

*Universidade Estadual de Campinas*

*Instituto de Física Gleb Wataghin*

*Tese de Doutorado*

***Sistema de Micromanipulação e  
Microanálise com Pinças Ópticas***

*Adriana Fontes*

*Orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar*

***Banca Examinadora:***

*Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Ferreira*

*Prof. Dr. Herch Moysés Nussenzveig*

*Prof. Dr. Antonio Manoel Mansanares*

*Prof. Dr. Luiz Carlos Barbosa*



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ADRIANA FONTES – RA931526** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 02/04/2004.

**COMISSÃO JULGADORA:**

*Carlos Lenz Cesar*

Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar (Orientador do Candidato) – IFGW/UNICAMP

*Ricardo Ferreira*

Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Ferreira – DQF/UFPE

*Luiz Carlos Barbosa*

Prof. Dr. Luiz Carlos Barbosa – IFGW/UNICAMP

*H. M. Nussenzweig*

Prof. Dr. Herch Moysés Nussenzweig – IFUFRJ

*Antonio Manoel Mansanares*

Prof. Dr. Antonio Manoel Mansanares – IFGW/UNICAMP

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

F737s	<p>Fontes, Adriana</p> <p>Sistema de micromanipulação e microanálise com pinças óticas / Adriana Fontes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2004.</p> <p>Orientador: Carlos Lenz Cesar.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".</p> <p>1. Pinças óticas. 2. Análise espectral. 3. Células. 4. Microanálise. 5. Microscópio e microscopia. 6. Lasers. I. Cesar, Carlos Lenz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(vsv/ifgw)</p>
-------	--

- **Título em inglês:** Micromanipulation and microanalysis in an optical tweezers systems

- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**

1. Optical tweezers
2. Spectrum analysis
3. Cells
4. Microanalysis
5. Microscope and microscopy
6. Lasers

- **Área de concentração:** Física

- **Titulação:** Doutora em ciências

- **Banca examinadora:**

Prof. Carlos Lenz Cesar  
Prof. Ricardo de Carvalho Ferreira  
Prof. Luiz Carlos Barbosa  
Prof. Herch Moysés Nussenzveig  
Prof. Antonio Manoel Mansanares

## *Agradecimentos*

*Gostaria de agradecer especialmente:*

- *Ao meu orientador Prof. Carlos Lenz Cesar pelo estímulo e atenção.*
- *Aos meus pais, especialmente à minha mãe Leonides Gandini, pelo incentivo e compreensão.*
- *Aos meus amigos: Antônio, Wendel, André, Liliana, Diogo, Herculano e Eugênio de Campinas e também Patrícia e Beate de Recife.*
- *Às agências FAPESP, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.*
- *Ao Hemocentro e à Profa. Selma Giorgio do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo fornecimento de amostras, discussões e idéias.*

## *Resumo*

A pinça óptica é um instrumento capaz de aprisionar e mover partículas da ordem de micrômetros, consistindo basicamente de um laser infravermelho fortemente focalizado que incide sobre um objeto com índice de refração maior do que o meio ao seu redor. As forças que uma pinça óptica exerce sobre uma partícula são da ordem de femto a pico Newtons. Por esse motivo sua principal aplicação é no mundo microscópico, especialmente no estudo de células e organelas, que podem ser manipuladas individualmente sem qualquer dano térmico. Neste trabalho abordamos aspectos teóricos e experimentais relacionados às pinças ópticas. No capítulo 2, em conjunto com a descrição das várias montagens utilizadas nesta Tese, damos especial atenção ao funcionamento de uma pinça óptica e aos pontos cruciais para entendê-la e utilizá-la. No capítulo 3, fazemos uso de sua ultra-sensibilidade tanto para observar ressonâncias de Mie em microesferas capturadas e iluminadas por ondas planas e feixes focalizados. Nesse mesmo capítulo também realizamos uma medida dinâmica da sua intensidade em função da distância do foco do laser ao centro da partícula. Os resultados obtidos revelam o papel fundamental da polarização da luz na força da pinça óptica e só podem ser explicados com o formalismo da óptica eletromagnética. No capítulo 4, mostramos que é possível unir a capacidade de manipulação da pinça óptica com a de caracterização de diferentes técnicas espectroscópicas lineares e não lineares, colocando-as em um mesmo sistema. Com esse acoplamento fomos capazes de fazer espectroscopia Raman, Hiper Raman, Hiper Rayleigh e fluorescência excitada por absorção de 2 fótons em materiais biológicos e outras amostras. No capítulo 5, mostramos que uma calibração da pinça óptica nos possibilita medir forças em partículas microscópicas e aplicamos a mesma na medida da força do parasita leishmania, encontrando valores tão pequenos quanto 200 femto Newtons. Também utilizamos esse instrumento para medir a elasticidade de hemácias normais, estocadas, irradiadas e falcizadas. Fechamos a Tese com o capítulo 6 que traz uma conclusão geral e perspectivas.

## *Abstract*

The optical tweezers is a tool capable of capturing and manipulating particles of micrometers order. The optical tweezers, basically, consists of a tightly focused infrared laser incident on a particle with refractive index larger than the surrounding media index. The optical forces actuating on the particle are of order of femto to pico Newtons. For this reason, the main application of an optical tweezers is in the microscopic world, especially in the study of cells that can be manipulated individually without thermal damage. In this work, we treat of theoretical and experimental aspects related to the optical tweezers. Chapter 2 contains the description of the set-ups used in this thesis. Special emphasis was given to those points critical for the understanding and to mounting an optical tweezers set up. Chapter 3 describes the use of the high sensitivity of the optical tweezers to observe the Mie resonances in microspheres captured and illuminated by plane waves and focalized beams. It also contains the description of the measurements of the intensity of the optical force as a function of the distance of the laser focus to the center of the particle. Our results show the fundamental role of the laser polarization for the forces of an optical tweezers. This can only be explained by a complete electromagnetic theory. Chapter 4 shows that it is possible to add the capability of manipulation of an optical tweezers to the ability of characterization of linear and non-linear spectroscopic techniques in only one integrated system. With this system, we were able to perform Raman, Hyper Rayleigh, Hyper Raman and Two-Photon Excited Luminescence in biological and non-biological samples. Chapter 5 describes an optical tweezers calibration method to measure forces as small as 200 femto Newtons of the protozoa *Leishmania amazonensis*. We also used the optical tweezers to measure the elasticity of normal, stored, sickle and irradiated red blood cells. Chapter 6 contains the conclusions and perspectives.

# Índice

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Sistemas Experimentais</b>	<b>7</b>
<b>2.1 A Pinça Óptica</b>	<b>8</b>
2.1.1 Princípio Básico de Funcionamento: Transferência de Momento do Fóton	9
2.1.2 Influência da Reflexão e Absorção na Força Óptica	12
2.1.3 Ordem de Grandeza da Força Óptica e Dimensões das Partículas Capturadas	14
2.1.5 Outros Lasers Comumente Utilizados na Pinça Óptica	21
2.1.6 Microscópio Óptico Simples	22
2.1.7 Microscópios de Óptica Infinita	24
2.1.8 Características das Objetivas	26
2.1.9 Falsa Armadilha e a Abertura Numérica	28
2.1.10 Microscópios Invertidos: Vantagens e Desvantagens	30
2.1.11 O Alinhamento	32
2.1.12 Resultados Obtidos com a Pinça Óptica Simples	34
<b>2.2 A Pinça Óptica Dupla</b>	<b>35</b>
2.2.1 Motivação e Pontos Experimentais Relevantes	35
2.2.2 O Sistema Experimental de Pinça Dupla	39
2.2.3 O Alinhamento	40
2.2.4 Resultados Obtidos com a Pinça Óptica Dupla	41
<b>2.3 Sistemas Experimentais para a Calibração da força da Pinça Óptica e Aplicações com Leishmanias e Hemácias</b>	<b>42</b>
<b>2.4 Sistema Experimental de Espectroscopia de Força e Medida da Força Óptica em Função do Deslocamento Centro-Foco e da Polarização</b>	<b>45</b>
2.4.1 Descrição dos Componentes do Sistema	47
2.4.2 Detalhes Experimentais da Aplicação de Espectroscopia de Força	52
<b>2.5 Sistema Experimental de Pinça Óptica com Espectroscopias Confocais</b>	<b>56</b>
2.5.1 Laser de Ti:Safira de femtosegundos (Tsunami)	57
2.5.2 Monocromador	62

2.5.3 CCD	63
2.5.4 Filtros Super NOTCH plus	63
2.5.5 Detalhes Experimentais	65
<b>3. Teoria Óptica Eletromagnética</b>	<b>69</b>
<b>3.1 “MDR modes” em Microesferas Excitadas por Incidência de Onda Plana</b>	<b>74</b>
3.1.1 Soluções da Equação de Onda Vetorial	74
3.1.2 Expansão de uma Onda Incidente Arbitrária em Função dos Harmônicos Esféricos Vetoriais	78
3.1.3 Cálculos dos Coeficientes de Mie para um Campo Incidente Arbitrário	80
3.1.4 Expansão de uma Onda Plana em Função dos Vetores Harmônicos Esféricos	83
3.1.5 Cálculos dos Coeficientes de Mie para Ondas Planas	85
3.1.6 “MDR modes”	86
3.1.7 Cálculo das Eficiências de Ressonâncias de Mie	90
<b>3.2 Pinças Óptica, Microesferas e Feixes Gaussianos Focalizados</b>	<b>104</b>
3.2.1 Aproximação da Integral Localizada	105
3.2.2 Aproximação de Davis e a Descrição do Feixe Incidente	106
3.2.3 Expansão do Feixe Gaussiano Incidente Focalizado, os Fatores de Forma e os Coeficientes de Mie	112
3.2.4. Seções de Choque	117
3.2.5 Resultados	118
<b>4. Aplicações de Pinça Óptica com Espectroscopias Confocais</b>	<b>131</b>
<b>4.1 Motivação</b>	<b>131</b>
4.1.1 Oportunidade de Incorporação de Técnicas de Microanálise à Pinça Óptica	134
4.1.2 Objetivos e Desafios do Trabalho Descrito nesse Capítulo	135
4.1.3 Estrutura do Capítulo	136
<b>4.2 Espectroscopia Raman</b>	<b>136</b>
<b>4.3 Resultados de Raman com Pinça Óptica</b>	<b>141</b>
<b>4.4 Processos Ópticos Envolvendo Dois Fótons</b>	<b>144</b>
<b>4.5 Processos de Absorção Multifotônica</b>	<b>145</b>



<b>4.6 Luminescência Excitada por Absorção Multifotônica</b>	<b>150</b>
<b>4.7 Aplicações e Resultados de Luminescência por Absorção de 2 Fótons</b>	<b>155</b>
<b>4.8 Processos Hiper Rayleigh e Hiper Raman</b>	<b>157</b>
<b>4.9 Resultados de Hiper Raman e Hiper Rayleigh</b>	<b>163</b>
<b>4.10 Integrando as Espectroscopias</b>	<b>164</b>
 <b>5. Óptica geométrica, Hidrodinâmica e Aplicações da Pinça Óptica</b>	 <b>167</b>
<b>5.1 Calibração da Pinça Óptica</b>	<b>170</b>
5.1.1 Teoria Óptica Geométrica	170
5.1.2 Teoria Hidrodinâmica	172
5.1.3 Métodos e Resultados	174
 <b>5.2 Medidas de Forças do Protozoário da Leishmaniose, o Parasita <i>Leishmania amazonensis</i></b>	 <b>177</b>
5.2.1 Motivação	177
5.2.2. O Parasita	178
5.2.3. Metodologia, Resultados e Conclusões	180
 <b>5.3 Medidas de Elasticidade de Hemácias Normais e Alteradas</b>	 <b>184</b>
5.3.1. Motivação	184
5.3.3 Validação Experimental do Modelo Hidro-elástico	191
5.3.4 Aplicações às Medidas de Elasticidade de Hemácias de Pacientes com Anemia e Traço Falciforme	197
5.3.5. Aplicações às Medidas de Elasticidade de Hemácias Irrradiadas em Função do Tempo de Estocagem	200
5.3.6. Aplicações às Medidas de Elasticidade de Hemácias Estocadas de Pacientes com Traço Falciforme	202
 <b>5.4 Teoria Hidrodinâmica</b>	 <b>204</b>
5.4.1 Mundo Microscópico: Baixos Números de Reynolds.	204
5.4.2 Equações de Continuidade	207
5.4.3 Continuidade da Massa	207
5.4.4 Continuidade do Momento	207
5.4.5 Fontes e Sumidouros de Momento	207
5.4.6. Lei de Hooke Generalizada.	210
5.4.7. Equação de Navier-Stokes	211

5.4.8. Equação de Stokes ou “Creeping Motion”	211
5.4.9. Teoremas Integrais em Escoamento de Stokes ou “Creeping Motion”	211
5.4.10 Presença de Singularidades ou Funções de Green	216
 <b>6. Conclusão e Perspectivas</b>	 <b>219</b>
 <b>Apêndice 1</b>	 <b>223</b>
 <b>Apêndice 2</b>	 <b>241</b>
 <b>Referências</b>	 <b>253</b>

# *Capítulo 1*

## *Introdução*

A incorporação de lasers na microscopia óptica nessas duas últimas décadas tem colaborado consideravelmente para as mais modernas pesquisas nas áreas de Biomedicina com propósitos de manipulação, medidas, diagnóstico, microanálise e construção de imagens.

Dentre as várias utilizações de lasers nessas áreas, destaca-se o trabalho pioneiro de Ashkin e colaboradores. Em 1986, eles demonstraram o uso de um instrumento, denominado pinça óptica, baseado na transferência de momento de fótons para capturar partículas dielétricas [1]. Embora essa ferramenta não tenha sido primeiramente desenvolvida para aplicações biológicas, logo ficou claro que essa seria a sua principal área de aplicação. Já no seu próximo artigo [2], Ashkin aplicou a pinça óptica na captura e manipulação de partículas biológicas com tamanhos variando de décimos a centenas de micra. Inicialmente, Ashkin utilizou um laser de argônio operando em  $\lambda = 514 \text{ nm}$ , porém, devido ao alto coeficiente de absorção de radiação no comprimento de onda visível, esse causava danos aos organismos vivos levando-os à

morte celular. Passaram assim a utilizar um laser Nd:YAG em  $\lambda = 1064 \text{ nm}$ . Como a maioria das substâncias que compõem o ser vivo é transparente ao infravermelho, a absorção nessa região é pequena e o pouco calor gerado é rapidamente transferido ao fluido por condução e convecção, conseqüentemente não há danos nesses organismos. A partir de então, a pinça óptica vem sendo amplamente utilizada em duas vertentes: manipulação direta de microorganismos e medidas de propriedades mecânicas e de forças em sistemas biológicos.

Como microferramenta de manipulação, a pinça óptica acoplada a outro instrumento denominado bisturi óptico já foi utilizada para inserir DNA no interior de diferentes tipos de células [3], para conectar DNA ao silício na tentativa de construção de uma interface biomecânica [4], para fertilizações in vitro [5] e para fusão de células. O bisturi óptico é fundamental para uma completa manipulação celular, pois é essencialmente um laser capaz de fazer perfurações em paredes e membranas celulares. Como os cortes são feitos por transferência de calor e não se pode danificar o material biológico, usa-se nesse instrumento um laser pulsado operando no verde. Geralmente, os tecidos orgânicos têm alta absorção nessa região do espectro.

Por outro lado, como microferramenta de medida, a pinça óptica já foi utilizada para medir e comparar deslocamentos celulares e forças de proteínas (miosinas) cardíacas [6], para caracterização de motores biológicos moleculares [7] e rigidez flexural de microtúbulos [8], para medir o comprimento de uma molécula de DNA [9] e a motilidade de espermatozóides humanos [10], para detectar concentrações de antígenos da ordem de femtomolares [11] e para observar a ausência de travamento do movimento de rotação reversa de flagelos motores de bactérias [12]. Além de todas essas aplicações, muito recentemente, a pinça óptica também tem começado a ser utilizada como uma ferramenta versátil e peça fundamental, em conjunto com técnicas espectroscópicas como, por exemplo, fluorescência e Raman, na construção de imagens e em estudos de células isoladas e microorganismos flagelados.

Nesta Tese de Doutorado tratamos de aspectos teóricos e experimentais relacionados à pinça óptica. No capítulo 2, descrevemos todas as montagens utilizadas sem, no entanto, relatar os resultados obtidos abrindo uma exceção apenas para os que envolveram as manipulações com a pinça óptica simples e dupla. Fizemos essa opção de apresentar todos os sistemas experimentais utilizados conjuntamente ao perceber que os mesmos compartilhavam de equipamentos e procedimentos. Além disso, também descrevemos, sem utilizar qualquer modelo quantitativo mais sofisticado, intuitivamente, o que vem a ser a pinça óptica e os pontos teóricos e experimentais mais relevantes para um bom aproveitamento desse instrumento. Para realizar medidas de forças de adesão e elasticidades, montamos um sistema de pinça dupla em que cada uma delas pode ser manipulada independentemente. Com isso observamos o intrigante comportamento de adesão de hemácias entre si. Nossas observações mostram que elas deslizam facilmente umas sobre as outras, mas se ligam fortemente pelas bordas. Após a pinça dupla, passamos a detalhar as montagens das aplicações realizadas nessa Tese; são elas: medida da intensidade da força óptica em função da posição do centro da partícula em relação ao foco do laser e da polarização, observação de ressonâncias de Mie em microesferas, acoplamento de espectroscopia com a pinça óptica, calibração da pinça óptica e medida de força e elasticidade de leishmanias e hemácias.

No capítulo 3 apresentamos primeiramente as ressonâncias de Mie observadas através da fluorescência excitada por absorção de dois fótons. Esse foi o ponto de partida para as observações das mesmas ressonâncias nas forças ópticas. Para tanto, utilizamos a sensibilidade e estabilidade da pinça óptica para observar diferenças muito pequenas de espalhamento e detectar as ressonâncias de Mie. Os “MDR modes” ou ressonâncias de Mie são previstos pelo formalismo de Mie para onda plana e dependem do tamanho, forma e índices de refração do objeto espalhador e do meio em que está embebido e são divididos em TE e TM. Nós usamos a pinça óptica para excitar esses modos em duas situações: a. através da incidência por onda plana e b. depois com o

feixe focalizado na borda nas posições  $(R,0,0)$ ,  $(0,R,0)$  e  $[(R,R,0)/\sqrt{2}]$ , utilizando uma técnica que denominamos Espectroscopia Ultra-sensível de Força. Com essa experiência concluímos que as ressonâncias de Mie dependem fortemente da posição do feixe em relação à polarização do laser, de forma que podemos excitar seletivamente os modos TE e TM. Ainda nesse mesmo capítulo relatamos a medida dinâmica da intensidade da força óptica em função da posição do centro ao foco do laser e da polarização. Com ele concluímos que a força da pinça óptica não é somente anisotrópica com relação às forças verticais e horizontais, mas também que as próprias forças horizontais em  $x$  e  $y$  são anisotrópicas entre si, ou seja, não há sequer uma simetria azimutal, pois as mesmas dependem do movimento da partícula em relação à polarização do feixe incidente. Para explicar tanto a observação das ressonâncias de Mie como também a medida dinâmica da intensidade, tivemos que deixar de lado a teoria de óptica geométrica, e utilizar a teoria eletromagnética para pinças ópticas, que acabou se mostrando muito boa na descrição dos nossos resultados.

No capítulo 4 apresentamos o nosso sistema de pinça óptica acoplado com as espectroscopias confocais Raman, Hiper Rayleigh, Hiper Raman e fluorescência por absorção de dois fótons. Comparamos a performance de nosso sistema “homemade” de microanálise com a de outros grupos repetindo suas medidas. Essa comparação mostrou que nossos tempos de aquisição e relação sinal ruído eram iguais ou melhores do que os apresentados por outros grupos, incluindo os trabalhos de nosso colaborador, Dr. Katsuhiro Ajito da Nippon Telegraph & Telephone do Japão [13]. Além disso, nosso sistema traz uma inovação em relação aos outros sistemas de espectroscopia & pinça óptica pelo fato de estarmos usando lasers de pulsos ultracurtos e um laser sintonizável para espectroscopia diferente do laser da pinça óptica. Com o laser pulsado foi possível observar espalhamento Hiper Raman e Hiper Rayleigh na pinça óptica, um resultado original. O laser de femtosegundos também nos permitiu observar simultaneamente a luminescência gerada por absorção de dois fótons na região do visível (500 nm), o

espalhamento Raman na região do infravermelho próximo (800 nm) e os espalhamentos Hiper Rayleigh e Hiper Raman na região do azul (400 nm). Usualmente, a presença da luminescência impede a observação do Raman, mas no nosso caso as regiões espectrais são completamente diferentes. Talvez uma das maiores vantagens do acoplamento da pinça óptica com a espectroscopia é que agregando microanálise à pinça óptica podemos analisar a composição e metabolismo de uma única célula, inclusive de células vivas em movimento. Também podemos aproximar e afastar partículas umas das outras, exercer tensões e forças sobre as mesmas e analisar as conseqüências dessas manipulações. O objetivo principal dessa pesquisa foi o de construir um sistema integrando a habilidade de manipulação da pinça óptica com a de caracterização das diferentes técnicas espectroscópicas.

No capítulo 5 tratamos de óptica geométrica, hidrodinâmica e as aplicações biológicas realizadas com a pinça óptica. Para medidas de forças em microesferas obtivemos, teórica e experimentalmente, as forças ópticas e hidrodinâmica atuantes sobre essa partícula quando forçada a movimentar-se em um líquido. Um dos objetivos de medir forças em microesferas é poder determinar forças atuantes em partículas de geometria complexa. O cálculo das forças ópticas e hidrodinâmica em objetos que não são esféricos é praticamente impossível. Assim, a microesfera é usada como um calibrador cuja precisão está intimamente ligada à concordância entre as forças que agem sobre a mesma. Do mesmo modo que a microesfera sofre um deslocamento na direção contrária ao seu movimento no líquido, ela também sofrerá quando estiver acoplada à partícula causadora da força que se quer determinar. Podemos usar o deslocamento como uma medida do valor dessa força. Afinal, ela é igual e contrária à força óptica, que por sua vez é calibrada com esse deslocamento. Retomamos a calibração desenvolvida na Tese de Mestrado, pois apesar de termos obtido resultados razoáveis, ao longo do Doutorado percebemos a importância do uso da esfera integradora para uma medida mais precisa da potência, que na época era realizada com detectores para feixes paralelos e não convergentes, assim como é o caso da pinça

óptica. Uma medida precisa da potência reflete em uma calibração mais precisa da pinça óptica. Depois de feita a calibração da pinça óptica, calculamos a força do protozoário *Leishmania amazonensis*, causador da doença Leishmaniose. Agora é o parasita que causa o deslocamento na microesfera. Sabendo o seu valor podemos quantificar a força desejada. Nesse mesmo capítulo também aplicamos a pinça óptica para estudar a elasticidade de hemácias. O bom desempenho das funções dessas células na corrente sangüínea está fortemente ligado à sua capacidade de deformação, que por sua vez é mantida pelas propriedades de elasticidade celular e viscosidade de sua membrana. A fim de quantificar essas propriedades simulamos a deformação dessas células no laboratório. Para isso, capturamos as hemácias com a pinça óptica, as submetemos a velocidades constantes e estudamos as forças elástica e hidrodinâmica que agem sobre a mesma. A determinação da elasticidade e viscosidade é muito importante, pois a partir de uma caracterização de hemácias normais podemos observar, por exemplo, o quanto as hemácias doentes ou o quanto as hemácias estocadas para transfusão estão com suas propriedades alteradas. Após a caracterização das hemácias normais estudamos a deformabilidade de hemácias de pacientes com anemia falciforme homozigotos, medicados ou não com hidroxuréia, de hemácias de doadores de sangue com traço falciforme correlacionada ao tempo de estocagem de bolsas e de hemácias tratadas com radiação  $\gamma$ , normalmente transfundidas em pacientes imuno-suprimidos, também correlacionada ao tempo de estocagem. Ao realizar essa pesquisa percebemos que para se aproveitar toda a variedade de aplicações que a pinça óptica pode nos proporcionar é fundamental entendermos a hidrodinâmica para baixos números de Reynolds do universo habitado pelos microorganismos, por isso esse capítulo traz também estudos teóricos nessa área.

Por fim, no último capítulo falamos um pouco das perspectivas abertas pelos estudos realizados nessa Tese de Doutorado.



## *Capítulo 2*

### *Sistemas Experimentais*

Neste capítulo descrevemos, do ponto de vista experimental, todas as montagens utilizadas ao longo dessa Tese. Entretanto, não incluímos a apresentação e a discussão dos resultados, que serão feitas nos capítulos posteriores. Os únicos resultados exibidos nesse capítulo são aqueles cuja maior dificuldade para obtê-los reside no sistema experimental e que falam por si próprios sem justificar maiores análises. Optamos por esse modo de apresentação ao perceber que as montagens compartilham de muitos equipamentos e procedimentos. Dessa forma todos os seus detalhes são então relatados aqui neste capítulo, sem mais detalhes nos capítulos subseqüentes.

Como um fio condutor para as diversas aplicações, adotamos a estratégia de apresentar: as metas da experiência em questão, um esquema da montagem com a descrição dos equipamentos e dos detalhes que se mostraram os mais importantes para o sucesso final da aplicação, uma discussão dos problemas que nos impediam de alcançar as metas e, dentro de um ponto de vista exclusivamente intuitivo e experimental, indicar como foi possível resolver cada um deles.

Os sistemas experimentais utilizados nessa Tese foram: 1. Pinça óptica simples; 2. Aplicação da pinça óptica simples para medidas de força, elasticidade e viscosidade; 3. Pinça óptica dupla; 4. Espectroscopia de força com pinças ópticas e 5. Espectroscopia linear (Raman) e não linear (luminescência excitada por absorção de dois fótons, Hiper Rayleigh e Hiper Raman) em conjunto com pinças ópticas.

Sem utilizar qualquer modelo quantitativo mais sofisticado apresentamos as idéias intuitivas dos fenômenos físicos envolvidos no experimento que nos permitem entender as opções de montagens experimentais utilizadas e as dificuldades que apareceram. Foi dessa forma que nós desenvolvemos o nosso trabalho, usando a intuição experimental nas montagens e usando uma análise quantitativa sobre os resultados obtidos como realimentação para a melhora do sistema e a obtenção de resultados mais precisos.

Assim, iniciamos este capítulo explicando, baseado na óptica geométrica, o princípio básico de funcionamento de uma pinça óptica, o qual é suficiente para definir variáveis e parâmetros importantes na montagem e na operação dos sistemas experimentais.

## **2.1 A Pinça Óptica**

Uma pinça óptica utiliza as forças de radiação de um laser para capturar e manipular partículas microscópicas. Os dois equipamentos fundamentais na sua montagem são o microscópio, dentro do qual a objetiva tem o papel principal, e o laser. A Figura 1 mostra um esquema da montagem experimental da nossa pinça óptica simples. Para entender a importância dos diversos componentes do sistema iniciamos, de forma intuitiva, com os fenômenos envolvidos na captura das partículas por uma pinça óptica.

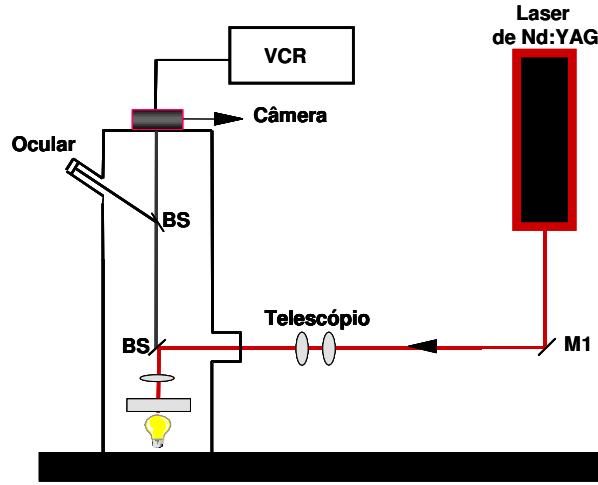


Figura 1. Sistema Experimental de Pinça Óptica simples.

### 2.1.1 Princípio Básico de Funcionamento: Transferência de Momento do Fóton

A forma mais simples de entender o princípio de operação de uma pinça óptica é através da óptica geométrica (aplicada quando  $r \gg \lambda$ , onde  $r$  é o raio da partícula e  $\lambda$  é o comprimento de onda) analisando a trajetória dos raios e associando-os a uma partícula, o fóton, que transporta momento  $|\vec{p}| = h\nu/c$  (no vácuo). Um obstáculo que muda apenas a direção do fóton recebe um impulso na direção da bissetriz do ângulo entre os fótons incidentes e refratados, como se fosse um choque entre partículas, conforme ilustra a Figura 2.

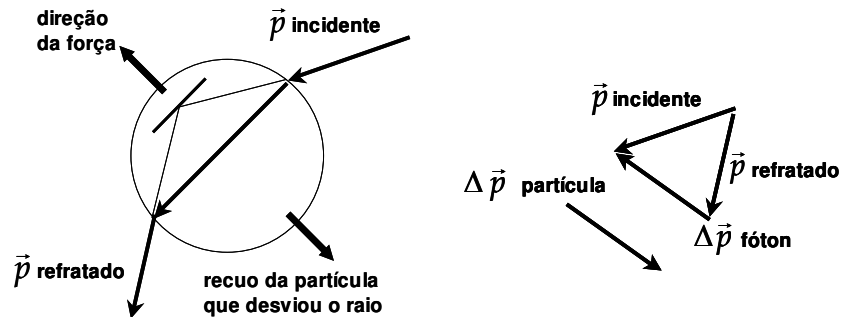


Figura 2. Choque entre fóton e centro espalhador.

Os trabalhos pioneiros de A. Ashkin em levitação de partículas iniciaram-se com a utilização de feixes de lasers contra-propagantes [14, 15, 16, 17] até que notou que apenas um feixe altamente focalizado era suficiente para capturá-las [18, 1]. Foi só a partir desse momento que essa técnica experimental passou a ser chamada de pinça óptica.

Para entender como um único feixe altamente focalizado é capaz de capturar uma partícula, mesmo contra um campo gravitacional, vamos analisar apenas a trajetória de dois raios meridionais, simétricos, que se encontrariam com o eixo  $z$  na posição  $z_0$  se não sofressem desvio devido ao centro espalhador. Vamos considerar que a partícula espalhadora é uma esfera com o eixo na vertical oposto à gravidade, conforme pode ser visto na Figura 3 e na Figura 4. Podem ocorrer quatro situações distintas dependendo se o índice de refração da esfera  $n_1$  for maior, ou menor, do que o índice de refração do meio externo  $n_2$ , e se a posição do foco é positiva,  $z_0 > 0$ , ou negativa,  $z_0 < 0$ . Quando  $n_1 > n_2$ , o raio se aproxima da normal ao entrar na partícula e se afasta da mesma ao sair. O oposto ocorre se  $n_1 < n_2$ . Assim, para  $n_1 > n_2$  e  $z_0 > 0$ , a trajetória será como mostra a Figura 3 a. Já se  $n_1 > n_2$  e  $z_0 < 0$ , será como na Figura 3 b. Nota-se então que a diferença entre esses casos,  $z_0 > 0$  e  $z_0 < 0$ , é que o raio se inclina para “baixo” ou para “cima”. A situação se inverte quando  $n_1 < n_2$ , conforme apresenta a Figura 4.

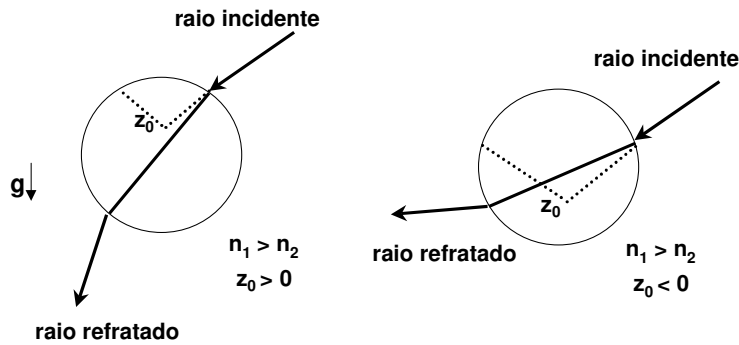


Figura 3. Trajetórias dos raios para  $n_1 > n_2$ .

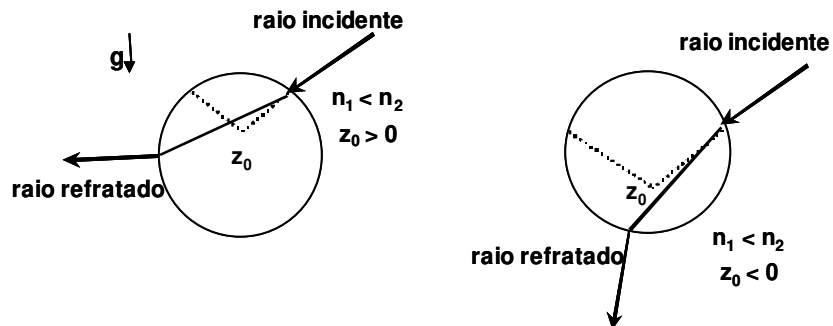
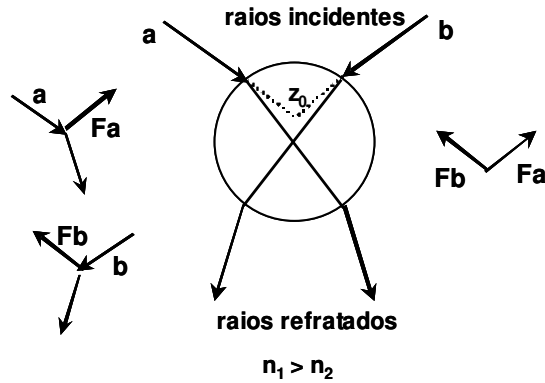
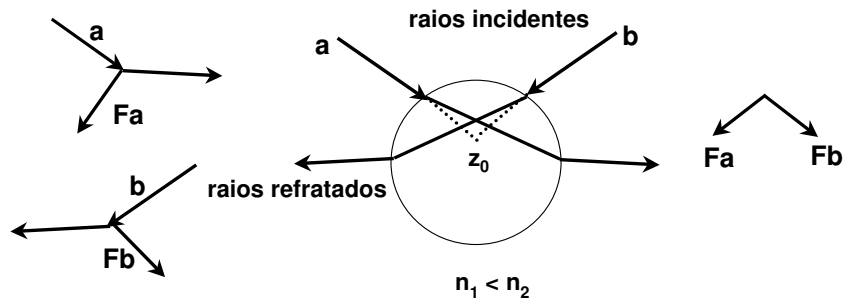


Figura 4. Trajetórias dos raios para  $n_1 < n_2$ .

Essa análise nos permite entender como um único feixe de laser pode capturar uma partícula, inclusive se opondo à gravidade, no caso  $n_1 > n_2$ , e como a partícula é expulsa do foco do laser no caso oposto. Para tanto, vamos considerar o foco na posição  $z_0 > 0$  no eixo vertical e analisar apenas as trajetórias de dois raios opostos **a** e **b** nos dois casos,  $n_1 > n_2$  e  $n_1 < n_2$ .

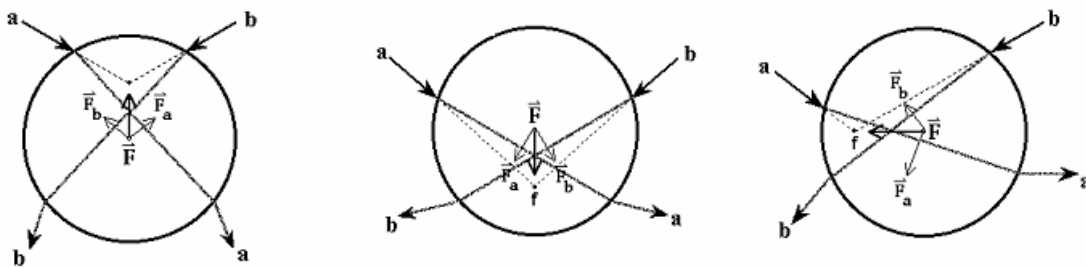


**Figura 5.** Forças e trajetórias de dois raios para o caso  $n_1 > n_2$ .



**Figura 6.** Forças e trajetórias de dois raios para o caso  $n_1 < n_2$ .

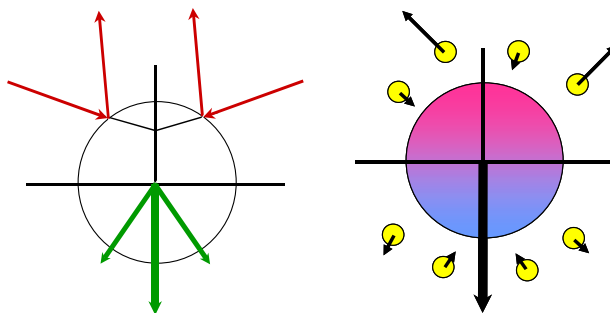
Na Figura 5, nota-se que as componentes horizontais se anulam e a força resultante é para “cima”, oposta à gravidade, tendendo a trazer o centro da partícula para o foco do laser. Já na Figura 6, a força resultante é para “baixo”, na direção da gravidade, tendendo a afastar o centro da partícula do foco do laser. A Figura 7 ilustra os raios e a direção da força para o foco do laser em diferentes posições no caso  $n_1 > n_2$ . Delas, se compreende que, se  $n_1 > n_2$ , a força é restauradora tendendo sempre a trazer o centro da partícula para o foco do laser, e se  $n_1 < n_2$  a tendência é expulsar a esfera do foco do laser.



**Figura 7.** Forças de dois raios para o caso  $n_1 < n_2$  e várias posições de foco.

### 2.1.2 Influência da Reflexão e Absorção na Força Óptica

Desconsiderando as reflexões, a força óptica seria nula quando o foco do laser coincidissem com o centro da esfera. Entretanto, associado à refração que desvia a trajetória dos raios, sempre existe uma reflexão cuja intensidade para incidência normal é dada por  $R = [(n_2 - n_1)/(n_2 + n_1)]^2$ . Os fótons refletidos tendem a expulsar a esfera do foco do laser conforme mostra a Figura 8 a. Dessa forma, a reflexão gera uma força que se contrapõe à força restauradora da pinça óptica. Normalmente a reflexão é muito menor que a transmissão, mas conforme a razão entre os índices de refração  $n_2/n_1$  aumenta, o papel da reflexão será cada vez mais significativo, impedindo a operação da pinça óptica quando  $n_1 \gg n_2$ .

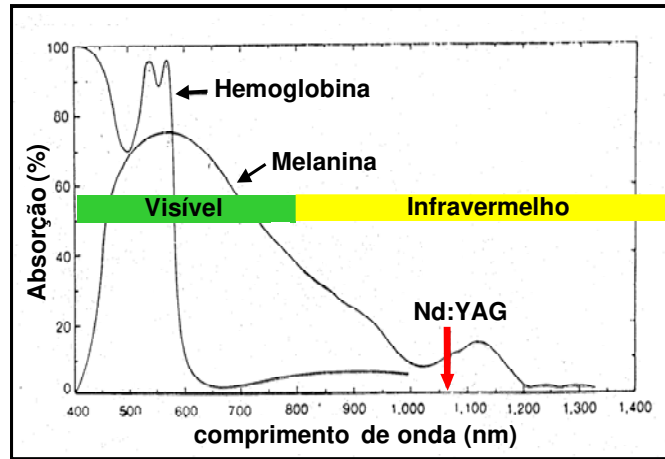


**Figura 8. (a).** Efeito da reflexão na força óptica. **(b).** Efeito radiômetro.

Não só a reflexão pode impossibilitar a captura de uma partícula pela pinça óptica, mas também a absorção. A absorção tem dois efeitos: direto, por transferência de momento de um fóton, que desaparece como se fosse um choque plástico e que também tende a expulsar a partícula do foco do laser, e indireto, através do calor gerado pela absorção do fóton. Nesse caso pode ocorrer o “efeito radiômetro” se a parte da partícula em que o feixe incide se torna mais aquecida do que a parte oposta. Quando aparece um

gradiente de temperatura assimétrico entre amostra e o meio externo, as moléculas do fluido que atingem a superfície da partícula adquirem maior velocidade por aumento de temperatura e são relançadas, transferindo a diferença de momento para a partícula. A Figura 8 b ilustra esse efeito que também tende a expulsar a partícula da armadilha óptica.

Mesmo que o efeito térmico seja pequeno do ponto de vista da força ele deve ser evitado ao máximo, pois um dos principais objetivos da pinça óptica é capturar e estudar partículas biológicas vivas, sem danificá-las termicamente. A maior parte das substâncias orgânicas presentes tende a ter alta absorção na região do visível onde encontram as ressonâncias eletrônicas dos elétrons de valência. A absorção dos modos vibracionais tende a ocorrer no infravermelho mais longínquo, deixando uma janela no infravermelho próximo com pouca absorção, conforme mostra a Figura 9, na qual apresentamos os espectros de absorção da melanina e da hemoglobina. A água, por exemplo, o componente mais abundante em todos os nossos estudos, possui linhas de absorção pouco intensas na região de 1.4  $\mu\text{m}$  e muito fortes na região de 2.7  $\mu\text{m}$ . Além da absorção, o espalhamento Rayleigh que também tende a expulsar a partícula capturada cai proporcionalmente ao fator  $1/\lambda^4$  no infravermelho. Nas primeiras demonstrações de uso da pinça óptica, Ashkin utilizou um laser de Argônio no visível, para capturar partículas inorgânicas em água. Entretanto, bactérias apareceram após certo tempo e ele observou que elas morriam depois de capturadas por tempos da ordem de 3 a 5 minutos, dependendo da potência do laser [19]. Isso lhe chamou a atenção para a importância das aplicações da pinça óptica em sistemas biológicos vivos e da necessidade de evitar danos térmicos aos mesmos. Para tanto, a idéia foi trocar o comprimento o laser para o infravermelho próximo [2]. Por isso, usou o laser comercial mais comum nessa região, o Nd:YAG, operando na região de 1064 nm, conforme também ilustra a Figura 9.



**Figura 9.** Espectro de absorção da melanina e hemoglobina.

### 2.1.3 Ordem de Grandeza da Força Óptica e Dimensões das Partículas Capturadas

Uma estimativa superior da ordem de grandeza da força da pinça óptica pode ser feita supondo que um feixe de laser unidirecional com 1 W de potência seja completamente absorvido pelo objeto. Neste caso a força será dada por:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{n^{\circ} \text{ fótons}}{\text{tempo}} \times p_{\text{fóton}} = \frac{\text{potência}}{hv} \times \frac{hv}{c} = \frac{\text{potência}}{c} \quad (2.1)$$

Aqui vale ressaltar que, muito antes do conceito de fótons como partículas, Maxwell já demonstrara que a força transmitida por uma onda eletromagnética era dada por  $F = \text{potência}/c$ . Usando essa expressão, temos que o valor da força será da ordem de:

$$F = \frac{1 \text{ W}}{3 \times 10^8 \text{ m/s}} = 3 \times 10^{-9} \text{ N} \quad (2.2)$$

Na prática apenas 100 a 200 mW de laser incide na partícula e os fótons são apenas desviados, e não completamente absorvidos, de modo que as força ópticas são bem menores do que nN. Forças máximas da pinça óptica são da ordem de 100 pN. Apesar de muito pequenas são forças consideráveis para partículas microscópicas. Suponha que o objeto capturado é uma partícula cúbica de 1  $\mu\text{m}$  de aresta com densidade igual a da água, ou seja  $m = (10^3 \text{ kg/m}^3) \times (10^{-6})^3 \text{ m}^3 = 10^{-15} \text{ kg}$ . Nesse caso a aceleração causada por uma força óptica de 100 pN vale  $a = F/m = 10^{-10} \text{ N} / 10^{-15} \text{ kg} = 10^5 \text{ m/s}^2 = 10^4 \times g$ , onde  $g$  é a aceleração da gravidade. Tomando uma



partícula 10 vezes maior, a massa cresce e a aceleração decresce, por um fator  $10^3$ , ainda na faixa de 10 g's. Entretanto para partículas com 100  $\mu\text{m}$  a aceleração seria  $10^{-2}$  g's, já desprezível frente a outras interações microscópicas. Dessa forma, fica claro que a aceleração causada pela força do laser só é considerável para partículas menores do que 50  $\mu\text{m}$ .

Em princípio, a força óptica não tem limite inferior, pois a potência do laser pode ser nula. Entretanto, a menor força óptica que podemos detectar é dada pela menor força ainda capaz de aprisionar uma partícula da mesma ordem de grandeza das forças causadas pelo movimento browniano gerado a partir de flutuações térmicas. Para uma estimativa desse limite inferior, vamos considerar a pinça óptica como um oscilador harmônico com constante elástica  $K(P)$ , proporcional à potência do laser incidente. Pelo teorema de equi-partição de energia temos:

$$\left\langle \frac{K \delta x^2}{2} \right\rangle = \frac{k_B T}{2} \Rightarrow \delta x = \sqrt{\frac{k_B T}{K}} \quad (2.3)$$

onde  $T$  é a temperatura,  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $\delta x$  o deslocamento causado pelo movimento browniano. Portanto, a expressão para a força devido às flutuações é  $F_{flut} = K(P) \delta x = \sqrt{K(P) k_B T}$ . Para estimar seu valor basta saber a constante elástica  $K(P)$  da pinça. Usando nossas medidas de calibração descritas no capítulo 5, obtivemos uma constante elástica para potência de 70 mW do laser da ordem de  $K(100\text{mW}) = 18 \times 10^{-6} \text{ N/m}$ . Utilizando esse valor de  $K$  para  $T = 300 \text{ K}$  temos  $F_{flut} = 0.27 \text{ pN} = 270 \text{ fN}$ . Diminuindo a potência do laser por um fator de 100, para 1 mW, cai pelo mesmo fator e a força de flutuação por um fator de 10, ou seja podemos considerar  $F_{flut} = 27 \text{ fN}$  como o limite inferior para nossa medida de força. Por outro lado baixas potências limitam a força máxima, logo a estratégia é usar potências altas para medir forças altas e baixas potências para medida de forças pequenas.

Partículas muito pequenas adquirem facilmente energia cinética suficiente para escapar do potencial óptico. Nas condições experimentais típicas em líquidos à

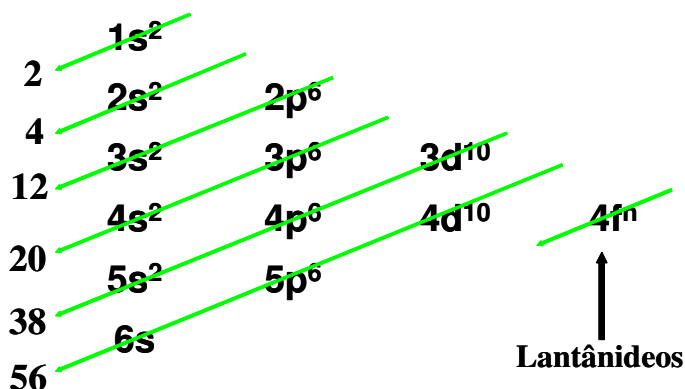
temperatura ambiente, a pinça óptica pode aprisionar partículas com dimensão até da ordem de 50 nm, abaixo do limiar de resolução típica de 200 nm dos microscópios ópticos. Embora partículas dessa dimensão não sejam visíveis seu aprisionamento pode ser detectado com técnicas espectroscópicas. Dessa forma a pinça é capaz de manipular partículas com dimensões entre 50 nm a 50  $\mu$ m, o que a torna uma ferramenta ideal para estudos de células e microorganismos.

#### 2.1.4 Laser de Nd:YAG

Na nossa pinça óptica usamos um laser de Nd:YAG modelo 3800 S da Spectra Physics operando em modo contínuo (“continuous wave” – cw) no comprimento de onda de  $\lambda = 1064$  nm. Trata-se de um laser comercial de alta potência, mais de 10 W (existem lasers de Nd:YAG com centenas de W), com o comprimento de onda bem na janela desejada, conforme mostrou a Figura 9 acima, e excelente qualidade de modo, geralmente TEM<sub>00</sub>, tornando-o a ferramenta ideal para a pinça óptica. É um laser de estado sólido capaz de operar por dezenas de anos apenas com troca das lâmpadas de bombeio e reposição da água deionizada.

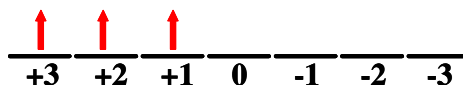
O principal componente desse laser é o íon de terra rara Nd<sup>3+</sup> embebido em um cristal de YAG (*Yttrium, Aluminium, Garnet* – Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>) no qual o Nd entra em substituição ao Y, já em um ambiente químico balanceado do ponto de vista das 3 cargas negativas à sua volta. O Nd faz parte da família dos Lantanídeos, terras raras com orbitais 4f incompletos, em que quase todos os elementos, exceto o Promécio por ser radioativo, são utilizados como meios laser ativos (Figura 10). O estado de oxidação usual das terras raras é 3, que quase sempre se apresentam na forma de íons trivalentes. Para tanto elas perdem dois elétrons do orbital 6s e um dos orbitais 4f. Entretanto, as funções de onda dos orbitais 5p, mesmo com energias mais baixas do que os 4f, são mais espalhadas espacialmente. O orbital 5p completo cria uma distribuição esférica de cargas que blindar os elétrons dos orbitais 4f de campos elétricos e magnéticos de átomos vizinhos. Dessa forma os níveis 4f se modificam muito pouco quando colocados

em diferentes hospedeiros, mantendo quase intacta a estrutura de níveis do átomo isolado.



**Figura 10.** Distribuição dos elétrons em camadas para as terras raras.

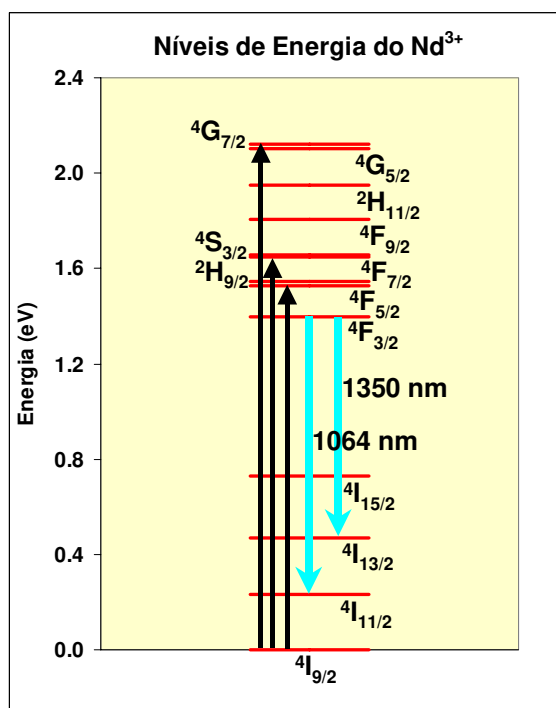
Quando colocados em um hospedeiro sólido, os níveis tendem a se alargar por influência dos fônons, a se deslocar por algumas centenas de  $\text{cm}^{-1}$  apenas devido ao efeito Stark e a quebrar a degenerescência magnética em  $J$ . O  $\text{Nd}^{3+}$  possui três elétrons nos orbitais  $4f$  que devem ser colocados segundo o esquema de Russel-Saunders, no qual os spins  $S$  e os momentos angulares orbitais  $L$  se somam independentemente, para finalmente dar origem ao momento angular total  $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$ , cujos números quânticos variam de  $|L - S|$  até  $|L + S|$ . Para íons com menos da metade da camada cheia, o estado fundamental corresponde ao menor  $J$ . A Figura 11 mostra a disposição dos 3 elétrons do  $\text{Nd}^{3+}$  no estado de energia mais baixa. Somando os spins, obtemos  $S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = \frac{3}{2}$ , e somando os  $m$ 's obtemos  $L = 3 + 2 + 1 = 6$ .



**Figura 11.** Disposição dos elétrons de  $\text{Nd}^{3+}$  segundo a regra de Russel-Saunders.

A notação espectroscópica é da forma  $^{2S+1}L_J$ , usando as letras S, P, D, F, G, H, I, J, etc para  $L = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  etc. No caso do  $\text{Nd}^{3+}$ , então,  $2S+1 = 4$ ,  $L = 6 = I$ , e o menor  $J = 6 - \frac{3}{2} = \frac{9}{2}$ , portanto o estado fundamental é  $^4I_{9/2}$  com degenerescência 10. Os próximos 4 principais níveis excitados correspondem apenas aos  $J$ 's seguintes de  $\frac{11}{2}$  até  $\frac{15}{2}$ . Níveis superiores são dados por rearranjos dos elétrons entre os  $m$ 's. A

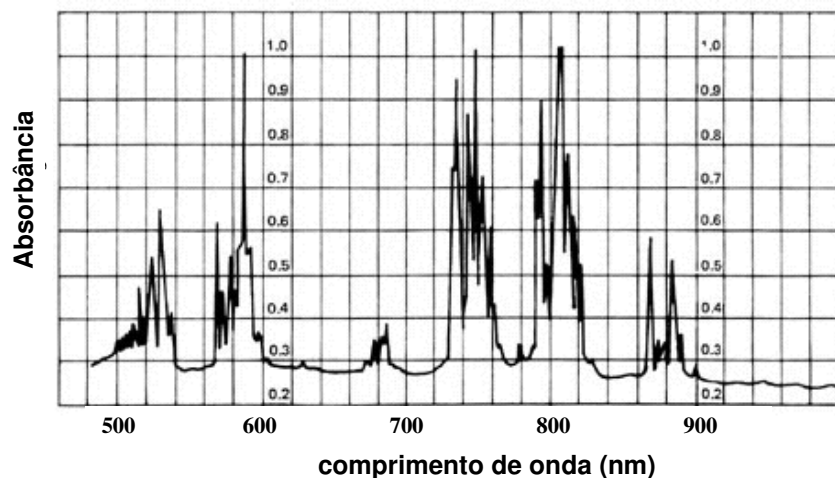
emissão laser em 1064 nm ocorre entre os níveis  ${}^4F_{3/2}$  e  ${}^4I_{11/2}$ , conforme ilustrado na Figura 12 onde vemos o diagrama de níveis do  $Nd^{3+}$ . Esse é um sistema laser de 4 níveis, no qual elétrons fotoexcitados para os níveis acima do  ${}^4F_{3/2}$  rapidamente decaem para o mesmo, não radiativamente, via emissão de fônons devido à pequena separação entre esses níveis. A emissão de fônons do nível  ${}^4F_{3/2}$  é muito pequena pois seriam necessários muitos fônons para atingir o nível mais próximo  ${}^4I_{15/2}$ . Por isso esse estado tem um tempo de vida razoavelmente longo, da ordem de 200  $\mu s$ . Já os elétrons dos níveis  ${}^4I_{11/2}$  até  ${}^4I_{15/2}$  decaem rapidamente para o estado fundamental por emissão de fônons em cascata. As duas linhas principais utilizadas nos lasers de Nd:YAG são a de 1064 nm, a mais intensa, do nível  ${}^4F_{3/2}$  para o  ${}^4I_{11/2}$ , e a de 1350 nm, do  ${}^4F_{3/2}$  para o  ${}^4I_{13/2}$ , conforme podemos ver na Figura 12. O bombeio é feito opticamente usando as bandas em torno de 800 nm, 750 nm e 580 nm, marcadas com setas pretas. A Figura 13 mostra o espectro de absorção do  $Nd^{3+}$  no YAG.



**Figura 12.** Diagrama de níveis do Nd:YAG.

Para bombeio de lasers cw se usa lâmpadas de arco de Kriptônio em alta pressão cujas linhas se ajustam bem ao espectro de excitação do  $Nd^{3+}$ . Essa lâmpada, na forma

de um tubo de comprimento igual ao do bastão de Nd:YAG, em torno de 10 cm, é colocada no foco de uma cavidade elíptica com o bastão de YAG no outro foco. Dessa forma todos os raios emitidos pela lâmpada atingirão o bastão. Uma opção mais barata é a lâmpada de Xenônio. Hoje também tem se tornado comum o uso de lasers de diodo como fonte de bombeio, devido à vantagem de melhor casamento das linhas e menor geração de calor. Entretanto, os lasers de diodo tendem a ter vida curta e são muito mais caros do que as lâmpadas de Kriptônio. O laser de Nd:YAG cw funciona muito bem, mesmo com uma tecnologia antiquada, sendo estável e sem problemas de operação. Um estoque de lâmpadas pode mantê-lo operacional por décadas, sem maiores necessidades de manutenção e importações.

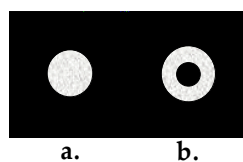


**Figura 13.** Espectro de absorção do laser de Nd:YAG.

O nível  $^4I_{11/2}$  está da ordem de 200 meV do estado fundamental, ou seja, em torno de  $10 k_B T$  para 300 K, temperatura ambiente. Porém, se a temperatura aumenta para 600 K, esses níveis já podem ser termicamente populados com o fator de  $e^{-5}$ , tornando o tempo de decaimento para o estado fundamental mais longo, prejudicando a inversão de população e o desempenho do laser. Por isso, o laser de Nd:YAG é refrigerado. Entretanto, a partida da lâmpada de arco de Kriptônio se dá através de uma descarga de alta tensão. Assim, se a água de refrigeração em torno da lâmpada apresentar resistência menor do que a do gás dentro da lâmpada, a descarga ocorrerá pela água,

não ionizando o gás da lâmpada. Dessa forma, é fundamental que se utilize água bidestilada e deionizada na refrigeração da lâmpada e do bastão de Nd:YAG. A fonte do laser já vem com colunas para deionizar a água que requerem manutenção periódica. A extração final de calor se dá por troca de calor entre o circuito primário da água deionizada e um circuito secundário de água comum ou refrigerada. O controle grosso da potência do laser é feito através da corrente da lâmpada de bombeio.

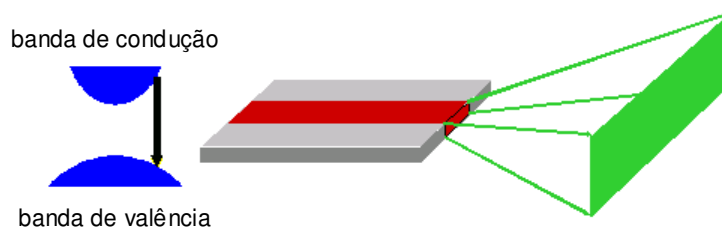
O bastão de Nd:YAG é cortado em ângulo de Brewster de modo que o laser sai polarizado, pois a perda por reflexão para a polarização s em centenas de idas e vindas na cavidade é muito grande para competir com a polarização p. Em alta potência, entretanto, podemos observar 4 lóbulos na luz transmitida por um polarizador cruzado. Esse efeito se deve a birrefringência termicamente induzida no bastão pelo gradiente de temperatura, que vai tornando os raios fora dos eixos x e y elipticamente polarizados. Para garantir um bom modo da luz emitida se coloca uma abertura intracavidade no laser. A forma correta de alinhamento do laser para se ter um bom modo  $TEM_{00}$  é, primeiro retirar essa abertura, e depois buscar o máximo de potência alinhando os espelhos de trás e da frente. Só depois se recoloca a abertura movendo-a lateralmente até encontrar o máximo de potência. Daí, se pode repetir o procedimento até não mais ser possível melhorar o valor da potência. Para examinar o modo, abrimos o feixe com uma lente divergente e observamos se a figura formada em um anteparo está bem circular. Alguns pesquisadores preferem utilizar o modo na forma de “donought” do laser, Figura 14, com o argumento de que os raios próximos do eixo do cone de luz incidente não geram forças na direção vertical. Nesse caso é necessário colocar uma abertura também na forma de “donought” em substituição à abertura circular dentro da cavidade do laser.



**Figura 14.** Modos dos laser. **a.**  $TEM_{00}$  e **b.** “donought”.

### 2.1.5 Outros Lasers Comumente Utilizados na Pinça Óptica

Tem sido comum o uso de lasers de diodo para pinça óptica que emitem na região de 800 nm e utilizam como transições laser a recombinação de portadores da banda de condução para a banda de valência. A grande vantagem desse laser é que o bombeio é realizado simplesmente por injeção de portadores, ou seja, através de uma corrente elétrica. Esses lasers, entretanto, têm apresentado problemas de baixa potência e péssima qualidade do modo. Isso porque a região da junção p-n que emite luz nesses lasers é retangular, levando a modos elípticos, como ilustra a Figura 15.



**Figura 15.** Laser de diodo.

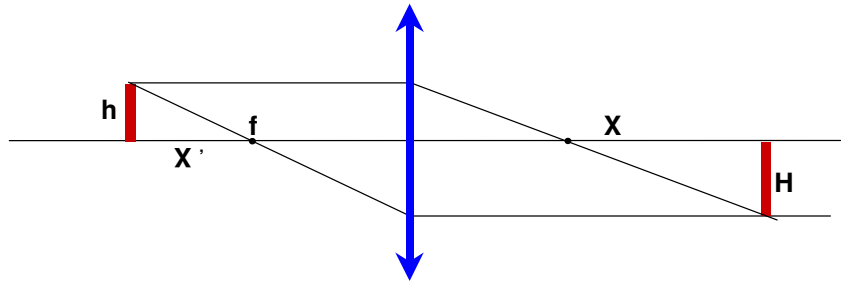
Ao focalizar modos desse tipo se perde boa parte da energia localizada no foco do laser, pode-se sempre tentar torná-los mais quadrados usando prismas anamórficos ou “limpar” o modo com um filtro espacial, mas isso é geralmente obtido às custas de perda de potência. Nossa experiência com esses lasers mostra pinças com pouca força, limitadas em torno de 10 pN. Lasers de Nd:YAG operam facilmente com 10 W enquanto os lasers de diodo usualmente têm potências abaixo de 1 W. Lasers de diodo com maiores potências geralmente têm tempos de vida bem mais curtos e preços muito mais altos.

Outra desvantagem dos lasers de diodo vem dos danos térmicos no comprimento de onda em torno de 800 nm, bem maiores do que em 1064 nm. Apesar de não ser necessário usar 10 W na pinça óptica, é sempre desejável ter mais potência do que o mínimo necessário. Boa parte da potência será perdida na abertura da objetiva e nas reflexões de suas lentes. Isso porque todas as objetivas vêm com “coating anti-refletor” para o visível para evitar o aparecimento de artefatos na imagem devido a múltiplas reflexões em suas superfícies. Esse “coating anti-refletor” para o visível acaba

aumentando a reflexão no infravermelho, de modo que apenas de 8-10% da luz do Nd:YAG é transmitida pela objetiva. Só ultimamente têm aparecido objetivas com “coating anti-refletor” para o visível e o infravermelho simultaneamente, devido exatamente ao uso de lasers em microscopia, como microscopia confocal e pinças ópticas. Uma pinça óptica “fraca” se torna incapaz de capturar microorganismos vivos com capacidade motora, principalmente os flagelados, pois ao se debaterem acabam escapando pela direção de menor força, geralmente na vertical. O grande teste da qualidade de uma pinça é sua capacidade de capturar espermatozóides, um dos campeões entre os microorganismos flagelados, com forças da ordem de 50 pN [10].

### 2.1.6 Microscópio Óptico Simples

O quadro intuitivo traçado até aqui pode nos ajudar a entender a importância dos diversos componentes da montagem experimental da pinça óptica, iniciando pelo microscópio, e dentro dele, da objetiva. Nossa descrição do microscópio irá se restringir aos aspectos importantes para a operação da pinça óptica. A Figura 16 mostra um objeto e sua imagem obtida através de uma objetiva de aumento  $m$ .



**Figura 16.** Formação de imagem.

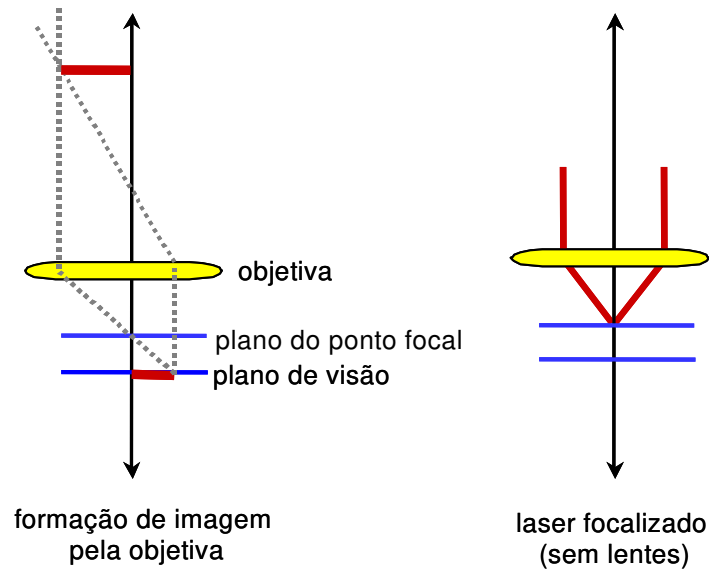
Usando a regra da óptica geométrica de que raios que passam pelo foco saem paralelos e raios que entram paralelos passam pelo foco no plano da imagem, obtemos por semelhança de triângulos que

$$\frac{h}{X} = \frac{H}{f} \rightarrow m = \frac{H}{h} = \frac{f}{X} \quad (2.4),$$

onde  $m$  é a magnificação lateral. Dada uma magnificação  $m$ , o objeto que está em foco se encontra a uma distância  $X = f/m$  do foco da objetiva. Entretanto, um feixe de luz

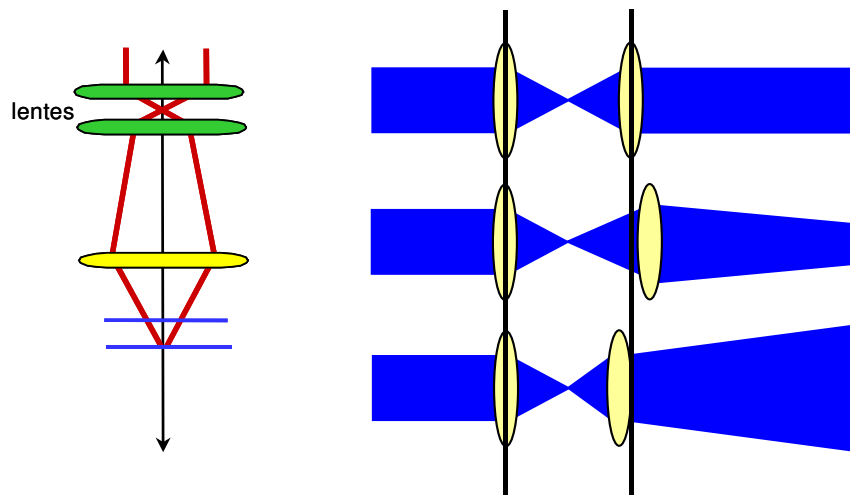


paralelo típico de um laser incidindo na objetiva pelo lado oposto da imagem, será focalizado no foco da mesma objetiva, fora do plano de visão. Isso significa que as partículas capturadas estarão completamente fora de foco e não serão detectadas, assim como mostra a Figura 17. Para focalizar o feixe do laser no plano de visão devemos torná-lo ligeiramente divergente.



**Figura 17.** Plano do ponto focal e plano de visão.

Isso é feito através de um telescópio, um sistema de duas lentes colocadas uma no foco da outra, conforme ilustra a Figura 18, na qual se percebe que afastando as duas lentes se obtém um feixe convergente e aproximando-as se obtém um feixe divergente. Ele nos permite controlar a profundidade  $z$  em que o laser é focalizado. Utilizamos lentes com distância focal bem curta para ganhar sensibilidade, ou seja, um pequeno deslocamento entre as lentes com um transladador micrométrico  $xyz$  terá um efeito apreciável na posição do foco do laser. Auxiliando alguns grupos que desejavam montar seus próprios sistemas de pinças ópticas percebemos que um dos fatores que mais haviam dificultado o alinhamento foi o fato de usarem lentes de grande distância focal. Fica difícil manter o alinhamento quando é necessário mover lentes por vários cm até encontrar o foco. Do ponto de vista do alinhamento da pinça esse telescópio é o ponto crucial.



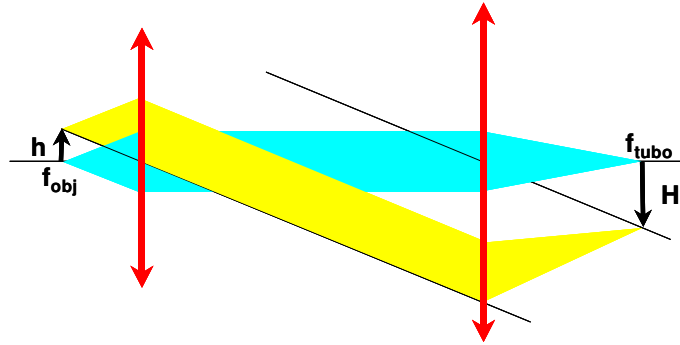
**Figura 18.** Importância do telescópio.

É importante notar que devemos ser capazes de visualizar as partículas “pinçadas”, significando que não podemos obstruir o caminho dos raios do microscópio utilizados para a formação da imagem. Por isso o “beam splitter” que desvia o feixe do laser de Nd:YAG para a objetiva tem que ser transparente ao visível, ou seja, um espelho dicróico. Espelhos dielétricos para Nd:YAG com mais de 99% de reflexão são bem transparentes ao visível se tornando a escolha ideal para o BS mostrado no esquema da Figura 1. Esses espelhos dielétricos, além de atuarem como espelhos também atuam como filtro, mas não de 100%, da luz do laser retroespalhada. Filtros complementares devem ser usados para segurança se o operador olha diretamente na ocular. No caso de uso exclusivo da câmera de vídeo pode-se usar o pequeno vazamento de luz desse espelho para alinhamento do sistema. Nos microscópios “upright” podemos usar a porta de epi-iluminação, por cima, ou de excitação de fluorescência para envio do laser. Foi o que fizemos no nosso caso em que o microscópio foi um Olympus modelo BH2.

### 2.1.7 Microscópios de Óptica Infinita

Até aqui, tratamos do microscópio convencional, também chamado de óptica finita. Os microscópios mais modernos são de óptica infinita funcionando de forma semelhante a uma lupa, onde o objeto é colocado no foco da objetiva. Assim, cada porção do objeto, vai dar origem a um feixe de raios paralelos que passam inclinados

pelo centro da objetiva, como mostra a Figura 19. Para focalizar esses raios paralelos e reconstruir a imagem desse objeto, coloca-se uma outra lente, chamada “lente de tubo”.



**Figura 19.** Formação de imagem em um microscópio de óptica infinita.

Nessa configuração, o aumento final será:

$$\frac{h}{f_{obj}} = \frac{H}{f_{tubo}} \rightarrow m = \frac{H}{h} = \frac{f_{obj}}{f_{tubo}} \quad (2.5)$$

Como os raios de luz, que são formados entre a objetiva e a “lente de tubo”, são paralelos, elementos ópticos como prismas, filtros e polarizadores podem ser colocados nesse espaço sem causar aberrações na formação da imagem na ocular. Há um número máximo de componentes que podem ser colocados, o qual é limitado pela distância existente entre a objetiva e a “lente de tubo”. Colocar a “lente de tubo” muito longe da objetiva reduz a quantidade de raios periféricos coletados resultando em imagens borradas e/ou escurecidas reduzindo assim sua qualidade. Nos microscópios de óptica infinita, se o laser for acoplado ao microscópio sem passar pela “lente de tubo”, não haveria a necessidade do uso do telescópio, pois o laser seria focalizado no foco que agora é o plano de visão. Entretanto, se a “lente de tubo” estiver no caminho do laser, haverá a necessidade do telescópio para compensar o desvio que será sofrido pelo feixe, pois nesse caso o plano focal não mais será o mesmo que o plano de visão.

Na grande maioria das vezes o feixe de laser entra no microscópio pelas portas reservadas para câmeras, máquinas fotográficas e/ou fluorescência e por isso fatalmente passa pela “lente de tubo”. Apesar disso, mesmo quando pode ser feita alguma modificação no microscópio de forma a possibilitar que o laser entre diretamente pela

objetiva e não se tem a necessidade direta de visualizar a captura, o telescópio permite corrigir a divergência do feixe de laser e é a única forma de controlar a posição vertical do foco.

### 2.1.8 Características das Objetivas

Os parâmetros que definem as propriedades das objetivas são: aumento, abertura numérica, distância de trabalho e se são de imersão em óleo ou água. O aumento já foi discutido, e é dado pela razão  $f/X$ , ou  $f_{obj}/f_{tubo}$ . A abertura numérica é definida como o ângulo do cone de luz na saída na objetiva  $N.A. = r/f$ , como mostra a Figura 20. De acordo com a lei do seno de Abbe,  $r/f = \sin\theta$  onde  $\theta$  é a abertura angular de um cone de luz que atravessa uma objetiva. Se não é o ar que está entre a mesma e a lâmina, a abertura numérica é então definida por  $N.A. = n \sin\theta$ , onde  $n$  é o índice de refração do meio.

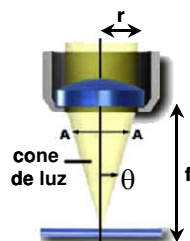


Figura 20. Definição de abertura numérica.

Quanto maior for a abertura numérica, maior é o ângulo de abertura do cone de luz formado. A abertura numérica, o aumento e o campo de visão de uma objetiva estão relacionados. Da Figura 21 vemos que o ângulo máximo que passa pela abertura da objetiva é dado por  $2h/X = NA$ , e usando  $m = f/X$  temos que  $2h = (f/m)NA$ , ou seja o campo de visão cai com o aumento da objetiva e aumenta com sua abertura numérica.

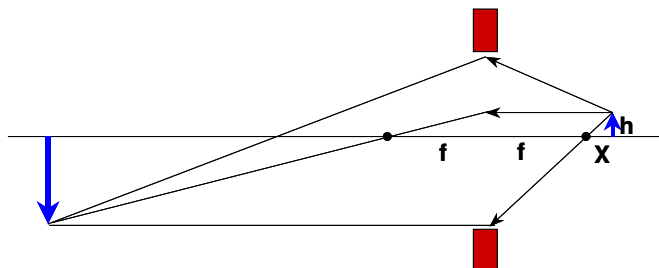
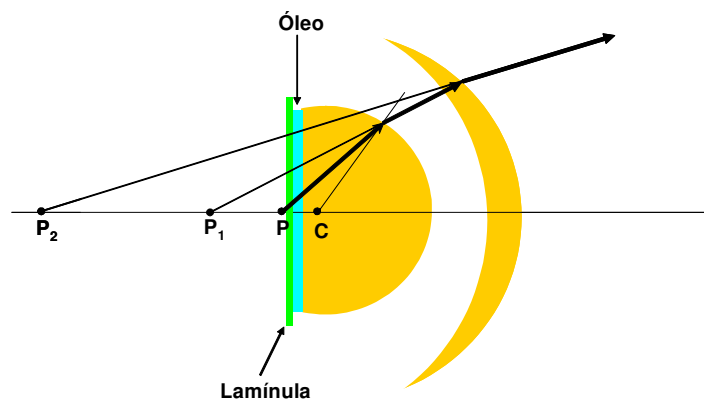


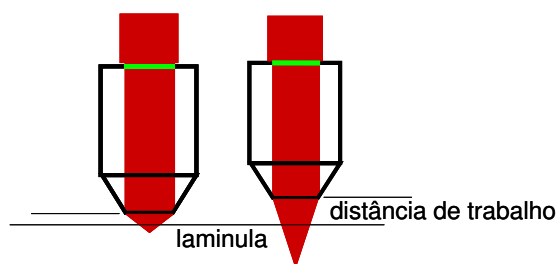
Figura 21. A objetiva e o campo de visão.

