{4} \langle \Delta x^2 \rangle \frac{(x_0^2 - \sigma^2)^2}{x_0^2 \sigma^4} &< r_m, \\ \frac{\sqrt{\langle \Delta x^2 \rangle} |(x_0^2 - \sigma^2)|}{2 x_0 \sigma^2} &< \sqrt{r_m}. \end{aligned} \quad (4.15)$$

Assim, temos que para $x_0 > \sigma$:

$$(x_0^2 - \sigma^2) < 2x_0\sigma^2 \sqrt{\frac{r_m}{\langle \Delta x^2 \rangle}}, \quad (4.16)$$

e para $x_0 < \sigma$:

$$-(x_0^2 - \sigma^2) < 2x_0\sigma^2 \sqrt{\frac{r_m}{\langle \Delta x^2 \rangle}}. \quad (4.17)$$

Definindo:

$$\epsilon = \frac{\sigma^2 r_m}{\langle \Delta x^2 \rangle}, \quad (4.18)$$

teremos, após resolvermos as inequações 4.16 e 4.17 que x_0 deve satisfazer:

$$\sqrt{\epsilon} \left(\sqrt{1 + \frac{1}{\epsilon}} - 1 \right) < \frac{x_0}{\sigma} < \sqrt{\epsilon} \left(\sqrt{1 + \frac{1}{\epsilon}} + 1 \right), \quad (4.19)$$

para que a razão entre as amplitudes da segunda e da primeira ordens seja menor que r_m .

O primeiro termo no somatório da Eq. (4.8) pode ser considerado muito pequeno comparado com 1 desde que:

$$\sum_i \beta_i \langle (\Delta x_i)^2 \rangle = \sum_i \sqrt{A_i^{(2)}} < 0.2 \%.$$

Para uma análise de ordem de grandeza façamos

$$\sum_i \sqrt{A_i^{(2)}} \sim 3\sqrt{A^{(2)}}.$$

Assim:

$$\sqrt{A^{(2)}} < 0.07 \%$$

e:

$$A^{(2)} < 0.005 \%.$$

Em nossos experimentos o valor máximo encontrado para $A^{(1)}$ é cerca de 5 %, o que leva a:

$$\frac{A^{(2)}}{A^{(1)}} < 0.1 \%.$$

Fazendo $r_m = 0.1 \%$ podemos desprezar o primeiro termo do somatório na Eq. (4.8) e além disso, para $\sigma = 0.3 \mu m$ e $\langle \Delta x^2 \rangle = 10^{-4} \mu m^2$, valores típicos encontrados em nossos experimentos, $\epsilon = 0.9$ e:

$$0.13 \mu m < x_0 < 0.69 \mu m. \tag{4.20}$$

Usando esse resultado podemos simplificar a função de correlação descrita na Eq. (4.8). Desde que a condição (4.20) seja respeitada observamos, com boa aproximação, apenas correlações de primeira ordem:

$$\langle I(\Delta x_i) I(\Delta x'_i) \rangle = I(x_{0i})^2 \left[1 + \sum_i \alpha_i^2 \langle \Delta x_i \Delta x'_i \rangle \right]. \tag{4.21}$$

Definindo a função de correlação normalizada por:

$$g(t) = \frac{\langle I(\Delta x_i) I(\Delta x'_i) \rangle}{\langle I(\Delta x_i) \rangle^2}, \tag{4.22}$$

temos:

$$g(t) = 1 + \alpha_x^2 \langle \Delta x \Delta x' \rangle + \alpha_z^2 \langle \Delta z \Delta z' \rangle, \quad (4.23)$$

pois é possível centralizar a microesfera em relação ao eixo y , posição para a qual $\alpha_y = 0$.

Usando a Eq. (3.48):

$$g(t) = 1 + \alpha_x^2 \langle \Delta x^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_x}\right) + \alpha_z^2 \langle \Delta z^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_z}\right). \quad (4.24)$$

Além disso, se o perfil é puramente gaussiano podemos rescrever a Eq. (4.24):

$$g_G(t) = 1 + \frac{x_0^2}{\sigma_x^4} \langle \Delta x^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_x}\right) + \frac{z_0^2}{\sigma_z^4} \langle \Delta z^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_z}\right) \quad (4.25)$$

e a função de correlação não normalizada:

$$G_G(t) = \left(I_0 e^{-\frac{x_0^2}{2\sigma_x^2}} e^{-\frac{z_0^2}{2\sigma_z^2}} \right)^2 \left[1 + \frac{x_0^2}{\sigma_x^4} \langle \Delta x^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_x}\right) + \frac{z_0^2}{\sigma_z^4} \langle \Delta z^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_z}\right) \right]. \quad (4.26)$$

Finalmente:

$$G_{Integral}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} G_G(x_0, 0, z_0, t) dx_0 = Constante \cdot g_{Integral}(t), \quad (4.27)$$

onde:

$$g_{Integral}(t) = \left[1 + \frac{1}{2\sigma_x^2} \langle \Delta x^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_x}\right) + \frac{z_0^2}{\sigma_z^4} \langle \Delta z^2 \rangle \exp\left(-\frac{t}{\tau_z}\right) \right]. \quad (4.28)$$

Há uma diferença importante entre as Eqs. (4.25) e (4.28). O termo que envolve a exponencial com tempo característico τ_x , depende em um caso, Eq. (4.25), do inverso de σ_x^4 e no outro, Eq. (4.28) do inverso de σ_x^2 . Isso faz com que $g_{Integral}$ seja menos sensível à variações de σ_x que g_G , possibilitando resultados mais precisos.

4.3 Método Diferencial e Método Integral

Para garantirmos que a microesfera esteja bem centralizada em relação ao eixo y (não controlamos sua posição em relação a z) impomos a ela um movimento oscilatório, ao longo desse eixo, com amplitude da ordem da amplitude do movimento Browniano. Verificamos então, se as correlações de intensidade têm amplitudes comparáveis às amplitudes de segunda ordem, indicando, com boa aproximação que $y_0 \sim 0$. Esse critério deve ser obedecido para todas as posições x_0 ao longo do perfil de retroespalhamento. Assim, medimos apenas as funções de correlação de intensidade de primeira ordem correspondentes às flutuações em x e em z .

4.3.1 Método Diferencial

Após medirmos o perfil de retroespalhamento, observando os cuidados apresentados nas Seções 4.1.1 e 4.2, deslocamos a microesfera para uma posição x_0 qualquer e com o correlacionador medimos a função de correlação das intensidades relativa a essa posição. Fazemos isso para a microesfera em várias posições no perfil de retroespalhamento.

Na FIG. 4.5 mostramos uma função típica da correlação das intensidades, em eixos lineares e semilog, normalizada pela intensidade média medida, Eq. 4.22.

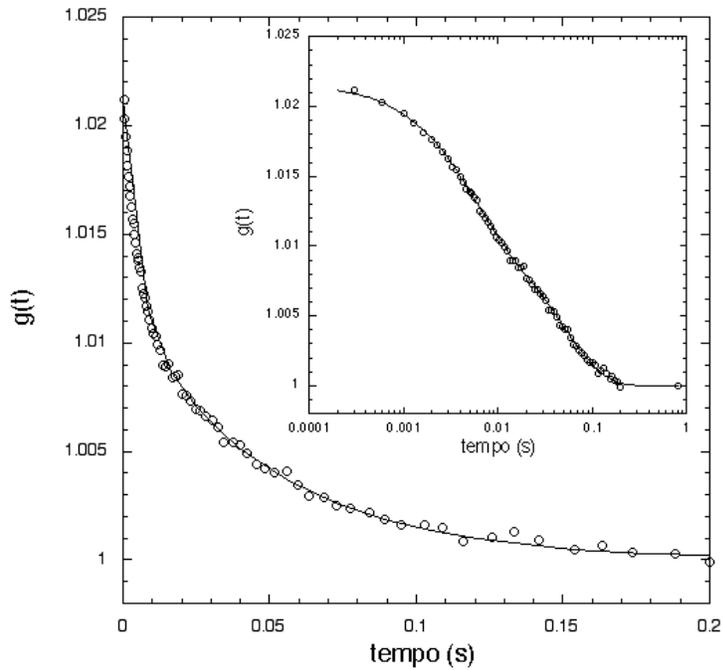


Figura 4.5: Função de correlação típica normalizada.

Ajustamos a função de correlação a duas exponenciais somadas a um termo constante 1, uma das exponenciais com tempo característico τ_x e amplitude A_x e a outra com tempo característico τ_z e amplitude A_z . Do conjunto medido de funções de correlação das intensidades obtemos os tempos característicos e as amplitudes em função de x_0 .

O tempo τ_z é 6 a 10 vezes maior que τ_x . Além disso, ele flutua muito, talvez devido à imprecisão no posicionamento da microesfera em relação ao eixo z . Como os tempos característicos são muito diferentes e não temos um bom controle sobre o posicionamento da microesfera ao longo do eixo z , concentramos nossa análise nos resultados para o movimento da esfera ao longo do eixo x .

Temos assim, dois modos de obter a constante de força k_x da pinça óptica. Um usando os tempos característicos τ_x e o outro usando as amplitudes A_x . Por consistência os dois devem levar ao mesmo resultado.

4.3.2 Método Integral

No método integral acumulamos uma função de correlação ao mesmo tempo que medimos o perfil de retroespalhamento. Nesse caso, a velocidade típica de deslocamento da microesfera é 3 nm/s e obtemos uma função de correlação integrada em relação a x_0 . Este método é implementado com maior facilidade se o perfil de retroespalhamento for uma gaussiana simples quando podemos usar a Eq. (4.28) para ajustar a função de correlação das intensidades. E, como temos σ_x do perfil de retroespalhamento, podemos obter a constante de força k_x da pinça óptica.

Capítulo 5

Resultados

5.1 Método Diferencial

Com o método diferencial medimos funções de correlação da intensidade retroespalhada para várias posições da microesfera no perfil de retroespalhamento.

Na FIG. 5.1 mostramos um exemplo típico dos perfis de retroespalhamento medidos. Neste caso a microesfera foi posicionada a $10 \mu m$ da lâmina.

