

PATRÍCIA SANTOS ALVES

TEORIA E CALIBRAÇÃO DE PINÇAS ÓPTICAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

PATRÍCIA SANTOS ALVES

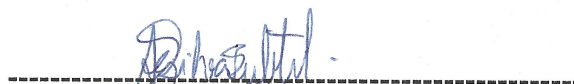
TEORIA E CALIBRAÇÃO DE PINÇAS ÓPTICAS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.



Nathan Bessa Viana



Andreza Germana da Silva Subtil



Alvaro Vianna N. de C. Teixeira
(Coorientador)



Sílvio da Costa Ferreira Junior



Márcio Santos Rocha
(Orientador)

“Almost everything all external expectations, all pride, all fear of embarrassment or failure - these things just fall away in the face of death, leaving only what is truly important. Remembering that you are going to die is the best way I know to avoid the trap of thinking you have something to lose. You are already naked. There is no reason not to follow your heart.” Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos eternos aos meus pais, Jânio e Gorete, que me dedicaram tanto amor e confiança. Ao meu irmão Oscar pelo exemplo e incentivo constante aos estudos. Ao meu namorado Vitor pelo apoio incondicional ao longo desta trajetória em Viçosa.

Agradeço ao professor Márcio pela orientação dedicada e pelas excelentes ideias. Aos demais professores do Departamento de Física que contribuíram para minha formação, em especial aos que colaboraram com a implantação do Laboratório de Física Biológica: Marcelo Lobato, Sílvio, Sukarno, Sidiney e Winder. Aos colegas do Departamento pelos conselhos.

Aos meus familiares e amigos que são o alicerce de mais esta etapa da minha vida.

Ao CNPq e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos; à FUNARBE, à FAPEMIG e às demais agências de fomento que contribuíram para a infraestrutura do laboratório.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 Introdução	1
2 Pinças Ópticas	3
2.1 Funcionamento de uma Pinça Óptica	3
2.2 Teorias de Pinças Ópticas	5
2.2.1 Teoria de Óptica Geométrica	6
2.2.2 Teoria de Rayleigh	17
2.2.3 Teoria MDSA	18
3 Movimento Browniano	20
3.1 Equação de Langevin	20
3.2 Teorema da Flutuação-Dissipação	22
3.3 Movimento Browniano de uma Partícula submetida ao Potencial Harmônico	26
4 Procedimentos experimentais e equipamentos	28
4.1 Montagem experimental	28
4.2 Preparação das amostras	30
4.3 Atrito sobre a microesfera em solução aquosa	30
4.4 Calibração da Pinça Óptica	31

4.4.1	Método da Força de Stokes	31
4.4.2	Método da função autocorrelação de posição da microesfera . . .	33
4.4.3	Método da luz retroespalhada pela microesfera	35
5	Resultados	37
5.1	Resultados Numéricos	37
5.2	Resultados Experimentais	40
5.2.1	Pinça óptica montada com o laser <i>1064-DPSS Altechna Corp.</i> .	40
5.2.2	Pinça óptica montada com o laser <i>IPG Photonics</i> modelo <i>YLR-5-1064-LP</i>	44
5.2.3	Comparação entre a teoria e o experimento	46
6	Conclusões e Perspectivas	48
A	Largura σ do perfil de intensidade gaussiano do laser	49
B	Função Correlação	51
C	Medida da potência na entrada da objetiva e potência local	54
D	Artigo aceito para publicação	56
	Revista <i>Applied Physics B: Lasers and Optics</i>	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

2.1	Esquema de forças na microesfera devido aos raios refratados.	4
2.2	Esquema de forças na microesfera devido aos raios refletidos.	5
2.3	Esquema de raios atingindo a microesfera: (a) Sem aberração esférica; (b) considerando o efeito da aberração esférica.	7
2.4	Microesfera pinçada com o centro deslocado da origem.	8
2.5	Microesfera pinçada com o centro deslocado da origem do sistema de coordenada principal, a origem de cada sistema particular é onde o raio toca o eixo z do sistema principal.	11
2.6	Representação do ângulo máximo θ_0 , limite de integração da Eq. (2.44).	15
3.1	Domínio de integração.	25
4.1	Montagem Experimental.	29
4.2	Microesfera presa a pinça antes e depois de ser estabelecido um fluxo	32
4.3	Função de autocorrelação de posição de uma microesfera sujeita ao po- tencial harmônico em função do tempo.	34
4.4	Gráfico típico de uma função de correlação de intensidades normalizada.	36
5.1	F_z em função de r/a ao longo da direção z . <i>Quadrados cheios</i> : $P_{local} =$ $1,21$ mW, <i>círculos</i> : $P_{local} = 1,37$ mW, <i>triângulos</i> : $P_{local} = 1,54$ mW, <i>quadrados vazios</i> : $P_{local} = 1,71$ mW e <i>discos</i> : $P_{local} = 1,87$ mW.	38
5.2	Força $\times$ deslocamento na direção x para uma microesfera de poliestireno com $a = 1,5$ μm , $h = a$ e $P_{local} = 1,37$ mW. <i>Quadrados</i> : sem aberração; <i>discos</i> : com aberração esférica.	39
5.3	$k_x \times P_{local}$ para uma microesfera de poliestireno com $a = 1,5$ μm , $h = 8,0$ μm . <i>Quadrados</i> : sem aberração; <i>discos</i> : com aberração esférica.	40

5.4	Constante de força da pinça em função da altura h do centro da microesfera pinçada em relação à lamínula. <i>Quadrados</i> : valores da constante de força medidos através da amplitude, <i>discos</i> : valores da constante de força medidos através do tempo característico.	41
5.5	Constante de força da pinça em função da potência relativa para uma altura $h = 8,5 \mu\text{m}$. <i>Quadrados</i> : valores da constante de força medidos através da amplitude, <i>discos</i> : valores da constante de força medidos através do tempo característico.	42
5.6	Histograma das coordenadas x e y da esfera presa na pinça. <i>Círculos</i> : pontos experimentais para a coordenada x ; <i>linha vermelha</i> : ajuste gaussiano na direção x . <i>Quadrados</i> : pontos experimentais para a coordenada y ; <i>linha preta</i> : ajuste gaussiano na direção y	43
5.7	Poço de potencial da pinça óptica nas direções x e y . <i>Círculos</i> : pontos experimentais para o potencial na direção x ; <i>linha vermelha</i> : ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção x . <i>Quadrados</i> : pontos experimentais para o potencial na direção y ; <i>linha preta</i> : ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção y	44
5.8	Constante de força da pinça em função da potência local para uma altura $h = 8,0 \mu\text{m}$. <i>Quadrados</i> : valores da constante de força medidos através do método da luz retroespalhada pela microesfera; <i>discos</i> : valores da constante de força medidos através do método da Força de Stokes e <i>triângulos</i> : valores da constante de força medidos através do método da função autocorrelação de posição da microesfera.	45
5.9	Poço de potencial da pinça óptica nas direções x e y . <i>Círculos</i> : pontos experimentais para o potencial na direção x ; <i>quadrados</i> : pontos experimentais para o potencial na direção y . <i>Linha vermelha</i> : ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção x ; <i>Linha preta</i> : ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção y	46
5.10	Constante de força da pinça em função da potência local para uma altura $h = 8,0 \mu\text{m}$. <i>Círculos</i> : k calculada através do método numérico sem considerar a aberração esférica; <i>discos</i> : k calculada através do método numérico considerando a aberração. <i>Triângulos</i> : k medida através da luz retroespalhada pela microesfera; <i>quadrados</i> : k medida através da Força de Stokes e <i>estrelas</i> : k medida através da função autocorrelação de posição da microesfera.	47

A.1	Potência relativa em função da abertura do diafragma. <i>Discos</i> : pontos experimentais, <i>linha</i> : ajuste segundo a Eq. (A.1).	49
B.1	Função de correlação $C(s)$	52

LISTA DE TABELAS

2.1	Variação do ângulo θ_0 com a altura.	17
C.1	Potência de saída no emissor do laser com as respectivas potências: a medida na entrada da objetiva e a local na microesfera.	54

RESUMO

ALVES, Patrícia Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012.
Teoria e calibração de pinças ópticas. Orientador: Márcio Santos Rocha Coorientadores: Marcelo Lobato Martins e Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira.

Neste trabalho estudamos alguns aspectos físicos do pinçamento óptico. Usamos um método de calibração da pinça óptica via análise da função de autocorrelação da posição da microesfera; por meio deste é possível determinar a constante de força da pinça de duas maneiras: usando a amplitude e o tempo característico desta função. Verificamos que a calibração utilizando o tempo característico é mais precisa da que utiliza a amplitude. Além disso, comparamos os resultados obtidos com duas técnicas de calibrações apresentadas na literatura. Determinamos a força óptica numericamente no limite da óptica geométrica e vimos que esse limite apresenta resultados satisfatórios para nosso arranjo experimental.

ABSTRACT

ALVES, Patrícia Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012.
Theory and calibration of optical tweezers. Advisor: Márcio Santos Rocha Co-
Advisors: Marcelo Lobato Martins and Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira.

In this work we have studied some physical aspects of optical tweezers. We use a method to calibrate the optical tweezer based on the analysis of the autocorrelation function of the trapped bead position. With this method it was possible to determine the trap stiffness of the tweezers by two ways: from the amplitude and from the characteristic time of the autocorrelation function. With this technique, we have verified that calibrating the tweezers by using the characteristic time is more accurate than by using the amplitude. Moreover, we have also compared the results obtained with this method with two other different calibration techniques. We determine the optical force numerically in the geometrical optics limit, which has allowed us to observe that this limit returns satisfactory yields for our experimental arrangement.

Capítulo 1

Introdução

Os primeiros estudos sobre o pinçamento óptico surgiram nos Estados Unidos em 1969. Ashkin e colaboradores desenvolveram esta técnica capaz de manipular pequenas partículas utilizando um feixe de laser fortemente focalizado [1, 2]. O confinamento ocorre devido à transferência de momento da luz para a partícula. Esta técnica permite estudar sistemas biológicos, pois a magnitude das forças envolvidas é da ordem de piconewtons e nesta escala, é possível capturar estruturas com tamanho típico da ordem de micrômetros. Assim, dependendo da potência e do comprimento de onda do laser, podemos manipular células individualmente sem danos.

Para realizar medidas quantitativas é essencial conhecermos a constante de força da pinça óptica. Como veremos, para uma microesfera de raio fixo a uma determinada altura em relação à lâmina, a pinça óptica estabelece um poço de potencial harmônico para pequenos deslocamentos. Desta forma, atua na microesfera uma força do tipo $F = -kx$, com uma constante de força k bem definida. Neste trabalho estudamos alguns aspectos teóricos e experimentais da pinça óptica descrevendo as técnicas de calibração que usamos para determinar esta constante de força.

No Capítulo 2 apresentamos o funcionamento de uma pinça óptica e além disso, é feita uma revisão de algumas teorias de pinças ópticas, discutindo os limites adequados para cada teoria. O limite da óptica geométrica é discutido mais detalhadamente, visto que usamos esta teoria para determinarmos numericamente a constante de força da pinça óptica.

No Capítulo 3 fizemos uma revisão de movimento browniano que, como veremos, é a base de dois métodos que usamos para a calibração da pinça.

No Capítulo 4 apresentamos os equipamentos utilizados na montagem experimental e os procedimentos para a realização das medidas da constante de força.

No Capítulo 5 são apresentados os resultados numéricos e os resultados experimentais da constante de força da pinça em função de alguns parâmetros, como a altura da microesfera em relação à lamínula e a potência do laser. Além disso fizemos uma comparação entre resultados numéricos, obtidos a partir da óptica geométrica, e os resultados experimentais.

No Capítulo 6 apresentamos as conclusões deste trabalho.

Capítulo 2

Pinças Ópticas

2.1 Funcionamento de uma Pinça Óptica

Uma pinça óptica consiste basicamente em um feixe de laser bem focalizado por meio de uma objetiva. Como veremos, sob certas condições, este feixe é capaz de aprisionar objetos da ordem de micrômetros na região próxima do foco desta lente.

Em 1969, Ashkin [1, 3, 4] propôs um experimento para estudar o movimento de uma microesfera sob a ação da pressão de radiação. No experimento, incidia-se um laser em microesferas de poliestireno situadas em solução aquosa e media-se as velocidades destas esferas. Foram observadas velocidades próximas das que foram estimadas e além disso, um outro fenômeno não esperado: as esferas eram guiadas para a região central do feixe do laser, região cuja intensidade do laser é maior no modo TEM_{00} em que foi realizado o experimento. A pinça óptica surgiu quando nesse experimento o laser foi fortemente focalizado com uma objetiva. Nesta situação, foi observado que as microesferas ficavam presas na região próxima ao foco da lente.

Podemos entender qualitativamente o confinamento de uma esfera sob ação da pinça usando a óptica geométrica. A Fig. 2.1 mostra um esquema das forças que atuam na microesfera, localizada nas regiões antes e depois do foco, devido aos raios refratados. O raio (1) que incide na esfera inferior é desviado da sua trajetória original e para que haja conservação do momento linear do sistema isolado, composto pela esfera e pela luz, haverá uma variação do momento da esfera de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio. Desta variação de momento uma força $\vec{F}_1$ atua na microesfera como representado na figura. O mesmo acontece com o raio (2). Observe que foi representado o perfil de intensidade gaussiano do laser e desta forma

um raio oriundo da região central do feixe possui maior intensidade do que um raio que parte das extremidades. Assim o módulo da força $\vec{F}_1$ é maior do que o da força $\vec{F}_2$ e a força resultante desloca a microesfera para a região do foco. Após passar pelo foco da lente, os raios refratados causam uma força resultante na esfera que aponta para baixo, novamente para a região do foco. Assim, o efeito da refração é deslocar o centro da esfera para o foco da lente. Essa força é conhecida como força de gradiente.

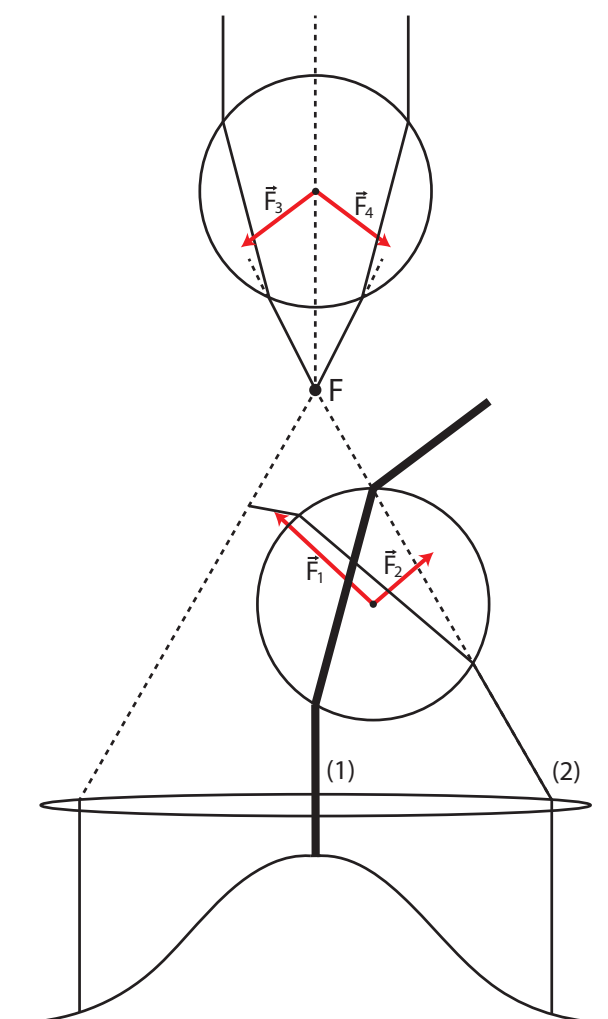


Figura 2.1: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refratados.

Observe que na Fig. 2.1 desenhamos os raios refratados para uma microesfera com índice de refração maior que o do meio que a envolve. Isso é fundamental para que ocorra o pinçamento óptico; pela conservação do momento linear, podemos perceber que se o índice de refração da esfera fosse menor que o do meio, a esfera não ficaria

confinada.

Além das forças provenientes dos raios refratados, atuam na microesfera forças devido aos raios refletidos. A Fig. 2.2 mostra alguns raios incidentes e refletidos na superfície de uma esfera dielétrica. As reflexões causam na microesfera uma força resultante que tende a deslocá-la no sentido de propagação do feixe, o que é conhecido como pressão de radiação. Desta forma, a pressão de radiação atrapalha o pinçamento. Outro fenômeno que contribui para a pressão de radiação é a possível absorção da luz pela microesfera.

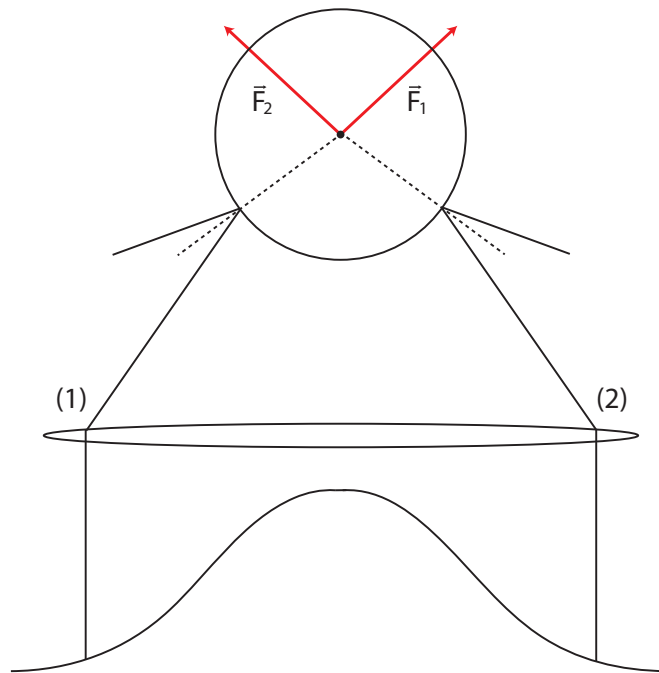


Figura 2.2: Esquema de forças na microesfera devido aos raios refletidos.

O confinamento da microesfera em uma região próxima ao foco da objetiva é feito usando uma objetiva de abertura numérica grande, que possibilita iluminar a objetiva com raios mais angulados. Desta forma, a pressão de radiação e a força de gradiente aumentam, mas a força de gradiente aumenta mais do que a pressão de radiação e por isso a pinça acontece.

2.2 Teorias de Pinças Ópticas

Nesta seção apresentamos uma revisão de algumas teorias de pinças ópticas discutindo os limites que se adequam a cada uma delas. A teoria de óptica geométrica

será discutida mais detalhadamente, pois a usamos para implementar nossos resultados numéricos.

2.2.1 Teoria de Óptica Geométrica

A teoria de óptica geométrica é adequada para o estudo de microesferas de tamanho muito maior que o comprimento de onda da luz incidente. Sendo a o raio da microesfera, $a \gg \lambda$. Nesse limite, podemos calcular a força sobre a microesfera exercida pelo feixe de luz integrando a força exercida por um único raio ao longo do feixe. Como usamos esta teoria para obter os resultados numéricos, nesta seção descrevemos este procedimento em detalhes.