Para evitar campos de visão muito pequenos, menores dos que os objetos que se pretende visualizar, é necessário crescer a abertura numérica com o aumento da objetiva. Vejamos o exemplo de uma objetiva de 100X com distância focal de  $5\text{ }\mu\text{m}$ . Para uma abertura numérica de 1, o campo de visão inteiro é da ordem de apenas  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Aberturas da ordem de 1 significam ângulos muito grandes. Tão grandes que parte da luz sofreria reflexão interna total e seria praticamente impossível conseguir uma boa correção das aberrações. A forma encontrada para obter aberturas numéricas acima de 1 foi o uso das objetivas de imersão esquematizadas na Figura 22. O fluido representado pela cor azul da figura tem o mesmo índice de refração do vidro da esfera cortada. Isso significa que o ponto  $P$  sai dessa primeira lente como se viesse de  $P_1$  e do menisco a seguir como se viesse de  $P_2$  em um ângulo bem menor do que o inicial. A partir daí se usam outras lentes para fazer correção das aberrações cromáticas.



**Figura 22.** Objetivas de imersão.

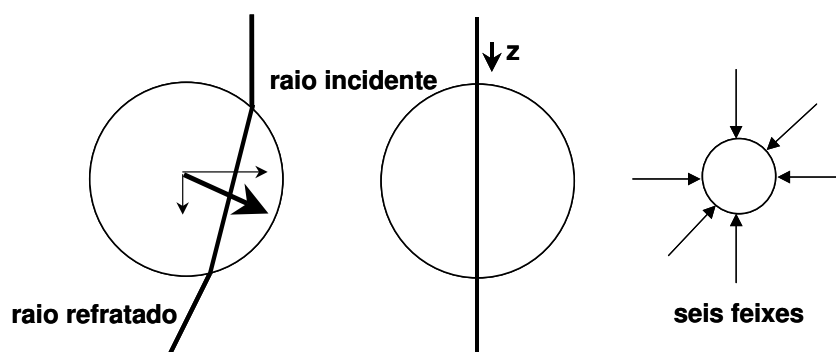
As objetivas de imersão em óleo podem chegar a aberturas numéricas de 1.4. Outro fator relacionado às aberturas numéricas é a distância de trabalho de uma objetiva. Ela é definida como a distância do objeto à saída da objetiva, no caso de objetivas de imersão, da lâmina até o objeto, conforme podemos ver na Figura 23. Dessa forma percebe-se que quanto maior o aumento, maior é a abertura numérica e menor é a distância de trabalho.



**Figura 23.** Abertura numérica e distância de trabalho.

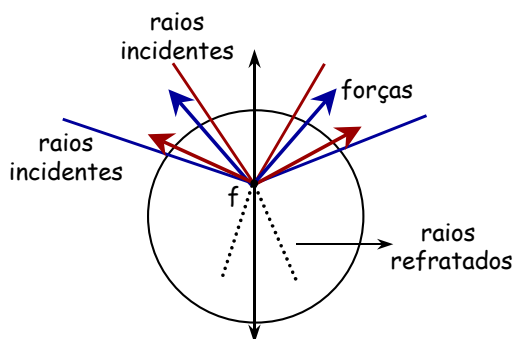
### 2.1.9 Falsa Armadilha e a Abertura Numérica

Uma pinça óptica deve ser capaz de capturar um objeto tridimensionalmente, com forças nas 3 direções  $x$ ,  $y$  e  $z$ . Para isso é necessário garantir que os raios de luz tenham componentes nessas 3 direções. Entretanto, também é possível se criar uma falsa armadilha, capaz de capturar uma partícula em apenas duas dimensões, e não em três. Ela opera sempre que um agente externo fornece a força necessária para que a partícula não mova na direção vertical, como por exemplo, uma partícula no fundo da lâmina, ou que flutua no líquido. Para criar uma “pinça óptica” verdadeira é necessário usar feixes de grande abertura numérica, enquanto mesmo apenas um feixe de luz paralelo é capaz de criar a falsa armadilha. Podemos entender isso acompanhando a trajetória de um raio vertical que incide lateralmente na esfera à uma certa distância de seu centro como mostrado na Figura 24. Esse raio se inclina na direção da esfera e aparecem duas forças, uma perpendicular ao raio tendendo a colocar o centro da esfera ao longo do raio e outra ao longo do raio, na direção  $z$ , acelerando a partícula verticalmente. A partícula poderia ficar em qualquer posição de equilíbrio ao longo do raio que passa pelo seu centro caso não houvesse a reflexão. Com a reflexão não há como estabilizar a partícula em alguma posição. Os primeiros trabalhos de Ashkin sobre levitação de partículas utilizavam uma configuração de 6 feixes contra-propagantes, para cancelar as forças de reflexão, nas três direções para capturar as partículas.



**Figura 24.** Configuração de uma falsa armadilha.

Num cone de luz são os raios mais inclinados, com maiores componentes horizontais, que geram as forças na direção vertical. A parte central do cone, quase toda vertical, gera forças restauradoras na direção horizontal. Quanto maior a abertura numérica, maior a força na direção vertical às custas de uma força menor na direção horizontal, conforme esquematizado na Figura 25 e na Figura 26.

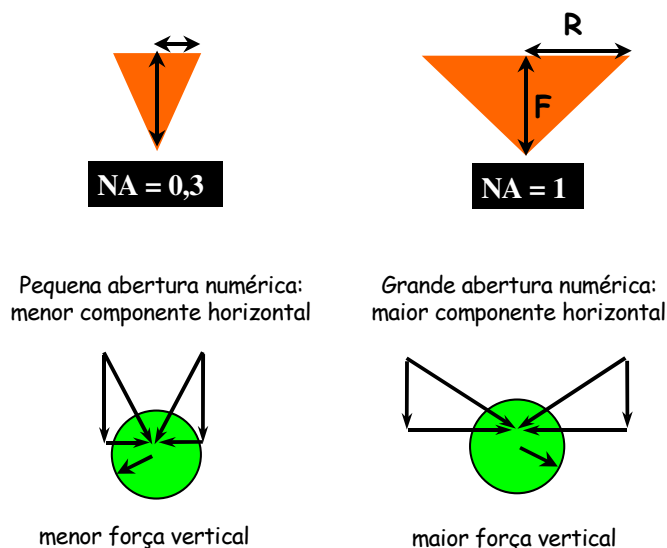


**Figura 25.** Falsa armadilha e a abertura numérica.

Armadilhas em 3 dimensões só são obtidas com aberturas numéricas da ordem de 1, tipicamente com aumentos acima de 60X. Qualquer movimento horizontal observado com objetivas de 40X ou menos são, na realidade, de falsa armadilha, usualmente de partículas no fundo da lâmina que não podem se mover na direção vertical.

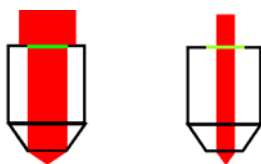
Para essas partículas pode-se observar movimento horizontal, mas não se consegue levá-las, pois a força vertical não é maior que seu peso. Um cuidado extra deve ser tomado no caso de microscópios invertidos, em que o feixe incide verticalmente contra a gravidade, pois a tendência da reflexão de expelir a partícula pode cancelar a gravidade e mesmo uma falsa armadilha pode movimentar a partícula

em 3 dimensões. Entretanto, não será capaz de capturar microorganismos com força motriz própria, a menos que existam forças nas 3 dimensões.



**Figura 26.** A abertura numérica e a força vertical.

Os cuidados com a falsa armadilha vão além do uso de uma objetiva com abertura numérica de alto valor. Esse valor é dado para a coleta da luz e definido pelas íris ao longo da objetivas. Do ponto de vista da luz incidindo na objetiva pelo lado da imagem só se obtém sua abertura numérica nominal quando a mesma é completamente preenchida, como mostra o esquema da Figura 27. Um feixe que incide na objetiva com diâmetro menor da que sua íris vai corresponder a um feixe focalizado com abertura menor do que a nominal.



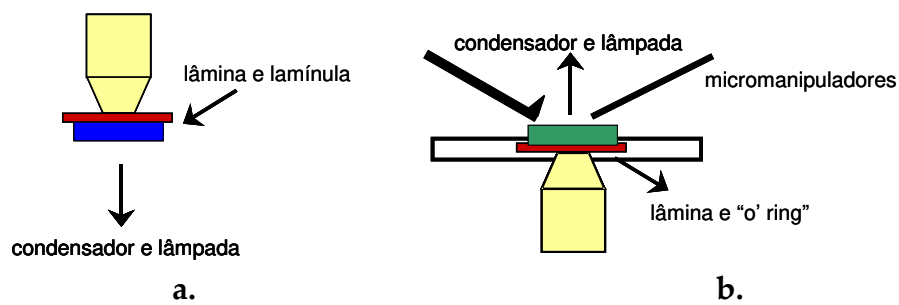
**Figura 27.** Falsa armadilha e o preenchimento da objetiva.

### 2.1.10 Microscópios Invertidos: Vantagens e Desvantagens

Um outro aspecto relevante na montagem de uma pinça óptica é se o microscópio é convencional “upright” ou invertido. Na Figura 28 a temos um esquema de um microscópio convencional, onde vemos que o laser entra por cima, passa primeiramente pela objetiva e depois incide sobre uma amostra que está



necessariamente delimitada por uma lamínula e uma lâmina, de forma que logo a seguir já está a plataforma. Ou seja, nesse caso só cabe uma lâmina de profundidade máxima em torno de 150  $\mu\text{m}$  entre a objetiva e a plataforma, lembrando que as distâncias de trabalho das objetivas usadas na pinça óptica são extremamente pequenas. Já na Figura 28 b, temos a ilustração de um microscópio invertido. Diferentemente do microscópio “upright”, agora o laser entra por baixo, encontra a objetiva e então incide sobre a amostra, tal que para podermos utilizar as objetivas de grande abertura numérica temos que inverter a lâmina para o laser passar primeiramente pela lamínula e depois pela lâmina respeitando assim os pequenos valores de distância de trabalho. A grande vantagem do microscópio invertido é o espaço considerável que há entre a lâmina e a lâmpada e condensadores, o qual nos propicia trabalhar com câmaras abertas que é bastante desejável para estudos com aplicações biológicas onde muitas vezes queremos estudar efeitos de determinadas substâncias ou também quando a experiência requer o uso micro-manipuladores. Assim, uma boa maneira de aproveitar esse recurso e que também nos livra da tarefa de inversão de lâmina, é trocar as câmaras convencionais por uma lamínula acoplada a um O’ring. Dessa forma podemos introduzir, em conjunto com a pinça óptica, substâncias e/ou instrumentos. O uso do “O’ring” ainda traz outra vantagem, como a amostra só está delimitada pela face da lamínula, os modelos de hidrodinâmica envolvidos nos experimentos são bem mais simples do que no caso anterior do microscópio convencional onde a amostra está delimitada por duas faces.



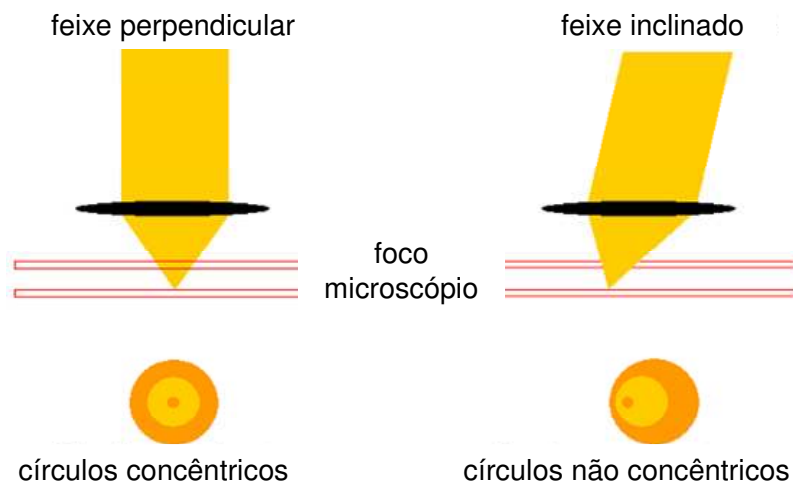
**Figura 28. a.** Microscópio convencional “upright”. **b.** Microscópio invertido.

### **2.1.11 O Alinhamento**

O procedimento que utilizamos para o alinhamento da pinça óptica no microscópio foi:

1. Em primeiro lugar garantir que o foco do laser caia no campo de visão do microscópio. Sem as duas lentes do telescópio, obriga-se o feixe do laser a incidir perpendicularmente na objetiva do microscópio, certificando-se de que ele está centralizado na mesma e a atravessa. Fazemos isso sem a objetiva e com um papel espalhador para ver o ponto central do laser bem no meio de onde seria o círculo da abertura da objetiva. Feito isso, colocamos a objetiva e procuramos visualizar o feixe na TV, começando com objetivas de pouco aumento para ampliar o campo de visão. As CCD's das câmeras de vídeo são fabricadas com detectores de silício capazes de detectar sinais até 1100 nm, logo seriam sensíveis ao 1064 nm do Nd:YAG. Entretanto, para não apresentarem artefatos que o olho humano não enxerga, elas incluem um filtro que só deixa passar o visível. Abrindo a câmera e retirando esse filtro pode-se visualizar a pequena parcela do infravermelho em 1064 nm refletida na lâmina e que vaza pelo espelho dielétrico, incapaz de danificar a CCD. Centralizamos o laser no campo de visão das objetivas de menor aumento, usualmente de 10X e passamos ao procedimento 2 de verticalizar a incidência do feixe do laser. Quando o mesmo estiver perpendicular veremos na TV um círculo concêntrico de laser simétrico que irá abrir e fechar uniformemente conforme movemos o parafuso de ajuste focal do microscópio – Figura 29.

2. Para garantir a verticalidade utilizamos um procedimento que converge movimentando-se alternadamente o espelho BS dentro do microscópio e o espelho M1 do esquema da Figura 1, de forma que o movimento de um compense o do outro até se visualizar o círculo perfeito na TV. O ponto central do círculo deve estar mais ou menos no centro da imagem, ou sairá do campo de visão quando usarmos objetivas de maiores aumentos.

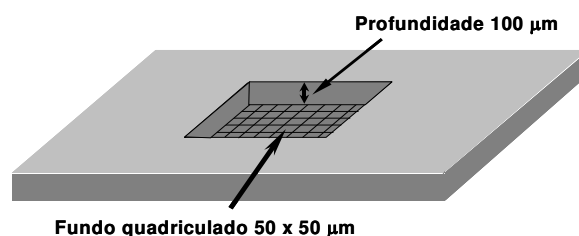


**Figura 29.** Esquema de alinhamento.

3. Nesse momento devemos introduzir o telescópio, ainda utilizando uma objetiva de 10X. Para centralizar o feixe ao longo dos eixos das várias lentes, primeiramente colocamos apenas a primeira delas que é normalmente montada sobre um sistema de translação XY. Essa lente tornará o laser divergente e mudará completamente a posição z do foco, que deve ser reencontrada. Agora, movendo apenas a lente que acabamos de introduzir no seu plano horizontal obrigamos o foco do laser a coincidir no mesmo ponto em que estava antes da lente ser colocada. Para isso, usamos a TV com um círculo desenhado na tela com uma caneta de retroprojeter. Repetimos então o processo de “verticalização”. Movimentando apenas a lente nos certificamos que o feixe, apesar de divergente, continua perpendicular formando círculos simétricos. Garantida que a primeira lente está centralizada, colocamos a segunda lente do telescópio, que deve ser montada em sistema de translação XYZ, para se poder variar a distância entre as duas lentes na direção z. Repetimos o procedimento anterior. Com o foco do laser bem próximo do centro da tela podemos passar para objetivas de maior aumento até chegar a de 100X.

4. Agora, o procedimento para colocar o foco do laser no plano de visão. Nesse ponto é bom usar uma câmara de Neubauer (Figura 30). Trata-se de um dispositivo utilizado para a contagem de glóbulos vermelhos do sangue e consiste em uma lâmina escavada com profundidade de 100  $\mu\text{m}$  cujo fundo é riscado com um quadriculado de 50 x 50  $\mu\text{m}$ .

A lamínula fecha essa “micro-piscina” por cima. Preparamos a câmara de Neubauer com água, fechamos com a lamínula e colocamos óleo de imersão sobre a mesma para usar a objetiva de 100X. Focalizamos a imagem até enxergar bem as ranhuras de 50  $\mu\text{m}$  da câmara de Neubauer, nos certificando assim que estamos no plano de visão do microscópio. Liberamos o laser. Já deve ser possível visualizar um círculo nesse estágio se as etapas anteriores foram bem feitas. Agora, movendo a segunda lente do telescópio apenas na direção z, devemos ver esse círculo abrindo e fechando, que nos permite encontrar a distância z para o menor ponto focal do laser no plano de visão. Feito isso voltamos ao procedimento da “verticalização” movendo a lente do telescópio nas direções XY até garantir a formação dos círculos concêntricos novamente. Nesse ponto, a captura ocorrerá bem próxima do plano de visão do microscópio.

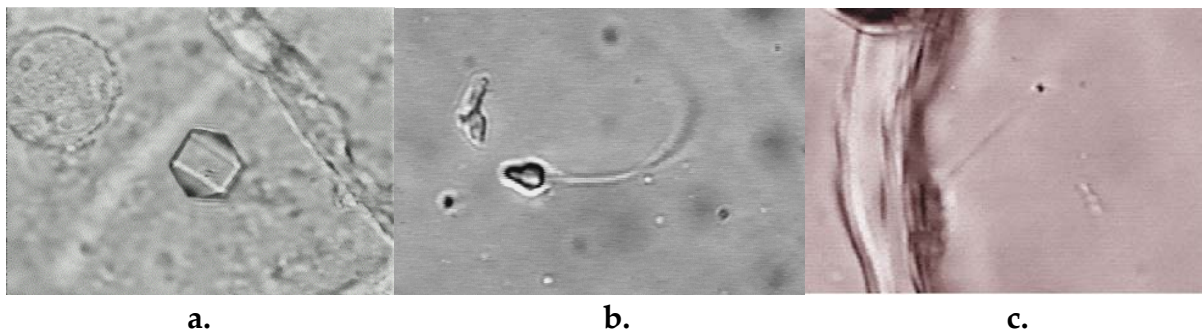


**Figura 30.** Ilustração da câmara de Neubauer.

5. A última etapa é feita com a captura de microesferas de poliestireno. Qualquer tinta branca de parede está cheia dessas microesferas. Diluímos bem essas microesferas em água e colocamos essa solução na câmara de Neubauer, usando a objetiva de 100X e ligando o laser de Nd:YAG. Se as etapas anteriores foram bem feitas, devemos ser capazes de visualizar esferinhas sendo capturadas no fundo da lâmina. Capturamos uma delas e a subimos movendo o foco do microscópio. Finalmente realizamos o ajuste fino do telescópio movendo-o na direção z até obter a microesfera bem focalizada. Nessa etapa o ponto de captura não precisa estar obrigatoriamente no centro da tela.

### **2.1.12 Resultados Obtidos com a Pinça Óptica Simples**

Abaixo estão algumas imagens de manipulação feitos em nosso laboratório com a pinça óptica simples.



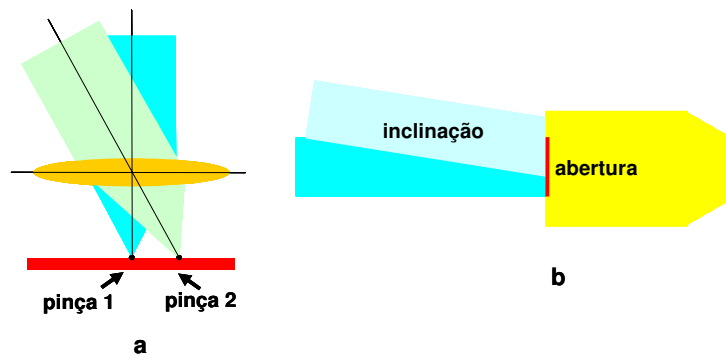
**Figura 31** a. Cristal de oxalato de cálcio de célula de cebola. b. Espermatozóide. c. Membrana esticada de célula de cebola.

## 2.2 A Pinça Óptica Dupla

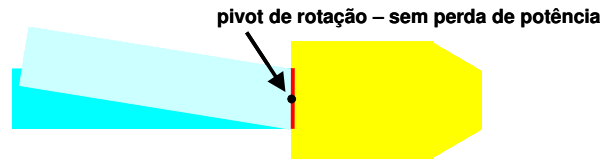
### 2.2.1 Motivação e Pontos Experimentais Relevantes

Normalmente, a maneira prática de transportar a partícula capturada de um local para o outro nas direções  $x$  e  $y$  é mantendo a pinça fixa e movimentando a plataforma ou platina, do microscópio. Isso porque mover a posição do feixe de pinça é muito mais complicado, podendo até desalinhar o sistema. Entretanto, para vários estudos, tais como adesão de partículas e medidas estáticas de elasticidades, é necessário usar dois ou mais pontos de captura e assegurar a capacidade de movimentá-los um em relação ao outro de forma independente. Inclinando o feixe de laser incidente podemos mover a posição de uma pinça em relação à outra conforme mostra a Figura 32 a. O problema com esse procedimento é que a inclinação do feixe que estava centralizado, o desalinha em relação à abertura da objetiva, esbarrando nos seus limites, perdendo potência e obtendo um feixe totalmente assimétrico, assim como apresenta a Figura 32 b. Essa perda de potência vai ocorrer sempre se a objetiva está completamente preenchida em um bom alinhamento da pinça óptica.

Para se resolver essa questão, é necessário defletir o feixe incidente de forma que sua rotação seja pivotada em torno do centro da abertura na entrada da objetiva, conforme mostra a Figura 33. Além disso, essa inclinação tem que ser realizada satisfazendo a captura no plano de visão e o preenchimento da objetiva. Finalmente, também é desejável controlar independentemente a potência de cada uma das pinças ópticas.

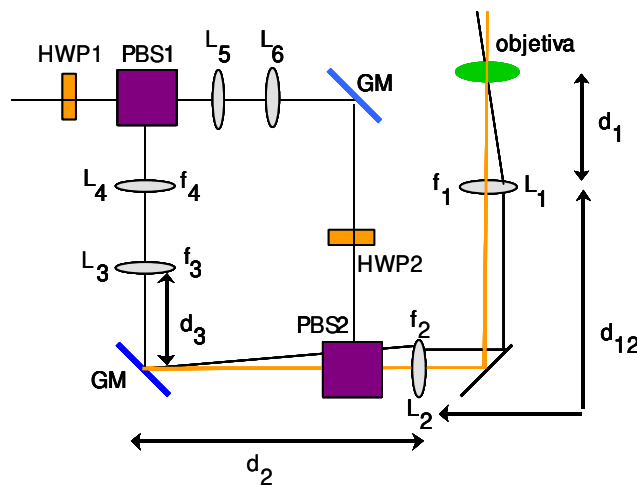


**Figura 32.** a. Movimento da pinça dupla. b. Inclinação do feixe na objetiva.



**Figura 33.** Ilustração da melhor forma de inclinar os feixes.

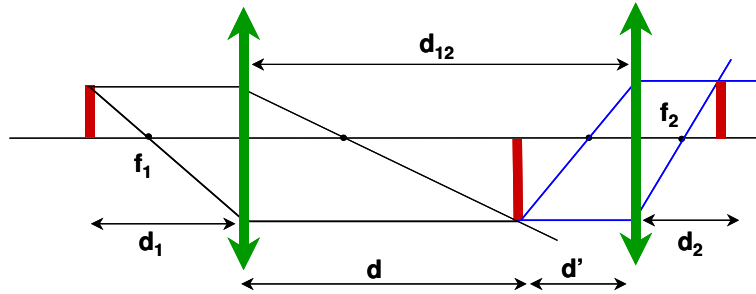
Para isso usamos a montagem esquematizada na Figura 34 abaixo. O laser é dividido por um “polarizer beam splitter” – PBS1 que transmite a parte do feixe polarizada paralelamente e reflete a polarizada perpendicularmente e que são recombinadas no segundo PBS2 de onde seguem colineares. Girando a polarização do laser incidente através da placa de meia onda HWP1, podemos controlar arbitrariamente a potência relativa dos dois feixes. Já a placa de meia onda HWP2 é usada como um atenuador para controlar a potência do braço no qual está. Com essas duas placas somos capazes então de controlar individualmente a potência em cada uma das pinças ópticas.



**Figura 34.** Esquema de montagem da pinça dupla.

Os espelhos GM são “gimbal mounts” produzidos para garantir que o centro do espelho seja o ponto de interseção dos eixos de rotação vertical e horizontal e são utilizados para inclinar o laser. Entretanto, é necessário transferir uma rotação do laser em torno do “gimbal mount” para uma rotação em torno do centro da objetiva. Para isso utilizamos um conjunto de 3 telescópios,  $L_1 + L_2$ ,  $L_3 + L_4$  e  $L_5 + L_6$  com distâncias focais  $f_i$ , tal que  $i = 1$  até 6. Os telescópios  $L_3 + L_4$  e  $L_5 + L_6$  são utilizados para o foco do laser estar no plano de visão e o  $L_1 + L_2$  para assegurar a rotação pivotada no centro da abertura da objetiva.

Para satisfazer todas essas condições utilizamos traçado de raios da óptica geométrica. Os pontos de rotação no “gimbal mount” e na abertura da objetiva devem ser pontos conjugados, ou seja, um é a imagem do outro. Para isso os suportes GM devem estar a uma distância  $d = d_1 + d_{12} + d_2$  dessa objetiva.



**Figura 35.** Diagrama de raios para as lentes  $L_1$  e  $L_2$ .

Usando a Figura 35 obtemos para a lente 1:

$$\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d} = \frac{1}{f_1} \rightarrow d = \frac{f_1 d_1}{d_1 - f_1} \text{ e } d' = \frac{-f_1 d_{12} - d_1(d_{12} - f_1)}{(d_1 - f_1)} \quad (2.6)$$

e para a lente 2:

$$\frac{1}{d_2} + \frac{1}{d'} = \frac{1}{f_2} \rightarrow d_2 = \frac{f_2 d'}{d' - f_2} \quad (2.7)$$

de onde tiramos que:

$$d_2 = \frac{-f_2 \frac{f_1 d_{12} - d_1(d_{12} - f_1)}{d_1 - f_1}}{-\frac{f_1 d_{12} - d_1(d_{12} - f_1)}{d_1 - f_1} - f_2} = \frac{f_2 [f_1 d_{12} - d_1(d_{12} - f_1)]}{f_1 d_{12} - d_1(d_{12} - f_1) + d_1 f_2 - f_1 f_2} \Rightarrow$$

$$d_2 = \frac{f_2 [f_1 d_{12} - d_1(d_{12} - f_1)]}{f_1(d_{12} - f_2) - d_1(d_{12} - f_1 - f_2)} \quad (2.8)$$

Substituindo agora  $d_{12}$ , temos:

$$d_2 = \frac{f_2}{f_1} (f_2 + f_1 - \frac{f_2}{f_1} d_1) \quad (2.9).$$

Usando semelhança de triângulos, podemos obter o tamanho do feixe  $r_2$  no suporte GM da Figura 36, onde consideramos as relações:

$$\frac{1}{f_3} = -\frac{1}{X'} + \frac{1}{d_3} \rightarrow X' = \frac{f_3 d_3}{(d_3 - f_3)} \quad (2.10),$$

$$\frac{r_1}{f_4} = \frac{r'}{d_{34} - X' - f_4} \rightarrow r' = \frac{r_1}{f_4} (d_{34} - X' - f_4) \rightarrow r' = \frac{r_1}{f_4 (d_3 - f_3)} [(d_{34} - f_4)((d_3 - f_3) - f_3 d_3)] \quad (2.11)$$

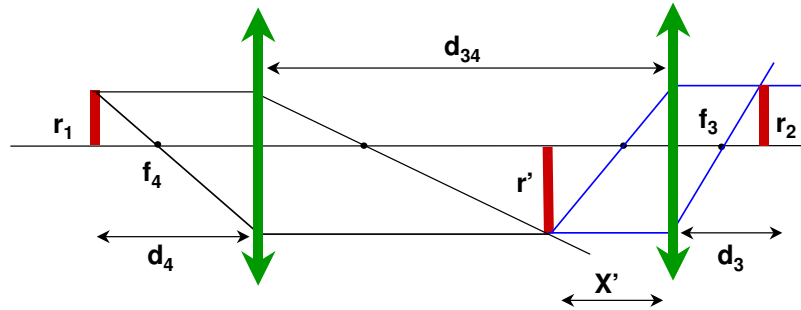
$$\frac{r_2}{(d_3 - f_3)} = \frac{r'}{f_3} \rightarrow r_2 = \frac{(d_3 - f_3)}{f_3} r' \quad (2.12)$$

e portanto,

$$r_2 = \frac{(d_3 - f_3)}{f_3 f_4 (d_3 - f_3)} [[(d_{34} - f_4)((d_3 - f_3) - f_3 d_3)] r_1 \rightarrow$$

$$r_2 = -\left( \frac{d_3}{f_4} - \frac{(d_{34} - f_4)(d_3 - f_3)}{f_4 f_3} \right) r_1 \quad (2.13),$$

sendo  $r_1$  o tamanho antes da lente  $f_4$  e  $d_{34} = f_3 + f_4$ .



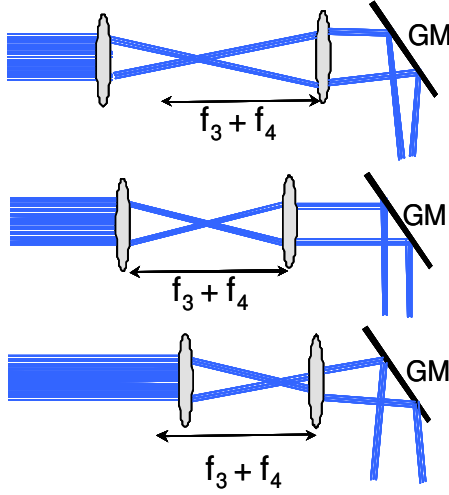
**Figura 36.** Diagrama de raios para as lentes  $L_3$  e  $L_4$ .

Se fizermos  $f_3 = d_3$ , temos:

$$r_2 = -\frac{f_3}{f_4} r_1 \quad (2.14)$$

e o tamanho do feixe  $r_2$  no GM é sempre o mesmo, independentemente da convergência ou divergência resultante da distância  $d_{34}$ , pois não é função da mesma, assim como mostra a Figura 37.





**Figura 37.** Telescópio relacionado ao tamanho do feixe.

Levando isso em consideração e o fato de que o GM e a abertura da objetiva são planos conjugados, temos que o tamanho final do feixe  $r_4$  na objetiva relacionado ao tamanho do feixe que entrou no sistema de lentes e espelhos é dado por:

$$r_4 = \left( \frac{f_1}{f_2} \right) \left( \frac{f_3}{f_4} \right) r_1 \quad (2.15)$$

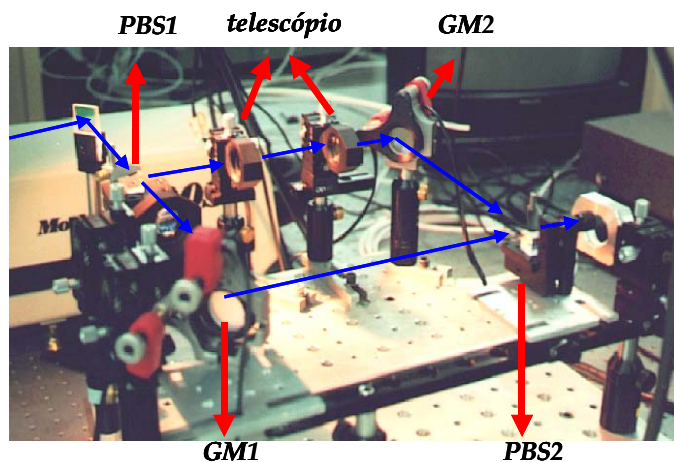
Por outro lado o tamanho do feixe no “gimbal mount”  $r_2$  está relacionado ao tamanho  $r_4$  na entrada da objetiva por  $r_4 = \left( \frac{f_1}{f_2} \right) r_2$ . Dessa forma, uma deflexão angular  $\theta_1$  no “gimbal mount” ocasionará uma deflexão do laser na entrada da objetiva de:  $\theta_2 = 2 \left( \frac{f_1}{f_2} \right) \theta_1$  e o deslocamento entre os focos será  $d = f_{obj} \theta_2$  onde  $f_{obj}$  é o foco da objetiva. Escolhendo as distâncias focais das diversas lentes podemos ampliar ou comprimir o movimento no microscópio.

Considerando-se as equações acima, garantimos a condição de preenchimento da objetiva, da rotação pivotada na sua abertura e do foco do laser no plano de visão, para obter uma pinça óptica dupla operando eficientemente.

### 2.2.2 O Sistema Experimental de Pinça Dupla

A Figura 38, apresenta uma foto do nosso sistema experimental de pinça dupla. Os valores escolhidos para os pares de telescópio  $\{(f_1, f_2), (f_3, f_4)\}$  foram respectivamente

30, 50, 2.5, 5 cm. As distâncias  $d_1$  e  $d_2$  foram 38 e 25 cm. Os feixes são movimentados pelo computador ou por joystick com atuadores piezoelétricos da NewFocus colocados em “gimbal mounts” da Newport e incidem na amostra através de uma objetiva de 100X e abertura numérica de 1.25. Uma mini-câmera CCD JVC faz parte do sistema e registra as imagens das partículas capturadas que podem ser estocadas e analisadas qualitativa e quantitativamente em VHS ou no computador. O microscópio “upright” Olympus está equipado com uma plataforma motorizada da Prior para movimentar a partícula capturada em x e y para aplicações com a pinça óptica simples e com um micrômetro com um rotator motorizado também da Prior para movimentos em z. Essa plataforma motorizada pode ser controlada via joystick ou via software.



**Figura 38.** Montagem da pinça óptica dupla.

### 2.2.3 O Alinhamento

Para alinhar a pinça dupla adotamos os seguintes procedimentos:

1. Sem qualquer lente e placas de meia-onda e com o auxílio de um visor ou um cartão sensível ao infravermelho, dividimos, recombinaos e direcionamos o feixe infravermelho até o microscópio, assegurando a perpendicularidade de ambos os feixes. Isso é feito para cada feixe separadamente, respeitando-se as distâncias calculadas nos itens anteriores. Para o primeiro feixe a perpendicularidade é garantida através de um espelho M1 fora do microscópio e M2 (BS) interior ao microscópio, assim como na pinça

óptica simples. Com o “gimbal mount” GM2 e o BPS2 obrigamos os dois feixes a serem colineares se certificando da perpendicularidade do segundo feixe.

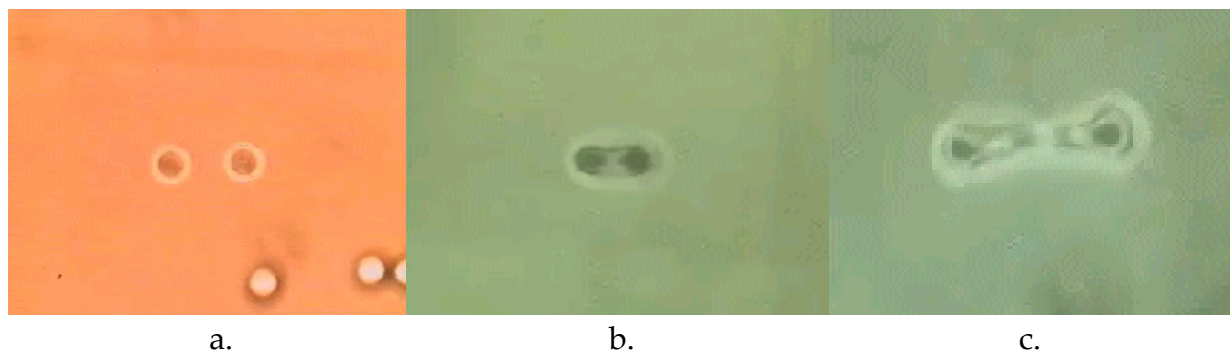
2. As lentes  $f_1$  e  $f_2$  são colocadas uma de cada vez de forma que o círculos voltem a ser obtidos no mesmo ponto da TV e a abrir e fechar uniformemente. Para isso só devemos utilizar os atuadores das lentes.

3. Finalmente, introduzimos os telescópios  $L_3 + L_4$  e  $L_5 + L_6$  de cada braço repetindo o alinhamento da pinça simples para cada um deles separadamente até que as respectivas pinças se encontrarem no plano de visão.

Dessa forma, fomos capazes de capturar duas microesferas e movimentá-las por todo o campo de visão no aumento de 100X. Também conferimos se a potência transmitida se mantinha constante quando se movimentava a posição da pinça óptica dupla.

#### 2.2.4 Resultados Obtidos com a Pinça Óptica Dupla

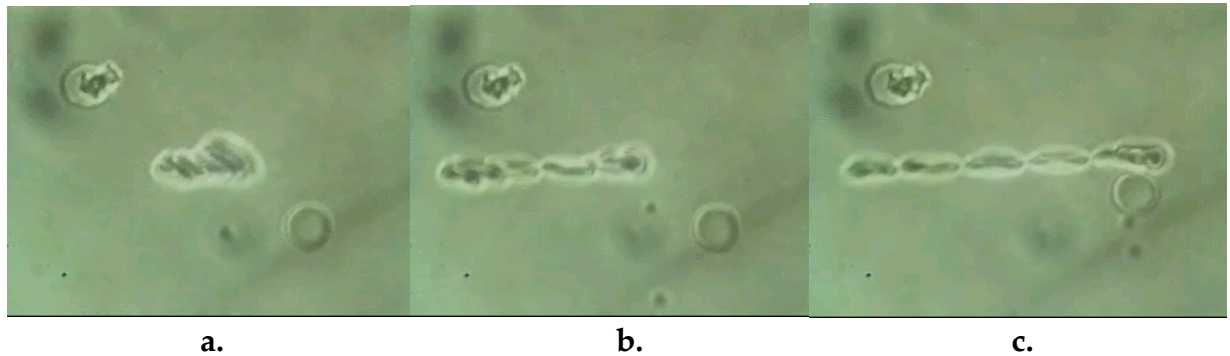
Abaixo estão algumas imagens obtidas em nosso laboratório de manipulação com pinça óptica duplas.



**Figura 39** **a.** Duas esferas capturadas, cada uma por uma pinça óptica. **b.** Hemácia sendo esticada pela pinça dupla. **c.** Hemácias sendo desconectadas pela pinça dupla.

Um resultado interessante foi o comportamento da adesão de hemácias entre si mostrado na Figura 40. Nesse experimento capturamos um aglomerado de hemácias, chamado “rouleaux” na área de hematologia, mantendo a pinça óptica da direita fixa enquanto se afastava a pinça da esquerda para forçar a separação das hemácias. Da figura, percebe-se que as hemácias deslizam facilmente umas sobre as outras, mas se

ligam fortemente pelas bordas. Esse é um problema interessante do ponto de vista biológico. Primeiro porque não se deseja que ocorra a adesão das hemácias com a formação de coágulos, e depois porque quase todos os mecanismos de infecção de células por parasitas e vírus se iniciam por um processo de adesão.



**Figura 40** a. “rouleaux” de hemácias. b. deslizando entre si. c. adesão forte nas bordas.

Esse sistema de pinça dupla abriu perspectivas para inúmeras novas aplicações que ainda não tivemos tempo de explorar completamente. Entre essas se encontram as medidas de adesão em hemácias e outros sistemas biológicos e estudos de quimiotaxia.

### **2.3 Sistemas Experimentais para a Calibração da força da Pinça Óptica e Aplicações com Leishmanias e Hemácias**

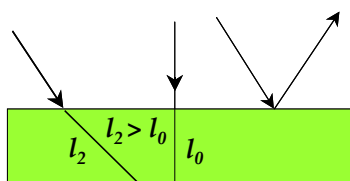
Usamos um sistema experimental de pinça óptica simples para realizar uma calibração da pinça óptica e também para estudar hemácias e leishmanias. A calibração da força pinça óptica é feita arrastando a partícula em um fluido com várias velocidades e comparando as forças óptica e hidrodinâmica que devem se anular no equilíbrio.

O experimento consiste na medida do deslocamento do centro da microesfera em relação à sua posição de equilíbrio na ausência e na presença do campo de velocidades hidrodinâmico. Para isso foi necessário imprimir uma velocidade conhecida e calibrada ao estágio de translação da Prior que nos permite atingir controladamente velocidades tão pequenas quanto  $10 \mu\text{m/s}$ . O experimento foi repetido para diferentes profundidades  $z$  e com fluidos de diferentes viscosidades. Para controlar a translação construímos um programa na linguagem LabView da National Instruments, que foi

desenvolvido especialmente para facilitar a interface computador/equipamentos usando portas paralelas e seriais. Os códigos são escritos graficamente como se fossem um diagrama de fluxo em que apenas conectamos os blocos da maneira desejada, como mostram as figuras do apêndice 2. Geralmente partimos dos exemplos que acompanham o próprio software para modificá-los de acordo com as nossas necessidades.

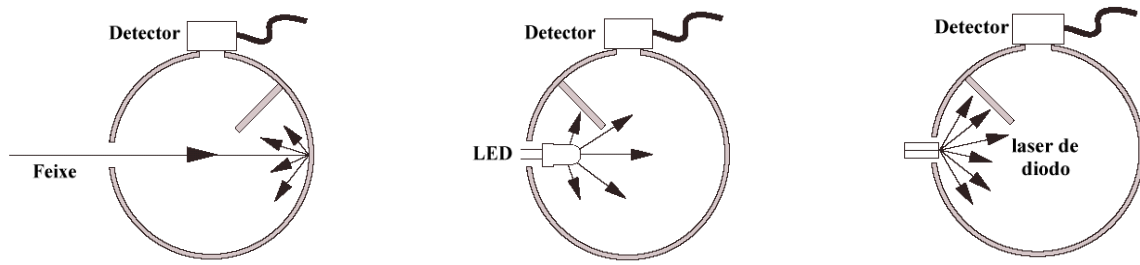
As imagens obtidas foram gravadas em vídeo ao mesmo tempo em que foram digitalizadas usando a placa de captura de imagens da Pinnacle System e analisadas pelo software Image Pro-Plus da Media Cybernetic.

Um dos fatores mais importantes para a obtenção de uma calibração precisa da força da pinça óptica é a medida correta da potência. O problema de utilizar um medidor de potência convencional é que ele fornece a leitura errada se o feixe incidente não for paralelo. Conforme a Figura 41, isso pode ocorrer por dois motivos: diferença de caminho óptico e reflexão externa total. Porém, o feixe da pinça óptica é obrigatoriamente altamente convergente.



**Figura 41.** Detector de potência convencional e a inclinação dos raios.

Para solucionar esse problema optamos pelo uso de uma esfera integradora capaz de realizar uma medida proporcional de todos os raios incidentes independentemente de seus ângulos. A idéia da esfera integradora é a de espalhar completamente os raios incidentes tornando a iluminação de um detector uniforme, assim como mostra a Figura 42. Ela opera da seguinte forma: a luz é coletada por uma de suas portas e é refletida e espalhada no seu interior de forma que a luz que sai por uma das outras portas, na qual é detectada, embora menos intensa, é uniforme. O anteparo da figura é utilizado para evitar que os raios incidam diretamente no detector.



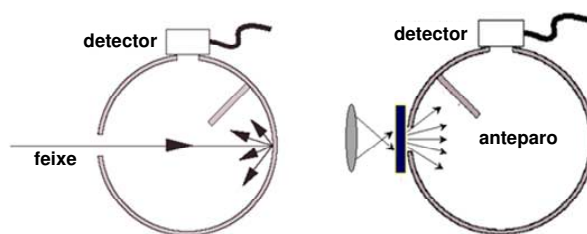
**Figura 42.** Esfera integradora e algumas de suas aplicações.

Os materiais usados no interior da esfera integradora, comumente spectralon, spectraflect, duraflect e infragold, são altamente refletores e espalhadores. Para a medida da grandeza de interesse, seja ela, a potência, o fluxo, a intensidade ou a irradiância, há a necessidade de se fazer uma calibração, determinando a refletância da esfera integradora com uma fonte conhecida. A relação entre as potências de entrada e saída é:

$$\frac{P_e}{P_a} = \frac{\rho A_e / A_s}{(1 - \rho (1 - A_p / A_s))} \quad (2.16),$$

onde  $P_e$  é a potência na porta de saída,  $P_a$  é a potência incidente,  $A_e$  é a área da porta de saída,  $A_s$  é a área da esfera integradora,  $A_p$  é a área das somas das portas e  $\rho$  é a refletância.

No nosso caso, não há a necessidade da calibração, pois desejamos apenas determinar o quanto se perde da potência incidente na objetiva e na lamínula. Dessa forma, basta realizar uma medida comparativa, entre a potência do feixe de laser paralelo e do feixe convergente sem modificar a geometria da esfera integradora. Os esquemas do posicionamento da esfera integradora para as medidas de feixes paralelos e convergentes são mostrados na Figura 43. Com essa razão e a medida da potência do feixe paralelo, agora determinada com precisão, obtemos a potência total transmitida pela pinça óptica, incluindo as perdas da objetiva, tanto na sua abertura quanto nas reflexões, e considerando o óleo de imersão e a lamínula.



**Figura 43.** Configuração de medida da potência para feixes paralelos e convergentes.

Para isso usamos uma esfera integradora Labsphere de spectralon que tem mais de 95% de refletância para comprimentos de onda de 250 a 2500 nm e com 2.5 cm de raio.

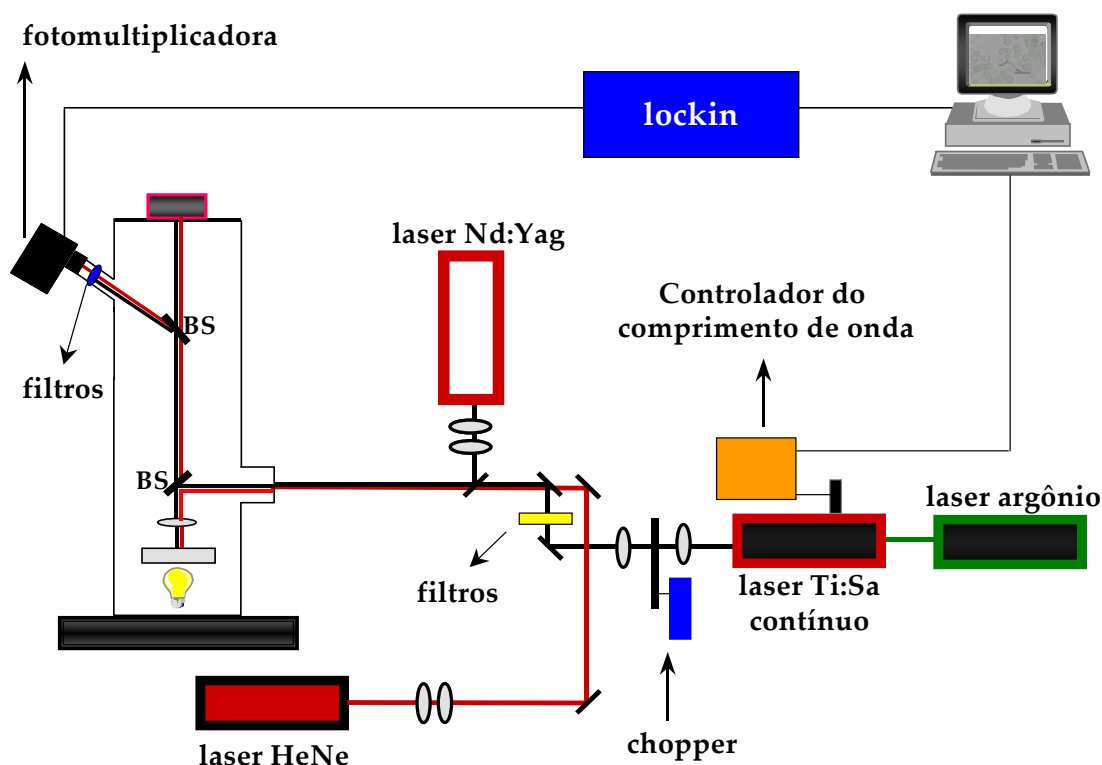
## 2.4 Sistema Experimental de Espectroscopia de Força e Medida da Força Óptica em Função do Deslocamento Centro-Foco e da Polarização

O objetivo desse experimento foi caracterizar quantitativamente, dentro de um modelo mais sofisticado do que a óptica geométrica, a força óptica em uma microesfera capturada na pinça óptica em função do comprimento de onda, da polarização e da distância do foco do laser ao centro da microesfera. Como a pinça óptica pode ser é um instrumento muito sensível para medidas de forças decidimos utilizá-la para caracterizar a sua própria força óptica. Para tanto sempre utilizamos dois lasers, um para manter a microesfera fixa em determinada posição e o outro, de potência bem menor e modulado por um chopper mecânico, para perturbar essa partícula e estudar sua ação em função dos parâmetros desejados. Os dois lasers que utilizamos nessa montagem foram Nd:YAG e o Ti:Safira cw.

Para estudar a força óptica em função do comprimento de onda e polarização usamos o laser de Nd:YAG para fixar a microesfera, e o de Ti:Safira sintonizável, para causar a perturbação conforme mostra o esquema da Figura 44. Neste caso o laser de Ti:Safira é modulado por um chopper mecânico e o monitoramento do movimento da microesfera é realizado através da luz de um laser de HeNe cujo espalhamento é modulado pelo movimento da microesfera. Essa luz espalhada é detectada pela fotomultiplicadora e filtrada eletronicamente pelo amplificador lock-in para medir

apenas sinais com a mesma frequência de modulação do chopper. Para varrer o comprimento de onda foi necessário construir um sistema para sintonizar o laser de Ti:Safira tanto do ponto de vista mecânico quanto de software. Usando um espelho dicróico juntamos os dois feixes de laser enviados para o microscópio.

Por outro lado, para caracterizar a força em função da posição do foco e polarização invertemos, usando o Ti:Safira para fixar a microesfera e o Nd:YAG para perturbá-la, assim como ilustra o esquema da Figura 45. Agora o laser de Nd:YAG é quem está sendo modulado pelo chopper mecânico. Para esse experimento foi fundamental o movimento controlado por computador do foco do laser de Nd:YAG permitido pela montagem da pinça dupla. Dessa forma obtivemos os resultados discutidos no capítulo 3.

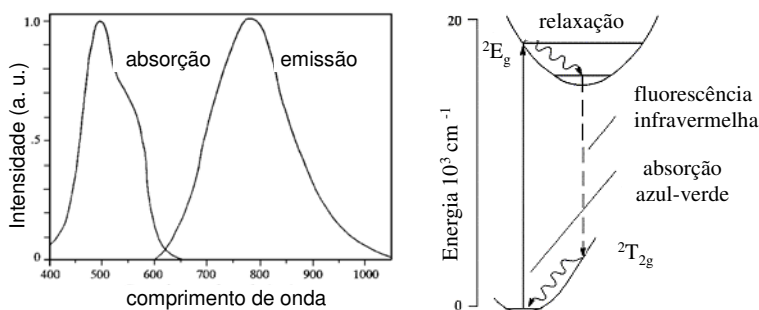


**Figura 44.** Sistema de observação dos modos de ressonância de Mie com pinças ópticas.





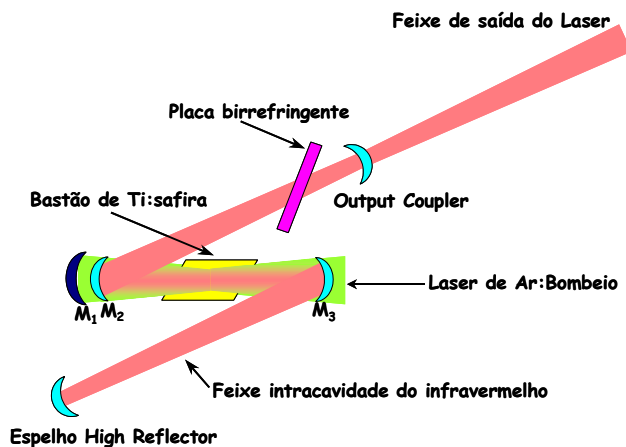
O principal componente de um laser de Ti:Safira é o íon  $\text{Ti}^{3+}$  embebido em um cristal de Safira ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), caracterizado por uma banda larga de luminescência, uma estrutura de níveis simples e uma seção de choque de ganho relativamente alta, assim como mostra a Figura 46. A estrutura eletrônica do  $\text{Ti}^{3+}$  envolve uma camada fechada mais um elétron 3d. Os níveis 3d têm sua degenerescência levantada pelo campo cristalino do cristal hospedeiro. Dessa forma o estado excitado  ${}^2E_0$  é duplamente degenerado com uma energia da ordem de  $19000\text{ cm}^{-1}$  ( $1000\text{ cm}^{-1} = 124\text{ meV}$ ), enquanto o nível fundamental é composto de três estados  ${}^2T_2$  quase degenerados, sendo um o estado fundamental e os outros dois separados por energias de  $38\text{ cm}^{-1}$  e  $107\text{ cm}^{-1}$ . A transição laser ocorre entre o estado  ${}^2E_0$  e o estado  ${}^2T_2$  de energia mais alta ( $107\text{ cm}^{-1}$ ), indicando que devemos resfriar o cristal para evitar popular termicamente o nível laser inferior (lembrando que para  $T = 300\text{K}$ ,  $kBT = 208\text{ cm}^{-1}$ ) e diminuir a eficiência do laser. A curva de absorção se estende por aproximadamente 250 nm com o máximo em torno de 500 nm. Assim, o laser de argônio operando continuamente e em todas as linhas do visível é a escolha mais usada para bombear o laser de Ti:Safira. Na Figura 46 também mostramos os espectros de absorção e o de emissão, que tem uma largura à meia altura de quase 200 nm, com um pico em torno de 780 nm; ou seja, o laser de Ti:Safira é um laser sintonizável. Por isso, o utilizamos em sua forma cw para os experimentos de ressonância de Mie cujos resultados estão no capítulo 3.



**Figura 46.** Espectros de absorção e emissão e esquema de níveis do Ti:Safira.

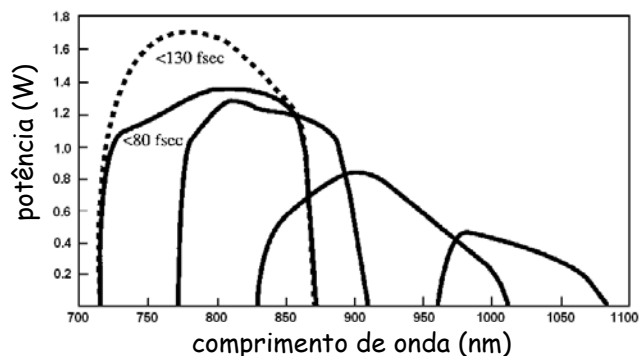
A Figura 47 apresenta um esquema da cavidade do laser de Ti:Safira. O laser de Argônio é focalizado no bastão de Ti:Safira através do espelho M1 e atravessa o espelho dicróico M2, criando o feixe focalizado de cor verde no bastão de Ti:Safira. O feixe no

infravermelho é completamente refletido pelos espelhos M2 e M3 para o espelho HR (“High Reflector”) e o OC (“Output Coupler”). Só haverá ganho nas regiões com alta intensidade do laser de bombeio no bastão. Por isso é tão importante o casamento de modos entre o laser de bombeio e do infravermelho. Os espelhos HR e OC têm seu foco um no outro, formando a cavidade estável. O OC transmite 10% da luz intracavidade.



**Figura 47.** Esquema da cavidade do laser de Ti:Safira.

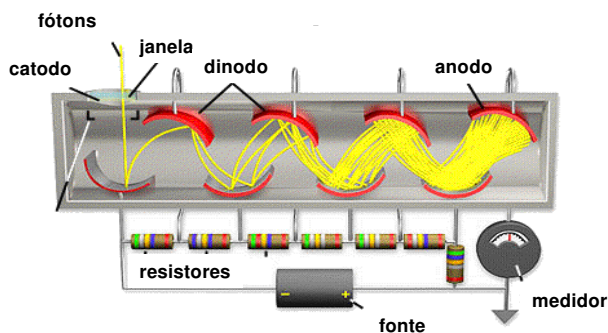
A placa birrefringente do esquema faz o papel do elemento de sintonia da cavidade, modulando as perdas por reflexão. Existem 4 superfícies intracavidade colocadas em ângulo de Brewster para a polarização  $p$ , 2 superfícies para a placa birrefringente e 2 para o bastão de Ti:Safira, significando que as perdas para a polarização  $s$  serão apreciáveis. Uma placa birrefringente muda o estado de polarização da luz incidente de linearmente polarizada,  $p$ , para elíptica, circular e até polarizada perpendicularmente,  $s$ , dependendo do seu ângulo de rotação, do comprimento de onda da luz incidente e de sua espessura. Não há qualquer perda extra para o comprimento de onda que não muda a polarização linear de incidência, enquanto os outros comprimentos de onda sofrerão as perdas de reflexão. Dessa forma, o laser é obrigado a operar em torno do comprimento de onda de menor perda. A sintonia é obtida através da rotação dessa placa birrefringente. A curva de sintonia para diferentes conjuntos de óptica não consta no manual do laser mas é similar a Figura 48 que é referente laser Ti:Safira pulsado - Tsunami.



**Figura 48.** Curva de sintonia do Ti:Safira.

#### 2.4.1.B Fotomultiplicadora

Na fotomultiplicadora o primeiro elétron é emitido através do efeito fotoelétrico e dá origem a uma emissão em cascata e amplificada através da colisão com placas polarizadas contra as quais foi acelerado como mostra a Figura 49. A emissão do elétron fotoexcitado requer uma energia mínima para ultrapassar a função trabalho da superfície dos metais e a resposta espectral das fotomultiplicadoras tende a ser nula na região do infravermelho. Tratamentos da interface como GaAs podem ampliar a região de resposta espectral, até pouco tempo limitada em torno de 900-1000 nm.



**Figura 49.** Configuração de uma fotomultiplicadora.

O fator de amplificação depende da voltagem de polarização utilizada, que foi mantida, no nosso caso até o valor de 600 V, uma vez que a intensidade era bastante alta. As fotomultiplicadoras são muito sensíveis sendo importante evitar excesso de luz nas mesmas que podem danificá-las por excesso de corrente. Nós fizemos as medidas com uma fotomultiplicadora Hamamatsu R282, com tempos de resposta da ordem de ns e resposta espectral entre 185-700 nm conforme podemos ver na Figura 50.

Alimentamos a fotomultiplicadora com uma fonte de tensão da Products for Reserch Inc.

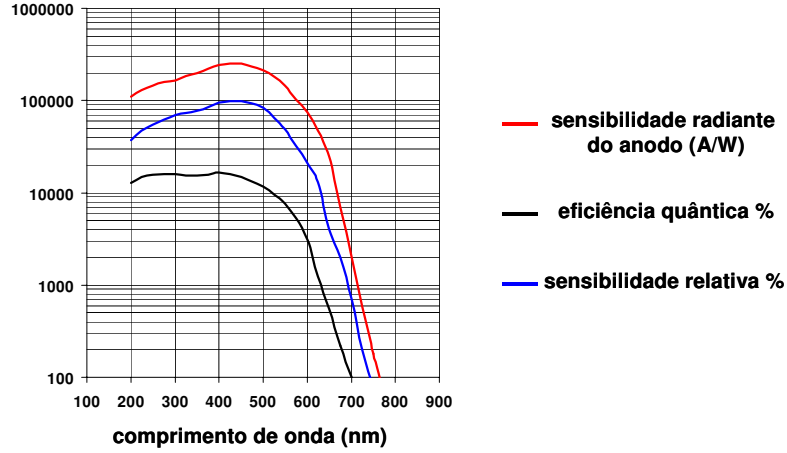


Figura 50. Resposta espectral da fotomultiplicadora.

#### 2.4.1.C Amplificador Lock-in

A idéia do amplificador lock-in é amplificar apenas o sinal de entrada de mesma frequência que um sinal de referência. Para tanto ele faz a seguinte operação com o sinal:

$$S_{saída} = \int_0^{\tau} S_{entrada}(t) \sin(\omega_{ref}t + \phi) dt \quad (2.17).$$

O sinal de entrada pode ser decomposto nas suas frequências por uma transformada seno de Fourier, por exemplo,  $S_{entrada} = \int_0^{\infty} S(\omega) \sin(\omega t) d\omega$  (2.18).

E assim obtemos:  $S_{saída} = \int_0^{\infty} S(\omega) \left[ \int_0^{\tau} \sin(\omega t) \sin(\omega_{ref}t + \phi) dt \right] d\omega$  (2.19). A integral em  $\tau$  é elementar resultando em:

$$\begin{aligned} \int_0^{\tau} \sin(\omega t) \sin(\omega_r t + \phi) dt &= \frac{1}{2} \int_0^{\tau} \cos[(\omega - \omega_r)t + \phi] dt - \frac{1}{2} \int_0^{\tau} \cos[(\omega + \omega_r)t + \phi] dt \\ &= \frac{1}{2} \frac{\sin[(\omega - \omega_r)\tau + \phi]}{(\omega - \omega_r)} - \frac{1}{2} \frac{\sin[(\omega + \omega_r)\tau + \phi]}{(\omega + \omega_r)} \cong \frac{1}{2} \frac{\sin[(\omega - \omega_r)\tau + \phi]}{(\omega - \omega_r)} \end{aligned} \quad (2.20)$$

para  $\omega_r$  grande. O termo  $\sin[(\omega - \omega_r)\tau + \phi]/2(\omega - \omega_r)$  funciona como um filtro vetorial de frequência tendendo à função delta de Dirac para  $\tau$  tendendo à infinito. Nesse caso, o sinal de saída é dado por  $S_{saída} = S(\omega_{ref}) \sin(\phi)$ , ou seja, o lock-in mede a

intensidade e a fase da componente na frequência de referência do sinal. O tempo de integração  $\tau$  pode ser escrito em função da quantidade de ciclos da frequência de referência,  $\tau = n \cdot 2\pi / \omega_0$ , então  $\Delta\omega = 2\pi / \tau = \omega_0 / n$  é largura de banda que o lock-in deixa passar. A regra prática aqui é usar  $n$  em torno de 10. Desta forma, quanto maior o tempo de integração utilizado, mais se filtram as frequências indesejadas. Por outro lado, esse tempo de integração define o tempo mínimo sem variações no sinal necessário para a filtragem do ruído, definindo o tempo total de uma varredura. Outra regra prática utilizada é que cada passo para a aquisição de um sinal demore um tempo igual ao tempo de integração. Isso significa que o tempo de varredura para obter 600 pontos com tempo de integração de 1 s é de 600 s, ou 10 min.

No nosso caso, por exemplo, o laser de Ti:Safira é o laser modulado pelo chopper mecânico de onde sai o sinal de referência para o lock-in. O laser de Ti:Safira obriga a partícula a se mover nessa mesma frequência modulando o espalhamento da luz do laser de HeNe. A fotomultiplicadora só detecta a luz espalhada do laser de HeNe, modulada e não modulada, pois utilizamos um filtro que corta o laser de Ti:Safira e o Nd:YAG. O lock-in então finalmente filtra apenas a componente da luz espalhada modulada na frequência de referência, ou seja, a variação do espalhamento gerada pelo movimento da microesfera.

Utilizamos o lock-in SR830 da Stanford Research System com o sinal de referência modulado em 12 Hz e tempo de integração de 1 s no experimento de espectroscopia de força. Na medida da força em função da posição aumentamos a frequência de modulação para 80 Hz mas deixamos o tempo de integração em 1 s.

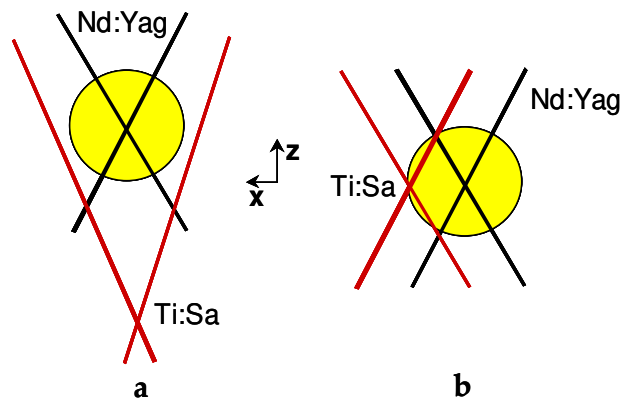
#### **2.4.2 Detalhes Experimentais da Aplicação de Espectroscopia de Força**

Observamos os modos de ressonância de Mie, ou “Morphology Dependent Resonances” (MDR), em microesferas de poliestireno de 9  $\mu\text{m}$  diluídas em água colocadas em uma câmara de Neubauer. Para garantir que o laser de Ti:Safira representasse apenas uma perturbação usamos filtros de densidade neutra para atenuá-

lo até potências 10 vezes menores do que a do laser da pinça óptica. O programa para varrer o comprimento de onda do laser de Ti:Safira e fazer a aquisição do sinal foi escrito em LabView, com entradas para as variáveis de controle tais como tamanho do passo, tempo de espera entre medidas sucessivas e média entre as medidas. O comprimento de onda do laser é ajustado através de um motor de passo de rotação colocado no micrômetro que controla uma placa birrefringente no interior da cavidade do laser. A relação entre o comprimento de onda e o passo do motor é calibrada através de uma CCD e um monocromador.

Nós observamos os espectros de força MDR em 4 situações distintas que podemos classificar em dois grupos:

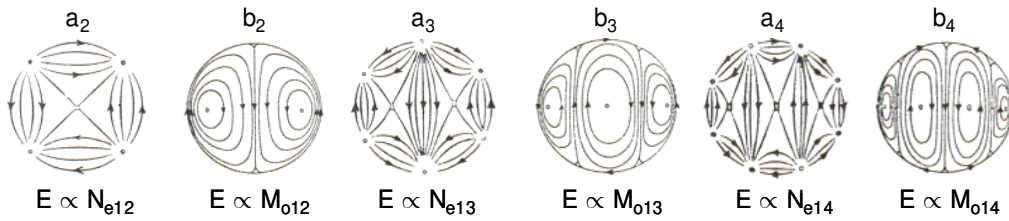
1. Feixe de Ti:Safira incidindo como uma onda plana. Para isso movimentamos a distância entre as lentes do telescópio do Ti:Safira até que seu foco estivesse muito distante do foco do laser de Nd:YAG. Com esse deslocamento, o raio do Ti:Safira se tornou da ordem de 40% maior do que o raio da microesfera no plano horizontal de seu centro, conforme mostra a Figura 51 a. Nessa situação, por simetria, o movimento da microesfera se dá no direção vertical,  $z$ .



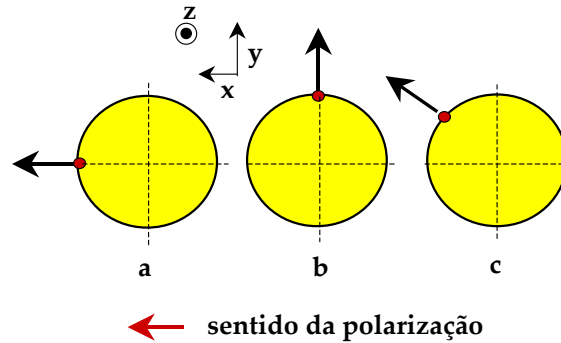
**Figura 51.** Posição do feixe de Nd:YAG e Ti:Safira incidindo como uma onda plana **a.** e focalizado **b.** para as medidas de modos MDR. Onde  $z$  é a direção de propagação.

2. Feixe de Ti:Safira como pinça óptica incidindo lateralmente. Nesse caso fizemos os focos do laser de Nd:YAG e de Ti:Safira coincidirem no centro da microesfera até que não existisse qualquer modulação da luz espalhada. Usando o atuador de uma das lentes movimentamos o feixe de Ti:Safira até a borda da microesfera assim como ilustra a

Figura 51 b. Esse é um ponto crítico da medida, não se observam os modos em qualquer posição da borda, pois os modos de uma microcavidade possuem mínimos e máximos na superfície, como ilustrado na Figura 52. É necessário acertar um máximo do modo. O procedimento experimental utilizado foi mover a posição do laser de Ti:Safira até observar um forte espalhamento no lado oposto, indicando que a luz acoplada na microcavidade deu a volta sobre a mesma. Essas medidas foram feitas nas direções x, y e a 45° entre x e y, sendo x o eixo definido pela polarização do laser de Ti:Safira, conforme mostra a Figura 53. As 3 medidas foram feitas na mesma microesfera.



**Figura 52.** Modos de Mie no interior de uma esfera.



**Figura 53.** Posição do feixe focalizado de Ti:Safira para as medidas de modos MDR. Figura representando o plano do microscópio, vista da posição z de incidência do feixe. **a.** polarizado paralelamente ao movimento da partícula. **b.** polarizado perpendicularmente ao movimento da partícula. **c.** polarizado a 45° em relação o movimento da partícula. O ponto vermelho representa o laser de Ti:Safira.

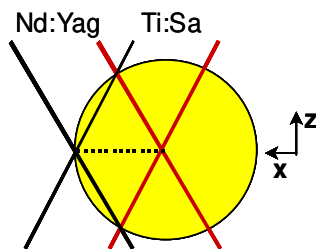
### 2.4.3 Detalhes Experimentais da Medida de Força Óptica em Função do Deslocamento Centro-Foco e da Polarização

O movimento de cada um dos feixes de Nd:YAG e conseqüentemente o movimento da partícula é feito através dos atuadores piezoelétricos das montagens de “gimbal mount”. Nesse caso, como já mencionado, a pinça dupla do Nd:YAG foi usada para perturbar a posição da microesfera capturada pelo laser de Ti:Safira. Garantimos



que as potências dos dois braços fossem as mesmas utilizando as placas de meia onda para dividir a potência. A seguir obrigamos que todos os feixes de lasers, o Ti:Safira e os dois braços da pinça dupla do Nd:YAG, capturassem a partícula na mesma posição  $x$ ,  $y$  e  $z$ , movimentando-os até não mais observar qualquer modulação da microesfera. Nesse ponto atenuamos igualmente os dois braços do Nd:YAG através de um filtro de densidade neutra após o PBS2, tornando-os apenas uma perturbação frente ao Ti:Safira, da mesma forma que na experiência de espectroscopia de força.

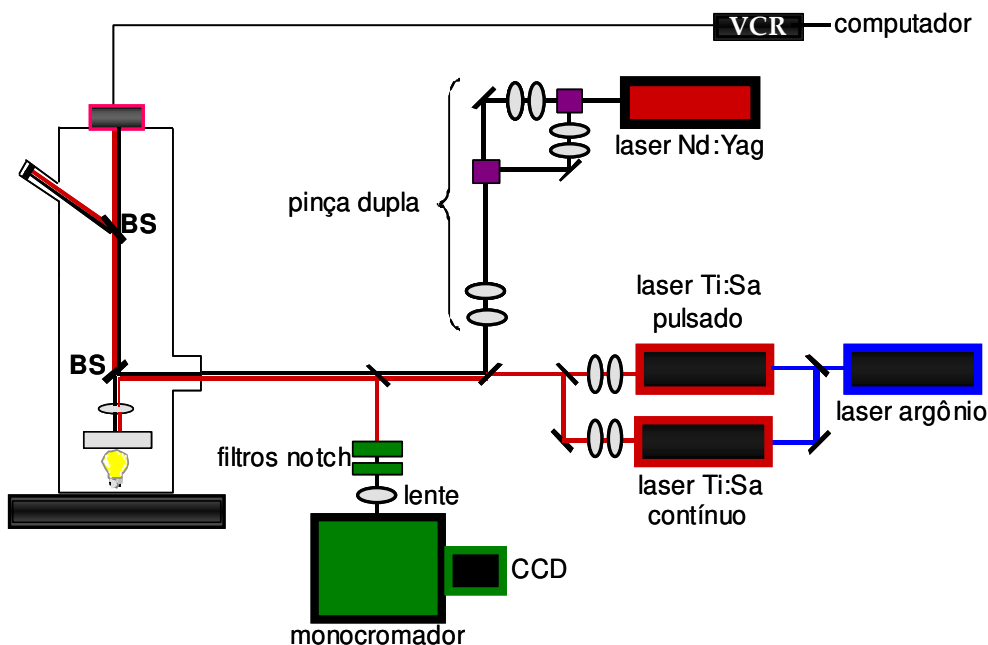
Bloqueamos um dos feixes da pinça dupla e movimentamos a posição do outro no microscópio através de um software de controle do atuador usando LabView para fazer a aquisição de sinal modulado no lock-in versus distância do Nd:YAG ao centro da microesfera, assim como podemos ver na Figura 54. Repetimos a medida trocando os braços bloqueados e desbloqueado. Nesses dois casos estamos medindo deslocamentos diferentes, com o movimento horizontal da partícula paralelo ou perpendicular à polarização do laser de Nd:YAG. A varredura foi feita desde zero até  $6\text{ }\mu\text{m}$ , para certificar que não houvesse mais luz atingindo a partícula, com passo de  $0.1\text{ }\mu\text{m}$ , para a microesfera de  $4.5\text{ }\mu\text{m}$  de raio. O manual dos atuadores piezoelétricos da NewFocus afirma que os mesmos apresentam um erro aleatório de 10 % no seu posicionamento. Adquirimos esses atuadores apenas para controlar a posição das duas pinças da pinça dupla de forma monitorada, de modo que esse erro não significava qualquer problema. A precisão dessa medida, entretanto, teria sido bem mais alta se dispuséssemos de um estágio de rotação mais preciso. Apesar disso os resultados foram muito claros e a concordância teoria–resultados experimentais foi boa, conforme se verá no capítulo 3.



**Figura 54.** Configuração da movimentação dos feixes de Nd:YAG para a medida da intensidade em função do deslocamento centro-foco.

## 2.5 Sistema Experimental de Pinça Óptica com Espectroscopias Confocais

Finalmente, a última montagem experimental foi a da incorporação de espectroscopias linear e não linear à pinça óptica. Essa montagem na realidade se inicia em 1999 com obras civis para trazer o laboratório de pinça óptica para um espaço vizinho ao laboratório onde tínhamos o sistema de lasers de pulsos curtos operacional e com a aquisição de duas mesas ópticas extras para acoplamento com as duas já existentes deixando todos os lasers e microscópios em uma única mesa óptica. Isso significou um bom investimento de tempo e trabalho, mas nos permitiu acoplar os diferentes lasers à pinça óptica assim como a incorporação de espectroscopias. Desde 1998, após um estudo na literatura utilizado como exame de qualificação, decidimos incorporar duas técnicas espectroscópicas à pinça óptica: luminescência excitada por absorção de dois fótons, usando o laser de Ti:Safira de femtosegundos de nosso laboratório, e micro Raman, usando laser de Ti:Safira cw. Entretanto, só no final de 2002 tivemos condições técnicas de completar esse projeto. Basicamente nos faltava o conjunto monocromador, CCD e filtros super NOTCH plus para implementar essas idéias. A montagem final está mostrada no esquema da Figura 55.



**Figura 55.** Sistema Experimental de Espectroscopias Raman, Mutifotônica, Hiper Raman e Hiper Rayleigh acopladas à pinça óptica.

O laser de Nd:YAG continua a fazer o papel da pinça óptica, simples ou dupla, enquanto o laser de argônio pode bombear ou o laser de Ti:Safira cw, para espectroscopia micro Raman, ou o laser de Ti:Safira pulsado de femtosegundos, para espectroscopias não lineares. Cada um desses lasers tem seu próprio telescópio e entra colinear no microscópio, exigindo alinhamento de todos na mesma posição focal em x, y e z. Os lasers de Ti:Safira, cw ou pulsado, são utilizados para excitar Raman, ou luminescência, Hiper Rayleigh ou Hiper Raman. A coleta do sinal gerado é feita através da mesma objetiva utilizada na excitação, ou seja estamos utilizando a geometria de retroespalhamento, onde o “beam splitter” BS é utilizado para enviar apenas o sinal retroespalhado ao monocromador. Esse é o esquema básico do sistema, sobre o qual devemos acrescentar detalhes sem os quais não é possível a obtenção de resultados, tais como procedimentos e respostas espectrais dos diferentes componentes. Para tanto vamos descrever primeiro os componentes principais, ou seja, laser de Ti:Safira de femtosegundos, monocromador, CCD e os filtros super NOTCH plus.