Esse perfil é levemente assimétrico e pode ser ajustado a uma gaussiana com uma dependência cúbica na posição x_0 , dada por:

$$I(x_0) = I_0 \exp\left(-\frac{x_0^2}{2\sigma_x^2} + c_x x_0^3\right). \quad (5.1)$$

A assimetria dos perfis de retroespalhamento pode ser controlada ajustando adequadamente a posição do detector de fótons na montagem experimental. Escolhemos no entanto, o exemplo acima, para ilustrar a aplicação do método geral desenvolvido na Seção 4.2.2. Para o perfil da FIG. 5.1 encontramos $\sigma_x = 0.276 \pm 0.008 \mu m$ e $c_x = 2.1 \pm 0.1 \mu m^{-3}$.

Na FIG. 5.2 mostramos o gráfico das amplitudes A_x e dos tempos característicos τ_x obtidos dos ajustes das funções de correlação de intensidade medidas, em função de x_0 .

Como esperávamos, o valor mínimo de amplitude ocorre quando $x_0 \sim 0$. Além disso, para $|x_0| < 0.15 \mu m$ o valor do tempo característico cai, até que em $x_0 = 0$ ele é metade de seu valor quando $|x_0| > 0.15 \mu m$. Esse fato é reflexo da presença de correlação de segunda ordem na região $|x_0| < 0.15 \mu m$.

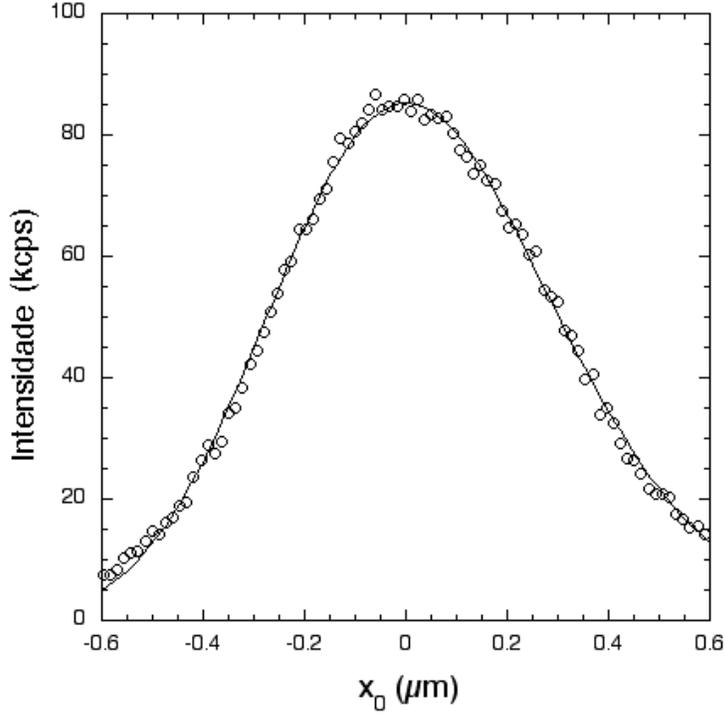


Figura 5.1: Perfil de retroespalhamento típico.

Usando as Eqs. (4.6) e (4.24) podemos escrever a amplitude A_x em termos de x_0 , para o perfil representado na FIG. 5.1 como:

$$A_x = \left(\frac{x_0}{\sigma_x^2} - 3c_x x_0^2 \right)^2 \langle \Delta x^2 \rangle. \quad (5.2)$$

A linha contínua no gráfico de $A_x \times x_0$ representa o ajuste de $A_x(x_0)$ usando a Eq. (5.2), fixando σ_x e c_x obtidos do perfil de retroespalhamento e deixando $\langle \Delta x^2 \rangle$ livre como parâmetro de ajuste. Encontramos $\langle \Delta x^2 \rangle = (6.8 \pm 0.2) \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$. Usando a Eq. (3.48):

$$\langle \Delta x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_x}, \quad (5.3)$$

o que leva a $k_x = 0.0059 \pm 0.0004 \text{ dyn/cm}$.

A constante de força da pinça óptica pode ser obtida de outra maneira, usando os tempos característicos e o coeficiente de atrito na microesfera $\tau = \gamma/k_x$.

O coeficiente de atrito γ depende da distância h em que a microesfera se encontra de uma parede, como por exemplo a interface água-vidro em nossas amos-

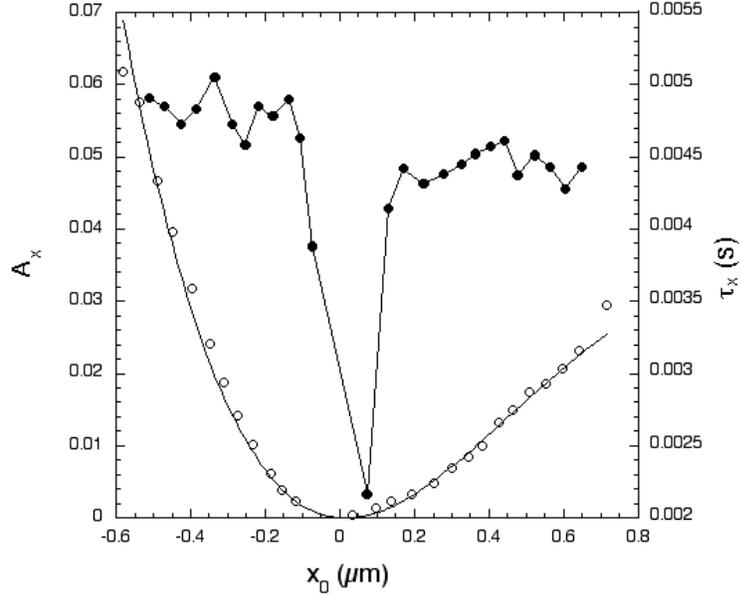


Figura 5.2: Amplitudes A_x e tempos característico τ_x em função de x_0 .

tras. Depende também se a direção de seu movimento é perpendicular ou paralela à lâmina.

No caso em que não há parede:

$$\gamma = \gamma_0 = 6\pi\eta R, \quad (5.4)$$

onde R é o raio da microesfera e η a viscosidade do meio em que ela está imersa.

Considerando o movimento ao longo da direção x (paralela à lâmina) podemos escrever [16]:

$$\gamma = \gamma_0 \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{R}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{R}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{R}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{R}{h} \right)^5 \right]^{-1}, \quad (5.5)$$

Fazendo a média dos tempos característicos obtidos para a região $|x_0| > 0.15 \mu m$ e considerando o coeficiente de atrito na microesfera para $h = 10 \mu m$ ($\eta = 0.902 \times 10^{-2} Poise$ para $T = 25^\circ C$) e $R = 1.4 \mu m$, obtemos $\gamma = 1.08\gamma_0$ e $k_x = 0.0058 \pm 0.0002 dyn/cm$. Ou seja, os dois procedimentos levam ao mesmo resultado para k_x , indicando que temos um bom controle sobre o sistema utilizado.

Um outro método para medir a constante de força k_x de uma pinça óptica é o da força de Stokes. Ao mover o fluido em que a microesfera está imersa com

velocidade constante v , aparece nela uma força de atrito, denominado força de Stokes F_S , no sentido do movimento do fluido, que desloca a microesfera de sua posição de equilíbrio na pinça óptica. A força de Stokes depende do coeficiente de atrito γ na microesfera, da velocidade v do fluido e é dada por:

$$F_S = \gamma v. \quad (5.6)$$

No estado estacionário, a força de Stokes é igual à força que a pinça óptica faz para manter a microesfera presa.

Deslocando a amostra com velocidade conhecida e controlando a distância entre a microesfera e a interface água-vidro da mesma, sabemos a força de Stokes que atua sobre a microesfera. Usando o perfil de retroespalhamento para medir quanto a microesfera sai de sua posição de equilíbrio, Δx , quando o fluido está movendo e usando as correlações de intensidade, medimos a constante de força k_x da pinça óptica. Do produto de Δx por k_x obtemos o valor da força da pinça, F_P sobre a microesfera.

Na FIG. 5.3 mostramos um gráfico de F_P em função de F_S .

Como $F_P = F_S$, devemos ter a inclinação da reta no gráfico da FIG. 5.3 igual a 1. Encontramos 1.01 indicando consistência entre os métodos utilizados.

5.2 Método Integral

Como discutimos anteriormente, o método integral é mais facilmente implementado quando os perfis de retroespalhamento são gaussianas simples.

Na FIG. 5.4 apresentamos o gráfico de um perfil que satisfaz essa condição e na FIG. 5.5 uma medida de correlação de intensidades para uma microesfera a $20 \mu m$ da lâmina.

Usando a Eq. (4.28) escrevemos para a amplitude da exponencial, relativa às flutuações no eixo x , da função de correlação obtida usando o método integral:

$$A_x = \frac{\langle \Delta x^2 \rangle}{2\sigma_x^2}. \quad (5.7)$$

Para a medida representada pela FIG. 5.4 encontramos $\sigma_x = 0.268 \pm 0.008 \mu m$.

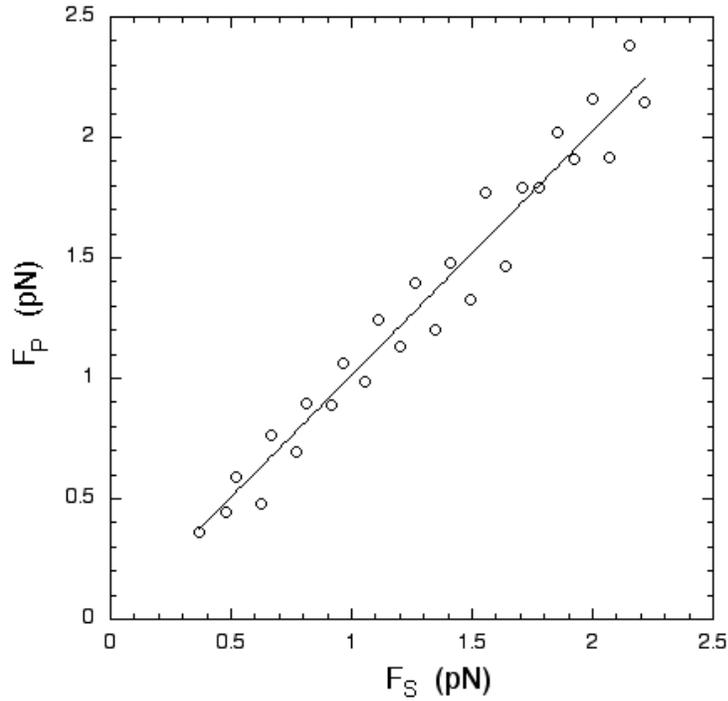


Figura 5.3: $F_P \times F_S$.