Ashkin e Roosen foram os primeiros a calcular a força na microesfera devido a um único raio. O módulo desta força pode ser escrito como [5, 6]:

$$F = \frac{n_{meio} P_r}{c} |Q_t|, \quad (2.1)$$

onde n_{meio} é o índice de refração do meio em que estão as microesferas, P_r é a potência do raio e c a velocidade da luz no vácuo. O fator Q_t leva em consideração as múltiplas reflexões e as transmissões no interior da esfera, e pode ser escrito como [5]:

$$Q_t = 1 + R \exp(2i\alpha) - T^2 \frac{\exp[2i(\alpha - \beta)]}{1 + R \exp(-2i\beta)}, \quad (2.2)$$

sendo R e T os coeficientes de reflexão e transmissão na interface meio-esfera, e α e β os ângulos de incidência e de refração do raio na superfície da esfera. Os coeficientes de reflexão e transmissão dependem dos ângulos α e β , e do tipo de incidência do raio na esfera, transversal elétrico (TE) ou transversal magnético (TM). Fazendo a média para os dois casos:

$$R(\alpha, \beta) = \frac{1}{2} \left[\frac{\sin(\alpha - \beta)}{\sin(\alpha + \beta)} \right]^2 + \frac{1}{2} \left[\frac{\tan(\alpha - \beta)}{\tan(\alpha + \beta)} \right]^2, \quad (2.3)$$

e

$$T(\alpha, \beta) = 1 - R(\alpha, \beta). \quad (2.4)$$

Somando a contribuição de cada raio podemos obter a força da pinça óptica sobre a esfera. A partir da força, determinamos a constante de força da pinça óptica em uma certa direção tomando a derivada parcial da força nesta direção em relação à posição na posição de equilíbrio da pinça óptica:

$$k_x = - \left(\frac{\partial F_x}{\partial x} \right)_{\vec{r}_{eq}}. \quad (2.5)$$

Primeiramente, determinaremos esta força supondo que todos os raios atingem a microesfera. O que de fato não corresponde à realidade, visto que ocorre refração quando os raios passam da lamínula, nosso porta-amostra, para o meio onde estão as esferas. Como a água tem um índice de refração menor que a do vidro da lamínula, os raios se afastam da normal; consequentemente, alguns raios não alcançam a microesfera situada em uma certa altura h . Além disso, como cada raio do feixe tem um determinado ângulo de incidência, os raios refratados encontram-se em uma região ao longo do eixo z e não em um simples ponto. Esse fenômeno é conhecido como aberração esférica da luz. A Fig. 2.3 apresenta um esquema da situação ideal, em que todos os raios alcançam a esfera, e a situação que considera o efeito da aberração esférica.

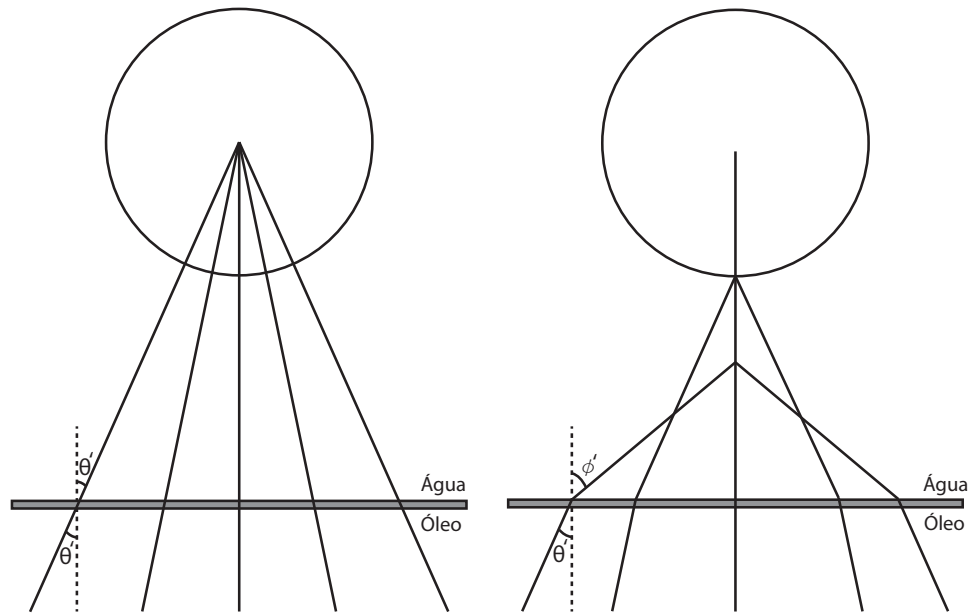


Figura 2.3: Esquema de raios atingindo a microesfera: (a) Sem aberração esférica; (b) considerando o efeito da aberração esférica.

Em seguida incluiremos o efeito da aberração esférica no cálculo da força da pinça sobre a microesfera.

Força total sobre a microesfera

Seguiremos um procedimento análogo ao que é feito nas Refs. [7, 8]. Como comentamos, dois casos serão considerados: no primeiro vamos considerar o caso ideal, sem a aberração esférica; no segundo incluiremos a aberração esférica a partir do resultado do primeiro caso.

Sem aberração esférica

Considere uma microesfera presa na pinça com o seu centro deslocado da origem, o foco da objetiva. Esta situação é representada na Fig. 2.4. O raio da esfera é representado por $\vec{a}$, a direção de incidência de um raio particular do feixe por $\vec{d}$. O vetor $\vec{r}$ representa o deslocamento entre o foco da objetiva e o centro da microesfera. O ângulo γ indica a direção de $\vec{r}$ em relação ao eixo z .

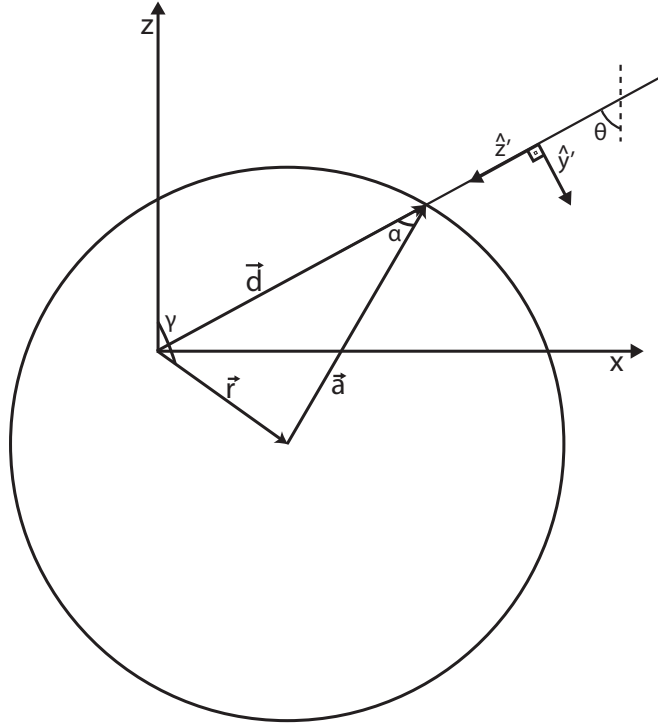


Figura 2.4: Microesfera pinçada com o centro deslocado da origem.

Note que na Fig. 2.4 além da força da pinça há também uma força externa, visto que representamos um deslocamento do centro da microesfera nas direções z e x em relação ao foco. O deslocamento na direção x pode ser causado por um fluxo,

estabelecido nesta direção, do fluido onde estão as microesferas. Quando não houver forças externas, o centro da microesfera estará deslocado do foco apenas na direção z , devido ao feixe de laser.

Em coordenadas esféricas, as componentes do vetor $\vec{d}$ podem ser escritas como:

$$\vec{d} = (d \sin \theta \cos \phi, d \sin \theta \sin \phi, d \cos \theta) \quad (2.6)$$

e como escolhemos o centro da microesfera situado no plano $y = 0$,

$$\vec{r} = (r \sin \gamma, 0, r \cos \gamma). \quad (2.7)$$

Usando a condição $|\vec{d} - \vec{r}| = a$, sendo a o raio da esfera, podemos escrever d em função de r , γ , θ e ϕ . Desta forma,

$$d^2 + r^2 - 2rd(\sin \gamma \sin \theta \cos \phi + \cos \gamma \cos \theta) = a^2. \quad (2.8)$$

Resolvendo esta equação para d :

$$d = [a^2 - r^2 + r^2(\sin \gamma \sin \theta \cos \phi + \cos \gamma \cos \theta)^2]^{\frac{1}{2}} + r(\sin \gamma \sin \theta \cos \phi + \cos \gamma \cos \theta). \quad (2.9)$$

Da Fig. 2.4 podemos escrever o ângulo α da seguinte equação:

$$r^2 = d^2 + a^2 - 2ad \cos \alpha,$$

daí:

$$\alpha = \arccos \left[\frac{d^2 + a^2 - r^2}{2ad} \right]. \quad (2.10)$$

Da Lei de Snell, podemos determinar o ângulo β :

$$n_{meio} \sin \alpha = n_{esfera} \sin \beta,$$

sendo n_{meio} e n_{esfera} os índices de refração do meio e do material da microesfera.

Com as equações (2.9) e (2.10) conseguimos expressar os ângulos α e β em função de θ e ϕ . Desta forma, o módulo da força de um único raio sobre a microesfera, dado pela Eq. (2.1), é expresso em função desses parâmetros.

Assim, precisamos determinar a direção da força devido a um raio. Esta direção pode ser encontrada se soubermos as componentes da força em cada direção. Considere o outro sistema de referência mostrado na Fig. 2.4, em que z' é o eixo na direção de incidência do raio e y' o eixo perpendicular a z' . Então, definimos [7, 8]:

$$F = F_{z'} + iF_{y'}, \quad (2.11)$$

logo:

$$\vec{F} = \frac{n_{meio} P_r}{c} \left[\text{Re}(Q_t) \hat{z}' + \text{Im}(Q_t) \hat{y}' \right]. \quad (2.12)$$

Por fim, temos que escrever os vetores unitários $\hat{z}'$ e $\hat{y}'$ em função dos parâmetros conhecidos. Note que $\hat{z}'$ está na mesma direção de $\vec{d}$, mas com sentido oposto. Então:

$$\hat{z}' = (-\sin\theta \cos\phi, -\sin\theta \sin\phi, -\cos\theta), \quad (2.13)$$

e como o vetor $\vec{r}$ está no plano $y = 0$:

$$\hat{y}' = \frac{\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')}{|\hat{z}' \times (\vec{r} \times \hat{z}')|}. \quad (2.14)$$

Podemos considerar a força de cada raio como um diferencial da força total e integrar para todo o feixe. Neste caso, a integração deve ser feita de $0 \leq \phi \leq 2\pi$ e $0 \leq \theta \leq \theta_0$. O ângulo θ_0 é o ângulo limite para a interface vidro e água, $\theta_0 = 62,46^\circ$, uma vez que todos os raios que atravessam a lamínula atingem a microesfera (ver Fig. 2.3 - caso sem aberração).

Inclusão da aberração esférica

A dificuldade ao incluir a aberração esférica é que cada raio toca o eixo z em um ponto diferente, não há um ponto focal comum. Para contornar esse problema, consideramos um sistema de coordenadas cartesiano particular para cada raio, como apresentado na Fig. 2.5.

A origem de cada um desses sistemas está no ponto onde o raio toca o eixo z do sistema principal. A origem do sistema de coordenadas principal é o foco da objetiva, ponto onde os raios convergiriam caso não houvesse a aberração esférica.

Definindo esses sistemas particulares, podemos escrever a força de cada raio em seu respectivo sistema da mesma forma que fizemos no caso sem considerar a aberração. Note que os eixos z dos sistemas de coordenadas principal e particular coincidem. Os eixos $\hat{z}'$ e $\hat{y}'$ são os mesmos apresentados na Fig. 2.4, sendo $\hat{z}'$ a direção do raio incidente e $\hat{y}'$ o eixo perpendicular a $\hat{z}'$. O eixo $\hat{z}''$ está na direção do raio refratado e $\hat{y}''$ o eixo perpendicular a $\hat{z}''$ como indicado na Fig. 2.5. O vetor $\vec{r}''$ liga a origem do sistema de coordenadas particular ao centro da microesfera. O ângulo γ'' localiza o vetor $\vec{r}''$ em relação ao eixo z e $|\vec{a}''| = a$. O vetor $\vec{b}$ liga a origem do sistema principal à origem do sistema de coordenadas particular e h é a altura da microesfera em relação à lamínula.

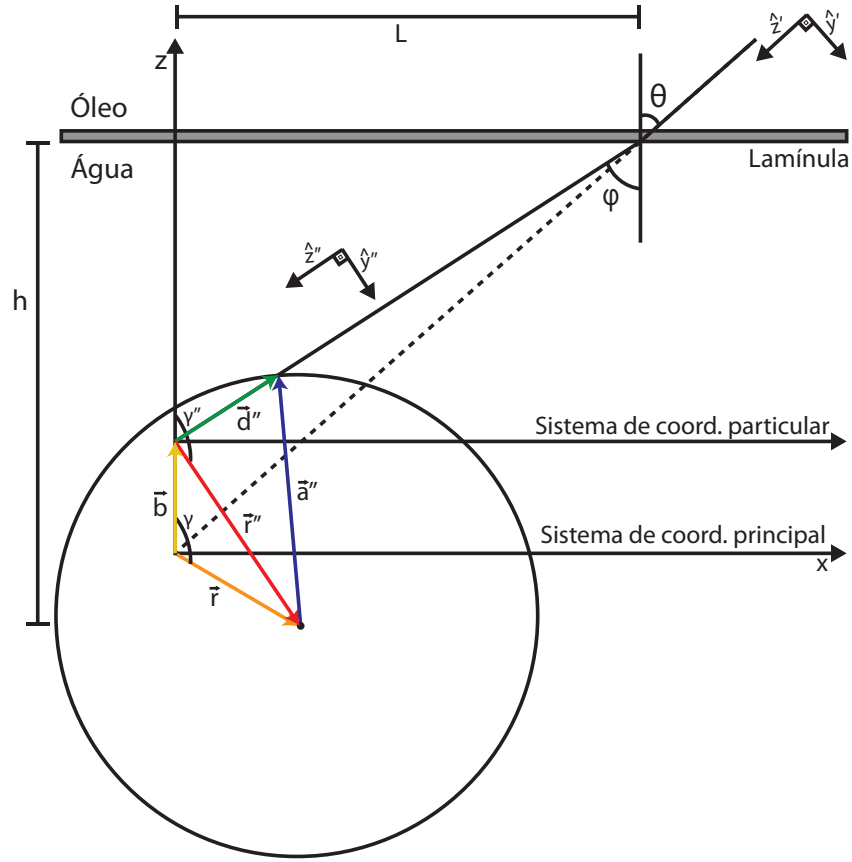


Figura 2.5: Microesfera pinçada com o centro deslocado da origem do sistema de coordenada principal, a origem de cada sistema particular é onde o raio toca o eixo z do sistema principal.

Da Fig. 2.5 podemos extrair as equações:

$$\tan \varphi = \frac{L}{h - b - r \cos(\pi - \gamma)} \quad (2.15)$$

e

$$\tan \theta = \frac{L}{h - r \cos(\pi - \gamma)}. \quad (2.16)$$

Dividindo a Eq. (2.16) pela Eq. (2.15):

$$\frac{\sin \theta \cos \varphi}{\cos \theta \sin \varphi} = \frac{1}{1 + \frac{b}{h - b + r \cos \gamma}}. \quad (2.17)$$

Usando a Lei de Snell,

$$n_{\text{vidro}} \sin \theta = n_{\text{meio}} \sin \varphi, \quad (2.18)$$

em que n_{vidro} e n_{meio} são os índices de refração do vidro e do meio onde estão as microesferas, a água, temos:

$$\frac{n_{meio} \cos \varphi}{n_{vidro} \cos \theta} = \frac{1}{1 + \frac{b}{h-b+r \cos \gamma}} = 1 - \frac{b}{h + r \cos \gamma}, \quad (2.19)$$

e desta forma conseguimos o módulo do vetor $\vec{b}$:

$$b = \left(1 - \frac{n_{meio} \cos \varphi}{n_{vidro} \cos \theta} \right) (h + r \cos \gamma). \quad (2.20)$$

Usando novamente a Lei de Snell podemos eliminar a dependência em φ :

$$\vec{b} = \left(1 - \sqrt{\frac{\left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}} \right)^2 - \sin^2 \theta}{1 - \sin^2 \theta}} \right) (h + r \cos \gamma) \hat{z}. \quad (2.21)$$

No sistema de coordenadas particular, analogamente ao caso sem aberração, podemos escrever:

$$\begin{aligned} d'' &= \sqrt{a^2 - r''^2 + r''^2 (\sin \gamma'' \sin \varphi \cos \phi + \cos \gamma'' \cos \varphi)^2} \\ &\quad + r'' (\sin \gamma'' \sin \varphi \cos \phi + \cos \gamma'' \cos \varphi) \end{aligned} \quad (2.22)$$

e

$$\alpha = \arccos \left[\frac{d''^2 + a^2 - r''^2}{2ad''} \right]. \quad (2.23)$$

Agora devemos escrever $\vec{r}''$ e γ'' em função de $\vec{r}$ e γ e dos outros parâmetros conhecidos. Podemos observar na Fig. 2.5:

$$\vec{r}'' = \vec{r} - \vec{b} \quad (2.24)$$

em módulo,

$$r'' = \sqrt{r^2 + b^2 - 2rb \cos \gamma}. \quad (2.25)$$

Fazendo o produto escalar de $\vec{r}''$ com $\vec{b}$, da Eq. (2.24) temos que:

$$\vec{r}'' \cdot \vec{b} = \vec{r} \cdot \vec{b} - \vec{b} \cdot \vec{b} \quad (2.26)$$

e desta equação determinamos γ'' :

$$\cos \gamma'' = \frac{r \cos \gamma - b}{r''}. \quad (2.27)$$

Então, análogo ao que foi feito no caso sem aberração, basta escrever os vetores unitários $\hat{z}''$ e $\hat{y}''$:

$$\hat{z}'' = (-\sin\varphi \cos\phi, -\sin\varphi \sin\phi, -\cos\varphi) \quad (2.28)$$

e

$$\hat{y}'' = \frac{\hat{z}'' \times (\vec{r}'' \times \hat{z}'')}{|\hat{z}'' \times (\vec{r}'' \times \hat{z}'')|}. \quad (2.29)$$

A partir desses resultados podemos calcular a força total do feixe sobre a microesfera. Consideramos a força devido a um raio, Eq. (2.1), um diferencial da força total do feixe; desta forma:

$$d\vec{F} = \frac{n_{meio}}{c} \left[\text{Re}(Q_t) \hat{z}'' + \text{Im}(Q_t) \hat{y}'' \right] dP. \quad (2.30)$$

Agora precisamos escrever o elemento de potência dP em função dos parâmetros conhecidos. O feixe possui um perfil de intensidade gaussiano e podemos representá-lo por:

$$I(\rho) = I_0 \exp\left(\frac{-\rho^2}{2\sigma^2}\right), \quad (2.31)$$

sendo σ a largura do perfil do feixe na entrada da objetiva $\sigma = 1,36 \pm 0,05$ mm para um dos lasers usados em nosso trabalho, o *IPG Photonics* modelo *YLR-5-1064-LP*. Determinamos este parâmetro experimentalmente, o procedimento é descrito no Apêndice A. Temos que $dP = I dA$, escrevendo o elemento de área dA em coordenadas cilíndricas $dA = \rho d\rho d\phi$ e usando a Eq. (2.31) podemos escrever o elemento de potência dP :

$$dP = I_0 \exp\left(\frac{-\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho d\phi. \quad (2.32)$$

Integrando a potência, podemos obter I_0 em termos da potência total do feixe,

$$P = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty I_0 \exp\left(\frac{-\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho d\phi. \quad (2.33)$$

De posse do resultado desta integral gaussiana,

$$I_0 = \frac{P}{2\pi\sigma^2}. \quad (2.34)$$

Assim:

$$dP = \frac{P}{2\pi\sigma^2} \exp\left(\frac{-\rho^2}{2\sigma^2}\right) \rho d\rho d\phi. \quad (2.35)$$

Para nossa objetiva é válida a condição de Abbe [9], que estabelece:

$$\rho = f \sin\theta, \quad (2.36)$$

onde f é a distância focal da objetiva. Podemos obter essa distância focal a partir das relações:

$$NA = n_{vidro} \sin \theta_m, \quad (2.37)$$

e

$$R_{ob} = f \sin \theta_m, \quad (2.38)$$

sendo n_{vidro} o índice de refração do material da lente, θ_m o valor máximo do ângulo θ e R_{ob} o raio da abertura máxima da objetiva. Para o nosso sistema, a abertura numérica da objetiva vale $NA = 1,4$ e $R_{ob} = 0,350 \pm 0,005$ cm. Então, pelas equações (2.37) e (2.38):

$$f = \frac{n_{vidro} R}{NA} \quad (2.39)$$

Desta forma, $f = 0,375 \pm 0,005$ cm.