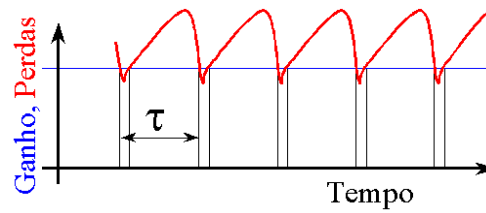
### **2.5.1 Laser de Ti:Safira de femtosegundos (Tsunami)**

Esse laser parte da geometria básica do Ti:Safira cw descrita na seção 2.4.1A modificando-a para gerar pulsos entre 60 a 120 femtosegundos (FWHM – “Full Width Half Maximum”) de duração, potência média de até 2 W, potência de pico de até 400 kW e taxa de repetição de 80 MHz. Trata-se do primeiro laser de pulsos de femtosegundos largamente comercializado, que apareceu por volta de 1990-1991. No início foi chamado de “magic mode locked lasers” porque não se entendia como era capaz de funcionar, não sendo similar aos lasers pulsados utilizados até então. Finalmente se percebeu que isso se devia ao fenômeno não linear de autofocalização no bastão de Safira. Basicamente o bastão de Ti:Safira tem uma não-linearidade alta o suficiente para, nas potências de intracavidade do laser, funcionar como uma lente não-linear. Na região central de um pulso de perfil gaussiano a intensidade é maior. O índice de refração de um material com  $n_2$  positivo, segundo a forma  $n(I) = n_0 + n_2 I$ , será

maior no centro, o que é equivalente a uma lente. Como a mudança do índice de refração com a intensidade do laser é chamada de efeito Kerr, esse mecanismo de geração dos pulsos ultracurtos é hoje conhecido como “Kerr Lens Modelocking”. A grande vantagem desse laser é que ele é capaz de gerar pulsos de femtosegundos em todo o intervalo de ganho do Ti:Safira, ou seja de 750 a 1100 nm.

A idéia intuitiva do travamento de modos, “mode-locking”, é que se obtém um pulso curto adicionando ondas com diferentes frequências com uma origem temporal em comum, ou seja, existe um determinado momento em que todas as diferentes frequências se somam. Se essas ondas possuírem uma relação de fase relativa bem definida podemos atingir o limite de um pulso curto limitado por transformada de Fourier,  $\Delta\nu \Delta T > \frac{1}{2}$ . Na cavidade de um laser só sobrevivem as frequências diferentes correspondentes aos modos longitudinais da mesma. Por isso, se obtém pulso curto quando se consegue travar esses modos em uma relação de fase bem definida.

Um laser opera na forma pulsada sempre que a janela de tempo na qual o ganho supera as perdas se repete no tempo com o mesmo “round trip time” do pulso dentro da cavidade, como mostra a Figura 56. O laser operando assim obriga a todos os modos oscilarem conjuntamente na janela temporal de ganho, gerando o “mode-locking”. O travamento de modos (“mode-locking”) é ativo quando existe um meio externo modulando as perdas da cavidade, tal como um modulador acusto-óptico desviando o feixe, por exemplo, e passivo quando essa modulação ocorre naturalmente. No bombeamento ativo é necessário sincronizar o modulador com a frequência de repetição própria da cavidade, enquanto no passivo essa sincronização ocorre automaticamente. No caso do Ti:Safira pulsado as diferenças de ganho se devem apenas à presença da lente Kerr, que só aparece em altas intensidades. Se as perdas na cavidade forem menores para o laser operando com essa lente extra do que sem ela, o laser tende a operar na forma de travamento de modos (mode-locked) pulsado, caso contrário opera na forma cw.

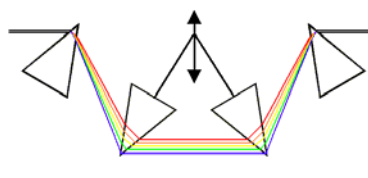


**Figura 56.** Esquema do ganho e as perdas na cavidade do laser. Nas janelas onde o ganho é maior que as perdas o laser pode pulsar.

Como as diferenças de perdas entre as operações cw e pulsada do laser de Ti:Safira são pequenas, esse laser pode operar tanto cw, quanto pulsado e até de forma mista, com pulsos sobre uma emissão cw. A lente Kerr só aparece quando se formam os primeiros pulsos intensos, usualmente a partir do ruído, de modo que o laser não é “self-starting”. Diferentes esquemas foram utilizados para obrigar esse laser a operar na forma “mode-locked”, dentre elas a Spectra Physics optou pela inserção de um modulador acusto-óptico dentro da cavidade, iniciando a operação pulsada através de um “mode-locking” ativo. Entretanto, o “round trip time” na cavidade de um pulso muito intenso é diferente do de um pulso pouco intenso, pois o índice de refração depende da intensidade. Isso significa que o mode-locked ativo inicial logo estaria fora de sincronia. A estratégia utilizada, então, foi manter a operação pulsada através de uma realimentação do modulador com um detector do próprio pulso do laser, abrindo e fechando a janela de ganho do modulador acusto-óptico no mesmo “round trip time” do pulso na cavidade. Trata-se, portanto, de uma forma de operação que mistura “mode-lockings” ativo e passivo. Quando bem alinhado pode-se desligar esse modulador e o laser se manterá na operação pulsada por horas seguidas.

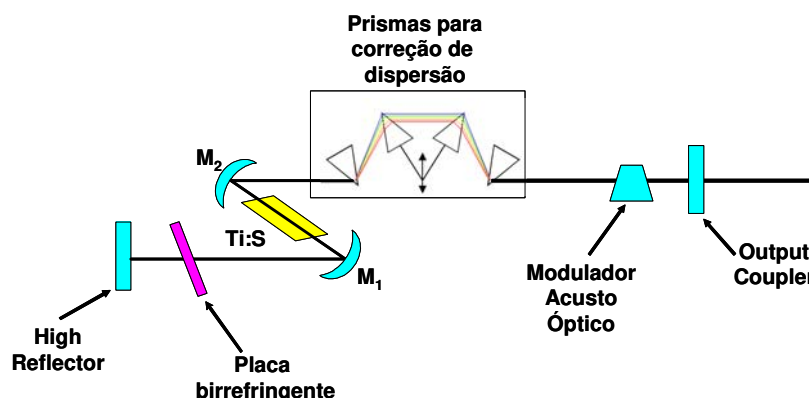
Além do modulador acusto-óptico duas modificações dentro da cavidade em relação ao laser de Ti:Safira cw são necessárias. A primeira delas é em relação à placa de birrefringente de sintonia, que deve permitir ganho para uma banda espectral bem mais larga do que a do laser cw, caso contrário a duração do pulso estaria limitada por transformada de Fourier (largura espectral). A outra é a necessidade de incluir um dispositivo para correção da dispersão de velocidade de grupo dentro da cavidade. Sem esse dispositivo as diferentes frequências do pulso do laser sincronizadas em  $t = 0$

perderiam esse sincronismo nas voltas seguintes, porque cada componente de frequência possui velocidade de grupo diferente. Por isso todos os lasers pulsados de Ti:Safira utilizam o dispositivo de correção da dispersão de velocidade de grupo formado por quatro prismas, mostrado na Figura 57. A inserção dos prismas no ângulo de Brewster evita perdas por reflexão. A idéia intuitiva é que o primeiro prisma abre o feixe e o último o recombina, tornando diferente o caminho óptico percorrido por cada componente. No exemplo da figura o caminho óptico percorrido pelo azul é maior do que o percorrido pelo vermelho, ou seja, estamos atrasando o azul em relação ao vermelho. Essa dispersão é oposta à dispersão normal dos materiais existente na cavidade do laser e pode ser usada para compensá-la. A forma experimental de obter essa compensação é através da introdução de maior ou menor quantidade de vidro dos dois prismas P2 e P3 movimentando-os conjuntamente. Isso não modifica a dispersão de caminho geométrico dos prismas mas introduz mais ou menos vidro na cavidade mudando a dispersão material. Essa quantidade de prisma intracavidade é o parâmetro chave para a boa operação de forma pulsada do laser de Ti:Safira de pulso curto.



**Figura 57.** Configuração dos prismas na cavidade.

O esquema de 4 prismas é o responsável pela compensação da dispersão. Só com eles é possível ter pulsos de femtosegundos de largura.



**Figura 58.** Esquema geral da cavidade do laser.

A Figura 58 mostra um esquema simplificado da cavidade do Ti:Safira pulsado que pode ser comparada à cavidade do Ti:Safira cw da Figura 47. O alinhamento do laser pulsado é bem mais complexo e sensível do que o do laser cw exigindo um treinamento de quem o faz. Sobre ele apenas diremos que é feito em etapas, separando os braços entre  $M_1$  e o HR, e entre  $M_2$  e o OC, procurando maximizar a potência independentemente do laser estar ou não pulsando. Com o laser operando em alta potência vamos introduzindo os prismas e monitorando a frequência da taxa de repetição dos pulsos. Quando o laser está próximo da operação pulsada, mesmo com o modulador acusto-óptico desligado, começam a aparecer instabilidades conhecidas como “noise bursts”. A experiência nos ensinou o truque do corante, o qual diminuiu muito o tempo gasto com o alinhamento desse laser. Esse truque consiste em focalizar a saída do laser em uma cubeta contendo rodamina. A rodamina não é excitada pelos comprimentos de onda entre 750 – 1000 nm do Ti:Safira, mas pode ser excitada pelo seu segundo harmônico, entre 375 – 500 nm. Como a eficiência do processo de absorção de dois fótons é proporcional à intensidade do pulso ao quadrado, a intensidade da luminescência aumenta muito à medida que a duração temporal do pulso diminui. Ligando o modulador acusto-óptico o laser pode não operar em femtosegundos mas é obrigado a operar pulsado, com pulsos de dezenas a centenas de picosegundos. Isso é o suficiente para a geração de alguma luminescência visível, embora pouco intensa, na cubeta com rodamina. Vê-se um aumento muito intenso dessa luminescência à medida que o pulso vai ficando mais curto, o que a torna uma realimentação instantânea entre as ações do alinhador e seus resultados. Com isso, basta otimizar essa intensidade movendo os prismas e realinhando. A otimização final é feita acompanhando a duração e intensidade do pulso no autocorrelador, dispositivo utilizado na medida de duração de tempos ultracurtos descrito na Tese de Doutorado do Gaston Tudury [20].

### 2.5.2 Monocromador

Nos experimentos com espectroscopias confocais utilizamos um monocromador de 30 cm da Acton Research modelo Spectra-Pro 300i em conjunto com a CCD “back-illuminated” da Princeton Instruments. O monocromador é equipado com duas grades de difração com blaze em 500 nm, uma com 1200 e outra com 300 linhas/mm. Ele e a CCD são comandados pelo computador através do programa WinSpec.

A Figura 59 apresenta um esquema desse monocromador. A luz que entra pela fenda de entrada é direcionada por um espelho côncavo até a grade de difração que abre o feixe em suas componentes espectrais. Outro espelho côncavo reflete o feixe para uma CCD que registra todo o espectro de uma vez só. Para o máximo de eficiência do monocromador é importantes escolher a grade com blaze para o comprimento de onda correto e número de linhas por mm adequada à resolução desejada. A melhor resolução da grade de difração ocorre quando ela é completamente preenchida, por isso o feixe de entrada deve estar no mesmo cone de luz definido pelas dimensões dos componentes do monocromador. Para tanto, devemos escolher a óptica de focalização na fenda casando com parâmetro do monocromador chamado f-number. O f-number ou f/number é definido como  $f/\text{number} = F/W = NA/2$ , sendo NA a abertura numérica do feixe.

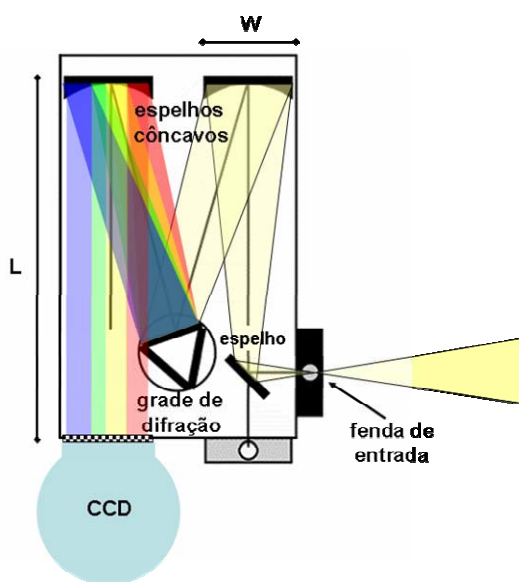


Figura 59. Interior do monocromador.



### 2.5.3 CCD

Nossa câmera CCD – Charge-coupled device – da Princeton Instruments é composta de uma matriz de pixels de 100 X 1200 fotodiodos de silício na configuração “back-illuminated” e refrigerada a nitrogênio líquido. Por software podemos aumentar o tamanho do pixel acionando a forma binning que soma a carga de pixels adjacentes. Essa operação troca resolução espectral por razão sinal/ruído, importante para sinais fracos. Como a luz do espectro se espalha apenas na horizontal adicionamos os pixels verticais, tomando o cuidado de evitar os pixels da região não iluminada que só contribuem com ruído.

A Figura 60 mostra a diferença entre as configurações “front-illuminated” e “back-illuminated”. Na configuração “back-illuminated” a luz atinge os pixels após atravessar uma camada de 25-30  $\mu\text{m}$  de espessura com “coating antirefletor”, diminuindo as perdas por absorção e reflexão e aumentando a eficiência quântica por um fator maior do que 2. Na região espectral em que o “coating antirefletor” deixa de atuar, usualmente no infravermelho próximo, as reflexões das duas superfícies podem interferir formando um padrão típico de um etalon, que apareceriam como artefatos no espectro. Não observamos quaisquer desses artefatos.

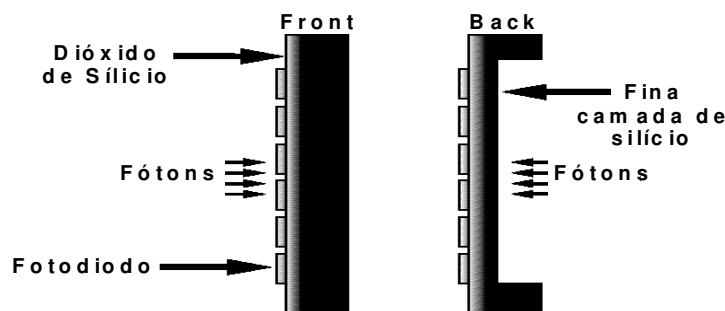
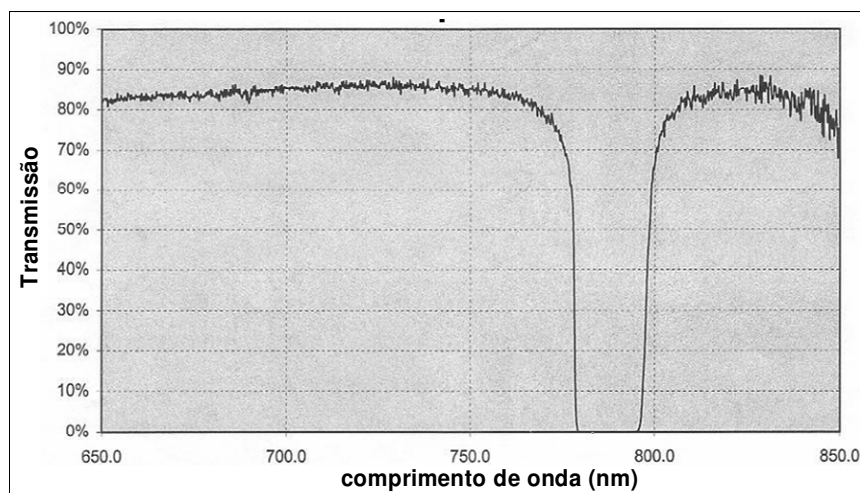


Figura 60. Esquema de CCDs back e front-illuminated.

### 2.5.4 Filtros Super NOTCH plus

O grande problema da espectroscopia Raman vem do fato de que sua intensidade pode ser  $10^{10}$  vezes menor do que a intensidade do espalhamento Rayleigh. Mesmo nos melhores monocromadores existe uma certa quantidade de luz espalhada em todas as direções, a “stray light”, que acaba chegando ao detector e mascarando um

sinal Raman. A solução encontrada no passado para conseguir contraste para detecção de Raman foi o uso de monocromadores duplos de 1 m. A “stray light” de um pequeno monocromador simples de 30 cm tornaria completamente inviável a observação de Raman. Ultimamente, entretanto, esse problema foi contornado através de filtros notchs que chegam a rejeitar por fatores de  $10^6$  a luz incidente em determinado comprimento de onda. Dois filtros desses em série permitem uma rejeição de  $10^{12}$ , significando que nada da luz advinda do espalhamento Rayleigh penetra no monocromador. O filtro ideal teria uma banda de corte muito estreita e intensa. Quanto mais estreita a banda espectral de corte mais caro é o filtro. Os melhores filtros no mercado são os super NOTCH plus, com largura total de banda de  $350\text{ cm}^{-1}$ , conforme exhibe a curva da Figura 61 extraída da folha de especificações de nosso filtro, especificado para 785 nm. Esses filtros funcionam refletindo completamente luz com comprimento de onda na banda de rejeição, mas transmitindo outros comprimentos de onda. Dessa forma ele se torna útil como o espelho dicróico utilizado para dirigir o laser de Ti:Safira ao microscópio, enquanto bloqueia o Rayleigh transmite o Raman retroespalhado para o monocromador. Para acoplar os lasers antes do microscópio, usamos um dos filtros NOTCH, assim como mostra a Figura 62 já que ele reflete somente o comprimento de onda do Ti:Safira e permite que passe por ele os outros, tais como o 1064 nm do Nd:YAG.



**Figura 61.** Curva da transmissão do filtro NOTCH em função do comprimento de onda.

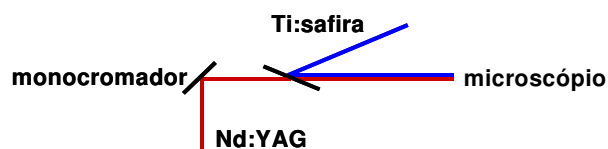


Figura 62. Acoplamento dos lasers.

### 2.5.5 Detalhes Experimentais

Para medida do Raman operamos o laser de Ti:Safira cw no centro do comprimento de onda do filtro super NOTCH plus, 785 nm, com potências variando de 10 a 500 mW. Foi necessário o uso de um filtro passa banda para cortar muitos comprimentos de onda gerados internamente na cavidade do laser que são pouco intensos frente ao 785 nm porém mais intensos do que o Raman. A luz retroespalhada do Nd:YAG usado na pinça óptica não representou problema maior por três razões: (1) é fácil bloqueá-la com filtros comuns, o próprio espelho dielétrico do Nd:YAG fez papel de filtro, (2) espectralmente ela está bem afastada da região de 785 nm e (3) a resposta da CCD cai bastante para a região de 1064 nm, já no limiar do gap óptico do silício. Foi necessário trocar o espelho BS dentro do microscópio que desviava o Nd:YAG por um espelho dielétrico próprio para o Ti:Safira. Nesse caso optamos por perder potência do Nd:YAG em lugar de perder eficiência na coleta do Raman. A transmissão das objetivas na região de 785 nm é melhor do que na região de 1064 nm chegando a quase 30%.

Para garantir resolução espacial o micro Raman deve ser montado na configuração confocal, em que o foco do laser e a abertura do detector são conjugados, um na imagem do outro, conforme Figura 62.

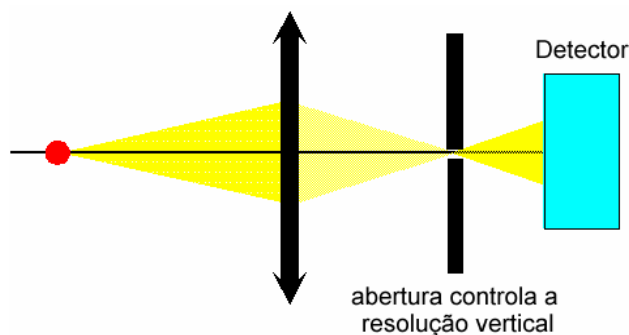


Figura 63. Configuração do Raman confocal.

Tornamos o nosso micro-Raman confocal quando focalizamos a luz retroespalhada do laser na fenda do monocromador. Para saber se o Raman irá incidir no centro da fenda, usamos a luz do laser retroespalhada por um espelho colocado após a objetiva no microscópio, para isso sintonizamos o Ti:Safira fora de 785 nm, onde é transmitido pelo filtro NOTCH. Uma maneira de certificar se o sistema está confocal é observar a imagem de um modo Raman na CCD, se ela estiver bem focalizada estamos na configuração desejada. Dessa forma, os sinais Raman gerados fora do plano de visão são bastante atenuados. Com essa montagem conseguimos ver sinais Raman Stokes e anti-Stokes de partículas capturadas e não capturadas, que serão descritos no capítulo 4.

Para as espectroscopias não lineares, ou seja, luminescência excitada por absorção de dois fótons, Hiper Rayleigh e Hiper Raman, foram necessárias algumas modificações. A mais importante foi trocar o laser de Ti:Safira cw pelo laser pulsado de femtosegundos. Outra modificação importante foi a troca de espelhos e filtros, pois agora desejamos coletar sinais nas regiões espectrais de 500 nm e 390 nm. O retroespalhamento do próprio laser na região de 800 nm é facilmente bloqueado com um filtro passa baixa que corta acima de 600 nm. O maior problema foi a resposta espectral do BS pois deve refletir tanto o Nd:YAG, o Ti:Safira e os sinais retroespalhados coletados pela objetiva para o monocromador. Usar o espelho dielétrico para os lasers de Nd:YAG ou Ti:Safira significaria uma perda enorme na coleta dos sinais para 500 – 390 nm. Acabamos optando pelo uso de um espelho semi-metálico, com refletividade da ordem de 80% e resposta espectral praticamente constante na banda de 350-1100 nm. Essa resposta espectral constante é um fator importante para não introduzir artefatos nos espectros. O uso de espelhos dielétricos em bandas espectrais muito largas é sempre problemático nesse aspecto. Em relação às intensidades, nossa regra prática foi de sacrificar a intensidade onde a luz é muito intensa em prol das intensidades menores. O aumento da potência dos lasers pode compensar facilmente as perdas sofridas no BS. Por outro lado, também aumentamos a intensidade do iluminador do microscópio para poder compensar a perda de potência da luz visível que incide na câmera de vídeo JVC.

A transmissão no visível foi de apenas 20%, entretanto, mais do que suficiente para visualizar e gravar as nossas imagens.

Com essas modificações nossa pinça óptica ficou equipada com possibilidades de obter espectros de absorção, luminescência simples e excitada por absorção de dois fótons, Raman, Hiper Raman e Hiper Rayleigh para partículas capturadas na pinça óptica.



## *Capítulo 3*

### *Teoria Óptica Eletromagnética*

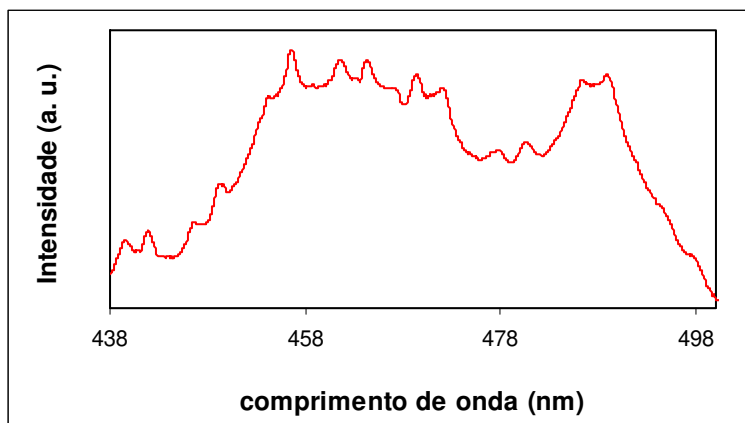
Quando observamos as ressonâncias de Mie, ou “Morphology Dependent Resonances” (MDR), na luminescência excitada por absorção de dois fótons em microesferas de poliestireno coradas, como mostra a Figura 64, ficou claro que se existem ressonâncias no espalhamento da luz do laser incidente e na fluorescência, elas também deveriam aparecer como ressonâncias nas forças ópticas. Experiências de espalhamento de Mie usualmente medem a intensidade da luz espalhada, para a qual existem detectores ultrasensíveis, atingindo o limite de unidades de fótons. Percebemos então que a própria pinça óptica seria a única possibilidade de substituir as fotomultiplicadoras como detector ultrasensível para a medida das forças ópticas muito pequenas envolvidas no espalhamento. A pinça óptica também satisfaz o critério de que uma boa medida de força deve ser realizada com um sistema estável, através de forças restauradoras, como as molas, que operam no mínimo de potencial. É impossível medir forças com sistemas de equilíbrio instável e é muito difícil a medida com sistemas de equilíbrio indiferente. Um exemplo de medida de força com sistemas indiferentes foi a

medida da carga do elétron de Millikan na qual a força elétrica e gravitacional se cancelavam, mas as partículas podiam se mover para qualquer posição.

A grande inovação desse capítulo, que foi o uso da própria pinça óptica para analisar as forças ópticas através de dois lasers, um para a medida e outro como causa do efeito, nos permitiu estudar diretamente as forças no espalhamento de Mie, através dos experimentos que denominamos “Espectroscopia Ultrasensível de Força” e “Medida Ultrasensível da Força em Função do Deslocamento”.

Outra grande vantagem do uso da pinça óptica para esse estudo é o fato de que ela permite realizar a medida em partículas isoladas, e também em diferentes condições na mesma partícula. Isso nos permitiu excitar seletivamente os modos TE e TM.

Embora a teoria da óptica geométrica tenha apresentado resultados satisfatórios na calibração da força óptica, o fato é que se trata de um formalismo restrito. Os próprios resultados obtidos na luminescência excitada por absorção de dois fótons em microesferas de poliestireno coradas nos obrigou a abandonar a estratégia de usar a teoria mais simples para explicar os nossos resultados experimentais. Para usar a óptica geométrica nesse caso, seria necessário no mínimo, incluir efeitos de interferência. Entretanto, um tratamento desse tipo, além de limitado, se torna mais complicado do que resolver de uma vez o problema eletromagnético completo.



**Figura 64.** Ressonâncias de Mie em uma microesfera de poliestireno corada.

O formalismo para onda plana prevê a existência de ressonâncias de Mie que dependem do tamanho, forma e índices de refração do objeto espalhador e do meio em



que está embebido. Descobrimos, após a obtenção dos nossos primeiros resultados, que o próprio Arthur Ashkin [21, 22] havia observado os “MDR modes” nos seus experimentos de levitação óptica em gotas de óleo de silicone suspensas no ar. Nas experiências de levitação a partícula flutua pela compensação da gravidade com a força óptica de reflexão, de forma análoga à da experiência de Millikan, um sistema indiferente. Para conseguir seus resultados Ashkin precisou construir um sistema de realimentação que modificava a potência do laser sempre que a partícula tendia a subir ou descer. O fato de que a experiência não foi repetida por outros grupos desde 1977, demonstra que apenas a excepcional habilidade experimental de Ashkin e seu técnico Dziedzic, permitiu a obtenção daqueles resultados. Nas experiências de levitação, entretanto, a partícula está obrigatoriamente centrada em relação a um feixe incidente. As ressonâncias de Mie também já foram observadas através de espalhamentos Rayleigh, Raman e fluorescência convencional [23].

Neste capítulo relatamos os nossos resultados experimentais, os quais concordam com o formalismo eletromagnético adotado. A técnica que utilizamos para desenvolver a teoria óptica eletromagnética pode ser explicada de maneira resumida da seguinte forma:

1. É necessário aplicar condições de contorno em uma superfície esférica, logo os campos incidentes e espalhados devem ser decompostos em ondas parciais, ou seja, devem ser descritos em coordenadas esféricas com a origem no centro da partícula. A solução da equação de onda em coordenadas esféricas é dada pelas funções esféricas de Bessel para a parte radial e pelos harmônicos esféricos para a angular.
2. As dificuldades que se contrapõem a essa estratégia são: feixes de luz simétricos preferem a descrição em coordenadas cilíndricas, não esféricas. Além disso, nosso feixe tem que ser focalizado, e com o foco obrigatoriamente fora do centro da partícula. O quadro piora quando se considera que o feixe antes de incidir na objetiva é linearmente polarizado na direção  $x$ , quebrando qualquer traço de simetria que porventura ainda existisse para facilitar os cálculos.

3. É fácil encontrar descrições do feixe de luz focalizado por uma objetiva usando o formalismo de difração escalar para pequenas aberturas numéricas. Entretanto, o espalhamento de Mie requer um tratamento vetorial desde o início e nossos experimentos são realizados em condições de grandes aberturas numéricas.

4. A maior dificuldade encontrada pelos pesquisadores em óptica é na descrição do feixe incidente e sua decomposição em ondas parciais, assim como afirma Gouesbet em um dos seus artigos [24]: “In all these theories, a crucial step is to describe the incident beam correctly. Unfortunately, the usual theoretical models of shaped beams do not exactly satisfy Maxwell’s equations. This is, for instance, the case for the so called Davis scheme for Gaussian beams. Such features then necessarily introduce inconsistencies in light scattering theories of shaped beams”<sup>1</sup>. Quase todos os experimentos nessa área são explicados com ondas planas porque sua expansão em ondas parciais é conhecida desde o século XIX. Além do problema central de encontrar os campos eletromagnéticos vetoriais para feixes focalizados, expandi-los em ondas parciais usualmente tornava inviáveis os cálculos computacionais.

5. O grupo de Gouesbet demonstrou que o princípio da localização fornecia uma excelente aproximação para a expansão de qualquer feixe em ondas parciais. Os resultados obtidos utilizando essa técnica na aproximação de Davis, para feixes gaussianos paraxiais, são suficientes para explicar nossos resultados de espectroscopia de força, tanto para a posição espectral dos picos quanto para a excitação seletiva dos modos TE e TM da microesfera através da polarização. A aproximação de Davis é mais apropriada para feixes com pequena abertura numérica. Uma descrição quantitativa da intensidade dos picos com maior precisão requer modelos mais gerais para o feixe incidente, como as encontradas nos trabalhos de Richards & Wolf [42] e,

---

<sup>1</sup> Em todas essas teorias, o passo crucial é descrever o feixe incidente corretamente. Infelizmente, os modelos teóricos usuais de feixes focalizados (shaped beams) não satisfazem as equações de Maxwell exatamente. Este é o caso, por exemplo, do assim chamado esquema de Davis para feixes gaussianos. Tais feições, portanto, necessariamente introduzem inconsistências nas teorias de espalhamento de luz de feixes focalizados.

particularmente, nos artigos de Paulo Américo Maia Neto e Moysés Nussenzveig [25, 26]. Dois motivos nos levaram a escolha do modelo de Gouesbet et al: 1 a facilidade computacional dessa técnica, devido a aproximação da localização e 2 a possibilidade para lidar com feixes polarizados, única forma de excitação seletiva dos modos TE e TM, em lugar de feixes circularmente polarizados descritos por Mazolli et al [27]. Para descrever a excitação seletiva a única restrição é que o “spot size” do feixe seja bem menor do que o raio da partícula, tornando a aproximação de Davis irrelevante.

Nesse capítulo apresentamos o formalismo eletromagnético e os resultados obtidos na seguinte ordem. Iniciamos com a teoria de incidência por ondas planas que descreve bem os resultados do espalhamento da força óptica na direção vertical com o feixe de Ti:Safira desfocalizado e da luminescência excitada por absorção de 2 fótons. Já os resultados para a força da pinça óptica incidindo na borda da partícula e da força em função do deslocamento só podem ser explicados com o feixe focalizado. Assim, a segunda parte do capítulo descreve como utilizamos o princípio da localização para calcular os coeficientes de expansão em ondas parciais de feixes gaussianos, e também como os mesmos foram usados para calcular as forças ópticas nas diferentes direções. Todos os nossos programas numéricos foram realizados com o software Mathematica e estão no apêndice 2. Finalmente apresentamos os gráficos experimentais e teóricos para as ressonâncias observadas na borda da partícula e a força em função do deslocamento. Muitos cálculos teóricos, integrais e provas de relações foram omitidos nesse capítulo e desenvolvidos no apêndice 1, para melhor compreensão do texto. Por outro lado, desenvolvimentos já existentes na literatura que requereriam um número excessivo de páginas de pura álgebra foram omitidos, os substituindo pela simples referência à fonte original.

Acreditamos ter demonstrado com os resultados desse capítulo a necessidade de utilizar um formalismo bem mais complexo para a descrição das forças envolvidas em experimentos de pinças ópticas. As aplicações da pinça óptica são sempre realizadas em meio fluido na presença de inevitáveis forças hidrodinâmicas anisotrópicas. Além disso,

na descrição hidrodinâmica de uma partícula capturada é sempre necessário considerar a proximidade das paredes da lâmina e lamínula, pois a distância de trabalho das objetivas capazes de aprisionar é de apenas 200  $\mu\text{m}$ . Já sabíamos de antemão através da análise intuitiva do capítulo 2 que a própria força óptica é anisotrópica, com a força vertical menor do que a força horizontal, mas preservando uma simetria azimutal. Nossos resultados, entretanto, mostram que sequer existe essa simetria azimutal, pois mesmo a força óptica horizontal depende da direção do movimento em relação à polarização do feixe incidente. Em outras palavras, a polarização do laser quebra a simetria azimutal.

### 3.1 “MDR modes” em Microesferas Excitadas por Incidência de Onda Plana

As principais referências para os cálculos de onda plana dessa seção são os livros de Bohren & Huffman [28], bastante didático, Van de Hulst [29], não tão didático mas fundamental na área e praticamente citado por todos os artigos no assunto, e do Jackson [30], que embora não trate especificamente desse problema, tem a linguagem mais comum para os físicos da geração que o utilizaram como livro texto de Eletrodinâmica.

#### 3.1.1 Soluções da Equação de Onda Vetorial

Provavelmente, um dos problemas mais importantes com solução exata na teoria de absorção e espalhamento por pequenas partículas seja o de um centro espalhador esférico com raio e índice de refração arbitrários. O equacionamento desse tipo de problema começa com as equações de Maxwell na ausência de cargas livres em meios homogêneos para os campos  $\vec{D} = \epsilon \vec{E}$  e  $\vec{H} = \vec{B}/\mu$  dadas por:

$$1. \nabla \cdot \vec{D} = 0, \quad 2. \nabla \cdot \vec{H} = 0, \quad 3. \nabla \times \vec{E} = -\mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad \text{e} \quad 4. \nabla \times \vec{H} = \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (3.1)$$

Aplicando o  $\nabla \times$  nas equações 3 e 4, encontramos as equações de onda vetoriais:

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = 0 \quad \text{e} \quad \nabla^2 \vec{H} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = 0 \quad (3.2).$$

Há duas estratégias para achar a solução dessas equações:

1. Partindo de um campo elétrico na forma  $\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r})e^{-i\omega t}$  resolve-se a equação diferencial vetorial para a dependência espacial do campo elétrico  $\nabla^2 \vec{E} + \frac{\omega^2}{c^2} \vec{E} = 0$  impondo a condição de que  $\nabla \cdot \vec{E} = 0$  e se obtém o campo magnético através de  $\vec{H}(\vec{r}, t) = -\frac{i}{\mu\omega} \nabla \times \vec{E}$ .
2. Partindo de um campo magnético na forma  $\vec{H}(\vec{r}, t) = \vec{H}(\vec{r})e^{-i\omega t}$  resolve-se a equação vetorial  $\nabla^2 \vec{H} + \frac{\omega^2}{c^2} \vec{H} = 0$  impondo a condição de que  $\nabla \cdot \vec{H} = 0$  e se obtém o campo elétrico através de  $\vec{E}(\vec{r}, t) = \frac{i}{\varepsilon\omega} \nabla \times \vec{H}$ .

De qualquer forma devemos iniciar encontrando as soluções das equações diferenciais vetoriais do tipo  $\nabla^2 \vec{F} + k^2 \vec{F} = 0$ , onde  $k = \omega/c$ . Quando as condições de contorno permitem, esse problema pode ser decomposto em uma equação diferencial escalar para cada componente. Infelizmente, na nossa situação, as condições de contorno em uma superfície esférica misturam as diferentes componentes tornando a técnica de decomposição muito complicada. Nesse caso, é melhor utilizar outra técnica para encontrar a solução das equações diferenciais vetoriais, partindo das soluções das equações diferenciais escalares da forma  $\nabla^2 \phi + k^2 \phi = 0$ . Para isso, suponha que se conhece a solução de um operador escalar  $\mathcal{L} \phi = 0$ , e que o operador vetorial  $\vec{A}$  comuta com  $\mathcal{L}$ . Então,  $\mathcal{L} \vec{A} \phi = \vec{A} \mathcal{L} \phi = 0$ , e  $\vec{u} = \vec{A} \phi$  é uma solução da equação vetorial. Desse modo, é necessário encontrar os operadores vetoriais que comutam com o operador  $\nabla^2 + k^2$ . No apêndice 1 demonstramos que os operadores  $\nabla$ ,  $\vec{L}$  e  $\nabla \times \vec{L}$  comutam com o  $\nabla^2$  e, portanto, as funções vetoriais  $\vec{A} = \nabla \phi$ ,  $\vec{D} = \vec{L} \phi$  e  $\vec{F} = (\nabla \times \vec{L}) \phi$  são possíveis soluções da equação vetorial, onde  $\vec{L} = -i\vec{r} \times \nabla$  é o operador momento angular.

Entretanto, o gradiente deve ser descartado para equações de ondas eletromagnéticas porque ele não é solenoidal, isto é,  $\nabla \cdot \nabla \phi = \nabla^2 \phi \neq 0$ , uma vez que  $\nabla^2 \phi = -k^2 \phi$ . Já as outras duas são solenoidais, pois  $\nabla \cdot \nabla \times \vec{V} = 0$  e

$\nabla \cdot \vec{L} = \nabla \cdot (-i\vec{r} \times \nabla) = -i\partial_j [\varepsilon_{jkl} x_k \partial_l] = -i [\varepsilon_{jkl} x_k \partial_j \partial_l + \varepsilon_{jkl} \delta_{jk} \partial_l] = 0$  pois os tensores  $\partial_j \partial_l$  e  $\delta_{jk}$  são simétricos e o  $\varepsilon_{ijk}$  antisimétrico<sup>2</sup>.

O produto escalar  $\vec{r} \cdot \vec{L} = -ix_j \varepsilon_{jkl} x_k \partial_l = -i\varepsilon_{jkl} x_j x_k \partial_l = 0$  pois  $x_j x_k$  é simétrico. Assim, ao escolher uma solução do tipo  $\vec{E} = \vec{L}\phi$  e  $\vec{H} = -i/\mu\omega \nabla \times (\vec{L}\phi)$  a componente radial do campo elétrico  $E_r = \vec{r} \cdot \vec{E} = 0$  é nula, o campo elétrico será transversal e estamos no caso denominado TE. Já a escolha  $\vec{H} = \vec{L}\phi$  e  $\vec{E} = -i/\mu\varepsilon\omega \nabla \times (\vec{L}\phi)$  leva a um campo magnético transversal e de maneira análoga estamos no caso TM.

A equação escalar  $\nabla^2 \phi + k^2 \phi = 0$ , sendo  $\nabla^2 = 1/r \partial^2 / \partial r^2 (r) - L^2 / r^2$  é resolvida por separação de variáveis com  $\phi = Z(r) Y_n^m(\theta, \varphi)$ . Lembrando que  $L^2 Y_n^m = n(n+1) Y_n^m$ , onde  $Y_n^m$  são os harmônicos esféricos.

$$\frac{Y_n^m}{r} \frac{d}{dr^2} (rZ) - \frac{n(n+1) Y_n^m Z}{r^2} + k^2 Y_n^m Z = 0 \quad (3.3)$$

a qual é igual a:

$$r^2 \frac{d^2 Z}{dr^2} + 2r \frac{dZ}{dr} + [k^2 r^2 - n(n+1)] Z = 0 \quad (3.4)$$

que é a equação das funções esféricas de Bessel.

Assim,  $Z_n = j_n(kr)$ ,  $\eta_n(kr)$ ,  $h_n^1(kr) = j_n + i\eta_n$  e  $h_n^2(kr) = j_n + i\eta_n$ , onde  $j_n(kr)$  e  $\eta_n(kr)$  são as funções esféricas de Bessel e de Neumann e  $h_n^1(kr)$  e  $h_n^2(kr)$  são as funções de Hankel de primeiro e segundo tipo. A função  $n_n(kr)$  diverge na origem e  $h_n^1(kr) \sim e^{ikr}/r$  e  $h_n^2(kr) \sim e^{-ikr}/r$ . Por isso devemos usar  $j_n(kr)$  como solução para os campos no interior da esfera e para as ondas incidentes, sejam as mesmas planas ou não, e  $h_n^1(kr)$  para os campos espalhados.

---

<sup>2</sup> A contração de um tensor simétrico  $S_{ij}$  com um antisimétrico  $A_{ij}$  é sempre nula, pois  $S_{ij} A_{ij} = S_{ji} A_{ji}$  por simples troca de letras, agora usando as propriedades de simetria  $S_{ij} A_{ij} = (S_{ij}) (-A_{ij}) = -S_{ij} A_{ij}$  levando a  $2 S_{ij} A_{ij} = 0$ , (c.q.d.).

Com o intuito de facilitar os cálculos e tornar nossos resultados comparáveis com os dos livros de Van de Hulst e Bohren & Huffman não usaremos diretamente os harmônicos esféricos  $Y_n^m$ , mas sim combinações lineares com paridade definida construídas a partir de  $Y_n^m$  e  $Y_n^{-m}$ , mantendo sempre  $m \geq 0$ . Assim, podemos utilizar:

$$Y_n^m = (-1)^m \sqrt{\frac{(2n+1)(n-m)!}{4\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) e^{im\varphi} \quad \text{e} \quad Y_n^{-m} = \sqrt{\frac{(2n+1)(n-m)!}{4\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) e^{-im\varphi} \quad (3.5)$$

para construir as funções:

$$\begin{aligned} Y_n^m + (-1)^m Y_n^{-m} &= (-1)^m \sqrt{\frac{(2n+1)(n-m)!}{4\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) [e^{im\varphi} + e^{-im\varphi}] = \\ &= (-1)^m \sqrt{\frac{(2n+1)(n-m)!}{\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) \cos m\varphi \quad (3.6) \end{aligned}$$

e,

$$\begin{aligned} Y_n^m - (-1)^m Y_n^{-m} &= (-1)^m \sqrt{\frac{(2n+1)(n-m)!}{4\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) [e^{im\varphi} - e^{-im\varphi}] = \\ &= (-1)^m i \sqrt{\frac{(2n+1)(n-m)!}{\pi(n+m)!}} P_n^m(\cos\theta) \sin m\varphi \quad (3.7), \end{aligned}$$

que estão relacionadas as funções comumente utilizadas pelas relações:

$$\psi_{enm} = P_n^m(\cos\theta) \cos m\varphi = (-1)^m \sqrt{\frac{\pi}{(2n+1)} \frac{(n+m)!}{(n-m)!}} [Y_n^m + (-1)^m Y_n^{-m}] \quad (3.8)$$

$$\psi_{onm} = P_n^m(\cos\theta) \sin m\varphi = -i(-1)^m \sqrt{\frac{\pi}{(2n+1)} \frac{(n+m)!}{(n-m)!}} [Y_n^m - (-1)^m Y_n^{-m}] \quad (3.9)$$

as quais possuem as mesmas propriedades de ortogonalidade dos harmônicos esféricos. Usamos também as mesmas convenções dos livros supracitados com os subscritos **e** e **o** para indicar as paridades pares e ímpares (**e**, de even, significa par e **o**, de odd, ímpar). Com essas funções construímos os vetores harmônicos esféricos  $\vec{M}$  e  $\vec{N}$ , definidos de maneira adimensional, como:

$$\begin{aligned} \vec{M}_{enm} &= \frac{1}{i} Z_n(kr) \vec{L} \psi_{enm}, \quad \vec{M}_{onm} = \frac{1}{i} Z_n(kr) \vec{L} \psi_{onm}, \quad \vec{N}_{enm} = \frac{1}{ik} \nabla \times [Z_n(kr) \vec{L} \psi_{enm}] = \frac{1}{k} \nabla \times \vec{M}_{enm} \quad \text{e} \\ \vec{N}_{onm} &= \frac{1}{ik} \nabla \times [Z_n(kr) \vec{L} \psi_{onm}] = \frac{1}{k} \nabla \times \vec{M}_{onm} \quad (3.10). \end{aligned}$$

Usando  $\vec{L} = i \left[ \frac{\hat{e}_\theta}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \varphi} - \hat{e}_\varphi \frac{\partial}{\partial \theta} \right]$  e explicitando as dependências de  $\vec{M}$  e  $\vec{N}$  com

$\psi$ , conforme detalhado no apêndice, ficamos com:

$$\vec{M}_{enm} = \frac{-m}{\sin \theta} (\sin m\varphi) P_n^m(\cos \theta) Z_n(\rho) \hat{e}_\theta - (\cos m\varphi) \frac{dP_n^m(\cos \theta)}{d\theta} Z_n(\rho) \hat{e}_\varphi \quad (3.11),$$

$$\vec{M}_{onm} = \frac{m}{\sin \theta} (\cos m\varphi) P_n^m(\cos \theta) Z_n(\rho) \hat{e}_\theta - (\sin m\varphi) \frac{dP_n^m(\cos \theta)}{d\theta} Z_n(\rho) \hat{e}_\varphi \quad (3.12),$$

e

$$\begin{aligned} \vec{N}_{enm} = & \frac{Z_n(\rho)}{\rho} (\cos m\varphi) n(n+1) P_n^m(\cos \theta) \hat{e}_r + (\cos m\varphi) \frac{dP_n^m(\cos \theta)}{d\theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho Z_n(\rho)] \hat{e}_\theta \\ & - m (\sin m\varphi) \frac{P_n^m(\cos \theta)}{\sin \theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho Z_n(\rho)] \hat{e}_\varphi \quad (3.13), \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \vec{N}_{onm} = & \frac{Z_n(\rho)}{\rho} (\sin m\varphi) n(n+1) P_n^m(\cos \theta) \hat{e}_r + (\sin m\varphi) \frac{dP_n^m(\cos \theta)}{d\theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho Z_n(\rho)] \hat{e}_\theta \\ & - m (\cos m\varphi) \frac{P_n^m(\cos \theta)}{\sin \theta} \frac{1}{\rho} \frac{d}{d\rho} [\rho Z_n(\rho)] \hat{e}_\varphi \quad (3.14). \end{aligned}$$

onde  $\rho = kr$ . No cálculo de  $\vec{N}$  usamos a equação diferencial dos polinômios associados

de Legendre,  $\frac{1}{\sin \theta} \frac{d}{d\theta} (\sin \theta \frac{dP_n^m}{d\theta}) + [n(n+1) - \frac{m^2}{\sin^2 \theta}] P_n^m = 0$ . Os vetores  $\vec{M}$  são também

ortogonais a  $\vec{N}$  e ortogonais entre si.

### 3.1.2 Expansão de uma Onda Incidente Arbitrária em Função dos Harmônicos Esféricos Vetoriais

Resolvida a equação vetorial podemos agora encontrar os campos elétricos e magnéticos de uma onda incidente. Para tanto, vamos então expandi-los em termos dos vetores  $\vec{M}$  e  $\vec{N}$ , segundo a forma:

$$\vec{E} = \sum_{n,m} A_{nm} \vec{M}_{nm} + B_{nm} \vec{N}_{nm} \quad \text{e} \quad \vec{H} = \sum_{n,m} -\frac{i\varepsilon\omega}{k} A_{nm} \vec{M}_{nm} - \frac{ik}{\mu\omega} B_{nm} \vec{N}_{nm} \quad (3.15)$$

Nosso objetivo é determinar os coeficientes  $A_{nm}$  e  $B_{nm}$ . Faremos isso somente para uma das paridades, pois o desenvolvimento para a outra é análogo. Iniciamos



obtendo o produto escalar de  $\vec{r}$  com os campos e usando o fato de que  $\vec{r} \cdot \vec{E} = 0$  para campos TE e  $\vec{r} \cdot \vec{H} = 0$  para os campos TM:

$$\begin{aligned}\vec{r} \cdot \vec{E} &= \sum B_{nm} \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm} = \sum B_{nm} \frac{n(n+1)}{k} (Z_n \psi_{nm}) \text{ e} \\ \vec{r} \cdot \vec{H} &= \sum A_{nm} \frac{-ik}{\mu\omega} \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm} = \sum A_{nm} \frac{-in(n+1)}{\mu\omega} (Z_n \psi_{nm}) \quad (3.16).\end{aligned}$$

Usando a ortogonalidade das funções angulares para extrair um único termo do somatório:

$$\begin{aligned}\int \vec{r} \cdot \vec{E} \psi_{n'm'}^* d\Omega &= \sum \frac{n(n+1)}{k} Z_n B_{nm} \int \psi_{nm} \psi_{n'm'}^* d\Omega = \frac{n'(n'+1)}{k} Z_{n'} B_{n'm'} \frac{2\pi}{2n'+1} \frac{(n'+m')!}{(n'-m')!} \\ Z_n(kr) B_{nm} &= \frac{k(2n+1)}{(n+m)!} \frac{(n-m)!}{2\pi n(n+1)} \int \psi_{nm}^* (\vec{r} \cdot \vec{E}) d\Omega \quad (3.17)\end{aligned}$$

e

$$\begin{aligned}\int \vec{r} \cdot \vec{H} \psi_{n'm'}^* d\Omega &= \sum \frac{n(n+1)}{k} \frac{-ik}{\mu\omega} Z_n A_{nm} \int \psi_{nm} \psi_{n'm'}^* d\Omega = -i \frac{n'(n'+1)}{\mu\omega} Z_{n'} A_{n'm'} \frac{2\pi}{2n'+1} \frac{(n'+m')!}{(n'-m')!} \\ Z_n(kr) A_{nm} &= \frac{i\mu\omega}{2\pi n(n+1)} \frac{(2n+1)(n-m)!}{(n+m)!} \int \psi_{nm}^* (\vec{r} \cdot \vec{H}) d\Omega \quad (3.18)\end{aligned}$$

onde  $d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi$  é o diferencial do ângulo sólido. Em princípio, para soluções exatas das equações de Maxwell, as funções radiais  $Z_n(kr) = j_n(kr)$  de ambos os lados deveriam se cancelar, o que nem sempre ocorre com as aproximações. Uma opção para eliminar a dependência radial dos coeficientes é multiplicar por  $j_{n'}(kr)$  e integrar em  $r$  usando a identidade:

$$\int_0^\infty j_n(kr) j_{n'}(kr) d(kr) = \frac{\pi}{2(2n+1)} \delta_{nn'} \quad (3.19)$$

obtendo:

$$B_{nm} = \frac{k(2n+1)}{(n+m)!} \frac{(n-m)!}{2\pi n(n+1)} \frac{2(2n+1)}{\pi} \int_0^\infty j_{n'}(kr) d(kr) \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \psi_{nm}^* (\vec{r} \cdot \vec{E}) d\Omega \quad (3.20)$$

$$A_{nm} = \frac{i\mu\omega}{2\pi n(n+1)} \frac{(2n+1)(n-m)!}{(n+m)!} \frac{2(2n+1)}{\pi} \int_0^\infty j_{n'}(kr) d(kr) \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \psi_{nm}^* (\vec{r} \cdot \vec{H}) d\Omega \quad (3.21)$$

### 3.1.3 Cálculos dos Coeficientes de Mie para um Campo Incidente Arbitrário

Com a expansão da onda incidente podemos agora encontrar os assim chamados coeficientes de Mie, definidos como as razões entre os coeficientes de mesma ordem  $n, m$  da expansão dos campos espalhados/campos incidentes e internos à partícula/campos incidentes. Para isso, é necessário aplicar as condições de contorno da continuidade dos campos elétricos e magnéticos tangenciais em  $r = a$ , onde  $a$  é o raio da esfera. Isso pode ser feito separadamente para as funções pares e ímpares, considerando as diferenças entre o meio interno e externo à partícula. Definimos os campos  $\vec{E}$  e  $\vec{H}$ , respectivamente, para as ondas incidentes, interior à esfera e espalhada como:

$$\vec{E}_i = \sum_{n,m}^{\infty} (g_{nTE}^m \vec{M}_{omn}^1 - i g_{nTM}^m \vec{N}_{emn}^1) \text{ e } \vec{H}_i = -\frac{k}{\mu\omega} \sum_{n,m}^{\infty} (g_{nTM}^m \vec{M}_{emn}^1 + i g_{nTE}^m \vec{N}_{omn}^1) \quad (3.22)$$

$$\vec{E}_d = \sum_{n,m}^{\infty} (c_n^m \vec{M}_{omn}^1 - i d_n^m \vec{N}_{emn}^1) \text{ e } \vec{H}_d = -\frac{k}{\mu_1\omega} \sum_{n,m}^{\infty} (d_n^m \vec{M}_{emn}^1 + i c_n^m \vec{N}_{omn}^1) \quad (3.23)$$

$$\vec{E}_s = \sum_{n,m}^{\infty} (i a_n^m \vec{N}_{emn}^3 - b_n^m \vec{M}_{omn}^3) \text{ e } \vec{H}_s = -\frac{k}{\mu\omega} \sum_{n,m}^{\infty} (a_n^m \vec{M}_{emn}^3 + i b_n^m \vec{N}_{omn}^3) \quad (3.24)$$

onde os índices “1” e “3” representam  $Z_n(\rho) = j_n(\rho)$  e  $Z_n(\rho) = h_n^1(\rho)$ . As condições de contorno são:  $E_{i\theta} + E_{i\phi} = (E_{d\theta} + E_{d\phi}) - (E_{s\theta} + E_{s\phi})$  e  $H_{i\theta} + H_{i\phi} = (H_{d\theta} + H_{d\phi}) - (H_{s\theta} + H_{s\phi})$ .

Para a paridade ímpar os campos incidentes são dados por:

$$\vec{E}_i = \sum_{n,m}^{\infty} g_{nTE}^m [A_1(\theta, \phi) Z_n(ka) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \phi) Z_n(ka) \hat{e}_\phi] \quad (3.25)$$

$$\vec{H}_i = \frac{-ki}{\omega\mu} \sum_{n,m}^{\infty} g_{nTE}^m \{B_1(\theta, \phi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \phi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\phi\} \quad (3.26)$$

os campos internos por:

$$\vec{E}_d = \sum_{n,m}^{\infty} c_n^m [A_1(\theta, \phi) Z_n(ka) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \phi) Z_n(ka) \hat{e}_\phi] \quad (3.27)$$

$$\vec{H}_d = \frac{-ki}{\omega\mu_1} \sum_{n,m}^{\infty} c_n^m \{B_1(\theta, \phi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \phi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\phi\} \quad (3.28)$$

e os campos das ondas espalhadas por:

$$\vec{E}_s = \sum_{n,m}^{\infty} -b_n^m [A_1(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\varphi] \quad (3.29)$$

$$\vec{H}_s = \frac{ki}{\omega\mu} \sum_{n,m}^{\infty} b_n^m \{B_1(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\varphi\} \quad (3.30)$$

onde  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  e  $B_2$  expressam as dependências em  $\theta$  e  $\varphi$  dos  $M$ 's e  $N$ 's.

Definindo  $x = ka = 2\pi Na/\lambda$  como o parâmetro de tamanho e  $M = k_1/k = N_1/N$  como o índice de refração relativo, onde  $N$  é o índice de refração do meio,  $N_1$  o índice de refração da partícula,  $a$  o raio da partícula e  $\lambda$  o comprimento de onda, temos que a continuidade dos campos elétricos leva a:

$$\begin{aligned} [A_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] g_{nTE}^m j_n(x) &= [A_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] c_n^m j_n(Mx) \\ &+ [A_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] b_n^m h_n^1(x) \Rightarrow \\ g_{nTE}^m j_n(x) &= j_n(Mx) c_n^m + h_n^1(x) b_n^m \quad (3.31) \end{aligned}$$

Repetindo para os campos magnéticos:

$$\begin{aligned} [B_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{g_{nTE}^m}{\mu} [x j_n(x)]' &= [B_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{1}{\mu_1} [c_n^m [Mx j_n(Mx)]' \\ &+ [B_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{1}{\mu_1} [b_n^m [x h_n^1(x)]'] \Rightarrow \\ \frac{g_{nTE}^m}{\mu} [x j_n(x)]' &= \frac{c_n^m}{\mu_1} [Mx j_n(Mx)]' + \frac{b_n^m}{\mu_1} [x h_n^1(x)]' \quad (3.32) \end{aligned}$$

Multiplicando por  $\mu\mu_1$  obtemos:

$$\mu_1 [x j_n(x)]' g_{nTE}^m = \mu [Mx j_n(Mx)]' c_n^m + \mu_1 [x h_n^1(x)]' b_n^m \quad (3.33)$$

Repetindo para a paridade par:

$$\vec{E}_i = -i \sum_{n,m}^{\infty} g_{nTM}^m \{C_1(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\theta + C_2(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\varphi\} \quad (3.34);$$

$$\vec{H}_i = \frac{-k}{\omega\mu} \sum_{n,m}^{\infty} g_{nTM}^m [D_1(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\theta + D_2(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\varphi] \quad (3.35);$$

$$\vec{E}_d = -i \sum_{n,m}^{\infty} d_n^m \{C_1(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\theta + C_2(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\varphi\} \quad (3.36);$$

$$\vec{H}_d = \frac{-k}{\omega \mu_1} \sum_{n,m}^{\infty} d_n^m [D_1(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\theta + D_2(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\varphi] \quad (3.37);$$

$$\vec{E}_s = i \sum_{n,m}^{\infty} a_n^m [A_1(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\theta + A_2(\theta, \varphi) Z_n(ka) \hat{e}_\varphi] \quad (3.38);$$

$$\vec{H}_s = \frac{ki}{\omega \mu} \sum_{n,m}^{\infty} a_n^m \{ B_1(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\theta + B_2(\theta, \varphi) \frac{1}{ka} \frac{d}{dka} [ka Z_n(ka)] \hat{e}_\varphi \} \quad (3.39);$$

A continuidade dos campos elétricos leva a:

$$\begin{aligned} [C_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + C_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{\mathcal{G}_{nTM}^m}{k} [x j_n(x)]' &= [C_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + C_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \\ d_n^m \frac{1}{k_1} [Mx j_n(Mx)]' + [C_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + C_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] a_n^m \frac{1}{k} [x h_n^1(x)]' &\Rightarrow \\ \frac{\mathcal{G}_{nTM}^m}{k} [x j_n(x)]' &= d_n^m \frac{1}{k_1} [Mx j_n(Mx)]' + a_n^m \frac{1}{k} [x h_n^1(x)]' \quad (3.40) \end{aligned}$$

Multiplicando por  $k_1$ :

$$M[x j_n(x)]' \mathcal{G}_{nTM}^m = [Mx j_n(Mx)]' d_n^m + M[x h_n^1(x)]' a_n^m \quad (3.41)$$

Já a continuidade dos campos magnéticos:

$$\begin{aligned} [D_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + D_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{k}{\mu} \mathcal{G}_{nTM}^m j_n(x) &= [D_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + D_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{k_1}{\mu_1} d_n^m j_n(Mx) \\ &+ [D_1(\theta, \varphi) \hat{e}_\theta + D_2(\theta, \varphi) \hat{e}_\varphi] \frac{k}{\mu} a_n^m h_n^1(x) \Rightarrow \\ \frac{k}{\mu} \mathcal{G}_{nTM}^m j_n(x) &= \frac{k_1}{\mu_1} d_n^m j_n(Mx) + \frac{k}{\mu} a_n^m h_n^1(x) \quad (3.42) \end{aligned}$$

Multiplicando por  $\mu \mu_1$  e dividindo por  $k$ ,

$$\mu_1 j_n(x) \mathcal{G}_{nTM}^m = M \mu j_n(Mx) d_n^m + \mu_1 h_n^1(x) a_n^m \quad (3.43)$$

Dessa forma, no final ficamos com quatro equações para determinar quatro coeficientes desconhecidos, das ondas interior e espalhada, em termos dos coeficientes da onda incidente, supostamente conhecidos:

$$j_n(x) \mathcal{G}_{nTE}^m = j_n(Mx) c_n^m + h_n^1(x) b_n^m \quad (3.44)$$

$$\mu_1 [x j_n(x)]' \mathcal{G}_{nTE}^m = \mu [Mx j_n(Mx)]' c_n^m + \mu_1 [x h_n^1(x)]' b_n^m \quad (3.45)$$

$$M[x j_n(x)]' \mathcal{G}_{nTM}^m = [Mx j_n(Mx)]' d_n^m + M[x h_n^1(x)]' a_n^m \quad (3.46)$$

$$\mu_1 j_n(x) g_{nTM}^m = M \mu j_n(Mx) d_n^m + \mu_1 h_n^1(x) a_n^m \quad (3.47)$$

Essas equações podem ser resolvidas duas a duas e independentemente para cada paridade, com as duas primeiras determinando os coeficientes  $c$  e  $b$ ; e as duas últimas os coeficientes  $a$  e  $d$ . Para achar  $c$ , multiplicamos a primeira equação por  $-\mu_1 [x h_n^1(x)]'$ , a segunda por  $h_n^1(x)$  e somamos:

$$\begin{aligned} -\mu_1 [x h_n^1(x)]' j_n(x) g_{nTE}^m &= -\mu_1 [x h_n^1(x)]' j_n(Mx) c_n^m - \mu_1 [x h_n^1(x)]' h_n^1(x) b_n^m \\ \mu_1 h_n^1(x) [x j_n(x)]' g_{nTE}^m &= \mu h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]' c_n^m + \mu_1 h_n^1(x) [x h_n^1(x)]' b_n^m \Rightarrow \\ \mu_1 g_{nTE}^m \{ [x j_n(x)]' h_n^1(x) - [x h_n^1(x)]' j_n(x) \} &= c_n^m \{ \mu h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]' - \mu_1 [x h_n^1(x)]' j_n(Mx) \} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} c_n^m &= \frac{\mu_1 g_{nTE}^m \{ [x j_n(x)]' h_n^1(x) - [x h_n^1(x)]' j_n(x) \}}{\{ \mu h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]' - \mu_1 [x h_n^1(x)]' j_n(Mx) \}} \Rightarrow \\ c_n &= \frac{c_n^m}{g_{nTE}^m} = \frac{\mu_1 \{ [j_n(x) x h_n^1(x)]' - h_n^1(x) [x j_n(x)]' \}}{\{ \mu_1 j_n(Mx) [x h_n^1(x)]' - \mu h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]' \}} \quad (3.48) \end{aligned}$$

Repetindo para os outros termos obtemos:

$$a_n = \frac{a_n^m}{g_{nTM}^m} = \frac{\{ \mu M^2 j_n(Mx) [x j_n(x)]' - \mu_1 j_n(x) [Mx j_n(Mx)]' \}}{\mu M^2 j_n(Mx) [x h_n^1(x)]' - \mu_1 h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]'} \quad (3.49)$$

$$d_n = \frac{d_n^m}{g_{nTM}^m} = \frac{\mu_1 \{ M j_n(x) [x h_n^1(x)]' - M h_n^1(x) [x j_n(x)]' \}}{\mu M^2 j_n(Mx) [x h_n^1(x)]' - \mu_1 h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]'} \quad (3.50)$$

$$b_n = \frac{b_n^m}{g_{nTE}^m} = \frac{\{ \mu_1 j_n(Mx) [x j_n(x)]' - \mu j_n(x) [Mx j_n(Mx)]' \}}{\mu_1 j_n(Mx) [x h_n^1(x)]' - \mu h_n^1(x) [Mx j_n(Mx)]'} \quad (3.51)$$

que são coeficientes de Mie, e independentes de  $m$ .

### 3.1.4 Expansão de uma Onda Plana em Função dos Vetores Harmônicos Esféricos

Usando os resultados da seção 3.1.2 podemos decompor os campos elétricos e magnéticos uma onda plana incidente em ondas parciais. Assumindo  $\vec{E}$  e  $\vec{H}$  como  $\vec{E} = E_0 e^{ikz} \hat{e}_x$  e  $\vec{H} = (-i/\mu\omega) E_0 \nabla \times e^{ikz} \hat{e}_x = (kE_0/\mu\omega) e^{ikz} \hat{e}_y$ . Temos,

$$\vec{r} \cdot \vec{E} = E_0 e^{ikz} x = E_0 e^{ikr \cos \theta} r \sin \theta \cos \varphi = \frac{iE_0}{k} \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) \cos \varphi \quad (3.52)$$

$$\vec{r} \cdot \vec{H} = \frac{k}{\mu\omega} E_0 e^{ikz} y = \frac{k}{\mu\omega} E_0 e^{ikr \cos \theta} r \sin \theta \sin \varphi = \frac{iE_0}{\mu\omega} \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) \sin \varphi \quad (3.53)$$

Assim,

$$Z_n(kr)B_{nm} = \frac{k(2n+1)}{(n+m)!} \frac{(n-m)!}{2\pi n(n+1)} \int \frac{iE_0}{k} \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) \cos \varphi \psi_{nm}^* \sin \theta d\theta d\varphi \quad (3.54).$$

Se  $\psi_{nm} = P_n^m(\cos \theta) \sin m\varphi$ , temos  $\int_0^{2\pi} \cos \varphi \sin m\varphi d\varphi = 0$ . Por outro lado com

$\psi_{nm} = P_n^m(\cos \theta) \cos m\varphi$ ,  $\int_0^{2\pi} \cos \varphi \cos m\varphi d\varphi = \pi \delta_{m,1}$ , onde  $\delta$  representa a função delta de

Kronecker. Dessa forma, ficamos com:

$$Z_n(kr)B_{1n} = \frac{iE_0\pi}{k} \frac{k(2n+1)}{(n+1)!} \frac{(n-1)!}{2\pi n(n+1)} \int_0^\pi \sin \theta P_n^1(\cos \theta) \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) d\theta \quad (3.55)$$

e integrando por partes,

$$Z_n(kr)B_{1n} = -\frac{iE_0\pi}{k} \frac{k(2n+1)}{(n+1)!} \frac{(n-1)!}{2\pi n(n+1)} \int_0^\pi e^{ikr \cos \theta} \left[ \frac{d}{d\theta} [\sin \theta P_n^1(\cos \theta)] d\theta \right] \quad (3.56).$$

Usando novamente a equação diferencial dos polinômios de Legendre, temos:

$$Z_n(kr)B_{1n} = -\frac{iE_0(2n+1)}{[n(n+1)]^2} \frac{n(n+1)}{2} \int_0^\pi e^{ikr \cos \theta} P_n^1(\cos \theta) \sin \theta d\theta \quad (3.57).$$

Entretanto,  $\int_0^\pi e^{ikr \cos \theta} P_n^1(\cos \theta) \sin \theta d\theta = \frac{2}{(-i)^n} j_n(kr)$ , tal que

$$Z_n(kr)B_{1n} = -\frac{iE_0(2n+1)}{[n(n+1)]^2} \frac{n(n+1)}{2} \frac{2}{(-i)^n} j_n(kr) \quad (3.58),$$

e portanto, no final temos  $B_{1n} = -\frac{i(i)^n E_0(2n+1)}{n(n+1)}$  para  $\psi_{nm}$  par e  $B_{1n} = 0$  para  $\psi_{nm}$  ímpar.

Já,

$$\begin{aligned} Z_n(kr)A_{nm} &= \frac{i\mu\omega}{2\pi n(n+1)} \frac{(2n+1)(n-m)!}{(n+m)!} \int \frac{iE_0}{\mu\omega} \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) \sin \varphi \psi_{nm}^* \sin \theta d\theta d\varphi = \\ &= -\frac{E_0}{2\pi n(n+1)} \frac{(2n+1)(n-m)!}{(n+m)!} \int \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) \sin \varphi \psi_{nm}^* \sin \theta d\theta d\varphi \quad (3.59) \end{aligned}$$

e agora temos que se  $\psi_{nm} = P_n^m(\cos \theta) \sin m\varphi$ ,  $\int \sin \varphi \sin m\varphi d\varphi = \pi \delta_{m,1}$ , porém se  $\psi_{nm} = P_n^m(\cos \theta) \cos m\varphi$ ,  $\int \sin \varphi \cos m\varphi d\varphi = 0$ . Portanto,

$$\begin{aligned} Z_n(kr)A_{1n} &= -\frac{\pi E_0}{2\pi n(n+1)} \frac{(2n+1)(n-1)!}{(n+1)!} \int \sin \theta P_n^1(\cos \theta) \left(\frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta}\right) d\theta = \\ &= \frac{E_0(2n+1)}{2[n(n+1)]^2} \int \left(\frac{d}{d\theta} [\sin \theta P_n^1(\cos \theta)]\right) e^{ikr \cos \theta} d\theta = \\ &= \frac{E_0(2n+1)}{2[n(n+1)]^2} n(n+1) \int_0^\pi e^{ikr \cos \theta} P_n^1(\cos \theta) \sin \theta d\theta = \frac{E_0(2n+1)}{n(n+1)} \frac{1}{(-i)^n} j_n(kr) \quad (3.60) \end{aligned}$$

e desse modo,

$$Z_n(kr)A_{1n} = \frac{E_0(2n+1)}{n(n+1)} \frac{1}{(-i)^n} j_n(kr) \Rightarrow A_{1n} = \frac{(i)^n E_0(2n+1)}{n(n+1)} \text{ para } \psi_{nm} \text{ ímpar e } A_{1n} = 0 \text{ para } \psi_{nm} \text{ par.}$$

No fim dos cálculos, vemos que o campo  $\vec{E}$  é dado por:

$$\begin{aligned} \vec{E} &= \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(i)^n E_0(2n+1)}{n(n+1)} \vec{M}_{o1n} - \frac{i(i)^n E_0(2n+1)}{n(n+1)} \vec{N}_{e1n} = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(i)^n (2n+1)}{n(n+1)} (\vec{M}_{o1n} - i\vec{N}_{e1n}) \Rightarrow \\ \vec{E}_i &= \sum_{n=1}^{\infty} E_n (\vec{M}_{o1n} - i\vec{N}_{e1n}) \quad (3.61) \end{aligned}$$

Para encontrar  $\vec{H}$  basta aplicar  $\vec{H} = (-i/\mu\omega)\nabla \times \vec{E}$ :

$$\begin{aligned} \vec{H} &= \left(\frac{-iE_0}{\mu\omega}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(i)^n (2n+1)}{n(n+1)} \nabla \times [(\vec{M}_{o1n} - i\vec{N}_{e1n})] = \left(\frac{-iE_0}{\mu\omega}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(i)^n (2n+1)}{n(n+1)} (\nabla \times \vec{M}_{o1n} - i\nabla \times \vec{N}_{e1n}) \\ \vec{H} &= \left(\frac{-iE_0}{\mu\omega}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(i)^n (2n+1)}{n(n+1)} (k\vec{N}_{o1n} - ik\vec{M}_{e1n}) = -\frac{kE_0}{\mu\omega} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(i)^n (2n+1)}{n(n+1)} (\vec{M}_{e1n} + i\vec{N}_{o1n}) \Rightarrow \\ \vec{H}_i &= -\frac{k}{\mu\omega} \sum_{n=1}^{\infty} E_n (\vec{M}_{e1n} + i\vec{N}_{o1n}) \quad (3.62) \end{aligned}$$

### 3.1.5 Cálculos dos Coeficientes de Mie para Ondas Planas

Comparando as expressões para os campos elétrico e magnéticos incidentes calculado para onda plana com os definidos na seção 3.1.3 e definindo os campos espalhados e interior como:

$$\vec{E}_d = \sum_{n=1}^{\infty} E_n (c_n \vec{M}_{o1n}^1 - i d_n \vec{N}_{e1n}^1) \text{ e } \vec{H}_d = -\frac{k_1}{\mu_1 \omega} \sum_{n=1}^{\infty} E_n (d_n \vec{M}_{e1n}^1 + i c_n \vec{N}_{o1n}^1) \quad (3.63)$$

$$\vec{E}_s = \sum_{n=1}^{\infty} E_n (i a_n \vec{N}_{e1n}^3 - b_n \vec{M}_{o1n}^3) \text{ e } \vec{H}_s = \frac{k}{\mu \omega} \sum_{n=1}^{\infty} E_n (a_n \vec{M}_{e1n}^3 + i b_n \vec{N}_{o1n}^3) \quad (3.64)$$

onde, os índices “1” e “3” também representam as funções  $Z_n(kr) = j_n(kr)$  e  $Z_n(kr) = h_n^1(kr)$ . Vemos então que, os coeficientes de Mie definidos na seção 3.1.3 aparecem naturalmente na decomposição da onda plana:  $g_{nTE}^m = g_{nTM}^m = E_n$ ,  $c_n^m = E_n c_n$ ,  $d_n^m = E_n d_n$ ,  $a_n^m = E_n a_n$  e  $b_n^m = E_n b_n$ .

### 3.1.6 “MDR modes”

Os valores de  $x$ 's para os quais os denominadores são exatamente nulos são chamados frequências naturais da esfera, são complexos e os modos normais associados são denominados modos virtuais. Como os denominadores não possuem raízes reais, as ressonâncias acontecem para as raízes complexas em que a parte imaginária é bem menor que a parte real, ou em outras palavras, para valores de  $x$  real em que os valores absolutos dos denominadores passam por mínimos. Esses modos dão origem a picos de ressonância que tanto podem ser vistos através de espectros de radiação retroespalhada como através do monitoramento do espalhamento Raman, da fluorescência e da força de pressão de radiação da pinça óptica. Suas posições espectrais são sempre as mesmas não importando o tipo de medida realizada. Para as ondas espalhadas, quando  $a_n = 0$ , o campo elétrico espalhado é da forma

$$\vec{E}_s = \sum_{n=1}^{\infty} E_n (b_n \vec{M}_{o1n}^3),$$

sem componente radial, só existindo modos TE. No outro caso, quando  $b_n = 0$ , no qual

$$\vec{H}_s = -\frac{k}{\mu \omega} \sum_{n=1}^{\infty} E_n (a_n \vec{M}_{e1n}^3) \text{ não tem componente radial e } \vec{E}_s = \sum_{n=1}^{\infty} E_n (i a_n \vec{N}_{e1n}^3) \text{ só existirá os}$$

modos TM.

Intuitivamente podemos interpretar as ressonâncias de duas maneiras. A primeira é através da óptica geométrica, onde a luz fica confinada por um pequeno



tempo dentro de uma esfera devido às múltiplas reflexões que ocorrem na superfície interna. A outra maneira, segundo Nussenzveig [31], é através da associação da óptica com a trajetória de uma partícula na mecânica clássica, ou mesmo na mecânica quântica, quando se consideram efeitos de interferência e tunelamento. A analogia da trajetória de um raio da óptica geométrica com a trajetória de uma partícula sujeita a um campo de forças na mecânica clássica é direta. Basicamente podemos mostrar que sempre existirá um potencial para o qual as duas trajetórias, do raio da óptica geométrica e da partícula no campo de forças, serão idênticas. Isso pode ser mostrado através dos dois princípios de ação mínima, o de Fermat da óptica geométrica, que afirma que:

$$\int_{s_1}^{s_2} n(\vec{r}) ds \text{ é mínima (3. 65),}$$

onde  $n(\vec{r})$  é o índice de refração dependente da posição  $\vec{r}$  e  $ds$  é o deslocamento infinitesimal ao longo da trajetória do raio, e o princípio da ação mínima para o movimento de uma partícula em um campo de forças conservativo, que afirma que:

$$\int_{t_1}^{t_2} T dt \text{ (3. 66),}$$

sujeita à restrição de que a conservação da energia mecânica,  $T + V = E$ , é mínima [32], onde  $T$  é a energia cinética e  $V$  a energia potencial.