As constantes de força obtidas do tempo característico ($k_x = \gamma/\tau_x$) e da amplitude da exponencial da função de correlação, Eq. (5.7), são respectivamente, $k_x = 0.0055 \pm 0.0003 \text{ dyn/cm}$ e $k_x = 0.0054 \pm 0.0002 \text{ dyn/cm}$, em boa concordância.

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que há consistência entre os três métodos (A_x , τ , F_S) utilizados para medir a constante de força k_x da pinça óptica. Isso mostra que temos um bom controle sobre a medida desse parâmetro.

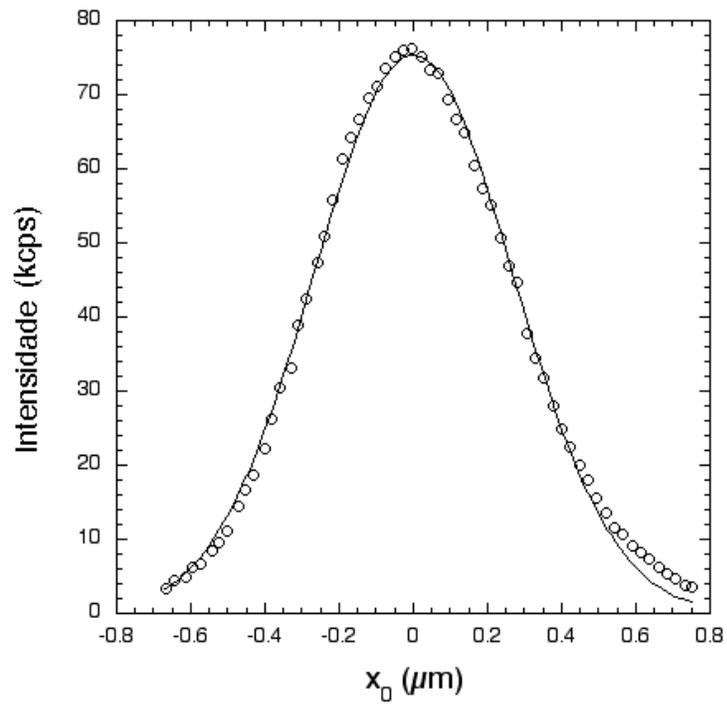


Figura 5.4: Perfil gaussiano.

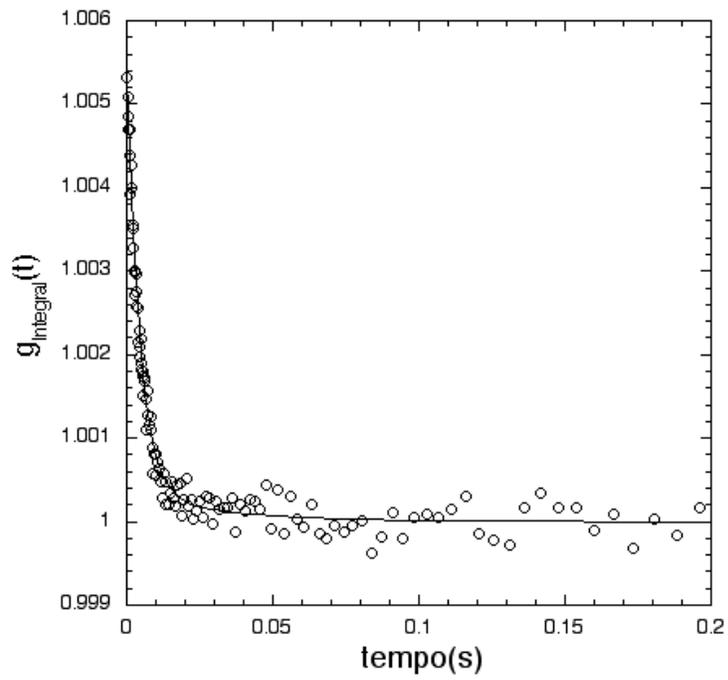


Figura 5.5: Medida de correlação feita seguindo o procedimento usado no método integral (4.3.2).

Capítulo 6

Aplicações

6.1 Atrito Sobre uma Esfera Perto de Uma Parede

Vimos, Eq. (5.5), que o coeficiente de atrito γ , na microesfera, depende da distância h em que ela se encontra de uma parede, em nosso caso a interface água-vidro da amostra.

Como aplicação do método integral medimos γ em função de h . Da função de correlação acumulada durante a medida do perfil de retroespalhamento usamos a amplitude da função de autocorrelação das flutuações de posição ao longo do eixo x para medir a constante de força k_x da pinça óptica. Com o valor de k_x obtido e a medida do tempo característico das flutuações determinamos o valor de γ .

Na FIG. 6.1 mostramos um gráfico de γ/γ_0 em função da distância h do centro de massa de uma microesfera de raio $R = 1.4 \mu m$, à interface água-vidro da amostra. Nessa medida $\gamma_0 = 6\pi\eta R = 2.27 \times 10^{-5} \text{ dyn s/cm}$, com $\eta = 0.859 \times 10^{-2} \text{ Poise}$ ($26.8^\circ C$).

A linha contínua corresponde a um ajuste dos valores medidos de γ usando a Eq. (6.1) abaixo:

$$\frac{\gamma}{\gamma_0} = \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{R}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{R}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{R}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{R}{h} \right)^5 \right]^{-1}. \quad (6.1)$$

Fixamos γ_0 e R na Eq. (6.1) e substituímos h por $h - h_0$, sendo h_0 o único parâmetro

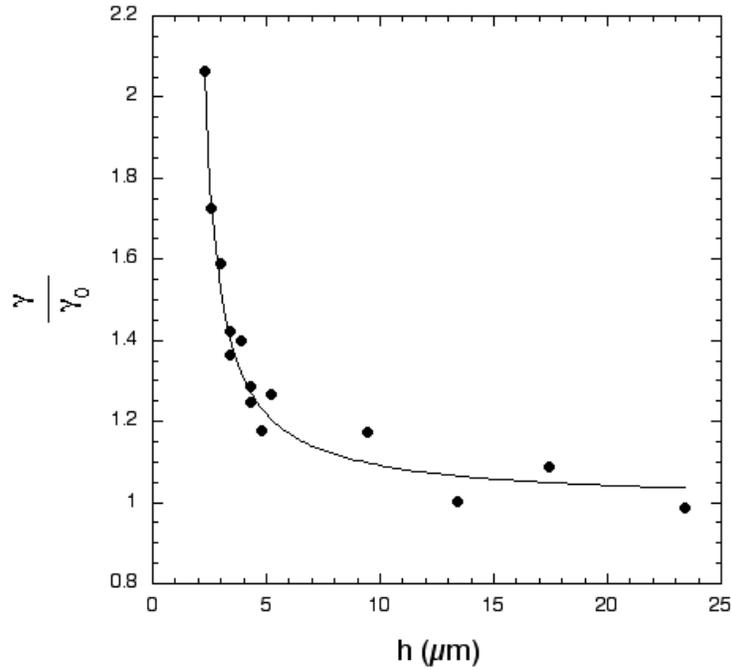


Figura 6.1: γ/γ_0 em função de h .

livre no ajuste.

Para medirmos a altura h usamos o deslocador do carrossel de objetivas do microscópio que tem graduação de $1 \mu\text{m}$. Colocamos inicialmente a microesfera enconstada na lâmina ($h = 1.4 \mu\text{m}$), mudando a posição do foco da objetiva. Em seguida, deslocando novamente a objetiva e tomando $h = 1.4 \mu\text{m}$ como referência, posicionamos a microesfera na altura desejada. Esperamos com esse procedimento que o erro na altura seja de cerca de $0.5 \mu\text{m}$. Do ajuste com todos os parâmetros fixos, exceto h_0 , encontramos $h_0 = 0.65 \mu\text{m}$, indicando boa concordância entre experimento e teoria.

6.2 Elasticidade Entrópica de uma Molécula de DNA

O que é a vida é uma pergunta que há séculos vem intrigando e fascinando os

que com ela se deparam. Apesar de antiga, ela ainda está longe de ser completamente respondida, se é que isso é possível. Devido aos grandes avanços científicos e tecnológicos ocorridos nos dois últimos séculos houve um grande número de descobertas que desmitificaram muitos dos conceitos a ela relacionados. Acredita-se, hoje, que as leis que explicam o mundo vivo são as mesmas leis que explicam o mundo não vivo. Foi pensando dessa forma que um enorme grupo de químicos, físicos e biólogos descobriram e caracterizaram a maioria das moléculas e processos biológicos hoje conhecidos.

Um marco nessa história foi a publicação de um modelo de estrutura para a molécula do ácido desoxiribonucleico (DNA), por Watson e Crick [17], em 1953. Por muitos anos, desde a sua descoberta em 1869, por Miescher [18], o DNA foi encarado como uma molécula de importância secundária. Sabia-se que grande atividade biológica acontecia no núcleo das células onde estavam juntos, DNA e uma enorme quantidade de proteínas. Devido à grande variedade de proteínas existentes, acreditava-se que eram elas as únicas responsáveis pela complexidade dos processos biológicos.

O modelo para a estrutura da molécula de DNA proposto por Watson e Crick é um modelo simples que se mostrou em perfeita concordância com medidas de difração de raios X feitas na mesma época, por Rosalind Franklin [19]. E mais, segundo ele, a informação vital, hoje conhecida como informação genética de cada ser vivo, poderia estar armazenada na sequência de bases que compõem a molécula de DNA [9]. O modelo sugere, com extrema elegância, como a informação genética pode ser copiada, explicando assim, como ela é duplicada, para ser transferida de uma para duas células após a divisão celular.

O DNA é um polímero. Polímeros são moléculas grandes, formadas pela ligação de vários complexos moleculares menores, denominados monômeros. Eles são formados quando as condições necessárias para a adição de um novo monômero à cadeia polimérica não dependem do tamanho da mesma.

A molécula de DNA é constituída por duas cadeias poliméricas, cuja unidade básica é uma das quatro moléculas conhecidas como nucleotídeos. Os nucleotídeos são formados pela ligação de um grupo fosfato com uma molécula de açúcar, a ribose, e uma das quatro bases nitrogenadas: Timina (T), Adenina (A), Guanina (G) e Citosina (C). As duas cadeias poliméricas se mantêm ligadas devido a pontes

de hidrogênio formadas entre as bases. O interessante é que essas ligações são específicas: Adenina se liga com Timina e Guanina se liga com Citosina. Assim, em uma molécula de DNA há duas cópias da informação genética, uma em cada uma das cadeias.