Usando a Eq. (2.36), podemos escrever o elemento de potência:

$$dP = \frac{P}{2\pi\sigma^2} \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta}{2\sigma^2}\right) f^2 \sin \theta \cos \theta d\theta d\phi. \quad (2.40)$$

Vamos escrever a potência total P em função da potência local P_{local} na microesfera, a potência do feixe após atravessar a lamínula que efetivamente atinge a microesfera. Podemos determinar a potência local descontando os raios que sofrem reflexão total na lâmina:

$$P_{local} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} I_0 \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta}{2\sigma^2}\right) f^2 \sin \theta \cos \theta d\theta d\phi. \quad (2.41)$$

comparando esta equação com a Eq. (2.33):

$$P_{local} = P \left[1 - \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta_0}{2\sigma^2}\right) \right]. \quad (2.42)$$

Assim podemos escrever o elemento de potência em função da potência local na microesfera,

$$dP = \frac{P_{local} \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta}{2\sigma^2}\right) T(\theta, \varphi)}{2\pi\sigma^2 \left[1 - \exp\left(\frac{-f^2 \sin^2 \theta_0}{2\sigma^2}\right) \right]} f^2 \sin \theta \cos \theta d\theta d\phi. \quad (2.43)$$

De posse desses resultados, podemos calcular a força total do feixe sobre a microesfera:

$$\vec{F} = \frac{n_{meio}}{c} \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} [Re(Q_t) \hat{z}' + Im(Q_t) \hat{y}'] dP, \quad (2.44)$$

em que usamos Q_t em função de θ e ϕ . A fim de tornar o problema mais realista, note que na Eq. (2.43) para o elemento de potência incluímos o coeficiente de transmissão

$T(\theta, \varphi)$ para a interface vidro e água. Este coeficiente de transmissão leva em conta a potência perdida do feixe ao atravessar a lamínula. Para finalizar o problema basta determinarmos o ângulo θ_0 que como veremos na próxima seção dependerá da altura da microesfera em relação a lâmina.

Ângulo θ_0

Nesta seção vamos determinar o valor máximo do ângulo para o qual os raios atingem a microesfera, o limite de integração θ_0 da Eq. (2.44). Mostramos a situação limite de um raio que atinge a esfera em uma altura h arbitrária na Fig. 2.6. O ângulo

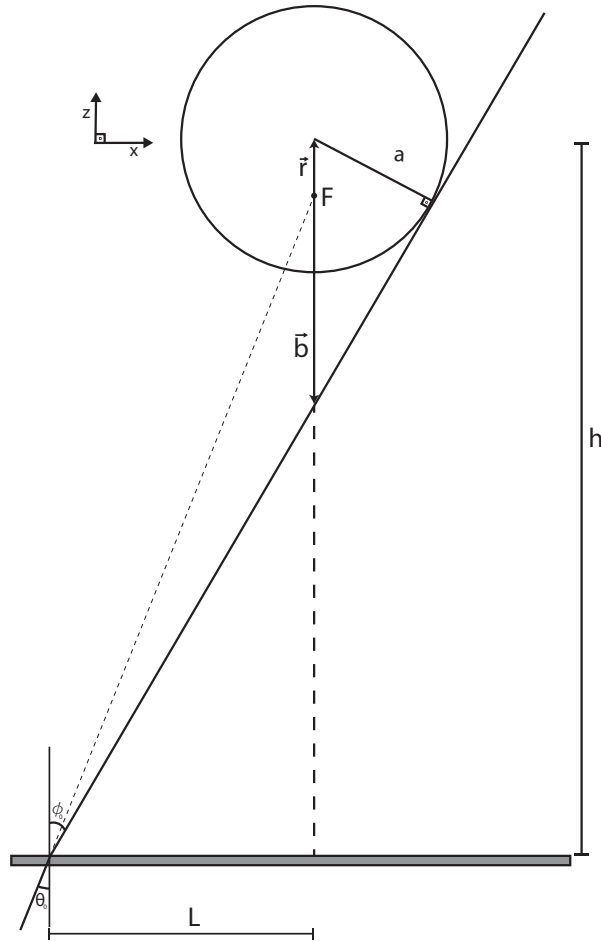


Figura 2.6: Representação do ângulo máximo θ_0 , limite de integração da Eq. (2.44).

θ_0 é o ângulo de incidência do raio e ϕ_0 o ângulo de refração depois de passar pela

lamínula. Nesta situação, o centro da esfera está deslocado do foco apenas na direção z , atua na microesfera apenas a força devido a pinça óptica. Observe que para o ângulo θ_0 , o raio refratado é tangente a esfera, para $\theta > \theta_0$ os raios não a tocam. Na Fig. 2.6, F é o foco da objetiva, L é a distância do centro da esfera ao ponto onde incide o raio com o ângulo θ_0 . O vetor $\vec{r}$ liga o foco ao centro da esfera e $\vec{b}$ liga o foco ao raio refratado ao longo do eixo z .

Da Fig. 2.6 temos as seguintes relações:

$$\tan \phi_0 = \frac{L}{h - r - b} \quad (2.45)$$

e

$$\tan \theta_0 = \frac{L}{h - r}. \quad (2.46)$$

Usando a Lei de Snell, podemos relacionar os ângulos θ_0 e ϕ_0 :

$$n_{vidro} \sin \theta_0 = n_{meio} \sin \phi_0. \quad (2.47)$$

Das equações (2.45) e (2.46):

$$\frac{\sin \phi_0 \cos \theta_0}{\cos \phi_0 \sin \theta_0} = \frac{h - r}{h - r - b}. \quad (2.48)$$

Usando a Eq. (2.47),

$$\frac{n_{vidro} \cos \theta_0}{n_{meio} \cos \phi_0} = \frac{h - r}{h - r - b}. \quad (2.49)$$

Para eliminar a dependência em ϕ_0 podemos usar novamente a Lei de Snell.

Assim:

$$\sin^2 \theta_0 = \frac{\left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}}\right)^2 (h - r)^2 - (h - r - b)^2}{(h - r)^2 - (h - r - b)^2}. \quad (2.50)$$

Mas b depende de θ_0 , da Fig. 2.6:

$$\sin \phi_0 = \frac{a}{r + b}.$$

Então:

$$b = \frac{n_{meio}}{n_{vidro}} \frac{a}{\sin \theta_0} - r. \quad (2.51)$$

Substituindo a Eq. (2.51) na Eq. (2.50):

$$\begin{aligned} & [(h - r)^2 - h^2] \sin^4 \theta_0 + 2ah \left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}}\right) \sin^3 \theta_0 \\ & + \left[h^2 - \left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}}\right)^2 (h - r)^2 - \left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}}\right)^2 a^2 \right] \sin^2 \theta_0 \\ & - 2ah \left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}}\right) \sin \theta_0 + \left(\frac{n_{meio}}{n_{vidro}}\right)^2 a^2 = 0. \end{aligned}$$

Podemos resolver esta equação numericamente para valores fixos de h , a e r . A Tabela 2.1 mostra alguns valores do ângulo θ_0 em função da altura para $a = 1,5 \mu\text{m}$, $r = 0,1 \mu\text{m}$, $n_{\text{vidro}} = 1,50$ e $n_{\text{meio}} = 1,33$. Note que quanto maior a altura, menor é o ângulo θ_0 e menos raios atingem a microesfera, o que deixa a pinça mais fraca.

Altura h (μm)	θ_0
1,5	62,46°
2,0	61,43°
3,0	57,89°
4,0	54,44°
5,0	51,32°
6,0	48,52°
7,0	45,98°
8,0	43,68°

Tabela 2.1: Variação do ângulo θ_0 com a altura.

Determinado o ângulo θ_0 , o problema da força do feixe sobre a microesfera considerando o efeito da aberração esférica é resolvido substituindo-o na Eq. (2.44).

2.2.2 Teoria de Rayleigh

O tratamento apresentado nesta seção normalmente é apropriado para microesferas que possuem um raio muito menor que o comprimento de onda do laser. A teoria de Rayleigh é válida para

$$2k_w a(\mu_n - 1) \ll 1, \quad (2.52)$$

sendo k_w o vetor de onda no meio onde estão as microesferas, a o raio da esfera e μ_n o índice de refração relativo, $\mu_n = n_{\text{esfera}}/n_{\text{meio}}$ (n_{esfera} e n_{meio} são os índices de refração da esfera e do meio respectivamente) [10, 11]. Nesse limite, podemos aproximar a esfera por um dipolo induzido em um campo elétrico aproximadamente uniforme [12, 8]. Como o comprimento de onda é muito grande comparado ao raio da esfera, podemos considerar que a variação espacial do campo elétrico é muito lenta nas proximidades da esfera. Nestas condições, o problema é de uma esfera dielétrica em um campo uniforme. A solução deste problema é bem conhecida e pode ser encontrada na Ref. [13]. Na região externa à esfera, o potencial elétrico em coordenadas esféricas é:

$$\varphi(\theta, r) = -Er \cos \theta + \left(\frac{K-1}{K+2} \right) \frac{a^3}{r^2} E \cos \theta \quad (2.53)$$

com $K = \epsilon/\epsilon_m$, sendo ϵ e ϵ_m as permissividades elétrica do material da esfera e do meio, respectivamente. E é o campo uniforme na ausência da esfera.

Podemos identificar o momento de dipolo induzido na esfera como o termo que acompanha a razão $\cos \theta/r^2$, que caracteriza um dipolo elétrico. Desta forma:

$$\vec{p} = \frac{K-1}{K+2} a^3 \vec{E} \quad (2.54)$$

e o termo de dipolo do potencial φ_d :

$$\varphi_d = \vec{p} \cdot \vec{r} \frac{1}{r^3}. \quad (2.55)$$

A energia potencial elétrica do dipolo no campo elétrico uniforme é dada por:

$$U = -\vec{p} \cdot \vec{E}. \quad (2.56)$$

Então, a força sobre a esfera é menos o gradiente desta energia:

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}(\vec{p} \cdot \vec{E}). \quad (2.57)$$

Fazendo este produto escalar:

$$\vec{F} = \frac{K-1}{K+2} a^3 \vec{\nabla} E^2. \quad (2.58)$$

Da Eq. (2.58) vemos que a força que atua na microesfera é proporcional ao gradiente do campo elétrico. A direção desta força aponta para o ponto de maior intensidade do campo, o foco.

2.2.3 Teoria MDSA

As teorias de óptica geométrica e Rayleigh funcionam apenas em alguns limites: a primeira para microesferas muito grandes, $a \gg \lambda$ e a segunda para microesferas pequenas, $a \ll \lambda$. Uma teoria completa para o estudo da constante de força para microesferas em qualquer faixa de tamanho foi proposta por Mazolli, Maia Neto e Nussenzveig [9, 14]. Esses autores calcularam as forças axial e transversa que atuam numa microesfera de raio e índice de refração arbitrários devido a pinça óptica. O cálculo é baseado na representação de Debye para o feixe de laser focalizado além da objetiva e na teoria de espalhamento de Mie para a interação do feixe com a microesfera.

Nesta teoria, as grandezas utilizadas nos cálculos são medidas de forma independente, não há parâmetros ajustáveis. Recentemente foram incluídas outras aberrações ópticas na teoria, em especial o astigmatismo [15].

Atualmente, a teoria MDSA de pinças ópticas é a mais realista e mais geral, pode ser utilizada para microesferas de qualquer tamanho. Vale ressaltar que no limite da esfera grande comparado ao comprimento de onda, esta teoria se reduz a teoria da óptica geométrica e para microesferas pequenas ($a \ll \lambda$) o caso volta a teoria Rayleigh.

Capítulo 3

Movimento Browniano

3.1 Equação de Langevin

Seja uma partícula de massa m cuja posição é $x(t)$ no instante de tempo t , e a velocidade correspondente $v \equiv \frac{dx}{dt}$. Considere que essa partícula está imersa em um líquido cuja temperatura absoluta é T .

Descrever todas as interações entre a partícula e o líquido seria inviável, uma vez que para cada molécula do líquido seriam adicionados novos graus de liberdade ao sistema [16]. Ao invés de uma descrição detalhada podemos considerar o líquido como um reservatório de calor, e as interações com a partícula podem ser substituídas por uma força efetiva que denominaremos $\mathcal{F}(t)$. Além disso, a partícula pode interagir com sistemas externos, como campo gravitacional, através de uma força F_{ext} . Desta forma, a segunda lei de Newton em uma dimensão para esta partícula:

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

Como a força efetiva $\mathcal{F}(t)$ representa as interações da partícula com o líquido, ela deve depender da posição de muitos átomos que estão em constante movimento. Então, $\mathcal{F}(t)$ deve flutuar rapidamente no tempo e de forma irregular, o que inviabiliza explicitar $\mathcal{F}$ como função de t . O problema pode ser resolvido tratando-o estatisticamente. Definimos por um *ensemble* um conjunto de sistemas igualmente preparados em que cada um deles é constituído por uma partícula e pelo meio que a envolve. A média de *ensemble* de uma grandeza A no instante de tempo t é dada por:

¹Este capítulo é baseado na Ref. [16]

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

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

Podemos dizer que a taxa de variação de $\mathcal{F}(t)$ é caracterizada por um intervalo de tempo característico τ^* , conhecido como tempo de correlação. Além disso, para sistemas em que não há direções preferenciais no espaço e para tempo suficientemente grande comparado a τ^* , a média de *ensemble* $\bar{\mathcal{F}}(t)$ é nula.

A equação (3.1) é válida para cada membro do *ensemble*. A força $\mathcal{F}(t)$ flutua rapidamente no tempo, mas a média de *ensemble* $\bar{\mathcal{F}}(t)$ tem uma variação no tempo muito mais lenta do que $\mathcal{F}(t)$. Langevin propôs escrevê-la como uma soma de duas partes [17],

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

sendo $\mathcal{F}'$ a parte de $\mathcal{F}$ que flutua rapidamente e $\bar{\mathcal{F}}$ a parte de variação lenta que tende a restaurar o equilíbrio da partícula. A velocidade v também flutua no tempo, e análogo ao que foi feito para a força na Eq. (3.3), podemos escrever:

$$v = \bar{v} + v' \quad (3.4)$$

onde v' denota a parte de v de flutuação rápida.

A parte de variação lenta da força, $\bar{\mathcal{F}}$, deve ser função de $\bar{v}$ satisfazendo a condição $\bar{\mathcal{F}}(\bar{v}) = 0$ quando $\bar{v} = 0$. Para valores não muito grandes de $\bar{v}$, podemos expandir $\bar{\mathcal{F}}(\bar{v})$ em série de potências de $\bar{v}$, o primeiro termo não nulo que satisfaz a condição acima é o linear. Então $\bar{\mathcal{F}}$ deve ser da forma

$$\bar{\mathcal{F}} = -\zeta \bar{v} \quad (3.5)$$

em que ζ é uma constante positiva conhecida como coeficiente de fricção (ou atrito) da partícula em relação ao meio que está imersa. É possível explicitar esta constante em termos de $\mathcal{F}$, essa relação é conhecida como Teorema da Flutuação-Dissipação para o movimento Browniano e será discutido na Seção 3.2. O sinal negativo na Eq. (3.5) mostra que $\bar{\mathcal{F}}$ atua no sentido de reduzir $\bar{v}$.

Então para a parte de variação lenta, a Eq. (3.1) se torna

$$m \frac{d\bar{v}}{dt} = F_{ext} + \bar{\mathcal{F}} = F_{ext} - \zeta \bar{v}. \quad (3.6)$$

Incluindo as partes que flutuam rapidamente no tempo v' e $\mathcal{F}'$, temos:

$$m \frac{dv}{dt} = F_{ext} - \zeta v + \mathcal{F}'(t). \quad (3.7)$$

Na Eq. (3.7) assumimos $\zeta \bar{v} \approx \zeta v$, pois a massa da partícula é muito maior que a massa do líquido na proximidade desta. Então $\zeta v'$ pode ser desprezado comparado ao termo predominante de flutuação rápida $\mathcal{F}'(t)$. A Eq. (3.7) é conhecida como equação de Langevin para o movimento browniano e difere da Eq. (3.1) por explicitar a decomposição da força $\mathcal{F}(t)$ numa força de flutuação lenta $-\zeta v$ e outra de rápidas flutuações $\mathcal{F}'(t)$ que é puramente randômica.

3.2 Teorema da Flutuação-Dissipação

Seja τ um intervalo de tempo macroscopicamente pequeno mas microscopicamente grande, de forma que $\tau \gg \tau^*$. Pretendemos encontrar uma relação entre o coeficiente de atrito ζ e a força estocástica $\mathcal{F}$.

Em um *ensemble* de sistemas que satisfaz a Eq. (3.1), podemos integrar em um intervalo de tempo τ e realizar a média de *ensemble* sobre as variáveis, desta forma:

$$m \langle v(t + \tau) - v(t) \rangle = F_{ext}(t)\tau + \int_t^{t+\tau} \langle \mathcal{F}(t') \rangle dt', \quad (3.8)$$

em que assumimos que a F_{ext} varia pouco no intervalo de tempo τ .