Mudando da variável tempo para a variável  $s$  que representa o deslocamento ao longo da trajetória da partícula, temos que  $ds^2 = dx^2 + dy^2 + dz^2$  e

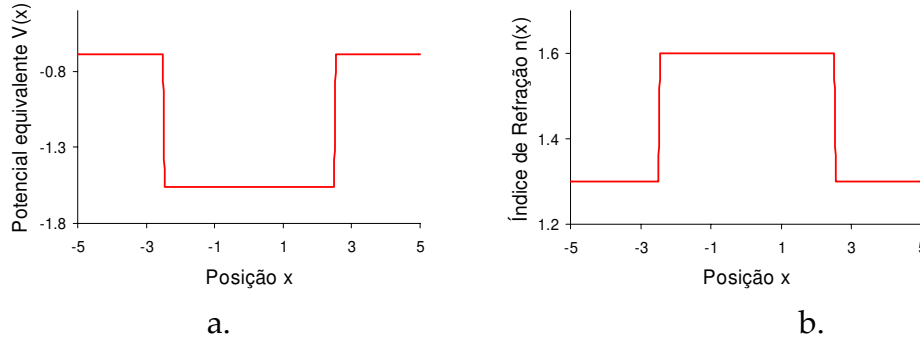
$T = m[(\dot{x})^2 + (\dot{y})^2 + (\dot{z})^2]/2 = [m(ds/dt)^2]/2$ . Assim:

$$\int_{t_1}^{t_2} T dt = \int_{t_1}^{t_2} \frac{m}{2} \left( \frac{ds}{dt} \right) \frac{ds}{dt} dt = \int_{s_1}^{s_2} \frac{m}{2} \left( \frac{ds}{dt} \right) ds \text{ (3. 67)}$$

A conservação da energia, por outro lado, é expressa como:  $\frac{m}{2} \left( \frac{ds}{dt} \right)^2 + V = E \Rightarrow \frac{ds}{dt} = \sqrt{\frac{2}{m}(E - V)}$ . Substituindo na equação 3.65 obtemos que a integral  $\int_{s_1}^{s_2} \sqrt{\frac{m}{2}(E - V)} ds$  deve ser mínima, ou, extraindo a constante  $\sqrt{\frac{mE}{2}}$ , que

$$\int_{s_1}^{s_2} \sqrt{1 - \frac{V}{E}} ds \text{ é mínima (3.68).}$$

As integrais (3.66) e (3.67) serão idênticas se  $n(\vec{r}) = \sqrt{1 - V/E}$ , logo o potencial  $V(\vec{r}) = E[1 - n^2(\vec{r})]$  dá origem uma trajetória da partícula idêntica a trajetória do raio de luz. Nota-se que o potencial será atrativo para regiões com maior índice de refração. Figura 1 a e b mostra o exemplo do potencial equivalente em uma região que apresenta descontinuidade no índice de refração entre as posições  $-L/2$  e  $+L/2$ , situação típica de uma partícula homogênea embebida em outro meio, também homogêneo.



**Figura 65.** Potencial equivalente.

O caso de uma partícula esférica, na qual  $n(\vec{r}) = n(r)$ , onde  $r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$ , corresponde ao caso do movimento da partícula em um campo de força central. Se o potencial é tal que  $\phi(\vec{r}) = \phi(r)$ , então  $F = \phi'(r)\vec{e}_r$  e  $\frac{d\vec{L}}{dt} = \vec{\tau} = \vec{r} \times \vec{F} = 0$ , ou seja, o momento angular  $\vec{L}$  se conserva. Como,

$$\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p} = m r \vec{e}_r \times \dot{\vec{r}} = m r \vec{e}_r \times (\dot{r} \vec{e}_r + r \dot{\theta} \vec{e}_\theta) = m r^2 \dot{\theta} (\vec{e}_r \times \vec{e}_\theta) = m r^2 \dot{\theta} \vec{e}_z \text{ e}$$

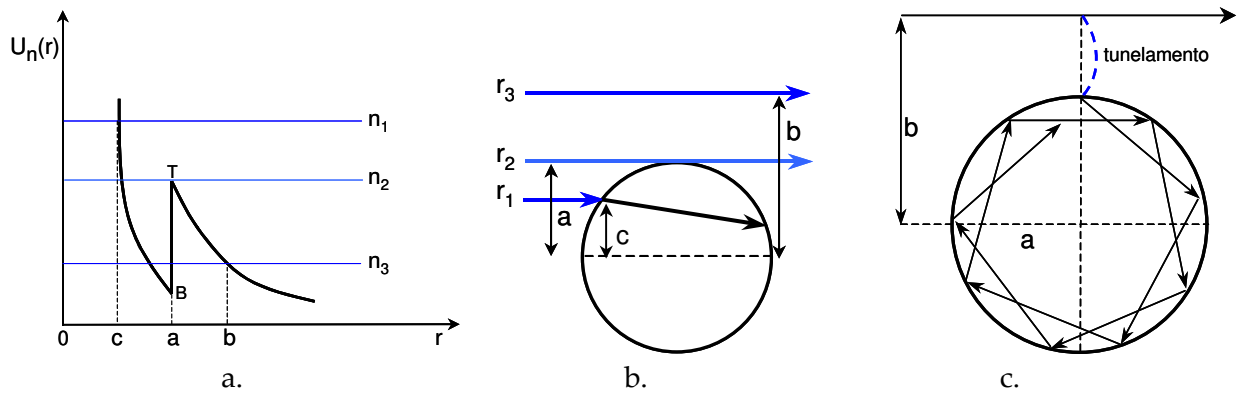
$$T = \frac{m \dot{\vec{r}}^2}{2} = \frac{m}{2} (\dot{r}^2 + r^2 \dot{\theta}^2) = \frac{m \dot{r}^2}{2} + \frac{m r^2 \dot{\theta}^2}{2} = \frac{m \dot{r}^2}{2} + \frac{m^2 r^4 \dot{\theta}^2}{2 m r^2} = \frac{m \dot{r}^2}{2} + \frac{L^2}{2 m r^2},$$

Temos,

$$E = \frac{m \dot{r}^2}{2} + \frac{L^2}{2 m r^2} + \phi(r) = \frac{m \dot{r}^2}{2} + \phi_{ef}(r),$$

onde  $\phi_{ef}(r) = \phi(r) + \frac{L^2}{2 m r^2} = \phi(r) + \frac{l(l+1)\hbar^2}{2 m r^2}$  é o potencial efetivo que permite estados ligados e também tunelamento.

Estendendo essa analogia entre a óptica geométrica e a mecânica clássica para uma analogia entre a óptica geométrica-ondulatória e a mecânica quântica, podemos relacionar o índice  $n$  dos coeficientes de Mie com o número quântico principal e as autofunções com os próprios coeficientes de Mie  $a_n$  e  $b_n$ . O índice  $n$  também representa o número de nodos das autofunções. Também podemos dizer que nessa associação com a mecânica quântica, a luz está sujeita a um potencial efetivo que é composto por um poço de potencial quadrado que representa a própria esfera somado a uma barreira centrífuga, assim como ilustra a Figura 66 a, onde  $a$  é o raio da esfera. Associando a largura das ressonâncias com a largura do poço podemos concluir que a largura das ressonâncias decresce com  $n$ .



**Figura 66.** Analogia dos modos de Mie com a mecânica quântica.

De acordo com o princípio da localização de Van de Hulst que veremos um pouco mais adiante, podemos associar o número  $n$  de um modo de ressonância a um raio que passa pela partícula na distância  $kr = (n + \frac{1}{2})$  de seu centro. Vamos então associar aos números de modos  $n_1$ ,  $n_2$  e  $n_3$  da Figura 66 b a raios que passam respectivamente nas distâncias  $r_1 = c$ ,  $r_2 = a$  e  $r_3 = b$  do centro da esfera. Ou seja, o raio  $c$  cruza a esfera, o raio  $a$  é tangente a sua borda e o raio  $b$  passa por fora da esfera. Porém, apenas os modos que estão entre T e B são do nosso interesse, pois somente esses correspondem às ressonâncias de Mie. Vamos analisar então o raio  $b$  na Figura 66 c. Assim como para partículas (tais como elétrons) na mecânica quântica, o raio  $b$  tem que tunelar pela barreira centrífuga e atravessar a região proibida entre  $a$  e  $b$  para atingir o

interior da esfera. Uma vez dentro do poço, uma partícula sofre reflexões entre as paredes a e c até que tunele novamente para fora da barreira de potencial. Essa situação justamente corresponde a raios que sofrem múltiplas reflexões no interior da esfera até que tunelem novamente para fora da mesma e dêem origem aos conhecidos modos ou ressonâncias de Mie.

### 3.1.7 Cálculo das Eficiências de Ressonâncias de Mie

A eficiência  $Q$  das ressonâncias de Mie representa o comportamento da seção de choque em função do comprimento de onda, ou do parâmetro de tamanho, e é definida por  $Q = C/\pi a^2$ , onde  $C$  é a seção de choque, definida como  $C_s = W_s/I_s$  com  $W_s$  sendo a taxa de energia eletromagnética que atravessa uma superfície e  $I_s$  a irradiância incidente. Para calcular a seção de choque para uma onda retroespalhada, usamos:

$$W = \frac{1}{2} \text{Re} \int \vec{E} \times \vec{H} d\Omega \quad (3.69),$$

onde  $\vec{E} \times \vec{H} = \vec{S}$  é o vetor de Poynting. Decompondo  $\vec{E}$  e  $\vec{H}$  em coordenadas esféricas  $\vec{E} = E_r \hat{e}_r + E_\theta \hat{e}_\theta + E_\phi \hat{e}_\phi$  e  $\vec{H} = H_r \hat{e}_r + H_\theta \hat{e}_\theta + H_\phi \hat{e}_\phi$ , temos que  $\vec{S} = E_\theta H_\phi \hat{e}_r - E_\phi H_\theta \hat{e}_r +$  componentes tangenciais que não interessam no caso da onda espalhada. Assim,

$$W_s = \frac{1}{2} \text{Re} \int (E_\theta H_\phi - E_\phi H_\theta) r^2 \sin \theta d\theta d\phi \quad (3.70)$$

Assumindo os campos elétrico e magnético espalhados como,

$$\vec{E}_s = \sum_{n,m} \alpha_{nm} (a_{enm} \vec{M}_{enm} - a_{onm} \vec{M}_{onm} - ib_{enm} \vec{N}_{enm} - ib_{onm} \vec{N}_{onm}) \quad (3.71)$$

$$\vec{H}_s^* = -\frac{k}{\mu\omega} \sum_{n',m'} \alpha_{n'm'}^* (b_{en'm'}^* \vec{M}_{en'm'}^* + b_{on'm'}^* \vec{M}_{on'm'}^* - ia_{en'm'}^* \vec{N}_{en'm'}^* - ia_{on'm'}^* \vec{N}_{on'm'}^*) \quad (3.72)$$

obtemos,

$$\begin{aligned} \vec{E}_{s\theta} = \sum_{n,m} \alpha_{nm} \{ & -a_{enm} \frac{m P_n^m}{\sin \theta} \sin m\phi h_n(\rho) + a_{onm} \frac{m P_n^m}{\sin \theta} \cos m\phi h_n(\rho) \\ & -ib_{enm} \frac{dP_n^m}{d\theta} \cos m\phi \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} - ib_{onm} \frac{dP_n^m}{d\theta} \sin m\phi \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} \} \end{aligned} \quad (3.73)$$

$$H_{s\varphi}^* = \frac{-k}{\mu\omega} \sum_{n',m'} \alpha_{n',m'}^* \{b_{en'm'}^* \frac{dP_{n'}^{m'}}{d\theta} \cos m'\varphi h_{n'}^*(\rho) - b_{on'm'}^* \frac{dP_{n'}^{m'}}{d\theta} \sin m'\varphi h_{n'}^*(\rho) \\ + ia_{en'm'}^* \frac{m'P_{n'}^{m'}}{\sin \theta} \sin m'\varphi \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} + ia_{on'm'}^* \frac{m'P_{n'}^{m'}}{\sin \theta} \cos m'\varphi \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho}\} \quad (3.74)$$

$$\bar{E}_{s\varphi} = \sum_{nm} \alpha_{nm} \{-a_{enm} \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \cos m\varphi h_n(\rho) - a_{onm} \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \sin m\varphi h_n(\rho) \\ + ib_{enm} \frac{dP_n^m}{d\theta} \sin m\varphi \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} - ib_{onm} \frac{dP_n^m}{d\theta} \cos m\varphi \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho}\} \quad (3.75)$$

$$H_{s\theta}^* = \frac{-k}{\mu\omega} \sum_{n',m'} \alpha_{n',m'}^* \{b_{en'm'}^* \frac{dP_{n'}^{m'}}{d\theta} \sin m'\varphi h_{n'}^*(\rho) - b_{on'm'}^* \frac{dP_{n'}^{m'}}{d\theta} \cos m'\varphi h_{n'}^*(\rho) \\ + ia_{en'm'}^* \frac{m'P_{n'}^{m'}}{\sin \theta} \cos m'\varphi \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} + ia_{on'm'}^* \frac{m'P_{n'}^{m'}}{\sin \theta} \sin m'\varphi \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho}\} \quad (3.76).$$

Agora, podemos integrar em  $\varphi$  e utilizar o fato de que:

$$\int_0^{2\pi} \cos m\varphi \cos m'\varphi d\varphi = (1 + \delta_{m0})\pi\delta_{mm'}, \quad \int_0^{2\pi} \sin m\varphi \sin m'\varphi d\varphi = (1 - \delta_{m0})\pi\delta_{mm'} \text{ e} \\ \int_0^{2\pi} \cos m\varphi \sin m'\varphi d\varphi = 0 = \int_0^{2\pi} \sin m\varphi \cos m'\varphi d\varphi \quad (3.77)$$

temos,

$$\int_0^{2\pi} \bar{E}_{s\theta} \bar{H}_{s\varphi}^* d\varphi = -\frac{\pi k}{\mu\omega} \sum_{n,n',m} \alpha_{nm} \alpha_{n',m}^* \{-a_{enm} b_{on'm}^* (1 - \delta_{m0}) \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} h_n(\rho) h_{n'}^*(\rho) + \\ ia_{enm} a_{en'm}^* (1 - \delta_{m0}) \frac{m^2}{\sin^2 \theta} P_n^m P_{n'}^m h_n(\rho) \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} + \\ a_{onm} b_{en'm}^* (1 + \delta_{m0}) \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} h_n(\rho) h_{n'}^*(\rho) + ia_{onm} a_{on'm}^* (1 + \delta_{m0}) \frac{m^2}{\sin^2 \theta} P_n^m P_{n'}^m h_n(\rho) \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \\ - ib_{enm} b_{en'm}^* (1 + \delta_{m0}) \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} h_{n'}^*(\rho) + b_{enm} a_{on'm}^* (1 + \delta_{m0}) \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \\ - ib_{onm} b_{on'm}^* (1 - \delta_{m0}) \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} h_{n'}^*(\rho) - b_{onm} a_{en'm}^* (1 - \delta_{m0}) \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho}\} \quad (3.78)$$

rearrajando os termos,

$$\begin{aligned}
\int_0^{2\pi} \vec{E}_{s\theta} \vec{H}_{s\phi}^* d\phi &= -\frac{\pi k}{\mu\omega} \sum_{n,n',m} \alpha_{nm} \alpha_{n'm}^* \{i[a_{enm} a_{en'm}^* + a_{onm} a_{on'm}^*] h_n(\rho) \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \frac{m^2}{\sin^2 \theta} P_n^m P_{n'}^m \\
&-i[b_{enm} b_{en'm}^* (1+\delta_{m0}) + b_{onm} b_{on'm}^* (1-\delta_{m0})] \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} h_{n'}^*(\rho) \\
&+[-a_{enm} b_{on'm}^* + a_{onm} b_{en'm}^*] \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} h_n(\rho) h_{n'}^*(\rho) + [b_{enm} a_{on'm}^* - b_{onm} a_{en'm}^*] \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \} \\
(3.79)
\end{aligned}$$

e

$$\begin{aligned}
\int_0^{2\pi} \vec{E}_{s\phi} \vec{H}_{s\theta}^* d\phi &= -\frac{\pi k}{\mu\omega} \sum_{n,n',m} \alpha_{nm} \alpha_{n'm}^* \{-i[a_{enm} a_{en'm}^* (1+\delta_{m0}) + a_{onm} a_{on'm}^* (1-\delta_{m0})] h_n(\rho) \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \\
&+i[b_{enm} b_{en'm}^* + b_{onm} b_{on'm}^*] \frac{m^2}{\sin^2 \theta} P_n^m P_{n'}^m \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} h_{n'}^*(\rho) \\
&+[-a_{enm} b_{on'm}^* - a_{onm} b_{en'm}^*] \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} h_n(\rho) h_{n'}^*(\rho) + [-b_{enm} a_{on'm}^* + b_{onm} a_{en'm}^*] \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \} \\
(3.80)
\end{aligned}$$

tal que no final,

$$\begin{aligned}
&\int_0^\pi \int_0^{2\pi} (\vec{E}_{s\theta} \vec{H}_{s\phi}^* - \vec{E}_{s\phi} \vec{H}_{s\theta}^*) \sin \theta d\theta d\phi \\
&= -\frac{\pi k}{\mu\omega} \sum_{n,n',m} \alpha_{nm} \alpha_{n'm}^* \{i[a_{enm} a_{en'm}^* (1+\delta_{m0}) + a_{onm} a_{on'm}^* (1-\delta_{m0})] h_n(\rho) \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \int_0^\pi \left( \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} + \frac{m^2}{\sin^2 \theta} P_n^m P_{n'}^m \right) \sin \theta d\theta \\
&-i[b_{enm} b_{en'm}^* (1+\delta_{m0}) + b_{onm} b_{on'm}^* (1-\delta_{m0})] \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} h_{n'}^*(\rho) \int_0^\pi \left( \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} + \frac{m^2}{\sin^2 \theta} P_n^m P_{n'}^m \right) \sin \theta d\theta \\
&+[-a_{enm} b_{on'm}^* + a_{onm} b_{en'm}^*] h_n(\rho) h_{n'}^*(\rho) \int_0^\pi \left( \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} + \frac{mP_{n'}^m}{\sin \theta} \frac{dP_n^m}{d\theta} \right) \sin \theta d\theta \\
&+[b_{enm} a_{on'm}^* - b_{onm} a_{en'm}^*] \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} \frac{[\rho h_{n'}^*(\rho)]'}{\rho} \int_0^\pi \left( \frac{mP_n^m}{\sin \theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} + \frac{mP_{n'}^m}{\sin \theta} \frac{dP_n^m}{d\theta} \right) \sin \theta d\theta \\
(3.81)
\end{aligned}$$

As integrais em  $\theta$  são de dois tipos:

$$\int_0^\pi \left\{ \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} + \frac{P_n^m P_{n'}^m}{\sin^2 \theta} \right\} \sin \theta \, d\theta = \frac{2n(n+1)}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \delta_{nn'} \quad (3.82) \text{ e}$$

$$\int_0^\pi \left( \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{P_n^m}{\sin \theta} + \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{P_{n'}^m}{\sin \theta} \right) \sin \theta \, d\theta = 0 \quad (3.83)$$

ficamos com,

$$\begin{aligned} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} (\vec{E}_{s\theta} \vec{H}_{s\varphi}^* - \vec{E}_{s\varphi} \vec{H}_{s\theta}^*) \sin \theta \, d\theta \, d\varphi = & -\frac{\pi k}{\mu\omega} \sum_{n,m} \alpha_{nm} \alpha_{nm}^* \{ i [a_{enm} a_{enm}^* (1 + \delta_{m0}) + a_{onm} a_{onm}^* (1 - \delta_{m0})] h_n(\rho) \frac{[\rho h_n^*(\rho)]'}{\rho} \\ & - i [b_{enm} b_{enm}^* (1 + \delta_{m0}) + b_{onm} b_{onm}^* (1 - \delta_{m0})] \frac{[\rho h_n(\rho)]'}{\rho} h_n^*(\rho) \} \frac{2n(n+1)}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \end{aligned} \quad (3.84)$$

de onde podemos notar que quando  $m = 0$ ,  $\int_0^\pi \int_0^{2\pi} (\vec{E}_{s\theta} \vec{H}_{s\varphi}^* - \vec{E}_{s\varphi} \vec{H}_{s\theta}^*) \sin \theta \, d\theta \, d\varphi = 0$ .

Para  $r \rightarrow \infty$ ,  $h_n \sim [(-i)^{n+1}/kr] e^{ikr}$  e então  $h_n^* \sim [(i)^{n+1}/kr] e^{-ikr}$ , tal que  $d/dkr[kr h_n(kr)] \sim [(-i)^{n+1}(i)] e^{ikr}$  e  $d/dkr[kr h_n^*(kr)] \sim [(i)^{n+1}(-i)] e^{-ikr}$ . Dessa forma:

$$\begin{aligned} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} (\vec{E}_{s\theta} \vec{H}_{s\varphi}^* - \vec{E}_{s\varphi} \vec{H}_{s\theta}^*) r^2 \sin \theta \, d\theta \, d\varphi = \\ \frac{\pi}{k\mu\omega} \sum_{m=0}^\infty \sum_{n=m}^\infty |\alpha_{nm}|^2 \frac{2n(n+1)}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \{ (|a_{enm}|^2 + |b_{enm}|^2)(1 + \delta_{m0}) + (|a_{onm}|^2 + |b_{onm}|^2)(1 - \delta_{m0}) \} \end{aligned} \quad (3.85)$$

E portanto,

$$W_s = \frac{\pi}{2k\mu\omega} \sum_{m=0}^\infty \sum_{n=m}^\infty |\alpha_{nm}|^2 \frac{2n(n+1)}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \{ (|a_{enm}|^2 + |b_{enm}|^2)(1 + \delta_{m0}) + (|a_{onm}|^2 + |b_{onm}|^2)(1 - \delta_{m0}) \} \quad (3.86)$$

Para o caso de incidência por onda plana,

$$\alpha_{nm} = E_n = \frac{(i)^n (2n+1) E_0}{n(n+1)} \quad \text{e} \quad |\alpha_{nm}|^2 = |E_n|^2 = |E_0|^2 \frac{(2n+1)^2}{n^2(n+1)^2} \quad (3.87),$$

$m = 1$  e só temos um coeficiente para as função pares que é o  $a_n$  e um coeficiente para a função ímpar que é o  $b_n$ . Então:

$$W_s = \frac{\pi}{2k\mu\omega} \sum_{n=1}^\infty |E_0|^2 \frac{(2n+1)^2}{n^2(n+1)^2} \frac{2n(n+1)}{2n+1} \frac{(n+1)n(n-1)!}{(n-1)!} \{ (|a_n|^2 + |b_n|^2) \}$$

$$W_s = \frac{\pi}{k\mu\omega} \sum_{n=1}^{\infty} |E_0|^2 (2n+1) \{|a_n|^2 + |b_n|^2\} \quad (3.88)$$

Mas,  $I_i = \frac{1}{2} \text{Re}(\vec{E}_i \times \vec{H}_i^*)$ , com  $\vec{E}_i = E_0 e^{ikz} \hat{e}_x$  e  $\vec{H}_i^* = \frac{k}{\mu\omega} E_0 e^{-ikz} \hat{e}_y \Rightarrow$

$$I_i = \frac{|E_0|^2}{2} \frac{k}{\mu\omega} \quad (3.89)$$

então a seção de choque é dada por:

$$C_s = \frac{W_s}{I_i} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \{|a_n|^2 + |b_n|^2\} \quad (3.90)$$

e a eficiência por:

$$Q_s = \frac{C_s}{\pi a^2} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \{|a_n|^2 + |b_n|^2\} \quad (3.91)$$

Há outras definições de eficiência, tais como a de retroespalhamento e a de extinção. Por exemplo, eficiência de retroespalhamento é dada por

$$Q_b = \left| \sum_n (2n+1)(-1)^n (a_n - b_n) \right| / x^2.$$

Vamos agora calcular a seção de choque de pressão de radiação para onda plana. O tensor das tensões de Maxwell e a força são dados por:

$$T_{ij} = E_i D_j + H_i B_j - \frac{1}{2} (\vec{E} \cdot \vec{D} + \vec{H} \cdot \vec{B}) \delta_{ij} \quad (3.92)$$

$$F_i = \oint_S T_{ij} n_j da \quad (3.93)$$

onde S é qualquer superfície que engloba o objeto espalhador. Em particular podemos usar a superfície em  $r \rightarrow \infty$  para meio externo não-absorvente. Como os campos podem ser complexos mas a força tem que ser real, temos que

$$F_i = \text{Re} \oint T_{ij} n_j da = \text{Re} \oint \left[ E_i D_j^* n_j + H_i B_j^* n_j - \frac{1}{2} (\vec{E} \cdot \vec{D}^* + \vec{H} \cdot \vec{B}^*) n_i \right] da \quad (3.94)$$

com,

$$\vec{n} = \hat{e}_r, \quad \vec{D} \cdot \vec{n} = \vec{D}_r^*, \quad \vec{B} \cdot \vec{n} = \vec{B}_r^* \quad \text{e} \quad da = r^2 \sin\theta d\theta d\phi,$$

$$\text{onde } \hat{e}_r = \sin\theta \cos\phi \hat{e}_x + \sin\theta \sin\phi \hat{e}_y + \cos\theta \hat{e}_z \quad (3.95)$$

temos,



$$F_i = \text{Re} \oint \left\{ \varepsilon_2 E_i E_r^* + \mu_2 H_i H_r^* - \frac{1}{2} [\varepsilon \vec{E} \cdot \vec{E}^* + \mu \vec{H} \cdot \vec{H}^*] n_i \right\} da \quad (3.96)$$

Os componentes radiais dos campos, tanto incidente quanto espalhado, levam a função  $Z_n(\rho) \sim e^{\pm i\rho} / \rho^2$ . O elemento de área é proporcional a  $r^2$ , logo qualquer produto com uma das componentes radiais vai com  $F_r F_t \sim 1/\rho^3$  e  $F_r F_t \sim 1/\rho^4$ , assim as relações  $r^2 F_r F_t \sim 1/r$  e  $r^2 F_r F_t \sim 1/r^2$ , se anulam para  $r \rightarrow \infty$ . Dessa forma, os dois primeiros termos na integral  $E_i E_r^*$  e  $H_i H_r^*$  são nulos. Além disso, para  $r \rightarrow \infty$ :

$$\begin{aligned} \vec{E} \cdot \vec{E}^* &= E_r E_r^* + E_\theta E_\theta^* + E_\phi E_\phi^* = E_\theta E_\theta^* + E_\phi E_\phi^* \\ \text{e } \vec{H} \cdot \vec{H}^* &= H_r H_r^* + H_\theta H_\theta^* + H_\phi H_\phi^* = H_\theta H_\theta^* + H_\phi H_\phi^* \end{aligned} \quad (3.97)$$

E então,

$$F_i = \text{Re} \oint \left\{ -\frac{1}{2} [\varepsilon (E_\theta E_\theta^* + E_\phi E_\phi^*) + \mu (H_\theta H_\theta^* + H_\phi H_\phi^*)] n_i \right\} da \quad (3.98)$$

Como o campo elétrico é  $\vec{E} = \vec{E}^{inc} + \vec{E}^{sca}$ ,

$$E_\theta E_\theta^* = [E_\theta^{inc} + E_\theta^{sca}] [E_\theta^{inc*} + E_\theta^{sca*}] = E_\theta^{inc} E_\theta^{inc*} + E_\theta^{inc} E_\theta^{sca*} + E_\theta^{sca} E_\theta^{inc*} + E_\theta^{sca} E_\theta^{sca*} \quad (3.99)$$

Entretanto, o termo  $E_\theta^{inc} E_\theta^{inc*}$  só depende do campo incidente e, portanto, não está relacionado à partícula, logo não deve entrar no cálculo da força. Antes de continuar o cálculo vamos definir as funções reais de  $\theta$ :

$$\pi_n^m = \frac{P_n^m}{\sin \theta} \text{ e } \tau_n^m = \frac{dP_n^m}{d\theta} \quad (3.100).$$

Lembrando que os campos elétricos e magnéticos são:

$$\vec{E}_i = E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [\vec{M}_{o1n}^1 - i\vec{N}_{e1n}^1] = \sum E_n [\vec{M}_{o1n}^1 - i\vec{N}_{e1n}^1] \quad (3.101)$$

$$\vec{H}_i = -\frac{k}{\mu\omega} E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [\vec{M}_{e1n}^1 + i\vec{N}_{o1n}^1] = -\frac{k}{\mu\omega} \sum E_n [\vec{M}_{e1n}^1 + i\vec{N}_{o1n}^1] \quad (3.102)$$

$$\vec{E}_s = E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [ia_n \vec{N}_{e1n}^3 - b_n \vec{M}_{o1n}^3] = \sum E_n [ia_n \vec{N}_{e1n}^3 - b_n \vec{M}_{o1n}^3] \quad (3.103)$$

$$\vec{H}_s = \frac{k}{\mu\omega} E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [ib_n \vec{N}_{o1n}^3 + a_n \vec{M}_{e1n}^3] = \frac{k}{\mu\omega} \sum E_n [ib_n \vec{N}_{o1n}^3 + a_n \vec{M}_{e1n}^3] \quad (3.104)$$

E considerando as formas assintóticas das funções de Bessel,

$$h_n^1(\rho) = (-i)^{n+1} \frac{e^{i\rho}}{\rho}, j_n(\rho) = \frac{1}{2\rho} \left[ (-i)^{n+1} e^{i\rho} + (i)^{n+1} e^{-i\rho} \right] e$$

$$\frac{1}{\rho} \left[ \rho h_n^1(\rho) \right]' = (-i)^n \frac{e^{i\rho}}{\rho}, \frac{1}{\rho} \left[ \rho j_n(\rho) \right]' = \frac{1}{2\rho} \left[ (-i)^n e^{i\rho} + (i)^n e^{-i\rho} \right] \quad (3.105),$$

$$E_{i\theta} = \frac{\cos \varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] + (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] e^{i\rho} \right\} \quad (3.106)$$

$$E_{i\varphi} = \frac{\sin \varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] - (-i)^{n+1} e^{i\rho} [\pi_n + \tau_n] \right\} \quad (3.107)$$

$$E_{s\theta} = \frac{\cos \varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right\} \quad (3.108)$$

$$E_{s\varphi} = \frac{\sin \varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] \right\} \quad (3.109)$$

assim, ficamos com as combinações:

$$E_{i\theta} E_{s\theta}^* = \frac{\cos^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] \left[ a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'} \right] \right. \\ \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] \left[ a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'} \right] \right\} \quad (3.110)$$

$$E_{s\theta} E_{i\theta}^* = \frac{\cos^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right. \\ \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right\} \quad (3.111)$$

$$E_{s\theta} E_{s\theta}^* = \frac{\cos^2 \varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \left[ a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'} \right] \quad (3.112)$$

$$E_{i\varphi} E_{s\varphi}^* = \frac{\sin^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] \left[ a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \tau_{n'} \right] \right. \\ \left. - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] \left[ a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'} \right] \right\} \quad (3.113)$$

$$E_{s\varphi} E_{s\varphi}^* = \frac{\sin^2 \varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] \left[ a_{n'}^* \pi_{n'}^* + b_{n'}^* \tau_{n'}^* \right] \right\} \quad (3.114)$$

$$E_{s\varphi} E_{i\varphi}^* = \frac{\sin^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] \right\} \quad (3.115)$$

Agora já podemos fazer as integrais em  $\varphi$ :

$$\text{Para } F_z \rightarrow \hat{e}_{rz} = \cos \theta \rightarrow \int_0^{2\pi} \cos^2 \varphi d\varphi = \int_0^{2\pi} \sin^2 \varphi d\varphi = \pi, \text{ e para}$$

$$F_x \rightarrow e_{rx} = \sin \theta \cos \varphi \text{ e } F_y \rightarrow e_{ry} = \sin \theta \sin \varphi \Rightarrow \int_0^{2\pi} \cos^2 \varphi \cos \varphi d\varphi = \int_0^{2\pi} \cos^2 \varphi \sin \varphi d\varphi = 0.$$

Portanto, só haverá força em  $z$ , como já sabíamos pela simetria do problema.

Continuando o cálculo de acordo com o apêndice,

$$\begin{aligned} \int_0^{2\pi} (E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^*) d\varphi &= \sum E_n E_{n'}^* \frac{\pi}{2\rho^2} \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2ip} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n - a_n \pi_n - b_n \tau_n] \right\} - \\ &\left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2ip} [\pi_n - \tau_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} - \\ &\left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [a_n \pi_n + b_n \tau_n + a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right\} - \\ &\left\{ (i)^{n+1} (-i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] [a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \right\} + \\ &\left\{ 2(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} \left\{ [a_n \tau_n + b_n \pi_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \right\} + \left\{ [a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'}] [a_n \pi_n + b_n \tau_n] \right\} \right\} \end{aligned} \quad (3.116)$$

Rearranjando os termos de  $E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^*$  e chamando o último de  $I_1$ , temos

$$I_1 = \int d\theta \sin \theta \cos \theta r^2 \sum \frac{\pi}{\rho^2} (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} E_n E_{n'}^* \left\{ [b_n b_{n'}^* + a_n a_{n'}^*] [\tau_n \tau_{n'} + \pi_n \pi_{n'}] + 2a_n b_{n'}^* [\pi_n \tau_{n'} + \tau_n \pi_{n'}] \right\} \quad (3.117)$$

Já os terceiro e quarto termos ficam como  $I_2$ ,

$$I_2 = \int_0^\pi d\theta r^2 \sin \theta \cos \theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} 2\text{Re} \left\{ [a_n + b_n] [\pi_n \pi_{n'} + \tau_n \tau_{n'}] + [a_n + b_n] [\tau_n \pi_{n'} + \pi_n \tau_{n'}] \right\} \right\} \quad (3.118)$$

Só falta agora, definir a integral  $I_3$  que é referente aos primeiros e segundos termos,

$$I_3 = \int_0^\pi d\theta \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2k^2} \sum E_n E_n^* 2 \operatorname{Re} \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} \times \right. \\ \left. \times [a_n \tau_n \pi_{n'} + b_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \tau_n \tau_{n'} + a_n \pi_n \tau_{n'} - b_n \tau_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \tau_{n'} + b_n \tau_n \tau_{n'}] \right\} \quad (3.119)$$

Usando as soluções dessas integrais em  $\theta$  demonstradas por Gouesbet [33], temos,

$$I_1 = \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} a_n b_n^* + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\pi}{k^2} |E_0|^2 \frac{n(n+2)}{(n+1)} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \\ + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\pi}{k^2} |E_0|^2 \frac{(n+1)(n-1)}{n} [b_n b_{n-1}^* + a_n a_{n-1}^*] = \quad (3.120)$$

Na terceira somatória fazemos  $n-1 = n \rightarrow n = n+1$ , pois ela poderia começar de 2 por causa do  $n-1$  e obtemos:

$$I_1 = \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \operatorname{Re} [a_n b_n^*] + \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \operatorname{Re} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \quad (3.121)$$

Agora para  $I_2$ ,

$$I_2 = -\frac{\pi |E_0|^2}{2k^2} \left\{ 2 \operatorname{Re} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n(n+2)}{(n+1)} [a_{n+1} + b_{n+1}] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2(n+1)(n-1)}{n} [a_{n-1} + b_{n-1}] + \sum_{n=1}^{\infty} 2 \left( \frac{2n+1}{n(n+1)} \right) [a_n + b_n] \right\} \right\} \quad (3.122)$$

Fazendo na primeira somatória  $n+1 = n \rightarrow n = n-1$  e na segunda  $n-1 = n \rightarrow n = n+1$ :

$$I_2 = -\frac{2\pi |E_0|^2}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} \operatorname{Re} \{ (2n+1) [a_n + b_n] \} \quad (3.123)$$

Quanto a  $I_3$ , vamos deixá-la por enquanto na sua forma integral.

De maneira similar, temos para o campo magnético  $\vec{H}$ ,

$$H_{i\theta} = \frac{k}{\mu\omega} \frac{\sin\varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] + (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] e^{i\rho} \right\} \quad (3.124)$$

$$H_{i\varphi} = -\frac{k}{\mu\omega} \frac{\cos\varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] - (-i)^{n+1} e^{i\rho} [\pi_n + \tau_n] \right\} \quad (3.125)$$

$$H_{s\theta} = \frac{k}{\mu\omega} \frac{\sin\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right\} \quad (3.126)$$

$$H_{s\varphi} = -\frac{k}{\mu\omega} \frac{\cos\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] \right\} \quad (3.127)$$

e portanto:

$$H_{i\theta} H_{i\theta}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \left( \frac{\sin^2\varphi}{2\rho^2} \right) \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \right. \\ \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \right\} \quad (3.128)$$

$$H_{s\theta} H_{i\theta}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \frac{\sin^2\varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n+1} (-i)^{n'+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right. \\ \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right\} \quad (3.129)$$

$$H_{s\theta} H_{s\theta}^* = \left( \frac{k}{\mu\omega} \right)^2 \frac{\sin^2\varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \tau_n + a_n \pi_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \quad (3.130)$$

$$H_{i\varphi} H_{s\varphi}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \frac{\cos^2\varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \tau_{n'}] \right. \\ \left. - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} \quad (3.131)$$

$$H_{s\varphi} H_{i\varphi}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \frac{\cos^2\varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] \right. \\ \left. - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] \right\} \quad (3.132)$$

$$H_{s\varphi} H_{s\varphi}^* = \left( \frac{k}{\mu\omega} \right)^2 \frac{\cos^2\varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'}^* + a_{n'}^* \tau_{n'}^*] \right\} \quad (3.133)$$

então dessa forma, ficamos com:

$$\int_0^{2\pi} (H_\theta H_\theta^* + H_\varphi H_\varphi^*) d\varphi = \sum E_n E_{n'}^* \frac{\pi}{2\rho^2} \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \left\{ \right. \\ \left. \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [b_n \tau_n + a_n \pi_n - b_n \pi_n - a_n \tau_n] \right\} \right. \\ \left. - \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} \right. \\ \left. - \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [b_n \pi_n + a_n \tau_n + b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right\} \right\}$$

$$\begin{aligned}
& -\left\{(i)^{n+1}(-i)^{n'+1}[\pi_n + \tau_n]\left[b_{n'}^*\pi_{n'} + a_{n'}^*\tau_{n'} + b_{n'}^*\tau_{n'} + a_{n'}^*\pi_{n'}\right]\right\} \\
& + \left\{2(-i)^{n+1}(i)^{n'+1}\left\{[b_n\tau_n + a_n\pi_n]\left[b_{n'}^*\tau_{n'} + a_{n'}^*\pi_{n'}\right]\right\} + \left\{[b_{n'}^*\pi_{n'} + a_{n'}^*\tau_{n'}][b_n\pi_n + a_n\tau_n]\right\}\right\} \quad (3.134)
\end{aligned}$$

tal que as integrais ficam,

$$I_4 = \frac{4\pi}{\mu^2\omega^2}|E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \frac{4\pi}{\mu^2\omega^2}|E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \quad (3.135)$$

$$I_5 = -\frac{2\pi|E_0|^2}{\mu^2\omega^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n + b_n]\} \quad (3.136)$$

$$\begin{aligned}
I_6 = & \int_0^\pi d\theta \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2(\mu\omega)^2} \sum E_n E_{n'}^* 2 \text{Re}\left\{-(-i)^{n'+1}(-i)^{n+1} e^{2i\rho} \times \right. \\
& \times [b_n \tau_n \pi_{n'} + a_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \tau_n \tau_{n'} + b_n \pi_n \tau_{n'} - a_n \tau_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \tau_{n'} + a_n \tau_n \tau_{n'}] \Big\} \quad (3.137)
\end{aligned}$$

Combinando  $I_1$  com  $I_4 = I_7$ ,  $I_2$  com  $I_5 = I_8$  e  $I_3$  com  $I_6 = I_9$ , e de acordo com a expressão de força  $F_i = \text{Re} \oint \left\{ -\frac{1}{2} [\varepsilon (E_\theta E_\theta^* + E_\phi E_\phi^*) + \mu (H_\theta H_\theta^* + H_\phi H_\phi^*)] n_i \right\} da$ , ficamos com:

$$I_7 = \left( \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon + \mu \frac{4\pi}{\mu^2\omega^2} |E_0|^2 \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \quad (3.138)$$

usando a relação  $\vec{k} \cdot \vec{k} = \omega^2 \varepsilon \mu$ :

$$I_7 = \left( \frac{8\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \quad (3.139)$$

$$I_8 = -\frac{4\pi|E_0|^2}{k^2} \varepsilon \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n + b_n]\} \quad (3.140)$$

e agora por último,

$$\begin{aligned}
I_3 + I_6 = & \left( \frac{\pi\varepsilon}{k^2} + \frac{\pi\mu}{\mu^2\omega^2} \right) \int_0^\pi d\theta \sin\theta \cos\theta \sum E_n E_{n'}^* \text{Re}\left\{-(-i)^{n'+1}(-i)^{n+1} e^{2i\rho} \times \right. \\
& [a_n \tau_n \pi_{n'} + b_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \tau_n \tau_{n'} + a_n \pi_n \tau_{n'} - b_n \tau_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \tau_{n'} + b_n \tau_n \tau_{n'}] + \\
& \left. [b_n \tau_n \pi_{n'} + a_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \tau_n \tau_{n'} + b_n \pi_n \tau_{n'} - a_n \tau_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \tau_{n'} + a_n \tau_n \tau_{n'}] \right\} \Rightarrow 0 \quad (3.141)
\end{aligned}$$

Dessa forma, no final dos cálculos a força devido a pressão de radiação é:

$$F = \frac{2\pi|E_0|^2}{k^2} \varepsilon \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re} \{ (2n+1)[a_n + b_n] \} - \left( \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re} [a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \quad (3.142).$$

Definindo a relação entre a força e a seção de choque como  $C = \frac{F}{\varepsilon |E_0|^2}$ , a eficiência para a pressão de radiação de uma onda plana é:

$$Q_{pr} = \frac{C}{\pi a^2} = \frac{2}{k^2 a^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re} \{ (2n+1)[a_n + b_n] \} - \left( \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re} [a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \Rightarrow$$

$$Q_{pr} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re} \{ (2n+1)[a_n + b_n] \} - \left( \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re} [a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \quad (3.143)$$

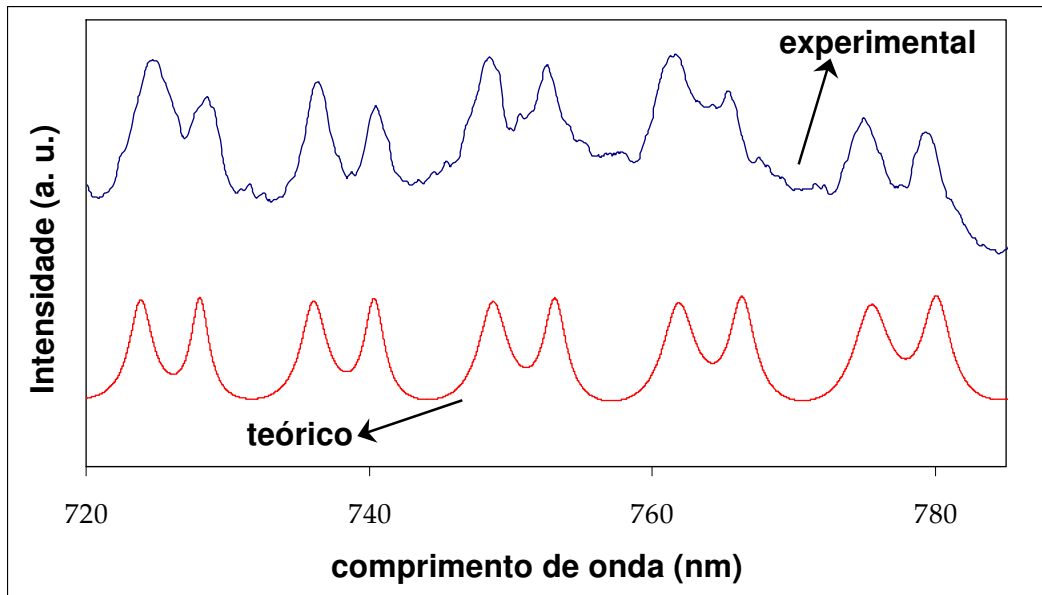
### 3.1.8 Aplicação dos Cálculos na Interpretação dos Experimentos de Espectroscopia de Força e Luminescência Excitada por Absorção de 2 Fótons

Na Figura 67, na Figura 68 e na Figura 69 a seguir estão os resultados teóricos e experimentais obtidos por excitação com onda plana. A Figura 67 mostra o gráfico da medida de espectroscopia de força. Na Figura 68 apresentamos os espectros de luminescência gerados através da absorção de 2 fótons, onde as curvas verde e vermelha se referem respectivamente a microesferas capturadas de 2.5 e 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, coradas com uma substância similar ao DAPI<sup>3</sup>. A partir dela, vemos que apenas na curva vermelha, para a microesfera maior, observamos as ressonâncias de Mie. A Figura 69 mostra o gráfico dos “MDR modes” sem a fluorescência de fundo. Para tanto, ajustamos a intensidade da curva verde da Figura 68 e a subtraímos da curva vermelha. O valor nominal do diâmetro das microesferas de poliestireno usadas na espectroscopia de força e fornecido pela Polysciences é de  $(9.126 \pm 0.5) \mu\text{m}$ . Já as

---

<sup>3</sup> O nome oficial do corante não é fornecido pelo fabricante.

microesferas coradas são da Molecular Probes e têm diâmetro nominal de  $(6 \pm 0.6) \mu\text{m}$ . Os respectivos índices de refração nunca foram medidos.



**Figura 67.** Resultado da Espectroscopia Ultrasensível de Força para microesferas de poliestireno de  $9 \mu\text{m}$  com incidência de onda plana. Em azul estão os dados experimentais e em vermelho os teóricos.

Para o cálculo do espectro teórico consideramos para o índice de refração as relações de dispersão da água  $n_a[\lambda] = 1.324 + 3.046 \times 10^{-3}/\lambda^2$  e do poliestireno  $n_p[\lambda] = 1.5683 + 10.087 \times 10^{-3}/\lambda^2$  obtidas do artigo de Bateman [34], com o comprimento de onda  $\lambda$  dado em nanômetros. Através do programa desenvolvido no Mathematica, apresentado no apêndice 2, ajustamos o raio da partícula até encontrar uma concordância entre os picos teóricos e os experimentais. Isso ocorreu para os raios de  $4.5 \mu\text{m}$  para a espectroscopia ultrasensível de força e  $2.73 \mu\text{m}$  para a medida da luminescência excitada por absorção de 2 fótons, que estão dentro do erro de 10% fornecido do fabricante. Após encontrados os raios, fizemos os gráficos teóricos usando as expressões de  $Q$  de espalhamento para a experiência de luminescência e  $Q_{pr}$  de pressão de radiação para a medida através da força.

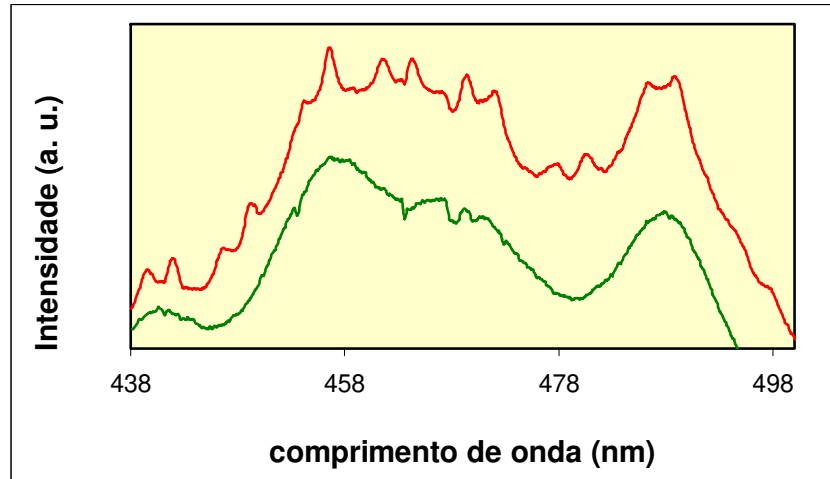
Até onde sabemos esse é um dos raros relatos de observação de “MDR modes” através da luminescência excitadas por absorção de 2 fótons, sendo o primeiro em



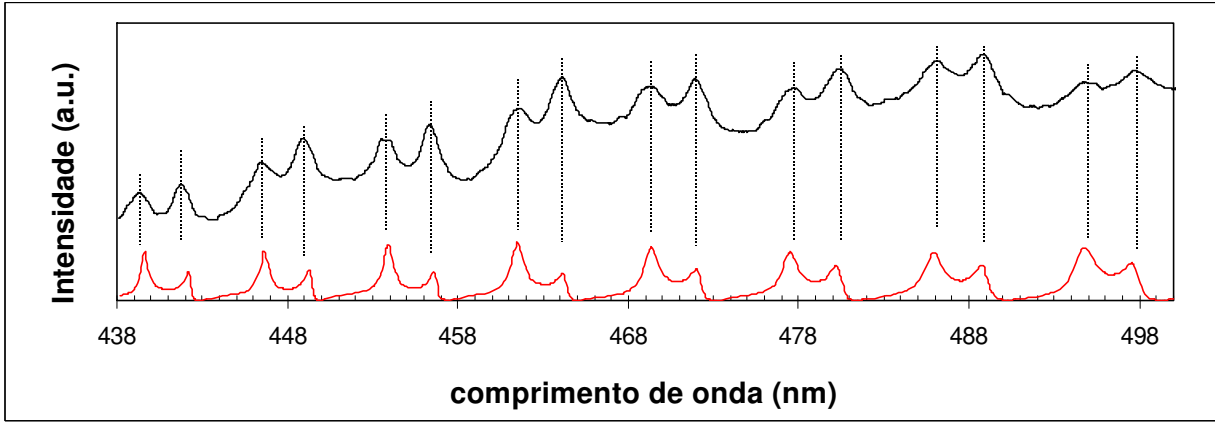
partículas capturadas pela pinça óptica. As ressonâncias de Mie também nunca foram observadas em microesferas de poliestireno pela medida da força óptica. Nos experimentos de espectroscopia de força, a onda plana é formada pela desfocalização do feixe de laser que incide no objeto, assim como está descrito no capítulo 2 e Figura 52. A posição das ressonâncias dos nossos resultados experimentais concordam com as previsões teóricas para, pelo menos, 10 picos. Já no outro caso, a onda plana é gerada no interior da microesfera pela luminescência. No total mais de 16 picos foram observados e a diferença entre as suas posições experimental e teórica é bem menor do que a largura das ressonâncias que é definida pela parte imaginária dos  $a_n$ 's e  $b_n$ 's.

Conforme descrito no capítulo 2, usamos o laser de Ti:Safira pulsado para excitar a fluorescência por absorção de 2 fótons e observamos os espectros com a grade de 1200 em 60s. Os primeiros estudos sobre a teoria de interação entre lasers pulsados e microcavidades esféricas começaram a surgir agora em 2001 e 2002 [35].

Os respectivos coeficientes  $a_n$  e  $b_n$  responsáveis pelos modos vão de  $a_{56}$  e  $b_{56}$  até  $a_{52}$  e  $b_{52}$  para a microesfera de poliestireno comum  $a_{57}$  e  $b_{57}$  até  $a_{50}$  e  $b_{50}$  para a microesfera corada. Os coeficientes  $a_n$  são referentes ao modo TM e os  $b_n$  ao modo TE.



**Figura 68.** Espectros de fluorescência excitada por absorção de 2 fótons, curva verde – microesfera de 2.5 μm, curva vermelha – microesfera de 6 μm e modos MDR.



**Figura 69.** Preto: espectro para a microesfera de 6  $\mu\text{m}$  da Figura 66 subtraído da fluorescência; vermelho: resultados teóricos.

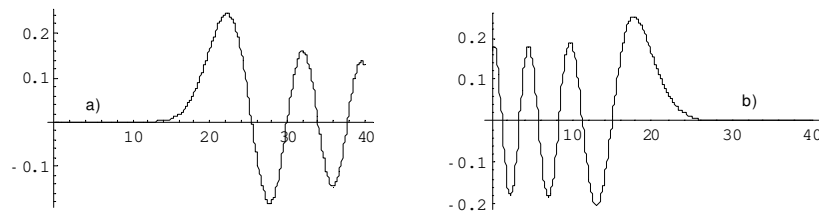
### 3.2 Pinças Óptica, Microesferas e Feixes Gaussianos Focalizados

O aspecto mais importante no estudo da pressão de radiação e ressonâncias de Mie nessa seção é a descrição do feixe incidente focalizado. A representação de Davis para feixes gaussianos paraxiais traz como grande atrativo o controle da ordem da aproximação, mas cada ordem isoladamente não satisfaz as equações de Maxwell [36]. As principais referências que utilizam o feixe de Davis são os trabalhos de Gouesbet, Lock, Ren e também de Barton [37, 38, 39, 40, 41].

Existem outras estratégias para descrição de feixes gaussianos. Uma delas é partir das funções de Green do tipo  $(e^{ik|\vec{r}-\vec{r}'|}/4\pi|\vec{r}-\vec{r}'|)$ , que sabemos ser solução das equações de Maxwell mas com singularidades em  $\vec{r} = \vec{r}'$ , e usar um vetor complexo para  $\vec{r}'$  a fim de garantir uma solução sem singularidades em qualquer posição. No entanto, essa descrição também leva a uma expressão do feixe gaussiano idêntica à forma de Davis de ordem zero. Outra estratégia é usar a teoria da difração no limite gaussiano, para aberturas numéricas pequenas. Porém, para isso precisamos considerar a teoria de difração vetorial, e não escalar. Nesse caso os feixes satisfazem as equações de Maxwell mas são obtidos na forma integral. Essa é a estratégia utilizada por Richards & Wolf [42] e por Cheng [43].

### 3.2.1 Aproximação da Integral Localizada

Vamos procurar apresentar os feixes incidentes na forma mais apropriada para a aplicação da Aproximação da Integral Localizada proposta pela primeira vez por Gouesbet [44] e bem sintetizada por Ren, Gouesbet e Gréhan [45] em uma receita com um conjunto de 5 regras para evitar o cálculo das integrais da seção 3.1.2 e utilizadas nas determinação dos coeficientes das ondas parciais. O princípio da localização foi proposto por Van de Hulst que fez um paralelo entre a teoria eletromagnética de Mie e a posição de um raio da óptica geométrica, percebendo que a função esférica de Bessel  $j_n(kr)$  vai a zero para  $kr < (n + 1/2)$ . Ao expandir uma onda em ondas parciais, as componentes com  $j_n(kr)Y_n^m$  carregam  $L^2 = n(n+1)\hbar^2$  e  $|\vec{p}| = \hbar k$ , como  $\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p} \Rightarrow L = bp \Rightarrow b = L/P = \sqrt{n(n+1)}/k$ , para  $n$  grande  $\sqrt{n(n+1)} = n\sqrt{(1+1/n)} \cong n(1+1/2n) = n + 1/2$ , então o parâmetro de impacto  $b$  será  $b \cong (n + 1/2)/k$ . Por isso, Van de Hulst associou o número do modo  $n$  a um raio que cruza a partícula na distância  $r = \lambda/2\pi(n + 1/2)$  de seu centro. Dessa forma, Ren, Gouesbet e Gréhan construíram o operador localização  $\hat{G}_n$  que atua apenas nas funções de  $r$  e  $\theta$  transformando  $kr$  em  $n + \frac{1}{2}$  e  $\theta$  em  $\pi/2$ , deixando intactas as funções de  $\phi$ . Veja por exemplo a Figura 70 a abaixo,  $j_n(kr)$  em função de  $\rho = kr$  para  $n=20$ ,  $j_n(kr)$  vai a zero para  $r < (n + 1/2) \approx (20 + 1/2) \approx 20$ . Analogamente, vemos outro exemplo na Figura 70 b, agora de  $j_n(kr)$  em função de  $n$  para  $\rho = 20$ , vemos que  $j_n(kr)$  vai a zero para  $n > (r - 1/2) \approx (20 - 1/2) \approx 20$ .



**Figura 70.** Princípio da localização. a.  $j_n(kr)$  em função de  $\rho$ . b.  $j_n(kr)$  em função de  $n$ .

A receita para encontrar os coeficientes da expansão  $g_{nTM}^m$  e  $g_{nTE}^m$  é a seguinte:

1. Expandir as componentes radiais dos campos elétricos e magnéticos em modos azimutais na forma  $E_r(r, \theta, \varphi) = \sum E_r(r, \theta) e^{im\varphi}$  e  $H_r(r, \theta, \varphi) = \sum H_r(r, \theta) e^{im\varphi}$ .

2. Criar as novas funções  $F_r^m(r, \theta)$  e  $I_r^m(r, \theta)$  através da remoção dos modos azimutais das contribuições de ondas planas, isto é,  $E_r^m = E_0 \sin\theta e^{ikz} F_r^m$  e  $H_r^m = H_0 \sin\theta e^{ikz} I_r^m$ .

1. Aplicar o operador localização nas funções  $F_r^m(r, \theta)$  e  $I_r^m(r, \theta)$ , transformando-as em  $\hat{G}F_r^m = F_r^m[(n+1/2)k, \pi/2]$  e  $\hat{G}I_r^m = I_r^m[(n+1/2)k, \pi/2]$ .

4. Multiplicar as expressões resultantes pelos fatores de normalização

$$Z_n^m = \frac{n(n+1)i}{n+1/2} \delta_{m,0} + \left[ \frac{-i}{n+1/2} \right]^{|m|-1} (1 - \delta_{m,0}).$$

5. Os coeficientes de forma do feixe da expansão são dados por  $g_{nTM}^m = Z_n^m \hat{G}(F_r^m)$  e  $g_{nTE}^m = Z_n^m \hat{G}(I_r^m)$ .

Os autores validaram essa receita em muitas situações diferentes que demonstraram ser uma boa aproximação para a expansão em ondas parciais de feixes paraxiais. Nós vamos utilizá-la na descrição de Davis.

### 3.2.2 Aproximação de Davis e a Descrição do Feixe Incidente

O primeiro passo é encontrar a expressão para os campos elétricos e magnéticos de um feixe gaussiano focalizado paraxial na representação de Davis com a polarização na direção x. Davis utiliza uma expansão em série em termos do parâmetro  $s = 1/k\omega_0$ , onde  $\omega_0$  é o “beam size” ou “spot size” e  $k$  o número de onda, truncada em alguma potência de  $s$ . Quanto maior a potência de  $s$ , melhor é a aproximação.

Para fazer essa aproximação voltamos às equações de Maxwell. Se  $\nabla \cdot \vec{B} = 0$  podemos escrever o campo magnético como  $\vec{B} = \nabla \times \vec{A}$  e usando  $\nabla \times \vec{E} = -\partial \vec{B} / \partial t \Rightarrow \nabla \times \vec{E} = -\nabla \times \partial \vec{A} / \partial t \Rightarrow \nabla \times [\vec{E} + \partial \vec{A} / \partial t] = 0 \Rightarrow \vec{E} + \partial \vec{A} / \partial t = -\nabla \phi$ , podemos escrever o campo elétrico como  $\vec{E} = -\nabla \phi - \partial \vec{A} / \partial t$ . Temos então que,

$$\nabla \cdot \vec{E} = -\nabla^2 \phi - \frac{\partial}{\partial t} \nabla \cdot \vec{A} = \frac{\rho}{\epsilon} \Rightarrow \nabla^2 \phi + \frac{\partial}{\partial t} \nabla \cdot \vec{A} = -\frac{\rho}{\epsilon} \quad (3.144)$$

Já,

$$\begin{aligned} \nabla \times \vec{B} &= \nabla \times \nabla \times \vec{A} = -\nabla^2 \vec{A} + \nabla(\nabla \cdot \vec{A}) = \mu \vec{J} + \mu \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \Rightarrow \nabla^2 \vec{A} - \nabla(\nabla \cdot \vec{A}) = -\mu \vec{J} - \mu \epsilon \frac{\partial}{\partial t} [-\nabla \phi - \frac{\partial \vec{A}}{\partial t}] \\ &= -\mu \vec{J} + \mu \epsilon [-\nabla \frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2}] \Rightarrow \nabla^2 \vec{A} - \mu \epsilon \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} - \nabla[\nabla \cdot \vec{A} + \mu \epsilon \frac{\partial \phi}{\partial t}] = -\mu \vec{J} \quad (3.145) \end{aligned}$$

usando  $\mu \epsilon = 1/c^2$ ,

$$\nabla^2 \vec{A} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} - \nabla[\nabla \cdot \vec{A} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial \phi}{\partial t}] = -\mu \vec{J} \quad (3.146)$$

sem cargas,  $\rho = 0$  e  $\vec{J} = 0$ , ficamos com

$$1. \vec{B} = \nabla \times \vec{A},$$

$$2. \vec{E} = -\nabla \phi - \frac{\partial \vec{A}}{\partial t},$$

$$3. \nabla^2 \phi + \frac{\partial}{\partial t} \nabla \cdot \vec{A} = 0 \text{ e}$$

$$4. \nabla^2 \vec{A} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} - \nabla[\nabla \cdot \vec{A} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial \phi}{\partial t}] = 0 \quad (3.147).$$

Usando o calibre de Lorentz, onde  $\nabla \cdot \vec{A} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial \phi}{\partial t} = 0$  e substituindo na equação 3

para  $\phi$ , temos

$$\nabla^2 \phi + \frac{\partial}{\partial t} \nabla \cdot \vec{A} = \nabla^2 \phi + \frac{\partial}{\partial t} [-\frac{1}{c^2} \frac{\partial \phi}{\partial t}] = \nabla^2 \phi - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} = 0 \quad (3.148)$$

Assim, vemos que no calibre de Lorentz as seguintes equações são válidas:

$$1. \nabla^2 \vec{A} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} = 0,$$

$$2. \nabla^2 \phi - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} = 0,$$

$$3. \nabla \cdot \vec{A} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial \phi}{\partial t} = 0,$$

$$4. \vec{B} = \nabla \times \vec{A} \text{ e}$$

$$5. \vec{E} = -\nabla\phi - \partial\vec{A}/\partial t \quad (3.149)$$

Fazendo,  $\vec{A} = \vec{A}(r)e^{-i\omega t}$  e  $\phi = \phi(\vec{r})e^{-i\omega t}$ , ficamos com:

$$1. \nabla^2 \vec{A} + k^2 \vec{A} = 0,$$

$$2. \nabla^2 \phi + k^2 \phi = 0,$$

$$3. \phi = -i \frac{c}{k} \nabla \cdot \vec{A},$$

$$4. \vec{E} = i \frac{c}{k} \nabla(\nabla \cdot \vec{A}) + i\omega \vec{A} \text{ e}$$

$$5. \vec{B} = \nabla \times \vec{A} \quad (3.150)$$

No formalismo de Davis, o potencial vetor  $\vec{A}$  é linearmente polarizado na forma  $\vec{A} = \hat{e}_x \psi(\vec{r})e^{ikz}$ . Para usar a equação 1 logo acima precisamos de:

$$\nabla^2 [\psi(\vec{r})e^{ikz}] = e^{ikz} \nabla^2 \psi(\vec{r}) + 2\nabla\psi \cdot \nabla e^{ikz} + \psi(\vec{r}) \nabla^2 e^{ikz} \Rightarrow \nabla^2 \psi(\vec{r}) + 2ik \frac{\partial \psi}{\partial z} = 0, \text{ ou seja,}$$

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} + 2ik \frac{\partial \psi}{\partial z} = 0 \quad (3.151)$$

rearranjando essa equação e usando  $k$  e  $\omega_0$  obtemos:

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial \left(\frac{x}{\omega_0}\right)^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial \left(\frac{y}{\omega_0}\right)^2} + \frac{\omega_0^2}{k^2 \omega_0^4} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \left(\frac{z}{k\omega_0^2}\right)^2} + 2i \frac{\partial \psi}{\partial \left(\frac{z}{k\omega_0^2}\right)} = 0 \quad (3.152)$$

e, finalmente, redefinindo as coordenadas da forma:

$$\xi = x/\omega_0, \quad \eta = y/\omega_0 \text{ e } \zeta = z/(k\omega_0^2) \text{ e } s = 1/k\omega_0 \quad (3.153),$$

chegamos à equação final:

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial \eta^2} + \frac{1}{k^2 \omega_0^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \zeta^2} + 2i \frac{\partial \psi}{\partial \zeta} = 0 \quad (3.154).$$

Para analisar as ordens de grandeza notamos que:

$$s = \frac{1}{k\omega_0} = \frac{1}{\frac{2\pi}{\lambda} \omega_0} \text{ e } \omega_0 \approx \lambda, \text{ então } s < \frac{1}{2\pi} \text{ é pequeno.}$$

Vamos procurar, portanto, soluções para  $\psi$  em termos de potências de  $s^2$ :  $\psi = \psi_0 + s^2\psi_2 + s^4\psi_4 + \dots$ , e coletar termos de mesma potência em  $s$ . Dessa forma as equações para as ordens zero, dois e quatro são dadas por:

$$\begin{aligned}\frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \eta^2} + 2i \frac{\partial \psi_0}{\partial \zeta} &= 0 \\ \frac{\partial^2 \psi_2}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \psi_2}{\partial \eta^2} + 2i \frac{\partial \psi_2}{\partial \zeta} &= -\frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \zeta^2} \\ \frac{\partial^2 \psi_4}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \psi_4}{\partial \eta^2} + 2i \frac{\partial \psi_4}{\partial \zeta} &= -\frac{\partial^2 \psi_2}{\partial \zeta^2} \quad (3.155)\end{aligned}$$

A estratégia é encontrar primeiro a solução de ordem zero, usá-la na equação seguinte para encontrar a solução de ordem 2 e assim sucessivamente. Para ordem zero verificamos que a função

$$\psi_0 = \frac{ie^{-i\frac{\rho^2}{i-2\zeta}}}{i-2\zeta} \text{ com } \rho^2 = \xi^2 + \eta^2 \text{ é uma solução.}$$

Para tanto, usamos:

$$\frac{\partial \psi_0}{\partial \xi} = -\frac{ie^{-i\frac{\rho^2}{i-2\zeta}}}{(i-2\zeta)} \frac{2i\xi}{(1-2\zeta)} = -\frac{2i\xi}{i-2\zeta} \psi_0 \quad (3.156)$$

$$\frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \xi^2} = \frac{-2i}{i-2\zeta} \psi_0 + \left( \frac{-2i\xi}{i-2\zeta} \right)^2 \psi_0 = \left\{ \frac{-2i}{i-2\zeta} - \frac{4\xi^2}{(i-2\zeta)^2} \right\} \psi_0 \quad (3.157)$$

$$\frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \eta^2} = \frac{-4i}{i-2\zeta} \psi_0 - \frac{4\rho^2}{(i-2\zeta)^2} \psi_0 \quad (3.158)$$

$$\frac{\partial \psi_0}{\partial \zeta} = \frac{(i-2\zeta)ie^{-i\frac{\rho^2}{i-2\zeta}}(-i\rho^2)\left[-\frac{1}{(i-2\zeta)^2}\right](-2) - ie^{-i\frac{\rho^2}{i-2\zeta}}(-2)}{(i-2\zeta)^2} = \frac{ie^{-i\frac{\rho^2}{i-2\zeta}}}{i-2\zeta} \left\{ -\frac{2i\rho^2}{(i-2\zeta)^2} + \frac{2}{i-2\zeta} \right\} \quad (3.159)$$

assim:

$$2i \frac{\partial \psi_0}{\partial \zeta} = \psi_0 \left\{ \frac{4\rho^2}{(i-2\zeta)^2} + \frac{4i}{i-2\zeta} \right\} \quad (3.160)$$

e portanto,  $\frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \psi_0}{\partial \eta^2} + 2i \frac{\partial \psi_0}{\partial \zeta} = 0$ , demonstrando nossa afirmação inicial.

Falta determinar os campos elétricos e magnéticos. Isso é feito à partir de

$\vec{E} = i \frac{c}{k} \nabla(\nabla \cdot \vec{A}) + i\omega \vec{A}$  com  $\vec{A} = \hat{e}_x \psi(\vec{r}) e^{ikz}$ , temos que  $\nabla \cdot \vec{A} = \frac{\partial \psi(\vec{r})}{\partial x} e^{ikz}$  e, portanto:

$$\begin{aligned} \nabla(\nabla \cdot \vec{A}) &= \hat{e}_x \frac{\partial}{\partial x} [e^{ikz} \frac{\partial \psi}{\partial x}] + \hat{e}_y \frac{\partial}{\partial y} [e^{ikz} \frac{\partial \psi}{\partial x}] + \hat{e}_z \frac{\partial}{\partial z} [e^{ikz} \frac{\partial \psi}{\partial x}] = \\ &= e^{ikz} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} \hat{e}_x + e^{ikz} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial y} \hat{e}_y + [ike^{ikz} \frac{\partial \psi}{\partial x} + e^{ikz} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial z}] \hat{e}_z = e^{ikz} \left\{ \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} \hat{e}_x + \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial y} \hat{e}_y + [ik \frac{\partial \psi}{\partial x} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial z}] \hat{e}_z \right\} \end{aligned} \quad (3.161)$$

O campo elétrico pode ser calculado por:

$$\vec{E} = i\omega \left\{ [\psi + \frac{1}{k^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2}] \hat{e}_x + [\frac{1}{k^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial y}] \hat{e}_y + [\frac{i}{k} \frac{\partial \psi}{\partial x} + \frac{1}{k^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial z}] \hat{e}_z \right\} \quad (3.162)$$

entretanto,

$$\begin{aligned} \frac{1}{k^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} &= \frac{1}{k^2 \omega_0^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \left( \frac{x}{\omega_0} \right)^2} = s^2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi^2} \\ \frac{1}{k^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial y} &= \frac{1}{k^2 \omega_0^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \left( \frac{x}{\omega_0} \right) \partial \left( \frac{y}{\omega_0} \right)} = s^2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi \partial \eta} \\ \frac{1}{k} \frac{\partial \psi}{\partial x} &= \frac{1}{k \omega_0} \frac{\partial \psi}{\partial \left( \frac{x}{\omega_0} \right)} = s \frac{\partial \psi}{\partial \xi} \\ \frac{1}{k^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x \partial z} &= \frac{1}{k^2 \omega_0^2} \frac{1}{k^2 \omega_0^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \left( \frac{x}{\omega_0} \right) \partial \left( \frac{y}{k^2 \omega_0^2} \right)} = \frac{1}{k^3 \omega_0^3} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi \partial \zeta} = s^2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi \partial \zeta} \end{aligned} \quad (3.163)$$

de forma que, no final dos cálculos, o campo elétrico vale:

$$\vec{E} = i\omega \left\{ [\psi + s^2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi^2}] \hat{e}_x + [s^2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi \partial \eta}] \hat{e}_y + [is \frac{\partial \psi}{\partial \xi} + s^3 \frac{\partial^2 \psi}{\partial \xi \partial \zeta}] \hat{e}_z \right\} \quad (3.164)$$

Tomando até a ordem de  $s^0$ :



$$E_x = i\omega\psi e^{ikz}, E_y = 0 \text{ e } E_z = 0 \quad (3.165)$$

Tomando até a ordem de  $s^1$ :

$$E_x = i\omega\psi e^{ikz}, E_y = 0 \text{ e } E_z = -\omega \frac{\partial\psi}{\partial\zeta} e^{ikz} \quad (3.166)$$

Para o campo magnético, temos:

$$\begin{aligned} \vec{H} = \frac{\nabla \times \vec{E}}{\mu} &= \frac{1}{\mu} \begin{vmatrix} \hat{e}_x & \hat{e}_y & \hat{e}_z \\ \partial_x & \partial_y & \partial_z \\ \psi e^{ikz} & 0 & 0 \end{vmatrix} = \frac{1}{\mu} \{ \partial_z [\psi e^{ikz}] \hat{e}_y - \partial_y [\psi e^{ikz}] \hat{e}_z \} \\ &= \frac{1}{\mu} \{ [ik\psi e^{ikz} + \frac{\partial\psi}{\partial z} e^{ikz}] \hat{e}_y - \frac{\partial\psi}{\partial y} e^{ikz} \hat{e}_z \} = \frac{ike^{ikz}}{\mu} \{ [\psi - \frac{i}{k} \frac{\partial\psi}{\partial z}] \hat{e}_y + \frac{i}{k} \frac{\partial\psi}{\partial y} \hat{e}_z \} = \\ &= \frac{ike^{ikz}}{\mu} \{ [\psi - \frac{i}{k(k\omega_0^2)} \frac{\partial\psi}{\partial \frac{z}{k\omega_0^2}}] \hat{e}_y + \frac{i}{k\omega_0} \frac{\partial\psi}{\partial \frac{y}{\omega_0}} \hat{e}_z \} = \frac{ike^{ikz}}{\mu} \{ [\psi - is^2 \frac{\partial\psi}{\partial\zeta}] \hat{e}_y + is \frac{\partial\psi}{\partial\eta} \hat{e}_z \} \end{aligned} \quad (3.167)$$

Em ordem zero, os campos elétrico e magnético são dados por:

$$E_x = i\omega\psi_0 e^{ikz}, E_y = 0 \text{ e } E_z = 0 \text{ e } H_x = 0, H_y = \frac{ik}{\mu} \psi_0 e^{ikz} \text{ e } H_z = 0 \quad (3.168),$$

com a função  $\psi_0$  definida como:

$$\psi_0 = \frac{ie^{-i\frac{\xi^2 + \eta^2}{i-2\zeta}}}{i-2\zeta} = \frac{ie^{-i\frac{\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2} - i - 2\frac{z}{k\omega_0^2}}}{i-2\frac{z}{k\omega_0^2}}}{i-2\frac{z}{k\omega_0^2}} e^{\frac{1}{i-2\frac{z}{k\omega_0^2}}} = \frac{-i-2\frac{z}{k\omega_0^2}}{1+\frac{4z^2}{k^2\omega_0^4}} = \frac{-i}{1+\frac{4z^2}{k^2\omega_0^4}} - \frac{2\frac{z}{k\omega_0^2}}{1+\frac{4z^2}{k^2\omega_0^4}} \quad (3.169)$$

Chamando  $D = [i - 2\frac{z-z_0}{l}]^{-1}$ , onde  $l = k\omega_0^2$ , os campos são expressos em

coordenadas cartesianas na forma:

$$E_x = i\omega\psi_0 e^{ikz} = E_0 e^{ik(z-z_0)} iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} = E_0 e^{ikz} [iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} e^{-ikz_0}] \quad (3.170)$$

$$H_y = \frac{ik}{\mu} \psi_0 e^{ikz} = H_0 e^{ik(z-z_0)} iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} = H_0 e^{ikz} [iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} e^{-ikz_0}] \quad (3.171)$$

ou em coordenadas esféricas como:

$$E_r = E_0 \sin\theta \cos\varphi e^{ikz} [iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} e^{-ikz_0}] \text{ e } H_r = H_0 \sin\theta \sin\varphi e^{ikz} [iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} e^{-ikz_0}] \quad (3.172).$$

Dessa forma observamos que os termos do tipo  $E_0 \sin\theta \cos\varphi e^{ikz}$  se referem à onda plana. Nessa descrição, podemos expressar os campos elétricos e magnéticos que descrevem um feixe gaussiano como:

$$E_r = gE_0 \sin\theta \cos\varphi e^{ikz} \text{ e } H_r = gH_0 \sin\theta \sin\varphi e^{ikz}, \text{ onde } g = [iDe^{-iD\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} e^{-ikz_0}] \quad (3.173).$$

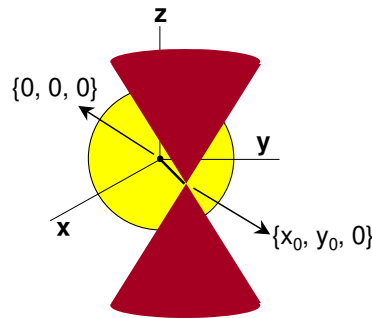
### 3.2.3 Expansão do Feixe Gaussiano Incidente Focalizado, os Fatores de Forma e os Coeficientes de Mie

Para aplicar a receita de Gouesbet a primeira providência é colocar a origem no centro da esfera ao invés do foco do laser. Feito isso devemos ser capazes de explicitar a dependência azimutal. Na nossa situação experimental o foco do laser está em  $z_0 = 0$  (plano equatorial) e  $x_0\hat{e}_x + y_0\hat{e}_y$  em relação ao centro da partícula como ilustra a Figura 71. Neste caso:

$$\psi_0 = iDe^{-iD\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{\omega_0^2}} = e^{-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{\omega_0^2}} \text{ com } D = \frac{1}{i - \frac{2z_0}{k\omega_0}} = \frac{1}{i} \quad (3.174)$$

Assim,

$$\begin{aligned} \psi_0 &= e^{-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{\omega_0^2}} = e^{-\frac{(x^2+y^2)+(x_0^2+y_0^2)-2xx_0-2yy_0}{\omega_0^2}} = e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} e^{\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}(\cos\varphi\cos\varphi_0+\sin\varphi\sin\varphi_0)} = \\ &= e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} e^{\frac{2\rho\rho_0\cos(\varphi-\varphi_0)}{\omega_0^2}} \quad (3.175) \end{aligned}$$



**Figura 71.** Sistema de coordenadas.

Nesse ponto, economizamos páginas de álgebra em relação ao artigo de Gouesbet e seu grupo [38, 39, 40] fazendo  $t = e^{i\varphi} \rightarrow$  na função geratriz para as funções modificadas de Bessel,

$$e^{\frac{1}{2}z(t+\frac{1}{t})} = \sum t^m I_m(z) \quad (3.176)$$

para reencontrar a fórmula  $e^{z \cos \varphi} = \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{im\varphi} I_m(z)$  que nos permite explicitar a

dependência azimutal diretamente como:

$$e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} e^{\frac{2\rho\rho_0 \cos(\varphi - \varphi_0)}{\omega_0^2}} = e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{im(\varphi - \varphi_0)} I_m\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \quad (3.177)$$

Para o campo elétrico falta incluir um  $\cos \varphi$  e para o magnético um  $\sin \varphi$ .