As sequências de nucleotídeos ligadas por pontes de hidrogênio formam uma estrutura helicoidal. Essa estrutura tem um diâmetro de [9] 20 \AA e se repete a cada 34 \AA . A distância entre um nucleotídeo e outro é 3.4 \AA . Assim sendo, há 10 nucleotídeos por passo de hélice, por fita, numa molécula de DNA.

Na FIG. 6.2 mostramos um esquema da molécula de DNA. Nessa figura, P corresponde ao passo da hélice, ou seja, a distância a partir da qual a estrutura se repete.

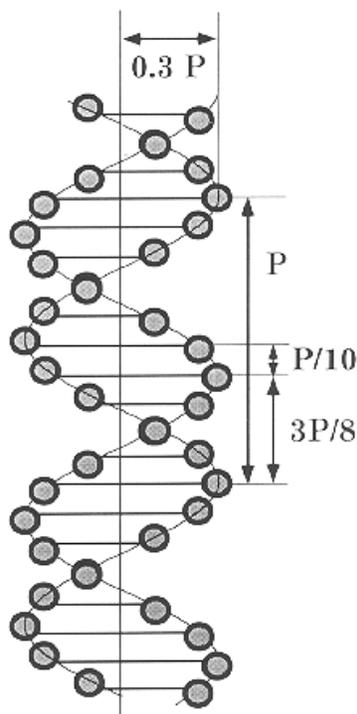


Figura 6.2: Representação esquemática de uma molécula de DNA.

A molécula de DNA precisa ser muito flexível, vejamos por quê. Para armaze-

nar toda a informação genética de um ser vivo, seu genoma, ela precisa ser grande. No caso do ser humano o comprimento total do DNA esticado de seu genoma é ~ 2.3 metros. Cada célula de nosso corpo tem diâmetro na escala de micron e possui uma cópia do genoma. Assim, como é possível colocar numa célula de algumas micra de diâmetro uma molécula de alguns metros de comprimento? Essa molécula precisa ser dobrada e empacotada enormemente, ou seja, ela precisa ser muito flexível.

A flexibilidade de uma molécula de DNA é caracterizada pelo seu comprimento de persistência A .

O comprimento de persistência é o intervalo médio de comprimento da molécula em que ela se mantém sem dobras. Ele corresponde ao comprimento de correlação das flutuações na dobra do polímero. Para o DNA, A pode variar de 40 a 500 nm , dependendo do meio em que ele se encontra.

Na situação de equilíbrio, uma molécula de DNA em solução aquosa e à temperatura ambiente, fica completamente enovelada. É preciso realizar trabalho sobre ela para que seja desenrolada. Por isso dá-se o nome a esta força de força entrópica em contraposição à força entálpica, termo usado quando o trabalho realizado sobre a molécula deforma uma ligação química. No caso do DNA, forças abaixo de 5 pN estão no regime entrópico.

Medidas de Força \times Extensão da molécula, feitas ao esticá-la, podem ser usadas para determinar seu comprimento de persistência.

Marko e Siggia [20] propuseram uma expressão aproximada, mas muito simples, baseados em teoria de polímeros, com a qual é possível obter o valor de A a partir dessas medidas:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right], \quad (6.2)$$

onde k_B é a constante de Boltzman, T a temperatura, z a distância média entre as extremidades da molécula para um dado valor de F , e L o valor máximo de z , que é denominado comprimento de contorno da molécula.

Esticamos uma molécula de DNA prendendo uma de suas extremidades a uma lamínula de vidro e a outra a uma microesfera de poliestireno de 2.8 μm de diâmetro. O DNA que usamos é o DNA do bacteriófago λ [9] um vírus que infecta a bactéria *Escherichia Coli*. Seu comprimento de contorno é de 16.5 μm .

Para obtermos uma amostra na qual encontramos DNA e microesferas nas condições acima descritas adotamos o seguinte protocolo [21]:

- Em 1 ml de PBS (“Phosphate Buffer Saline” [22]) pH 5.5 colocamos 1 μl da solução estoque de microesferas de poliestireno - solução *a*.

- Descongelamos o DNA (550 $\mu g/ml$) colocando-o em um banho térmico a 62°C por 5 minutos.

- Juntamos 180 μl da solução *a*, 136 μl de PBS pH 5.5 e 5 μl da solução estoque de DNA, descongelada; homogeneizamos essa solução com cuidado e a deixamos em repouso por 20 minutos - solução *b*.

- Para cada amostra usamos cerca de 100 μl da solução *b*.

- Esperamos 24 horas e em seguida lavamos as amostras e as preenchemos com solução de PBS pH 7.4.

O pH final da solução com o DNA é 7.4, mesmo pH em que ele é encontrado em condições fisiológicas.

Ao fim do processo encontramos: DNA grudado apenas à lamínula, DNA grudado apenas à microesfera, DNA livre, microesfera livre e DNA grudado à lamínula e à microesfera (FIG. 6.3).

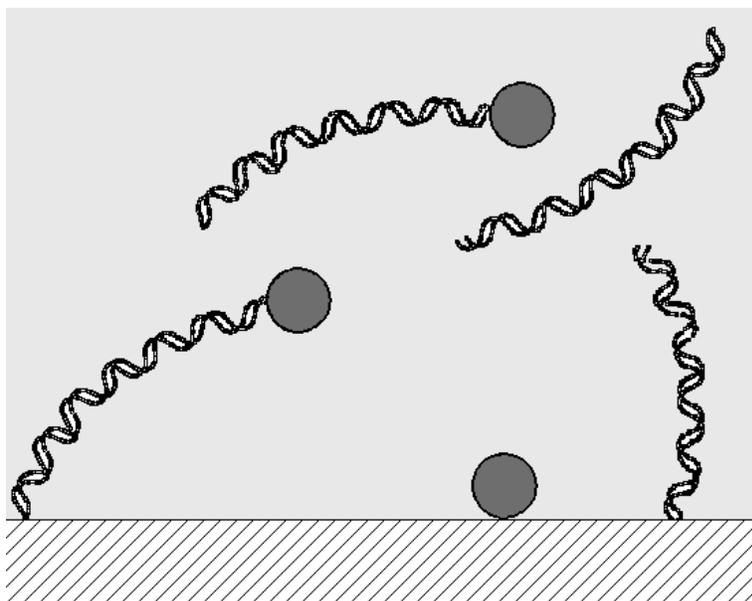


Figura 6.3: Possibilidades de situações para microesferas e DNA numa amostra.

Para escolhermos a situação em que temos o DNA ligado pelas extremidades à microesfera e à lamínula, deslocamos a microesfera em várias direções e verificamos se a molécula de DNA têm o mesmo comprimento em todas elas (FIG. 6.4).

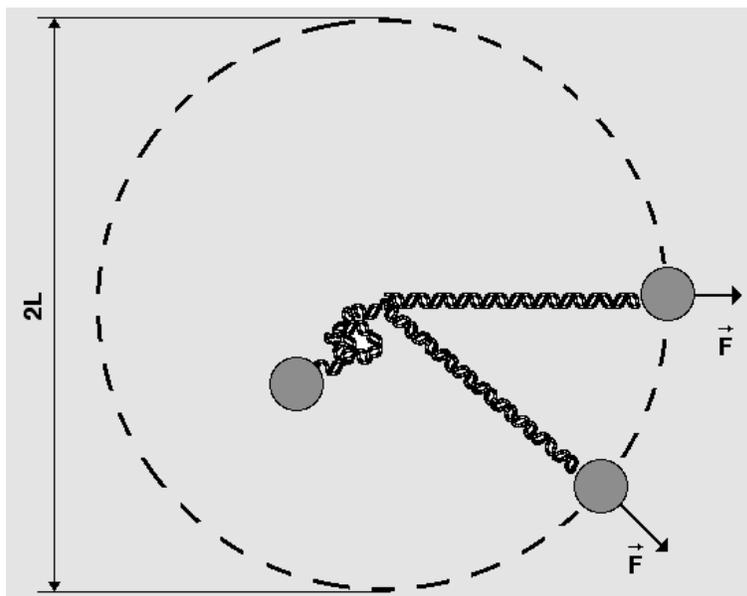


Figura 6.4: Critério para escolha de um conjunto DNA-microesfera.

Para medirmos a força necessária para manter a molécula de DNA com dada extensão z usamos a pinça óptica como sensor de força. De modo semelhante ao que fizemos no método da força de Stokes para medir k_x , usamos o perfil de retroespalhamento para saber quanto a microesfera sai de sua posição de equilíbrio na pinça quando o DNA é esticado. Na FIG. 6.5 mostramos um gráfico da intensidade retroespalhada em função da projeção x da extensão do DNA no plano da lamínula, $x = \sqrt{z^2 - h^2}$ onde $h = 3.5 \mu m$. Usando o tempo característico da função de correlação acumulada quando o DNA está enovelado, obtemos o valor da constante de força k_x . Com esses dois resultados obtemos a força da pinça, que é igual, em módulo, à componente x da força que atua sobre o DNA.

Na FIG. 6.6 mostramos um gráfico dessa força em função de x . Em termos de

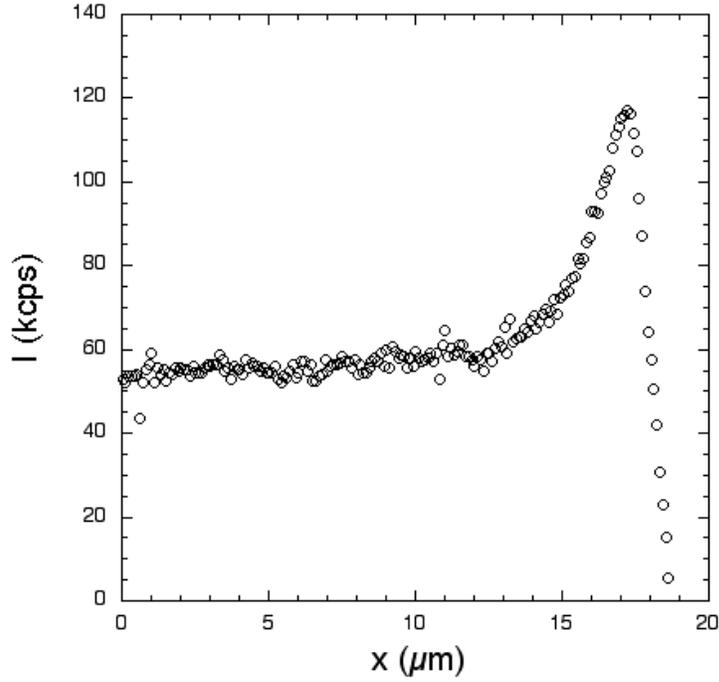


Figura 6.5: $I \times x$.

x escrevemos a Eq. (6.2) como:

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x^2 + h^2}}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x}{\sqrt{x^2 + h^2}}. \quad (6.3)$$

A linha contínua na FIG.6.6 corresponde ao ajuste de $F_x(x)$ usando a Eq. (6.3), onde A e L são os parâmetros de ajuste. Encontramos para essa medida $A = 41.0 \pm 0.9 \text{ nm}$ e $L = 19.53 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{m}$. Considerando outras medidas, feitas com moléculas diferentes sob as mesmas condições encontramos A variando de 40 a 48 nm e L de 13 a 22 μm . Esses resultados estão em acordo com resultados descritos na literatura [23, 24].