Assim, precisamos encontrar uma expressão para $\langle \mathcal{F} \rangle$. Considere uma partícula e as moléculas do fluido imediatamente próximas a ela um pequeno sistema imerso em um reservatório de calor, com temperatura absoluta constante T . Os possíveis estados que este sistema pode assumir em que a partícula tenha velocidade v são denotados por σ e nesses estados a força $\mathcal{F}$ tem o valor $\mathcal{F}_\sigma$.

Suponha que num tempo arbitrário t a partícula tenha velocidade $v(t)$. Podemos assumir que neste tempo a partícula esteja em equilíbrio com o reservatório, onde $\langle \mathcal{F} \rangle = 0$ e a probabilidade da partícula estar num estado σ será denotado por $W_\sigma^{(0)}$. Um pouco adiante, para $t' = t + \tau'$ quando a partícula tem velocidade $v(t + \tau')$, o movimento da partícula afeta o meio em sua volta e, se τ' é suficientemente pequeno, a força média $\langle \mathcal{F}(t') \rangle$ dependerá da situação anterior no tempo t . Assim, quando a velocidade da partícula muda, o equilíbrio interno do meio em sua volta é perturbado. Mas para um tempo da ordem do tempo de correlação τ^* o equilíbrio é restaurado nas novas condições, em que $v = v(t + \tau')$.

Para o intervalo de tempo τ' , $\tau' > \tau^*$, supomos que a velocidade da partícula mude de $\Delta v(\tau')$. Devido a esta mudança, a energia do reservatório passa de E' para $E' + \Delta E'(\tau')$ e o número de estados acessíveis ao reservatório muda de $\Omega(E')$ para $\Omega(E' + \Delta E')$. Em equilíbrio, a probabilidade de um determinado estado σ da partícula é proporcional ao número de estados acessíveis ao reservatório [16]. Então é possível comparar a probabilidade de ocorrência da mesma configuração σ nos tempos t e $t + \tau'$:

$$\frac{W_\sigma(t + \tau')}{W_\sigma^{(0)}} = \frac{\Omega(E' + \Delta E')}{\Omega(E')}, \quad (3.9)$$

em que $W_\sigma(t + \tau')$ é a probabilidade do estado σ em um tempo $t' = t + \tau'$.

Então, podemos escrever:

$$W_\sigma(t + \tau') = W_\sigma^{(0)} e^{\beta \Delta E'} \quad (3.10)$$

onde

$$\beta = \frac{\partial \ln \Omega}{\partial E'}. \quad (3.11)$$

A Eq. (3.11) segue diretamente da equação de Boltzman, $S(E) = K_B \ln \Omega(E)$, e da relação termodinâmica $\frac{1}{T} = \frac{dS}{dE}$. Para pequenas variações da energia:

$$W_\sigma(t + \tau') = W_\sigma^{(0)} (1 + \beta \Delta E'). \quad (3.12)$$

De posse da probabilidade de ocorrência do estado σ , podemos calcular o valor médio da força $\mathcal{F}$ no instante $t' = t + \tau'$:

$$\begin{aligned} \langle \mathcal{F} \rangle &= \sum_{\sigma} W_\sigma(t + \tau') \mathcal{F}_\sigma \\ \langle \mathcal{F} \rangle &= \sum_{\sigma} W_\sigma^{(0)} (1 + \beta \Delta E') \mathcal{F}_\sigma \\ \langle \mathcal{F} \rangle &= \left\langle (1 + \beta \Delta E') \mathcal{F} \right\rangle_0. \end{aligned} \quad (3.13)$$

O símbolo $\langle \rangle_0$ denota a média usando a probabilidade de equilíbrio, $W_\sigma^{(0)}$. Como $\langle \mathcal{F} \rangle_0 = 0$,

$$\langle \mathcal{F} \rangle = \beta \left\langle \Delta E' \mathcal{F} \right\rangle_0. \quad (3.14)$$

O aumento de energia do reservatório no intervalo de tempo $\tau' = t' - t$ pode ser escrito como menos o trabalho feito pela força $\mathcal{F}$ sobre a partícula:

$$\Delta E' = - \int_t^{t'} v(t'') \mathcal{F}(t'') dt'' \quad (3.15)$$

Assumindo que a velocidade v varia pouco no intervalo de tempo τ' :

$$\Delta E' = -v(t) \int_t^{t'} \mathcal{F}(t'') dt'' \quad (3.16)$$

Substituindo $\Delta E'$ na Eq. (3.14):

$$\begin{aligned} \langle \mathcal{F}(t') \rangle &= -\beta \left\langle \mathcal{F}(t') v(t) \int_t^{t'} \mathcal{F}(t'') dt'' \right\rangle_0 \\ \langle \mathcal{F}(t') \rangle &= -\beta \bar{v}(t) \int_t^{t'} \langle \mathcal{F}(t') \mathcal{F}(t'') \rangle_0 dt'' \end{aligned} \quad (3.17)$$

em que fizemos a média de v e de $\mathcal{F}$ separadamente, visto que a variação de v é muito menor que a variação de $\mathcal{F}$.

Escrevendo a Eq. (3.17) em termos da variável s , onde $s \equiv t'' - t'$, e substituindo o valor de $\langle \mathcal{F}(t') \rangle$ na Eq. (3.8):

$$m \langle v(t + \tau) - v(t) \rangle = F_{ext}(t) \tau + \int_t^{t+\tau} dt' \int_{t-t'}^0 \langle \mathcal{F}(t') \mathcal{F}(t' + s) \rangle_0 ds \quad (3.18)$$

O domínio de integração da integral que aparece na Eq. (3.18) é mostrado na Fig. 3.1 e o integrando é exatamente a função correlação $C(s)$ (ver Apêndice B) de $\mathcal{F}$ que é diferente de zero apenas na região onde $|s| \sim \tau^*$ que é muito menor que τ . Como $C(s)$ não depende de t' , podemos fazer a integração em t' primeiro. Mudando a ordem de integração e aplicando os limites mostrados na Fig. 3.1, temos:

$$\begin{aligned} I &= \int_{-\tau}^0 C(s) ds \int_{t-s}^{t+\tau} dt' \\ I &= \int_{-\tau}^0 C(s) (\tau + s) ds \end{aligned} \quad (3.19)$$

em que I é a integral da Eq. (3.18), $I = \int_t^{t+\tau} dt' \int_{t-t'}^0 C(s) ds$.

Como $C(s) \rightarrow 0$ quando $|s| \gg \tau^*$ podemos desprezar s e substituir o limite inferior $-\tau$ por $-\infty$ na Eq. (3.19). Assim:

$$I \approx \tau \int_{-\infty}^0 C(s) ds$$

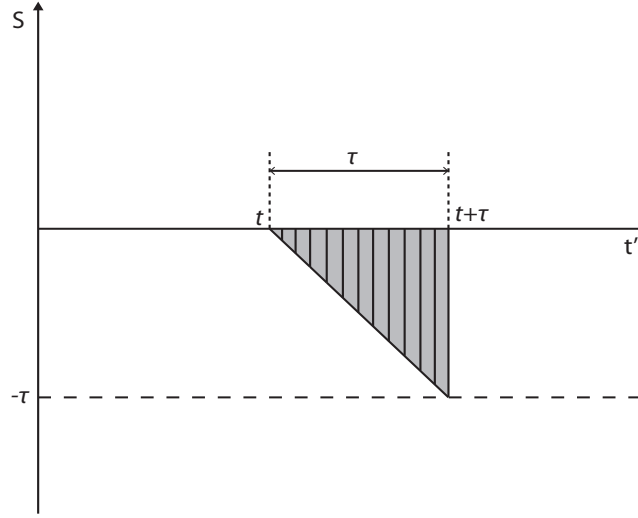


Figura 3.1: Domínio de integração da integral da Eq. (3.18).

e como $C(s)$ é uma função par:

$$I = \frac{1}{2}\tau \int_{-\infty}^{+\infty} C(s) ds \quad (3.20)$$

Desta forma, usando a Eq. (3.20) segue que a Eq. (3.18) pode ser escrita como:

$$m \langle v(t + \tau) - v(t) \rangle = F_{ext}(t)\tau - \zeta \bar{v}(t)\tau, \quad (3.21)$$

em que a constante ζ é dada por:

$$\zeta \equiv \frac{1}{2K_B T} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle \mathcal{F}(t') \mathcal{F}(t' + s) \rangle_0 ds. \quad (3.22)$$

Como $\bar{v}$ varia pouco no intervalo de tempo τ :

$$m \frac{d\bar{v}}{dt} = F_{ext} - \zeta \bar{v}. \quad (3.23)$$

A Eq. (3.22) é conhecida como Teorema da Flutuação-Dissipação para o movimento browniano, e explicita o coeficiente de atrito ζ em termos da função correlação da força estocástica na situação de equilíbrio.

3.3 Movimento Browniano de uma Partícula submetida ao Potencial Harmônico

Como já discutimos, a pinça óptica estabelece um potencial harmônico na microesfera. Além disso, neste trabalho utilizamos dois métodos de calibração da pinça que se respaldam nas flutuações brownianas. Nesta seção, vamos resolver a equação de Langevin para a escala de tempo que a partícula alcança a posição de equilíbrio. Uma análise desta equação em todas as escalas de tempo pode ser encontrada na Ref. [18]. Podemos escrever a equação de Langevin, Eq. (3.7), para uma partícula submetida ao potencial harmônico fazendo $F_{ext} = -kx$:

$$m \frac{dv}{dt} + \zeta v + kx = \mathcal{F}(t). \quad (3.24)$$

O movimento de uma partícula em um poço de potencial harmônico pode ser descrito em três escalas de tempo diferentes:

- $t_1 = \tau^*$, nesta escala de tempo são observadas as flutuações da força estocástica, x e v não variam significativamente;
- $t_2 = \zeta/m$, que é o tempo característico para a partícula alcançar sua velocidade de equilíbrio;
- $t_3 = \zeta/k$, que é tempo característico para a partícula alcançar a posição de equilíbrio [18, 19, 7].

Estamos interessados nas flutuações da posição da partícula. Assim, observamos o movimento browniano na escala de tempo t_3 . Nesta escala, a partícula já alcançou sua velocidade de equilíbrio, logo $\frac{dv}{dt} = 0$. Desta forma, a Eq. (3.24) pode ser escrita como:

$$\frac{dx}{dt} + \frac{x}{\tau} = \frac{\mathcal{F}(t)}{\zeta} \quad (3.25)$$

onde $\tau = \zeta/k$.

Podemos resolver a Eq (3.25) explicitando a dependência de x com $\mathcal{F}$:

$$x(t) = x_0(t) e^{-\frac{t-t_0}{\tau}} + \int_{t_0}^t \frac{\mathcal{F}(t')}{\zeta} e^{-\frac{(t-t')}{\tau}} dt'. \quad (3.26)$$

Para $t_0 \rightarrow -\infty$:

$$x(t) = \int_{-\infty}^t \frac{\mathcal{F}(t')}{\zeta} e^{-\frac{(t-t')}{\tau}} dt'. \quad (3.27)$$

Em termos da função correlação de x :

$$C_x(s) = \langle x(0)x(s) \rangle = \frac{1}{\zeta^2} \int_{-\infty}^0 dt' \int_{-\infty}^s \langle \mathcal{F}(t') \mathcal{F}(t'') \rangle e^{-\frac{(s-t'-t'')}{\tau}} dt'' . \quad (3.28)$$

Usando a Eq. (B.14) do Apêndice B:

$$\begin{aligned} C_x(s) &= \frac{2K_B T}{\zeta} \int_{-\infty}^0 dt' \int_{-\infty}^s \delta(t'' - t') e^{-\frac{(s-t'-t'')}{\tau}} dt'' \\ C_x(s) &= \frac{2K_B T}{\zeta} \int_{-\infty}^0 e^{-\frac{(s-2t')}{\tau}} dt' \\ C_x(s) &= \frac{K_B T}{k} e^{-\frac{s}{\tau}} . \end{aligned}$$

Logo,

$$\langle x(0)x(s) \rangle = \frac{K_B T}{k} e^{-\frac{s}{\tau}} \quad (3.29)$$

é a solução da equação de Langevin para uma partícula em movimento browniano submetida ao potencial harmônico na escala de tempo t_3 , que é o tempo característico para a partícula alcançar sua posição de equilíbrio [18].

Capítulo 4

Procedimentos experimentais e equipamentos

4.1 Montagem experimental

A Fig. 4.1 mostra um esquema da montagem experimental que utilizamos em nossas medidas. A região entre a linha pontilhada representa o microscópio invertido Nikon Ti-S, com objetiva de óptica corrigida no infinito, aumento de 100X e abertura numérica $NA=1,4$. A objetiva do microscópio é responsável por focalizar o feixe infravermelho (IV), que produz a pinça. Esse feixe é cilíndrico ao sair do emissor e se torna cônico após atravessar a objetiva. Além disso, a objetiva é usada para coletar a intensidade de luz retroespalhada do laser He-Ne pela microesfera e observá-las.

O laser visível de He-Ne da *Research Electro-Optics* de $\lambda = 632,8$ nm é utilizado para determinarmos a constante de força da pinça óptica através da análise da luz retroespalhada pela microesfera. O laser IV é responsável por aprisionar as microesferas. No esquema, o laser IV representa os dois lasers de infravermelho com os quais trabalhamos: *1064-DPSS Altechna Corp.* com potência máxima de 2,5 W; e o *IPG Photonics* modelo *YLR-5-1064-LP* com potência máxima de 6,0 W. Esses dois lasers de comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm operam no modo usual TEM_{00} .

L_1 representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio. Logo abaixo do condensador está a amostra de solução aquosa de microesferas. Representamos uma microesfera presa devido ao potencial da pinça e indicamos o sistema de referência. A lamínula é o porta-amostra e h é a distância do centro da microesfera pinçada em relação à lamínula. O deslocador piezoelétrico Newport acoplado ao estágio

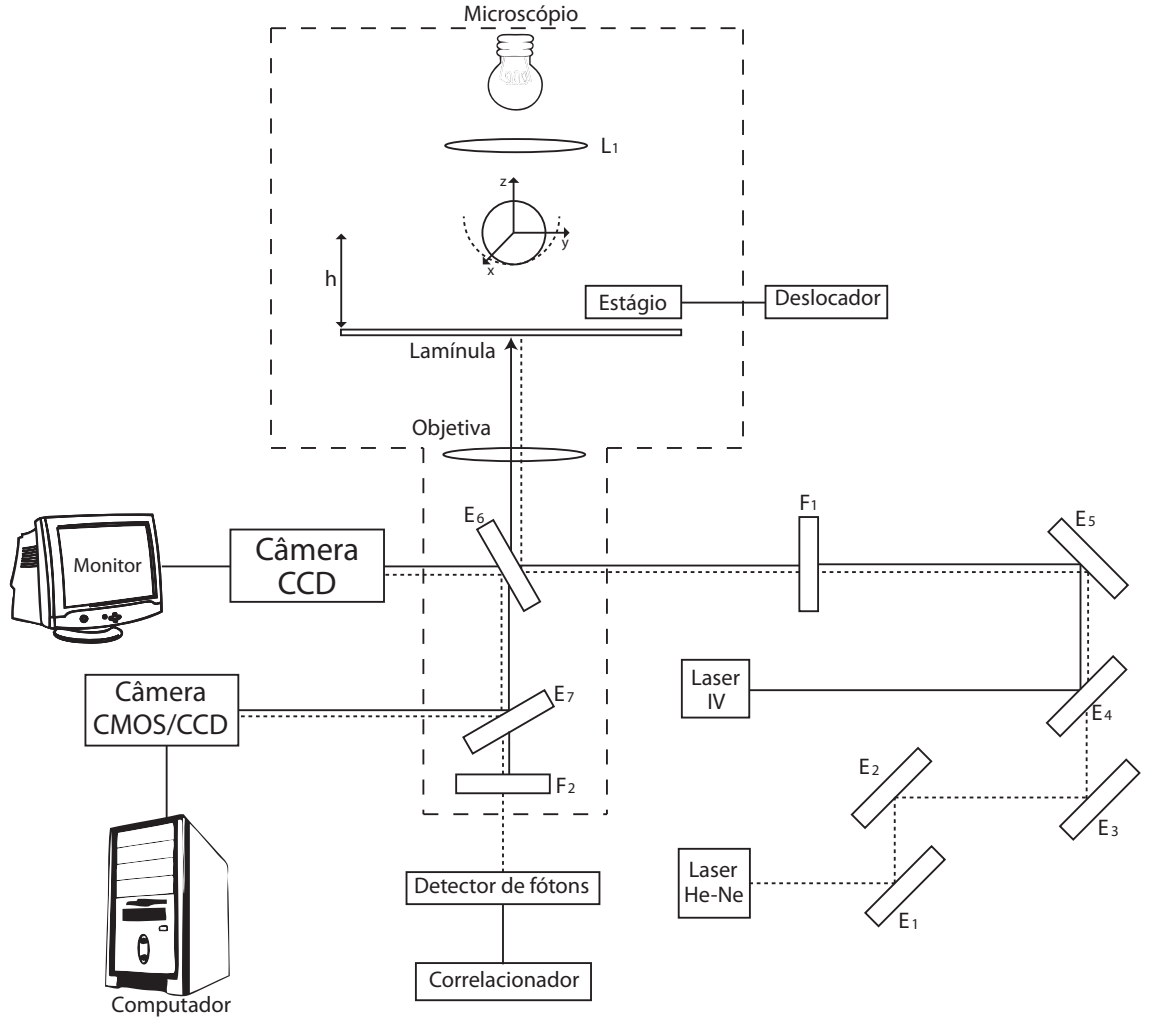


Figura 4.1: Montagem Experimental.

permite movimentar a lamínula com precisão nanométrica.

Em uma das saídas do microscópio conectamos o detector de fótons *BI-APD* ligado ao correlacionador *TuboCorr digital autocorrelator* ambos da *Brookhaven Instruments*. O correlacionador nos fornece as funções de correlação de intensidade da luz retroespalhada pela microesfera em função do tempo. Em frente ao detector de fótons usamos um filtro passa faixa centrado em $\lambda = 632,8$ nm, representado por F_2 , a fim de garantir que a luz coletada pelo detector seja advinda apenas do laser de He-Ne. F_1 representa um filtro de densidade neutra.

Nas outras duas saídas conectamos as câmeras: a CMOS é ligada ao computador que devido a sua alta taxa de captura a utilizamos no experimento de análise da

função da autocorrelação de posição da microesfera, como descrito na seção 4.4.2; e uma câmera CCD analógica é ligada ao monitor para a visualização da amostra. Para fazermos a calibração da pinça via força de Stokes (seção 4.4.1), trocamos a câmera CMOS por outra câmera CCD digital, pois a câmera CCD fornece uma imagem mais uniforme, que é mais fácil de ser trabalhada usando a videomicroscopia.

E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_5 , E_6 e E_7 são espelhos. Sendo que E_4 e E_6 são espelhos dicróicos, particularmente o espelho E_4 reflete o laser IV mas é transparente para o laser de He-Ne.