Incluindo o  $\cos \varphi$  obtemos:

$$\begin{aligned} \cos \varphi e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} e^{\frac{2\rho\rho_0 \cos(\varphi - \varphi_0)}{\omega_0^2}} &= e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{-im\varphi_0} e^{im\varphi} \frac{e^{i\varphi} + e^{-i\varphi}}{2} I_m\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) = \\ &= \frac{1}{2} e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{-im\varphi_0} \left( e^{i(m+1)\varphi} + e^{i(m-1)\varphi} \right) I_m\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \quad (3.178) \end{aligned}$$

Como nosso objetivo é obter um campo do tipo  $E_r^m(r, \theta) e^{im\varphi}$  redefinimos os  $m$ 's das somatórias para expressar  $\psi_0$  na forma:

$$\begin{aligned} &= e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \frac{1}{2} \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} e^{im\varphi} \left[ e^{-i(m+1)\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) + e^{-i(m-1)\varphi_0} I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right. \\ &\quad \left. + \left[ \frac{1}{2} (e^{i\varphi_0} + e^{-i\varphi_0}) I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right\} = \\ &= e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \left[ \frac{1}{2} \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} e^{im\varphi} e^{-im\varphi_0} \left[ e^{-i\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) + e^{i\varphi_0} I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right] + \cos \varphi_0 I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right\} = \\ &= e^{-\frac{\rho^2 + \rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \left[ \frac{1}{2} \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} e^{im\varphi} e^{-i(m-1)\varphi_0} \left[ I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) + e^{-2i\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right] + \cos \varphi_0 I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right\} \quad (3.179) \end{aligned}$$

Já a inclusão do  $\sin\varphi$  leva a:

$$\begin{aligned}
\sin\varphi e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} e^{\frac{2\rho\rho_0\cos(\varphi-\varphi_0)}{\omega_0^2}} &= e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{-im\varphi_0} e^{im\varphi} \frac{e^{i\varphi} - e^{-i\varphi}}{2i} I_m\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) = \\
&= \frac{1}{2i} e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \sum_{m=-\infty}^{\infty} e^{-im\varphi_0} \left( e^{i(m+1)\varphi} - e^{i(m-1)\varphi} \right) I_m\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) = \\
&= e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \frac{1}{2i} \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} e^{im\varphi} \left[ e^{-i(m+1)\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) - e^{-i(m-1)\varphi_0} I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] + \right. \\
&\quad \left. \left[ \frac{1}{2i} (e^{i\varphi_0} - e^{-i\varphi_0}) I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right\} = \\
&= e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \left[ \frac{1}{2i} \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} e^{im\varphi} e^{-im\varphi_0} \left[ e^{-i\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) - e^{i\varphi_0} I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right] + \sin\varphi_0 I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right\} = \\
&= e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \left[ \frac{1}{2i} \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} e^{im\varphi} e^{-i(m-1)\varphi_0} \left[ I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) - e^{-2i\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right] + \sin\varphi_0 I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right\} \quad (3.180)
\end{aligned}$$

Com isso, os campos radiais elétrico e magnético ficam dados por:

$$\begin{aligned}
E_r^m &= \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} E_0 e^{ikz} \sin\theta e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \frac{1}{2} e^{im\varphi} e^{-i(m-1)\varphi_0} \left[ I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) + e^{-2i\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right. \\
&\quad \left. + \cos\varphi_0 I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right\} \rightarrow E_r^m = \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} E_0 e^{ikz} \sin\theta e^{im\varphi} F_r^m \quad (3.181)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
H_r^m &= \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} H_0 e^{ikz} \sin\theta e^{-\frac{\rho^2+\rho_0^2}{\omega_0^2}} \left\{ \frac{1}{2i} e^{im\varphi} e^{-i(m-1)\varphi_0} \left[ I_{m-1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) - e^{-2i\varphi_0} I_{m+1}\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right] \right. \\
&\quad \left. + \sin\varphi_0 I_1\left(\frac{2\rho\rho_0}{\omega_0^2}\right) \right\} \rightarrow H_r^m = \sum_{\substack{m=-\infty \\ m \neq 0}}^{\infty} H_0 e^{ikz} \sin\theta e^{im\varphi} I_r^m \quad (3.182).
\end{aligned}$$

Agora podemos usar uma relação em  $m$  das funções modificadas de Bessel  $I_{-m}(x) = I_m(x)$  para limitar os somatórios de  $m = 0$  até infinito, isolando o termo com  $m = 0$ , reescrevendo as expressões acima como:

$$E_r^m = e^{-\frac{k^2 \rho^2 + k^2 \rho_0^2}{k^2 \omega_0^2}} \left\{ \left[ \sum_{m=1}^{\infty} e^{\mp i(|m|-1)\varphi_0} \left[ I_{|m|-1} \left( \frac{2k\rho\rho_0}{k\omega_0^2} \right) + e^{\mp 2i\varphi_0} I_{|m|+1} \left( \frac{2k\rho\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right] \right] + \cos \varphi_0 I_1 \left( \frac{2k\rho\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right\} \quad (3.183)$$

$$H_r^m = e^{-\frac{k^2 \rho^2 + k^2 \rho_0^2}{k^2 \omega_0^2}} \left\{ \left[ \frac{1}{i} \sum_{m=1}^{\infty} e^{\mp i(|m|-1)\varphi_0} \left[ I_{|m|-1} \left( \frac{2k\rho\rho_0}{k\omega_0^2} \right) - e^{\mp 2i\varphi_0} I_{|m|+1} \left( \frac{2k\rho\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right] \right] + \sin \varphi_0 I_1 \left( \frac{2k\rho\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right\} \quad (3.184)$$

Nesse ponto já cumprimos com os passos 1 e 2 da receita. Os passos 3 e 4 são dados pela aplicação do operador localização e multiplicação pelo fator de normalização:

$$\begin{aligned} g_{nTM}^m &= Z_n^m \hat{G} E_r^m = \\ &= \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} Z_n^m e^{-\frac{(n+1/2)^2 + k^2 \rho_0^2}{k^2 \omega_0^2}} \left\{ e^{\mp i(|m|-1)\varphi_0} \left[ I_{|m|-1} \left( \frac{2(n+1/2)\rho_0}{k\omega_0^2} \right) + e^{\mp 2i\varphi_0} I_{|m|+1} \left( \frac{2(n+1/2)\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right] \right. \\ &\quad \left. + \cos \varphi_0 I_1 \left( \frac{2(n+1/2)\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right\} \end{aligned} \quad (3.185)$$

$$\begin{aligned} g_{nTE}^m &= Z_n^m \hat{G} H_r^m = \\ &= \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} Z_n^m e^{-\frac{(n+1/2)^2 + k^2 \rho_0^2}{k^2 \omega_0^2}} \left\{ \frac{e^{\mp i(|m|-1)\varphi_0}}{i} \left[ I_{|m|-1} \left( \frac{2(n+1/2)\rho_0}{k\omega_0^2} \right) - e^{\mp 2i\varphi_0} I_{|m|+1} \left( \frac{2(n+1/2)\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right] \right. \\ &\quad \left. + \sin \varphi_0 I_1 \left( \frac{2(n+1/2)\rho_0}{k\omega_0^2} \right) \right\} \end{aligned} \quad (3.186)$$

definindo,

$$s = \frac{1}{k\omega_0}, \quad Q = 2s(n+1/2) \frac{\rho_0}{\omega_0} \quad \text{e} \quad Z_n^m = \frac{n(n+1)i}{n+1/2} \delta_{m,0} + \left[ \frac{-i}{n+1/2} \right]^{|m|-1} (1 - \delta_{m,0}) \quad (3.187)$$

ficamos com,

$$g_{nTM}^0 = \sum_{n=1}^{\infty} \left( \frac{n(n+1)i}{n+1/2} \right) \cos \varphi_0 e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2(n+1/2)^2 \right)} I_1(Q) \quad (3.188)$$

$$g_{nTM}^m = \sum_{n,m=1}^{\infty} \left( \frac{-ie^{\mp i\varphi_0}}{n+1/2} \right)^{|m|-1} e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2(n+1/2)^2 \right)} \left[ I_{|m|-1}(Q) + e^{\mp 2i\varphi_0} I_{|m|+1}(Q) \right] \quad (3.189)$$

$$g_{nTE}^0 = \sum_{n=1}^{\infty} \left( \frac{n(n+1)}{n+1/2} i \right) \text{sen} \varphi_0 e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} I_1(Q) \quad (3.190)$$

$$g_{nTE}^m = \sum_{n,m=1}^{\infty} \frac{\pm 1}{i} \left( \frac{-ie^{\mp i\varphi_0}}{n+1/2} \right)^{|m|-1} e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} \left[ I_{|m|-1}(Q) - e^{\mp 2i\varphi_0} I_{|m|+1}(Q) \right] \quad (3.191)$$

No caso particular em que o foco se desloca apenas na direção x,  $\varphi_0 = 0$  e  $\rho_0 = x_0$ , os  $g_n^m$ 's são dados por:

$$g_{nTM}^0 = \sum_{n=1}^{\infty} \left( \frac{n(n+1)}{n+1/2} i \right) e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} I_1(Q) \quad (3.192)$$

$$g_{nTM}^m = \sum_{n,m=1}^{\infty} \left( \frac{-ie^{\mp i\varphi_0}}{n+1/2} \right)^{|m|-1} e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} \left[ I_{|m|-1}(Q) + I_{|m|+1}(Q) \right] \quad (3.193)$$

$$g_{nTE}^0 = 0 \quad (3.194)$$

$$g_{nTE}^m = \sum_{n,m=1}^{\infty} \frac{\pm 1}{i} \left( \frac{-ie^{\mp i\varphi_0}}{n+1/2} \right)^{|m|-1} e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} \left[ I_{|m|-1}(Q) - I_{|m|+1}(Q) \right] \quad (3.195)$$

Já para deslocamentos ao longo do eixo y,  $\varphi_0 = \pi/2$  e  $\rho_0 = y_0$ :

$$g_{nTM}^0 = 0 \quad (3.196)$$

$$g_{nTM}^m = \sum_{n,m=1}^{\infty} \left( \frac{-ie^{\mp i\varphi_0}}{n+1/2} \right)^{|m|-1} e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} \left[ I_{|m|-1}(Q) - I_{|m|+1}(Q) \right] \quad (3.197)''$$

$$g_{nTE}^0 = \sum_{n=1}^{\infty} \left( \frac{n(n+1)}{n+1/2} i \right) e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} I_1(Q) \quad (3.198)$$

$$g_{nTE}^m = \sum_{n,m=1}^{\infty} \frac{\pm 1}{i} \left( \frac{-ie^{\mp i\varphi_0}}{n+1/2} \right)^{|m|-1} e^{-\left( \frac{\rho_0^2}{\omega_0^2} + s^2 (n+1/2)^2 \right)} \left[ I_{|m|-1}(Q) + I_{|m|+1}(Q) \right] \quad (3.199)$$

Com os coeficientes g's temos a expansão dos campos elétrico e magnético em ondas parciais:

$$\vec{E}_i = \sum_{n,m}^{\infty} (g_{nTE}^n \vec{M}_{omn}^1 - i g_{nTM}^n \vec{N}_{emn}^1) \text{ e } \vec{H}_i = -\frac{k}{\mu\omega} \sum_{n,m}^{\infty} (g_{nTM}^n \vec{M}_{emn}^1 + i g_{nTE}^n \vec{N}_{omn}^1) \quad (3.200)$$

A expansão dos campos espalhados é obtida multiplicando os fatores de forma  $g_n^m$  pelos coeficientes de Mie,  $a_n g_{nTM}^m$  e  $b_n g_{nTE}^m$ .

### 3.2.4. Seções de Choque

Com os fatores de forma  $g_n^{m'}$ s do feixe podemos calcular as seções de choque e eficiências para as forças de pressão de radiação exercidas por pinças ópticas em partículas esféricas. Entretanto, se o cálculo da eficiência para a onda plana, sem a inclusão dos  $m'$ s, exigiu algumas páginas de álgebra, um feixe geral vai requerer muito mais. Podemos obter de forma geral as diferentes seções de choque e eficiências em termos dos fatores de forma e para tanto será necessário utilizar inúmeras relações de recorrência e integrais. Felizmente todo esse desenvolvimento já foi feito por diferentes autores e está disponível na literatura [45, 46, 41]. Comparamos as fórmulas dos diferentes trabalhos para detectar algum erro que tenha passado despercebido, mas todos eles chegaram ao mesmo resultado. As expressões para as seções de choque para as componentes x, y e z da força de captura da pinça óptica são dadas por:

$$C_{pr, z} = \frac{\lambda^2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{p=-n}^n \left( \frac{1}{(n+1)^2} \frac{(n+1+|p|)!}{(n-|p|)!} \times \text{Re}[(a_n + a_{n+1}^* - 2a_n a_{n+1}^*) g_{n,TM}^p g_{n+1,TM}^{p*} + (b_n + b_{n+1}^* - 2b_n b_{n+1}^*) g_{n,TE}^p g_{n+1,TE}^{p*}] + p \frac{2n+1}{n^2(n+1)^2} \frac{(n+|p|)!}{(n-|p|)!} \times \text{Re}[i(2a_n b_n^* - a_n - b_n^*) g_{n,TM}^p g_{n,TE}^{p*}] \right) \quad (3.201)$$

para a componente z, e

$$C = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{p=1}^{\infty} \sum_{n=p}^{\infty} \sum_{m=p-1 \neq 0}^{\infty} \frac{(n+p)!}{(n-p)!} \times [(S_{m,n}^{p-1} + S_{n,m}^{-p} - 2U_{m,n}^{p-1} - 2U_{n,m}^{-p}) \times \left( \frac{1}{m^2} \delta_{m,n+1} - \frac{1}{n^2} \delta_{n,m+1} \right) + \frac{2n+1}{n^2(n+1)^2} \times \delta_{n,m} (T_{m,n}^{p-1} - T_{n,m}^{-p} - 2V_{m,n}^{p-1} + 2V_{n,m}^{-p})] \quad (3.202)$$

onde,  $C_{pr, x} = \text{Re}[C]$  é a seção de choque para a componente x e  $C_{pr, y} = \text{Im}[C]$  para a componente y, com as seguintes definições:

$$U_{n,m}^p = a_n a_m^* g_{n,TM}^p g_{m,TM}^{p+1*} + b_n b_m^* g_{n,TE}^p g_{m,TE}^{p+1*}$$

$$V_{n,m}^p = i b_n a_m^* g_{n,TE}^p g_{m,TM}^{p+1*} - i a_n b_m^* g_{n,TM}^p g_{m,TE}^{p+1*}$$

$$S_{n,m}^p = (a_n + a_m^*)g_{n,TM}^p g_{m,TM}^{p+1*} + (b_n + b_m^*)g_{n,TE}^p g_{m,TE}^{p+1*}$$

$$T_{n,m}^p = i(b_n + a_m^*)g_{n,TE}^p g_{m,TM}^{p+1*} - i(a_n + b_m^*)g_{n,TM}^p g_{m,TE}^{p+1*} \quad (3.203)$$

Utilizando os fatores de forma obtidos para os feixes gaussianos, os coeficientes de Mie e as seções de choque acima podemos comparar nossos resultados experimentais com os cálculos teóricos.

### 3.2.5 Resultados

#### 3.2.5.1 Espectroscopia de Força para Feixes Focalizados

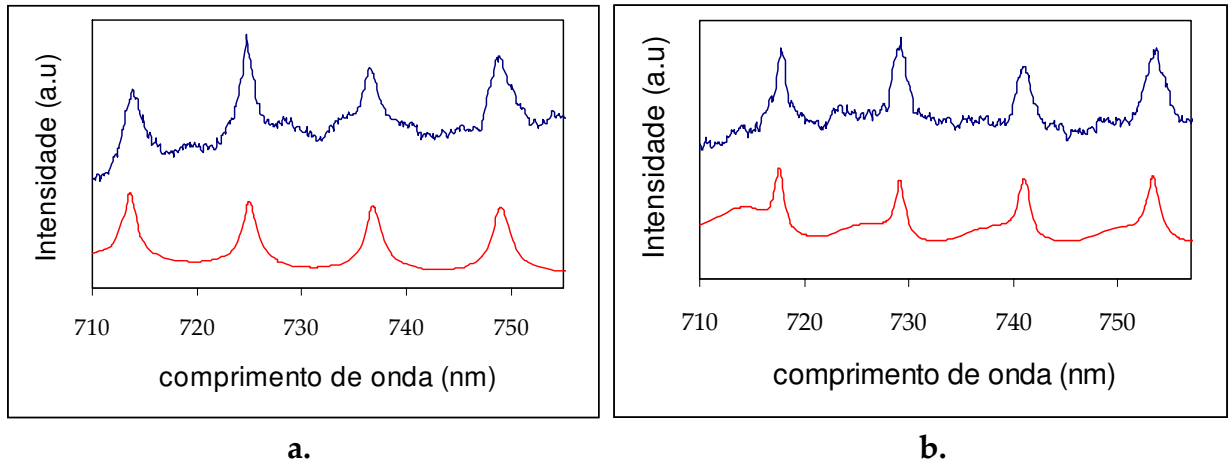
Nessa experiência a origem, o centro da microesfera, é definida pela posição do foco do laser de Nd:YAG. A força que estamos estudando é gerada pelo laser de Ti:Safira cw focalizado na borda da microesfera mas com a mesma posição vertical do Nd:YAG. Dessa forma asseguramos experimentalmente a condição  $z_0 = 0$  utilizada nos cálculos acima. Em relação aos modelos teóricos, nossos resultados experimentais fornecem um valor proporcional à seção de choque para força óptica em função do comprimento de onda de um feixe polarizado na direção  $x$  focalizado em três posições diferentes  $(R, 0, 0)$ ,  $(0, R, 0)$  e  $((R, R, 0)/\sqrt{2})$ , onde  $R$  é o raio da partícula. No Capítulo 2 apresentamos detalhes do procedimento experimental.

É importante salientar que os nossos resultados para o feixe focalizado nas 3 posições da borda da microesfera foram todos obtidos com a mesma microesfera. Isso foi possível porque nossa pinça é capaz de manter a partícula aprisionada por horas, uma vez que cada espectro demandava mais de 30 minutos. Mesmo assim, foi necessário repetir o experimento algumas vezes, pois quando ocorria uma colisão com outras microesferas em volta, ou a partícula inicialmente presa escapava ou as duas microesferas ficavam presas conjuntamente. Isso chegou a ocorrer nos últimos minutos da última medida invalidando 2 horas de medidas já adquiridas. Resolvemos esse problema diminuindo bastante a concentração das microesferas e, com isso, a



probabilidade de colisão. Além disso, um outro ponto fundamental nessa medida é o acoplamento das ressonâncias, não basta colocar o laser na borda da partícula para observarmos os “MDR modes”. Existe uma posição ótima para a qual eles são excitados. O procedimento para encontrar essa posição foi: 1. focalizar o feixe na borda da partícula e fazer um espectro apenas na região de um pico; 2. mudar levemente a posição do laser e obter outro espectro. 3. repetir esses passos até maximizar a intensidade do picos 4. refazer o mesmo procedimento para todas as situações estudadas. O tempo total das medidas em uma mesma microesfera foi de quase 4 horas. Esses são os resultados apresentados nessa Tese.

Com o programa de onda plana encontramos o raio da microesfera utilizada através da comparação entre os picos teóricos e experimentais, assim como foi feito na seção 3.1.8. Usando, novamente, as relações de dispersão da água e do poliestireno de Bateman chegamos ao raio de  $4.66 \mu\text{m}$ .

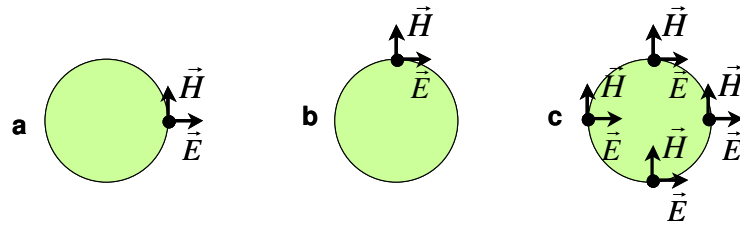


**Figura 72.** Espectro obtido com o feixe focalizado na posição **a.**  $(R, 0, 0)$  e **b.**  $(0, R, 0)$ .

Esse será portanto o valor do raio da microesfera utilizado no cálculo das forças com feixe localizado nas bordas, no formalismo do feixe gaussiano focalizado das seções 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.5 para as três posições do foco do Ti:Safira. Para calcular a força no caso do feixe focalizado escrevemos o programa no Mathematica (apêndice 2). Como se pode ver, o programa é quase todo escrito na forma algébrica, o que permite entender facilmente sua estrutura. Entretanto, foi necessário usar um pequeno truque

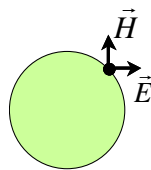
para evitar que o programa voltasse a calcular os mesmos coeficientes de Mie a cada passo, o que o tornava demasiadamente lento. Para isso incluímos comandos do tipo  $an[n\_ , \lambda\_]:= (an[n, \lambda] = an[n, mn[\lambda], xa[\lambda]]); Table [an[n, \lambda], \{n, 0, 100\}, \{\lambda, 0.71, 0.760\}]$ . As Figura 72 a e b apresentam os resultados experimentais comparados aos resultados teóricos para o feixe focalizado em  $(R, 0, 0)$  e  $(0, R, 0)$ .

Percebe-se claramente como os resultados experimentais desses gráficos são diferentes dos resultados obtidos para onda plana da Figura 67 em que os picos aparecem em duplas. Ficou claro que para o feixe focalizado estamos excitando seletivamente os modos TE e TM, em cada um dos casos, e os picos de cada um desses modos aparecem isoladamente. A idéia intuitiva sobre essas situações é mostrada na Figura 73. Com o foco na posição  $(R, 0, 0)$  só o campo elétrico tem componente radial e apenas os modos TM são excitados. Já na posição  $(0, R, 0)$  só o campo magnético tem componente radial e só os modos TE são excitados. Quando se excita com uma onda plana que incide sobre toda a partícula haverá excitação dos modos TM devido aos raios incidentes ao longo de x e dos modos TE devido aos raios incidentes na direção y, exibindo a estrutura característica de picos duplos observada.



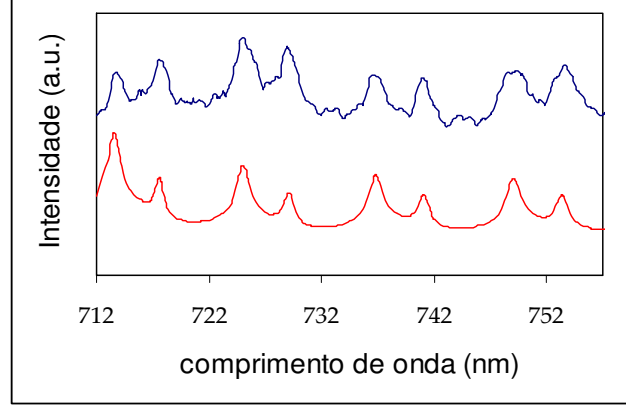
**Figura 73.** Campos elétrico e magnético para o feixe é focalizado na posição a.  $(R, 0, 0)$  e b.  $(0, R, 0)$ . c. onda plana.

Essa mesma idéia é demonstrada no caso em que o feixe é focalizado na posição  $((R, R, 0)/\sqrt{2})$ , conforme representado na Figura 74.



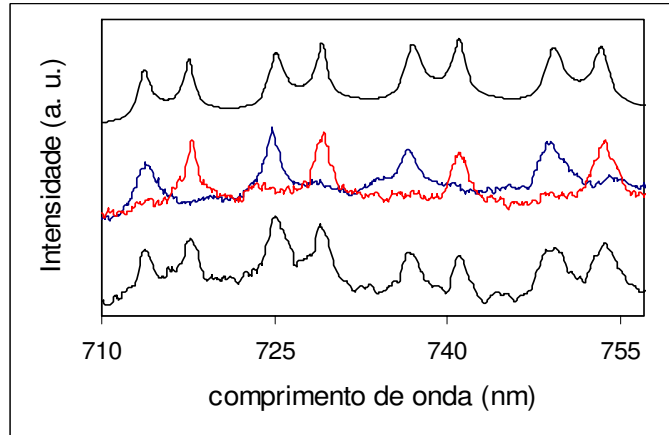
**Figura 74.** Campos elétrico e magnético quando o feixe é focalizado na posição  $((R, R, 0)/\sqrt{2})$ .

Neste caso, tanto o campo elétrico quanto o magnético possuem componentes radiais, logo ambos os modos, TE e TM, serão excitados. Isso é confirmado pelos nossos resultados tanto experimentais quanto teóricos apresentados na Figura 75.



**Figura 75.** Espectro obtido com o feixe focalizado na posição  $\left((R, R, 0)/\sqrt{2}\right)$ .

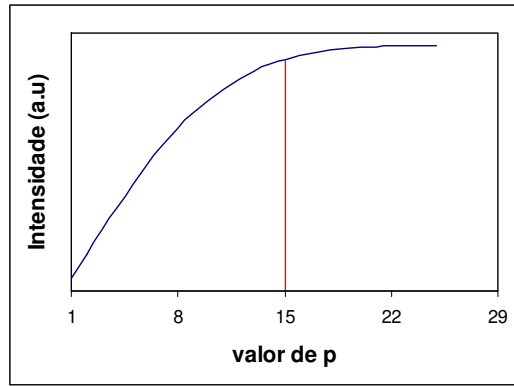
A Figura 76 faz uma síntese de todos esses resultados mostrando os quatro espectros, teórico de onda plana, e focalizados  $(R, 0, 0)$ ,  $(0, R, 0)$  e  $\left((R, R, 0)/\sqrt{2}\right)$  no mesmo gráfico.



**Figura 76.** Síntese dos resultados. Na sequência de cima para baixo: onda plana, focalizado em  $(R, 0, 0)$  e  $(0, R, 0)$ , focalizado em  $\left((R, R, 0)/\sqrt{2}\right)$ .

Os dados teóricos se ajustaram muito bem aos experimentais para um total de 16 picos observados na mesma microesfera. Os respectivos coeficientes  $a_n$  e  $b_n$  responsáveis pelos modos vão de  $a_{56}$  e  $b_{56}$  até  $a_{59}$  e  $b_{59}$ . Os coeficientes  $a_n$  são referentes ao modo TM e os  $b_n$  ao modo TE. Esses resultados demonstram o papel

fundamental da polarização para as ressonâncias de Mie e comprovam as previsões do modelo teórico do feixe gaussiano. Acreditamos que essa concordância demonstra tanto a qualidade do modelo teórico quanto do experimento em si. Essa comparação seria impossível se cada espectro tivesse sido obtido com partículas diferentes. Menos ainda se nossa pinça óptica fosse incapaz de segurar uma partícula por horas seguidas, sem mencionar a idéia de utilizar a própria ultrasensibilidade da pinça para medir forças ópticas ultrapequenas.

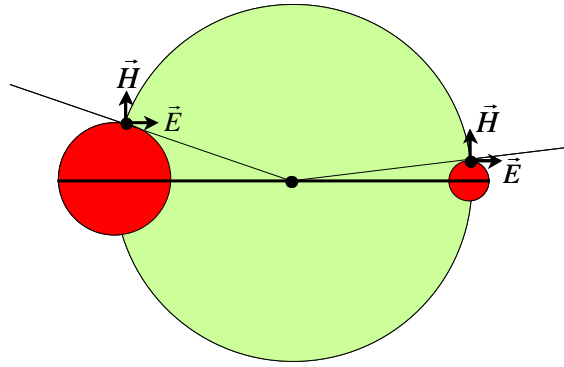


**Figura 77.** Gráfico de  $F_x$  em função de  $p$ .

Na comparação modelo teórico versus resultados experimentais observamos alguns fatos. A idéia intuitiva de um raio passando pela borda da partícula, conforme mostra a Figura 24 do capítulo 2, indica que a força terá componentes tanto na direção horizontal,  $x$  e/ou  $y$ , quanto na vertical  $z$ . Por isso nosso programa somou em quadratura  $\sqrt{F_x^2 + F_y^2 + F_z^2}$  as diferentes seções choque. Para o caso  $(R, 0, 0)$  só  $F_x$  e  $F_z$ , para o caso  $(0, R, 0)$  só  $F_y$  e  $F_z$  e as três para o ângulo de  $45^\circ$ . Notamos que as forças em  $z$  na borda têm a mesma ordem das forças no plano. Para decidir o limite para os valores de  $p$  utilizados no cálculo da força horizontal, fixamos o comprimento e o raio nas condições de ressonância e calculamos a força em função de  $p$ , assim como podemos ver na Figura 77. Percebemos então que a força converge até  $p$  da ordem de 15. Observamos que espectros com  $p = 15$  e  $p = 30$  não diferem.

Outro aspecto que merece discussão é o papel do “spot size” em relação ao raio da partícula para a excitação seletiva dos modos TE e TM. Conforme mostra a Figura 78

para o caso de um feixe focalizado no eixo  $x$ , à medida que o spot size em relação ao tamanho da partícula aumenta, aumenta a excitação do modo TE, pois diferentes regiões do feixe terão componentes de  $H$  na direção radial. Apenas no limite em que o “spot size” vai a zero é possível suprimir completamente um dos modos. É difícil medir o “spot size” do laser, que, no nosso caso, foi ajustado para os melhores resultados, com valor de  $\omega_0$  em torno de  $0.4 - 0.5 \mu\text{m}$  (ou seja da ordem do comprimento de onda), muito bom do ponto de vista experimental.



**Figura 78.** O tamanho do “spot size” e os modos de ressonância.

Chegamos a tentar observar as ressonâncias largas de Fabry-Perot existentes quando o foco incide bem no centro da partícula devido à interferência entre as múltiplas reflexões previstas na Tese de Mazzolli [27] e já observados por Ashkin no experimento de levitação. Entretanto, essas ressonâncias são muito mais largas do que as ressonâncias de Mie aqui observadas, e sua profundidade de modulação depende fortemente do coeficiente de reflexão. Para incidência normal a reflexão é dada por

$$R = \left[ \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right]^2, \text{ e cai muito com a diferença entre os dois índices de refração. Ashkin}$$

usava microesferas de óleo com  $n=1,6$  embebidas no ar, com  $n = 1$ , enquanto nós usamos microesferas de poliestireno  $n=1,6$  embebida em água com  $n=1,3$ , com uma refletividade muito menor. Por isso nossa medida ficou dentro do ruído. Sequer temos a opção de aumentar demais a diferença de índices de refração pois perderíamos a pinça óptica. A única chance de fazer essa observação seria utilizar um material com baixo índice de refração para o laser da pinça em  $1064 \text{ nm}$  mas muito alto para o laser de

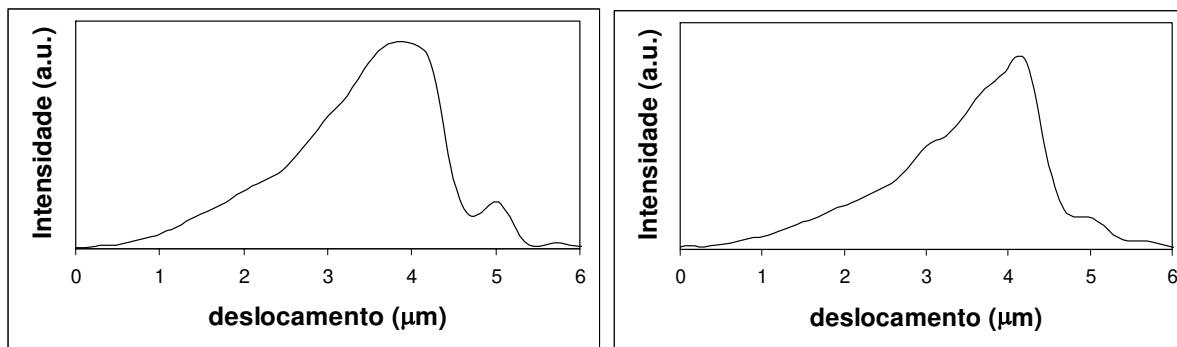
Ti:Safira. Materiais semicondutores podem apresentar esse comportamento, pois o índice de refração cresce muito para comprimentos de onda abaixo do gap óptico. Faltou entretanto a microesfera dos mesmos. Um material ideal seria o GaAs.

### **3.2.5.2 Medida da Força Óptica em Função do Deslocamento Centro-Foco e da Polarização**

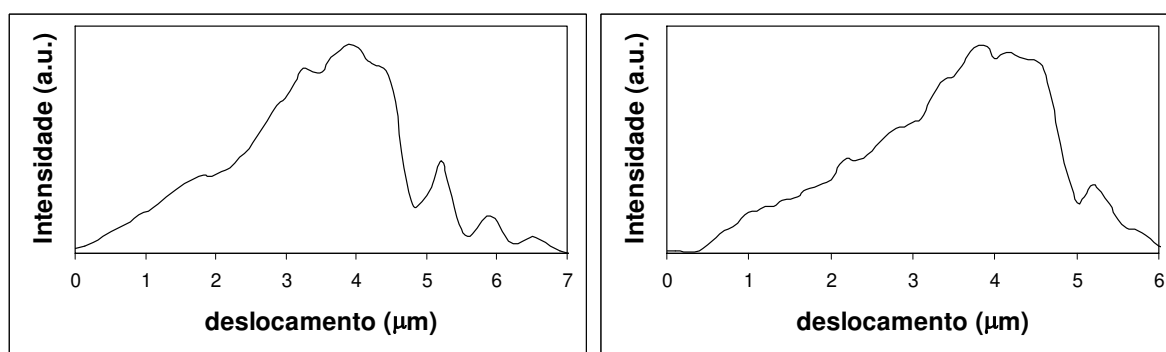
A montagem do experimento de Espectroscopia Ultrasensível de Força abriu a perspectiva de usá-la em um experimento ultrasensível de medida da força da própria pinça óptica, usando outra pinça óptica. Experiências de medida de força da pinça óptica e comparações com modelos teóricos tradicionalmente envolveram calibrações através de modelos hidrodinâmicos ou uso de movimento Browniano. Como veremos no capítulo 5, modelos hidrodinâmicos em baixos números de Reynolds na presença inevitável de paredes estão longe de total consenso, mesmo entre os especialistas na matéria. Problemas seculares nessa área estão sendo revisitados em publicações do século XXI. Isso significa que essas calibrações, no mínimo, representam testes de modelos contra modelos. Com esses resultados obtidos nessa seção é possível testar vários modelos e diferenciá-los com base em detalhes tão pequenos que jamais seriam detectados com medidas de apenas valores numéricos. Um exemplo disso são as oscilações que aparecem nas curvas que iremos mostrar.

As Figura 79 a e b e Figura 80 a e b apresentam os dados experimentais. Todas elas foram realizadas para o foco em  $z_0 = 0$ , da mesma forma que nas medidas de espectroscopia de força. A diferença nesse caso é que medimos a força em função da posição do foco para um comprimento de onda fixo, 1064 nm do laser de Nd:YAG, que variou continuamente, com passos de 0.1  $\mu\text{m}$ , de zero até cerca de 8  $\mu\text{m}$ . Conforme descrito no capítulo 2, as potências do feixe para as polarizações horizontais e verticais foram calibradas para serem iguais após a objetiva, de modo a permitir comparações entre as forças medidas para movimentos paralelos e perpendiculares à polarização. Nas medidas das Figura 79 a e Figura 80 a, o movimento da partícula foi perpendicular

à polarização do laser, enquanto nas Figura 79 **b** e Figura 80 **b** foi paralelo à polarização do laser.



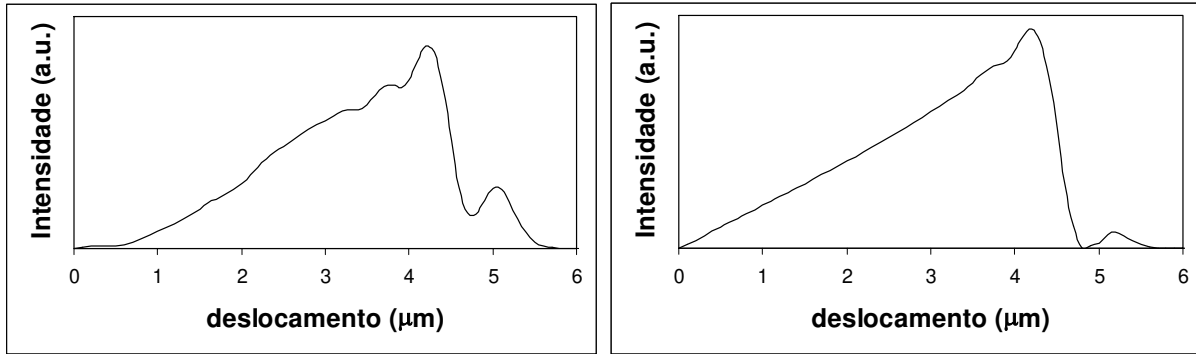
**Figura 79.** Dados experimentais para partículas de raio de 4.5  $\mu\text{m}$  **a.** movimento perpendicular a polarização **b.** movimento paralelo a polarização.



**Figura 80.** Dados experimentais para partículas de raio de 4.5  $\mu\text{m}$  **a.** movimento perpendicular a polarização **b.** movimento paralelo a polarização.

Para obter as curvas teóricas só foi necessário inverter o programa escrito para a espectroscopia de força fixando o comprimento de onda e variando a posição do foco do laser, mas utilizando as mesmas expressões para as forças nas direções horizontal e vertical. Também aqui somamos vetorialmente a força na direção  $z$ . Vale a pena ressaltar que nossas medidas são sensíveis às variações de posição da microesfera, independentemente da direção desse movimento, de modo que nem a medida nem o modelo estão diferenciando se o movimento é para cima ou para baixo, ou para fora do centro ou na direção do centro da partícula. Isso significa que oscilações que passariam de valores positivos para negativos aparecerão como lóbulos positivos apenas. As Figura 81 **a e b** mostram os gráficos teóricos da intensidade da força em função do deslocamento. Na Figura 81 **a** o deslocamento do foco é perpendicular à polarização e

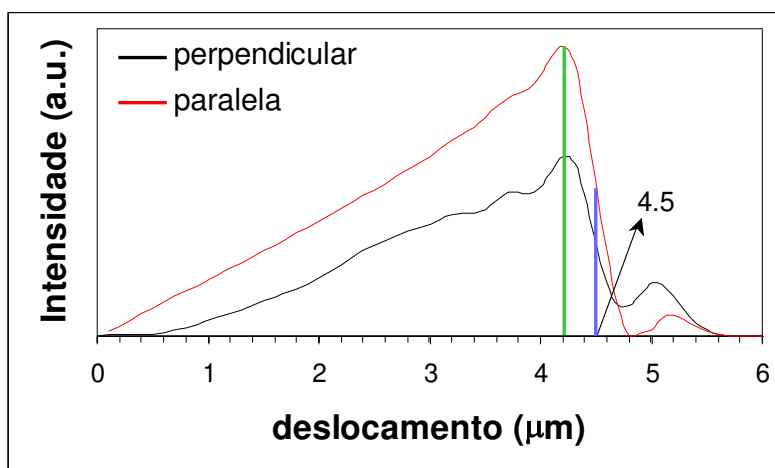
na Figura 81 **b** é paralelo à polarização. Comparando todas as imagens, notamos que as medidas das Figura 79 **a**, Figura 80 **a** estão de acordo a Figura 81 **a** e as das Figura 79 **b** e Figura 80 **b** estão de acordo com a Figura 81 **b**.



**Figura 81.** Dados teóricos **a.** movimento perpendicular a polarização  
**b.** movimento paralelo a polarização.

Tanto os resultados experimentais quanto os teóricos nos levam à conclusão de que a força óptica tem uma anisotropia azimutal que depende da direção do movimento da partícula em relação à polarização do feixe. Essa assimetria se torna mais pronunciada quando o foco do laser se aproxima da borda da microesfera, ou seja, em situações de forças grandes e no limiar de escape da partícula. Na Figura 82, podemos observar que a força óptica na partícula que se movimenta paralelamente à polarização do laser é consideravelmente maior do que a força da partícula que se movimenta na direção perpendicular. Esse fato faz sentido considerando que a reflexão para a polarização *s* é sempre maior do que a reflexão para a polarização *p*. Também notamos que o valor máximo da força ocorre em torno de  $r \sim 4 \mu\text{m}$  para uma partícula de raio  $R \sim 4.5 \mu\text{m}$ , ou seja, o pico da força não acontece exatamente na borda da partícula. Também faz sentido do ponto de vista intuitivo se consideramos que a largura do feixe era da ordem de  $0,5 \mu\text{m}$ . Isso significa que ao chegar à essa distância da borda parte do feixe incidirá fora da partícula, não sendo desviada.

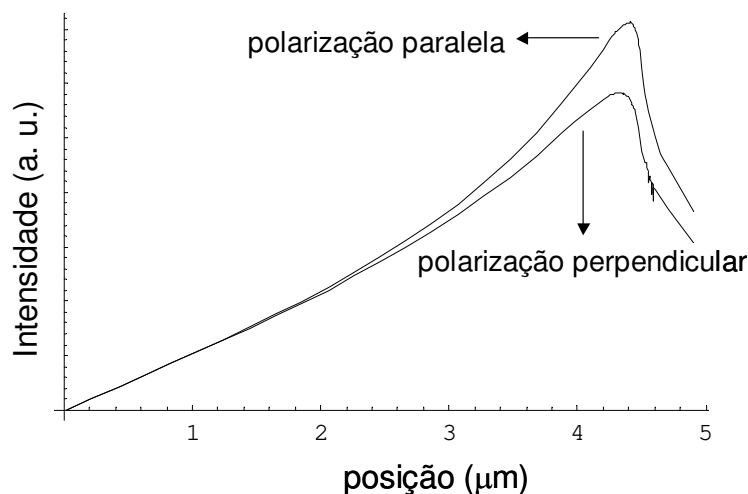




**Figura 82.** Dados teóricos, preto: movimento perpendicular a polarização, vermelho: movimento paralelo a polarização.

Simulamos esses resultados também com o modelo de óptica geométrica descrito no capítulo 5, conforme podemos ver na Figura 83. Nesse caso não foi possível calcular a força para distâncias do foco maiores do que o raio da partícula, como obtidos experimentalmente e simulados nos cálculos eletromagnéticos. Uma forma usual de medida da força da pinça óptica é a medida da força de escape da armadilha óptica. Nossos resultados indicam que esses são exatamente os casos mais perigosos do ponto de vista dos modelos. Primeiro porque é exatamente para deslocamentos próximo da borda onde ocorrem as maiores divergências entre os modelos de óptica geométrica e o cálculo eletrodinâmico completo. Segundo porque as anisotropias são maiores também nessa situação. No caso do movimento de um microorganismo modelado como uma esfera seria necessário observar se o escape se deu na direção paralela ou perpendicular à polarização do laser, sem falar da direção vertical. Terceiro porque essas medidas assumem que a posição do foco no escape é igual ao raio da partícula, o que não é verdade e pode representar um erro de mais de 10%. Em último porque é exatamente para o feixe focalizado nas bordas que se excitam as ressonâncias de Mie, de forma anisotrópica, caso o comprimento de onda do laser coincida com uma delas. Conforme podemos ver através da Figura 72 isto pode levar a um aumento da força de até 50%.

Entretanto, o acoplamento na ressonância pode ser facilmente destruído pois é bastante sensível à posição e às oscilações da partícula.



**Figura 83.** Dados teóricos obtidos através da óptica geométrica.

Um aspecto que nos pareceu muito interessante, e para o qual devotamos grande esforço nos assegurando que não se tratava de qualquer artefato nas medidas experimentais, foram as várias oscilações que aparecem quando o foco se aproxima e ultrapassa a borda da partícula. São bem mais intensas para a polarização perpendicular ao movimento e a Figura 80 (experimental) exhibe pelo menos três dessas oscilações bem distintas após o foco do laser ultrapassar a borda da partícula. Além disso percebe-se que essas oscilações se iniciam antes de atingir a borda. A princípio acreditávamos que as simulações com feixe puramente gaussiano não seriam capazes de mostrar essas oscilações, mas os resultados da Figura 81 comprovam que isso não é verdade. Entretanto, essas oscilações nem são tão pronunciadas e nem tantas quanto as da curva experimental. Nesse ponto acreditamos que é necessário considerar os efeitos da abertura da objetiva na difração do feixe incidente. Dois casos limites nos chamam a atenção: (1) o feixe gaussiano do laser não preenche completamente a abertura da entrada da objetiva e será um feixe gaussiano puro na região da imagem; (2) o feixe gaussiano preenche completamente essa abertura com intensidade constante em toda sua área. Nesse caso forma-se o padrão típico de difração de Airy no foco do laser,

$J_1(kr)/kr$ , com um máximo central seguido dos anéis à sua volta. Nesse caso observaríamos uma oscilação cada vez que um dos anéis extrapolasse a borda da partícula. Experimentalmente sabemos que estamos entre esses dois casos, pois toma-se o cuidado de preencher completamente a objetiva para garantir sua alta abertura numérica, com a contrapartida de uma perda parcial de potência. Entretanto, evitamos o limite em que o feixe do laser tem uma área muito maior do que a abertura para não perder tanta potência. Isso significa que haverá efeitos da difração mas a potência do laser incidente não é uniforme em toda a abertura de entrada da objetiva. Essa situação só pode ser simulada adotando a representação de Richards & Wolf [42] e resolvendo diretamente as integrais que ela contém.

Uma das últimas correções que poderiam ser introduzidas no modelo seria a das aberrações. Entretanto, não acreditamos que a estratégia de utilizar o modelo mais simples capaz de explicar nossos resultados experimentais tenha atingido esse limite. Sabemos que as correções das aberrações esféricas das objetivas dos microscópios são necessariamente muito boas para garantir uma boa imagem. Entretanto, essas correções são feitas para a região do visível e não do infravermelho. Portanto, não seria surpreendente se essas correções fossem necessárias.



## *Capítulo 4*

# *Aplicações de Pinça Óptica com Espectroscopias Confocais*

### **4.1 Motivação**

Desde 1999 percebemos quanto valor poderia ser agregado ao nosso sistema de pinça óptica com a incorporação de técnicas espectroscópicas ou de microanálise. A idéia sempre foi a de construir um sistema integrando a habilidade de manipulação da pinça óptica com a de caracterização das diferentes técnicas espectroscópicas. O objetivo final foi o de adquirir a possibilidade de acompanhar em tempo real, processos físico-químicos mantendo a capacidade de manipulá-los. Agregando microanálise à pinça poderíamos analisar a composição e metabolismo de uma única célula, inclusive de células vivas em movimento. Poderíamos aproximar e afastar partículas umas das outras, exercer tensões e forças sobre as mesmas e analisar as conseqüências e causas dessas manipulações.

Um exemplo de investigação que muito se beneficiará da capacidade de microanálise que instalamos é o estudo de quimiotaxia de microorganismos. Esse projeto, objetivo da Tese de Mestrado de uma estudante do nosso grupo, vai dar continuidade aos estudos sobre o protozoário *Leishmania amazonensis* descrito no capítulo 5. A quimiotaxia é a resposta de organismos unicelulares frente a gradientes de concentração de substâncias atratoras ou repulsoras. Ela tem sido extensivamente estudada de dois pontos de vista: 1. como uma caixa preta na qual se observa uma resposta a um estímulo, (determinando a função resposta) e 2. com modelos de funcionamento interno da caixa preta. Nesses estudos os estímulos são a presença de gradientes de concentração das substâncias e a resposta é a direcionalidade no tempo dos microorganismos. Para estudos do ponto de vista da caixa preta a simples manipulação com a pinça óptica é suficiente, pois podemos movimentar o parasita ao longo do gradiente de concentração ao mesmo tempo em que medimos a sua resposta, basicamente a intensidade e direção das forças com que ele responde aos estímulos externos. Existem modelos e controvérsias sobre como todo esse processo acontece bioquimicamente [47]. O modelo padrão afirma que quando um atrator se liga ao seu receptor induz a ligação de uma proteína adaptadora CheW, a qual controla a atividade de outra proteína CheA. Essa proteína, por sua vez, abastece as proteínas CheY com radicais fosfatos que se ligam ao motor flagelar induzindo uma rotação anti-horária. O processo termina com a desfosforilação do CheY para CheZ. A metilação das proteínas intracelulares é o mecanismo inibidor. Para ter acesso a informações dentro da caixa preta in vivo seria necessário acompanhar a formação dos grupos protéicos por alguma técnica de microanálise.

Desejamos, portanto, incorporar à pinça óptica, técnicas de espectroscopia com resolução micrométrica para individualizar o objeto de estudo e resolução espectral para diferenciar compostos químicos diferentes. Vale a pena notar que em uma reação química as moléculas se modificam, mas os átomos são os mesmos. Isso significa que

espectroscopias que detectam os níveis atômicos mais internos, como fluorescência de raios-X, não forneceria a informação relevante para o nosso problema.

A absorção no infravermelho tem a alta especificidade molecular desejada, pois é sensível aos modos vibracionais e constantes de forças entre átomos. Entretanto, como as energias vibracionais estão em regiões de comprimento de onda muito longo, sua resolução espacial é pobre. Sem mencionar as dificuldades com janelas, lentes, fontes de luz intensas e detectores para região acima de 3  $\mu\text{m}$ . A espectroscopia Raman, no entanto, é capaz de trazer a informação dos modos vibracionais do infravermelho para a região do visível, com resolução espacial de até 200 nm e para a qual existem fotomultiplicadoras, CCDs e fotodiodos de avalanche (APDs) supersensíveis. Outra possibilidade de extrair informações com especificidade química é através da luminescência, tanto endógena, dos próprios componentes químicos presentes no microorganismo, quanto exógena, através de marcadores fluorescentes que se ligam a proteínas ou moléculas específicas.

Além da capacidade de acompanhar a bioquímica no nível microscópico também desejamos ter a capacidade de microscopia com seletividade química, isto é, obter uma imagem em 2 e/ou 3 dimensões das regiões em que determinada substância está presente. Também desejaríamos obter essas imagens em tempo real, ou seja, ser capazes de acompanhar processos bioquímicos no tempo e no espaço.

Nesse aspecto houve uma grande avanço nas duas últimas décadas com o desenvolvimento das microscopias confocais de varredura a laser, nas quais se reconstrói uma imagem através da fluorescência de um fluoróforo em função da posição do foco do laser. O advento de lasers de pulsos ultracurtos comerciais de fácil manuseio na década de 90, principalmente Ti:Safira, abriu a oportunidade para técnicas de óptica não linear, ou processos de mais de um fóton, como a microscopia multifóton

e microscopia SHG (“Second Harmonic Generation”)<sup>4</sup>. Percebemos, portanto, uma dupla utilidade na incorporação de espectroscopias a pinça óptica: 1. a capacidade de acompanhar no tempo uma informação espectroscópica em uma posição fixa no espaço; 2. a capacidade de extrair imagens com alguma seletividade química.

#### **4.1.1 Oportunidade de Incorporação de Técnicas de Microanálise à Pinça Óptica**

Nosso grupo trabalhava em duas áreas de pesquisas com objetivos e infra-estruturas experimentais com pouca superposição além do envolvimento das mesmas pessoas. Para as pesquisas de novos materiais fotônicos de resposta ultra-rápida tínhamos um sistema de lasers de pulsos ultracurtos sintonizável de 750 nm até quase 3000 nm, enquanto a infra-estrutura do laboratório de pinças ópticas incluía o laser de Nd:YAG e a microscopia, em espaços físicos distintos. Entretanto, os lasers pulsados e cw são as ferramentas básicas que permitem a incorporação das técnicas espectroscópicas lineares e não lineares à pinça óptica. Dessa forma ficou claro que um investimento ordens de grandeza abaixo do necessário para a aquisição do sistema de lasers de pulsos ultracurtos<sup>5</sup> era suficiente para a incorporação da microanálise à pinça óptica. Para tanto foi necessário fundir os dois espaços físicos em um só e 4 mesas ópticas em um conjunto único para evitar desalinhamento de lasers causado pelo movimento de qualquer umas das mesmas.

---

<sup>4</sup> Essa microscopia é denominada hoje por microscopia SHG porque veio da comunidade de óptica não linear. Entretanto, o processo SHG é específico para feixes de laser e seu segundo harmônico se propagando em direções bem definidas com regras de seleção restritas. Na microscopia SHG detecta-se, na realidade, o espalhamento no segundo harmônico, processo conhecido como espalhamento Hiper Rayleigh. Nesse caso a denominação mais adequada seria microscopia Hiper Rayleigh.

<sup>5</sup> Trata-se de 3 lasers com preços em torno de US\$ 100.000: 1 Laser de Argônio + 1 laser de Ti:Safira pulsado + 1 oscilador paramétrico. Adicionando US\$ 40.000 para o laser de Ti:safira cw chega-se ao custo total de US\$ 340.000.



#### 4.1.2 Objetivos e Desafios do Trabalho Descrito nesse Capítulo

Em vista do exposto, percebe-se que nosso objetivo ao desenvolver o trabalho descrito nesse capítulo não foi o de estudar com profundidade as propriedades espectroscópicas, como Raman, ou de óptica não linear, como Hiper Rayleigh ou Hiper Raman, de qualquer das amostras com as quais obtivemos os resultados apresentados, mas o de incorporar à pinça óptica o máximo das técnicas de microanálise possível para demonstrar sua viabilidade e caracterizar as performances obtidas. Os materiais foram escolhidos para caracterizar nossa instrumentação e não o inverso. Obviamente que os trabalhos futuros só farão sentido no caso inverso, usar a instrumentação para caracterizar os materiais. Portanto, no nosso caso, o desafio foi a implementação do sistema experimental.

Mesmo que desejássemos e obtivéssemos todo o financiamento necessário, não seria possível adquirir no mercado equipamentos comerciais com as especificações do nosso sistema, simplesmente porque eles ainda não existem. Existem microscópios multifóton isolados e equipamentos de micro-Raman isolados, mas não existe um equipamento que integre todas essas técnicas junto com a pinça óptica em um sistema único. Isso significa que foi necessário desenvolver do início, partindo de blocos preexistentes, um sistema “homemade”. O enorme trabalho para a montagem dessa instrumentação, entretanto, foi compensado pelo fato de que estaríamos mais capacitados para a realização de medidas diversificadas do que os próprios especialistas em cada área de espectroscopia no Brasil hoje.

Gostaria de chamar a atenção para o fato de que para desenvolver uma instrumentação de sistemas de espectroscopia é necessário diagnosticar e encontrar uma solução para cada artefato que surge, e não são poucos, principalmente quando adicionados aos artefatos da microscopia. É fácil perder a noção de quantas pessoas e horas de trabalho especializado foram necessários para sanar cada um dos problemas de instrumentação quando simplesmente adquirimos um equipamento comercial.

### 4.1.3 Estrutura do Capítulo

Dentro do cenário exposto acima estruturamos esse capítulo através do seguinte critério: primeiro descrevemos o nosso trabalho com espectroscopias envolvendo 1 fóton de excitação, no nosso caso, basicamente Raman; e em segundo tratamos das espectroscopias que envolveram excitação por dois fótons, ou seja, luminescência excitada por absorção de dois fótons, espalhamentos Hiper Rayleigh e Hiper Raman. A descrição de cada uma dessas espectroscopias foi a mais simples, isto é, utilizamos a representação mais intuitiva, seja ela clássica ou quântica, direcionada para os nossos objetivos que são as propriedades desejadas fornecidas pela técnica.

## 4.2 Espectroscopia Raman

Chandrasekhara Venkata Raman descobridor do efeito Raman nasceu na Índia em 1888 e morreu em 1970. Um dos seus mais importantes trabalhos foi sobre as cores dos oceanos, quando começou a estudar o espalhamento da luz que resultou na descoberta do efeito Raman em 1928, pelo qual recebeu o prêmio Nobel.

Quando a luz incide sobre um material, ela pode ser absorvida ou espalhada. A maior parte da luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente, nesse caso temos os chamados espalhamentos elásticos, tais como o espalhamento Rayleigh, que ocorre quando a luz é espalhada por partículas menores do que o comprimento de onda, e o espalhamento Mie, que ocorre quando a luz é difundida por partículas iguais ou maiores que o comprimento de onda, conforme estudamos exaustivamente no capítulo 3. Todavia uma pequena fração da luz espalhada - 1 entre  $10^7$  fótons, sofre troca de frequência e, nesse caso, temos a ocorrência do espalhamento inelástico. Como a energia da luz é proporcional à sua frequência, a variação de frequência da luz espalhada deve ser igual às diferenças de frequências vibracionais ou rotacionais das moléculas do material. Quando esse processo de troca de energia entre o material e a luz incidente envolve fônons ópticos, o efeito é chamado de Raman; e quando envolvem fônons acústicos, de Brillouin. De um ponto de vista quântico esses efeitos podem ser

vistos como transições entre níveis de energia vibracionais do estado eletrônico fundamental de uma molécula por um processo envolvendo um fóton e um fônon, conforme representado na Figura 84. No espalhamento Stokes um fóton de energia mais alta é absorvido com a simultânea emissão de um fóton de energia mais baixa e um fônon. Já no anti-Stokes ocorre a absorção de um fóton de energia mais baixa e de um fônon com a emissão simultânea de um fóton de energia mais alta. No efeito Raman não estimulado só são absorvidos fônons térmicos pré-existentes, cuja população varia com a temperatura, de modo que a intensidade do pico Stokes é sempre mais alta do que a do anti-Stokes. No caso do espalhamento Stokes e anti-Stokes, as diferenças de nº de onda entre os níveis vibracionais, também chamada Raman Shift, são dadas respectivamente por  $\nu_s = \frac{1}{\lambda_i} - \frac{1}{\lambda_e}$  e  $\nu_{as} = \frac{1}{\lambda_i} + \frac{1}{\lambda_e}$ , onde  $\lambda_i$  e  $\lambda_e$  são os comprimentos de onda do fóton incidente e do fóton espalhado. A intensidade do Raman anti-Stokes decresce exponencialmente com o aumento do Raman Shift.

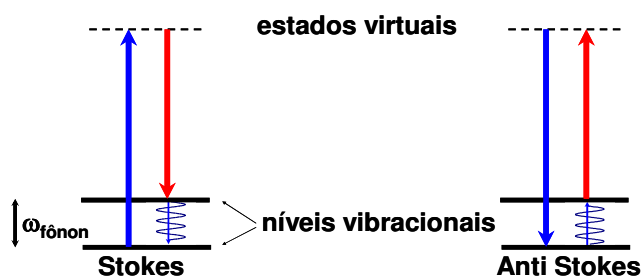
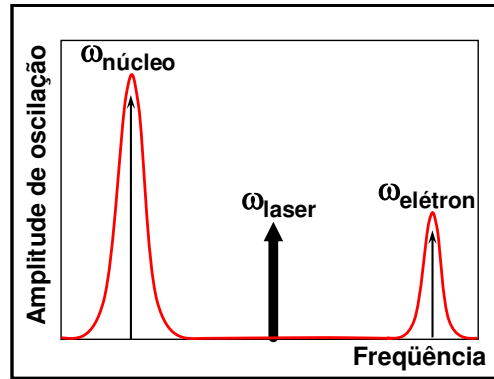


Figura 84. Raman Stokes e anti-Stokes.

Já em um quadro clássico podemos pensar o efeito Raman como a modulação de um dipolo. Para tanto consideramos uma molécula em que os núcleos estão presos em uma determinada posição de equilíbrio em torno da qual vibram com frequências baixas devido as suas grandes massas, enquanto os elétrons vibram com frequências muito mais altas por causa das massas 1000 vezes menor. Na situação típica de espectroscopia Raman de materiais transparentes, a frequência da luz incidente é muito menor do que a das ressonâncias dos elétrons e muito superior a das vibrações dos núcleos. A resposta de um oscilador harmônico amortecido forçado com frequências muito superiores às frequências de ressonância cai com  $1/\omega^2$ , mas para frequências

inferiores às da ressonância ele responde como se fosse o caso estático,  $F = Kx$ , na mesma frequência da luz incidente. Isso significa que a frequência da luz incidente é alta demais para forçar as vibrações dos núcleos mas é capaz de colocar os elétrons em oscilação, conforme representado na Figura 85. Entretanto é a oscilação do dipolo núcleo + elétron que irradia ondas eletromagnéticas e a vibração natural do núcleo modula a um dipolo que, com o núcleo parado, vibraria na frequência do elétron, igual à do fóton incidente.



**Figura 85.** Frequências de ressonância do núcleo e elétron relacionada à frequência de emissão do laser.

A polarização do dipolo é função das coordenadas nucleares, que não respondem ao campo elétrico incidente, mas vibram naturalmente com a frequência do fônon,  $x_n = x_{n0} + \delta x_n \cos(\omega_{f\acute{o}non} t)$ , e da eletrônica, que acompanha o campo incidente,  $x_e = x_{e0} + \delta x_e(E) \cos(\omega t)$ . Expandindo a polarização em série de Taylor até termos cruzados de segunda ordem em  $x_n$  e  $x_e$ , obtemos:

$$P(x_e, x_n) = P(x_{e0}, x_{n0}) + \frac{\partial P}{\partial x_e} \delta x_e(E) \cos(\omega t) + \frac{\partial P}{\partial x_n} \delta x_n \cos(\omega_{f\acute{o}non} t) + \frac{\partial^2 P}{\partial x_e \partial x_n} \delta x_e(E) \delta x_n \cos(\omega_{f\acute{o}non} t) \cos(\omega t) \quad (4.1)$$

Se o material não é ferroelétrico, o primeiro termo, uma polarização permanente, é nulo. O segundo termo, que irradia na mesma frequência do fóton incidente, é o espalhamento elástico de Rayleigh. O terceiro, da vibração do núcleo,

emite fótons no infravermelho. O quarto termo, finalmente, vai dar origem ao Raman, pois como  $\cos A \cos B = \frac{1}{2} \{ \cos(A + B) + \cos(A - B) \}$  temos:

$$\cos(\omega_{\text{fôn}} t) \cos(\omega t) = \frac{1}{2} \cos[(\omega - \omega_{\text{fôn}}) t] - \frac{1}{2} \cos[(\omega + \omega_{\text{fôn}}) t] \quad (4.2)$$

e então haverá fótons emitidos com  $\omega - \omega_{\text{fôn}}$ , Stokes, e  $\omega + \omega_{\text{fôn}}$ , anti-Stokes. Neste quadro é fácil perceber a possibilidade de “overtones” e combinações de fônons considerando termos de ordem mais alta envolvendo apenas uma derivada em relação

à  $x_e$ . Por exemplo, o termo com  $\frac{\partial^3 P}{\partial x_e \partial x_{n1} \partial x_{n2}} \delta x_e(E) \delta x_{n1} \delta x_{n2} \cos(\omega_{f1} t) \cos(\omega_{f2} t) \cos(\omega t)$ ,

que vai emitir fótons com as frequências  $\omega - \omega_1 - \omega_2$ ,  $\omega - \omega_1 + \omega_2$ ,  $\omega + \omega_1 - \omega_2$  e  $\omega + \omega_1 + \omega_2$ . Se  $\omega_1 = \omega_2$  podemos observar os vários harmônicos de um fôn. Normalmente a eficiência das combinações de modos e “overtones” cai muito rapidamente com as linhas mais intensas correspondendo a um fôn de cada modo normal de vibração da molécula permitido pelas regras de seleção. Fabricantes de micro-Raman têm demonstrado a qualidade e sensibilidade de seus equipamentos com espectros que mostram até a quarta harmônica do fôn LO em torno de  $500 \text{ cm}^{-1}$  do silício.

O Raman ressonante, com uma eficiência maior que o Raman convencional, acontece quando a luz incidente tem energia idêntica à de uma transição eletrônica real. Usando lasers no visível ou infravermelho próximo, apenas materiais coloridos apresentam Raman ressonante. Por outro lado, praticamente todos os materiais possuem algum nível eletrônico na região do ultravioleta, exceto materiais especiais normalmente usados em janelas e objetivas, mas que são geralmente raros e caros.

O efeito Raman, na linguagem de um engenheiro de comunicações, ocorre quando as vibrações dos núcleos dos átomos modulam diretamente a polarização núcleo-elétrons, remetindo, como se fosse uma antena, um sinal modulado nas frequências  $\omega_{\text{luz}} \pm \omega_{\text{núcleo}}$ . Dessa forma, o Raman traz a informação sobre as vibrações dos núcleos do infravermelho para o visível ou infravermelho próximo, de forma análoga a

uma rádio FM que transporta a informação de voz na faixa de 20 Hz – 10 kHz por uma portadora na faixa de 100 MHz.

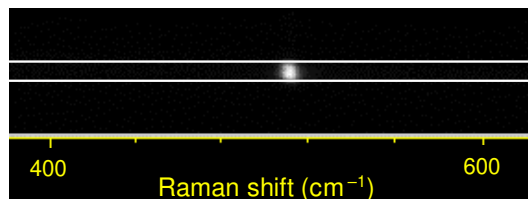
Conforme discutido no capítulo 2, o grande problema do Raman é sua baixa intensidade, que pode chegar a  $10^{-10}$  dos fótons incidentes, várias ordens de grandeza inferior ao espalhamento Rayleigh. Por isso a necessidade de uso monocromadores duplos de 1 m ou de mais de um filtro NOTCH com taxas de rejeição da ordem de  $10^6$ . A desvantagem do uso dos filtros NOTCH é que não são sintonizáveis. Com isso perdemos a capacidade de sintonia do laser, obrigando-nos a operar na região definida pelo filtro. Outra desvantagem é o fato de que os melhores desses filtros têm largura de  $350\text{ cm}^{-1}$  não permitindo observar linhas abaixo de  $100\text{ cm}^{-1}$ . Novos sistemas Raman praticamente consistem de uma primeira passagem por um filtro NOTCH sintonizável seguida pela passagem por um monocromador apenas. Nesse caso seria possível utilizar o laser de bombeio em todo seu intervalo de sintonia e ainda chegar tão próximo da linha do laser quanto  $10\text{ cm}^{-1}$  na configuração normal e mesmo até  $1\text{ a }3\text{ cm}^{-1}$  em configurações especiais. Trata-se, no entanto, de equipamentos caros, grandes, nem um pouco amigáveis para quem deseja modificar sua configuração para incluir seu próprio microscópio, pinça óptica e software de controle.

Quando decidimos incorporar espectroscopia à pinça óptica procuramos na literatura quem já havia utilizado as duas técnicas conjuntamente. O trabalho que nos pareceu mais interessante foi do Dr. Katsuhiro Ajito do NT&T Basic Science Laboratory do Japão. Entramos em contato com ele por e-mail e acabamos convidando-o para uma visita de um mês ao Brasil. Interessante foi o fato de que nossas culturas e trajetórias estavam invertidas. O Dr. Katsuhiro era Engenheiro Químico com doutorado em Raman que evoluiu da espectroscopia para a pinça óptica. Ele adquiriu um sistema compacto da Renishaw fabricado sob encomenda para operar na região do Ti:Safira cuja montagem confocal praticamente garantia as condições de operação da pinça óptica. Nós, por outro lado, evoluímos da pinça óptica para a espectroscopia e tivemos que adaptar o sistema existente para medida de Raman, usando apenas componentes

básicos de óptica, monocromador e CCD. Por isso a colaboração com o Dr. Ajito não nos livrou do sofrimento de montar nosso instrumento quase do zero. Entretanto, jamais teríamos tido sucesso sem os filtros NOTCH, objetivas especiais e materiais que ele trouxe consigo, sem falar do compromisso de obter um espectro Raman no período de 3 semanas em que nos visitou. Por outro lado, nossa comparação de performance automática foi com o sistema do Dr. Ajito. Uma vantagem inicial de nosso sistema comparado ao dele foi o fato de que usamos o Ti:Safira cw apenas para excitação do Raman deixando o Nd:YAG com o papel de pinça óptica. Com isso podemos usar um sistema de varredura do Ti:Safira para obtenção de imagens. Outra vantagem foi a possibilidade de uso do laser de Ti:Safira pulsado, que abre perspectivas para processos não lineares. Uma vez resolvidos os maiores detalhes experimentais passamos a obter espectros com os mesmos materiais que o Dr. Ajito havia caracterizado. Dessa forma sabíamos que ainda poderíamos melhorar o desempenho do nosso sistema. Paramos essa otimização quando obtivemos os mesmos espectros obtidos por ele com menores ou iguais tempos de aquisição.

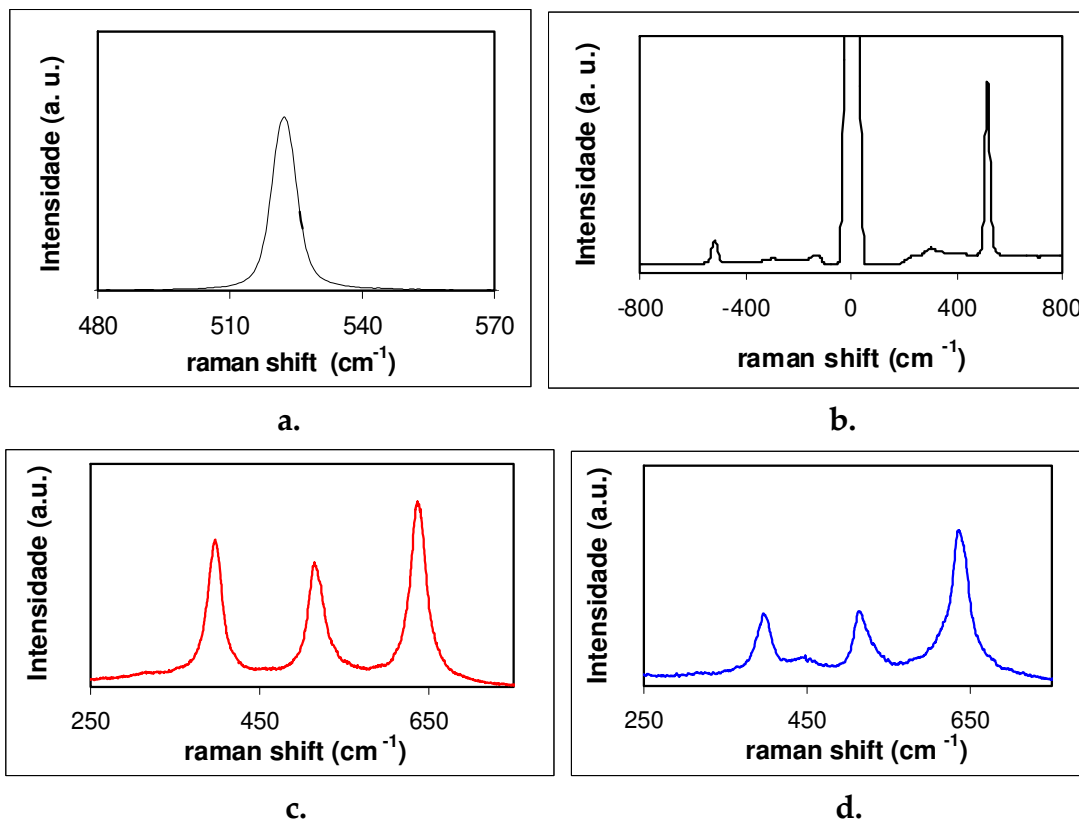
#### 4.3 Resultados de Raman com Pinça Óptica

A Figura 86 ilustra como a imagem do Raman do silício aparece na CCD. Nossa CCD tem 1200 pixels na horizontal e 100 pixels na vertical. O sinal extraído do software corresponde à soma da intensidade dos pixels verticais para sua respectiva posição horizontal. Entretanto, para melhorar a relação sinal/ruído delimitamos a janela vertical somando apenas as intensidades dos pixels da região iluminada, evitando adicionar apenas o ruído das regiões escuras.



**Figura 86.** Imagem do Raman Stokes do Silício na CCD.

Na Figura 87 mostramos espectros de Raman Stokes e anti-Stokes do silício, partículas de anatase na forma de pó sobre uma lâmina e TiO<sub>2</sub>. A qualidade do sistema foi avaliada comparando os nossos espectros com os obtidos pelo micro-Raman do Dr. Ajito e por outros artigos [13, 48], tomando como base a relação sinal/ruído e o tempo de aquisição dos dados. As informações sobre potência e tempo de exposição são apresentadas nas legendas.

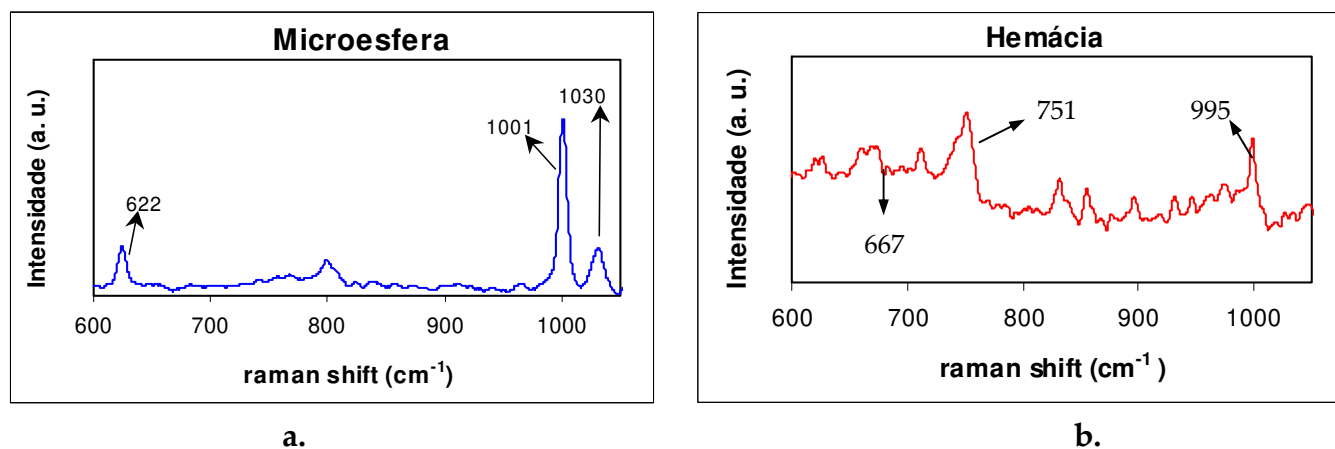


**Figura 87.** Espectros de Raman. **a.** Silício Stokes, 20 mW-1 s. **b.** Silício Stokes/anti-Stokes, 20 mW-1 s. **c.** Anatase-Stokes, 20 mW-1 s. **d.** TiO<sub>2</sub>, 20 mW-1 s.