6.3 Microcalorímetro e Teste Parcial de Uma Teoria Sobre Pinçamento Óptico

A constante de força da pinça óptica depende linearmente da potência da luz

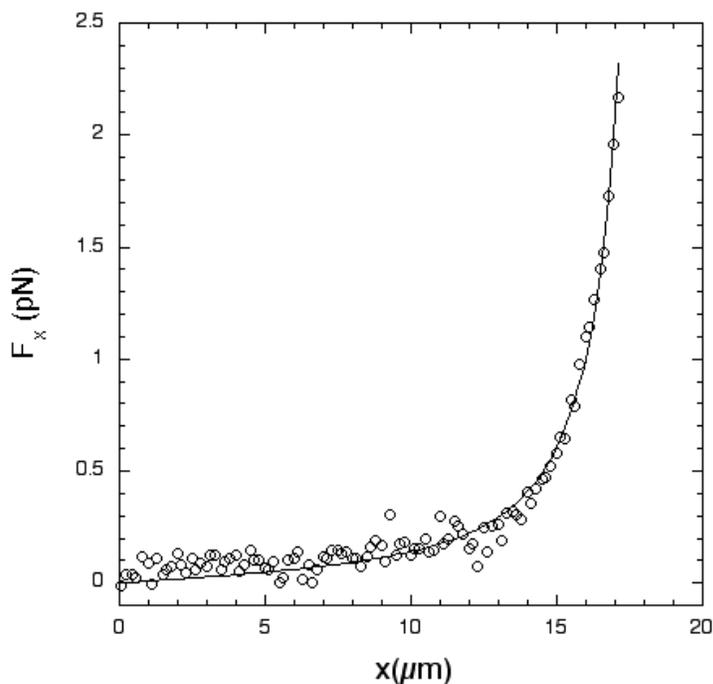


Figura 6.6: $F_x \times x$.

que ilumina a microesfera pinçada [5]. Para compararmos nossos resultados com as teorias disponíveis sobre pinçamento óptico precisamos saber o valor dessa potência em nossos experimentos.

Medi-la, no entanto, não é simples como poderíamos imaginar. Por exemplo, a potência medida usando um detector de fótons sobre a objetiva e a amostra não é a mesma potência que chega na microesfera pinçada. Isso porque devido à grande abertura numérica da objetiva, vários feixes ($\theta > 61^\circ$) são totalmente refletidos na interface água-vidro e outros são refratados com ângulos grandes em relação ao eixo da objetiva em cada interface água-ar ou vidro-água que o laser encontra. Esses feixes não alcançam o detector que está colocado sobre a amostra e a potência medida nessa situação é menor que a potência real chegando na microesfera.

Para resolvermos esse problema desenvolvemos um microcalorímetro para medir a potência local que chega a uma microesfera próxima à interface vidro-água de nossas amostras.

A FIG. 6.7 mostra um esquema do microcalorímetro.

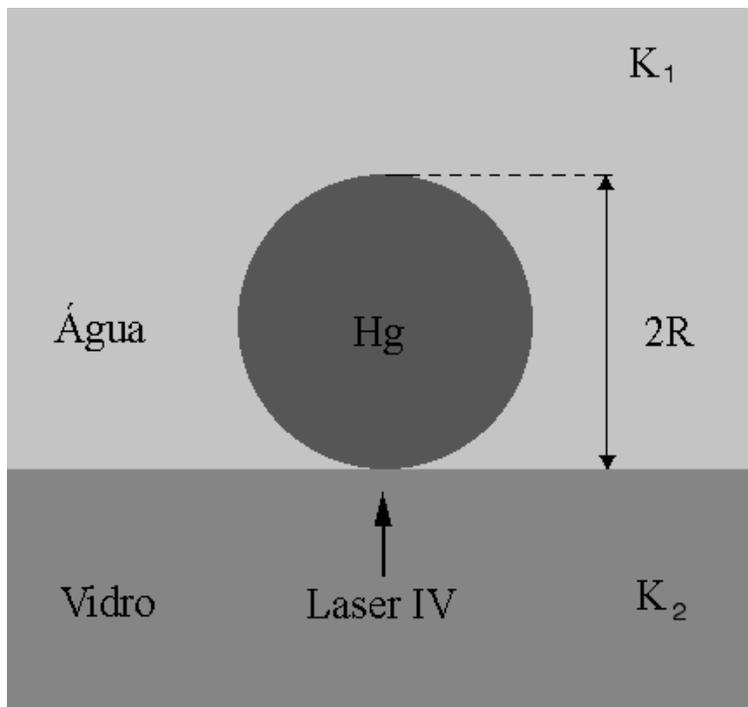


Figura 6.7: Esquema do microcalorímetro.

O microcalorímetro é feito com microesferas de mercúrio, na faixa de 1 a $4\ \mu m$ de raio. Incidimos o laser sobre uma microesfera de Hg imersa em água e devido à absorção da luz do laser pelo Hg a esfera começa a aquecer. O sistema atinge o estado estacionário em menos de $1\ s$ para cada valor de potência. Quando aumentamos a potência e a microesfera atinge a temperatura local de ebulição da água ($T_b = 97.2^\circ C$) ela salta, o que torna esse ponto fácil de ser determinado. Como o coeficiente de absorção do Hg para o comprimento de onda que usamos é conhecido, podemos determinar a potência local chegando na microesfera.

Uma dificuldade que encontramos ao construir o microcalorímetro foi produzir microesferas de Hg com raios na escala de micrón. Para obtê-las, primeiramente colocamos uma gota de cerca de $2\ mm$ de diâmetro entre duas folhas de papel limpas e, batendo nas folhas, produzimos várias gotas na faixa de 50 a $100\ \mu m$ de diâmetro. Escolhemos então, uma entre as menores e a colocamos no porta-amostras sem água. Incidindo sobre ela o laser com potência máxima evaporamos o Hg , que condensa logo em seguida, numa região próxima, em forma de pequenas microesferas com diâmetros na faixa desejada. Preenchemos então, o porta-amostras com água e

fazemos as medidas.

A equação de condução de calor, com um termo de fonte de potência constante, para estados estacionários é escrita como:

$$\nabla^2 T = -\frac{p}{K}, \quad (6.4)$$

onde T representa o campo de temperatura, p a densidade de potência e K a condutividade térmica do meio.

A condutividade térmica do Hg é cerca de 13 vezes maior que a da água. Assim, podemos considerar que a microesfera de Hg tem temperatura uniforme. Como essas microesferas têm diâmetro na escala de micrômetro, podemos considerar o sistema infinitamente grande para cima e para os lados e limitado inferiormente pela espessura da lamínula de vidro ($170 \mu m$).

Para estimarmos o intervalo de tempo que o sistema leva para atingir o estado estacionário consideraremos o coeficiente de difusão térmica da água $D_A = 1.4 \times 10^{-3} cm^2/s$ e a espessura da lamínula de vidro como comprimento característico. Encontramos um tempo de $0.1 s$. Assim, após mudarmos a potência do laser, o sistema leva cerca de $0.1 s$ para atingir o estado estacionário novamente.

Precisamos determinar a temperatura T na superfície da microesfera de Hg , que absorve potência P_a , imersa em um meio semi-infinito (água), com condutividade térmica K_1 em contato com outro meio semi-infinito (vidro), com condutividade térmica K_2 . Esse problema foi resolvido pelo Prof. Ricardo S. Schor, usando o método de imagens. Considerando a temperatura no infinito igual a T_0 e a geometria descrita na FIG. 6.7, a solução possui uma forma fechada:

$$T = T_0 + \frac{P_a}{4\pi K_{eff} R}, \quad (6.5)$$

com

$$K_{eff} = -\frac{K_1}{\delta} \ln(1 - \delta), \quad (6.6)$$

e

$$\delta = \frac{K_2 - K_1}{K_2 + K_1}. \quad (6.7)$$

Detalhes dessa solução estão no Apêndice B.

Usando os valores de K_1 e K_2 para $100^\circ C$ (tabela 6.1), obtemos $K_{eff} = 0.781 \pm 1\% W/mK$.

<i>Material</i>	<i>K (W/mK)</i>		<i>índice de refração</i> $\lambda = 832 \text{ nm}$
	25°C	100°C	
Hg	8.25	9.43	$3.035 + i 6.306$
Água	0.6071	0.6791	1.314 (100°C)
Vidro	1.01	1.13	1.50

Tabela 6.1: Valores de índice de refração e condutividade térmica para os materiais usados nesta tese [25].

A potência absorvida P_a é igual à potência local P_L chegando à microesfera multiplicada pelo coeficiente de absorção do Hg para o comprimento de onda do laser ($\lambda = 832 \text{ nm}$) usado.

Durante as medidas, ajustamos o foco do laser de modo que ele ficasse próximo do centro da microesfera de Hg . Assim, consideramos os feixes em incidência normal na microesfera.

Nessa situação, o coeficiente de absorção do Hg em contato com água é dado por [26]:

$$A = \frac{\frac{4n}{n_{H_2O}}}{\left(1 + \frac{n}{n_{H_2O}}\right)^2 + \left(\frac{\kappa}{n_{H_2O}}\right)^2}, \quad (6.8)$$

onde n e κ são, respectivamente, as partes real e imaginária do índice de refração do Hg e n_{H_2O} é o índice de refração da água.

Usando os valores de n , κ e n_{H_2O} indicados na Tabela 6.1 encontramos $A = 0.272$.