4.2 Preparação das amostras

As amostras são soluções de microesferas de poliestireno (Polysciences inc.) de diâmetro $3,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ em água deionizada (DI). A concentração da solução é de $0,5 \mu\text{L}$ da solução estoque de microesferas para $1000 \mu\text{L}$ de água DI.

O porta-amostra consiste em uma lamínula de vidro de espessura aproximada $0,15 \text{ mm}$ com um O-ring de borracha de diâmetro aproximado de $1,0 \text{ cm}$ colado em sua superfície. O O-ring é colado na superfície da lamínula usando parafina derretida. A solução é posta no interior do anel e em seguida tampamos com outra lamínula para diminuir as influências do meio externo sobre a solução, evitando perturbações mecânicas.

4.3 Atrito sobre a microesfera em solução aquosa

Uma grandeza importante para determinar a constante da pinça óptica é o coeficiente de atrito sobre a microesfera em solução aquosa. Este coeficiente depende do tamanho da microesfera, da distância em relação a lamínula e da viscosidade da solução. O coeficiente de atrito para movimentos paralelos à superfície da lamínula pode ser escrito como [20, 21, 22]

$$\zeta = \zeta_0 \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 + \dots \right]^{-1} \quad (4.1)$$

onde a é o raio da microesfera, h é a distância do seu centro em relação a lamínula e:

$$\zeta_0 = 6\pi\eta a, \quad (4.2)$$

sendo que η é a viscosidade da água. Consideramos também a variação da viscosidade com a temperatura [23]:

$$\eta = 10^{-3} [0,26 + 1,51 \exp(-t_c/29)] \quad (4.3)$$

onde t_c é a temperatura do ambiente em graus Celsius e a viscosidade é encontrada em unidades SI.

4.4 Calibração da Pinça Óptica

A pinça óptica é uma ferramenta poderosa de manipulação de objetos da ordem de micrômetros e tem sido usada em aplicações em física e em biologia [2, 24]. Para realizar medidas quantitativas de força com precisão é essencial conhecermos a constante de força da pinça óptica.

Neste trabalho utilizamos três métodos para calibrar a pinça óptica: método da força de Stokes, pela análise da função autocorrelação de posição da microesfera e via análise da medida da luz retroespalhada pela microesfera. Esses três procedimentos serão discutidos nesta seção.

4.4.1 Método da Força de Stokes

Esse método consiste em deslocar o estágio do microscópio com velocidade conhecida e medir o deslocamento da microesfera em relação à situação inicial, com o estágio parado.

A microesfera presa na pinça está submetida a um potencial aproximadamente harmônico e quando um fluxo é aplicado à amostra, que pode ser feito movendo o estágio do microscópio, a força de Stokes atua na microesfera mudando sua posição média de equilíbrio em relação ao mínimo do poço de potencial como apresentado na Fig. 4.2. O módulo da força de Stokes é dada por:

$$F = \zeta v, \quad (4.4)$$

sendo ζ determinado pelas Eqs. (4.1) e (4.2) e v a velocidade do fluxo em relação a microesfera.

Supondo que se estabeleça um fluxo na direção x , a força de Stokes irá deslocar a posição de equilíbrio da microesfera por uma quantidade Δx . A força resultante é

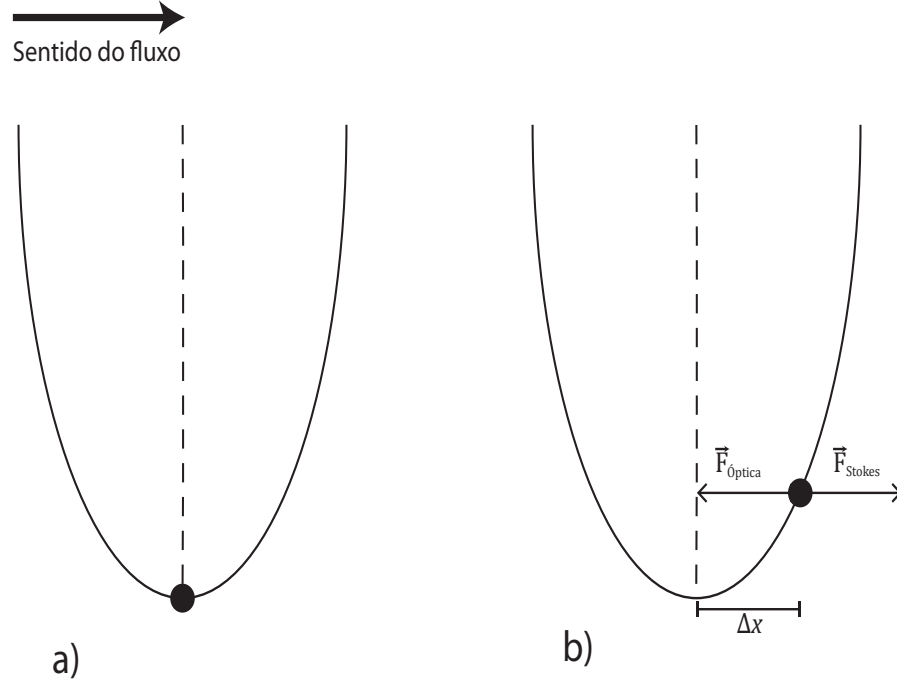


Figura 4.2: (a) Microesfera presa a pinça óptica antes de ser estabelecido o fluxo. (b) Microesfera presa a pinça depois do fluxo ser estabelecido.

nula na nova posição de equilíbrio, daí:

$$F_{Stokes} = F_{optica}.$$

Desta forma,

$$\zeta v = k\Delta x.$$

Assim, podemos explicitar a constante da pinça:

$$k = \frac{\zeta v}{\Delta x}. \quad (4.5)$$

Para fazer esse experimento pinçamos uma microesfera, ajustamos a altura desejada com o *knob* do microscópio e começamos a filmagem antes de mover o estágio. Desta forma, conseguimos extrair do vídeo informações da posição média da microesfera antes e depois do fluxo ser estabelecido. A diferença entre a posição média final e a inicial da microesfera fornece-nos o seu deslocamento no poço de potencial, Δx . Determinamos a relação *pixel*/micromêtro capturando uma foto de uma lamínula graduada. Para esta configuração experimental o valor encontrado foi de $20,7 \text{ pixels}/\mu\text{m}$.

Para determinarmos a velocidade do fluxo marcamos a variação de posição em um determinado intervalo de tempo de uma referência, por exemplo uma microesfera presa à lamínula. De posse da relação *pixel*/micrômetro e da taxa de captura da câmera facilmente convertemos *pixel* e *frame* nas unidades de interesse, micrômetro e segundo. Assim, determinados Δx e v obtemos a constante de força da pinça substituindo esses dados na Eq. (4.5).

Uma das vantagens deste método é a facilidade de realizar o experimento. Por outro lado, mover a amostra com uma velocidade constante pode ser uma dificuldade para aqueles que não possuem um deslocador piezoelétrico.

4.4.2 Método da função autocorrelação de posição da microesfera

Para este experimento utilizamos uma câmera Guppy F503B CMOS (Allied Vision Technologies) a fim de capturar o movimento browniano da microesfera submetida ao potencial harmônico. A área da filmagem foi $90 \times 90 \text{ pixels}^2$ e a taxa de captura usada foi 580 quadros por segundo, que é compatível com o tempo característico para a partícula alcançar sua posição de equilíbrio submetida a este potencial (10^{-3} s). A relação *pixel*/micrômetro para esta configuração experimental foi de $45,3 \text{ pixels}/\mu\text{m}$. Em seguida, determinamos as coordenadas x e y do centro de massa da microesfera para cada *frame* do vídeo. Para isso, usamos a ferramenta *analyze particles - center of mass* do programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Com estas coordenadas em função do tempo, fizemos um programa em FORTRAN para determinar a função autocorrelação de posição da microesfera. A Fig. 4.3 mostra um gráfico típico deste experimento. Os dados foram ajustados por uma exponencial simples de acordo com a Eq. (3.29):

$$\langle x(0)x(t) \rangle = Ae^{-\frac{t}{\tau^*}}. \quad (4.6)$$

Através do ajuste determinamos a amplitude A e o tempo característico τ^* . Comparando com a Eq. (3.29) podemos determinar a constante da pinça óptica no plano paralelo à lamínula por meio desses dois parâmetros da função de autocorrelação:

$$A = \frac{K_B T}{k}$$

ou,

$$k = \frac{K_B T}{A} \quad (4.7)$$

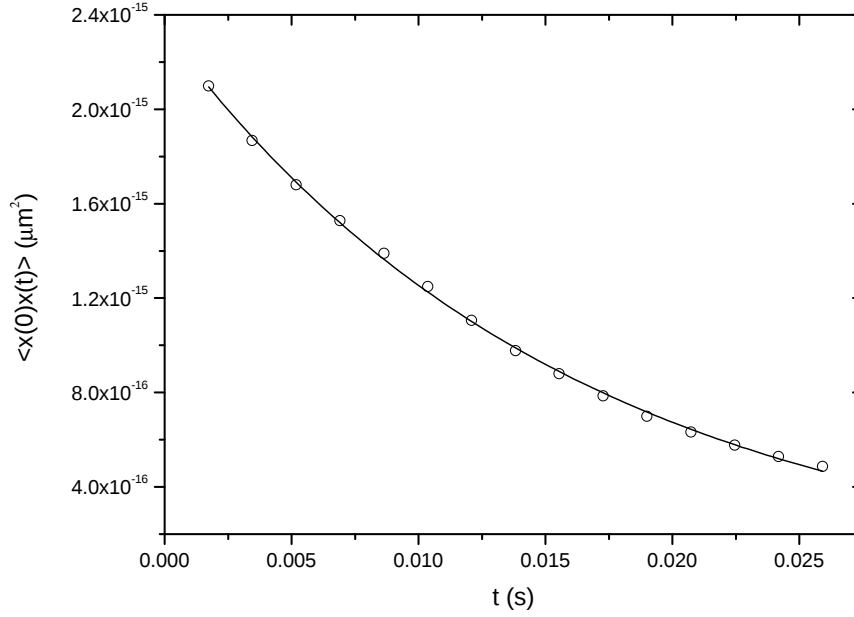


Figura 4.3: Função de autocorrelação de posição de uma microesfera sujeita ao potencial harmônico em função do tempo. Círculos: dados experimentais; linha: ajuste segundo a Eq. (4.6).

E via o tempo característico:

$$t^* = \tau$$

usando que $k = \frac{\zeta}{\tau}$ podemos determinar a constante de força da pinça óptica. Em nossa montagem, a constante de força nas direções x e y (paralelas à lamínula) são basicamente iguais, devido a simetria do poço de potencial no plano xy .

Este método é similar à calibração que utiliza a densidade do espectro de potência, que usa o formalismo de Fourier para estudar as flutuações brownianas da microesfera no domínio das frequências [25, 26]. Todavia, tem a vantagem de ser mais simples que o deixa acessível a um público mais amplo, de outras áreas como biologia e química. Além disso, este método não utiliza equipamentos sofisticados como motores piezoelétricos e fotodetectores que normalmente são utilizados em outros métodos de calibração. Como veremos no Capítulo 5, apesar da simplicidade este método apresenta resultados precisos.

4.4.3 Método da luz retroespalhada pela microesfera

Conectamos o correlacionador e o detector no microscópio como mostrado na Fig. 4.1. A intensidade da luz retroespalhada pela microesfera presa na pinça depende do seu tamanho e de sua posição relativa ao feixe He-Ne, laser usado para o espalhamento. Desta forma, as flutuações de posição da esfera causam flutuações na intensidade da luz retroespalhada por ela. Dessas flutuações de intensidade, podemos determinar a constante de força da pinça.

Verificamos um comportamento gaussiano da intensidade de luz retroespalhada pela microesfera posicionando-a em um ponto de intensidade mínima e variando a posição relativa do detector ao longo de uma direção até o outro ponto de intensidade mínima. A partir da verificação do perfil, posicionamos a microesfera em um dos pontos do perfil cuja derivada é máxima. Nestas posições obtemos uma melhor relação sinal-ruído para a função de correlação [21, 27]. Escolhemos a direção de interesse, no nosso caso a direção x , e centralizamos primeiramente a esfera em relação a direção y , posicionamos a esfera na direção y em um ponto do perfil cuja derivada é nula. Assim, garantimos que a contribuição para a função de correlação seja máxima devido ao movimento na direção de interesse e mínima devido ao movimento na direção y [21, 28]. Com o detector posicionado, o correlacionador mede as funções de correlação. A Fig. 4.4 é um exemplo da função de correlação de intensidades normalizada pela amplitude.

A função correlação de intensidades para uma microesfera submetida a um potencial harmônico, devido a pinça óptica, é dada por [29, 21]:

$$f(t) = B + A_x \exp[-t/\tau_x] + A_z \exp[-t/\tau_z] \quad (4.8)$$

sendo B o mínimo da função de correlação, A_x e A_z as amplitudes e τ_x e τ_z os tempos característicos do movimento browniano da microesfera nestas duas direções. A Eq. (4.8) foi usada para ajustar os pontos experimentais; a curva experimental e o ajuste são apresentados na Fig. 4.4. Através deste ajuste, conseguimos determinar as constantes A_x , A_z , τ_x e τ_z . O tempo característico τ_z é aproximadamente 6 a 10 vezes maior que τ_x e varia muito de uma medida para outra que pode ser devido a imprecisão em controlar a posição da microesfera na direção z [21, 8].

De posse do tempo característico do movimento browniano na direção x e do coeficiente de atrito sobre ela nesta mesma direção (ver seção 4.3), a constante de força da pinça óptica pode ser determinada através da relação [21, 27]:

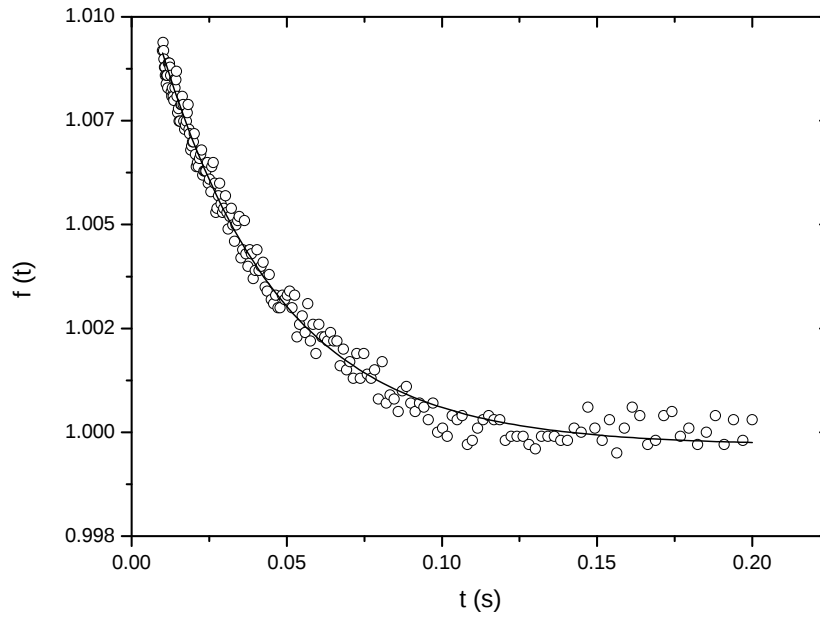


Figura 4.4: Gráfico típico de uma função de correlação de intensidades normalizada.

$$k_x = \frac{\zeta}{\tau_x}. \quad (4.9)$$

Este método exige equipamentos mais sofisticados como o fotodetector, o correlacionador e o laser de He-Ne, o que torna esta calibração mais cara. No entanto, o fotodetector é capaz de captar flutuações brownianas em uma resolução mais alta que a do método descrito na seção 4.4.2. Assim, esta calibração fornece resultados ainda mais precisos que a calibração por meio da correlação de posição.

Capítulo 5

Resultados

Neste capítulo analisamos os resultados numéricos e experimentais obtidos para a constante de força das duas pinças ópticas com as quais trabalhamos. Os resultados numéricos foram implementados no MATHEMATICA usando o limite da óptica geométrica (OG) discutido no Capítulo 2. Os resultados experimentais foram obtidos com as técnicas descritas no Capítulo 4.

5.1 Resultados Numéricos

Os resultados numéricos foram obtidos no limite da OG. Na seção 5.2.3 comparamos os resultados numéricos com os resultados experimentais. Para a pinça óptica montada com o laser *1064-DPSS Altechna Corp.* não foi possível comparar o experimento com os resultados numéricos devido ao fato do laser ter apresentado problemas antes de determinarmos alguns parâmetros necessários para o cálculo.

Usando a Eq. (2.44) calculamos a força total do feixe de laser sobre a microesfera ao longo de uma direção paralela a lamínula; como já comentamos, devido à simetria do poço de potencial da pinça, a força é basicamente a mesma nessas direções. Apresentamos o resultado da força na direção x em função do deslocamento x da microesfera em relação à posição de equilíbrio. Mostramos também a constante de força da pinça óptica na direção x em função da potência local do feixe na microesfera.

Fizemos os cálculos utilizando os valores da potência local apresentados na Tabela C.1 no Apêndice C. Vale ressaltar que a potência local mostrada na Tabela C.1 é válida para uma microesfera encostada na lamínula. Consideramos que a potência perdida entre a lâmina e a microesfera a uma determinada altura é apenas devido ao efeito da aberração esférica que diminui o número de raios que chegam na esfera. Uti-

lizamos o valor $n_{esfera} = 1,60$ para índice de refração das microesferas de poliestireno; o índice de refração do meio utilizado foi $n_{agua} = 1,33$. Os outros parâmetros são o foco $f = 0,375 \pm 0,005$ cm e a largura do perfil de intensidade do laser $\sigma = 1,36 \pm 0,05$ mm cujo procedimento da medida é descrito no Apêndice A.

Para calcular F_x e k_x temos que determinar a posição de equilíbrio da microesfera presa na pinça como mostrado na Fig. 2.6, onde a esfera está deslocada na direção z . A posição de equilíbrio r_{eq} é a posição onde a força resultante na direção z é nula. Podemos observar na Fig. 5.1 que a razão entre a posição de equilíbrio e o raio da microesfera (r_{eq}/a) é uma constante e não depende da potência local na microesfera para $F_z = 0$. Note que a razão $(r/a)_z$ na direção z depende da potência local, mas na posição de equilíbrio ($F_z = 0$) esta razão é constante. O gráfico da Fig. 5.1 corresponde à situação de uma microesfera situada a $8,0 \mu\text{m}$ da lamínula para o caso sem aberração. Nos dois casos, considerando a aberração e sem considerá-la, o centro da esfera fica acima do foco da objetiva. Assim, o ângulo γ definido na Fig. 2.5 vale 180° .