As Figura 88 **a** e **b** exibem os espectros de uma microesfera de 6  $\mu\text{m}$  e de uma hemácia capturadas pela pinça óptica. Enquanto uma boa relação sinal/ruído é obtida com apenas 2 segundos para a microesfera de poliestireno foi necessário usar 2 minutos para observar o Raman da hemácia. Tipicamente, materiais biológicos apresentam espectros Raman repletos de picos. A hemácia utilizada nessa medida foi obtida simplesmente furando o dedo com uma agulha esterilizada e pingando uma gota de sangue em soro fisiológico, sem qualquer outro cuidado, tanto para evitar contato com



oxigênio, que ativa as plaquetas para iniciar o processo de coagulação, nem para a utilização de conservantes comumente empregados em hematologia tais como o CPDA<sub>1</sub> (citrato, fósforo, dextrose, adenina). Os três picos destacados na Figura 88 **b** são idênticos aos obtidos por Xie e seu grupo para uma preparação similar da célula. As condições para se obter o espectro de Raman da microesfera e a sua qualidade foram as mesmas dos artigos do Dr. Ajito e Xie [13, 48]. Já o espectro do Raman da hemácia nos custou mais tempo. Enquanto Xie obteve um espectro com 5s, nós levamos cerca de 2 min. Entretanto, fomos capazes de obtê-lo em um bom intervalo de tempo apesar de não termos, assim como ele, um equipamento otimizado para o infravermelho.



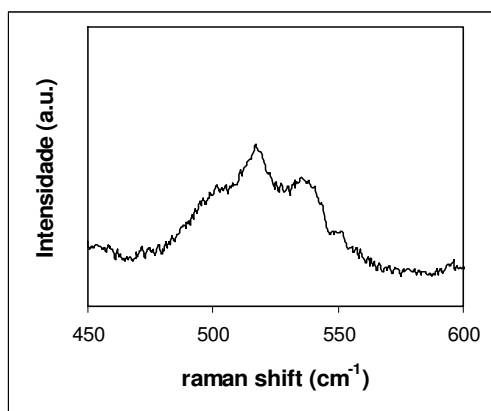
**Figura 88.** Espectros de Raman de uma microesfera e uma hemácia capturadas pela pinça óptica. **a.** microesfera, 20 mW-2 s. **b.** hemácia, 20 mW-2 min.

Esses resultados demonstram o quão eficiente e sensível é o nosso equipamento e, principalmente, que com ele tivemos sucesso em observar espectros quimicamente seletivos como Raman de partículas capturadas. Para melhorar a eficiência do nosso sistema necessitaríamos de objetivas com “coating” anti-refletor para a região do Ti:Safira. Não tanto por causa da perda de intensidade da luz incidente, que pode ser compensada com o aumento da potência do laser, mas devido ao aumento da eficiência de coleta do Raman. Aumentar demais a potência do laser incidente pode danificar a amostra, principalmente as biológicas. Nossa objetiva transmitia aproximadamente 20% na região de 785 nm, mas hoje já existem objetivas com transmissão em torno de 80%. Poderíamos aumentar a eficiência por um fator 4 com a óptica correta. Outro ponto de

otimização viria de grades de difração com blaze para a região do infravermelho e o uso de uma grade de 600 linhas/mm. Nosso monocromador só tinha duas grades de difração, de 1200 linhas/mm que abre demais o espectro e de 300 linhas/mm que fecha demais, perdendo resolução. Em muitos casos a grade de 600 seria ideal, a mesma foi utilizada por Xie para observar Raman de hemácias. Todas essas otimizações, entretanto, envolveriam a compra de material importado que seria muito demorada para nos ser útil nesse estágio.

#### **4.4 Processos Ópticos Envolvendo Dois Fótons**

O laser de Ti:Safira pulsado abriu a possibilidade de realização de espectroscopias não lineares por processos de dois fótons que não era permitida pelo laser de cw Ti:Safira. O laser cw permite melhor resolução para Raman devido à sua largura de linha muito fina, impossível de ser obtida pelo laser de pulso curto devido ao limite imposto pela transformada de Fourier. Espectros Raman lineares também podem ser obtidos com laser pulsado mas com resolução bem menor, ou seja, espectros bem mais largos, como mostra a Figura 89 abaixo. Para tanto não usamos o filtro banda, mas o espectro do pulso, mais largo do que  $350\text{ cm}^{-1}$ , é estreitado pelo próprio filtro NOTCH de tal forma que até podemos observar um “vazamento” do mesmo no espectro obtido (um pulso espectralmente menor implica em duração temporal de pulso maior). A situação ideal seria ter a largura espectral dos pulsos do laser da ordem da largura de linha dos picos Raman, mas isso geralmente significa pulsos de picosegundos e não femtosegundos. É possível controlar a largura espectral e a duração temporal dos pulsos de laser com janelas espectrais intracavidade, mas isso envolve um completo realinhamento do mesmo. A menos que exista uma vantagem específica para obter Raman linear com laser pulsado, todo esse trabalho não parece compensar. Talvez compense para quem deseja obter Raman resolvido no tempo em picosegundos.



**Figura 89.** Raman do silício obtido com o laser pulsado de femtosegundos.

Por outro lado o laser de femtosegundos se torna vantajoso na obtenção de processos multifotônicos. Nós o utilizamos em três desses processos, para excitar luminescência por absorção de dois fótons, para gerar espalhamento no segundo harmônico (o Hiper Rayleigh) e para excitar Hiper Raman, conforme descrevemos a seguir.

#### 4.5 Processos de Absorção Multifotônica

Os processos multifótons são aqueles que necessitam de mais de um fóton para ocorrer, sendo, portanto, proporcionais à intensidade do feixe incidente elevada pelo número de fótons envolvidos no processo. No fundo são semelhantes à uma reação química em que  $A + A + \dots + A \rightarrow B$ , para a qual a velocidade de reação depende da concentração de A elevada à enésima potência, i.e.,  $V = c[A]^n$ . Nessa analogia, [A] é a concentração de fótons que é proporcional à intensidade da luz. Esses processos dependem da probabilidade de encontrar mais de um fóton na mesma posição ao mesmo tempo. Por isso são facilmente observados com lasers pulsados, onde todos os fótons se superpõem automaticamente no tempo, aumentando a chance de se encontrar mais de um fóton em um mesmo momento. Por outro lado a superposição espacial ocorre no foco do laser, onde os fótons estão mais concentrados. Como a probabilidade de ocorrer processos não-lineares aumenta com  $I^n$ , os mesmos só são significativos em

um pequeno volume em torno do foco do laser, onde está o ponto de maior intensidade do feixe de excitação, garantindo assim uma alta resolução espacial.

Processos de absorção por 2 ou mais fótons foram previstos por Marie Göppert-Mayer em 1931, porém observações de processos multifotônicos só foram possíveis depois da invenção do laser pulsado de Rubi em 1960. A primeira observação de absorção de 2 fótons foi feita por Kaiser e Garret em 1961 e a de 3 fótons por Singh e Bradley em 1964 [49]. Após isso, a excitação por absorção de múltiplos fótons tem sido usada em estudos espectroscópicos de diversos materiais. Já a aplicação dessa técnica na Biologia começou muito recentemente, somente em 1990 com a invenção de Denk, Strickler e Webb do microscópio de fluorescência de varredura por absorção de 2 fótons [50].

Sem entrar em maiores detalhes, sem preocupações com as constantes multiplicativas e a densidade de estados, podemos extrair informações relevantes sobre esses processos através da teoria de perturbação dependente do tempo. Nessa teoria o Hamiltoniano é dado por  $H = H_0 + \lambda H'(t)$ , onde  $H_0$  é o Hamiltoniano não perturbado cujas autofunções  $u_n$ , tal que  $H_0 u_n = E_n u_n$ , formam uma base. O termo  $H'(t) = V e^{-i\omega t}$ , é a perturbação e  $\lambda$  é o parâmetro que a liga e desliga. Expandindo a função de onda que satisfaz a equação de Schroendinger

$$\frac{\partial \Psi}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} H \Psi \text{ na forma } \Psi = \sum_n a_n(t) u_n e^{-i\frac{E_n}{\hbar}t} \quad (4.3),$$

aplicando a derivada temporal, o Hamiltoniano e extraindo o produto interno com

$$\langle u_k e^{-i\frac{E_k}{\hbar}t} | \text{ de ambos os lados chegamos a } \dot{a}_k(t) = -\frac{i}{\hbar} \sum_n \lambda a_n(t) \langle u_k | V | u_n \rangle e^{i(\omega_{kn} - \omega)t} \text{ sendo}$$

$$\omega_{kn} = \frac{E_k - E_n}{\hbar}. \text{ Usando a expansão dos coeficientes em ordens de } \lambda \text{ na forma}$$

$$a_k = \sum_s \lambda^s a_k^{(s)} \text{ e coletando termos de mesma ordem obtemos o sistema de equações}$$

diferenciais  $\dot{a}_k^{(0)} = 0$ ,  $\dot{a}_k^{(s)}(t) = -\frac{i}{\hbar} \sum_n a_n^{(s-1)}(t) V_{kn} e^{i(\omega_{kn}-\omega)t}$ , com  $V_{kn} = \langle u_k | V | u_n \rangle$ . A

estratégia é resolver o sistema para a ordem mais baixa e usá-la para encontrar as soluções da ordem seguinte e assim sucessivamente. A suposição que se faz é que em  $t = 0$  o sistema se encontrava no estado inicial  $i$ , logo  $\dot{a}_k^{(0)} = \delta_{ki}$ . Com isso encontramos a equação diferencial para os coeficientes de primeira ordem  $\dot{a}_k^{(1)}(t) = -\frac{i}{\hbar} V_{ki} e^{i(\omega_{ki}-\omega)t}$  que pode ser integrada facilmente fornecendo

$$a_f^{(1)}(t) = -\frac{i}{\hbar} V_{fi} \frac{e^{i(\omega_{fi}-\omega)t} - 1}{i(\omega_{fi}-\omega)} \quad (4.4).$$

Agora usamos esse resultado para achar a equação diferencial para os termos de segunda ordem, dos quais poderemos extrair os coeficientes de absorção de dois fótons.

Nesse caso,  $\dot{a}_f^{(2)}(t) = -\frac{1}{\hbar^2} \sum_n V_{ni} \frac{e^{i(\omega_{ni}-\omega)t} - 1}{i(\omega_{ni}-\omega)} V_{fn} e^{i(\omega_{fn}-\omega)t}$ . Só estamos interessados no termo que envolve a multiplicação das duas exponenciais, o único que contém  $2\omega$ , portanto queremos

$$a_f^{(2 \text{ fótons})} = -\frac{1}{\hbar^2} \sum_n \frac{V_{fn} V_{ni}}{i(\omega_{ni}-\omega)} \int_0^t e^{i(\omega_{ni}+\omega_{fn}-2\omega)t'} dt' \quad (4.5).$$

Mas  $\omega_{ni} + \omega_{fn} = \frac{E_n - E_i + E_f - E_n}{\hbar} = \omega_{fi}$ , de modo que:

$$a_f^{(2 \text{ fótons})} = -\frac{1}{\hbar^2} \sum_n \frac{V_{fn} V_{ni}}{i(\omega_{ni}-\omega)} \frac{e^{i(\omega_{fi}-2\omega)t} - 1}{i(\omega_{fi}-2\omega)} \quad (4.6).$$

Como  $\frac{e^{ix} - 1}{ix} = e^{ix/2} \frac{e^{ix/2} - e^{-ix/2}}{2i(x/2)} = e^{ix/2} \frac{\text{sen}(xt/2)}{(x/2)} e \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\text{sen}^2[xt/2]}{(x/2)^2} = 2\pi t \delta(x)$ , temos:

$$|a_f^{(1)}(t)|^2 = \frac{2\pi}{\hbar^2} t |V_{fi}|^2 \delta(\omega_{fi} - \omega) \quad (4.7)$$

e

$$|a_f^{(2 \text{ fótons})}(t)|^2 = \frac{2\pi}{\hbar} t \left| \sum_n \frac{V_{fn} V_{ni}}{E_n - (E_f + E_i)/2} \right|^2 \delta(E_f - E_i - 2\hbar\omega) \quad (4.8).$$

Usando um potencial de perturbação de dipolo  $V = -q \vec{r} \cdot \vec{e} E_0$ , onde  $\vec{e}$  é o vetor unitário da polarização do campo elétrico e o fato do coeficiente de absorção ser proporcional a  $d|a_f|^2/dt$ , vemos que a absorção por 1 fóton só ocorre se a energia do fóton for igual a diferença de energia entre os estados inicial  $i$  e final  $f$  e que a força de oscilação vai ser proporcional à  $|\langle i | \vec{e} \cdot \vec{r} | f \rangle|^2 E_0^2$ . Isso significa que a absorção de 1 fóton é proporcional à  $I$  e que só existe transição entre estados de diferentes paridades, pois  $\vec{e} \cdot \vec{r}$  é um operador ímpar. Por outro lado, a transição por absorção de dois fótons só ocorre quando a energia de dois fótons é igual a da transição e que a força do oscilador é proporcional a

$$\left| \sum_n \frac{\langle i | \vec{e} \cdot \vec{r} | n \rangle \langle n | \vec{e} \cdot \vec{r} | f \rangle}{E_n - (E_f + E_i)/2} \right|^2 E_0^4 \quad (4.9).$$

Logo será proporcional ao quadrado da intensidade e só ocorre entre estados de mesma paridade, pois  $n$  precisa ter paridade oposta a  $i$  e a  $f$ . O processo de absorção por 3 fótons seguirá uma regra do tipo

$$\left| \sum_{n'} \sum_n \frac{\langle i | \vec{e} \cdot \vec{r} | n \rangle \langle n | \vec{e} \cdot \vec{r} | n' \rangle \langle n' | \vec{e} \cdot \vec{r} | f \rangle}{\Delta} \right|^2 E_0^6 \quad (4.10),$$

sendo proporcional à intensidade ao cubo e ocorrendo entre estados de diferentes paridades. Apesar das diferenças das regras de seleção os espectros de absorção de 1 e 2 fótons têm mostrado apenas pequenas diferenças para uma boa variedade de corantes sugerindo que estados fluorescentes geralmente degenerados são alcançados tanto com uma excitação linear como não linear [51]. Além disso, campos eletromagnéticos em volta da molécula quebram a simetria local e a paridade dos estados, permitindo todas as transições. Nenhuma diferença foi observada nos espectros de emissão, como era de se esperar.

Processos multifótons são geralmente caracterizados através das seções de choque  $\sigma_k$  definidas através da taxa de absorção de fótons da forma,

$$\frac{\Delta n_{\text{fótons}}^{(k)}}{\Delta t} = \sigma_k \left( \frac{I}{h\nu} \right)^k \quad (4. 11).$$

Números típicos para seções de choque para absorção de 1 fóton são da ordem de  $\sigma_1 = 10^{-16} \text{ cm}^2$ , de 2 e 3 fótons são respectivamente da ordem  $\sigma_2 = 10^{-49} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$  e  $\sigma_3 = 10^{-82} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}^2$  [51]. Isso significa que uma taxa de absorção de aproximadamente  $5 \times 10^7$  fótons/segundo, próximo da saturação para o estado fundamental, requer uma potência da ordem de 140 mW no foco em um processo de um fóton. Já para se atingir essa mesma taxa de absorção com um processo de dois fótons, usando a mesma óptica e comprimento de onda em torno de 870 nm, seria necessário intensidades de 5,4 GW/cm<sup>2</sup>, que correspondem a uma potência média de 12 W no foco do laser [52].

No caso dos lasers pulsados, com uma duração do pulso  $\tau_p$  da ordem de centenas de femtosegundos e tempo de repetição  $\tau_{rep}$  da ordem de dezenas de nanosegundos, os detectores são sensíveis ao valor médio do número de fótons por unidade de tempo, i.e.,

$$\frac{\Delta n_{\text{fótons}}^{(k)}}{\Delta t} = \frac{\sigma_k}{(h\nu)^k} \frac{1}{\tau_{rep}} \int_0^{\tau_{rep}} I^k(t) dt \quad (4. 12).$$

Supondo um pulso quadrado com  $I = I_{pico}$  no intervalo de duração do pulso  $\tau_p$ ,

$$\frac{\Delta n_{\text{fótons}}^{(k)}}{\Delta t} = \sigma_k \left( \frac{I_{pico}}{h\nu} \right)^k \frac{\tau_p}{\tau_{rep}}, \text{ que leva a } I_{pico} = h\nu \left[ \frac{\tau_{rep}}{\sigma_k \tau_p} \frac{\Delta n}{\Delta t} \right]^{(1/k)}.$$

Como

$$I_{pico} = \frac{\tau_{rep}}{\tau_p} \bar{I} = \frac{\tau_{rep}}{\tau_p} \frac{\bar{P}}{A} \quad (4. 13),$$

a potência média requerida para se obter uma determinada taxa de absorção será:

$$\bar{P} = \left[ \frac{\tau_p}{\tau_{rep}} \right]^{(k-1)/k} A \frac{hc}{\lambda} \left[ \frac{1}{\sigma_k} \frac{\Delta n}{\Delta t} \right]^{(1/k)} \quad (4. 14).$$

Supondo um feixe gaussiano com  $w_o = \frac{\lambda}{\pi NA}$ , tal que  $A = \pi w_o^2 = \frac{\lambda^2}{\pi NA^2}$  e onde  $NA$  é a abertura numérica da objetiva temos,

$$\bar{P} = \left[ \frac{\tau_p}{\tau_{rep}} \right]^{(k-1)/k} \frac{hc\lambda}{\pi NA^2} \left[ \frac{1}{\sigma_k} \frac{\Delta n}{\Delta t} \right]^{(1/k)} \quad (4.15)$$

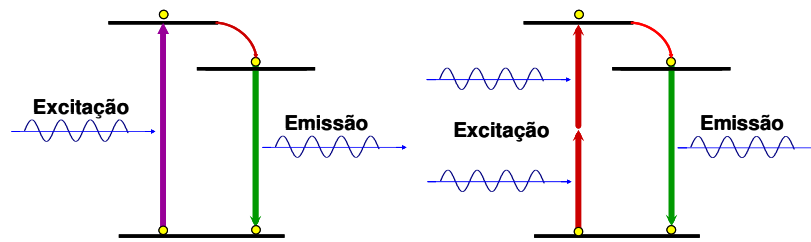
que pode chegar a ser tão pequena quanto 45 mW para processos de dois fótons com pulsos de 100 fs e taxa de repetição de 80 MHz típicas de um laser de Ti:Safira pulsado de femtosegundos, cuja potência média pode chegar a 2 W [52]. Isso indica quão facilmente se obtém excitação por processos de dois fótons com lasers desse tipo. Não é somente o fato de poder usar pequenos valores de potência que faz do Ti:Safira um dos escolhidos, a duração e a taxa de repetição do seu pulso também possibilitam se fazer espectroscopia resolvida no tempo [53].

#### 4.6 Luminescência Excitada por Absorção Multifotônica

No processo de fluorescência, esquematizado na Figura 90 abaixo, um elétron de uma molécula sofre uma transição para um estado com nível de energia mais alto através da absorção de um fóton. Usualmente a molécula sofre uma mudança conformacional após a excitação, pois as forças químicas entre os átomos dependem do estado em que está o elétron, levando o elétron excitado para um nível de energia menor do que o inicial. Desse estado o elétron pode retornar ao estado fundamental pela emissão de um fóton. Se o decaimento for rápido, chama-se o processo de fluorescência, se lento de fosforescência, e os dois casos são englobados pela palavra luminescência. Existem, entretanto, outras possibilidades para o retorno do elétron ao estado fundamental além da fluorescência. Por exemplo, 1. ele pode ser transferido para moléculas vizinhas, processo conhecido como transferência de carga, 2. apenas a sua energia pode ser transferida, processo chamado de transferência de energia ou ainda 3. ele pode ficar aprisionado em armadilhas profundas, tal como “dangling bonds”. Esses processos podem levar a um esmaecimento da fluorescência ou “photobleaching”.



Dependendo do grau desses processos de decaimento, a fluorescência pode ser muito pouco intensa. Por isso é comum a utilização de marcadores fluorescentes exógenos às amostras analisadas, geralmente corantes orgânicos, envoltos em substâncias químicas para evitar o “photobleaching” ou o “quenching” da fluorescência. A desvantagem dos marcadores exógenos é que podem ser citotóxicos. O “photobleaching” tem sido um dos grandes problemas da microscopia confocal de fluorescência, em muitos casos fornecendo ao pesquisador apenas um intervalo de minutos para obtenção de suas imagens.



**Figura 90.** Esquema de absorção de um e múltiplos fótons.

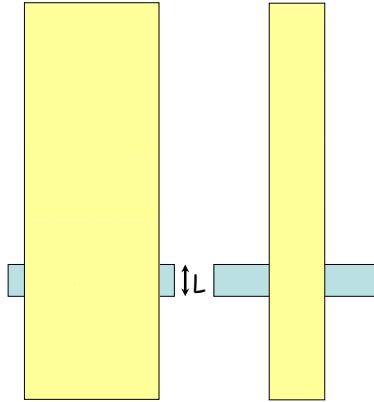
A diferença fundamental entre processos de 1 fóton e multifóton vem da quantidade de fótons absorvidos em um determinado volume. No caso da absorção de 1 fóton esse número só depende da espessura do volume e não da área do feixe, pois o coeficiente de absorção  $\alpha$  é independente da intensidade. Suponha dois feixes paralelos com a mesma potência, mas diferentes intensidades, como mostra a Figura 91. As quantidades de fótons absorvidos por unidade de tempo nessas duas situações, são dadas por

$$\frac{\Delta n_1}{\Delta t} = \frac{I_1 A_1 (1 - e^{-\alpha L})}{h\nu} \quad \text{e} \quad \frac{\Delta n_2}{\Delta t} = \frac{I_2 A_2 (1 - e^{-\alpha L})}{h\nu} \quad (4.16),$$

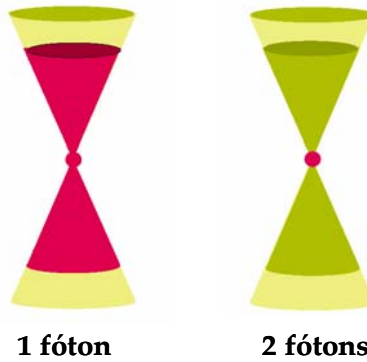
e são iguais com a suposição de mesma potência, isto é,  $I_1 A_1 = I_2 A_2$ . A única diferença entre esses dois casos é a densidade superficial do número de fótons absorvidos. Já na absorção de dois fótons, onde o coeficiente de absorção depende da intensidade incidente da forma  $\alpha = \alpha_2 I$ , a quantidade de fótons absorvidos será muito maior para o feixe mais intenso. Tal que,

$$\frac{\Delta n_1}{\Delta t} = \frac{I_1 A_1 (1 - e^{-\frac{\alpha_2 P_L}{A_1}})}{h\nu} < \frac{\Delta n_2}{\Delta t} = \frac{I_2 A_2 (1 - e^{-\frac{\alpha_2 P_L}{A_2}})}{h\nu} \quad (4.17),$$

devido ao fator exponencial. Foi essa característica que levou o grupo de W. W. Webb de Cornell à proposta da microscopia confocal multifóton. A Figura 92 mostra que, enquanto uma quantidade uniforme de fótons de luminescência são gerados em todo o cone de luz incidente, ela é concentrada no foco do laser no processo multifóton.



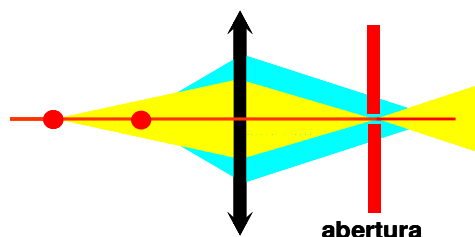
**Figura 91.** Fótons absorvidos no processo linear.



**Figura 92.** Geração de fluorescência por um e dois fótons.

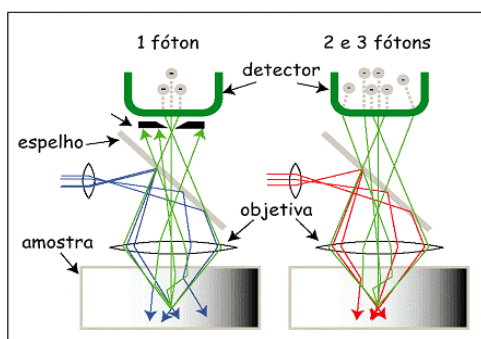
A microscopia confocal convencional foi introduzida, basicamente, para possibilitar a obtenção de imagens de fluorescência em 3 dimensões. O seu grande problema é a profundidade e a resolução vertical em  $z$ , pois há a necessidade de rejeitar a fluorescência gerada fora do foco do cone de luz incidente. Isso é feito através de uma abertura colocada em frente ao detector, conforme ilustra a Figura 93, que seleciona o

sinal coletado pela mesma objetiva responsável por focalizar o laser de excitação. Chama-se esse processo de “descanning”.



**Figura 93.** Ilustração de funcionamento de um microscópio confocal.

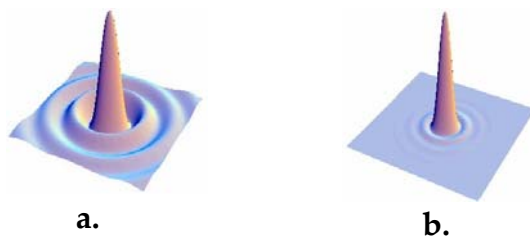
Quanto menor a abertura, maior a resolução em z e menor a relação sinal ruído, pois a mesma bloqueia parte da luz advinda da amostra, principalmente se esta for espalhada durante percurso até a abertura, como mostra a Figura 94. Para aumentar a relação sinal/ruído é necessário aumentar a intensidade do laser aumentando a chance de ocorrerem danos térmicos e “photobleaching”. Já na microscopia confocal multifóton só há emissão de luz no foco do laser, tornando a abertura desnecessária. Além disso, no caso multifóton, apenas o volume do foco está sendo excitado, o que evita o “photobleaching” de outras porções da amostra dentro do cone de incidência do laser.



**Figura 94.** Microscópio Confocal e Multifóton.

A denominação confocal é utilizada para sistemas em que tanto a iluminação quanto a coleta da luz transmitida, ou emitida, pela amostra passam pela mesma óptica. Nesse caso, a resolução espacial aumenta, pois a figura de difração de Airy fica elevada ao quadrado, conforme mostra a Figura 95. Nos processos de dois fótons a própria excitação já depende da intensidade da luz ao quadrado, não dependendo do sistema

de coleta do sinal óptico. Trata-se, portanto, de um processo intrinsecamente confocal. Essa é a característica que torna os processos multifótons bastante atrativos para microscopia.



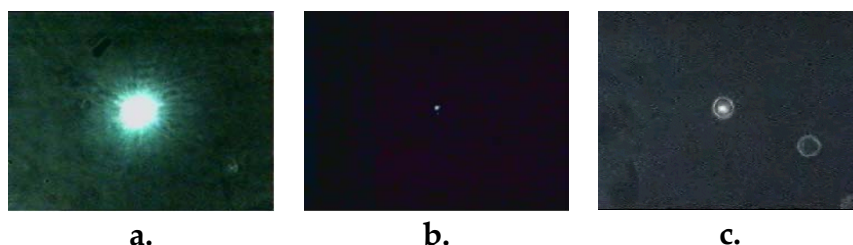
**Figura 95. a.** Gráfico 3D do padrão de difração de Airy **b.** padrão de difração elevado ao quadrado onde se nota um pico central mais estreito e os anéis ao seu redor muito menos intensos.

Além da resolução espacial lateral existem outras vantagens na microscopia confocal multifóton. O fato de que a fluorescência só é gerada no foco do laser elimina a necessidade da abertura e uma maior quantidade de luz pode ser coletada melhorando a razão sinal/ruído. A excitação se dá no dobro do comprimento de onda de excitação por um fóton, significando 16 vezes menos espalhamento, o qual depende de  $\lambda$  com  $1/\lambda^4$ . Com isso a profundidade de observação, principalmente em meios túrbidos, é 16 vezes maior do que na convencional, permitindo a obtenção de imagens de camadas da amostra que estão em profundidades da ordem de centenas de micrômetros [54, 55].

A grande maioria dos fluoróforos biológicos endógenos que são intrínsecos à célula ou exógenos - tais como corantes - absorvem no ultravioleta próximo, em torno de 350 nm, e no visível quando estamos falando da espectroscopia convencional de 1 fóton. Assim, uma fonte de luz de excitação com emissão entre 690 – 1050 nm permite excitação dos mesmos por absorção multifotônica. Essa região, de 690 – 1050 nm, é, muitas vezes, chamada de “janela biológica da célula” [51]. Em primeiro lugar porque nessa região do espectro, há pouca ou nenhuma absorção de um fóton pelos tecidos e pigmentos celulares evitando geração de calor e danos térmicos significativos, e em segundo possibilita a aquisição de imagens de microorganismos vivos.

#### 4.7 Aplicações e Resultados de Luminescência por Absorção de 2 Fótons

Algumas das imagens das fluorescências excitadas por absorção de dois fótons em microesferas fluorescentes da Polysciences de 9  $\mu\text{m}$  de diâmetro presas na lâmina e microesferas fluorescentes da Molecular Probes com 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro capturadas na pinça óptica são vistas na Figura 96. Já a Figura 97 mostra a imagens da fluorescência de uma amostra de ZnSe, na qual se percebe que chegamos a saturar a câmera de vídeo do microscópio.

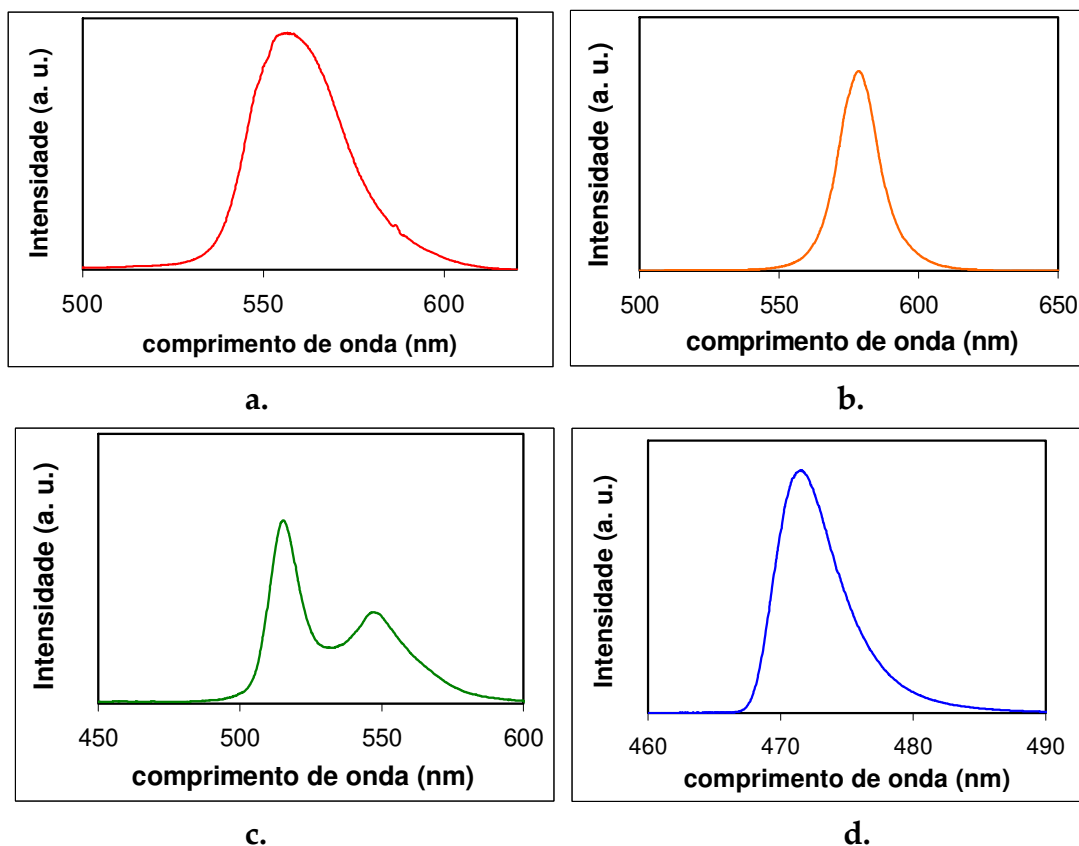


**Figura 96.** Imagens de Fluorescência obtida por absorção de 2 fótons. **a.** Microesfera presa na lâmina com laser Tsunami incidindo com alta potência. **b.** Mesma microesfera com laser Tsunami incidindo com baixa potência. **c.** Microesfera capturada fluorescendo.

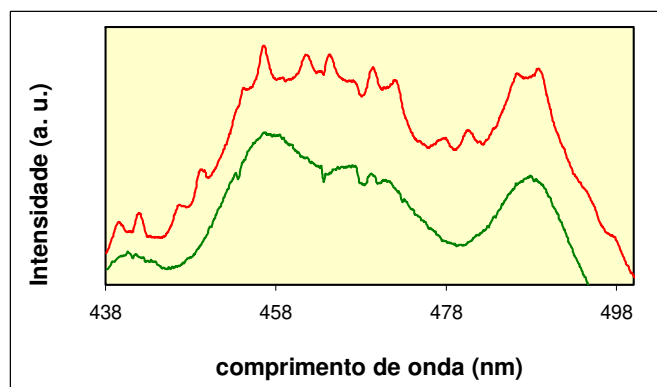


**Figura 97.** Imagens do ZnSe da ordem de micrometros no microscópio.

A Figura 98 apresenta os espectros de fluorescência obtidos com as microesferas coradas com materiais similares a fluoresceína e rodamina respectivamente (os nomes dos corantes originais não são fornecidos pelos fabricantes), as quais chamaremos de microesferas verdes (fluoresceína) e laranja (rodamina), por causa da cor de suas emissões. Na mesma figura também temos o espectro da fluorescência de uma amostra de ZnSe. As medidas foram obtidas com microesferas de 2.5 e 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, após atenuar a potência do Tsunami com filtros de densidade neutra. Potências mais altas danificavam chegando a ponto de evaporá-las. O espectro que apresentou os picos de ressonância de Mie descrito no capítulo 3 está repetido na Figura 99.



**Figura 98.** Espectros de fluorescência por absorção de 2 fótons. **a.** Rodamina – 1 s. **b.** Microesfera verde – 30 s. **c.** Microesfera laranja – 5 s. **d.** Luminescência do ZnSe.



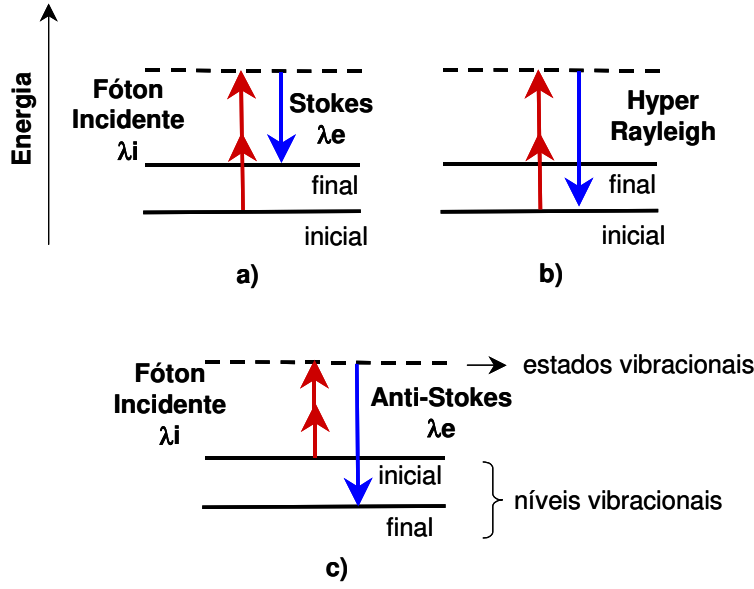
**Figura 99.** Espectros de fluorescência por absorção de 2 fótons – 60 s, curva verde – microesfera de 2.5 μm, curva vermelha – microesfera de 6 μm e modos MDR.

Esses resultados demonstram a possibilidade de obtenção de imagens por microscopia confocal multifóton no nosso sistema experimental. Para tanto precisamos adquirir a intensidade da fluorescência em função da posição  $x$ ,  $y$  e  $z$  do foco do laser, o que exigiria todo um investimento de software de comando. Nosso sistema de

varredura, entretanto, seria bem lento pois o estágio de translação da Prior é bastante pesado, requerendo tempo para movimentá-lo. Isso inviabilizaria a obtenção de imagens em tempo real, mas não de amostras inorgânicas. Entretanto, a microscopia confocal multifóton hoje se trata de um equipamento comercial, não compensando esforço para simples reprodução de imagens com qualidade inferior aos mesmos. Juntá-lo à pinça óptica é novidade e agrega valor, mas nesse caso o que mais desejamos é acompanhar processos dinamicamente, ou seja, por varredura rápida. Um dos motivos pelo qual deixamos de investir mais tempo na continuidade desse trabalho foi a aprovação da compra de um microscópio confocal multifóton comercial na FAPESP, no qual a varredura é feita com o laser e não na posição da amostra e portanto muito mais rápida. Com isso poderíamos capturar um microorganismo e obter sua imagem em 3 dimensões ao mesmo em que o manipulamos. Infelizmente as importações da FAPESP estão paralisadas e ficamos sem esse equipamento.

#### **4.8 Processos Hiper Rayleigh e Hiper Raman**

Outros dois processos excitados por dois fótons que demonstramos foram as medidas do espalhamento Hiper Rayleigh e Hiper Raman. A Figura 100 ilustra esses processos, essencialmente semelhantes ao Rayleigh e Raman, mas excitados com dois fótons no lugar de apenas um. Por isso dependem da intensidade com  $I^2$ , e se tratam de processos não lineares. De forma análoga à da fluorescência excitada por absorção multifotônica, apresentam as mesmas vantagens do ponto de vista de microscopia de alta resolução e em 3 dimensões [56]. Entretanto existe uma distinção clara nesses dois casos: a absorção multifotônica envolve uma transição entre estados reais em ressonância com energia  $nh\nu$ , que não é necessário nem para o espalhamento Hiper Rayleigh nem para o Hiper Raman. Os estados tracejados são virtuais e o processo ocorre fora da ressonância pela interação entre o campo elétrico da radiação incidente a as moléculas do material.



**Figura 100. a.** Hiper Raman Stokes **b.** Hiper Rayleigh **c.** Hiper Raman anti-Stokes.

Em relação à expansão da polarização em série de Taylor, o Hiper Rayleigh aparece do termo

$$\frac{\partial^2 P}{\partial x_e^2} \delta x_e^2(E) \cos^2(\omega t) \quad (4.18).$$

Como  $\cos^2(\omega t) = (1 + \cos 2\omega t)/2$ , essa parcela da polarização vai dar origem a uma componente contínua, chamada de retificação óptica, e outra no dobro da frequência do campo incidente, ou segunda harmônica. Comparado com o termo do espalhamento Rayleigh  $(\partial P / \partial x_e) \delta x_e(E) \cos(\omega t)$ , podemos perceber que os tensores envolvidos,  $(\partial^2 P / \partial x_e^2)$  para o Hiper Rayleigh, e  $(\partial P / \partial x_e)$  para o Rayleigh, possuem paridades diferentes, com uma derivada a mais no Hiper Rayleigh. Em moléculas ou cristais com simetria de inversão não se nota diferença em qualquer propriedade com a troca de  $\vec{r}$  por  $-\vec{r}$ . O tensor do Hiper Rayleigh tem a mesma paridade da polarização  $P$ , ou seja ímpar, enquanto o tensor do Rayleigh é par. Isso significa que o espalhamento Hiper Rayleigh em moléculas com simetria de inversão é proibido. Entretanto, essas simetrias tendem a ser quebradas nas interfaces. Por esse motivo o espalhamento Hiper Rayleigh é aplicado no estudo das mesmas. Pelos mesmos motivos, a microscopia através do Hiper Rayleigh, conhecida também como Microscopia SHG, é especialmente boa para



demarcar os contornos. Por outro lado a intensidade de um sinal de interfaces tende a ser bem menor do que a de sinais de volume.

O termo da série de Taylor que dá origem ao Hiper Raman envolve uma derivada em relação às coordenadas nucleares e duas em relação às eletrônicas, da forma

$$\frac{\partial^3 P}{\partial x_n \partial x_e^2} \delta x_n \delta x_e^2(E) \cos^2(\omega t) \cos(\omega_{\text{fôn}} t) \quad (4.19).$$

Combinando os cosenos da forma  $\cos^2(\omega t) \cos(\omega_{\text{fôn}} t) = [1 + \cos(2\omega t)] \cos(\omega_{\text{fôn}} t) / 2$ , obtemos as diferentes componentes:

$$\left[ \cos(\omega_{\text{fôn}} t) / 2 \right] + \left[ \cos[(2\omega - \omega_{\text{fôn}}) t] / 4 \right] - \left[ \cos[(2\omega + \omega_{\text{fôn}}) t] / 4 \right] \quad (4.20),$$

que correspondem a sinais gerados nas frequências  $2\omega - \omega_n$  para o Hiper Raman Stokes, e  $2\omega + \omega_n$  para o Hiper Raman anti-Stokes. Comparado ao Raman, cujo tensor é dado por  $(\partial^2 P / \partial x_n \partial x_e)$ ; o Hiper Raman, com o tensor  $(\partial^3 P / \partial x_n \partial x_e^2)$ , tem uma derivada à mais e, portanto, paridade trocada. Isso significa que as regras de seleção espectroscópicas do Hiper Raman são diferentes das regras de seleção do Raman. Especialmente, para amostras com simetrias de inversão e portanto uma técnica complementa a outra, vendo os modos que a outra deixa de observar. Em outras palavras o Hiper Raman contém informações espectroscópicas diferentes das do Raman. O Hiper Raman nos fornece a mesma informação que a espectroscopia por absorção de infravermelho e mais os chamados “modos silenciosos”. Todos os modos ativos na espectroscopia por absorção de infravermelho são também ativos no Hiper Raman mas nem todos os modos ativos no Hiper Raman o são na espectroscopia por absorção de infravermelho.

No vocabulário de óptica não linear a expansão da polarização é feita em termos do campo elétrico na forma:  $\vec{P} = \vec{P}_1 + \vec{P}_2 + \vec{P}_3 + \dots = \chi^{(1)} \vec{E} + \chi^{(2)} : \vec{E} \vec{E} + \chi^{(3)} : \vec{E} \vec{E} \vec{E} + \dots$  em que  $\chi$ 's são as susceptibilidades. Essa é a linguagem preferida das pessoas que trabalham com óptica não linear em sólidos e superfícies, feixes de lasers bem

direcionados, com regras de seleção e condições de “phase matching” bem definidas. Termos que envolvem dois campos elétricos podem gerar segundos harmônicos, ou frequências soma e diferença, já termos com 3 campos elétricos podem gerar terceiros harmônicos e misturas de 4 ondas. Normalmente os mesmos utilizam termos como geração de segundo harmônico, SHG, terceiro harmônico, THG, mistura de duas e quatro ondas, efeito Kerr, etc. Já a comunidade de química, que trabalha mais com moléculas livres em soluções, prefere a notação em termos das polarizabilidades e Hiperpolarizabilidades da forma:

$$\vec{P} = \vec{P}_1 + \vec{P}_2 + \vec{P}_3 + \dots = \alpha \vec{E} + \frac{1}{2} \beta : \vec{E} \vec{E} + \frac{1}{6} \gamma : \vec{E} \vec{E} \vec{E} + \dots,$$

onde  $\alpha$  é a polarizabilidade (tensor de rank 2),  $\beta$  é a Hiperpolarizabilidade (tensor de rank 3) e  $\gamma$  é a segunda Hiperpolarizabilidade (tensor de rank 4). Comumente utilizam a palavra espalhamento pouco utilizada pela comunidade de óptica não linear. Nesse caso se referem a espalhamentos Hiper Rayleigh em lugar de SHG, Hiper Raman em lugar de mistura de quatro ondas, etc. Comparando com a expansão de Taylor anterior percebemos que  $\vec{P}_1$  está relacionado aos espalhamentos Rayleigh e Raman,  $\vec{P}_2$  está relacionado aos efeitos Hiper Rayleigh e Hiper Raman e  $\vec{P}_3$  aos segundos Hiper Rayleigh e Hiper Raman.

É necessário ter clara a distinção entre o espalhamento Hiper Raman nas frequências  $2\omega \pm \omega_{f\text{onon}}$  e o espalhamento Raman do segundo harmônico na mesma frequência. Os sinais do espalhamento Hiper Raman são gerados diretamente através de dois fótons na frequência  $\omega$  e um fônon, sem necessidade sequer da geração do segundo harmônico. Em linguagem química poderíamos simbolizá-lo como uma reação apenas do tipo  $1 \text{ fóton}(\omega) + 1 \text{ fóton}(\omega) + 1 \text{ fônon}(\omega_f) \Rightarrow 1 \text{ fóton}(2\omega \pm \omega_f)$ . Já o espalhamento Raman do segundo harmônico usa dois processos em cascata que podemos simbolizar como  $1 \text{ fóton}(\omega) + 1 \text{ fóton}(\omega) \Rightarrow 1 \text{ fóton}(2\omega)$  para o primeiro processo, e para o segundo  $1 \text{ fóton}(2\omega) + 1 \text{ fônon}(\omega_f) \Rightarrow 1 \text{ fóton}(2\omega \pm \omega_f)$ . Apenas em materiais nos quais a geração de

segundo harmônico é muito intensa, o Raman do segundo harmônico pode ser tão intenso quanto o Hiper Raman.

Outro aspecto relevante nas comparações entre Rayleigh & Raman versus Hiper Rayleigh & Hiper Raman, vem da intensidade relativa entre os espalhamentos Rayleigh e Raman. Em ambos os casos o Raman envolve um tensor de ordem mais alta do que o Rayleigh, entretanto, enquanto o espalhamento Raman é várias ordens de grandeza menos intenso do que o espalhamento Rayleigh, isso não é verdade para os espalhamentos Hiper Raman e Hiper Rayleigh, que podem ter intensidades da mesma ordem de grandeza. Isso porque o Hiper Rayleigh tende a ser proibido e é um efeito de superfície enquanto o Hiper Raman é de volume. Na prática isso significa que para observar o espalhamento Raman é necessário rejeitar o Rayleigh, mas os espalhamentos Hiper Rayleigh e Hiper Raman podem ser observados simultaneamente no mesmo espectro. Isso traz uma grande vantagem para o Hiper Raman em relação ao Raman. No caso do Raman, não foi possível utilizar a grande janela de sintonia do laser de a Ti:Safira para procurar espalhamentos Raman ressonantes por que os filtros NOTCH não são sintonizáveis. No espalhamento Hiper Raman, entretanto, não sendo necessário rejeitar o Hiper Rayleigh, podemos sintonizar o laser continuamente. Além disso, os Hiper Raman entram em ressonância quando  $2\hbar\omega = E_f - E_i$ , que, para o segundo harmônico do laser de Ti:Safira, representa o intervalo de comprimento de onda de 350-500 nm, já no limiar do ultravioleta, região em que a maioria das amostras apresentam níveis eletrônicos.

Após essa apresentação de tantas vantagens do Hiper Raman alguém poderia se perguntar porque essa técnica é tão pouco utilizada comparativamente ao Raman embora tenha sido demonstrada ainda na década de 1960. O grande problema é sua baixa eficiência e a necessidade de uso de lasers de potências de pico muito intensas, como qualquer processo de dois fótons. Os relatos de obtenção de espectros Hiper Raman mostram espectros, comumente de curvas ponto a ponto, que demoravam horas

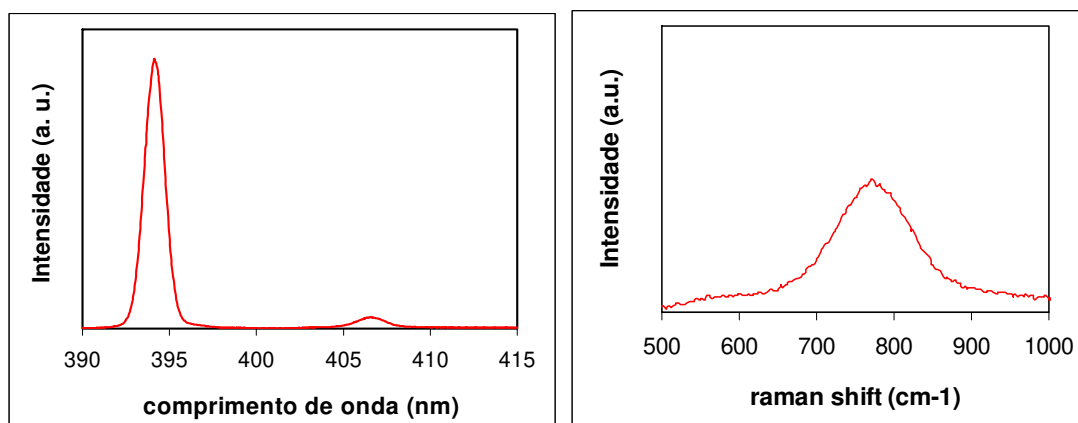
para serem obtidos. O laser de escolha era o Nd:YAG Q-switch/mode-locked com um trem de pulsos de duração em torno de 100 picosegundos separados por 10 ns e taxa de repetição em torno de 10 Hz. Entretanto, lasers de femtosegundos e taxas de repetição de 80 MHz mudam completamente esse quadro. Primeiro porque a potência de pico de pulsos de 100 fs tende a ser mil vezes maior do que a de pulsos de 100 ps. Entretanto esse ganho na potência de pico pode ser limitado pelos limiares de danos. Os mecanismos de limiares de danos para efeitos térmicos e cumulativos, que dependem da energia depositada no material em tempos longos são completamente diferentes dos limiares de danos para pulsos muito curtos. Nesse caso, campos elétricos muito intensos podem gerar “optical breakdown” e ionização. Esse limiar é definido em termos da intensidade, geralmente na faixa de  $\text{TW}/\text{cm}^2$ , mesmo nos casos em que a energia por pulso é muito pequena. O outro limiar de danos térmicos de lasers com repetição de 80 MHz é dado por sua potência média, como se fosse um laser cw. Como a absorção linear no infravermelho é baixa esse limiar tende a ser mais alto do que o de lasers cw no visível.

Entretanto, mesmo considerando o caso em que as intensidades de pico são iguais entre os lasers de Ti:Safira atuais e os lasers de Nd:YAG utilizados no passado, a taxa de repetição de 80 MHz comparada à de 10 Hz permite um ganho na relação sinal/ruído de quase  $10^7$ . Nesse aspecto 3 horas de tempo de acumulação com um laser de 10 Hz teria o mesmo número de pulsos contidos em 1 ms de um laser com 100 MHz. Por isso fomos capazes de observar espectros Hiper Raman em até 1 minuto, tempos de acumulação da mesma ordem de grandeza do Raman, mesmo sem a coleta óptica otimizada para o Hiper Raman. Com espelhos dicróicos adequados podemos aumentar nossa eficiência de excitação e coleta por um fator 2 pelo menos. Essa é uma vantagem muito importante para a microscopia, pois viabiliza a obtenção de imagens com resolução por Hiper Raman em questão de dezenas de minutos. O Hiper Raman para microscopia traz duas vantagens fundamentais: (1) é quimicamente específico como o Raman e (2) sendo um processo de 2 fótons é intrinsecamente confocal com as mesmas

vantagens para reconstrução de imagens em 3 D de alta resolução da microscopia confocal multifóton.

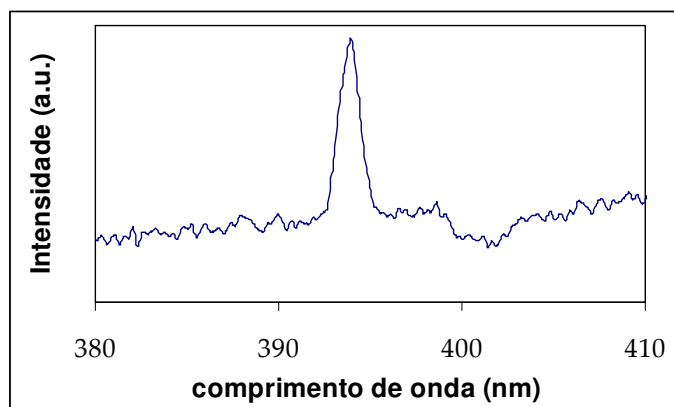
#### 4.9 Resultados de Hiper Raman e Hiper Rayleigh

A Figura 101, mostra os espectros de Hiper Rayleigh e Hiper Raman do Titanato de Estrôncio –  $\text{SrTiO}_3$ , que servem para caracterizar nossa instrumentação pois seus picos Hiper Raman são bem conhecidos e documentados [57, 58]. Notamos que podemos ver o pico do Hiper Raman na mesma escala que o Hiper Rayleigh. As legendas das figuras apresentam as informações sobre potências e tempos de exposição utilizadas. Apesar do pico do Hiper Rayleigh conter pouca informação do ponto de vista espectroscópico ele é excelente do ponto de vista do alinhamento e otimização da medida. Como ele é mais intenso e mais fácil de observar, nós otimizamos o sistema através dele para só depois adquirir o Hiper Raman. Nessas medidas usamos uma pastilha como amostra em lugar de um cristal para evitar problemas com as regras de seleção e a orientação cristalina. Ambos os espectros, Hiper Rayleigh e Hiper Raman são, no mínimo, tão largos quanto o segundo harmônico do espectro do pulso utilizado, ou seja, da ordem de  $250 \text{ cm}^{-1}$ . Por isso alguns picos citados na literatura, geralmente obtidos com pulsos de picosegundos, foram encobertos pela linha do Hiper Rayleigh no nosso caso.



**Figura 101.** Hiper Rayleigh e Hiper Raman do  $\text{TiSrO}_3$  – 60 s.

Também medimos o Hiper Rayleigh de uma microesfera de sílica capturada, assim como mostra a Figura 102.



**Figura 102.** Hiper Rayleigh de uma microesfera de vidro capturada - 60 s.

#### 4.10 Integrando as Espectroscopias

As figuras apresentadas ao longo desse capítulo dão uma boa idéia do conjunto de possibilidades de espectroscopias e microscopias que abrimos com esse trabalho. Raman na região de 800 nm com laser de Ti:Safira cw, fluorescência na região de 500-600 nm excitadas por absorção de dois fótons e Hiper Rayleigh & Hiper Raman na região de 400 nm. Com isso demonstramos que todas espectroscopias podem ser acopladas em uma mesma e única montagem, agregadas à pinça óptica, utilizando um microscópio comercial, conforme foi apresentado no capítulo 2. Todos os espectros foram obtidos com poucos segundos. Desse modo, com o micro-Raman, o micro Hiper Raman, a pinça óptica e mais as luminescências que somos capazes obter através da absorção de 2 fótons temos agora uma ferramenta completa para estudar células vivas e uma grande variedade de amostras em um mesmo sistema experimental. Podemos fazer medidas de uma única célula em movimento ou não pois temos a possibilidade capturá-la. Também somos capazes de realizar aplicações em tempo real se assim for desejável, com direito a observar alterações geradas por qualquer modificação na atividade celular, sendo a mesma causada ou não por uma substância acrescida ao meio onde a partícula biológica está através do monitoramento da intensidade da fluorescência ou da observação de picos de Raman. Os espectros de Hiper Raman foram obtidos com 60 s, tempo que só pode ser obtido quando se usa um laser de femtosegundos com 80 megahertz de repetição. As espectroscopias de Hiper Raman e

Hiper Rayleigh, por também serem um efeito não linear, além de terem as mesmas vantagens que a espectroscopia de multifóton e também poderem ser usadas para se fazer imagens de alta resolução, se forem aplicadas na biologia ainda tem a vantagem adicional de não causar dano algum para a célula. A espectroscopia multifotônica pode causar alguns danos a célula pois exige o uso de corantes que geralmente são bastante tóxicos. Apesar da intensidade para esses espalhamentos serem bem menos intensa, já existem relatos do uso de Hiper Rayleigh na área biomédica [59]. Temos então no final um sistema de microespectroscopia bastante eficiente para diversos tipos estudos que pode envolver desde materiais biológicos até amostra de estado sólido.





## *Capítulo 5*

# *Óptica geométrica, Hidrodinâmica e Aplicações da Pinça Óptica*

Na minha dissertação de Mestrado [60] nós desenvolvemos um modelo de óptica geométrica para calcular a força óptica em uma esfera e usamos um método de calibração comparando-a com a força de arraste hidrodinâmica entre dois planos infinitos, o fundo da lâmina e a superfície da lamínula em uma câmara de Neubauer de 100  $\mu\text{m}$  de profundidade, cuja solução é conhecida [61]. Os resultados dessa calibração foram bastante razoáveis, mesmo sem tomar maiores cuidados com a medida da potência do laser, como discutido no capítulo 2. Ao longo do trabalho de doutorado percebemos a importância do uso da esfera integradora e reobtivemos as medidas da potência do laser após a objetiva. Dessa forma, a primeira aplicação da pinça óptica discutida nesse capítulo trata de uma reanálise dos nossos dados de calibração da pinça óptica com as novas medidas de potência. Assim, só reapresentaremos de forma

resumida os desenvolvimentos da Tese de Mestrado que são necessários para a obtenção desses novos resultados.

Apesar do modelo eletromagnético fornecer uma descrição mais completa e correta sobre a pinça óptica, o modelo de óptica geométrica para  $x \gg a/\lambda \gg 1$  ( $a$  é o raio da partícula e  $\lambda$  é o comprimento de onda) é suficientemente preciso para pequenos deslocamentos em torno da posição de equilíbrio e pode ser utilizado em medidas de força, principalmente quando bem calibrado. Para tanto, nós sempre evitamos, desde o Mestrado, medidas que envolvem a velocidade na qual a microesfera se solta da pinça óptica. Sempre preferimos medir pequenos deslocamentos da partícula causados pela força de arraste em um fluido com velocidades controladas. Com isso, garantimos maior compatibilidade entre os modelos da óptica geométrica e eletromagnética. O aspecto da calibração é recorrente nos trabalhos de muitos autores na área de pinças ópticas devido a sua importância estratégica para o uso das mesmas como técnica de medidas quantitativas de propriedades mecânicas no mundo microscópico.

Essa calibração, por exemplo, nos permitiu quantificar a força de um protozoário importante na área da saúde como a *Leishmania amazonensis*, na sua forma promastigotas, que causa a Leishmaniose, uma doença endêmica no Brasil. O objetivo final foi o de dar um primeiro passo para entender o seu comportamento nas proximidades da célula alvo, o macrófago, por ela infectada. Desde então percebemos a importância de estudar a quimiotaxia de microorganismos, para a qual a medida da força e sua direcionalidade são fundamentais.

Também no Mestrado desenvolvemos um modelo simples para medida da elasticidade das hemácias que nos permitiu obter resultados quantitativos. Isso representou um grande avanço na época uma vez que era comum a apresentação de resultados apenas através da quantidade de sinais em forma cruzes, ou seja, qualitativos. Esse trabalho teve continuidade do ponto de vista médico e a mesma técnica foi utilizada em diversas condições hematológicas. Mesmo considerando que a simplicidade do modelo não permitiria a obtenção de resultados numéricos absolutos, o

fato é que, mantendo as mesmas condições podemos obter resultados comparativos com muito mais sensibilidade dos que os métodos qualitativos utilizados até então. Do ponto de vista experimental procuramos validar o método estudando seu comportamento contra as previsões do modelo simples, nos certificando que quaisquer diferenças entre valores reais e valores obtidos estivessem em uma constante multiplicativa. Para garantir a comparabilidade, as medidas obtidas para essas aplicações foram realizadas sempre dentro do mesmo procedimento. Nesse capítulo apresentamos, de forma sintetizada, os resultados desse trabalho realizado em colaboração com o Hemocentro da UNICAMP. Mostramos que vantagens essa técnica pode oferecer em termos de sensibilidade e individualidade do método de medida, nos permitindo caracterizar e diferenciar hemácias em diversas condições, tais como, células estocadas, irradiadas e de pacientes com anemia falciforme.

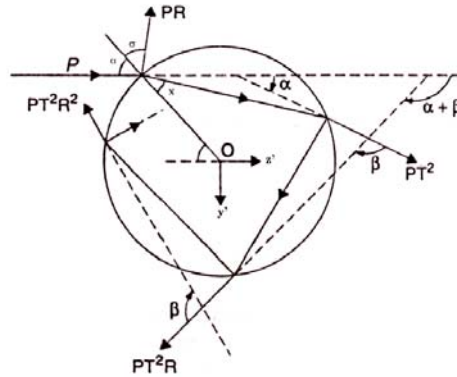
Ao mesmo tempo, do ponto de vista da física envolvida, procuramos dar maior suporte teórico ao modelo simples, para justificá-lo ou substituí-lo por modelos com medidas de valores absolutos. O aspecto que levantou as maiores discussões parece estar concentrado no modelo de escoamento de Couette que utilizamos para hidrodinâmica em baixos números de Reynolds. Dessa forma decidimos estudar a hidrodinâmica mais a fundo, a princípio procurando por soluções já prontas para o arraste de um corpo com uma geometria plana entre duas paredes. Para nossa surpresa não conseguimos encontrar em toda a literatura uma solução para o problema de um disco ou uma placa se movendo com velocidade uniforme nessas condições. Também percebemos que só na última década os problemas de hidrodinâmica em baixos números de Reynolds se tornaram suficientemente importantes para merecerem a atenção dos pesquisadores. Encontramos trabalhos tão recentes quanto 2002 e 2003 nessa área. Isso porque, embora pareçam simples e análogos a problemas de eletrostática, os problemas hidrodinâmicos são muito mais complicados. Nesse capítulo, portanto, relatamos os resultados dos nossos estudos da hidrodinâmica em baixos números de Reynolds incluindo alguns teoremas que justificam nossas aproximações

geométricas para a hemácia. O universo habitado pelos microorganismos, de baixos números de Reynolds, é um universo pré-Galileano, sem inércia, no qual os corpos só se movimentam na presença de uma força e param instantaneamente na ausência das mesmas, e onde as forças de arraste vêm acompanhadas, inevitavelmente, por variações de pressão. Essas forças hidrodinâmicas provavelmente são muito mais relevantes para esses seres, com densidade igual à da água, do que as advindas do campo gravitacional, ao contrário do mundo em que nós habitamos.

## 5.1 Calibração da Pinça Óptica

### 5.1.1 Teoria Óptica Geométrica

O primeiro passo para calcular a força óptica na aproximação geométrica foi calcular a força que um único pincel de luz exerce sobre uma esfera considerando todas as suas refrações e reflexões, Figura 103 [1, 62, 63].



**Figura 103.** Reflexões e refrações de um pincel de luz dentro de uma esfera. Origem das coordenadas no centro da esfera e o eixo  $z'$  está na direção do pincel de luz incidente.

Desse modo, as força de um único pincel de luz sobre a esfera nas coordenadas  $z'$  e  $y'$  são:

$$F_{y'} = \frac{n_1 P}{c} \left[ -R \sin(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right] \quad (5.1)$$

$$F_{z'} = \frac{n_1 P}{c} \left[ 1 - R \cos(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right] \quad (5.2)$$

Para realizar os somatórios, escrevemos as forças no plano complexo através da transformação  $F_c = F_{z'} + iF_{y'}$  e assim as somas se tornam séries geométricas e temos:

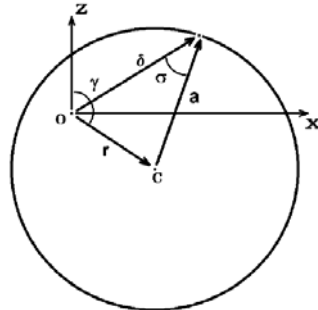
$$F_c = \frac{n_1 P}{c} \left( 1 + R \exp(2\sigma i) - T^2 \exp(i\alpha) \left[ \frac{1}{1 - R \exp(i\beta)} \right] \right) \quad (5.3)$$

Onde  $\alpha = 2(\sigma - x)$ ,  $\beta = (\pi - 2x)$  e  $\sin x = n \sin \sigma$ . A variável  $\sigma$  é o ângulo de incidência,  $n = n_1/n_2$  é o índice de refração relativo sendo  $n_1$  o índice de refração referente ao fluido e  $n_2$  a esfera.,  $c$  é a velocidade da luz e  $P$  é a potência do laser. As variáveis  $R = (\tan(\sigma - x)/\tan(\sigma + x))^2$  e  $T = 1 - R$  são, respectivamente, a refletância e a transmitância para um pincel linearmente polarizado. Dentre outros parâmetros, a força  $F_c$  depende do índice de refração relativo e do ângulo de incidência.

O ângulo de incidência varia para cada pincel, então é necessário trocar a origem e o sistema de coordenadas para uma posição fixa que escolhemos ser o foco do feixe de laser, Figura 104. Escrevendo o ângulo de incidência  $\sigma$  em função dos vetores  $\vec{\delta}$  e  $\vec{r}$  temos que a expressão final de força dependerá somente do deslocamento  $\vec{r}$  vetor (variável que conecta o foco do feixe ao centro da esfera), o ângulo de convergência do feixe (abertura numérica), o raio da esfera, a potência do laser (que consideramos ser igual para cada pincel) e o índice de refração relativo, todos parâmetros conhecidos. Usando a lei dos cossenos temos que,

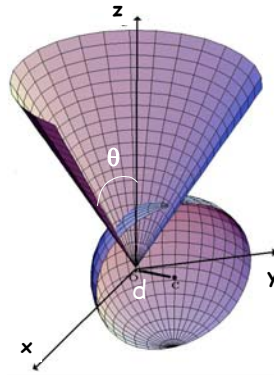
$$\sigma = \arccos \left[ 1 + d^2 - (r/a)^2 / 2d \right] \quad (5.4),$$

onde  $d = \|\vec{\delta}\|$ ,  $|\vec{\delta} - \vec{r}| = a$  e o deslocamento  $\vec{r} = (r \sin \gamma, 0, r \cos \gamma)$ .



**Figura 104.** Troca do sistema de coordenadas e definição de ângulos e vetores.

A força de todo o feixe cônico do laser é obtido pela integração  $F = \int \vec{F} dA / \int dA$ . Na Tese de Mestrado obtivemos o diferencial de integração através de  $r = f \tan \theta$ , de modo que  $r dr d\varphi = f^2 \sec^2 \theta \tan \theta d\theta d\varphi$  conforme Ashkin havia proposto. Aqui corrigimos isso usando a condição seno de Abbe para a qual  $r = f \sin \theta$  e  $r dr d\varphi = f^2 \sin \theta \cos \theta d\theta d\varphi$ . A Figura 105 mostra a geometria de integração do feixe de laser incidente. A expressão da força óptica e seus valores foram obtidos usando Mathematica.



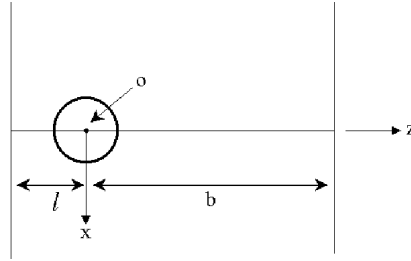
**Figura 105.** Geometria de integração do feixe de laser incidente.

### 5.1.2 Teoria Hidrodinâmica

A força hidrodinâmica de arraste em uma esfera em velocidade constante na presença de duas paredes é um dos poucos problemas hidrodinâmicos em baixos números de Reynolds suficientemente estudado. A presença das paredes não permite que se utilize simplesmente a força de Stokes. O desenvolvimento desse trabalho foi abordado na minha Tese de Mestrado seguindo os passos de Faxen descritos no livro de Brenner.

As equações diferenciais em baixos números de Reynolds,  $\mu \nabla^2 \vec{v} = \nabla p$  e  $\nabla \cdot \vec{v} = 0$ , onde  $\vec{v}$  é a velocidade,  $p$  a pressão e  $\mu$  a viscosidade do fluido, são conhecidas como equações de “creeping motion”, serão deduzidas na seção de hidrodinâmica desse capítulo. As equações do regime de “creeping motion”, ao contrário do regime oposto com altos números de Reynolds, são lineares, garantindo o princípio da superposição de soluções. Para incluir a correção das paredes é necessário resolver essas equações com as condições de contorno de “non slip”, i.e.,  $\vec{v} = 0$  para o fluido adjacente à

partícula e  $\vec{v} = 0$  para o fluido nas paredes. Para garantir as condições de contorno nas paredes é preciso incluir imagens, mais complicadas do que as imagens da eletrostática, e imagens das imagens, sucessivamente. A velocidade é escrita como uma superposição de velocidades  $\vec{v} = \vec{v}^1 + \vec{v}^2 + \vec{v}^3 + \dots$ , onde  $\vec{v}^1$  é a solução para a partícula livre em um líquido não delimitado e a influência das paredes é incorporada através das sucessivas correções. A Figura 106 mostra a geometria do problema, com uma esfera de raio  $a$  separada de uma das paredes pela distância  $l$  e da outra  $b$ , de forma que a distância entre as mesmas é  $l + b$ , e com a origem das coordenadas no centro da esfera, para facilitar a aplicação das condições de contorno na mesma. A velocidade  $v$  da partícula é paralela às paredes.



**Figura 106.** Esquema do modelo hidrodinâmico.

O resultado final para a força de arraste, até ordem de  $(a/l)^3$ , é dado por:

$$F = \frac{6\pi\mu a v}{1 - A\left(\frac{a}{l}\right) + B\left(\frac{a}{l}\right)^3} \quad (5.5)$$

onde A e B são os coeficientes integrais dados por:

$$\begin{aligned} A = & \frac{3(1-h)}{4} \int_0^{+\infty} \frac{x}{N(st-1)} \left\{ s^2 t^3 (1-h) [(1-h)x-1] + s^3 t^2 (1+h) [(1+h)x-1] + 4s^2 t^2 [2(1-h^2)x^2 - 2x+1] \right. \\ & + 2st^2 [(3-h^2)x-h] + 2s^2 t [(3-h^2)+h] - 4st [2(1-h^2)x^2 + 2x+1] + s(1-h) [(1-h)x+1] \\ & \left. + t(1+h) [(1+h)x+1] \right\} dx + \frac{9(1-h)}{8} \int_0^{+\infty} \frac{s+t-2}{st-1} dx \end{aligned} \quad (5.6)$$

$$\begin{aligned}
B = & \frac{2(h-1)(1-h)^2}{8(h-2)} \int_0^{+\infty} \frac{x^2}{N} \left\{ st^2 [2(1-h)x-1] + s^2 t [2(1+h)x-1] + st [(4x-1)^2 + 1] + t [2(1+h)x+1] \right. \\
& + s [2(1-h)x+1] dx \left. \right\} + \frac{(1-h)^3}{4} \int_0^{+\infty} \frac{x^3}{N(st-1)} \left\{ s^2 t^3 (1-h) + s^3 t^2 (1+h) + s^2 t^2 (8x-4) - st^2 (8x-2h) \right. \\
& - s^2 t (8x+2h) + st (8x+4) dx - s(1-h) - t(1+h) dx \left. \right\} - \frac{(1-h)^3}{8} \int_0^{+\infty} x^2 \frac{s+t-2}{st-1} dx, \\
(5.7)
\end{aligned}$$

com  $N = (st-1)^2 - 16x^2 st$ ,  $s = e^{2x(1-h)}$ ,  $t = e^{2x(1+h)}$ ,  $l = (1-h)L$  e  $b = (1+h)L$ .

Na nossa calibração desprezamos os termos de ordem maior que  $(a/l)^3$ . As constantes A e B foram obtidas com integração utilizando o Mathematica.

### 5.1.3 Métodos e Resultados

Nós conferimos experimentalmente nossos modelos teóricos usando microesferas de 9  $\mu\text{m}$  de diâmetro da Polysciences. A montagem experimental usada está descrita no capítulo 2. A posição de equilíbrio é medida no repouso, na ausência de forças óptica e hidrodinâmica, quando o foco do laser coincide com o centro da esfera na horizontal. Na vertical existe um pequeno deslocamento devido às reflexões. Quando a esfera se movimenta com velocidade constante, a força óptica será equilibrada pela força hidrodinâmica através da mudança do centro da microesfera. Esse deslocamento do foco em relação ao centro pode ser facilmente determinado superpondo imagens da esfera em repouso e em movimento e medindo a distância entre seus centros, assim como ilustra Figura 107. O movimento das partículas foi gravado em fitas de vídeo e digitalizado usando uma placa de captura. O deslocamento foi medido usando o software Image-Pro Plus da Media Cybernetics. Assumimos o ângulo  $\gamma$  do modelo óptico como  $90^\circ$  pelo fato do movimento ser feito na direção x. Variamos a profundidade  $l$  usando o micrômetro do microscópio e  $b$  é obtido pela diferença entre a profundidade total de 100  $\mu\text{m}$  da Neubauer e  $l$ .

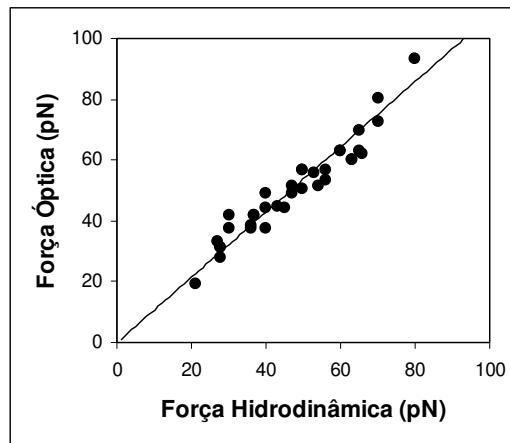


A potência do laser foi medida com a esfera integradora após a objetiva do microscópio, usando o procedimento descrito no capítulo 2. Variamos tanto os índices de refração quanto a viscosidade do fluido usando soluções de água e açúcar nas concentrações de 14%, 20% e 28%. Verificamos os valores da solução, tabelados no Handbook de Física e Química, usando um viscosímetro de Ostwald e um refratômetro de Abbe. As velocidades de arraste foram controladas pelo computador variando de 150  $\mu\text{m/s}$  até 350  $\mu\text{m/s}$  em passos de 50  $\mu\text{m/s}$ . Também variamos as profundidades  $l$  nas distâncias de 15  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  e 85  $\mu\text{m}$ . Isso significa que nossas medidas experimentais varreram tanto os parâmetros do modelo hidrodinâmico quanto os do modelo óptico, ou seja, para uma mesma potência do laser, variamos: velocidade de arraste, profundidade  $l$ , viscosidade  $\eta$  e índice de refração relativo  $n$ , e usamos os valores dos mesmos nos cálculos das forças óptica e hidrodinâmica. Dessa forma foi possível comparar os resultados obtidos.



**Figura 107.** Deslocamento da microesfera em repouso em relação à em movimento.

A Figura 108 mostra o gráfico dos valores calculados da força óptica vs. força hidrodinâmica para mais de 30 pontos. O coeficiente angular da reta é  $47^\circ$ , muito próximo do valor de  $45^\circ$  esperado, com  $R^2$  da ordem de 0,9. Antes do uso da esfera integradora e da condição seno de Abbe, nós estávamos obtendo uma inclinação de  $40^\circ$  entre as duas forças. Esse foi o principal resultado para nos dar confiança no uso da técnica para medida de forças. Vale notar, entretanto, que só estamos calibrando forças horizontais, pois só medimos deslocamentos horizontais. O método de medida do deslocamento vertical do capítulo 3 é relativo apenas, não permitindo comparações quantitativas. Teríamos que desenvolver métodos de calibração para torná-lo quantitativo.



**Figura 108.** Gráfico da força óptica versus força hidrodinâmica.

Além de o gráfico demonstrar as possibilidades de calibração da técnica também fornece uma boa idéia do intervalo de forças das nossas medidas, chegando a quase 100 pN, o que demonstra a qualidade da nossa pinça óptica. Poucas pinças ópticas chegam a esse limite.

Dado a qualidade dos dados decidimos testar o nosso sistema como um medidor de viscosidade. Agora nós medimos os deslocamentos e usamos os valores calculados para força óptica a fim de determinar a força hidrodinâmica,  $F_{opt} = F_{hidro}$ , através da qual calculamos as viscosidades. Para tanto movimentamos uma microesfera em duas diferentes soluções de 20% e 32% de glicerol em água com velocidades variadas. A **Tabela 1** apresenta os valores que obtivemos e os valores tabelados no Handbook de Química e Física. Embora nosso objetivo jamais tenha sido o de desenvolver um viscosímetro à pinça óptica, a pergunta sobre em que situações ele poderia ser útil comparado aos convencionais acabou ocorrendo. Percebemos então que a vantagem dessa técnica ocorreria em situações em que há pouco ou nenhum acesso ao fluido, como em microfluídica, por exemplo. Viscosímetros convencionais utilizam, comumente, dezenas de mililitros do fluido. A pinça óptica poderia operar na faixa de microlitros até submicrolitros. Isso abre a oportunidade de medida da viscosidade local, dentro de células intactas, por exemplo. Experimentos desse tipo serão cada vez mais

importantes à medida que nossa capacidade de manipulação do mundo microscópico aumenta.