Como a temperatura na microesfera de Hg , quando ela salta, é a temperatura local de ebulição da água, $T_b = 97.2^\circ\text{C}$, podemos escrever a potência local como:

$$P_L = \frac{1}{A} (T_b - T_0) 4\pi K_{eff} R. \quad (6.9)$$

Medimos o raio da microesfera de mercúrio analisando sua imagem (FIG. 6.8). Fazemos o gráfico dos níveis de cinza ao longo de uma direção que passa pelo diâmetro da microesfera, em função da distância. Consideramos o diâmetro da microesfera o intervalo entre as posições onde o nível de cinza é a média entre seus valores máximo e mínimo.

Uma vez medido o raio da microesfera de Hg podemos determinar a potência local usando a Eq. (6.9).

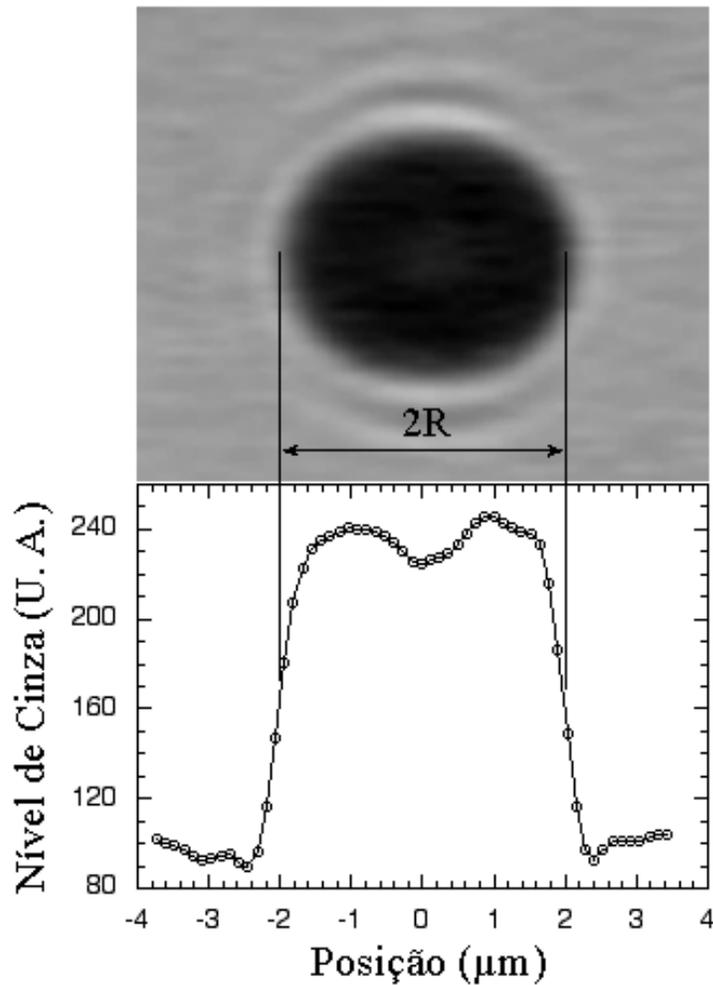


Figura 6.8: Imagem da microesfera de Hg e gráfico de níveis de cinza ao longo do diâmetro, em função da distância.

Consideramos, até agora, na análise do microcalorímetro, apenas transporte de calor por difusão. Sabemos, no entanto, que com o aumento da temperatura da água, transporte por convecção pode estar presente, aumentando a condutividade térmica efetiva do sistema. Efeitos convectivos podem ser desprezados se $|(\vec{V} \cdot \vec{\nabla})T| \ll |D_A \nabla^2 T|$, onde \vec{V} é a velocidade da água e D_A seu coeficiente de difusão térmica. Considerando novamente $l = 170 \mu m$ como comprimento típico do sistema devemos ter $V \ll \frac{D}{l} = 824 \mu m/s$.

Usando microesferas de poliestireno de $1 \mu m$ de diâmetro e analisando seu

movimento em situações próximas ao salto da microesfera de *Hg*, encontramos que sua velocidade é de cerca de $20 \mu\text{m/s}$. Assim, podemos desprezar os efeitos de convecção da água em nossa análise.

Medimos a potência que entra na objetiva P_E , para as nossas condições de trabalho. Com o microcalorímetro podemos saber, quanto dessa potência chega à amostra. Para isso, assumimos que $P_L = T_r P_E$, onde T_r é o coeficiente de transmissão da objetiva + interface vidro-água. Assim, podemos reescrever a Eq. (6.9) como:

$$R = \frac{AT_r}{4\pi K_{eff} (T_b - T_0)} P_E. \quad (6.10)$$

Na FIG. 6.9 mostramos os resultados das medidas de R em função de P_E . Usando $A = 0.272$, $K_{eff} = 0.781 \text{ W/mK}$, $T_0 = 25.1^\circ\text{C}$ e $T_b = 97.2^\circ\text{C}$, encontramos

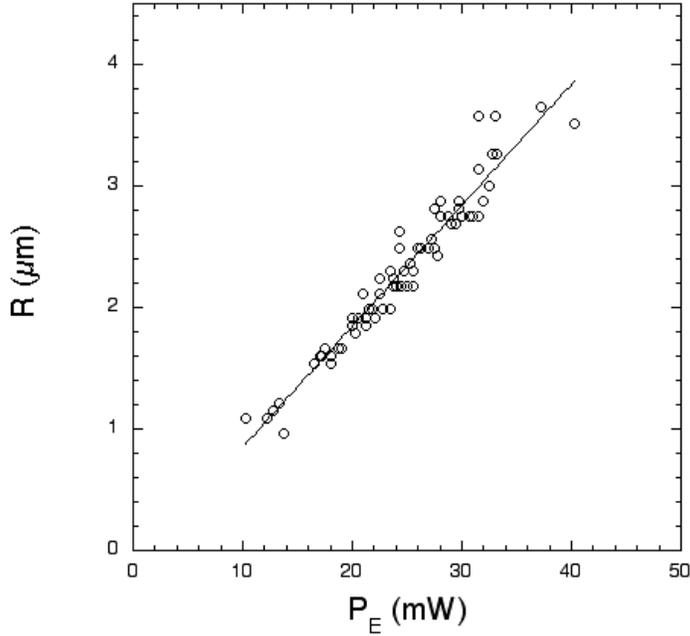


Figura 6.9: $R \times P_E$.

$$T_r = 0.26 \pm 5\%.$$

Medimos também a constante de força k_x de nossa pinça óptica para a micro-

esfera de $1.4 \mu m$ de raio, próxima à lâmina ($h = 3.5 \mu m$). Na FIG. 6.10 mostramos o resultado dessa medida. Encontramos para a reta descrita pelo ajuste de $k_x \times P_L$

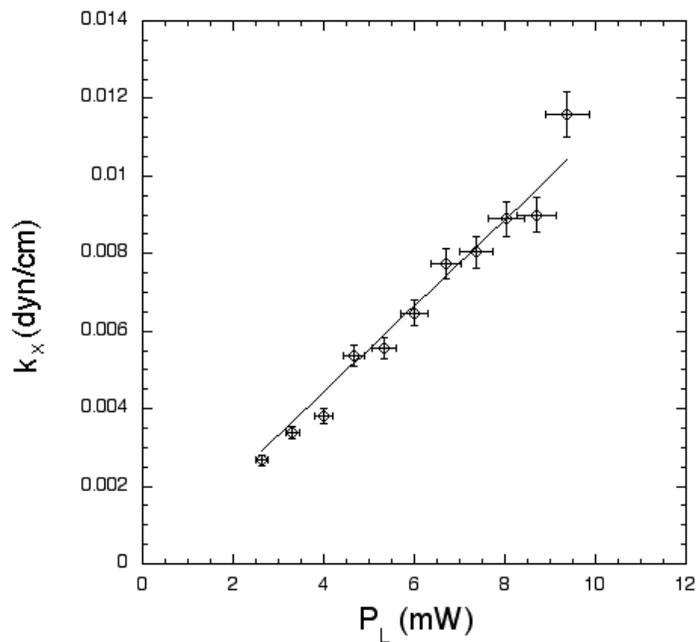


Figura 6.10: Constante de força da pinça em função da potência local chegando na microesfera.

uma inclinação de $(1.12 \pm 10\%) \text{ dyn/cmW}$. Para os parâmetros de nosso experimento, cálculos feitos por Alexander Mazzoli e Paulo Américo Maia Neto, usando a condição seno de Abbe, dão para essa inclinação o valor de 0.94 dyn/cmW (óptica geométrica) e 0.93 dyn/cmW (teoria exata) [27]. Os resultados experimentais e a teoria concordam dentro de 20%.

Capítulo 7

Conclusões

Nesta tese usamos a técnica de correlação de intensidades para estudar o movimento Browniano de uma microesfera presa numa pinça óptica. Mostramos que essa técnica possibilita dois meios independentes de medir a constante de força da pinça, consistentes entre si. Mostramos também que eles são consistentes com outro método, o da Força de Stokes que é comumente utilizado para caracterizar pinças ópticas. Apresentamos três aplicações do pinçamento óptico e da metodologia desenvolvida: medida do coeficiente de atrito sobre a microesfera em função da distância de seu centro de massa à interface água-vidro da amostra, medida do comprimento de persistência de uma molécula de DNA e medida da relação entre constante de força da pinça e potência chegando na microesfera pinçada. Esses resultados indicam que a metodologia que desenvolvemos pode ser consistentemente utilizada.