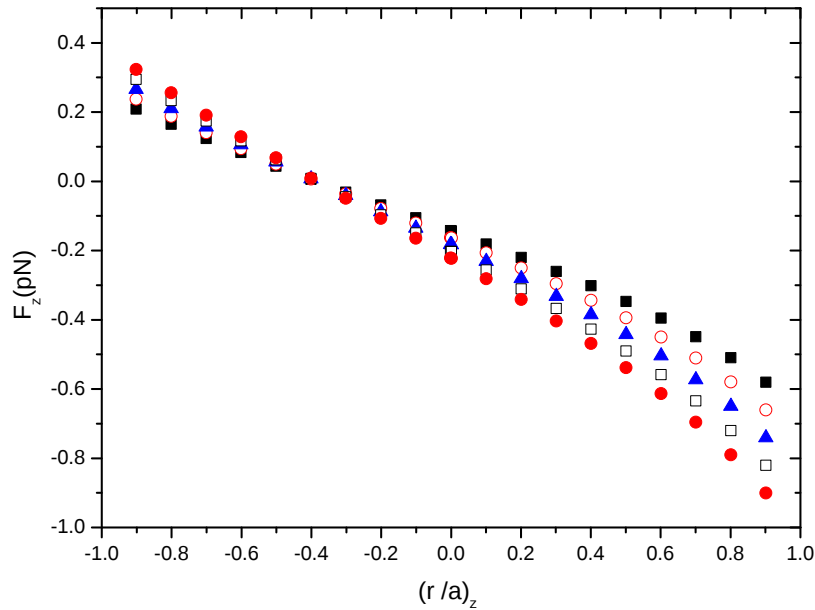


Figura 5.1: F_z em função de r/a ao longo da direção z . *Quadrados cheios*: $P_{local} = 1,21$ mW, *círculos*: $P_{local} = 1,37$ mW, *triângulos*: $P_{local} = 1,54$ mW, *quadrados vazios*: $P_{local} = 1,71$ mW e *discos*: $P_{local} = 1,87$ mW.

A força da pinça sobre a esfera na direção x é obtida deslocando-se ligeiramente

a microesfera nesta direção a partir da posição de equilíbrio, na implementação usamos um deslocamento de 10% do valor do raio da esfera. Em ambos os casos, considerando ou não a aberração, a força é diretamente proporcional ao deslocamento. Na Fig. 5.2, apresentamos a curva $F_x \times x$ para uma esfera encostada na lâmina, onde é possível perceber o efeito da aberração esférica embora esse seja mínimo nesta situação.

A constante de força pode ser calculada com a Eq. (2.5), observe que k_x é a inclinação da curva $F_x \times x$ apresentada na Fig. 5.2. Note que o efeito da aberração esférica é diminuir a constante de força da pinça. A Fig. 5.3 mostra a constante de força da pinça em função da potência local para a esfera situada a uma altura $h = 8,0 \mu\text{m}$.

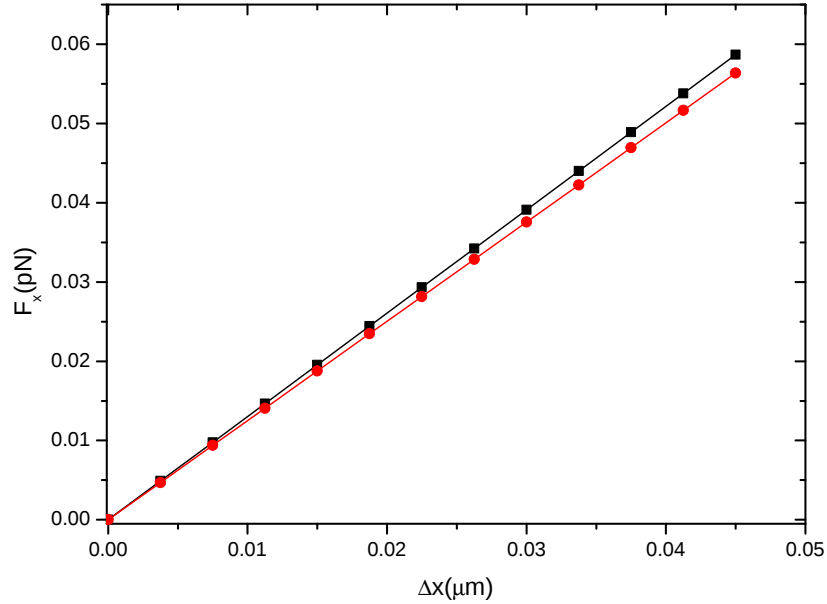


Figura 5.2: Força $\times$ deslocamento na direção x para uma microesfera de poliestireno com $a = 1,5 \mu\text{m}$, $h = a$ e $P_{local} = 1,37 \text{ mW}$. *Quadrados*: sem aberração; *discos*: com aberração esférica.

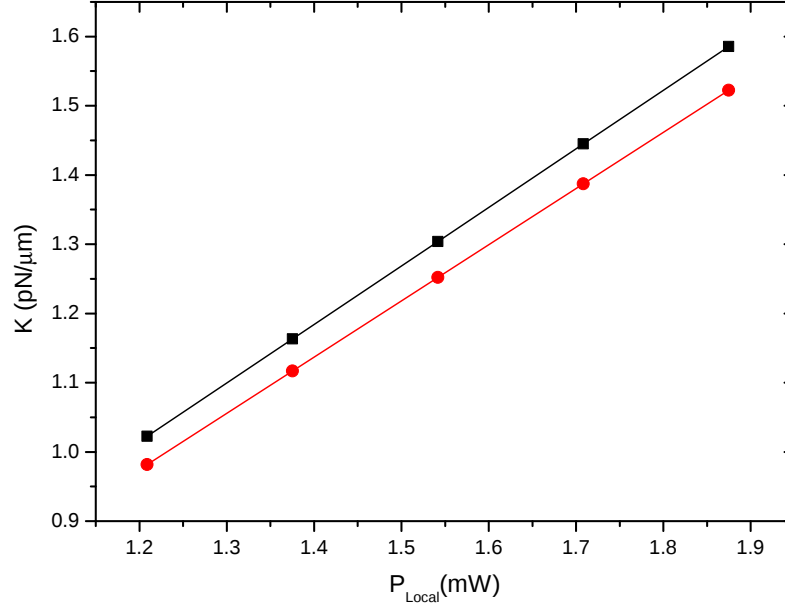


Figura 5.3: $k_x \times P_{local}$ para uma microesfera de poliestireno com $a = 1,5 \mu\text{m}$, $h = 8,0 \mu\text{m}$. Quadrados: sem aberração; discos: com aberração esférica.

5.2 Resultados Experimentais

5.2.1 Pinça óptica montada com o laser *1064-DPSS Altechna Corp.*

Como descrito na seção 4.4.2 a constante de força da pinça óptica k pode ser determinada calculando-se a função de autocorrelação $\langle x(0)x(t) \rangle$. Uma curva típica com os dados experimentais e o ajuste desta curva são mostrados na Fig. 4.3. Observe que há uma concordância satisfatória entre os dados experimentais e a teoria, ajuste segundo a Eq. (3.29). Além disso, com este método podemos calcular a constante de força por meio da amplitude ($k_B T/k$) e do tempo característico ($\tau = \zeta/k$) da Eq. (3.29). Determinar k por meio da amplitude é equivalente a calibrar a pinça calculando o deslocamento quadrático médio que é exatamente a função de autocorrelação para $t = 0$.

Os resultados deste trabalho demonstram que a calibração via análise do tempo característico é mais confiável do que a calibração por meio da amplitude como apre-

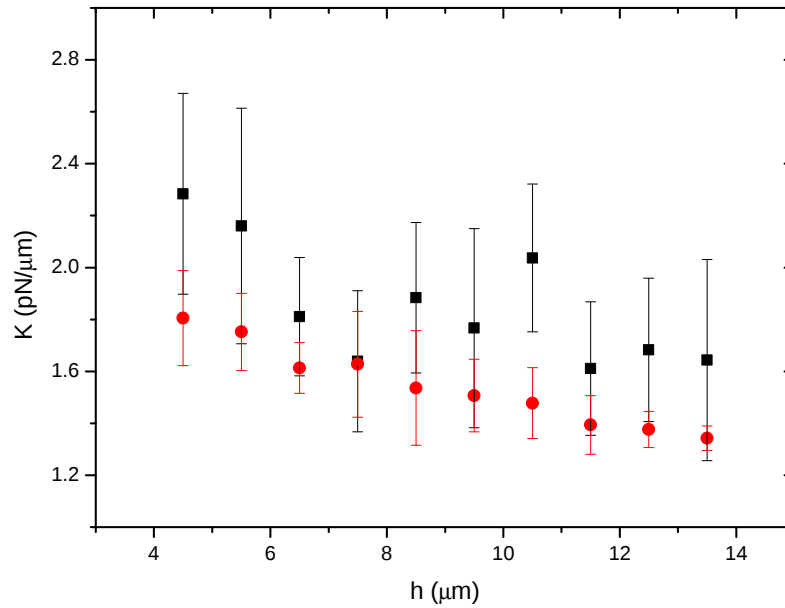


Figura 5.4: Constante de força da pinça em função da altura h do centro da microesfera pinçada em relação à lamínula. *Quadrados*: valores da constante de força medidos através da amplitude, *discos*: valores da constante de força medidos através do tempo característico.

sentado nas Figs. 5.4 e 5.5. Note que a calibração pelo tempo característico flutua menos e as barras de erro são menores comparadas à calibração pela amplitude. As barras de erro são o desvio padrão de um conjunto de dez medidas realizadas.

Na Fig. 5.4 mostramos a constante de força da pinça óptica em função da altura h do centro da microesfera em relação a lamínula. O método é suficientemente preciso para observarmos a redução da constante de força com a altura que acontece devido à aberração esférica, efeito inerente ao arranjo experimental [10].

Na Fig. 5.5 mostramos a constante de força da pinça em função da potência para uma altura fixa, $h = 8,5 \mu\text{m}$. Como sabemos, esta constante de força é proporcional a potência do laser usado para montar a pinça e este resultado também é reproduzido neste trabalho.

A função autocorrelação de posição foi usada por Gibson em 2008, Ref. [30], para medir a força na microesfera devido a pinça óptica. No entanto, nosso trabalho inova ao comparar explicitamente a constante de força obtida pela amplitude e pelo

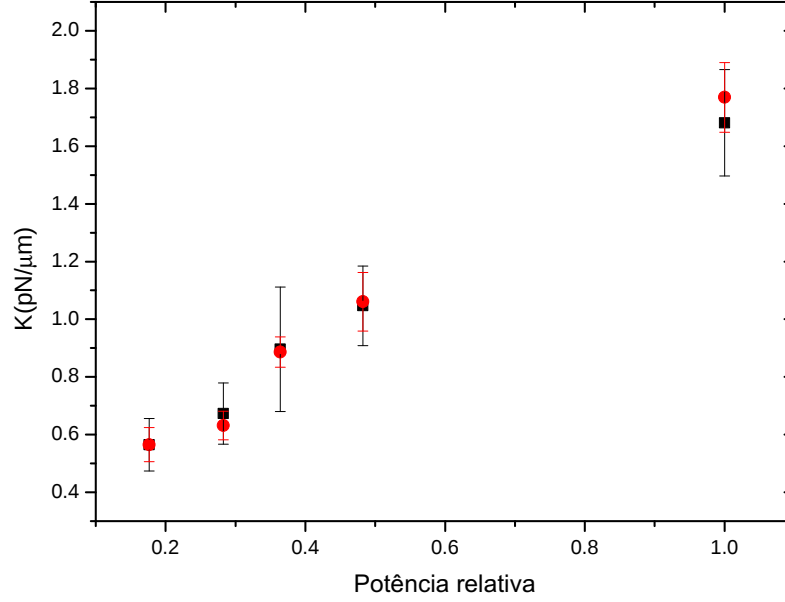


Figura 5.5: Constante de força da pinça em função da potência relativa para uma altura $h = 8,5 \mu\text{m}$. *Quadrados*: valores da constante de força medidos através da amplitude, *discos*: valores da constante de força medidos através do tempo característico.

tempo característico desta função de autocorrelação, demonstrando que a calibração que utiliza o tempo característico é mais precisa. Assim, a partir desta seção apresentamos os resultados da calibração usando a autocorrelação de posição por meio do tempo característico.

Como descrito na seção 4.4.2, determinamos as coordenadas do centro de massa da microesfera em função do tempo usando uma câmera com alta taxa de captura. A partir desses dados podemos determinar a forma do potencial nas proximidades da região de equilíbrio. Para isso, construímos um histograma das posições da esfera. Em equilíbrio, a densidade de probabilidade $\rho(x)$ da posição da partícula em uma dimensão é dada por [31]:

$$\rho(x) = \exp[-V(x)/k_B T]$$

onde $V(x)$ é o potencial da pinça.

O potencial pode ser obtido a partir do histograma das posições da esfera presa como [31]:

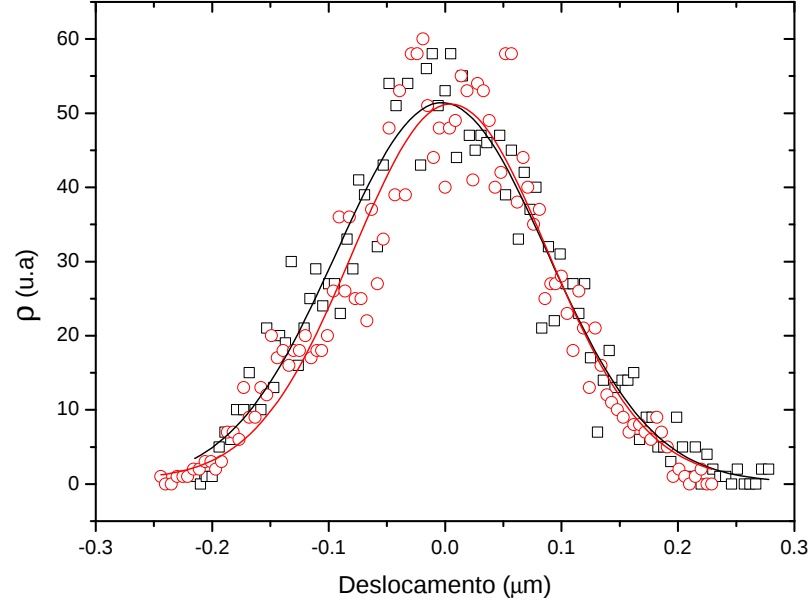


Figura 5.6: Histograma das coordenadas x e y da esfera presa na pinça. *Círculos*: pontos experimentais para a coordenada x ; *linha vermelha*: ajuste gaussiano na direção x . *Quadrados*: pontos experimentais para a coordenada y ; *linha preta*: ajuste gaussiano na direção y .

$$V(x) = -k_b T \ln(\rho(x))$$

A Fig. 5.6 mostra o histograma das coordenadas x e y para uma esfera submetida a uma potência de 18% da potência máxima que usamos para este laser, a uma altura de $8,5 \mu\text{m}$. Na Fig. 5.7 apresentamos os potenciais na direção x e na direção y para estas condições. Mostramos os dois potenciais a fim de confirmar o que já comentamos, que os valores da constante de força nas direções paralelas à lâmina são praticamente os mesmos. Com a informação dos potenciais, determinamos as constantes de força da pinça nas direções x e y :

$$k = 2c$$

sendo c o coeficiente do termo quadrático do respectivo potencial. Nessas condições, $k_x = 0,58 \pm 0,03 \text{ pN}/\mu\text{m}$ e $k_y = 0,54 \pm 0,05 \text{ pN}/\mu\text{m}$. Além disso, podemos observar

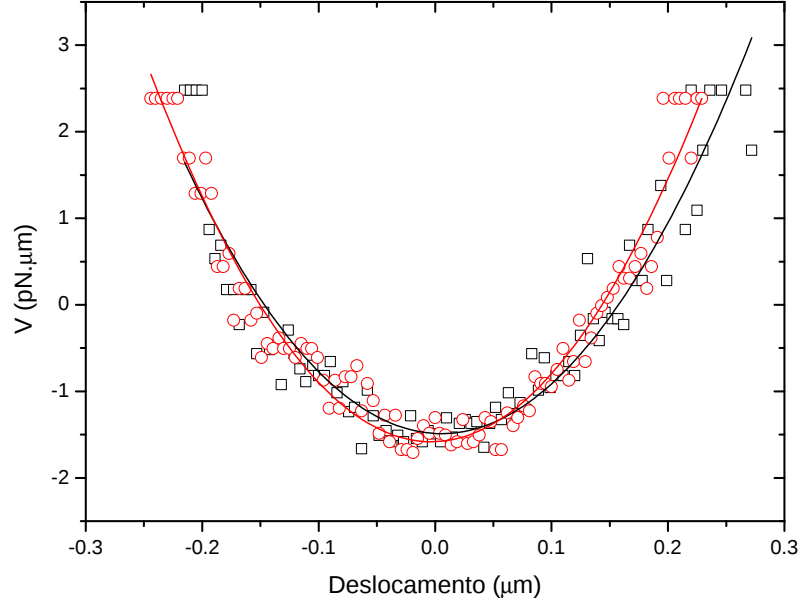


Figura 5.7: Poço de potencial da pinça óptica nas direções x e y . *Círculos*: pontos experimentais para o potencial na direção x ; *linha vermelha*: ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção x . *Quadrados*: pontos experimentais para o potencial na direção y ; *linha preta*: ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção y .

que o valor da constante na direção x é bem próximo do valor da calibração apresentada na Fig. 5.5 nas mesmas condições.

5.2.2 Pinça óptica montada com o laser *IPG Photonics* modelo *YLR-5-1064-LP*

Para a pinça óptica montada com o laser *IPG Photonics* modelo *YLR-5-1064-LP* calculamos a constante de força usando os três métodos descritos na Seção 4.4. Essas calibrações foram feitas para uma altura fixa de $8,0 \mu\text{m}$. Para cada método, determinamos a constante de força em função da potência. Na Fig. 5.8 apresentamos esses dados no gráfico $k \times P_{\text{local}}$. As barras de erro são o desvio padrão de um conjunto de medidas dos respectivos tipos de calibração.

Note que as calibrações via método da luz retroespalhada e por meio da função autocorrelação de posição da microesfera possuem maiores barras de erro, provavel-

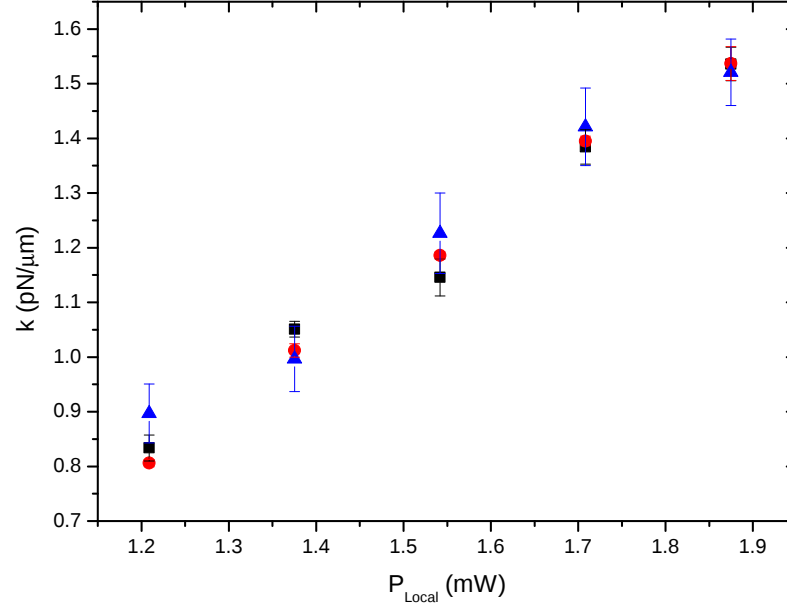


Figura 5.8: Constante de força da pinça em função da potência local para uma altura $h = 8,0 \mu\text{m}$. *Quadrados*: valores da constante de força medidos através do método da luz retroespalhada pela microesfera; *discos*: valores da constante de força medidos através do método da Força de Stokes e *triângulos*: valores da constante de força medidos através do método da função autocorrelação de posição da microesfera.

mente pelo fato de as potências usadas serem baixas e o tamanho da microesfera utilizada ser relativamente grande. As flutuações brownianas aumentam com a diminuição da potência e do tamanho da microesfera. No nosso caso, apesar da potência baixa, o tamanho relativamente grande da microesfera pode diminuir nossa resolução em detectar flutuações brownianas que são fundamentais para os métodos de correlação de posição e intensidades. Por outro lado, flutuações brownianas pequenas favorecem a calibração pelo método de Stokes.