	20%	32%
Handbook	1.73cP	2.63cP
Pinça Óptica	1.83cP $\pm 6\%$	2.76cP $\pm 5\%$

**Tabela 1.** Viscosidades tabeladas no Handbook de Química e Física e medidas pela pinça óptica.

## 5.2 Medidas de Forças do Protozoário da Leishmaniose, o Parasita *Leishmania amazonensis*

### 5.2.1 Motivação

Os resultados obtidos no estudo da calibração da força óptica nos mostrou que era possível medir quantitativamente a força de cílios e flagelos de microorganismos. Uma medida comparativa sempre pode ser facilmente realizada pelo fato da força óptica ser diretamente proporcional à potência do laser. Nesse caso seria possível, por exemplo, determinar a motilidade de espermatozóides medindo a potência do laser no limite em que o mesmo consegue escapar da armadilha óptica. Quanto maior a motilidade maior essa potência. Entretanto, não se trata de uma medida quantitativa. Para realização de medidas quantitativas é necessário capturar partículas com geometrias bem definidas nas quais seja possível quantificar ou a força óptica ou a hidrodinâmica. Por isso a calibração e o cálculo das forças em microesferas é crucial. Assim, para a medida de forças em microobjetos vivos ou não, deve-se capturar uma microesfera de um material que se ligue ao microorganismo, e não diretamente o objeto de estudo. Nos regimes de escoamentos em baixos números de Reynolds, sem energia cinética, estamos sempre em uma condição de equilíbrio, conforme discussão da seção 5.4, e a força na microesfera será igual à força do flagelo ou cílio. No fundo o deslocamento da microesfera é o nosso transdutor de força.

As forças obtidas com as pinças ópticas, de Pico a FemtoNewtons -  $10^{-12}$  a  $10^{-15}$ N - são da mesma ordem de grandeza das forças de motores celulares como cílios e flagelos, ou forças de adesão entre as superfícies de

microorganismos/microorganelas. Por essa razão a pinça óptica é uma ferramenta ideal para o estudo de propriedades mecânicas, como forças e elasticidades, de microorganismos in vivo, com a vantagem adicional de permitir a aproximação e afastamento de superfícies ou microorganismos aderentes de forma controlada e documentada em vídeo. Usando essa técnica com promastigotas de *Leishmania amazonensis*, um protozoário parasita, podemos entender melhor os fenômenos relacionados a sua mobilidade flagelar, adesão, dissociação e sensibilidade a estímulos do microambiente. O objetivo final dessa aplicação é estudar a maneira como o protozoário da Leishmaniose infecta os macrófagos do hospedeiro humano e como se comporta com a proximidade dos mesmos. Entretanto, essa pesquisa deve se iniciar pela caracterização do comportamento do protozoário em uma situação padrão, ou seja, na ausência dos macrófagos. A medida mais importante dessa caracterização é a da força do flagelo em meio de cultura, que será comparada, posteriormente, às forças do flagelo na presença do macrófago. O objeto desse trabalho, portanto, foi demonstrar essa técnica e estabelecer sua sensibilidade e limites para determinação de forças de flagelos.

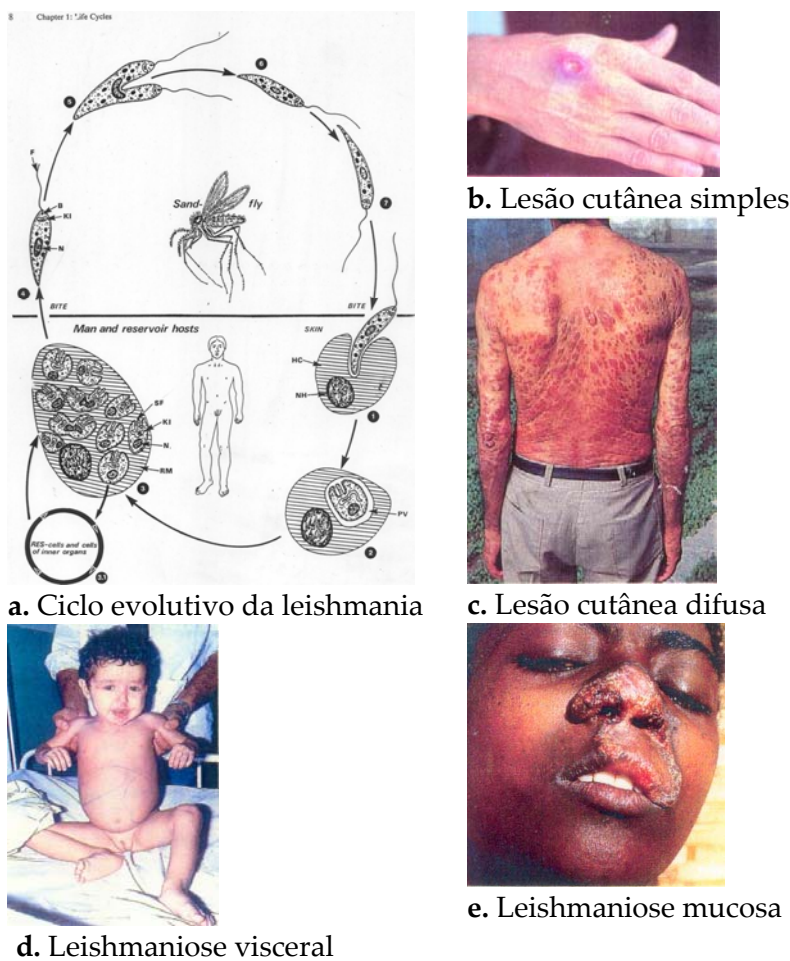
### 5.2.2. O Parasita

A leishmania é um protozoário da ordem Kinetoplastida e da família Trypanossomatidae. Esses parasitas, assim como *Trypanossoma cruzi* e *Trypanossoma brucei*, são responsáveis por parasitoses com altos índices de incidência em várias regiões do mundo. Doença de Chagas, leishmaniose e tripanossomíase africana afetam cerca de trinta milhões de pessoas [64].

O ciclo evolutivo da leishmania está esquematizado na Figura 109 a. A forma promastigota é flagelar, móvel, tem cerca de 20 µm de extensão e vive no tubo digestivo do inseto flebótomo, ligado às microvilosidades, onde prolifera. Essa forma pode ser cultivada *in vitro*. Os mecanismos moleculares de ligação dos promastigotas ao intestino do inseto não são bem conhecidos. O inseto vetor inocula os promastigotas na pele do

hospedeiro através da saliva. Os protozoários penetram nas células dos macrófagos, dentro das quais mudam para a forma amastigota. Os detalhes sobre essa transformação da forma promastigota para amastigota não são bem conhecidos, embora existam evidências que promastigotas são sensíveis às mudanças ambientais. As mudanças microambientais sofridas pelos promastigotas são drásticas, no tubo digestivo do flebotomíneo a temperatura é em torno de 26°C e pH 7.2 e no ambiente intracelular dos macrófagos de mamíferos de 35 - 37°C e pH 5. Os amastigotas são menores em tamanho (cerca de 5 µm de diâmetro), ovóides, imóveis e com flagelo muito pequeno e intracelular. Dependendo da espécie de leishmania, observa-se tropismo por macrófagos de diferentes tecidos, ocasionando diferentes patologias, Figura 109. Não há vacinas e a quimioterapia, utilizada há mais de quarenta anos para todos os tipos da doença, não é totalmente efetiva, apresenta efeitos colaterais sérios e casos de resistência [65, 66]. A *Leishmania amazonensis*, provoca lesões cutâneas simples, e em baixa porcentagem de indivíduos infectados há evolução para a leishmaniose cutânea difusa, Figura 109 c.

Embora exista uma extensa literatura sobre as moléculas e os antígenos do parasita que contribuem para a infecção celular, os aspectos relacionados à cinética de entrada e adesão dos promastigotas, mobilidade e sensibilidade a estímulos externos, são pouco estudados. Entre os raros trabalhos de cinética por filmagens, realizados com leishmania, estão os do grupo de Rabinovitch [67]. O estudo foi feito com células infectadas com a forma amastigota e não tinha como objetivo avaliar a aderência ou o processo de infecção. Para avaliar o papel do corpo axial na mobilidade de promastigotas de *Leishmania mexicana* o grupo de LeBowitz [68] analisou a mobilidade de mutantes *PFR2<sup>-</sup>*, que não possuem essa estrutura. Os estudos, realizados em microscopia estroboscópica em campo escuro se limitaram a medição da frequência das “batidas” flagelares. Nenhum outro parâmetro, como por exemplo, amplitude, força, elasticidade ou deformabilidade foi analisado.



**Figura 109.** Ciclo evolutivo e diferentes formas da leishmaniose.

Em outros microorganismos ciliados e flagelados os parâmetros citados acima são mais bem estudados e medidas mais precisas são obtidas devido ao uso da pinça óptica. Por exemplo, em *Escherichia coli* ligadas a microesferas, o uso da pinça óptica possibilitou a análise de dezenas de bactérias individuais, os cálculos de velocidade e tempo de rotação, de força e de torque. Medidas das forças envolvidas na adesão da bactéria a superfícies com manose também foram possíveis usando a pinça óptica para manipulação. Os autores quantificaram e avaliaram as forças necessárias para a adesão e o desligamento da bactéria da superfície [69, 70].

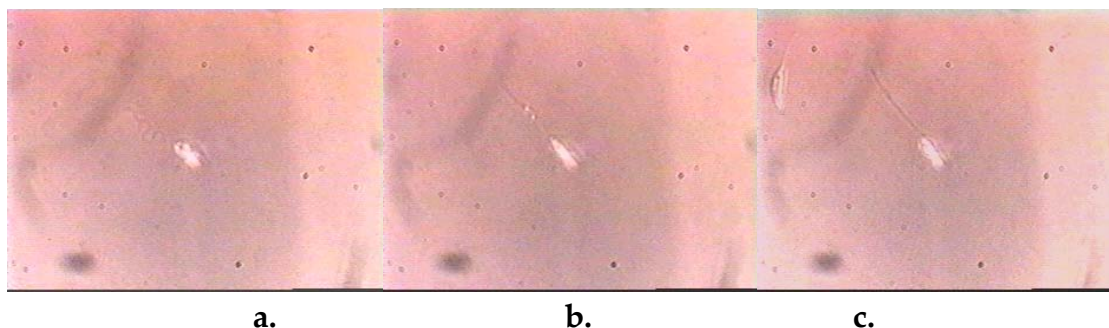
### 5.2.3. Metodologia, Resultados e Conclusões

No laboratório da Dra. Selma Giorgio no Depto. de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, o cultivo do parasita e de várias linhagens de macrófagos e as

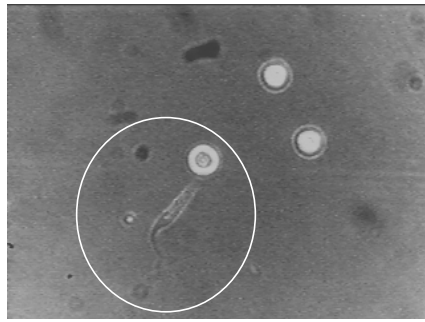
infecções em modelos *in vitro* e *in vivo* são realizados rotineiramente com a seguinte metodologia:

**Parasitas:** As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* - MHOM/BR/73/M2269 - são cultivadas em meio de cultura RPMI da Sigma complementado com antibióticos, glutamina e soro fetal bovino 10% da Cultiab em temperatura de 26°C em estufa após o cultivo do material de lesões cutâneas de camundongos de linhagem susceptível - BALB/c. A proliferação e a curva de crescimento das culturas de promastigotas são seguidas pelas contagens em câmara de Neubauer.

**Medidas com a Pinça Óptica:** Cerca de um milhão de promastigotas foram diluídos em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino na presença de esferas de poliestireno e aplicados em câmara de Neubauer para podermos capturar uma única leishmania sem interferência das outras. Eles podem se capturados diretamente com a pinça óptica, conforme mostra a Figura 110. Ao fazer isso já foi possível perceber uma mudança em seu comportamento, tentando claramente escapar da pinça óptica, que não havia sido observada na captura de espermatozóides. Parasitas livres passavam em volta com velocidade constante, enquanto o capturado se debatia e usava a estratégia de encolher seu flagelo liberando-o repentinamente na tentativa de escapar da pinça óptica. Isso abre a perspectiva de observar seu comportamento capturado, mas sobre condições de um escoamento. Estamos supondo que esse parasita tenha mecanismo sensorial de movimento e não algum capaz de perceber a radiação eletromagnética do laser, talvez no máximo um sensor de calor por ela gerado.



**Figura 110.** Promastigota de *Leishmania amazonensis* capturado na pinça óptica tentando escapar e dobrando seu flagelo (a e b) e c. expulsando-o repentinamente.



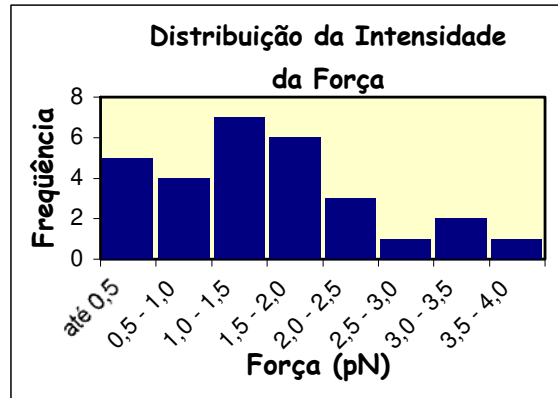
**Figura 111.** Leishmania presa a uma esfera que está capturada pela pinça óptica.

Para a medida da força capturamos uma esfera e colocamos em contato com uma promastigota até ocorrer uma adesão. A **Figura 111** mostra o parasita preso na microesfera. Essas medidas são realizadas individualmente. Com altas potências do laser percebemos claramente que o movimento mais comum acontece na direção vertical,  $z$ , na qual a força óptica é menor. No vídeo notamos a microesfera entrando e saindo do foco com os anéis das figuras de difração se modificando. Entretanto, como toda a nossa calibração foi feita para movimentos horizontais, foi necessário diminuir a potência do laser até perceber o parasita movendo a esfera lateralmente. Após vários testes com diferentes tamanhos de esferas optamos pelas microesferas com diâmetros de  $4.5\ \mu\text{m}$  e  $6\ \mu\text{m}$ , devido ao compromisso entre a capacidade do parasita de movimentar a partícula e a nossa de visualizar e quantificar esses deslocamentos. Conhecendo, então, a potência do laser, o índice de refração da esfera, a viscosidade, o índice de refração do meio de cultura, o tamanho da esfera e o deslocamento causado pelo parasita, nós fomos capazes de calcular a força de uma *Leishmania amazonensis* padrão e verificamos que essa está entre  $0.19\ (190\ \text{fN}) - 3.6\ \text{pN}$ , onde a força média é  $1.49\ \text{pN}$ . Medimos a força de aproximadamente 30 protozoários, representadas no gráfico **Figura 112**. Para cada um deles utilizamos uma média dos deslocamentos realizados no cálculo da força.

Esses resultados indicaram que valia a pena investir um maior esforço para melhorar o entendimento do fenômeno da mobilidade flagelar da forma promastigota da leishmania e dos mecanismos de infecção desse parasita. Notamos que os parasitas livres tendem a se movimentar com seu flagelo para frente, embora eles possam se



movimentar das duas formas. A leishmania capturada tende a inverter a direção do movimento, com o flagelo para trás. Mas também vimos leishmanias capturadas movendo o flagelo para frente. Existem observações de que a maioria das vezes em que a leishmania infecta uma célula o contato se inicia com o flagelo, o que sugere que o flagelo possa ter algum papel mais relevante no mecanismo de infecção celular. Esses resultados mostram que essa técnica é útil para responder a várias questões a nível celular sobre quais são os sensores do microorganismo e sua quimiotaxia na presença de um gradiente artificial das substâncias atratoras ou repulsoras. Os resultados pareceram tão promissores que o estudo de leishmanias se tornou o projeto de mestrado de uma nova estudante.



**Figura 112.** Distribuição das intensidades de forças medidas.

Para melhor entender nossas limitações nas medidas de forças muito pequenas, como os valores de 190 fN medidos para as leishmanias, decidimos estimar as forças de movimento browniano gerado a partir das flutuações térmicas para quantificar sua influência no movimento e na força do parasita capturado. Experimentalmente foi fácil comparar o estado de movimento da microesfera com o parasita aderido com as microesferas à sua volta paradas e perceber que estávamos bem acima do limite imposto pelo movimento Browniano. Para estimar esse limite consideramos a pinça óptica como um oscilador harmônico em equilíbrio térmico para o qual:

$$\left\langle \frac{K\delta x^2}{2} \right\rangle = \frac{k_B T}{2}, \quad \delta x = \sqrt{\frac{k_B T}{K}} \quad (5.8)$$

e a força devido às flutuações é  $F_{flut} = K \delta x = \sqrt{K k_B T}$ , onde  $K$  é a constante da mola,  $T$  é a temperatura,  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $\delta x$  é o deslocamento causado pelo movimento browniano. Para saber  $F_{flut}$  é necessário saber o valor de  $K$  e para estimá-lo consideramos o maior valor de deslocamento obtido com a calibração usando microesferas de poliestireno, ou seja  $\delta x = 3 \mu\text{m}$ ,  $F = 54 \text{ pN}$  temos  $K = 18 \times 10^{-6} \text{ N/m}$  e  $F_{flut} = 0.27 \text{ pN}$ . Como  $F \propto P$ , diminuindo a potência  $P$  por um fator de 100 para termos forças da ordem de  $0.54 \text{ pN}$ , i. e., da ordem das forças encontradas para o parasita, temos  $F_{flut} = 0.027 \text{ pN}$ . Isso significa que a menor força medida  $0.19 \text{ pN} \approx 10 \times F_{flut}$  ainda é da ordem de 10 vezes maior do que o limite do movimento Browniano.

### 5.3 Medidas de Elasticidade de Hemácias Normais e Alteradas

#### 5.3.1. Motivação

O glóbulo vermelho normal é uma célula altamente deformável que, no estado de repouso, assume a forma de um disco bicôncavo ou discócito, com um diâmetro médio de  $8 \mu\text{m}$ , como mostra a Figura 113. Essas células devem transpor capilares e sinusóides do baço com diâmetro de  $3$  a  $4 \mu\text{m}$ , muito menores do que as mesmas. A hemácia normal pode se alongar em até  $230\%$  da sua dimensão original e, na sua função de captar o oxigênio dos pulmões através da hemoglobina e levá-lo para todas as células do corpo, atravessa os vasos sanguíneos por aproximadamente  $500.000$  vezes percorrendo uma distância de aproximadamente  $250 \text{ km}$  durante a sua vida média de  $120$  dias.



**Figura 113.** Hemácias e suas características: forma bicôncava; tamanho de  $7 - 9 \mu\text{m}$ ; vida média de  $120$  dias; flexibilidade para transpor capilares e sinusóides do baço com  $3 - 4 \mu\text{m}$ ; o envelhecimento aumenta sua rigidez e ela é retirada da circulação.

Tanto a forma bicôncava quanto a deformabilidade da célula são determinadas pela natureza e composição da bicamada lipídica, pelo citoesqueleto, pela geometria celular, pela concentração e tipo de hemoglobina intracelular e pela manutenção da relação superfície/volume celular. A geometria celular, incluindo a razão superfície/volume celular, é um dos mais importantes componentes que regulam a deformabilidade celular de hemácias. A forma discóide bicôncava das células normais cria uma vantagem da área de superfície em relação ao volume, permitindo que o eritrócito normal sofra uma deformação enquanto mantém constante a área de superfície. Tais fenômenos, só são possíveis se o glóbulo vermelho mantiver a integridade de suas principais propriedades: durabilidade e deformabilidade celular.

Em consequência da deformabilidade, a hemácia se comporta mais como uma gota líquida do que propriamente como uma partícula sólida, na ocasião em que o sangue flui através de pequenos vasos sangüíneos. Isso explica a notável baixa viscosidade do fluxo, a despeito da elevada proporção de hemácias presentes (valores normais em torno de  $5.11 \times 10^6 / \text{mm}^3$  em homens e  $4.5 \times 10^6 / \text{mm}^3$  em mulheres) na corrente sangüínea [71].

A perda ou diminuição dessa capacidade de deformação, leva a uma retirada prematura das hemácias da circulação e, conseqüentemente, à diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos. Esta situação patológica é encontrada em algumas anemias hereditárias como, por exemplo, na esferocitose, anemia falciforme e eliptocitose.

No projeto em colaboração entre o Instituto de Física e o Hemocentro da Unicamp, no qual estou envolvida desde a iniciação científica, ficou claro que essa era uma caracterização que muito interessava aos médicos. As primeiras idéias para a quantificação dessa propriedade foram: 1. usar duas pinças ópticas para medir a deformação da hemácia frente a uma força conhecida 2. usando apenas uma pinça óptica, medir sua deformação devido a uma força de arraste hidrodinâmica e, finalmente, 3. deformá-la e medir o tempo de retorno. A pinça dupla só foi montada muito tempo depois. Rapidamente também percebemos que o tempo de retorno,

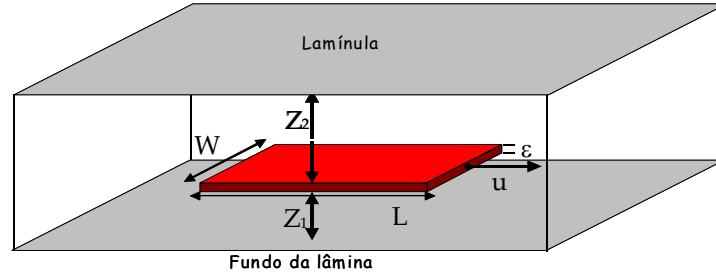
embora pudesse ser medido, estava no limite de nossa resolução de 1/30 segundos entre dois quadros sucessivos de uma câmera comum de vídeo. Além disso, notamos que essa medida traz muito mais informações sobre a viscosidade da membrana da hemácia do que sobre sua elasticidade. De modo que optamos por iniciar esses estudos com a força de arraste hidrodinâmica. Primeiro nós observamos a sensibilidade das deformações frente a movimentos grosseiros, realizados com a mão mesmo. Percebendo que a resposta era boa investimos na montagem de um sistema que permitisse controlar, e quantificar a velocidade, na faixa de 20 a 500  $\mu\text{m/s}$ . Primeiro utilizamos um motor de passo, mas o movimento em velocidades abaixo de 70  $\mu\text{m/s}$  era feito aos saltos, prejudicando a medida. Por isso optamos pela aquisição do estágio de translação com motor de corrente contínua, mais preocupados com a precisão da velocidade do que com a resolução espacial e capacidade de retornar ao mesmo ponto. Finalmente chegamos ao seguinte procedimento de medida: captura-se uma hemácia colocando-a em movimento contra o fluido à sua volta com uma velocidade constante e controlada. Esse movimento deforma a hemácia devido às forças de viscosidade. A medida dessa deformação fornece a elasticidade  $\mu$  da hemácia através de um modelo simplificado. Como as observações clínicas que se seguiram mantiveram esse padrão, vamos apresentar esses resultados nesse capítulo seguindo a ordem histórica. Primeiro a descrição do modelo simplificado, as justificativas para sua validade, os testes experimentais que fizemos e depois os resultados clínicos obtidos. No final apenas entraremos na discussão dos novos estudos de hidrodinâmica que realizamos para entender melhor a validade do modelo.

### **5.3.2. Modelo Simplificado**

#### **Modelo hidrodinâmico**

No modelo simplificado assumimos que a hemácia, na sua forma bicôncava da Figura 113 acima, pode ser aproximada por um paralelepípedo de comprimento  $L$ , largura  $W$  e espessura  $\varepsilon$  desprezível. A hemácia está localizada a uma profundidade  $Z_1$

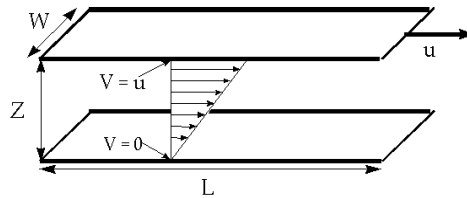
do fundo da câmara de Neubauer, cuja profundidade total é de  $H = 100 \mu\text{m}$ , e  $Z_2 = Z_1 - H$  da lamínula. Essa hemácia é arrastada com a pinça óptica no fluido do plasma sangüíneo, cuja viscosidade é  $\mu$ , com uma velocidade constante  $V$ , conforme mostra a Figura 114.



**Figura 114.** Modelo geométrico da hemácia na câmara de Neubauer.  $Z_1$  e  $Z_2$  representam, respectivamente, a distância da hemácia ao fundo da lâmina e ao topo da lamínula na câmara de Neubauer.  $L$ ,  $W$  e  $\varepsilon$  indicam o comprimento, a largura e a espessura da hemácia e  $u$  é a velocidade de arraste.

Para o cálculo da força hidrodinâmica fizemos a suposição de que esse paralelepípedo se move de acordo com o escoamento de Couette, onde há um gradiente linear de velocidade entre duas placas conforme mostra a Figura 115 e a força de arraste é dada pela expressão:

$$F_{couette} = \mu \frac{WL}{Z} u \quad (5.9)$$



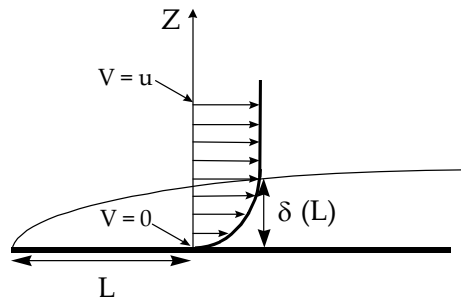
**Figura 115.** Gradiente de velocidades em um escoamento de Couette.

Como no nosso problema existem quatro superfícies envolvidas: duas da hemácia, uma da lâmina e outra da lamínula, simplesmente nós decidimos adicioná-las como dois escoamentos de Couette. Nesse caso a força total nas duas superfícies da hemácia será dada por:

$$F_{hidro} = \mu WL \left( \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} \right) u = \mu \frac{WL}{Z_{eq}} u \quad (5.10),$$

onde  $1/Z_{eq} = 1/Z_1 + 1/Z_2$  e  $W$  e  $L$  são os valores de largura e do comprimento da célula.

Nossa justificativa para o uso do escoamento de Couette seguiu o seguinte raciocínio. Se a distância entre as placas se torna muito grande não faz mais sentido se falar em um gradiente linear da velocidade entre a superfície da partícula e a parede. Entretanto, mesmo nesse caso, a força de arraste ainda estará presente, mas seria melhor descrita com um escoamento de Stokes do que com o de Couette. Na ausência das paredes o gradiente de velocidade deixa de ser linear e se desenvolve uma camada limite após a qual a velocidade do fluido não muda mais. Assim decidimos estimar a dimensão dessa camada limite e compará-la com a distância  $H$  entre paredes da câmara de Neubauer para decidir sobre que regime de escoamento utilizar. Para tanto utilizamos a expressão para a formação da camada limite em uma placa semi- infinita em função da distância à sua borda, dada por  $\delta = 5L/\sqrt{R}$ , onde  $R$  é o número de Reynolds. Essa camada limite está representada na Figura 116.



**Figura 116.** Desenvolvimento da camada limite  $\delta$ .

Podemos notar que  $L$  também entra na definição do número de Reynolds, de modo que a envoltória da camada limite cresce com  $\sqrt{L}$  e não  $L$ . No nosso caso  $L$  é o tamanho da hemácia de  $10\text{ }\mu\text{m}$  e para velocidades de  $100\text{ }\mu\text{m/s}$  então  $\delta \approx 1000\text{ }\mu\text{m} = 1\text{mm}$ , cerca de dez vezes superior aos  $100\text{ }\mu\text{m}$  de profundidade da câmara de Neubauer. Isso mostra que assumir o gradiente de velocidade na condição de “non slip”, entre a hemácia e as paredes, por um gradiente linear deve ser uma boa aproximação e que os cálculos não devem diferir muito de modelos hidrodinâmicos mais completos.

Nesse ponto vale a pena ressaltar uma diferença entre o nosso modelo e outros comumente utilizados na hidrodinâmica. Usualmente os autores utilizam soluções das equações de “creeping motion” com todo o esforço para garantir as condições de contorno de “non slip” nas superfícies envolvidas. É comum utilizarem uma adição dessas funções como aproximação mesmo sabendo que ela não satisfaz as condições de contorno. Como diferentes formas de abordagem teórica podem levar a resultados numéricos semelhantes, no nosso modelo garantimos as condições de contorno sem a preocupação para que o campo de velocidades fosse uma solução das equações de “creeping motion”. Simplesmente adotamos uma aproximação para o campo de velocidades como sendo uma reta. Funções que variam pouco sempre podem ser aproximadas por retas. Seria necessário um gradiente muito concentrado na hemácia para nossa aproximação se tornar muito pobre. Mas se esse fosse o caso as paredes teriam pouca influência no arraste, o que está longe da realidade. O fato de a camada limite ser muito maior do que as separações entre as superfícies, indica que esse gradiente não deve ser assim tão concentrado na hemácia.

### **Modelo elástico**

A célula deforma-se sobre a ação da força hidrodinâmica criando uma força elástica igual e em direção oposta. A idéia então foi medir a constante dessa mola. Esse trabalho se iniciou com a necessidade dos médicos de caracterizarem uma propriedade das hemácias que eles chamavam de deformabilidade, avaliada de forma qualitativa e subjetiva na maioria dos trabalhos publicados, e para a qual não existe a definição de uma grandeza física que pudéssemos utilizar. Mesmo pensando intuitivamente em termos de constantes elásticas de molas, estava claro que essa é uma característica não apenas do material, mas da sua geometria. Assim hemácias de tamanhos diferentes podem ter constantes de molas diferentes apenas devido às suas dimensões. Para se determinar um parâmetro intrínseco da hemácia, que independe de seu tamanho e sua forma, é melhor usar o conceito de elasticidade em lugar da constante elástica.

A explicação intuitiva apresentada aos pesquisadores de área médica para definir esse conceito partiu da idéia de associação de molas em série e em paralelo, equivalentes às associações de resistências em paralelo e em série respectivamente. Portanto, dois corpos idênticos tracionados ao longo de seu comprimento, um ao lado do outro, apresentarão uma constante de mola dobrada, ou seja, a constante da mola deve ser multiplicada pela largura  $W$  do corpo. Da mesma forma, um corpo sobre o outro apresentarão uma constante de mola dobrada linear proporcional a espessura  $\delta$ . Por outro lado, dois corpos um ao longo do outro, na direção da tração, apresentarão uma constante de mola que é metade de cada um deles. Isso então significa que a constante da mola será proporcional à área da seção reta do corpo e inversamente proporcional ao seu comprimento,

$$K = k \frac{W\delta}{L} \quad (5.11),$$

onde  $k$ , a elasticidade, é uma propriedade apenas do material com que a mola é fabricada. Quando esse material tem uma espessura constante, podemos definir a elasticidade  $\eta = k\delta$ , e a constante a mola é dada por

$$K = \eta \frac{W}{L} \quad (5.12).$$

No caso das hemácias, assumimos que a resposta elástica é dada pela membrana de camada bilipídica de espessura constante. Dessa forma assumimos a seguinte expressão para a força elástica:

$$F_{elástica} = K\Delta L = \eta \frac{W}{L} \Delta L \quad (5.13)$$

onde  $\Delta L/L = (L - L_0)/L$  é a deformação sofrida pela célula.

### **Modelo hidro-elástico**

No equilíbrio, as forças elástica e hidrodinâmica são iguais, logo vale a relação:



$$\eta \frac{W}{L} \Delta L = \mu \frac{WL}{Z_{eq}} v \Rightarrow \Delta L = \frac{\mu L^2}{\eta Z_{eq}} v \quad (5.14),$$

que pode ser escrita como

$$L = L_0 + \frac{\mu L_0^2}{\eta Z_{eq}} v \quad (5.15),$$

assumindo que  $L^2 \approx L_0^2$ . Dessa forma, determinamos o método de medida: medir a elongação  $L$  da hemácia em função da velocidade. Pelas previsões do modelo simples deve ser uma reta com o coeficiente angular

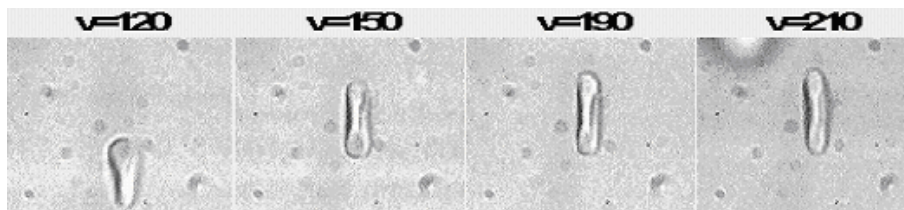
$$\alpha = \frac{\mu L_0^2}{\eta Z_{eq}} \quad (5.16).$$

Medindo esse coeficiente e conhecendo  $L_0$ ,  $Z_{eq}$  e  $\mu$  do fluido determinamos a elasticidade  $\eta$ .

### 5.3.3 Validação Experimental do Modelo Hidro-elástico

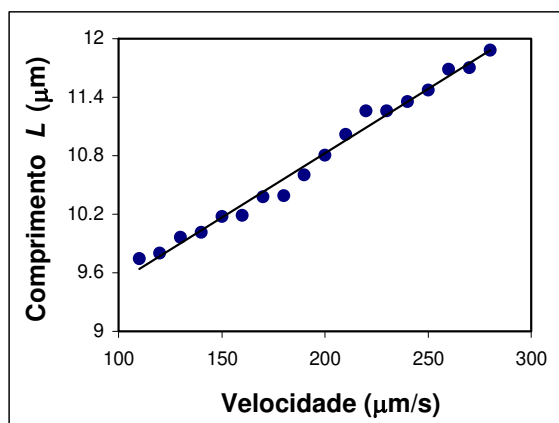
Antes de mais nada, decidimos testar experimentalmente se as hemácias se comportavam de acordo com as previsões desse modelo simples hidro-elástico. As variáveis, ou parâmetros, sobre nosso total controle são a velocidade e a profundidade na câmara de Neubauer,  $Z$ . O modelo prevê o comportamento de uma reta em função da velocidade, e que a inclinação dessa reta depende de  $Z$ , na forma  $1/Z_{eq} = 1/Z + 1/(d - Z)$ .

Para validá-lo experimentalmente realizamos um experimento com uma mesma hemácia capturando-a com a pinça óptica e movimentando-a com diferentes velocidades em várias profundidades  $Z$ . A Figura 117 abaixo mostra a deformação de uma hemácia em diferentes velocidades.



**Figura 117.** Hemácia em deformação para velocidades entre 120-300  $\mu\text{m/s}$ .

Nessas medidas utilizamos hemácias coletadas no Hemocentro da Unicamp de indivíduos normais doadas no mesmo dia do experimento. A forma de coleta e o meio de preservação das hemácias são fundamentais para a repetibilidade do experimento. Antes de tudo o sangue não deve entrar em contato com oxigênio para não disparar o processo de coagulação através das plaquetas, como observamos nos nossos primeiros experimentos simplesmente com sangue coletado de um furo no dedo. As hemácias rapidamente se aderiam umas às outras e nas paredes da câmara. Também pingamos gotas de sangue diretamente em água e observamos hemácias com formatos muito estranhos completamente diferente da forma bicôncava da Figura 113. Isso porque o equilíbrio iônico entre os meios interno e externo da hemácia é fundamental na manutenção de suas propriedades. Para tanto ela deve estar em um meio isotônico. Todos esses cuidados são garantidos no protocolo de coleta de sangue para doação, e só após o uso de sangue coletado dessa forma passamos a obter resultados repetitivos. A solução preservativa e anticoagulante na bolsa foi o CPDA<sub>1</sub> (citrato, fósforo, dextrose, adenina) e, para a medida, diluímos 1  $\mu\text{l}$  de concentrado de hemácias em 1000  $\mu\text{l}$  de plasma AB. A viscosidade do plasma foi medida com um viscosímetro de Ostwald, obtendo o valor  $\mu = 2.19 \text{ cP}$ .



**Figura 118.** Deformação da hemácia em função da velocidade de arraste  $v$ .

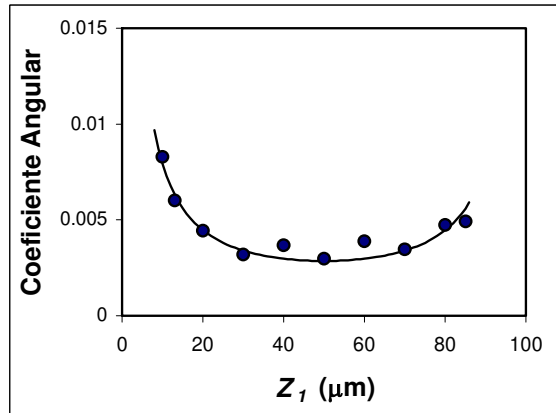
Para a medida de deformação em função da velocidade movemos cerca de 30 hemácias com velocidades de 100, 110, 120,..., 260 e 280  $\mu\text{m/s}$ , conforme descrição do capítulo 2, e as elongações foram quantificadas com o software de análise de imagens

Image Pro-Plus. Mantivemos a hemácia no centro da câmara de Neubauer, na profundidade de 50  $\mu\text{m}$ , e obtivemos o gráfico da Figura 118, que mostra o comportamento linear previsto no modelo simples.

Já para a medida da deformação em função da profundidade na câmara de Neubauer, repetimos o procedimento para uma única hemácia se movendo com velocidades de 170, 200, 230, 260 e 290  $\mu\text{m/s}$  nas profundidades de 10, 13, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 85  $\mu\text{m}$ . A Figura 119 mostra o gráfico do comportamento do coeficiente angular em função de Z, ajustado com uma curva do tipo

$$f(Z) = A \left( \frac{1}{Z} + \frac{1}{H-Z} \right) \quad (5.17).$$

Consideramos essa validação experimental a mais importante, pois a curva  $f(Z)$  tem um comportamento diferente, bem específico, inclusive divergindo para  $Z = 0$  e  $Z = H$ .

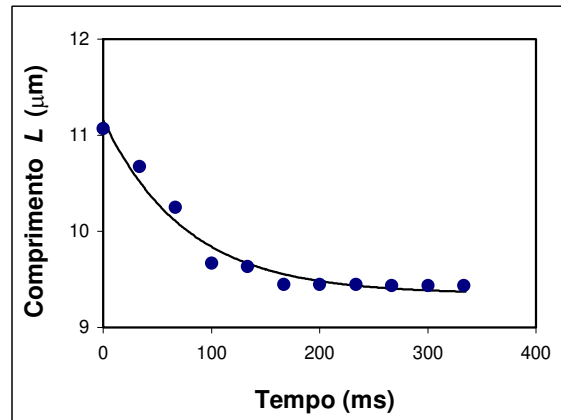


**Figura 119.** Coeficiente angular da deformação da hemácia em função de  $Z$ .

O modelo acima se aplica ao caso estacionário. Porém tanto nos estágios iniciais, antes de completar-se a deformação, quanto nos finais, antes de retornar à morfologia inicial, temos uma situação não estacionária em que a força elástica na hemácia está mudando. Essa mudança conformacional da hemácia dispara processos de dissipação de energia tanto através da viscosidade interna do citoplasma, e externa do plasma sanguíneo, como pela viscosidade de membrana da hemácia. Nesse caso o movimento é equivalente a um sistema massa-mola superamortecido, no qual em lugar de oscilar, a

mola retorna à situação de equilíbrio segundo uma exponencial decrescente do tempo da forma:  $L = L_0 \exp(-t/\tau)$ . Hochmuth et al [72] mostraram que as viscosidades do citoplasma e do plasma são desprezíveis comparadas com a viscoelasticidade da membrana para efeitos rápidos, na escala de centenas de milisegundos. Eles mostraram que o tempo de retorno é dado por  $\tau = \mu_{membrana} / \eta$  onde  $\mu_{membrana}$  é a viscosidade interna da membrana e  $\eta$  a sua elasticidade.

Um dos últimos testes de validação dos nossos resultados foi então parar o estágio de translação repentinamente na última velocidade, na máxima elongação, portanto, e observar o retorno da hemácia em função do tempo, analisando a seqüência de imagens que começa com a máxima deformação da célula e termina com a recuperação de sua morfologia inicial. Para tanto capturamos e digitalizamos imagens quadro a quadro desse movimento usando o controle remoto de um vídeo de 8 cabeças. A câmera grava na taxa de 30 quadros/s, de modo que o intervalo de tempo entre um quadro e outro é de 33 ms. O gráfico da Figura 120 mostra o resultado obtido do qual extraímos um tempo de retorno de 76.7 ms.



**Figura 120.** Deformação da hemácia em função do tempo.

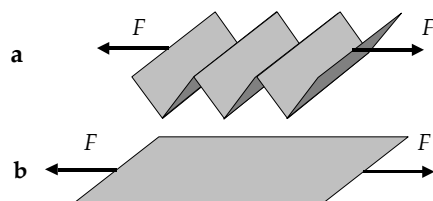
Esse tempo de retorno  $\tau$  é uma propriedade intrínseca da membrana. Concluimos então, que a pinça óptica permite que as medidas de  $\mu_{membrana}$  e  $\eta$  sejam ambas realizadas sobre uma mesma hemácia simultaneamente. Do gráfico da Figura 118 extraímos a elasticidade  $\eta$ , cujo valor obtido foi de  $\eta = (4 \pm 0.1) \times 10^{-4} \text{ dyn/cm}$ .

Usando o tempo de retorno medido e esse valor da elasticidade encontramos  $\mu_{membrana} = 3 \times 10^{-5} \text{ poise.cm}$  para a viscosidade da membrana.

Grande parte desse trabalho já estava pronta na época da defesa de minha Tese de Mestrado. Até aquele momento a motivação do trabalho foi de quantificar de alguma forma uma propriedade relacionada à “deformabilidade” das hemácias. O fato de que obtivemos resultados repetitivos e sensíveis levou ao seu uso em aplicações clínicas, após o período do meu Mestrado. O protocolo de medida foi aperfeiçoado e mantido o mesmo para permitir comparações, e detalhes bem mais específicos sobre os mesmos podem ser encontrados na Tese de Doutorado do Marcelo Brandão defendida pela Faculdade de Ciências Médicas [73]. Nesse momento nos perguntamos sobre até onde deveríamos considerar válido o modelo simples visto que os resultados da validação experimental foram surpreendentemente bons, mesmo considerando a hemácia com a forma de um paralelepípedo. Ao longo das medidas clínicas também percebemos que essa técnica era mais sensível na detecção de efeitos externos do que as outras técnicas comumente utilizadas.

A grandeza que medimos com essa técnica deve ser denominada por elasticidade aparente, ou elasticidade total, da hemácia em lugar de elasticidade da membrana que é uma grandeza bem definida. Isso porque nossa técnica analisa a estrutura da hemácia como um todo e não apenas a elasticidade intrínseca de sua membrana. Um exemplo que mostra a diferença entre os dois casos pode ser visualizado através das Figura **121 a** e **b**. Considere duas folhas de papel idênticas, uma dobrada e outra não, cujo comprimento em função da força  $F$  aplicada é observado de cima, de onde se percebe apenas sua projeção vertical. A deformação do papel dobrado será muito maior do que a do papel não dobrado, embora os dois sejam feitos do mesmo material. A elasticidade intrínseca do papel seria medida no papel não dobrado, enquanto no dobrado se mede uma elasticidade muito menor do que a intrínseca. A elasticidade intrínseca pode ser medida usando o método da pipeta no qual suga-se com uma diferença de pressão

conhecida apenas a membrana da hemácia para dentro de um capilar observando o comprimento de sua deformação. A nossa medida para a elasticidade total da hemácia foi de  $\eta = (4 \pm 0.1) \times 10^{-4} \text{ dyn/cm}$  enquanto valores típicos para elasticidade da membrana obtidos pelo método da pipeta são de  $\eta_p = (6 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$  [74, 75].



**Figura 121.** Folhas de papel, dobrada e não dobrada, submetidas a uma tração  $F$ . A deformação no comprimento da folha dobrada será dada pela elasticidade total e é muito menor que a elasticidade intrínseca da folha de papel medida com a folha não dobrada.

Entretanto, na corrente sanguínea é a elasticidade total da hemácia o fator que interessa, pois é ela que mede a habilidade da célula se deformar dobrando-se sobre si mesma e transpor vasos com dimensões menores do que ela mesma. Além disso, a elasticidade total é muito mais sensível à influência de fatores externos como pressão osmótica e presença de drogas do que a elasticidade de sua membrana. No limite em que a hemácia for fortemente tracionada, correspondendo à situação em que a folha dobrada se desdobrou completamente, as duas medidas de elasticidade devem coincidir. Isso sugere que a técnica de medida com pinça óptica é mais adequada para caracterizar patologias hematológicas do que outras técnicas.

Outra vantagem dessa técnica, além de sua sensibilidade, é sua individualidade, medindo hemácia por hemácia. Se todas as hemácias de um paciente com determinada doença tivessem suas propriedades elásticas modificadas o paciente, provavelmente, estaria morto. Assim espera-se que a maioria de suas hemácias ainda mantenha o comportamento normal. Medidas que detectam apenas valores médios teriam pouca sensibilidade, pois a parcela normal da população de hemácias tende a trazer os valores médios dessas propriedades para dentro da faixa de normalidade. Técnicas como medidas de tamanho médio ou fração de hemácias destruídas após passagem por

parede porosa caem nessa categoria. A característica da doença pode ser a presença de hemácias completamente fora da região de normalidade que deixaria de ser percebida pelas técnicas não individuais. Esse fato já foi salientado por Narla Mohandas & Robert Hebbel [76] em “Erythrocyte deformability, fragility and rheology” quando afirmam: *“As técnicas provaram ser úteis em delinear o comportamento mecânico de populações celulares. Por não medirem individualmente as células, estes métodos não apresentam uma definição completa das conseqüências fisiológicas do comportamento reológico alterado.”*

Por outro lado, as medidas individualizadas devem ser feitas em grande número de hemácias para diminuir a probabilidade de deixar de observar aquelas fora do padrão de normalidade. Para a realização de tantas medidas precisamos aumentar a velocidade das mesmas e esse trabalho foi feito através de uma completa automatização do sistema de medida, incluindo desligar o laser, mover a platina do microscópio para uma posição aleatória assegurando uma boa amostragem, ligar o laser, prender a hemácia, levantá-la até a altura desejada e movimentá-la com diferentes velocidades. A seguir descrevemos de forma resumida os resultados clínicos obtidos com esse trabalho.

#### **5.3.4 Aplicações às Medidas de Elasticidade de Hemácias de Pacientes com Anemia e Traço Falciforme**

A molécula da hemoglobina é formada por quatro subunidades, cada uma contendo um grupo heme (derivado porfirínico contendo um radical ferro) ligado a um polipeptídeo. Uma alteração hereditária na formação dessas cadeias causa a anemia falciforme. A Hemoglobina falcêmica foi a primeira hemoglobina anormal a ser identificada e é de grande importância clínica. A alteração de um único nucleotídeo (A → T), no DNA do gene para a cadeia beta da hemoglobina, forma-se então a hemoglobina variante S ou HbS onde há uma substituição de uma Valina por um Ácido Glutâmico na posição 6 (6GLU-VAL). Quando desoxigenada nos capilares, a HbS se polimeriza e forma agregados que dão ao eritrócito uma forma diferente, lembrando uma foice. A homozigose para esta mutação causa a anemia falciforme, uma doença grave relativamente comum em algumas partes do mundo, sendo predominante em

negros. Os heterozigotos possuem traço falcêmico, são normais clinicamente, porém suas hemácias sofrem afoiçamento quando submetidas à pressão baixa de oxigênio.

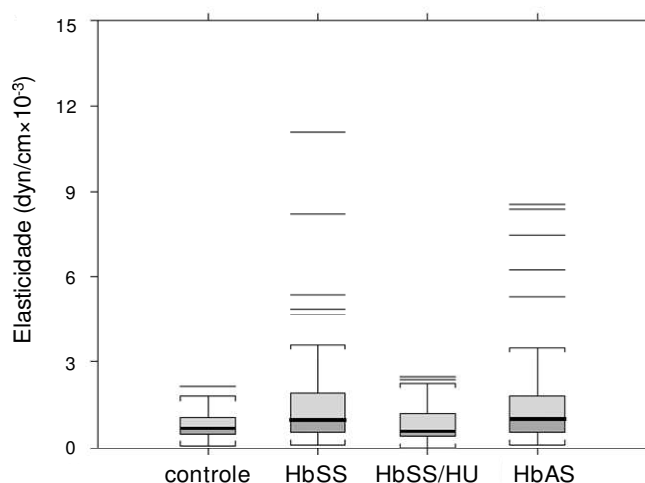
A célula falcizada não tem flexibilidade, tem vida curta e há um aumento da viscosidade sangüínea em relação aos portadores de eritrócitos normais. Em conseqüência deste aumento da viscosidade, o fluxo sangüíneo nos capilares é retardado e pode até mesmo parar, levando os tecidos a uma deficiência em oxigênio. Pode ocorrer lesão da parede dos capilares e coagulação sangüínea.

Embora o defeito primário da anemia falciforme seja uma alteração na constituição da hemoglobina, alterações secundárias no metabolismo, na estrutura da membrana e na função também ocorrem. Pacientes homozigotos para essa mutação (HbSS) apresentam anemia hemolítica e crises vaso-oclusivas que levam a danos na maioria de seus tecidos. Por outro lado os pacientes heterozigotos, ou traço falciforme (HbAS), são assintomáticos. A Hidroxiuréia (HU) tem sido usada com sucesso no tratamento dessa doença porque ela melhora a produção fetal de hemoglobina e a deformabilidade da hemácia como um todo. Usamos a anemia falciforme como um modelo clínico para mostrar que o método da pinça óptica é bastante sensível.

Estudamos a deformabilidade de 25 pacientes com hemoglobina S com idades variando entre 23 e 51 anos (15 homozigotos para HbS incluindo 5 pacientes medicados com Hidroxiuréia por pelo menos 6 meses, e 10 pacientes traço falciformes) e 35 controles normais. Com respeito aos haplotipos  $\beta$ -globina, 8 pacientes eram Benin/Bantu, 4 Benin/Benin e 3 Bantu/Bantu. A  $\alpha$ -Talassemia estava ausente em 8 HbSS pacientes. O Comitê de Ética da UNICAMP aprovou esse estudo. Para fazer o experimento, 0.5  $\mu$ l de concentrado de eritrócitos foi diluído em 1000  $\mu$ l de plasma AB com viscosidade conhecida e medida no viscosímetro de Ostwald  $\eta = 1.85$  cP. Pelo menos 17 células de cada paciente foi submetida a 6 diferentes velocidades (150 a 250  $\mu$ m/s, com variação de 20  $\mu$ m/s). A análise dos dados foi feita segundo o modelo e o procedimento descrito anteriormente.



Nossos resultados mostraram que as hemácias dos pacientes HbS eram mais rígidas que a dos indivíduos normais (controle  $\rightarrow \eta = (0.89 \pm 0.6) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ; HbSS  $\rightarrow \eta = (1.70 \pm 2.0) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ; HbAS  $\rightarrow \eta = (1.80 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ), exceto para aqueles que estavam tomando Hidroxiuréia (HbSS/HU  $\rightarrow \eta = (0.96 \pm 1.0) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ). Mesmo em pacientes com traço falciforme foi possível detectar hemácias bastante rígidas. Para os pacientes homozigotos tratados com Hidroxiuréia a rigidez das hemácias se aproximou da distribuição dos pacientes normais do controle. A Figura 122 mostra esses resultados. Não houve correlação entre a elasticidade da hemácia e os haplotipos de  $\beta$ -globina ou a  $\alpha$ -talassemia.



**Figura 122.** Elasticidade total da hemácia medida pela pinça óptica em pacientes com anemia falciforme (SS), homozigotos HbS tomando HU (SS/HU), heterozigotos (AS) e controles normais.

Neste estudo nós mostramos através do uso da pinça óptica que foi possível detectar diferenças na elasticidade de hemácias de portadores de HbS (HbSS e HbAS) comparados com hemácias normais e que o uso da Hidroxiuréia levou a uma “normalização” de deformabilidade dos eritrócitos. O fato da técnica com pinças ópticas ter detectado diferenças entre indivíduos com traço falciforme e controle demonstra sua sensibilidade, pois esses indivíduos são assintomáticos. Dessa maneira temos que a deformabilidade dos glóbulos vermelhos é apenas um dos aspectos clínicos da anemia falciforme.

O gráfico da Figura 122 exemplifica bem a necessidade de técnicas de medidas individualizadas discutida acima. Nela percebemos uma população de hemácias com elasticidades muito acima da região de normalidade, com valores acima de 5 vezes o valor médio, embora o valor médio não seja tão diferente da distribuição do controle. Esse trabalho foi publicado na revista *European Journal of Haematology* [77].

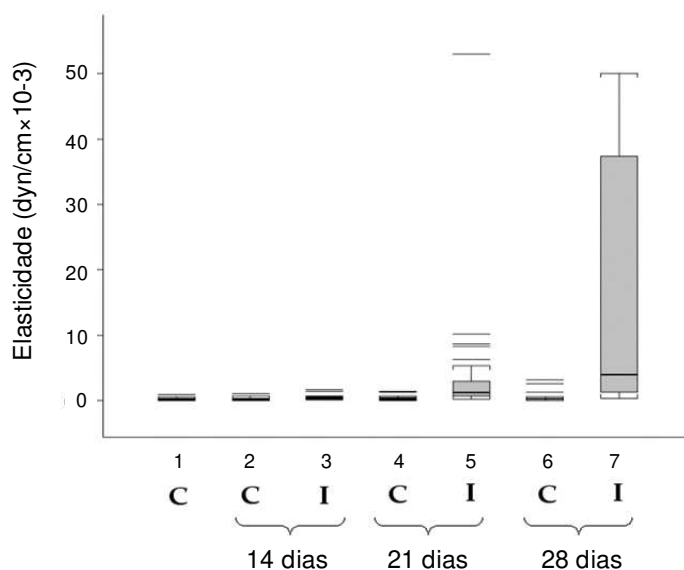
### **5.3.5. Aplicações às Medidas de Elasticidade de Hemácias Irradiadas em Função do Tempo de Estocagem**

A Doença enxerto-hospedeiro associada à transfusão “Transfusion associated graft-versus-host disease (TA-GVHD)” é uma complicação usualmente fatal da transfusão de sangue em pacientes imunosuprimidos. Nessa reação os glóbulos brancos do sangue do doador reconhecem materiais exógenos do hospedeiro disparando o processo de fagocitose. Para evitar esse fato é preciso destruir os glóbulos brancos do sangue do doador, submetendo-o a uma irradiação com raios gama. Em princípio essa irradiação mata células nucleadas (glóbulos brancos) sem destruir as hemácias (anucleadas). Entretanto, a pergunta sobre o que acontece a seguir com as hemácias ficou sem uma boa resposta. Sabe-se que irradiação resulta na produção de espécies de oxigênio tais como radicais hidroxilas capazes de iniciar ou amplificar o processo de peroxidação de lipídios comprometendo a integridade da membrana. Além disso, a irradiação acelera o extravazamento de íons potássio da hemácia, resultando em aumento da viscosidade interna e prejudicando a deformabilidade celular.

Bancos de sangue sem acesso imediato a irradiador de sangue usam o procedimento regular de armazenar unidades de sangue irradiados. Entretanto, enquanto bolsas de sangue coletadas em CPDA<sub>1</sub> podem ser estocadas por 35 dias, os padrões da AABB recomendam que o tempo de estocagem de hemácias irradiadas seja limitado a 28 dias após a irradiação. O objetivo desse estudo foi analisar as propriedades mecânicas de unidades de sangue irradiadas em função do tempo de estocagem.

Para tanto coletamos 5 bolsas de doadores de sangue sadios em CPDA<sub>1</sub>, sendo que cada uma foi dividida de maneira estéril em 2 bolsas. Uma das unidades resultantes da divisão recebeu radiação gama na dose de 25 Gy no mesmo dia e a outra foi mantida como controle e não recebeu radiação. Todas elas foram estocadas a 4°C e amostras das mesmas foram analisadas nos dias 1, 14, 21 e 28 de estocagem. Dez hemácias de cada bolsa eram submetidas a 6 diferentes velocidades (150, 170, 190, 210, 230 e 250  $\mu\text{m/s}$ ) e analisadas no computador conforme o modelo anteriormente descrito. A diluição concentrado de eritrócitos/plasma foi também 0.5  $\mu\text{l}/1000 \mu\text{l}$  e a viscosidade do plasma  $\eta = 1.504 \text{ cP}$ .

A Figura 123 mostra os resultados obtidos para 28 dias de estocagem. Eritrócitos das unidades irradiadas e estocadas por 21 e 28 dias mostram um valor para a elasticidade significativamente mais alto (21 dias =  $(3.54 \pm 1.3) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$  e 28 dias =  $(14 \pm 3.2) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ) comparados ao controle (21 dias =  $(0.37 \pm 0.03) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$  e 28 dias =  $(0.5 \pm 0.09) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ;). A elasticidade das hemácias estocadas irradiadas estocadas por 14 dias ( $(0.43 \pm 0.038) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ) foi semelhante as da não irradiadas ( $(0.34 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}$ ).



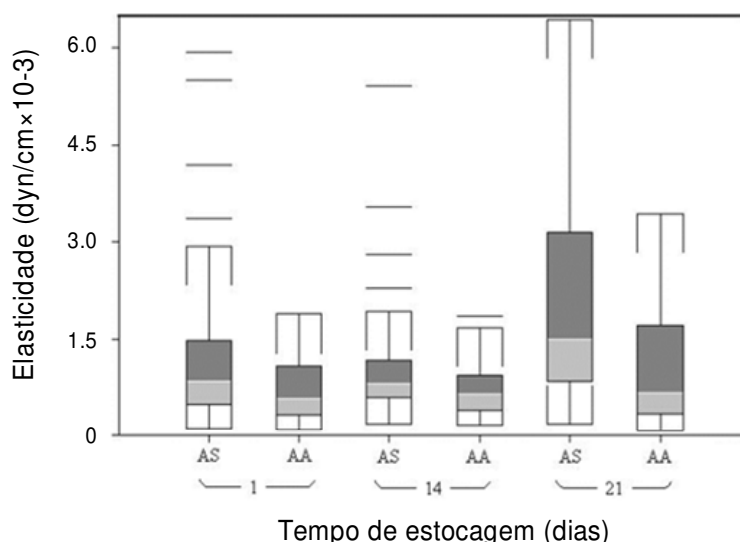
**Figura 123.** Hemácias armazenadas e irradiadas comparadas ao controle.

Já houve relatos de efeitos bioquímicos e morfológicos da irradiação de hemácias usando doses terapêuticas (15 - 30 Gy) e que esses efeitos podem ser acentuados com o tempo de estocagem [78]. Estudos da deformabilidade de hemácias irradiadas até 50 Gy com reoscópio demonstrou que o índice de deformação entre as hemácias irradiadas e controle não foi estatisticamente diferente [79]. Entretanto o índice de deformação das hemácias diminuiu ligeiramente durante a estocagem. Cicha et al, [80] mostrou que a radiação gama em 35 Gy estocadas em manitol-adenina-fosfato reduziu a deformabilidade de hemácias e o número de células não deformáveis aumentou durante a estocagem. Ele observou a deformabilidade das células em fluxo constante e esta era principalmente induzida por vazamentos de íons  $K^+$  das hemácias. Os resultados do nosso estudo estão em acordo com os achados prévios sugerindo que a deformabilidade de hemácias irradiadas diminui durante a estocagem. Entretanto a alta sensibilidade da técnica com pinça óptica nos permite concluir que não há diferença significativa até 14 dias para hemácias estocadas em CPDA<sub>1</sub> porém há uma diferença bastante significativa para células estocadas até 21 dias. Dessa forma nossos resultados sugerem que as unidades irradiadas estocadas por 21 dias estejam comprometidas e que a transfusão seria mais eficiente e segura se o tempo de estocagem fosse limitado a 14 dias. Este trabalho foi publicado na revista Transfusion [81].

#### **5.3.6. Aplicações às Medidas de Elasticidade de Hemácias Estocadas de Pacientes com Traço Falciforme**

Indivíduos com traço falciforme AS são considerados doadores de sangue e suas hemácias são consideradas seguras para transfusão. As células desses indivíduos são estocadas e transfundidas por 35 dias. Desse modo, o objetivo desse estudo foi analisar a deformabilidade de hemácias de doadores AS. Para isso, 14 bolsas foram estudadas, sendo 7 de indivíduos normais (controle-AA) e 7 de indivíduos com traço falciforme (AS). As amostras foram estudadas com 1, 14, 21, 28 e 35 dias de estocagem. A diluição do concentrado de hemácias/plasma foi a mesma dos experimentos anteriores e a

viscosidade do plasma era 1.61 cP, pelo menos 25 células de cada bolsa foram analisadas. Os resultados encontrados estão representados no gráfico da Figura 124.



**Figura 124.** Gráfico comparando a distribuição da elasticidade de hemácias AS e controle (AA) durante o período de estocagem.

As hemácias AS estocadas por 1, 14 e 21 (1 dia =  $0.84 \times 10^{-3}$  dyn/cm, 14 dias =  $0.81 \times 10^{-3}$  dyn/cm, 21 dias =  $1.48 \times 10^{-3}$  dyn/cm) são significativamente menos deformáveis que as hemácias AA-controle para os mesmos respectivos dias (1 dia =  $0.58 \times 10^{-3}$  dyn/cm, 14 dias =  $0.65 \times 10^{-3}$  dyn/cm, 21 dias =  $0.66 \times 10^{-3}$  dyn/cm). A maioria das hemácias de traço falciforme com 28 e 35 dias era tão rígida que escapava da pinça, aproximadamente 30% dela não permanecia capturada conforme crescia o valor da velocidade. Dessa forma, a precisão dos valores de elasticidade para hemácias AS de 28 e 35 dias foi prejudicada. Os valores de elasticidade para hemácias controle para 28 e 35 dias são respectivamente (28 dias =  $0.77 \times 10^{-3}$  dyn/cm, 35 dias =  $0.92 \times 10^{-3}$  dyn/cm). Esse nosso estudo confirma resultados prévios que mostraram que células AS são menos filtradas que células normais. Nossos resultados sugerem que muitas das células AS tornam-se rígidas com a estocagem e que mesmo uma pequena concentração de hemoglobina S (pacientes com traço falciforme possuem 35% da hemoglobina total sendo hemoglobina S) pode comprometer a elasticidade

celular. Essa diminuição da deformabilidade das células com traço falciforme pode interferir no seu comportamento na circulação. Hemácias AS com 28 dias ou mais de estocagem parecem estar prejudicadas e a transfusão dessas células com um menor período de estocagem pode ser mais eficiente. Este trabalho foi publicado na revista Vox Sanguinis [82].

## 5.4 Teoria Hidrodinâmica

### 5.4.1 Mundo Microscópico: Baixos Números de Reynolds.

O número de Reynolds é definido como  $Re = \frac{\rho l v}{\mu}$ , onde  $l$  é uma dimensão típica do corpo na presença de um fluido com velocidade  $v$ . A viscosidade cinemática é definida por  $\nu = \mu/\rho$ , de modo que  $Re = \frac{l v}{\nu}$ . Para a água  $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Analisando a dimensão desse número percebemos que

$$[Re] = \frac{M}{L^3} L v \frac{L V}{F} = \frac{M v^2}{F L} = \frac{\text{energia cinética}}{\text{trabalho da viscosidade}} \quad (5.18),$$

significando que a energia cinética é desprezível em números de Reynolds muito pequenos. Notando que  $\mu^2/\rho$  tem dimensão de força e usando os números para água,  $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$  vemos que o valor da força que aparece em um corpo com número de Reynolds igual a 1 será  $F = (\mu^2/\rho) = 10^{-4} \text{ dynas} = 10^{-9} \text{ N}$ . Tratam-se de força muito pequenas, embora maiores do que as da pinça óptica, que só interessam para objetos muito pequenos. O número de Reynolds para um microorganismo com  $L = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $v = 100 \text{ }\mu\text{m/s}$  na água é de  $10^{-3}$ .

Purcell [83] apresenta um exemplo interessante sobre a completa não importância da energia cinética para um microorganismo com dimensões de micra se movendo na água com  $30 \text{ }\mu\text{m/s}$ . Para o movimento é necessário uma força constante. Daí ele se faz a pergunta: em quanto tempo e que distância esse corpo pára após desligar essa força? Para estimar essa distância podemos supor válida a lei de Stokes

para esferas  $F = 6\pi\mu a v$ , onde  $a$  é o raio da partícula. Nesse caso é fácil integrar a equação de Newton obtendo

$$v = v_0 e^{-t/\tau} \text{ com } \tau = \frac{2a^2 \rho_{\text{corpo}}}{9v \rho_{H_2O}} \quad (5.19),$$

supondo a densidade do microorganismo igual à da água e um raio de 10  $\mu\text{m}$ , ele pára em 20  $\mu\text{s}$ , e 0,2  $\mu\text{s}$  para um raio de 1  $\mu\text{m}$ . Integrando a velocidade nesse intervalo de tempo temos que ele percorre a distância de 6  $\text{\AA}$  para o raio de 10  $\mu\text{m}$  e 0,06 $\text{\AA}$  para o raio de 1  $\mu\text{m}$ . Em outras palavras, pára instantaneamente. Não havia qualquer energia cinética armazenada. Para baixos números de Reynolds as forças estão sempre em equilíbrio, i.e.,  $F_{\text{externa}} = F_{\text{viscosa}}$ .

A aparente semelhança dessas equações com as equações da eletrostática é enganadora. Não ajuda muito o fato da pressão ser uma função harmônica, para a qual já existe toda uma biblioteca de soluções, porque as condições de contorno dos problemas de hidrodinâmica são impostas na velocidade e não na pressão. A condição de contorno típica da hidrodinâmica é a condição de “NON SLIP”, ou seja, a velocidade do fluido em contato com uma interface rígida é a mesma da interface. Nossos problemas envolvem um corpo rígido se movendo com velocidade  $\vec{U}_0$  entre dois planos infinitos separados por uma distância  $d$ , que são o fundo da lâmina na câmara de Neubauer e a lamínula. Neste caso as condições de contorno são que  $\vec{v} = \vec{U}_0$  na superfícies do corpo e  $\vec{v} = 0$  nas paredes, o que complica bastante o problema.

Existem soluções prontas para diversas formas geométricas em um meio infinito, mas é quase inacreditável quão poucas soluções existem para problemas centenários de hidrodinâmica em baixos números de Reynolds, após todo o desenvolvimento da aviação, mísseis teleguiados etc. Aparentemente, houve uma grande falta de interesse nesse tipo de problemas, como afirma Purcell: *“Now, I’m going to talk about a world which, as physicists, we almost never think about. The physicist hears about viscosity in high school*

*when he's repeating Millikan's oil drop experiment<sup>6</sup> and he never hears about it again, at least not in what I teach. And Reynold's number, of course, is something for the engineers. And the low Reynolds number regime most engineers aren't even interested in – except possibly chemical engineers, in connection with fluidized beds, a fascinant topic I heard about from a chemical engineering friend at MIT. But I want to take you into the world of very low Reynolds number – a world which is inhabited by the overwhelming majority of the organisms in this room. This world is quite different from the one that we developed our intuitions in."*

Esse quadro, entretanto, mudou drasticamente na última década, não apenas porque a mundo biológico microscópico se tornou mais importante mas também porque a diminuição do tamanho dos dispositivos eletromecânicos leva naturalmente ao regime de baixos números de Reynolds. Prova disso é que a palavra microfluídica está se tornando parte do vocabulário comum. No nosso caso, lidando com partículas capturadas pelas pinças ópticas em fluidos, torna-se impossível entender completamente os problemas sem o uso da hidrodinâmica em baixos números de Reynolds. Muito menos se pretendemos estudar forças em microorganismos. Isso indica que mesmo físicos interessados nos aspectos ópticos da pinça óptica e não na hidrodinâmica, serão obrigados a dedicar um esforço razoável para lidar com problemas de hidrodinâmica em baixos números de Reynolds. Apesar do interesse renovado na área só encontramos solução pronta para o problema de uma esfera entre duas paredes [84], mas não de um disco ou de uma figura plana. Da mesma forma chama a atenção o grande número de trabalhos publicados no século XXI contendo soluções de problemas que imaginávamos estarem completamente resolvidos no século XIX, no máximo início do século XX. A impressão é de que a história dessa área ficou dormente após Stokes.

---

<sup>6</sup> Desconfio que o autor queria se referir à graduação e não high school. No ensino médio aqui no Brasil sequer se ensina as equações de Bernoulli, e jamais se demonstraria experiência de Millikan.



### 5.4.2 Equações de Continuidade

Para deduzir a equação de Navier-Stokes é necessário usar as equações de continuidade da massa e do momento. A equação da continuidade de uma grandeza qualquer é da forma

$$\nabla \cdot \vec{J} + \frac{\partial u}{\partial t} = \text{Fontes} - \text{Sumidouros} \text{ onde, } \vec{J} = \frac{\text{quantidade da grandeza}}{\text{área} \times \text{tempo}} \quad (5.20)$$

é o vetor fluxo na direção do escoamento  $\vec{v}$  da grandeza, tal que  $\vec{J} = u \vec{v}$ ,  $u = \frac{\text{quantidade da grandeza}}{\text{volume}}$  é a densidade da grandeza e as fontes e sumidouros são definidos por:

$$\text{Fonte} = \frac{\text{quantidade criada}}{\text{volume} \times \text{tempo}} \text{ e } \text{Sumidouro} = \frac{\text{quantidade destruída}}{\text{volume} \times \text{tempo}} \quad (5.21).$$

### 5.4.3 Continuidade da Massa

Para a continuidade da massa  $u = \rho$ ,  $\vec{J} = \rho \vec{v}$  e não há fonte nem sumidouros de massa, portanto a equação de continuidade da massa é dada por  $\nabla \cdot \vec{J} + \frac{\partial \rho}{\partial t} = 0$ . Se o fluido é incompressível  $\rho$  é constante no tempo e no espaço, i.e.,  $\frac{\partial \rho}{\partial t} = 0$  e  $\frac{\partial \rho}{\partial x_i} = 0$ , significando que  $\nabla \cdot \rho \vec{v} = \rho \nabla \cdot \vec{v} = 0$ . Isso implica que a velocidade é sempre solenoidal, i.e.,  $\nabla \cdot \vec{v} = 0$ .

### 5.4.4 Continuidade do Momento

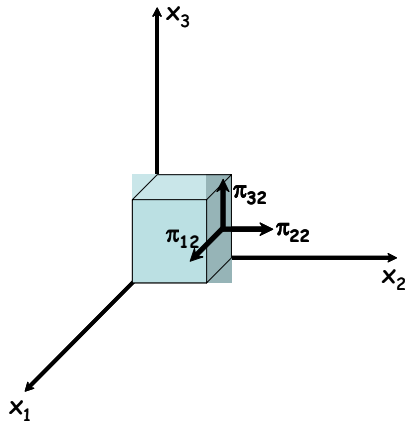
Para a equação da continuidade do momento linear partimos das equações de Newton  $\vec{F} = \frac{d\vec{P}}{dt}$ , para criar a fonte de momento  $\vec{f} = \frac{\Delta \vec{F}}{\Delta V} = \frac{\Delta \vec{P}}{\Delta V \Delta t}$ . O tensor densidade de momento é dado por  $u = \frac{\Delta \vec{P}}{\Delta V} = \frac{\Delta m \vec{v}}{\Delta V} = \rho \vec{v}$  e o tensor fluxo por  $\vec{J} = (\rho \vec{v}) \vec{v}$ , levando à equação da continuidade do momento  $\nabla \cdot (\rho \vec{v} \vec{v}) + \rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = F - S$ .

### 5.4.5 Fontes e Sumidouros de Momento

Procurando no dicionário inglês-português percebe-se que as palavras que utilizaremos nessa seção têm os seguintes significados: stress = pressão, tensão, carga; strain = deformação, distorção; stretch = esticamento, distensão e shear = esforço transversal, cisalhamento, ato de cortar com tesoura ou guilhotina.

Separamos as forças externas atuando em um elemento de volume em dois tipos: volumétricas e de contato. Volumétricas são forças de ação à distância através de campos gravitacionais ou eletromagnéticos. Neste caso as fontes de momento são dadas por  $\vec{f}$ . As forças de contato são transmitidas através dos tensores das tensões de superfície  $\pi_{ij}$  definidos através das forças  $\Delta F_i = \oint \pi_{ij} n_j da$  onde  $n_j$  é normal à superfície na direção  $j$  e do elemento de área. Usando o teorema da divergência em um elemento de volume  $\Delta F_i = \oint \pi_{ij} n_j da = \int_{\Delta V} \partial_j \pi_{ij} dV = \partial_j \pi_{ij} \Delta V$  vemos que a densidade de força de contato é dada por  $\Delta F_i / \Delta V = \partial_j \pi_{ij}$ .

**Figura 125.** Elemento de volume, as forças e o tensor das tensões.

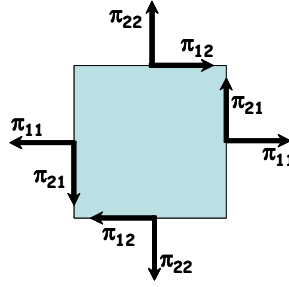


Para um elemento de volume infinitesimal, as forças volumétricas são desprezadas e a somatória das forças e torques de contato em um corpo de massa nula tem que se zerar. Da Figura 125 ao lado notamos as forças nas direções 1, 2 e 3 são dadas por  $F_1 = \pi_{12} \Delta x_1 \Delta x_3$ ,  $F_2 = \pi_{22} \Delta x_1 \Delta x_3$  e  $F_3 = \pi_{32} \Delta x_1 \Delta x_3$ .

A força  $F_2$  é normal à superfície enquanto as forças  $F_1$  e  $F_3$ , paralelas, são forças de cisalhamento ou “shear forces”. Para uma tensão homogênea, as forças nas faces diferentes têm a mesma intensidade e direções opostas devido às normais, como mostra a Figura 126. Isso significa que a força resultante é automaticamente nula. Para cancelar o torque, entretanto, é necessário exigir que:

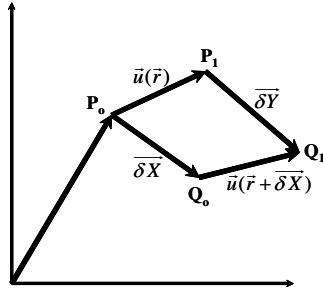
$$(\pi_{12} dx_1 dx_3) dx_2 = (\pi_{21} dx_2 dx_3) dx_1 \quad (5.22)$$

ou seja, que o tensor das tensões seja simétrico,  $\pi_{ij} = \pi_{ji}$ .



**Figura 126.** Tensão homogênea e as forças.

**Figura 127.** Deformação.



Vamos considerar dois pontos de um corpo inicialmente em  $P_0$  e  $Q_0$  que se movem para os pontos  $P_1$  e  $Q_1$ , como mostra a Figura 127. Isso não significa que houve uma deformação pois o corpo pode ter simplesmente transladado e girado sem deformar.