Apêndice A

Relação Entre Correlações de Intensidade e Correlações de Posição para um Perfil Gaussiano

Consideremos uma microesfera, cuja posição média do centro de massa é x_{0i} , movendo-se num perfil gaussiano de luz retroespalhada dado por:

$$I(x_i) = I_0 \prod_i \exp\left(-\frac{x_i^2}{2\sigma_i^2}\right). \quad (\text{A.1})$$

Consideremos também que a posição da microesfera flutua em torno de seu valor médio x_{0i} com amplitude Δx_i . Podemos escrever sua posição no perfil x_{pi} como:

$$x_{pi} = x_{0i} + \Delta x_i, \quad (\text{A.2})$$

sendo que Δx_i possui média nula. x_{pi} flutua no tempo acompanhando Δx_i e a função de correlação das intensidades pode ser escrita como:

$$\langle I(0)I(t) \rangle = I_0^2 \left\langle \prod_i \exp\left(-\frac{[x_{pi}(0)^2 + x_{pi}(t)^2]}{2\sigma_i^2}\right) \right\rangle. \quad (\text{A.3})$$

Definindo:

$$x_{pi}^+(t) = \frac{1}{\sqrt{2}}[x_{pi}(t) + x_{pi}(0)], \quad (\text{A.4})$$

e

$$x_{pi}^-(t) = \frac{1}{\sqrt{2}}[x_{pi}(t) - x_{pi}(0)], \quad (\text{A.5})$$

temos:

$$\langle x_{pi}^+(t)x_{pi}^-(t) \rangle = 0, \quad (\text{A.6})$$

as novas variáveis são descorrelacionadas! Além disso:

$$x_{pi}^+(t)^2 + x_{pi}^-(t)^2 = x_{pi}(0)^2 + x_{pi}(t)^2. \quad (\text{A.7})$$

Assim, podemos escrever a função de correlação das intensidades em termos das novas variáveis $x_{pi}^+(t)$ e $x_{pi}^-(t)$:

$$\langle I(0)I(t) \rangle = I_0^2 \left\langle \prod_i \exp \left(-\frac{[x_{pi}^+(t)^2 + x_{pi}^-(t)^2]}{2\sigma_i^2} \right) \right\rangle. \quad (\text{A.8})$$

Devido à Eq. (A.6):

$$\langle I(0)I(t) \rangle = I_0^2 \prod_i \left\langle \exp \left(-\frac{x_{pi}^+(t)^2}{2\sigma_i^2} \right) \right\rangle \left\langle \exp \left(-\frac{x_{pi}^-(t)^2}{2\sigma_i^2} \right) \right\rangle. \quad (\text{A.9})$$

As variáveis $x_{pi}^+(t)$ e $x_{pi}^-(t)$, assim como x_{pi} e Δx_i são gaussianas. Para uma variável gaussiana x a operação $\langle B \rangle$ corresponde a realizar a média de B considerando todos os valores possíveis de x , pesados por:

$$P(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi(\langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2)}} \exp \left[-\frac{(x - \langle x \rangle)^2}{2(\langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2)} \right], \quad (\text{A.10})$$

ou seja:

$$\langle B \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} P(x)B(x)dx. \quad (\text{A.11})$$

Temos, usando as Eqs. (A.2, A.4 e A.5) que:

$$\langle x_{pi}^+(t) \rangle = \sqrt{2}x_{0i}, \quad (\text{A.12})$$

$$\langle x_{pi}^+(t)^2 \rangle = 2x_{0i}^2 + \langle \Delta x_i^2 \rangle + \langle \Delta x_i(0)\Delta x_i(t) \rangle, \quad (\text{A.13})$$

$$\langle x_{pi}^-(t) \rangle = 0 \quad (\text{A.14})$$

e

$$\langle x_{pi}^-(t)^2 \rangle = \langle \Delta x_i^2 \rangle - \langle \Delta x_i(0)\Delta x_i(t) \rangle. \quad (\text{A.15})$$

Usando as Eqs. (A.10 e A.11) e fazendo a média de $\exp(-x^2/2\sigma^2)$ encontramos:

$$\left\langle \exp \left(-\frac{x^2}{2\sigma^2} \right) \right\rangle = \frac{\sigma}{\sqrt{\sigma^2 + \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2}} \exp \left[-\frac{\langle x \rangle^2}{2(\sigma^2 + \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2)} \right]. \quad (\text{A.16})$$

Definindo:

$$\langle + \rangle = \left\langle \exp \left(-\frac{x_{pi}^+(t)^2}{2\sigma_i^2} \right) \right\rangle \quad (\text{A.17})$$

e

$$\langle - \rangle = \left\langle \exp \left(-\frac{x_{pi}^-(t)^2}{2\sigma_i^2} \right) \right\rangle, \quad (\text{A.18})$$

temos, usando as Eqs (A.12, A.13, A.14, A.15 e A.16):

$$\langle + \rangle = \frac{\sigma_i}{\sqrt{\sigma_i^2 + \langle \Delta x_i^2 \rangle + \langle \Delta x_i(0) \Delta x_i(t) \rangle}} \exp \left[-\frac{x_{0i}^2}{\sigma_i^2 + \langle \Delta x_i^2 \rangle + \langle \Delta x_i(0) \Delta x_i(t) \rangle} \right] \quad (\text{A.19})$$

e

$$\langle - \rangle = \frac{\sigma_i}{\sqrt{\sigma_i^2 + \langle \Delta x_i^2 \rangle - \langle \Delta x_i(0) \Delta x_i(t) \rangle}}. \quad (\text{A.20})$$

Finalmente:

$$\begin{aligned} \langle I(0)I(t) \rangle &= \frac{\sigma_i^2}{\sqrt{[\sigma_i^2 + \langle \Delta x_i^2 \rangle]^2 - \langle \Delta x_i(0) \Delta x_i(t) \rangle^2}} \times \\ &\exp \left[-\frac{x_{0i}^2}{\sigma_i^2 + \langle \Delta x_i^2 \rangle + \langle \Delta x_i(0) \Delta x_i(t) \rangle} \right]. \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

Apêndice B

Solução do Problema de Condução de Calor para o Microcalorímetro

Este problema é análogo ao problema eletrostático de uma esfera metálica carregada com carga Q , em um meio dielétrico semi-infinito com constante dielétrica ϵ_1 em contato com outro meio dielétrico semi-infinito com constante dielétrica ϵ_2 . Ele foi resolvido pelo Prof. Ricardo S. Schor, usando o método de imagens e os seguintes resultados [26]:

- Potencial devido a uma carga puntual q num meio de constante dielétrica ϵ_1 , situada à distância H de outro meio com constante dielétrica ϵ_2 (FIG. B.1). Estamos interessados em achar o potencial elétrico para o lado direito da FIG. B.1 (meio com constante dielétrica ϵ_1). Para isso, devemos colocar uma carga imagem q' na posição $-H$ para satisfazer as condições de contorno na interface, cujo valor é:

$$q' = - \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1} \right) q. \quad (\text{B.1})$$

- Potencial elétrico devido a uma carga puntual q , à distância y do centro de uma esfera metálica descarregada (FIG. B.2). A carga imagem, nesse caso, tem que ser colocada na posição:

$$y' = \frac{R^2}{y} \quad (\text{B.2})$$

e seu valor é:

$$q' = -\frac{R}{y}q. \quad (\text{B.3})$$

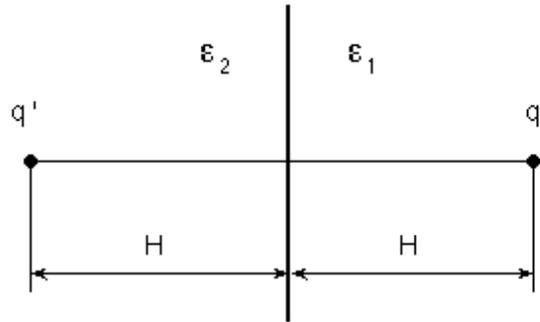


Figura B.1: Esquema para carga pontual q e dois meios dielétricos.

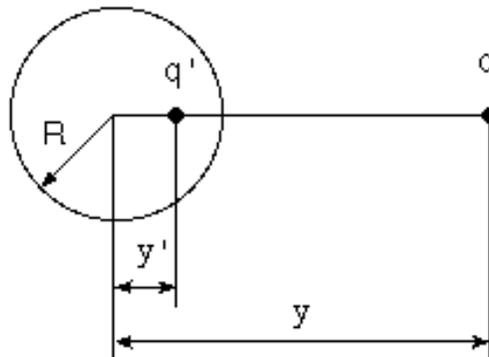


Figura B.2: Esquema para carga pontual q e uma esfera metálica descarregada.

Consideremos agora o problema de uma esfera metálica com carga q_0 , cujo centro está à distância H da interface entre dois meios dielétricos de constantes dielétricas ϵ_1 e ϵ_2 (FIG. B.3).

Para satisfazer as condições de contorno na interface, devemos colocar uma carga imagem q'_0 na posição $-H$:

$$q'_0 = - \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1} \right) q_0. \quad (\text{B.4})$$

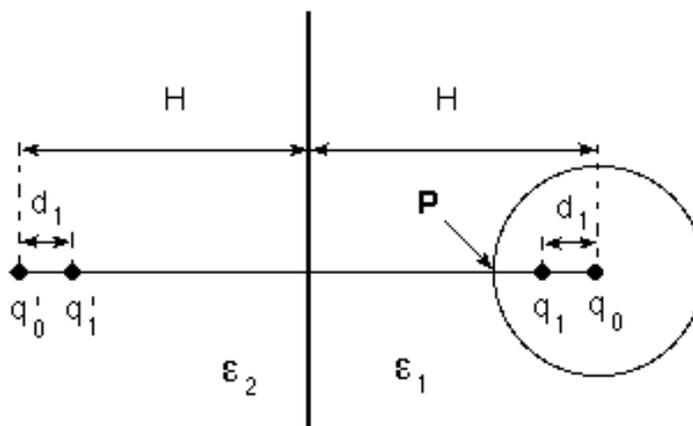


Figura B.3: Esquema para uma esfera metálica e dois meios dielétricos.

Mas, ao colocarmos a carga imagem q'_0 o potencial na superfície da esfera é desbalanceado. Precisamos, então, colocar outra carga imagem q_1 , à distância y_1 do centro da esfera para equilibrar o potencial em sua superfície novamente:

$$q_1 = -\frac{R}{2H}q'_0 \quad (\text{B.5})$$

e

$$d_1 = \frac{R^2}{2H}. \quad (\text{B.6})$$

Ao introduzirmos a carga q_1 , novamente o potencial na interface é desbalanceado e para acertarmos as condições de contorno, nova carga imagem q'_1 deve ser colocada na posição $-H + d_1$:

$$q'_1 = -\left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1}\right)q_1. \quad (\text{B.7})$$

Esse processo tem que ser feito infinitas vezes.

Definindo:

$$\delta = \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1}\right), \quad (\text{B.8})$$

e escolhendo adequadamente as cargas imagens e suas posições, montamos uma tabela com os valores de q , d e q' (Tabela B.1).

q_0	$d_0 = 0$	$q'_0 = -\delta q_0$
$q_1 = -\frac{R}{2H}q'_0$	$d_1 = \frac{R^2}{2H}$	$q'_1 = -\delta q_1$
$q_2 = -\frac{R}{2H-d_1}q'_1$	$d_2 = \frac{R^2}{2H-d_1}$	$q'_2 = -\delta q_2$
\vdots	\vdots	\vdots
$q_{n+1} = -\frac{R}{2H-d_n}q'_n$	$d_{n+1} = \frac{R^2}{2H-d_n}$	$q'_{n+1} = -\delta q_{n+1}$

Tabela B.1: Valores das cargas imagens e das posições d .