Analogamente ao que foi feito para a pinça montada com o laser *1064-DPSS Altechna Corp.*, construímos o potencial para a pinça montada com o laser *IPG Photonics modelo YLR-5-1064-LP* a partir das coordenadas do centro de massa da microesfera em função do tempo. Na Fig. 5.9 apresentamos o potencial nas direções x e y para uma esfera submetida a uma potência local de 1,71 mW para a altura de 8,0 μm . Nessas condições, $k_x = 1,41 \pm 0,05 \text{ pN}/\mu\text{m}$ e $k_y = 1,43 \pm 0,03 \text{ pN}/\mu\text{m}$. Note que o

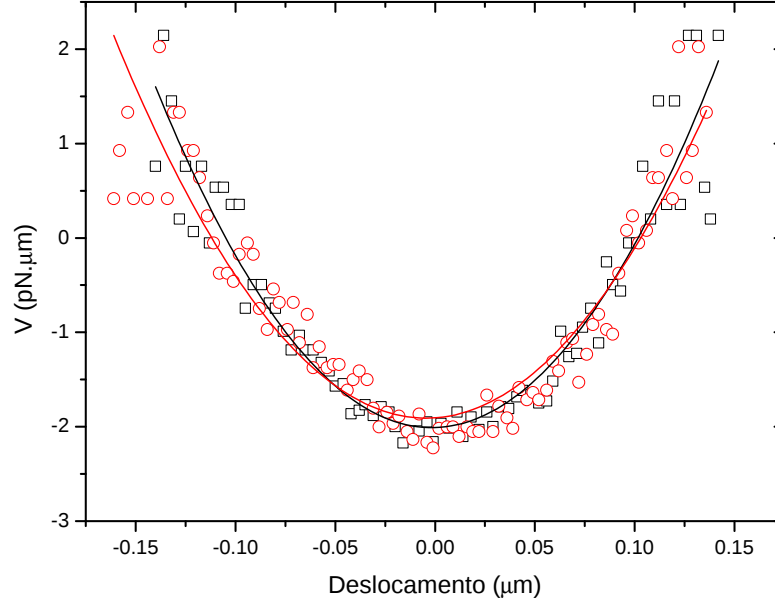


Figura 5.9: Poço de potencial da pinça óptica nas direções x e y . *Círculos*: pontos experimentais para o potencial na direção x ; *quadrados*: pontos experimentais para o potencial na direção y . *Linha vermelha*: ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção x ; *linha preta*: ajuste polinomial de grau 2 para o potencial na direção y .

valor da constante de força na direção x é bem próximo dos valores das calibrações apresentadas na seção 5.2.2 nas mesmas condições.

5.2.3 Comparação entre a teoria e o experimento

Nesta seção comparamos a constante de força da pinça determinada pelos métodos experimentais e pelos métodos numéricos. Na Fig. 5.10 apresentamos esse resultado em função da potência local.

Podemos observar que para potências mais baixas os resultados experimentais e numéricos não são tão próximos quanto para potências mais altas. Isso pode ser atribuído às maiores flutuações da microesfera quando trabalhamos com uma potência menor.

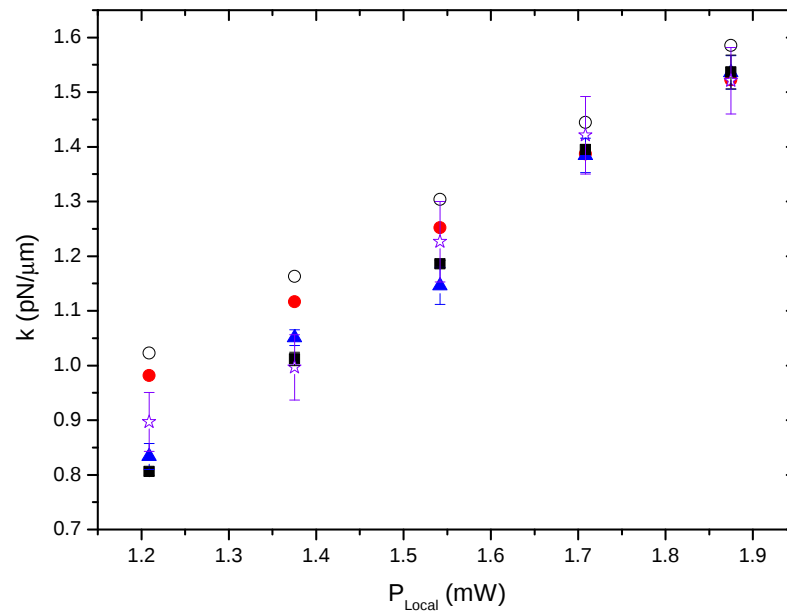


Figura 5.10: Constante de força da pinça em função da potência local para uma altura $h = 8,0 \mu\text{m}$. *Círculos*: k calculada através do método numérico sem considerar a aberração esférica; *discos*: k calculada através do método numérico considerando a aberração. *Triângulos*: k medida através da luz retroespalhada pela microesfera; *quadrados*: k medida através da Força de Stokes e *estrelas*: k medida através da função autocorrelação de posição da microesfera.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho mostramos que o limite da óptica geométrica apresenta um resultado satisfatório para obtermos a constante de força da pinça montada com um laser com $\lambda=1064$ nm e trabalhando com microesferas de raio $a = 1,5 \mu\text{m}$, para $a \approx 1,41 \lambda$.

Implementamos um método simples e barato para a calibração da pinça utilizando uma câmera de alta taxa de captura. A simplicidade dos equipamentos e do método deixa-o acessível a um público mais amplo, de outras áreas como biologia e química.

Comparamos o resultado deste método com outros da literatura e mostramos que uma taxa de ~ 580 quadros por segundo é suficiente para determinarmos a constante de força k . Usando este método, via análise da função de autocorrelação, determinamos k pela amplitude e pelo tempo característico do ajuste e mostramos que a calibração usando o tempo característico é mais precisa do que usando a amplitude. Este resultado foi aceito para publicação na revista *Applied Physics B: Lasers and Optics* (Apêndice D).

Como perspectiva deste trabalho, podemos repetir as comparações dos três métodos de calibração para outras situações distintas, sobretudo para microesferas de outras faixas de tamanho. Desta forma, é possível inferir qual método é o mais adequado para calibrar a pinça nas diversas faixas de tamanho das microesferas.

Apêndice A

Largura σ do perfil de intensidade gaussiano do laser

Um parâmetro necessário para obtermos os resultados numéricos é a largura σ do feixe do laser da pinça óptica antes de atravessar a objetiva. Para determinar este parâmetro, utilizamos um diafragma circular concêntrico ao feixe.

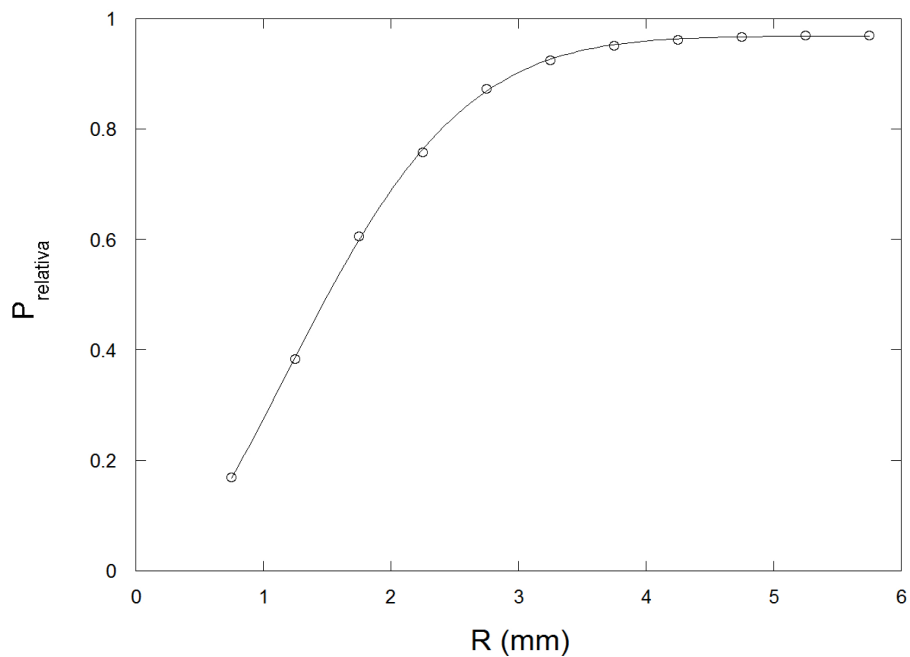


Figura A.1: Potência relativa em função da abertura do diafragma. *Discos*: pontos experimentais, *linha*: ajuste segundo a Eq. (A.1).

Medimos a potência do feixe após passar pelo diafragma para várias aberturas R . Com estes dados, construímos um gráfico da potência medida em função da abertura do diafragma. A Fig. A.1 mostra os pontos experimentais e o ajuste segundo a Eq. (A.1) [28].

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

em que P_T é a potência total do laser incidente no diafragma. Deste ajuste, determinamos o valor σ :

$$\sigma = 1,36 \pm 0,05 \text{ mm},$$

este valor é para o laser *IPG Photonics modelo YLR-5-1064-LP*.

Apêndice B

Função Correlação

A média de *ensemble* que aparece na Eq. (3.18),

$$C(s) = \left\langle F(t')F(t'') \right\rangle_0 = \left\langle F(t')F(t' + s) \right\rangle_0 \quad (\text{B.1})$$

é chamada função de correlação da função $F(t)$. A média de *ensemble* é feita na situação de equilíbrio em que a distribuição de sistemas do *ensemble* é independente do valor absoluto do tempo. Assim, esta média é independente do tempo t' e depende apenas da diferença temporal s . Seja $F(t)$ qualquer função estocástica de t , então:

$$C(0) = \langle F(t)F(t) \rangle = \langle F^2(t) \rangle > 0 \quad (\text{B.2})$$

Para s suficientemente grande, $F(t)$ e $F(t + s)$ tornam-se descorrelacionados, e a probabilidade de F assumir um certo valor no tempo $t + s$ é independente do valor que F assumiu num tempo anterior t . Então:

$$\lim_{s \rightarrow \infty} C(s) = 0 \quad (\text{B.3})$$

Outra propriedade da função de correlação:

$$|C(s)| \leq C(0) \quad (\text{B.4})$$

e a paridade de $C(s)$,

$$C(s) = C(-s) \quad (\text{B.5})$$

A demonstração dessas propriedades pode ser encontrada na Ref. [16]. A Fig. B.1 ilustra o comportamento de $C(s)$. Podemos explicitar a função de correlação da força estocástica usando o formalismo da Transformada de Fourier. Seja:

$$J(w) = \int_{-\infty}^{+\infty} C(s)e^{iws}ds \quad (\text{B.6})$$

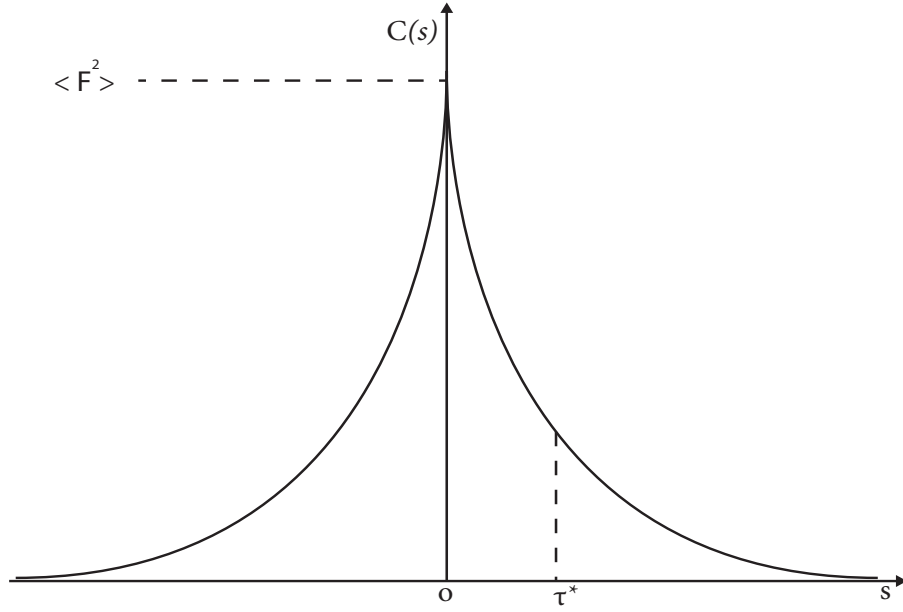


Figura B.1: Comportamento da Função de correlação.

$$C(s) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} J(w) e^{-iws} dw \quad (\text{B.7})$$

e como γ é dado por:

$$\gamma = \frac{1}{2K_B T} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle F(t') F(t' + s) \rangle_0 ds \quad (\text{B.8})$$

Podemos substituir a Eq. (B.7) na Eq. (B.8):

$$2K_B T \gamma = \int_{-\infty}^{+\infty} ds \left[\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} J(w) e^{-iws} dw \right] \quad (\text{B.9})$$

Invertendo a ordem de integração:

$$\begin{aligned} 2K_B T \gamma &= \int_{-\infty}^{+\infty} J(w) dw \left[\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-iws} ds \right] \\ 2K_B T \gamma &= \int_{-\infty}^{+\infty} J(w) \delta(w) dw \\ J(0) &= 2K_B T \gamma. \end{aligned} \quad (\text{B.10})$$

A escala de tempo que F flutua é muito pequena, da ordem de $10^{-13}s$ [16]. Desta forma, a densidade espectral de F pode ser considerada constante no domínio

das frequências. Visto que uma distribuição muito concentrada no tempo tem uma transformada de Fourier muito larga nas frequências. Usando esta aproximação:

$$J(w) = 2K_B T \gamma \quad (\text{B.11})$$

Substituindo este valor na Eq. (B.7):

$$C(s) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} 2K_B T \gamma e^{-iws} dw \quad (\text{B.12})$$

$$\langle F(0)F(s) \rangle = C(s) = 2K_B T \gamma \delta(s). \quad (\text{B.13})$$

Como $C(s)$ depende apenas da diferença temporal s :

$$\langle F(t')F(t'') \rangle = 2K_B T \gamma \delta(t'' - t'). \quad (\text{B.14})$$

Apêndice C

Medida da potência na entrada da objetiva e potência local

No Capítulo 5 discutimos e mostramos os gráficos para a constante de força da pinça óptica em função de alguns parâmetros, dentre estes a potência. Para comparar os resultados experimentais com os resultados numéricos decidimos apresentar esses resultados em função da potência local na microesfera visto que esta medida é necessária para obter os resultados numéricos. Os valores da potência de entrada na objetiva foram medidos com um medidor de potência convencional.

Potência de saída no emissor (W)	Potência de entrada na objetiva (mW)	Potência Local (mW)
1,50	3,90	$1,21 \pm 0,02$
1,65	4,43	$1,37 \pm 0,02$
1,80	4,97	$1,54 \pm 0,02$
1,95	5,51	$1,71 \pm 0,02$
2,10	6,05	$1,87 \pm 0,02$

Tabela C.1: Potência de saída no emissor do laser com as respectivas potências: a medida na entrada da objetiva e a local na microesfera.

Para calcular a potência local temos que saber a transmitância da objetiva usada para montar a pinça. A transmitância média depende da largura do feixe, do comprimento de onda do laser e da objetiva. Esta grandeza foi calculada para

uma objetiva e um laser semelhantes aos do nosso sistema na Ref. [32], cujo valor é $T_{ob} = 0,31 \pm 0,01$. De posse da medida da potência de entrada na objetiva e usando a T_{ob} determinamos a potência local na microesfera. A Tabela C.1 mostra os valores da potência de saída no emissor, a de entrada na objetiva e a potência local na microesfera para a pinça óptica montada com o laser *IPG Photonics* modelo *YLR-5-1064-LP*.

Apêndice D

Artigo aceito para publicação

Neste apêndice apresentamos o artigo aceito para publicação na revista *Applied Physics B: Lasers and Optics* durante o período de mestrado da autora desta dissertação (março de 2010 a fevereiro de 2012).

Videomicroscopy calibration of optical tweezers by position autocorrelation function analysis.*

P. S. Alves and M. S. Rocha[†]

*Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa,
Phone: 55-31-38993399, Fax: 55-31-38992483, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil
(Dated: February 23, 2012)*

We present a simple method to calibrate optical tweezers by using only videomicroscopy to measure the position autocorrelation function of the trapped bead in the potential well of the tweezers. To accomplish this task, we use a high-speed camera with ~ 500 fps (frames per second), which provides a precise measurement of the relaxation time of the bead Brownian fluctuations. We also study the variation of the trap stiffness as a function of some parameters of interest such as the laser power and the distance from the bead center to the microscope coverslip, showing that the presented method returns precise results.

Key words: optical tweezers; Brownian motion; videomicroscopy; position autocorrelation function.

PACS numbers: 87.80.Cc, 05.40.Jc, 87.15.Vv

I. INTRODUCTION

Since its discovery by Ashkin in 1969 [1], optical trapping has found applications in many areas of science, especially in physics and biology [2, 3]. The optical tweezers apparatus basically consists of a single laser beam focused by a high numerical aperture microscope objective. Such an arrangement is able to trap dielectric particles near the lens focus, being a powerful tool to manipulate individual systems such as colloidal particles, viruses, living cells or polymers like DNA and RNA [3–5]. Recent reviews on the optical trapping phenomena can be found in Refs. [6–8].

In order to perform quantitative measurements of the applied forces and torques on the systems to be manipulated, it is fundamental to calibrate the optical tweezers by determining its trap stiffness. This task can be accomplished more easily if the trapped object is a dielectric microsphere because of its privileged symmetry. In fact, in most quantitative applications dielectric silica or polystyrene beads are usually bound to the system to be manipulated, and therefore the optical forces and torques are applied on these beads. The bead trapped in the potential well of the tweezers is a Brownian harmonic oscillator and therefore, in addition to the stochastic force $F(t)$ due to its interaction with the surrounding fluid, the bead experiences a restoring optical force $F_{opt} = -\kappa x$ when displaced x from its equilibrium position (the bottom of the potential well), where κ is the trap stiffness. In the literature, one can find many different methods which can be used to measure κ , such as indirect calibration using Stokes force [9–11], dynamic light scattering [11–13], back focal plane interferometry [14–16], among others. Many of these techniques are based

in analyzing the Brownian fluctuations of the bead, usually using photodetectors to measure the bead position as a function of time [6, 12]. In this paper we suggest a simpler method, in which one has only to capture a ~ 3 seconds movie of the trapped bead with a high-speed camera in order to determine the trap stiffness by analyzing the bead position autocorrelation function in the potential well of the optical tweezers. Even though the physical principles behind this kind of experiment are well known [12, 17–22], we show that the position autocorrelation function of the bead can provide more precise results for κ than those obtained from traditional mean-squared displacements. In fact, the presented method is similar to performing a power spectral density analysis (which uses the formalism of Fourier transforms to study the Brownian fluctuations of the bead in the frequency domain [18]), but has the advantage of being simpler and therefore accessible to a broader audience. We emphasize that the experimental method developed in this work is the simplest one possible, since it requires only a very simple and rapid experiment, which is already capable of providing very precise results. In addition, an important advantage of our technique is that acceptable results can be obtained using less data, hence shorter measurement times, which may enable some chemical or biological studies in which the experiment duration is short. The method also dispenses additional equipments (such as piezoelectric motors, lasers and/or photodetectors) and commercially available or own developed softwares, which are usually employed in other techniques. In the present days, a high-speed CMOS camera capable of reaching typical frame rates of ~ 1000 frames per second (fps) for small capturing areas ($\sim 50 \times 50$ pixels²) is inexpensive, which provides our method with an excellent cost-benefit.

***Short title:** Videomicroscopy calibration of optical tweezers...

[†]**e-mail:** marcos.rocha@ufv.br

II. EXPERIMENTAL PROCEDURE

Our optical tweezers uses a 1064 nm, 2.5 W (maximum output power) solid state laser (1064-DPSS, Altechna Corp.), operating in the usual TEM₀₀ mode. The beam is expanded to a ~ 1 cm diameter spot by using two lenses and passed through a 100 $\times$, N.A. 1.4 Plan Apo Nikon oil immersion objective mounted in a Nikon Ti-S inverted microscope. To perform the experiments, we use a Guppy F503B CMOS camera (Allied Vision Technologies) in order to capture a $\sim 90 \times 90$ pixels², ~ 580 fps, ~ 3 seconds movie of the trapped bead. The spatial resolution obtained with this experimental setup is 45.3 pixels/ μm . Next, we use the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) in order to determine the coordinates x and y of the bead center for each frame of the movie. This task can be performed using the centroid-find feature of the software. The stiffness of our tweezers is the same for bead motion in the x or y directions (due to the symmetry of the potential well in the xy plane), which are the directions parallel to the coverslip, and therefore the method can be used to measure the transverse trap stiffness of the tweezers. The axial trap stiffness for motion perpendicular to the coverslip (z direction) can also be measured with this method, but in this case one has to perform a height calibration by using the diffraction pattern of the bead image, such as performed in Ref. [23].

The sample used in all measurements consists of a solution of 3.0 μm diameter polystyrene beads in deionized water.

The analysis of the bead motion can be performed with high accuracy by calculating the position autocorrelation function of the bead, as discussed below. Theoretically, this task can be accomplished by solving the Langevin equation with an harmonic potential. An extensive theoretical treatment on this problem can be found in Ref. [24]. Nevertheless, for our experiments, the problem can be considerably simplified since we are interested only in fluctuations occurring in the time scale of milliseconds. This is the scale of typical relaxation time τ for a bead to achieve its equilibrium position in the potential well of the tweezers [12]. This relaxation time can be estimated with the expression $\tau = \gamma/\kappa$, where γ is the friction coefficient on the bead [12, 25]. In this time scale, the position autocorrelation function of the bead can be written as [12, 25]

$$\langle x(0)x(t) \rangle = \frac{k_B T}{\kappa} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (1)$$

where k_B is Boltzmann's constant and T is the absolute temperature.

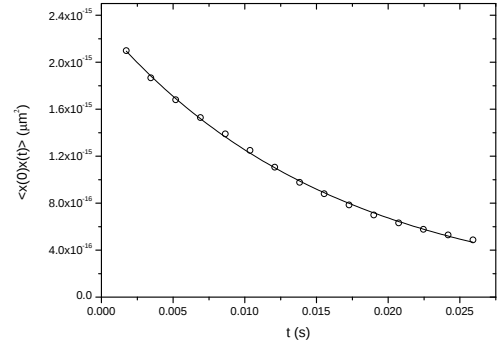


FIG. 1: Position autocorrelation function $\langle x(0)x(t) \rangle$ of a 3.0 μm diameter polystyrene bead trapped in the potential well of our optical tweezers as a function of time, for $h = 11.5 \mu\text{m}$. Circles: experimental data; Solid line: a fitting to Eq. 1.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The trap stiffness κ can be determined calculating the autocorrelation curve $\langle x(0)x(t) \rangle$ from the experimental data and fitting this curve to Eq. 1. Figure 1 shows a typical experimental curve obtained with this procedure and a fitting with Eq. 1. Observe that the agreement between the experimental data and the theory is excellent, which validates our method. An important remark which must be observed is that the trap stiffness κ can be determined from the discussed fitting process both from the amplitude ($k_B T/\kappa$) and from the relaxation time ($\tau = \gamma/\kappa$) of Eq. 1. Determining κ from the amplitude is equivalent to calibrating the tweezers by calculating the mean-squared displacement of the trapped bead, since this quantity is just the autocorrelation function in $t = 0$. Nevertheless, the results of this work demonstrate explicitly that a calibration performed by using the relaxation time is more robust, as shown in Figs. 2 and 3.

In Fig. 2 we plot the trap stiffness of our optical tweezers for a 3.0 μm diameter polystyrene bead as a function of the height h from the bead center to the coverslip of the sample. The method is sufficiently accurate to determine the decrease of the trap stiffness as a function of bead height, which is partially due to the spherical aberration effect inherent to the experimental setup [8]. Observe that the data obtained from the relaxation time is more robust than that obtained from the amplitude of the position autocorrelation function, presenting smaller fluctuations and smaller error bars. These error bars were determined by calculating the standard deviation from a set of ten different measurements.

Finally, in Fig. 3 we show the behavior of the trap stiffness as a function of the laser power for a similar 3.0

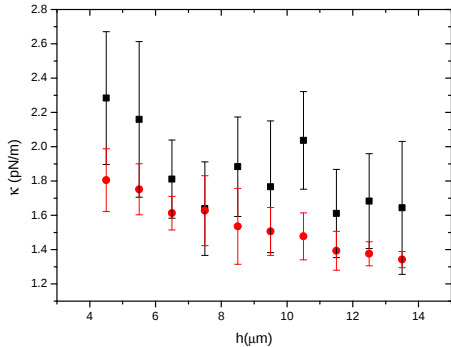


FIG. 2: Transverse trap stiffness κ for a $3.0 \mu\text{m}$ diameter polystyrene bead as a function of the distance h from the bead center to the coverslip. *Circles*: experimental data obtained from the relaxation time $\tau = \gamma/\kappa$; *Squares*: experimental data obtained from the amplitude $k_B T/\kappa$ of the position autocorrelation function. Observe that the data obtained from the relaxation time is more robust, presenting smaller fluctuations and error bars.

μm diameter polystyrene bead at a fixed distance $h = 8.5 \mu\text{m}$ from the coverslip. As well known, the trap stiffness is proportional to the laser power used in the trap, and this behavior is also reproduced here.

The position autocorrelation function was previously used by Gibson *et al.* to accurately measure quantities such as bead position and applied forces on particles in optical traps [21]. In a similar way, Keen *et al.* has recently used the technique to measure multipoint viscosity in microfluidic channels by using multiple optical traps [22]. Finally, Crocker and Grier [20] have previously monitored the trajectories of colloidal particles using a method of digital videomicroscopy similar to ours, but with a own developed software. The results presented in these works are as robust as those obtained with our method, which therefore confirms those previous results.

Finally, as possible applications of the presented method, we cite the possibility of multiple calibration by using different beads in multiple optical traps, such as performed by Keen *et al.* [22]. Another possibility is the study of chemical or biological studies in which the experiment duration is short, since the developed calibration procedure takes only ~ 3 seconds, as discussed before. In addition, note that for many applications the calibration procedure can be performed simultaneously to the experiment itself just by filming the entire experiment and using this movie to perform the calibration. Thus one can even know how the trap stiffness behaves along the experiment by using the presented method.

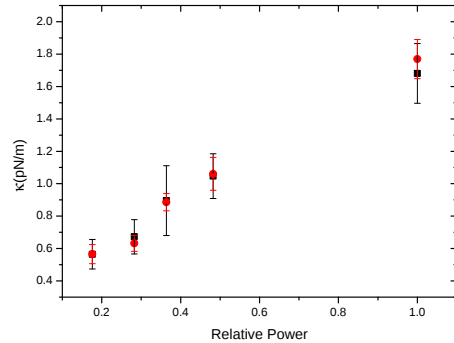


FIG. 3: Transverse trap stiffness κ for a $3.0 \mu\text{m}$ diameter polystyrene bead as a function of the relative power of the laser used in the trap, for $h = 8.5 \mu\text{m}$. *Circles*: experimental data obtained from the relaxation time $\tau = \gamma/\kappa$; *Squares*: experimental data obtained from the amplitude $k_B T/\kappa$ of the position autocorrelation function. Observe that the data obtained from the relaxation time again present smaller error bars. The laser power was controlled by using neutral density filters.

IV. CONCLUSION

We have presented a simple and robust method to calibrate optical tweezers, discussing the advantages in determining the position autocorrelation function of the trapped bead. In particular, observe that the mean-squared displacement is just the amplitude of our position autocorrelation function, which we have shown that provides less accurate results than those obtained from the relaxation time. The equipment required is the simplest one possible, and the analysis software can be freely downloaded from the internet, allowing anyone to use the method. In addition, the advantage of the presented method as compared to power spectral density analysis is its simplicity, since one is not required to work in the frequency domain (which can be confusing to professionals without the specialized training), thus permitting anyone to perform a rapid and robust calibration of optical tweezers. This feature is important since optical tweezers are largely used in multi-disciplinary research. Moreover, as discussed before, another advantage of our technique is that acceptable results can be obtained using less data, hence shorter measurement times, which may enable some chemical or biological studies in which the experiment duration is short.

V. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mi-

nas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Arthur Bernardes - Universidade Federal de Viçosa

(FUNARBE-UFV) and Núcleo de Excelência em Física Biológica - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (PRONEX-FACEPE).

-
- [1] A. Ashkin, "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.* **24** (4), 156–159 (1970).
 - [2] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science* **235** (4795), 1517–1520 (1987).
 - [3] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, "Stretching DNA with optical tweezers," *Biophys. J.* **72** (3), 1335–1346 (1997).
 - [4] S. Mohanty, K. Mohanty, and P. Gupta, "Dynamics of Interaction of RBC with optical tweezers," *Opt. Express* **13** (12), 4745–4751 (2005).
 - [5] A. S. Khalil, J. M. Ferrer, R. R. Brau, S. T. Kottmann, C. J. Noren, M. J. Lang, and A. M. Belcher, "Single M13 bacteriophage tethering and stretching," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (12), 4892–4897 (2007).
 - [6] K. C. Neuman and S. M. Block, "Optical trapping," *Rev. Sci. Instrum.* **75** (9), 2787–2809 (2004).
 - [7] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, and C. Bustamante, "Recent advances in optical tweezers," *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 205–228 (2008).
 - [8] M. S. Rocha, "Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments," *Am. J. Phys.*, **77** (8), 704–712 (2009).
 - [9] L. P. Ghislain, N. A. Switz, and W. W. Webb, "Measurement of small forces using an optical trap," *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 2762–2768 (1994).
 - [10] R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich, "Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap," *Biophys. J.* **70** (4), 1813–1822 (1996).
 - [11] N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, "Towards absolute calibration of optical tweezers," *Phys. Rev. E* **75** (2), 021914-1–13 (2007).
 - [12] N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, "Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere," *Phys. Rev. E* **65** (4), 041921-1–11 (2002).
 - [13] M. E. J. Friese, H. Rubinsztein-Dunlop, N. R. Heckenberg, and E. W. Dearden, "Determination of the force constant of a single-beam gradient trap by measurement of backscattered light," *Appl. Optics* **35** (36), 7112–7116 (1996).
 - [14] M. W. Allersma, F. Gittes, M. J. deCastro, R. J. Stewart, and C. F. Schmidt, "Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry," *Biophys. J.* **74**, 1074–1085 (1998).
 - [15] F. Gittes and C. F. Schmidt, "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers," *Opt. Lett.* **23**, 7–9 (1998).
 - [16] S. F. Tolić-Nørrelykke, E. Schaffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Julicher, and H. Flyvbjerg, "Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane," *Rev. Sci. Instrum.* **77** (10), 103101-1–11 (2006).
 - [17] J. P. Staforelli, E. Vera, J. M. Brito, P. Solano, S. Torres, and C. Saavedra, "Superresolution imaging in optical tweezers using high-speed cameras," *Opt. Express* **18** (4), 3322–3331 (2010).
 - [18] K. Berg-Sørensen and H. Flyvbjerg, "Power spectrum analysis for optical tweezers," *Rev. Sci. Instrum.* **75** (3), 594–612 (2004).
 - [19] M. Polin, K. Ladavac, S.-H. Lee, Y. Roichman, and D. G. Grier, "Optimized holographic optical traps," *Opt. Express* **13** (15), 5831–5845 (2005).
 - [20] J. C. Crocker and D. G. Grier, "Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies," *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 298–310 (1996).
 - [21] G. M. Gibson, J. Leach, S. Keen, A. J. Wright, and M. J. Padgett, "Measuring the accuracy of particle position and force in optical tweezers using high-speed video microscopy," *Opt. Express* **16** (19), 14561–14570 (2008).
 - [22] S. Keen, A. Yao, J. Leach, R. Di Leonardo, C. Saunter, G. Love, J. Cooper, and M. Padgett, "Multipoint viscosity measurements in microfluidic channels using optical tweezers," *Lab Chip* **9**, 2059–2062 (2009).
 - [23] M. D. Carbajal-Tinoco, R. Lopez-Fernandez, and J. L. Arauz-Lara, "Asymmetry in Colloidal Diffusion near a Rigid Wall," *Phys. Rev. Lett.* **99** (13), 138303 (2007).
 - [24] S. Velasco, "On the Brownian motion of a harmonically bound particle and the theory of a Wiener process," *Eur. J. Phys.* **6**, 259–265 (1985).
 - [25] F. Reif, "Fundamentals of statistical and thermal physics," McGraw-Hill, 1985.

Referências Bibliográficas

- [1] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24(4):156–159, 1970.
- [2] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235:1517–1520, 1987.
- [3] A. Ashkin. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:4853–4860, 1997.
- [4] A. Ashkin. *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers: a reprint volume with commentaries*. World Scientific, 2006.
- [5] A. Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.*, 61:569–582, 1992.
- [6] G. Roosen. La lévitation optique de sphères. *Can. J. Phys.*, 57(9):1260–1279, 1979.
- [7] N. B. Viana. *Pinças Ópticas e Aplicações*. Tese de Doutorado, UFMG, 2002.
- [8] M. S. Rocha. *Pinças Ópticas: Experimento e Teoria*. Dissertação de Mestrado, UFMG, 2004.
- [9] P. A. M. Neto and H. M. Nussenzveig. Theory of optical tweezers. *Europhys. Lett.*, 50(5):702–708, 2000.
- [10] M. S. Rocha. Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments. *Am. J. Phys.*, 77:704–712, 2009.
- [11] J. K. G. Dhont. *An introduction to dynamics of colloids*. Elsevier, 1996.
- [12] A. Mazolli. *Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento Mie*. Tese de Doutorado, UFJR, 2003.

- [13] J. D. Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley e Sons. Inc., 1975.
- [14] A. Mazolli, P. A. M. Neto, and H. M. Nussenzveig. Theory of trapping forces in optical tweezers. *Proc. R. Soc. Lon. A*, 459:3021–3041, 2003.
- [15] R. S. Dutra. *Parametrizando uma Pinça Óptica: Efeitos de Aberrações e Absorção*. Tese de Doutorado, UFJR, 2011.
- [16] F. Reif. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. McGraw-Hill, 1965.
- [17] R. K. Pathria. *Statistical Mechanics*. Butterworth-Heinemann, 1996.
- [18] S. Velasco. On the brownian motion of a harmonically bound particle and the theory of a wiener process. *Eur. J. Phys.*, 6:259–265, 1985.
- [19] P. P. J. M. Schram and S. A. Trigger. Brownian motion in shear flows, harmonic potentials and colloidal crystals. *Physica B*, 228:91–96, 1996.
- [20] H. Faxen. The resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers. *Ann. Phys.*, 68(10):89–119, 1922.
- [21] N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita. Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere. *Phys. Rev. E*, 65(041921):1–11, 2002.
- [22] M. I. M. Feitosa and O. N. Mesquita. Wall-drag effect on diffusion of colloidal particles near surfaces: a photon correlation study. *Phys. Rev. A*, 44(10):6677–6685, 1991.
- [23] M. S. Rocha. *Pinças Ópticas: Experimento, Teoria e Aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*. Tese de Doutorado, UFMG, 2008.
- [24] D. G. Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424:21–27, 2003.
- [25] K. Berg-Sørensen and H. Flyvbjerg. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.*, 75(3):594–612, 2004.
- [26] S. F. Nørrelykke and H. Flyvbjerg. Power spectrum analysis with least-squares fitting: Amplitude bias and its elimination, with application to optical tweezers and atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.*, 81, 2010.

- [27] A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig. Theory of trapping forces in optical tweezers. *R. Soc. Lond. A.*, 459:3021–3041, 2003.
- [28] N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig. Towards absolute calibration of optical tweezers. *Phys. Rev. E*, 75, 2007.
- [29] R. Bar-Ziv, A. Meller, T. Tlusty, E. Moses, J. Stanvans, and S. A. Safran. Localized dynamic light scattering: Probing single particle dynamics at the nanoscale. *Phys. Rev. Lett.*, 78(1):154–157, 1997.
- [30] G. M. Gibson, J. Leach, S. Keen, A. J. Wright, and M. J. Padgett. Measuring the accuracy of particle position and force in optical tweezers using high-speed video microscopy. *Opt. Express*, 16(10):14561–14570, 2008.
- [31] N. Osterman. Tweezpal optical tweezers analysis and calibration software. *Computer Physics Communications*, 181:1911–1916, 2010.
- [32] N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, and P. A. Maia Neto. Characterization of objective transmittance for optical tweezers. *Applied Optics*, 45(18):4263–4269, 2006.