Da Tabela B.1 vemos que:

$$q_{n+1} = \frac{d_{n+1}}{R}\delta q_n. \quad (\text{B.9})$$

Podemos, agora, calcular o potencial na posição P da superfície da esfera metálica, indicada na FIG. B.3:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \left[\sum_{n=0}^{\infty} \frac{q_n}{R-d_n} + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q'_n}{2H-R-d_n} \right], \quad (\text{B.10})$$

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{q_n}{R-d_n} - \frac{\delta q_n}{2H-R-d_n} \right). \quad (\text{B.11})$$

Mas:

$$2H-d_n-R = \frac{R(R-d_{n+1})}{d_{n+1}}. \quad (\text{B.12})$$

Assim:

$$\frac{\delta q_n}{2H-R-d_n} = \left(\frac{d_{n+1}}{R}\delta q_n \right) \frac{1}{R-d_{n+1}}. \quad (\text{B.13})$$

Usando a Eq. (B.9):

$$\frac{\delta q_n}{2H-R-d_n} = \frac{q_{n+1}}{R-d_{n+1}}, \quad (\text{B.14})$$

assim:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{q_n}{R-d_n} - \frac{q_{n+1}}{R-d_{n+1}} \right). \quad (\text{B.15})$$

A série descrita na Eq. (B.15) é uma série telescópica. Os únicos termos que não se cancelam no somatório são o primeiro e o termo do limite $n \rightarrow \infty$. Assim, podemos escrever:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \left(\frac{q_0}{R} - \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{q_n}{R-d_n} \right). \quad (\text{B.16})$$

Quando $n \rightarrow \infty$, $d_n \rightarrow d$:

$$d = \lim_{n \rightarrow \infty} d_n = \frac{R^2}{2H - d}, \quad (\text{B.17})$$

$$d = H - \sqrt{H^2 - R^2}. \quad (\text{B.18})$$

Quando $n \rightarrow \infty$, $q_n \rightarrow q$:

$$q = \lim_{n \rightarrow \infty} q_n = \frac{d}{R} \delta q, \quad (\text{B.19})$$

$$q = 0. \quad (\text{B.20})$$

Assim:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{q_0}{R}. \quad (\text{B.21})$$

Para determinarmos o valor de q_0 usamos a lei de Gauss numa superfície esférica bem próxima à superfície da esfera metálica:

$$\sum_{n=0}^{\infty} q_n = Q, \quad (\text{B.22})$$

onde Q é a carga total na esfera metálica. Usando a Eq. (B.9) escrevemos:

$$q_n = \delta^n \prod_{j=1}^n \left(\frac{d_j}{R} \right) q_0, \quad n \geq 1. \quad (\text{B.23})$$

Assim:

$$Q = q_0 \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \delta^n \prod_{j=1}^n \left(\frac{d_j}{R} \right) \right]. \quad (\text{B.24})$$

Da Eq. (B.24) obtemos a relação entre q_0 e a carga total na esfera, Q , e finalmente, escrevemos:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{Q}{R} \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \delta^n \prod_{j=1}^n \left(\frac{d_j}{R} \right) \right]^{-1}. \quad (\text{B.25})$$

No caso de $H = R$ há uma expressão fechada para a Eq. (B.25). Temos para essa situação que:

$$d_n = \frac{n}{n+1} R. \quad (\text{B.26})$$

Assim:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{Q}{R} \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \delta^n \prod_{j=1}^n \left(\frac{j}{j+1} \right) \right]^{-1}. \quad (\text{B.27})$$

Mas:

$$\prod_{j=1}^n \frac{j}{j+1} = \frac{1}{n+1}, \quad (\text{B.28})$$

logo:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_1} \frac{Q}{R} \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\delta^n}{n+1} \right]^{-1}. \quad (\text{B.29})$$

Temos também que:

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{\delta^{n+1}}{n+1} = -[\delta + \ln(1-\delta)], \quad (\text{B.30})$$

e:

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{\delta^n}{n+1} = -\frac{1}{\delta} [\delta + \ln(1-\delta)]. \quad (\text{B.31})$$

Substituindo a Eq. (B.31) na expressão para o potencial Eq. (B.29) teremos:

$$\varphi_P = \frac{1}{4\pi\epsilon_{eff}} \frac{Q}{R}, \quad (\text{B.32})$$

onde:

$$\epsilon_{eff} = -\frac{\epsilon_1}{\delta} \ln(1-\delta) \quad (\text{B.33})$$

e

$$\delta = \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + \epsilon_1} \right).$$

Para obtermos a solução do problema de condução de calor fazemos $\varphi_P \rightarrow T - T_0$, $\epsilon_1 \rightarrow K_1$, $\epsilon_2 \rightarrow K_2$ e $Q \rightarrow P_a$ nas Eq. (B.8, B.32 e B.33).

Apêndice C

Artigos Submetidos

Em anexo seguem os artigos que resultaram do trabalho apresentado nesta tese.

O artigo cujo título é “Dynamic Light Scattering From an Optically Trapped Microsphere” foi aceito para publicação na revista “Physical Review E”. O artigo teve uma ótima aceitação pelos árbitros internacionais que o julgaram. Abaixo transcrevemos suas palavras.

Referee 1

The present work deals with a dielectric microsphere, trapped by an optical (IR) tweezer. First of all I would like to say that the paper is very well organised and very clearly written. My only remark is that the set-up figure could perhaps have been put earlier, in the discussion of the introduction. This one is a bit difficult to follow without the simplification if visualisation.

The paper discusses the method and underlying theory. Thermal fluctuations of the microsphere are described by a Langevin equation. Measurement of the correlation function of the scattering of a second light beam facilitates the measurement of the stiffness of the tweezer, and of the viscosity of the medium. Different complementary methods are discussed, and two interesting applications among which the measurement of the entropic elasticity of DNA. A difference with previous work is the

off-centered location of the sphere in the tweezer, which gives rise to optical oscillations that are the same as the ones of the bead itself.

I really enjoyed reading this work. This is work “comme il faut”. It is easy to recommend publication in PRE.

Referee 2

This paper describes experiments and theory on dynamic light scattering from optically trapped microspheres. This is a comprehensive extension of localized dynamic light scattering to the case in which the optical trap and the scattering beam are not necessarily collinear, as well as using back scattering. This offers a quantitative approach to track the dynamics of motion and to measure simultaneously trap stiffness and friction on bead. In particular, I find useful and instrumental their Integral Method for scanning the relative displacement of trap and scattering beam profiles.

I have one technical question related to auto-correlation functions (ACF) measured by back scattering, which the authors may wish to address. The signal-to-noise ratio of an ACF, or its dynamic range, is best seen on a log scale. It is hard to determine from figures 5 & 11 what is the dynamic range of the measurement. This is particular important in this case since accurate determination of both the x and z time scales requires at least one decade of signal. However, I trust that the authors have given this careful consideration.

The manuscript is well written, clear and elegant. I commend the authors for their work and I encourage them to take the next step and study a more biophysical problem. I recommend publication in Physical Review E.

O artigo cujo título é “In Situ Measurement of Laser Power at the Focus of a High Numerical Aperture Objective Using a Micro-Calorimeter” foi submetido para publicação na revista “Applied Physics Letters”.

Referências Bibliográficas

- [1] A. Ashkin, Phys. Rev. Lett. **24**, 156 (1970).
- [2] A. Ashkin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 4853 (1997).
- [3] C. Bustamante, J. F. Marko e E. D. Siggia, Science **265** 1599 (1994).
- [4] G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky e A. J. Libchaber, Natl. Acad. Sci. USA **96** 7916 (1999).
- [5] P. A. Maia Neto e H. M. Nussenzveig, Europhys. Lett. **50**, 702 (2000).
- [6] A. Ashkin, Biophys. J. **61**, 569 (1992).
- [7] Cálculos feitos partindo da análise feita por A. Fontes em sua Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas, 1999.
- [8] A. Ashkin e J. M. Dziedzic, Science **235**, 1517 (1987).
- [9] L. Stryer, *Biochemistry*, (W. H. Freeman and Company, New York, 1995).
- [10] R. Brown, Ann. d. Phys. u. Chem. **14**, 294 (1828).
- [11] *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*, editado por R. Fürf (Dover Publications, New York, 1956).
- [12] H. B. Callen e T. A. Welton, Phys. Rev. **83** 34 (1951).
- [13] F. Reif, *Fudamentals of Statistical and Thermal Physics*, (McGraw-Hill, New York, 1965).
- [14] N. B. Viana, R. T. S. Freire e O. N. Mesquita, a ser publicado na revista Phys. Rev. E (2002).

- [15] R. Bar-Ziv, A. Meller, T. Tlusty, E. Moses, J. Stavans e S. A. Safran, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 154 (1997); A. Meller, R. Bar-Ziv, T. Tlusty, E. Moses, J. Stavans e S. A. Safran, *Biophys. J.* **74**, 1541 (1998).
- [16] M. I. M. Feitosa e O. N. Mesquita, *Phys. Rev. A* **544**, 6677 (1991).
- [17] J. D. Watson e F. H. C. Crick, *Nature* **171** 737 (1953).
- [18] J. F. (Jr) Miescher, *Die histochemischen und physiologischen Arbeitne von Friedrich Miesher. Gesammelt un herausgegeben von seinen Freunden*, Leipzig.
- [19] R. E. Franklin e E. G. Goslind, *Nature* **172** 156 (1953).
- [20] J. F. Marko e E. D. Siggia, *Macromolecules* **28**, 8759 (1995).
- [21] G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky e A. J. Libchaber, *Appl. Phys. Lett.* **73**, 291 (1998).
- [22] Usamos PBS com concentração 140 *mM* de Na^+ .
- [23] T. Strick, J. F. Alemand, V. Croquette e D. Bensimon, *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **74**, 115 (2000).
- [24] M. D. Wang, H. Yin, r. Landick, J. Gelles e S. M. Block, *Biophys. J.* **72**, 1335 (1997).
- [25] CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76th edition, CRC Press (1995); a condutividade térmica das lamínulas de vidro usadas foi medida por V. E. de Carvalho, com $\pm 6\%$ de erro.
- [26] J. D. Jackson, *Classical Eletrodynamics*, (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975).
- [27] P. A. Maia Neto, A. Mazolli e H. M. Nussenzveig, comunicação particular (2001).