Para haver deformação, portanto, é necessária a existência de uma deformação. Se  $\vec{u}(\vec{r}) = \vec{u}(\vec{r} + \vec{\delta X})$  só ocorreu uma translação, logo só haverá deformação se  $\vec{\delta u} = \vec{u}(\vec{r} + \vec{\delta X}) - \vec{u}(\vec{r}) \neq 0$ , embora isso ainda não descarte a possibilidade de ter acontecido apenas uma rotação. Expandindo  $\delta u$  em série de Taylor até primeira ordem  $\vec{\delta u} = \vec{u}(\vec{r}) + (\vec{\delta X} \cdot \nabla) \vec{u}(\vec{r}) - \vec{u}(\vec{r}) = (\vec{\delta X} \cdot \nabla) \vec{u}(\vec{r})$ , vemos que  $\delta u_i = \delta X_k \partial_k u_i$  onde  $\partial_k u_i$  é um tensor de rank 2. Todo tensor de rank 2 pode ser decomposto em um tensor simétrico e um antisimétrico pois:

$$\Gamma_{ij} = \frac{1}{2}(\Gamma_{ij} + \Gamma_{ji}) + \frac{1}{2}(\Gamma_{ij} - \Gamma_{ji}) = S_{ij} + A_{ij} \quad (5.23),$$

portanto  $\partial_k u_i = \frac{1}{2}(\partial_k u_i + \partial_i u_k) + \frac{1}{2}(\partial_k u_i - \partial_i u_k) = \eta_{ik} + w_{ik}$ . Analisando a parte antisimétrica

percebemos que se trata de uma rotação apenas, pois o tensor antisimétrico de dimensão 3 pode ser associado a um vetor dual na forma

$\vec{w} = \frac{1}{2} \varepsilon_{ijk} w_{jk} \vec{e}_i = \vec{e}_i \frac{1}{2} \varepsilon_{ijk} (\partial_j u_k - \partial_k u_j)$ , onde  $\varepsilon_{ijk}$  é o tensor de Levi-Civita. Entretanto,

$\varepsilon_{ijk} \partial_j u_k = \varepsilon_{ikj} \partial_k u_j$  por simples troca de letras dos índices mudos  $j$  e  $k$ , mas

$\varepsilon_{ijk}\partial_j u_k = -\varepsilon_{ijk}\partial_k u_j$  pela antisimetria do  $\varepsilon_{ijk}$ , de modo que  $\vec{w} = \vec{e}_i \varepsilon_{ijk} \partial_j u_k = \nabla \times \vec{u}$ . Isso significa que  $\vec{w} \times \vec{\delta X} = (\nabla \times \vec{u}) \times \vec{\delta X} = -\vec{e}_i w_{ik} \delta X_k$ <sup>7</sup> é apenas uma rotação de um corpo rígido do tipo  $\vec{v} = \vec{\omega} \times \vec{r}$ , pois nesse caso  $\nabla \times \vec{v} = 2\vec{\omega}$  e  $\vec{\omega} \times \vec{r} = \frac{1}{2}(\nabla \times \vec{v}) \times \vec{r}$ . A deformação, portanto, é dada apenas pela componente simétrica  $\eta_{ij} = \eta_{ji} = \frac{1}{2}(\partial_i u_j + \partial_j u_i)$ .

#### 5.4.6. Lei de Hooke Generalizada.

A lei de Hooke generalizada estabelece uma relação linear entre os tensores das tensões e deformação na forma  $\pi_{ij} = C_{ijkl} \eta_{kl}$ , onde  $C_{ijkl}$  agora é um tensor de rank 4 com  $3^4 = 81$  elementos. As simetrias diminuem o número de elementos distintos. Por exemplo,  $\pi_{ij} = \pi_{ji}$  implica que  $C_{jikl} = C_{jilk}$  enquanto  $\eta_{kl} = \eta_{lk}$  implica em  $C_{jikl} = C_{jilk}$ .

Existe mais uma simetria pelo fato de que  $C_{ijkl} = \frac{\partial \text{Energia}}{\partial \eta_{ij} \partial \eta_{kl}} = \frac{\partial E}{\partial \eta_{kl} \partial \eta_{ij}} = C_{klij}$ . Essas

simetrias trazem o número de elementos distintos para apenas 21. Se o meio é isotrópico  $C_{ijkl}$  pode ser decomposto nos 3 tensores isotrópicos  $A_{ijkl} = \delta_{ij} \delta_{kl}$ ,  $B_{ijkl} = \delta_{ik} \delta_{jl} + \delta_{il} \delta_{jk}$  e  $D_{ijkl} = \delta_{ik} \delta_{jl} - \delta_{il} \delta_{jk}$ , de forma que  $C_{ijkl} = a \delta_{ij} \delta_{kl} + b(\delta_{ik} \delta_{jl} + \delta_{il} \delta_{jk}) + c(\delta_{ik} \delta_{jl} - \delta_{il} \delta_{jk})$ . O tensor das tensões será dado por  $\pi_{ij} = a \delta_{ij} \delta_{kl} \eta_{kl} + b(\delta_{ik} \delta_{jl} + \delta_{il} \delta_{jk}) \eta_{kl} + c(\delta_{ik} \delta_{jl} - \delta_{il} \delta_{jk}) \eta_{kl}$ , mas como  $\eta_{ij}$  é simétrico o terceiro termo se anula e  $\pi_{ij} = a \eta_{kk} \delta_{ij} + 2b \eta_{ij} = -p \delta_{ij} + 2\mu \eta_{ij}$ , onde  $p$  é a pressão e  $\mu$  a “shear viscosity”. Até aqui temos usado a notação para elasticidades. A notação da mecânica dos fluidos faz a troca de  $\pi_{ij}$  por  $\sigma_{ij}$  e  $\eta_{ij}$  por  $D_{ij}$ , na forma

$$\sigma_{ij} = -p \delta_{ij} + 2\mu D_{ij} \text{ e } D_{ij} = \frac{1}{2}(\partial_i u_j + \partial_j u_i).$$

---

<sup>7</sup>  $\vec{w} \times \vec{\delta X} = \vec{e}_i \varepsilon_{ijk} w_j \delta X_k = \frac{1}{2} \vec{e}_i \varepsilon_{ijk} \varepsilon_{jlm} w_{lm} \delta X_k = \frac{1}{2} \vec{e}_i (\delta_{ik} \delta_{ml} - \delta_{il} \delta_{mk}) w_{lm} \delta X_k =$   
 $= \frac{1}{2} \vec{e}_i (w_{ki} - w_{ik}) \delta X_k = -\vec{e}_i w_{ik} \delta X_k$

### 5.4.7. Equação de Navier-Stokes

Colocando então as fontes e sumidouros na equação da continuidade do momento obtemos a equação de Navier-Stokes  $f_i + \partial_j \sigma_{ij} = \rho(\vec{v} \cdot \nabla) v_i + \rho \frac{\partial v_i}{\partial t}$ .

### 5.4.8. Equação de Stokes ou “Creeping Motion”

Vamos voltar à equação de Navier-Stokes,  $f_i + 2\mu \partial_j D_{ij} - \rho \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} = \rho \frac{\partial v_i}{\partial t}$ .

Reescrevendo-a na forma em função do número de Reynolds

$$f_i L + 2\mu [L \partial_j D_{ij} - \frac{L\rho \vec{v}}{\mu} \cdot \nabla \vec{v}] = \rho L \frac{\partial v_i}{\partial t} \quad (5.24),$$

vemos que o mesmo aparece no termo que contém o gradiente de  $v$ , tornando-o desprezível. Para baixos números de Reynolds, portanto, a equação de Navier-Stokes se reduz a  $f_i + 2\mu \partial_j D_{ij} = \rho \frac{\partial v_i}{\partial t}$ . As equações de “creeping motion” para movimentos

estacionários  $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0$  são dadas por:  $\partial_j \sigma_{ij} = -f_i$  pela continuidade do momento e  $\partial_i v_i = 0$  pela continuidade da massa, com a definição  $\sigma_{ij} = -p \delta_{ij} + \mu(\partial_i v_j + \partial_j v_i)$ . Entretanto:

$$\partial_j [-p \delta_{ij} + \mu \partial_j v_i + \mu \partial_i v_j] = -\partial_i p + \mu \partial_j \partial_j v_i + \mu \partial_i \partial_j v_j = [-\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + \mu \nabla(\nabla \cdot \vec{v})]_i \quad (5.25)$$

e como  $\nabla \cdot \vec{v} = 0$  concluímos que as equações no regime viscoso são (“governing equations”):  $\mu \nabla^2 \vec{v} = \nabla p - \vec{f}$  junto com  $\nabla \cdot \vec{v} = 0$ . Na ausência de forças externas devemos resolver  $\mu \nabla^2 \vec{v} = \nabla p$  com  $\nabla \cdot \vec{v} = 0$ . Como os operadores  $\nabla^2$  e  $\nabla \cdot$  comutam entre si, aplicando o divergente na primeira equação e usando a segunda obtemos a equação escalar  $\nabla^2 p = 0$  para  $p$ , que significa que  $p$  é uma função harmônica. Já, aplicando o laplaciano  $\mu \nabla^2 \nabla^2 \vec{v} = \nabla^2 \nabla p = \nabla \nabla^2 p = 0$  de modo que  $\nabla^4 \vec{v} = 0$ , significando que o campo de velocidades é uma função biarmônica.

### 5.4.9. Teoremas Integrais em Escoamento de Stokes ou “Creeping Motion”

#### 5.4.9.A Teorema da Dissipação

Vamos escrever as equações de Stokes na forma:  $\partial_j \sigma_{ij} = 0$ ,  $D_{ii} = \nabla \cdot \vec{v} = 0$ . Vejamos quanto vale  $\partial_j (v_i \sigma_{ij})$ :  $\partial_j (v_i \sigma_{ij}) = v_i \partial_j \sigma_{ij} + \sigma_{ij} \partial_j v_i = \sigma_{ij} (D_{ij} + W_{ij}) = \sigma_{ij} D_{ij}$  pois  $\sigma_{ij} W_{ij} = 0$

porque se trata da contração de um tensor simétrico com um antisimétrico. Vamos considerar duas superfícies,  $S_2$ , parada, na qual  $V = 0$ , e  $S_1$ , na qual  $V = U_0$ , e o campo de velocidades e tensões na região entre elas. Aplicando o teorema da divergência para o produto que acabamos de encontrar

$$\int_V \partial_j (v_i \sigma_{ij}) dV = \oint_{S_1} v_i \sigma_{ij} n_j da - \oint_{S_2} v_i \sigma_{ij} n_j da \quad (5.26)$$

$$\oint_{S_1} v_i \sigma_{ij} n_j da = \int_V \sigma_{ij} D_{ij} dV$$

pois a velocidade em  $S_2$  é nula. Por outro lado  $\sigma_{ij} D_{ij} = [-p\delta_{ij} + 2\mu D_{ij}] D_{ij} = -p D_{ii} + 2\mu D_{ij} D_{ij} = 2\mu D_{ij} D_{ij}$  que nos fornece o resultado:

$$\oint_{S_1} v_i \sigma_{ij} n_j da = 2\mu \int_V D_{ij} D_{ij} dV \quad (5.27)$$

A interpretação do teorema é que a potência fornecida pela força externa  $\oint_{S_1} v_i \sigma_{ij} n_j da = - \int_V v_i f_i^{ext} da$  é igual à potência dissipada pelo sistema  $2\mu \int_V D_{ij} D_{ij} dV$ , visto que não há acumulação de energia cinética.

#### 5.4.9.B Teorema da Unicidade

Suponha dois campos de velocidade  $v_i$  e  $v'_i$  que satisfazem as equações de “creeping motion” e as mesmas condições de contorno. Então podemos dizer que as soluções desse problema são iguais. Para provar partimos de

$$I = \int_V (D'_{ij} - D_{ij})(D'_{ij} - D_{ij}) dV = \int_V [\partial_j (v'_i - v_i)](D'_{ij} - D_{ij}) dV \quad (5.28)$$

usando a técnica de integrais por partes,

$$\partial_j [(v'_i - v_i)(D'_{ij} - D_{ij})] = \partial_j [(v'_i - v_i)](D'_{ij} - D_{ij}) + (v'_i - v_i) \partial_j (D'_{ij} - D_{ij}) \quad (5.29),$$

transformamos a integral no volume em integrais de superfície

$$I = \int_V \partial_j [(v'_i - v_i)(D'_{ij} - D_{ij})] dV - \int_V (v'_i - v_i) \partial_j (D'_{ij} - D_{ij}) dV =$$

$$= \oint_S (v'_i - v_i)(D'_{ij} - D_{ij}) n_j da + \int_V (v'_i - v_i) \partial_j (D'_{ij} - D_{ij}) dV \quad (5.30)$$

Em  $S$   $v_i = v'_i$  anulando a integral de superfície. Para o outro termo utilizamos as equações de “creeping motion”

$$\partial_j \sigma_{ij} = 0 \Rightarrow \partial_j [-p \delta_{ij} + 2\mu D_{ij}] = -\partial_i p + 2\mu \partial_j D_{ij} = 0 \Rightarrow \partial_j D_{ij} = \frac{1}{2\mu} \partial_i p \quad (5.31)$$

Assim,  $I = -\frac{1}{2\mu} \int_V (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) \partial_i (p' - p) dV$ . Usando a mesma técnica anterior:

$$\partial_i [(\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i)(p' - p)] = \partial_i [(\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i)](p' - p) + (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) \partial_i (p' - p).$$

Mas  $\partial_i (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) = \partial_i \mathbf{v}'_i - \partial_i \mathbf{v}_i = 0$  logo  $I = -\frac{1}{2\mu} \int_S (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) (p' - p) n_j da = 0$  pelas condições na superfície. Por outro lado:

$$I = \int_V (D'_{ij} - D_{ij})(D'_{ij} - D_{ij}) dV = 0 \Rightarrow D'_{ij} = D_{ij} \quad \forall \vec{r} \in V \quad (5.32)$$

e provamos a unicidade.

#### 5.4.9.C Teorema da Dissipação Mínima

Vamos supor agora dois campos de velocidades  $\mathbf{v}_i$  e  $\mathbf{v}'_i$  em que  $\mathbf{v}_i$  satisfaz as equações de “creeping motion” mas  $\mathbf{v}'_i$  satisfaz apenas a continuidade da massa, i.e.,  $\partial_i \mathbf{v}'_i = 0$ . Além disso, a região de interesse está delimitada pelas superfícies  $S_1$ , na qual  $\mathbf{v}_i = \mathbf{v}'_i$ , e por  $S_2$ , na qual  $\mathbf{v}_i = \mathbf{v}'_i = 0$ . O teorema da Dissipação Mínima afirma que a menor dissipação possível é para o escoamento que satisfaz as equações de “creeping motion”. A demonstração é semelhante à do teorema da Unicidade. Vamos partir de:

$$(\partial_j \mathbf{v}'_i - \partial_j \mathbf{v}_i) D_{ij} = [D'_{ij} + W'_{ij} - D_{ij} - W_{ij}] D_{ij} = (D'_{ij} - D_{ij}) D_{ij} \quad (5.33)$$

usando a contração de tensores simétricos com antisimétricos novamente. Por outro lado, com os resultados anteriores, podemos colocar esses termos na forma própria para usar o teorema da divergência:

$$\begin{aligned} [\partial_j (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i)] D_{ij} &= \partial_j [(\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) D_{ij}] - \frac{1}{2\mu} (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) \partial_i p \\ \partial_i [(\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) p] &= (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) \partial_i p \quad \therefore \\ [\partial_j (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i)] D_{ij} &= \partial_j [(\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) D_{ij}] - \frac{1}{2\mu} \partial_i [(\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) p] \end{aligned} \quad (5.34)$$

Assim:

$$\begin{aligned} \int_V (D'_{ij} - D_{ij}) D_{ij} dV &= \oint_{S_1} (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) D_{ij} n_j da - \oint_{S_2} (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) D_{ij} n_j da \\ &\quad - \frac{1}{2\mu} \oint_{S_1} (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) p n_i da + \frac{1}{2\mu} \oint_{S_2} (\mathbf{v}'_i - \mathbf{v}_i) p n_i da = 0 \end{aligned} \quad (5.35)$$

pois em  $S_1$   $v_i = v'_i$  e em  $S_2$  ambos são nulos. Agora, a dissipação do escoamento  $v'_i$  vale:

$$\begin{aligned} E(\vec{v}') &= 2\mu \int_V D'_{ij} D'_{ij} dV = 2\mu \int_V [D'_{ij} D'_{ij} - (D'_{ij} - D_{ij})(D'_{ij} - D_{ij})] dV = \\ &= 2\mu \int_V D_{ij} D_{ij} dV + 2\mu \int_V (D'_{ij} - D_{ij})(D'_{ij} - D_{ij}) dV \end{aligned} \quad (5.36)$$

Isso significa que  $E(\vec{v}') = E(\vec{v}) + C$  e  $C \geq 0 \quad \therefore E(\vec{v}') \geq E(\vec{v})$ . A menor dissipação é a do movimento de “creeping motion”.

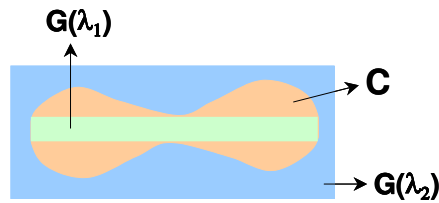
### 5.1.9.D Geometria Equivalente

Vamos supor um escoamento de Stokes devido um corpo  $C_1$ , limitado pela superfície  $S_1$ , com velocidade  $U$ , i.e.  $v_i(S_1) = U$ , limitado pela superfície  $S$  na qual  $v_i = 0$ . Vamos tomar outro corpo  $C_2$  com a mesma velocidade  $U$ , mas agora limitado por  $S_2$ , de tal forma que o corpo  $C_1$  está contido em  $S_2$ . A mesma superfície  $S$  limita os escoamentos nos dois casos. O campo de velocidade  $v_1$  satisfaz as equações de “creeping motion” entre  $S_1$  e  $S$ . Já para o campo  $v_2$  vamos tomar uma velocidade que satisfaz as equações de “creeping motion” entre  $S_2$  e  $S$ , mas é constante e igual à  $U$  entre  $S_2$  e  $S_1$ . Isso significa que  $v_2$  não satisfaz as equações de “creeping motion” em todo o espaço, mas é solenoidal em todo ele. Logo as condições do teorema de Dissipação mínima são válidas e podemos afirmar que  $E(\vec{v}') \geq E(\vec{v})$ . Por outro lado  $E(\vec{v}') = 2\mu \int_{V > S_2} D'_{ij} D'_{ij} dV + 2\mu \int_{S_1 < V < S_2} D'_{ij} D'_{ij} dV$ , mas  $D'_{ij} = 0$  no volume entre  $S_1$  e  $S_2$  porque a velocidade é constante. Mas  $\int_V D_{ij} D_{ij} dV = \oint_S U_i \sigma_{ij} n_j da = U_i \oint_S \sigma_{ij} n_j da = U_i F_i$  o que significa que  $U_i F'_i \geq U_i F_i \quad \therefore F'_i \geq F_i$ . A conclusão é que se um corpo contém outro e ambos se deslocam com a mesma velocidade a força de arraste será maior para corpo que contém o outro.

Daqui, podemos perceber a geometria equivalente. Criamos um corpo com uma geometria  $G$  qualquer e um fator de escala  $\lambda$  que aumenta suas dimensões. A força de arraste será uma função contínua e crescente de  $\lambda$ ,  $F(\lambda)$ . Vamos considerar agora um corpo  $C$  de tal forma que  $C$  contém  $G(\lambda_1)$  e  $G(\lambda_2)$  contém  $C$ , conforme mostra a Figura



**128.** Então,  $F(\lambda_1) < F(C) < F(\lambda_2)$  e existe  $\lambda_{eq}$  de tal forma que  $F(\lambda_{eq}) = F(C)$ . Como a superfície externa  $S$  na qual a velocidade é nula não entrou no resultado para o cálculo da dissipação o  $\lambda_{eq}$  independe da mesma, o que nos fornece a seguinte estratégia para lidar com corpos de geometrias muito diferentes: 1. calcular a força de arraste para o corpo desejado em um escoamento infinito, sem paredes, bem mais fácil do que na presença das paredes. 2. Determinar o  $\lambda_{eq}$  no fluido infinito em comparação com um corpo com uma geometria em que se conheça a solução na presença das fronteiras  $S$ . 3. Usar esse mesmo  $\lambda_{eq}$  para o cálculo da força de arraste na presença da fronteira.



**Figura 128.** Geometria Equivalente.

Uma forma de justificar mais detalhadamente a aproximação da hemácia na sua forma bicôncava por um paralelepípedo de comprimento  $L$ , largura  $W$  e espessura  $\varepsilon$  desprezível, seria através do Teorema de Mínima Dissipação e da geometria equivalente.

#### 5.4.9. E Teorema Recíproco

Vamos considerar agora dois escoamentos entre as superfícies  $S_1$  e  $S_2$  no qual ambos satisfazem as equações de “creeping motion”, ambos são nulos em  $S_2$ , mas que não satisfazem as mesmas condições de contorno em  $S_1$ . Então percebe-se que  $\sigma'_{ij}D_{ij} = [-p'\delta_{ij} + 2\mu D'_{ij}]D_{ij} = -p'D_{ii} + 2\mu D'_{ij}D_{ij} = 2\mu D'_{ij}D_{ij}$  que será o mesmo trocando a linha de lugar, levando a  $\sigma'_{ij}D_{ij} = \sigma_{ij}D'_{ij}$ . Agora

$$\partial_j(\sigma'_{ij}v_i) = (\partial_j\sigma'_{ij})v_i + \sigma'_{ij}\partial_jv_i = \sigma'_{ij}(D_{ij} + W_{ij}) = \sigma'_{ij}D_{ij} \text{ e também } \partial_j(\sigma_{ij}v'_i) = \sigma_{ij}D'_{ij}.$$

Logo,

$$\begin{aligned} \int_V \partial_j(\sigma'_{ij}v_i) dV &= \int_V \partial_j(\sigma_{ij}v'_i) dV \\ \oint_{S_1} v_i \sigma'_{ij} n_j da - \oint_{S_2} v_i \sigma'_{ij} n_j da &= \oint_{S_1} v'_i \sigma_{ij} n_j da - \oint_{S_2} v'_i \sigma_{ij} n_j da \end{aligned} \quad (5.37).$$

Como  $v_i$  e  $v'_i$  são nulos em  $S_2$ :

$$\oint_{S_1} v_i \sigma'_{ij} n_j da = \oint_{S_1} v'_i \sigma_{ij} n_j da$$

ou

$$\oint_{S_1} v_i f'_i da = \oint_{S_1} v'_i f_i da \quad (5.38)$$

#### 5.4.10 Presença de Singularidades ou Funções de Green

Vamos considerar o problema do escoamento devido a uma força pontual em um meio infinito, cujas equações são:

$$\begin{aligned} \partial_j \sigma_{ij} &= -f_i \delta(\vec{r} - \vec{r}') \\ \sigma_{ij} &= -p \delta_{ij} + 2\mu D_{ij} \\ \partial_i v_i &= 0 \end{aligned} \quad (5.39)$$

Pode-se verificar que uma solução dessas equações, conhecida como Stokeslet, é dada por:

$$\begin{aligned} \vec{v}(\vec{r}, \vec{f}) &= \frac{1}{8\pi\mu} \left[ \frac{\vec{f}}{R} + \frac{(\vec{f} \cdot \vec{R})\vec{R}}{R^3} \right] \\ p(\vec{r}, \vec{f}) &= \frac{1}{4\pi} \frac{\vec{f} \cdot \vec{R}}{R^3} \\ \sigma_{ij}(\vec{r}, \vec{f}) &= -\frac{(\vec{f} \cdot \vec{R})R_i R_j}{R^5} \end{aligned} \quad (5.40)$$

onde  $\vec{R} = \vec{r} - \vec{r}'$  e  $R = ||\vec{R}||$

Claro que  $\vec{v}(\vec{r} - \vec{h}, \vec{f})$  e  $p(\vec{r} - \vec{h}, \vec{f})$  também são soluções e, dessa forma, podemos escrever cada um dos termos da expansão em série de Taylor dessas funções em termos de  $h$ , ou seja,

$$\vec{v}(\vec{r} - \vec{h}, \vec{f}) = \sum_n (-1)^n \frac{(\vec{h} \cdot \nabla)^n}{n!} \vec{v}(\vec{r}, \vec{f}) \quad \text{e} \quad p(\vec{r} - \vec{h}, \vec{f}) = \sum_n (-1)^n \frac{(\vec{h} \cdot \nabla)^n}{n!} p(\vec{r}, \vec{f}) \quad (5.41).$$

O primeiro termo na expansão é chamado de Doublet e é dado por:

$$\begin{aligned} \vec{v}_D(\vec{r}, \vec{f}, \vec{h}) &= \frac{1}{8\pi\mu} \left\{ \frac{(\vec{f} \times \vec{h}) \times \vec{R}}{R^3} - \left[ \frac{(\vec{f} \cdot \vec{h})\vec{R}}{R^3} - \frac{3(\vec{f} \cdot \vec{R})(\vec{h} \cdot \vec{R})\vec{R}}{R^5} \right] \right\} \\ p_D(\vec{r}, \vec{f}, \vec{h}) &= -\frac{1}{4\pi} \left[ \frac{(\vec{f} \cdot \vec{h})}{R^3} - \frac{3(\vec{f} \cdot \vec{R})(\vec{h} \cdot \vec{R})}{R^5} \right] \end{aligned} \quad (5.42)$$

de onde percebemos que a velocidade tem dois termos com simetrias diferentes, um antisimétrico por causa do produto vetorial e o outro simétrico, já a pressão é totalmente simétrica. Por isso se quebra o Doublet em duas contribuições, o Stresslet, simétrico, e o Rotlet, antisimétrico:

$$\begin{aligned}\vec{v}_{ss}(\vec{r}, \vec{f}, \vec{h}) &= -\frac{1}{8\pi\mu} \left[ \frac{(\vec{f} \cdot \vec{h})}{R^3} - \frac{3(\vec{f} \cdot \vec{R})(\vec{h} \cdot \vec{R})}{R^5} \right] \vec{R} \\ p_{ss}(\vec{r}, \vec{f}, \vec{h}) &= -\frac{1}{4\pi} \left[ \frac{(\vec{f} \cdot \vec{h})}{R^3} - \frac{3(\vec{f} \cdot \vec{R})(\vec{h} \cdot \vec{R})}{R^5} \right]\end{aligned} \quad (5.43)$$

e

$$\vec{v}_{sr}(\vec{r}, \vec{f}, \vec{h}) = \frac{1}{8\pi\mu} \frac{(\vec{f} \times \vec{h}) \times \vec{R}}{R^3} = \frac{1}{8\pi\mu} \frac{\vec{\Omega} \times \vec{R}}{R^3} \text{ com } \vec{\Omega} = \vec{f} \times \vec{h} \text{ e } p_{sr}(\vec{r}, \vec{f}, \vec{h}) = 0 \quad (5.44)$$

A Figura 129 a mostra uma representação pictorial entre o Doublet, o Stresslet e o Rotlet. Nela se percebe que no Stresslet não há torque nem força resultante, só tensão, já no rotlet não há força resultante, mas existe torque. Se os vetores  $\vec{h}$  e  $\vec{f}$  são paralelos, i.e.,  $\vec{h} // \vec{f}$  o rotlet será naturalmente nulo, na forma representada na Figura 129 b. Os próximos termos na expansão dão origem a quadrupólos e outras ordens superiores envolvendo expressão algébricas cada vez mais complicadas. Existe, entretanto, ainda um termo simples que pode ser extraído do Stokeslet, chamado de Source Doublet, Potential Doublet ou Double Layer Potential, obtido aplicando o laplaciano na solução do Stokeslet. Em lugar de aplicar diretamente o laplaciano na velocidade entretanto é mais simples usar o fato de que  $\nabla^2 \vec{v} = \frac{1}{\mu} \nabla p$  e aplicar o gradiente diretamente no  $p$  do Stokeslet para obter

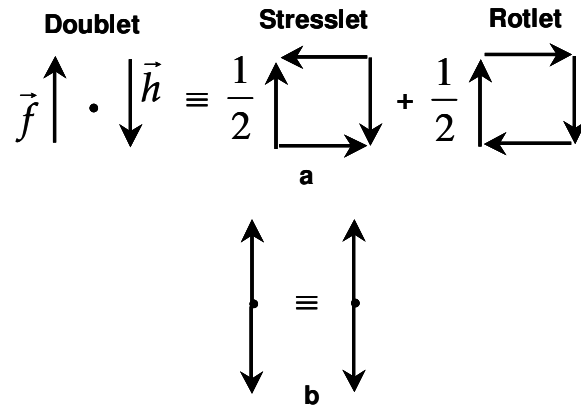
$$\vec{v}_{sd}(\vec{r}, \vec{f}) = \frac{2}{8\pi\mu} \left[ \frac{\vec{f}}{R^3} - \frac{3(\vec{f} \cdot \vec{R})\vec{R}}{R^5} \right] \quad (5.45).$$

A semelhança do Source Doublet com o Stokeslet, diferindo na potência do denominador o torna muito útil para geometrias esféricas. Por exemplo, a lei de Stokes para uma esfera de raio  $a$  em um meio infinito sai facilmente se percebemos que podemos usar um Stokeslet e um Source Doublet centrados na origem para satisfazer as

condições de contorno de velocidade constante na superfície da mesma. Neste caso queremos encontrar duas constantes  $\alpha$  e  $\beta$  que garantam

$$v_i = \alpha \left[ \frac{F_i}{a} + \frac{(\vec{F} \cdot \vec{R})x_i}{a^3} \right] + \beta \left[ -\frac{F_i}{a^3} + \frac{3(\vec{F} \cdot \vec{R})x_i}{a^5} \right] \quad (5.46).$$

Percebe-se que  $\beta = -\frac{a^2}{3}\alpha$  cancela os termos com  $\vec{F} \cdot \vec{R}$  e fornece  $v_i = \alpha \frac{4F_i}{3a}$  e usando o fato de que  $\alpha = \frac{1}{8\pi\mu}$  chegamos a  $\vec{F} = 6\pi\mu a \vec{v}$ , a lei de Stokes [85].



**Figura 129.** **a.** Ilustração de Doublet, Stresslet e Rotlet. **b.**  $h$  e  $f$  são paralelos.

## *Capítulo 6*

### *Conclusão e Perspectivas*

O trabalho desenvolvido ao longo do Doutorado abriu diversas perspectivas para novas pesquisas. O fato de incorporarmos a capacidade de espectroscopias lineares e não lineares nos forneceu um horizonte muito vasto, impossível de ser explorado em uma única Tese. A observação das ressonâncias de Mie em microesferas capturadas e a medida da intensidade da força óptica em função da posição do centro da partícula ao foco do laser e da polarização nos fez pensar sobre os métodos de calibração e sobre a Teoria de pinça óptica. As oscilações vistas nos gráficos da seção 3.2.5.2 não são explicadas por nenhum modelo óptico, abrindo a possibilidade de aplicação de novos modelos de feixes incidentes incluindo, por exemplo, efeitos de difração, já que experimentalmente o feixe do laser não é nem muito menor e nem tão maior que o diâmetro da objetiva. Esses resultados também nos levam a um estudo mais detalhado do papel da polarização em uma pinça óptica.

Outro ponto importante seria realizar uma calibração anisotrópica da pinça óptica. Até o momento temos uma calibração para a força óptica do plano e não para a força em  $z$ . A força que o laser exerce sobre uma partícula é menos intensa na direção de

propagação  $z$  do que na direção perpendicular. Isso significa que quando aprisionamos microorganismos flagelados eles tenderão a se deslocar mais na direção  $z$ , onde a força óptica é menor, do que nas outras. Para quantificar esse movimento precisamos de uma calibração da força nessa direção. O sistema ideal seria capaz de quantificar o deslocamento nas 3 direções e medir a intensidade, direção e sentido do vetor força. Essa calibração se torna necessária para estudos quantitativos de movimentos de microorganismos aprisionados.

O nosso sistema de pinça óptica acoplado à espectroscopia demonstrou a capacidade de obter os mais variados espectros. Isso abriu a possibilidade de realizar microscopias com esse mesmo sistema usando linhas espectroscópicas específicas. Para tanto, é necessário associar a intensidade da linha com a posição do laser de excitação. Nosso sistema atual de varredura será lento, pois o estágio de translação tem massa grande, mas isso não seria o problema para amostras estáticas. Isso nos permitirá obtenção de imagens tanto através da luminescência excitada por dois fótons como por Hiper Rayleigh ou Hiper Raman. No caso do Hiper Raman, por exemplo, o tempo de integração será maior do que o tempo de varredura, não importando muito a velocidade da mesma. Imagens construídas a partir do SHG estão começando a ser usadas na Biomedicina. Uma forma de aumentar a velocidade de imagens em linhas de Raman é o uso da técnica chamada CARS – “Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy” que amplifica consideravelmente a intensidade do sinal, com a conseqüente diminuição do tempo de aquisição. O CARS é feito usando-se 2 lasers que têm suas frequências sintonizadas de forma que a diferença entre elas seja igual à frequência de um modo de vibração da molécula em questão.

A pinça dupla nos mostrou que é possível utilizá-la no estudo, de grande importância biológica, dos processos de adesão de eritrócitos. Até o momento não existe uma medida absoluta desse fator. Quantificar essa adesão poderia ajudar a explicar a natureza da ligação hemácia-hemácia tanto no sentido biológico como químico e colaboraria para garantir a qualidade de transfusões, no estudo de doenças e na

validade dos modelos empregados no dia a dia de um banco de sangue. Poderíamos quantificar essa adesão acoplando as hemácias em microesferas cujo deslocamento nos permitiria calibrar o valor da força. Para isso, é necessário funcionalizar as microesferas garantindo sua ligação com as hemácias.

A calibração da medida de forças e de elasticidade nos levou ao estudo da hidrodinâmica no regime conhecido como o “creeping motion”. Afinal, os microorganismos vivem em um universo sem inércia de baixos números de Reynolds e qualquer aspecto de sua mecânica, como as técnicas ópticas se propõem a fazer, só pode ser completamente entendido com o conhecimento dessa hidrodinâmica. Apesar de mais de um século dos trabalhos de Stokes e outros grandes nomes da hidrodinâmica, o fato é que não encontramos desenvolvimentos teóricos prontos na literatura para as forças hidrodinâmicas na presença de duas paredes, a não ser no caso de esferas. Trabalhos de matemáticos nessa área estão aparecendo em 2000 e 2001. Novos desenvolvimentos na microscopia e microbiologia, incluindo a pinça óptica, trazem incentivos para a solução desses problemas. A maior distância de uma partícula capturada pela pinça óptica a uma parede é a “working distance” das objetivas de 100 X dos microscópios ópticos, que é da ordem de 200  $\mu\text{m}$ . Muitas das nossas medidas são realizadas em uma câmara de Neubauer. Para um bom aproveitamento da pinça óptica é fundamental uma maior compreensão da hidrodinâmica envolvida. Além do estudo teórico e do seu papel na medida de forças e elasticidades, também podemos usar a pinça óptica para compreender e validar modelos de dinâmica de fluidos, tais como interação entre micropartículas.

Quanto mais estudamos e compreendemos os fenômenos envolvidos, mais idéias e novas aplicações surgem para ser colocadas em prática. Todo o trabalho dessa Tese nos ensinou que, no campo de pesquisa da pinça óptica, estamos apenas no início. Cada novo desenvolvimento só amplia as possibilidades de sua utilização.





## *Apêndice 1*

# 1. Prova de que os operadores $\nabla$ , $\vec{L}$ e $\nabla \times \vec{L}$ comutam com o $\nabla^2$ :

Vamos mostrar que os operadores  $\nabla$ ,  $\vec{L}$  e  $\nabla \times \vec{L}$  comutam com o  $\nabla^2$ , usando a notação tensorial de Einstein em que índices repetidos significa soma nos mesmos, os tensores de Levi-Civita  $\varepsilon_{ijk} = 1$  para  $ijk = 123, 312$  e  $231$ ;  $\varepsilon_{ijk} = -1$  para  $ijk = 213, 321$  e  $132$ ; e  $\varepsilon_{ijk} = 0$  para quaisquer índices repetidos e o delta de Kronecker  $\delta_{ij} = 1$  se  $i = j$  e  $\delta_{ij} = 0$  se  $i \neq j$ , obtemos:

a.  $\nabla \nabla^2 = \vec{e}_i \partial_i \partial_j \partial_j = \partial_j \partial_j (\vec{e}_i \partial_i) = \nabla^2 \nabla$

b.  $\vec{L} = -i \vec{r} \times \nabla = -i \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} x_k \partial_l \Rightarrow \nabla^2 \vec{L} = \partial_m \partial_m (-i \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} x_k \partial_l) \Rightarrow$

$$\nabla^2 \vec{L} = -i \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} \partial_m \partial_m (x_k \partial_l) = -i \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} [2\delta_{m,k} \partial_m \partial_l + x_k \partial_l \partial_m \partial_m].$$

Se o tensor  $S_{ij}$  é simétrico, i.e.,  $S_{i,j} = S_{j,i}$ , então  $\varepsilon_{ijk} S_{ij} = 0$ , pois  $\varepsilon_{ijk} S_{ij} = \varepsilon_{jik} S_{ji}$  por simples troca de letras e  $\varepsilon_{ijk} S_{ij} = \varepsilon_{jik} S_{ji} = -\varepsilon_{ijk} S_{ij}$  pela antisimetria do  $\varepsilon$  e simetria de  $S$ , logo  $2\varepsilon_{ijk} S_{ij} = 0$ . Dessa forma  $\varepsilon_{jkl} \partial_k \partial_l = 0$  levando a  $\nabla^2 \vec{L} = -i \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} x_k \partial_l \partial_m \partial_m = \vec{L} \nabla^2$ .

c.  $\nabla \times \vec{L} = \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} \partial_k L_l = \vec{e}_j \varepsilon_{jkl} \partial_k [-i \varepsilon_{lmn} x_m \partial_n] = -i \vec{e}_j [\varepsilon_{ljk} \varepsilon_{lmn}] \partial_k (x_m \partial_n)$ . Aqui usamos a identidade  $\varepsilon_{ljk} \varepsilon_{lmn} = \delta_{jm} \delta_{kn} - \delta_{jn} \delta_{km}$  obtendo  $\nabla \times \vec{L} = -i \vec{e}_j [\delta_{jm} \delta_{kn} - \delta_{jn} \delta_{km}] \partial_k (x_m \partial_n)$  que, na contração com as  $\delta$ 's, se transforma em  $\nabla \times \vec{L} = -i \vec{e}_j [\partial_k (x_j \partial_k) - \partial_k (x_k \partial_j)]$ . Desenvolvendo, obtemos  $\nabla \times \vec{L} = -i \vec{e}_j [x_j \partial_k \partial_k + \delta_{kj} \partial_k - x_k \partial_k \partial_j - \partial_j (\partial_k x_k)]$  que é transformado em

$$\nabla \times \vec{L} = -i \vec{e}_j [x_j \partial_k \partial_k + \partial_j - x_k \partial_k \partial_j - 3\partial_j],$$

pois  $\partial_k x_k = \sum_{k=1}^3 \frac{\partial x_k}{\partial x_k} = \sum_{k=1}^3 1 = 3$ . Portanto,  $\nabla \times \vec{L} = i [2\vec{e}_j \partial_j - \vec{e}_j x_j \partial_k \partial_k + x_k \partial_k (\vec{e}_j \partial_j)]$ , ou seja,

$\nabla \times \vec{L} = i [2\nabla - \vec{r} \nabla^2 + (\vec{r} \cdot \nabla) \nabla]$ . Aplicando o Laplaciano  $\nabla^2 \nabla \times \vec{L} = \partial_m \partial_m \nabla \times \vec{L}$  obtemos  $\nabla^2 \nabla \times \vec{L} = i [2(\vec{e}_j \partial_j) \partial_m \partial_m - \partial_m \partial_m (\vec{e}_j x_j) (\partial_k \partial_k) + \partial_m \partial_m (x_k \partial_k) (\vec{e}_j \partial_j)]$ . Agora é só separar os termos em que a derivada  $\partial_m$  se aplica em  $x$  dos outros para obter  $\nabla^2 \nabla \times \vec{L} = i [2\vec{e}_j \partial_j - (\vec{e}_j x_j \partial_k \partial_k) + (x_k \partial_k) (\vec{e}_j \partial_j)] \partial_m \partial_m + \partial_m (\delta_{mk} \partial_k) (\vec{e}_j \partial_j) - \partial_m (\vec{e}_j \delta_{mj}) (\partial_k \partial_k)$  que

vira  $\nabla^2 \nabla \times \vec{L} = i [2\vec{e}_j \partial_j - (\vec{e}_j x_j \partial_k \partial_k) + (x_j \partial_j) (\vec{e}_j \partial_j)] \partial_m \partial_m = (\nabla \times \vec{L}) \nabla^2$  uma vez que

$\partial_m(\delta_{mk}\partial_k)(\vec{e}_j\partial_j) - \partial_m(\vec{e}_j\delta_{mj})(\partial_k\partial_k) = \vec{e}_j\partial_j\partial_k\partial_k - \vec{e}_j\partial_j\partial_k\partial_k = 0$ . Dessa forma, mostramos que os operadores  $\nabla$ ,  $\vec{L}$  e  $\nabla \times \vec{L}$  comutam com o  $\nabla^2$  e as funções vetoriais  $\vec{A} = \nabla\phi$ ,  $\vec{D} = \vec{L}\phi$  e  $\vec{F} = (\nabla \times \vec{L})\phi$  satisfazem a equação diferencial vetorial.

**2. Prova de que as funções  $\Psi_{nm}$  construídas a partir dos harmônicos esféricos são ortogonais entre si:**

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{enm} | \Psi_{en'm'} \rangle &= (-1)^{m+m'} \sqrt{\frac{\pi}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!}} \sqrt{\frac{\pi}{2n'+1} \frac{(n'+m')!}{(n'-m')!}} \langle Y_n^m + (-1)^m Y_n^{-m} | Y_{n'}^{m'} + (-1)^{m'} Y_{n'}^{-m'} \rangle \\ &= (-1)^{m+m'} \sqrt{\frac{\pi}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!}} \sqrt{\frac{\pi}{2n'+1} \frac{(n'+m')!}{(n'-m')!}} \{ \delta_{nn'} \delta_{mm'} + (-1)^{m+m'} \delta_{nn'} \delta_{mm'} \} = \frac{2\pi}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \delta_{nn'} \delta_{mm'} \end{aligned}$$

e o mesmo vale para a função par  $\Psi_{onm}$ . Também,

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{onm} | \Psi_{en'm'} \rangle &= i(-1)^{m+m'} \sqrt{\frac{\pi}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!}} \sqrt{\frac{\pi}{2n'+1} \frac{(n'+m')!}{(n'-m')!}} \langle Y_n^m - (-1)^m Y_n^{-m} | Y_{n'}^{m'} + (-1)^{m'} Y_{n'}^{-m'} \rangle \\ &= i(-1)^{m+m'} \sqrt{\frac{\pi}{2l+1} \frac{(l+m)!}{(l-m)!}} \sqrt{\frac{\pi}{2n'+1} \frac{(n'+m')!}{(n'-m')!}} \{ \delta_{nn'} \delta_{mm'} - (-1)^{m+m'} \delta_{nn'} \delta_{mm'} \} = 0 = \langle \Psi_{enm} | \Psi_{on'm'} \rangle \end{aligned}$$

**3. Cálculo de  $\vec{M}$  e  $\vec{N}$ :**

Temos que  $\vec{L} = i[\frac{\hat{e}_\theta}{\sin\theta} \frac{\partial}{\partial\phi} - \hat{e}_\phi \frac{\partial}{\partial\theta}]$  e sendo  $\vec{M}_{nm} = \frac{1}{i} Z_n(kr) \vec{L} \Psi_{nm}$

$$\begin{aligned} \vec{M}_{enm} &= \frac{1}{i} Z_n(\rho) \vec{L} \Psi_{enm} = \frac{1}{i} Z_n(\rho) i [\frac{\hat{e}_\theta}{\sin\theta} \frac{\partial}{\partial\phi} - \hat{e}_\phi \frac{\partial}{\partial\theta}] P_n^m(\cos\theta) \cos m\phi \\ &= \{ \frac{-m \sin m\phi}{\sin\theta} P_n^m(\cos\theta) Z_n(\rho) \hat{e}_\theta - \cos m\phi \frac{dP_n^m(\cos\theta)}{d\theta} Z_n(\rho) \hat{e}_\phi \} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \vec{M}_{onm} &= \frac{1}{i} Z_n(\rho) \vec{L} \Psi_{onm} = \frac{1}{i} Z_n(\rho) i [\frac{\hat{e}_\theta}{\sin\theta} \frac{\partial}{\partial\phi} - \hat{e}_\phi \frac{\partial}{\partial\theta}] P_n^m(\cos\theta) \sin m\phi \\ &= \{ \frac{-m \cos m\phi}{\sin\theta} P_n^m(\cos\theta) Z_n(\rho) \hat{e}_\theta - \sin m\phi \frac{dP_n^m(\cos\theta)}{d\theta} Z_n(\rho) \hat{e}_\phi \} \end{aligned}$$

Lembrando que  $\vec{N}_{nm} = \frac{1}{ik} \nabla \times [Z_n(kr) \vec{L} \Psi_{nm}] = \frac{1}{k} \nabla \times \vec{M}_{nm}$ ,

$$\begin{aligned}
\nabla \times \vec{M}_{enm} &= \frac{1}{k} \frac{1}{r^2 \sin\theta} \begin{bmatrix} \hat{e}_r & r\hat{e}_\theta & r \sin\theta \hat{e}_\phi \\ \partial r & \partial\theta & \partial\phi \\ 0 & -\frac{m \sin m\phi}{\sin\theta} P_n^m(\cos\theta) Z_n(\rho) & -\cos m\phi \frac{dP_n^m(\cos\theta)}{d\theta} Z_n(\rho) \end{bmatrix} = \\
&= \frac{1}{k} \frac{1}{r^2 \sin\theta} \{ \\
&[-r Z_n(\rho) \cos m\phi \frac{d}{d\theta} [\sin\theta \frac{dP_n^m}{d\theta}] + \frac{r m \cos m\phi Z_n(\rho) P_n^m}{\sin\theta} \} \hat{e}_r + r \sin\theta \cos m\phi [\frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\theta \\
&- r \sin\theta [\frac{m \sin m\phi P_n^m}{\sin\theta} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\phi \} = \\
&= \frac{r Z_n(\rho)}{k r^2} \cos m\phi [-\frac{1}{\sin\theta} \frac{d}{d\theta} [\sin\theta \frac{dP_n^m}{d\theta} + \frac{m^2 P_n^m}{\sin^2\theta}] \hat{e}_r + \cos m\phi \frac{dP_n^m}{d\theta} [\frac{1}{kr} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\theta \\
&- \frac{m \sin m\phi P_n^m}{\sin\theta} [\frac{1}{kr} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\phi
\end{aligned}$$

usando a equação diferencial dos polinômios associados de Legendre,

$$\vec{N}_{enm} = \frac{r Z_n(\rho)}{k r^2} \cos m\phi n(n+1) P_n^m \hat{e}_r + \cos m\phi \frac{dP_n^m}{d\theta} [\frac{1}{\rho} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\theta - \frac{m \sin m\phi P_n^m}{\sin\theta} [\frac{1}{\rho} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\phi$$

Analogamente:

$$\vec{N}_{onm} = \frac{r Z_n(\rho)}{k r^2} \sin m\phi n(n+1) P_n^m \hat{e}_r + \sin m\phi \frac{dP_n^m}{d\theta} [\frac{1}{\rho} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\theta - \frac{m \cos m\phi P_n^m}{\sin\theta} [\frac{1}{\rho} \frac{d[r Z_n(\rho)]}{dr}] \hat{e}_\phi$$

**4. Prova da relação**  $\vec{H} = \sum -\frac{i\varepsilon\omega}{k} A_{nm} \vec{M}_{nm} - \frac{ik}{\mu\omega} B_{nm} \vec{N}_{nm}$ :

Vamos escrever o campo elétrico como:  $\vec{E} = \sum A_{nm} \vec{M}_{nm} + B_{nm} \vec{N}_{nm}$ . No caso TE,

$$\vec{E} = \sum A_{nm} \vec{M}_{nm} \text{ e } \vec{H} = \sum -\frac{i}{\mu\omega} A_{nm} \nabla \times \vec{M}_{nm} = \sum -\frac{ik}{\mu\omega} A_{nm} \frac{\nabla \times \vec{M}_{nm}}{k} = \sum -\frac{ik}{\mu\omega} A_{nm} \vec{N}_{nm}.$$

No caso TM,

$$\vec{H} = \sum C_{nm} \vec{M}_{nm} \text{ e } \vec{E} = \sum \frac{i}{\varepsilon\omega} C_{nm} \nabla \times \vec{M}_{nm} = \sum \frac{ik}{\varepsilon\omega} C_{nm} \frac{\nabla \times \vec{M}_{nm}}{k} = \sum \frac{ik}{\varepsilon\omega} C_{nm} \vec{N}_{nm}$$

$$\vec{H} = \sum -\frac{ik}{\mu\omega} A_{nm} \vec{N}_{nm} - \frac{i\varepsilon\omega}{k} B_{nm} \vec{N}_{nm} \text{ mas,}$$

$$\vec{E} = \sum B_{nm} \vec{N}_{nm} \Rightarrow B_{nm} \vec{N}_{nm} = \frac{ik}{\varepsilon\omega} C_{nm} \vec{N}_{nm} \Rightarrow C_{nm} = -\frac{i\varepsilon\omega}{k} B_{nm} \Rightarrow \vec{H} = \sum -\frac{i\varepsilon\omega}{k} B_{nm} \vec{N}_{nm}$$

então:

$$\vec{H} = \sum -\frac{ik}{\mu\omega} A_{nm} \vec{N}_{nm} - \frac{i\varepsilon\omega}{k} B_{nm} \vec{N}_{nm}$$

### 5. Cálculo de $\vec{r} \cdot \vec{E}$ e $\vec{r} \cdot \vec{H}$ :

$$\vec{r} \cdot \vec{E} = \sum A_{nm} \vec{r} \cdot \vec{M}_{nm} + B_{nm} \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm} \text{ mas } \vec{r} \cdot \vec{M}_{nm} = \vec{r} \cdot \vec{L}\psi_{nm} = 0 \text{ então } \vec{r} \cdot \vec{E} = \sum B_{nm} \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm}$$

$$\text{e } \vec{r} \cdot \vec{H} = \sum A_{nm} \frac{-ik}{\mu\omega} \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm},$$

$$\begin{aligned} \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm} &= \frac{\vec{r}}{ik} \nabla \times [Z_n(\rho) \vec{L}\psi_{nm}] = \frac{\vec{r}}{ik} \{ \nabla Z_n(\rho) \times \vec{L}\psi_{nm} + Z_n(\rho) \nabla \times \vec{L}\psi_{nm} \} \\ &= \frac{\vec{r}}{ik} \left\{ \frac{Z_n(\rho)}{r} \vec{r} \times \vec{L}\psi_{nm} + Z_n(\rho) \nabla \times \vec{L}\psi_{nm} \right\} \end{aligned}$$

$$\text{mas, } \vec{r} \cdot [\vec{r} \times \vec{L}\psi_{nm}] = 0 \text{ então } \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm} = \frac{\vec{r}}{ik} Z_n(\rho) \nabla \times \vec{L}\psi_{nm} \text{ porém } \nabla \times \vec{L} = i[2\nabla - \vec{r}\nabla^2 + (\vec{r} \cdot \nabla)\nabla] \text{ e}$$

$$\vec{r} \cdot \nabla \times \vec{L} = i\{2(\vec{r} \cdot \nabla) + (\vec{r} \cdot \nabla)(\vec{r} \cdot \nabla) + r^2 \nabla^2\} \text{ sendo que } (\vec{r} \cdot \nabla)\psi_{nm} = 0 \text{ pois } \psi_{nm} \text{ não depende de } r.$$

Considerando que

$$\nabla^2 = r^2 \frac{\partial^2}{\partial r^2} - \frac{L^2}{r^2}, \quad \vec{r} \cdot \nabla \times \vec{L}\psi_{nm} = -ir^2 \nabla^2 \psi_{nm} = ir^2 \frac{L^2}{r^2} \psi_{nm} = in(n+1)\psi_{nm}$$

$$\text{temos } \vec{r} \cdot \vec{N}_{nm} = \frac{n(n+1)}{k} Z_n(\rho) \psi_{nm} \text{ e portanto}$$

$$\vec{r} \cdot \vec{E} = \sum \frac{n(n+1)}{k} Z_n(\rho) \psi_{nm} B_{nm} \text{ e } \vec{r} \cdot \vec{H} = \sum i\left(\frac{-ik}{\mu\omega}\right) \frac{n(n+1)}{k} Z_n(\rho) \psi_{nm} A_{nm}$$

### 6. Cálculo de integrais:

#### A. Integrais de seno e cosseno:

$$\int_0^{2\pi} \cos \varphi \cos m\varphi \, d\varphi = \int_0^{2\pi} \frac{1}{2} \{ \cos(m-1)\varphi + \cos(m+1)\varphi \} d\varphi = \pi \delta_{m1}$$

$$\int_0^{2\pi} \cos \varphi \sin m \varphi d\varphi = \int_0^{2\pi} \frac{1}{2} \{ \sin(m-1)\varphi + \sin(m+1)\varphi \} d\varphi = 0$$

$$\int_0^{2\pi} \cos m \varphi \cos m' \varphi d\varphi = \int_0^{2\pi} \frac{1}{2} \{ \cos(m-m')\varphi + \cos(m+m')\varphi \} d\varphi = \pi \delta_{mm'} + \pi \delta_{mm'} \delta_{m0}$$

$$= [1 + \delta_{m0}] \pi \delta_{mm'}$$

Analogamente:

$$\int_0^{2\pi} \sin \varphi \sin m \varphi d\varphi = \pi \delta_{m1}, \quad \int_0^{2\pi} \sin \varphi \cos m \varphi d\varphi = 0 \quad \text{e} \quad \int_0^{2\pi} \sin m \varphi \sin m' \varphi d\varphi = [1 - \delta_{m0}] \pi \delta_{mm'}$$

## B. Integraes por partes:

1.

$$Z_n(kr) B_{1n} = \frac{iE_0 \pi}{k} \frac{k(2n+1)}{(n+1)!} \frac{(n-1)!}{2\pi n(n+1)} \int_0^\pi \sin \theta P_n^1(\cos \theta) \left( \frac{d}{d\theta} e^{ikr \cos \theta} \right) d\theta$$

$$= \frac{iE_0 \pi}{k} \frac{k(2n+1)}{(n+1)!} \frac{(n-1)!}{2\pi n(n+1)} \left\{ \sin \theta P_n^1(\cos \theta) e^{ikr \cos \theta} \Big|_0^\pi - \int_0^\pi e^{ikr \cos \theta} \sin \theta P_n^1(\cos \theta) \left[ \frac{d}{d\theta} \sin \theta P_n^1(\cos \theta) \right] d\theta \right\}$$

$$Z_n(kr) B_{1n} = - \frac{iE_0 \pi}{k} \frac{k(2n+1)}{(n+1)!} \frac{(n-1)!}{2\pi n(n+1)} \int_0^\pi e^{ikr \cos \theta} \left[ \frac{d}{d\theta} \sin \theta P_n^1(\cos \theta) \right] d\theta$$

2.

$$\int_0^\pi \left\{ \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} + \frac{P_n^m P_{n'}^m}{\sin^2 \theta} \right\} \sin \theta d\theta = \int_0^\pi \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \sin \theta d\theta + \int_0^\pi \frac{P_n^m P_{n'}^m}{\sin^2 \theta} \sin \theta d\theta = \frac{dP_n^m}{d\theta} \sin \theta P_{n'}^m \Big|_0^\pi$$

$$- \int_0^\pi \frac{d}{d\theta} \left[ \frac{dP_n^m}{d\theta} \sin \theta \right] \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} P_{n'}^m d\theta + \int_0^\pi \frac{P_n^m P_{n'}^m}{\sin^2 \theta} \sin \theta d\theta = \int_0^\pi P_{n'}^m \left\{ - \frac{1}{\sin \theta} \frac{d}{d\theta} \left[ \sin \theta \frac{dP_n^m}{d\theta} \right] + \frac{P_n^m}{\sin^2 \theta} \right\} \sin \theta d\theta$$

$$= \int_0^\pi n(n+1) P_{n'}^m P_n^m \sin \theta d\theta = \frac{2n(n+1)}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \delta_{nn'}$$

3.

$$\int_0^\pi \left( \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} \frac{P_n^m}{\sin \theta} + \frac{dP_n^m}{d\theta} \frac{P_{n'}^m}{\sin \theta} \right) \sin \theta d\theta = \int_0^\pi \left( \frac{dP_{n'}^m}{d\theta} P_n^m + \frac{dP_n^m}{d\theta} P_{n'}^m \right) d\theta = P_{n'}^m P_n^m \Big|_0^\pi - \int_0^\pi \left( \frac{dP_n^m}{d\theta} P_{n'}^m \right) d\theta + \int_0^\pi \left( \frac{dP_n^m}{d\theta} P_{n'}^m \right) d\theta$$

$$= P_{n'}^m (-1) P_n^m (-1) - P_{n'}^m (1) P_n^m (1) = 0$$

pois  $P_{n'}^m(\pm 1) = 0$ .

## 7. Cálculo de $Q_{pr}$

Vamos agora calcular a seção de choque de pressão de radiação para onda plana.

O tensor de stress de Maxwell e a força são dados por:

$$T_{ij} = E_i D_j + H_i B_j - \frac{1}{2} (\vec{E} \cdot \vec{D} + \vec{H} \cdot \vec{B}) \delta_{ij}$$

$$F_i = \oint_S T_{ij} n_j da$$

onde  $S$  é qualquer superfície que engloba o objeto. Em particular podemos usar a superfície em  $r \rightarrow \infty$ . Como os campos podem ser complexos mas a força tem que ser real, temos que

$$F_i = \text{Re} \oint T_{ij} n_j da = \text{Re} \oint \left[ E_i D_j^* n_j + H_i B_j^* n_j - \frac{1}{2} (\vec{E} \cdot \vec{D}^* + \vec{H} \cdot \vec{B}^*) n_i \right] da$$

com,

$$\vec{n} = \hat{e}_r, \quad \vec{D}^* \cdot \vec{n} = \vec{D}_r^*, \quad \vec{B}^* \cdot \vec{n} = \vec{B}_r^* \quad \text{e} \quad da = r^2 \sin \theta d\theta d\varphi,$$

$$\text{onde } \hat{e}_r = \sin \theta \cos \varphi \hat{e}_x + \sin \theta \sin \varphi \hat{e}_y + \cos \theta \hat{e}_z$$

temos,

$$F_i = \text{Re} \oint \left\{ \epsilon_2 E_i E_r^* + \mu_2 H_i H_r^* - \frac{1}{2} [\epsilon \vec{E} \cdot \vec{E}^* + \mu \vec{H} \cdot \vec{H}^*] n_i \right\} da$$

Os componentes radiais dos campos, tanto incidente quanto espalhado, levam a função  $Z_n(\rho) / \rho \sim e^{\pm i\rho} / \rho^2$ . O elemento de área é proporcional a  $r^2$ , logo qualquer produto com uma das componentes radiais vai com  $F_r F_t \sim 1/\rho^3$  e  $F_r F_t \sim 1/\rho^4$ , assim as relações  $r^2 F_r F_t \sim 1/r$  e  $r^2 F_r F_t \sim 1/r^2$ , se anulam para  $r \rightarrow \infty$ . Dessa forma, os dois primeiros termos na integral  $E_i E_r^*$  e  $H_i H_r^*$  são nulos. Além disso, para  $r \rightarrow \infty$ :

$$\vec{E} \cdot \vec{E}^* = E_r E_r^* + E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^* = E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^* \quad \text{e} \quad \vec{H} \cdot \vec{H}^* = H_r H_r^* + H_\theta H_\theta^* + H_\varphi H_\varphi^* = H_\theta H_\theta^* + H_\varphi H_\varphi^*$$

E então,

$$F_i = \text{Re} \oint \left\{ -\frac{1}{2} [\epsilon (E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^*) + \mu (H_\theta H_\theta^* + H_\varphi H_\varphi^*)] n_i \right\} da$$

Como o campo elétrico é  $\vec{E} = \vec{E}^{inc} + \vec{E}^{sca}$ ,

$$E_\theta E_\theta^* = [E_\theta^{inc} + E_\theta^{sca}] [E_\theta^{inc*} + E_\theta^{sca*}] = E_\theta^{inc} E_\theta^{inc*} + E_\theta^{inc} E_\theta^{sca*} + E_\theta^{sca} E_\theta^{inc*} + E_\theta^{sca} E_\theta^{sca*}$$

Entretanto, o termo  $E_\theta^{inc} E_\theta^{inc*}$  só depende do campo incidente e portanto não está relacionado à partícula, logo o mesmo não entra no cálculo da força. Antes de continuar o cálculo vamos definir as funções de  $\theta$ :

$$\pi_n^m = \frac{P_n^m}{\sin\theta} \text{ e } \tau_n^m = \frac{dP_n^m}{d\theta} \text{ que são reais.}$$

Lembrando que os campos elétricos e magnéticos são:

$$\begin{aligned}\vec{E}_i &= E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [\vec{M}_{o1n}^1 - i\vec{N}_{e1n}^1] = \sum E_n [\vec{M}_{o1n}^1 - i\vec{N}_{e1n}^1] \\ \vec{H}_i &= -\frac{k}{\mu\omega} E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [\vec{M}_{e1n}^1 + i\vec{N}_{o1n}^1] = -\frac{k}{\mu\omega} \sum E_n [\vec{M}_{e1n}^1 + i\vec{N}_{o1n}^1] \\ \vec{E}_s &= E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [ia_n \vec{N}_{e1n}^3 - b_n \vec{M}_{o1n}^3] = \sum E_n [ia_n \vec{N}_{e1n}^3 - b_n \vec{M}_{o1n}^3] \\ \vec{H}_s &= \frac{k}{\mu\omega} E_0 \sum i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} [ib_n \vec{N}_{o1n}^3 + a_n \vec{M}_{e1n}^3] = \frac{k}{\mu\omega} \sum E_n [ib_n \vec{N}_{o1n}^3 + a_n \vec{M}_{e1n}^3]\end{aligned}$$

E considerando as formas assintóticas das funções de Bessel,

$$\begin{aligned}h_n^1(\rho) &= (-i)^{n+1} \frac{e^{i\rho}}{\rho}, j_n(\rho) = \frac{1}{2\rho} [(-i)^{n+1} e^{i\rho} + (i)^{n+1} e^{-i\rho}] \text{ e} \\ \frac{1}{\rho} [\rho h_n^1(\rho)]' &= (-i)^n \frac{e^{i\rho}}{\rho}, \frac{1}{\rho} [\rho j_n(\rho)]' = \frac{1}{2\rho} [(-i)^n e^{i\rho} + (i)^n e^{-i\rho}], \\ E_{i\theta} &= \sum E_n \left\{ \cos\varphi \pi_n \frac{1}{2\rho} [(-i)^{n+1} e^{i\rho} + (i)^{n+1} e^{-i\rho}] - i \cos\varphi \tau_n \frac{1}{2\rho} [(-i)^n e^{i\rho} + (i)^n e^{-i\rho}] \right\} = \\ \sum E_n \cos\varphi \frac{1}{2\rho} &\left\{ \pi_n [(-i)^{n+1} e^{i\rho} + (i)^{n+1} e^{-i\rho}] - i \tau_n [(-i)^n e^{i\rho} + (i)^n e^{-i\rho}] \right\} = \\ \sum E_n \frac{\cos\varphi}{2\rho} &[(-i)^{n+1} e^{i\rho} \pi_n + (i)^{n+1} e^{-i\rho} \pi_n - (-i)^{n+1} e^{i\rho} \tau_n - (i)^{n+1} e^{-i\rho} \tau_n] = \\ \frac{\cos\varphi}{2\rho} \sum E_n &\left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] + (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] e^{i\rho} \right\}\end{aligned}$$



$$E_{i\varphi} = \sum E_n \left\{ -\text{sen}\varphi \frac{\tau_n}{2\rho} \left[ (-i)^{n+1} e^{i\varphi} + (i)^{n+1} e^{-i\varphi} \right] + i \text{sen}\varphi \pi_n \left[ (-i)^n e^{i\varphi} + (i)^n e^{-i\varphi} \right] \right\} =$$

$$\frac{\text{sen}\varphi}{2\rho} \sum E_n \left[ -(-i)^{n+1} e^{i\varphi} \tau_n - (i)^{n+1} e^{-i\varphi} \tau_n - (-i)^{n+1} e^{i\varphi} \pi_n + (i)^{n+1} e^{-i\varphi} \pi_n \right] =$$

$$\frac{\text{sen}\varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\varphi} [\pi_n - \tau_n] - (-i)^{n+1} e^{i\varphi} [\pi_n + \tau_n] \right\}$$

$$E_{s0} = \frac{\cos\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ i a_n \tau_n (-i)^n e^{i\varphi} - b_n (-i)^{n+1} \pi_n e^{i\varphi} \right\} =$$

$$= \frac{\cos\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\varphi} [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right\}$$

$$E_{s\varphi} = \frac{\text{sen}\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ -i a_n \pi_n (-i)^n e^{i\varphi} + b_n (-i)^{n+1} \tau_n e^{i\varphi} \right\} =$$

$$= \frac{\text{sen}\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\varphi} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] \right\}$$

assim, ficamos com as combinações:

$$E_{i0} E_{s0}^* = \left[ \frac{\cos\varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\varphi} [\pi_n - \tau_n] + (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] e^{i\varphi} \right\} \right] \times$$

$$\left[ \frac{\cos\varphi}{\rho} \sum E_{n'}^* \left\{ -i a_{n'}^* \tau_{n'} (i)^{n'} e^{-i\varphi} - b_{n'}^* \tau_{n'} (i)^{n'+1} \pi_{n'} e^{-i\varphi} \right\} \right] =$$

$$\left( \frac{\cos^2\varphi}{2\rho^2} \right) \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -a_{n'}^* (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\varphi} \tau_{n'} [\pi_n - \tau_n] - b_{n'}^* (i)^{n'+1} (i)^{n+1} e^{-2i\varphi} \pi_{n'} [\pi_n - \tau_n] - \right.$$

$$\left. (-i)^{n+1} a_{n'}^* (i)^{n'+1} \tau_{n'} [\pi_n + \tau_n] - (i)^{n+1} b_{n'}^* (-i)^{n'+1} \pi_{n'} [\pi_n + \tau_n] \right\} =$$

$$\left( \frac{\cos^2\varphi}{2\rho^2} \right) \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\varphi} [\pi_n - \tau_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \right\}$$

$$E_{s0} E_{i0}^* = \left[ \frac{\cos\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ -(-i)^{n+1} a_n \tau_n e^{i\varphi} - b_n (-i)^{n+1} \pi_n e^{i\varphi} \right\} \right] \times$$

$$\left[ \frac{\cos\varphi}{2\rho} \sum E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n'+1} e^{i\varphi} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] + (i)^{n'+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] e^{-i\varphi} \right\} \right] =$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{\cos^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} a_n \tau_n [\pi_{n'} - \tau_{n'}] - (-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} b_n \pi_n [\pi_{n'} - \tau_{n'}] \right. \\
&\quad \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} a_n \tau_n [\pi_{n'} + \tau_{n'}] - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} b_n \pi_n [\pi_{n'} + \tau_{n'}] \right\} = \\
&\frac{\cos^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n] - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right\} \\
&E_{s\theta} E_{s\theta}^* = \left[ \frac{\cos \varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ -(-i)^{n+1} e^{i\rho} [a_n \tau_n + b_n \pi_n] \right\} \right] \times \left[ \frac{\cos \varphi}{\rho} \sum E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n'+1} e^{-i\rho} [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \right\} \right] = \\
&= \frac{\cos^2 \varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \tau_n + b_n \pi_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \\
&E_{i\varphi} E_{s\varphi}^* = \left[ \frac{\sin \varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] - (-i)^{n+1} e^{i\rho} [\pi_n + \tau_n] \right\} \right] \\
&\quad \times \left[ \frac{\sin \varphi}{\rho} \sum E_{n'}^* \left\{ (i)^{n'+1} e^{-i\rho} [a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} \right] = \\
&= \frac{\sin^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \tau_{n'}] - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] [a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} \\
&E_{s\varphi} E_{i\varphi}^* = \left[ \frac{\sin \varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] \right\} \right] \times \\
&\quad \left[ \frac{\sin \varphi}{2\rho} \sum E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n'+1} e^{i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] - (i)^{n'+1} e^{-i\rho} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] \right\} \right] = \\
&\frac{\sin^2 \varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] [\pi_{n'} + \tau_{n'}] \right\} \\
&E_{s\varphi} E_{s\varphi}^* = \frac{\sin^2 \varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [a_n \pi_n + b_n \tau_n] [a_{n'}^* \pi_{n'}^* + b_{n'}^* \tau_{n'}^*] \right\}
\end{aligned}$$

Agora já podemos fazer as integrais em  $\varphi$ :

$$\text{Para } F_z \rightarrow \hat{e}_{rz} = \cos \theta \rightarrow \int_0^{2\pi} \cos^2 \varphi \, d\varphi = \int_0^{2\pi} \sin^2 \varphi \, d\varphi = \pi, \text{ e para}$$

$$F_x \rightarrow e_{rx} = \text{sen}\theta \cos\varphi \text{ e } F_y \rightarrow e_{ry} = \text{sen}\theta \text{sen}\varphi \Rightarrow \int_0^{2\pi} \cos^2\varphi \cos\varphi \, d\varphi = \int_0^{2\pi} \cos^2\varphi \text{sen}\varphi \, d\varphi = 0.$$

Portanto, só haverá força em z, como já sabíamos pela simetria do problema.

Continuando o cálculo,

$$\begin{aligned} \int_0^{2\pi} (E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^*) d\varphi = \sum E_n E_{n'}^* \frac{\pi}{2\rho^2} \bigg\{ & -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\varphi} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n - a_n \pi_n - b_n \tau_n] \bigg\} - \\ & \bigg\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\varphi} [\pi_n - \tau_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \tau_{n'}] \bigg\} - \\ & \bigg\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [a_n \pi_n + b_n \tau_n + a_n \tau_n + b_n \pi_n] \bigg\} - \\ & \bigg\{ (i)^{n+1} (-i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] [a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \bigg\} + \\ & \bigg\{ 2(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} \big\{ [a_n \tau_n + b_n \pi_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'}] \big\} + \big\{ [a_{n'}^* \pi_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'}] [a_n \pi_n + b_n \tau_n] \big\} \bigg\} \end{aligned}$$

Rearranjando os termos de  $E_\theta E_\theta^* + E_\varphi E_\varphi^*$  e chamando o último de  $I_1$ , temos

$$\begin{aligned} I_1 = \int d\theta \text{sen}\theta \cos\theta \, r^2 \sum \frac{\pi}{\rho^2} (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} E_n E_{n'}^* \big\{ & b_n b_{n'}^* [\tau_n \tau_{n'} + \pi_n \pi_{n'}] + a_n b_{n'}^* [\pi_n \tau_{n'} + \tau_n \pi_{n'}] + \\ & b_n a_{n'}^* [\tau_n \pi_{n'} + \pi_n \tau_{n'}] + a_n a_{n'}^* [\pi_n \pi_{n'} + \tau_n \tau_{n'}] \big\} = \\ = \int d\theta \text{sen}\theta \cos\theta \, r^2 \sum \frac{\pi}{\rho^2} (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} E_n E_{n'}^* \big\{ & [b_n b_{n'}^* + a_n a_{n'}^*] [\tau_n \tau_{n'} + \pi_n \pi_{n'}] + 2a_n b_{n'}^* [\pi_n \tau_{n'} + \tau_n \pi_{n'}] \\ & + b_n a_{n'}^* [\tau_n \pi_{n'} + \pi_n \tau_{n'}] \big\} \end{aligned}$$

Já os terceiro e quarto termos ficam como  $I_2$ ,

$$\begin{aligned} I_2 = \int_0^\pi d\theta \, r^2 \text{sen}\theta \cos\theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \big\{ & -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} 2 \text{Re} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [a_n \pi_n + b_n \tau_n + a_n \tau_n + b_n \pi_n] \big\} = \\ = \int_0^\pi d\theta \, r^2 \text{sen}\theta \cos\theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \big\{ & -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} 2 \text{Re} [a_n \pi_n \pi_{n'} + a_n \tau_n \pi_{n'} + b_n \pi_n \pi_{n'} \\ & + b_n \tau_n \pi_{n'} + a_n \pi_n \tau_{n'} + a_n \tau_n \tau_{n'} + b_n \pi_n \tau_{n'} + b_n \tau_n \tau_{n'}] \big\} = \\ = \int_0^\pi d\theta \, r^2 \text{sen}\theta \cos\theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \big\{ & -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} 2 \text{Re} [a_n [\pi_n \pi_{n'} + \tau_n \tau_{n'}] + a_n [\tau_n \pi_{n'} + \pi_n \tau_{n'}] \\ & + b_n [\pi_n \pi_{n'} + \tau_n \tau_{n'}] + b_n [\tau_n \pi_{n'} + \pi_n \tau_{n'}]] \big\} = \end{aligned}$$

$$= \int_0^\pi d\theta r^2 \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} 2\text{Re} \left[ [a_n + b_n] [\pi_n \pi_{n'} + \tau_n \tau_{n'}] + [a_n + b_n] [\tau_n \pi_{n'} + \pi_n \tau_{n'}] \right] \right\}$$

Só falta agora, definir a integral  $I_3$  que é referente aos primeiros e segundos,

$$\begin{aligned} I_3 &= \int_0^\pi d\theta r^2 \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n - a_n \pi_n - b_n \tau_n] \right\} - \\ &\quad \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} = \\ &= \int_0^\pi d\theta r^2 \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* 2\text{Re} \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [a_n \tau_n + b_n \pi_n - a_n \pi_n - b_n \tau_n] \right\} = \\ I_3 &= \int_0^\pi d\theta \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2k^2} \sum E_n E_{n'}^* 2\text{Re} \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} \times \right. \\ &\quad \left. \times [a_n \tau_n \pi_{n'} + b_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \tau_n \tau_{n'} + a_n \pi_n \tau_{n'} - b_n \tau_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \tau_{n'} + b_n \tau_n \tau_{n'}] \right\} \end{aligned}$$

Usando as soluções dessas integrais em  $\theta$  demonstradas por Gouesbet,

$$\begin{aligned} \int_0^\pi [\pi_{n'} \tau_n + \pi_n \tau_{n'}] \sin\theta \cos\theta d\theta &= \frac{2}{2n+1} \frac{(n+1)!}{(n-1)!} \delta_{n,n'} e \\ \int_0^\pi [\pi_n \pi_{n'} + \tau_n \tau_{n'}] \sin\theta \cos\theta d\theta &= \frac{2n^2(n+1)(n+2)^2}{(2n+1)(2n+3)} \text{ se } n' = n+1, \frac{2n(n+1)^2(n-1)^2}{(2n+1)(2n-1)} \text{ se } n' = n-1, 0 \text{ se } n' \neq n \pm 1 \end{aligned}$$

temos,

$$\begin{aligned} I_1 &= \sum \frac{\pi}{k^2} (-i)^{n+1} (i)^{n+1} (i)^n (-i)^n E_0 E_0 \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2}{2n+1} \frac{(n+1)!}{(n-1)!} 2\text{Re} [a_n b_n^*] + \\ &\sum \frac{\pi}{k^2} (-i)^{n+1} (i)^{n+2} (i)^n (-i)^{n+1} E_0 E_0 \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2n+3}{(n+1)(n+2)} \frac{2n^2(n+1)(n+2)^2}{(2n+1)(2n+3)} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] + \\ &\sum \frac{\pi}{k^2} (-i)^{n+1} (i)^n (i)^n (-i)^{n-1} E_0 E_0 \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2n-1}{(n-1)n} \frac{2n(n+1)^2(n-1)^2}{(2n+1)(2n-1)} [b_n b_{n-1}^* + a_n a_{n-1}^*] \end{aligned}$$

$$I_1 = \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} a_n b_n^* + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\pi}{k^2} |E_0|^2 \frac{n(n+2)}{(n+1)} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \\ + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\pi}{k^2} |E_0|^2 \frac{(n+1)(n-1)}{n} [b_n b_{n-1}^* + a_n a_{n-1}^*] =$$

Na terceira somatória fazemos  $n-1 = n \rightarrow n = n+1$ , pois ela poderia começar de 2 por causa do  $n-1$  e obtemos:

$$I_1 = \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\pi}{k^2} |E_0|^2 \frac{n(n+2)}{(n+1)} [b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \\ + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\pi}{k^2} |E_0|^2 \frac{(n+2)(n)}{(n+1)} [b_{n+1} b_n^* + a_{n+1} a_n^*] = \\ I_1 = \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*]$$

Agora para  $I_2$ ,

$$I_2 = -\frac{\pi |E_0|^2}{2k^2} \left\{ 2 \text{Re} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} (i)^n (-i)^{n+1} (-i)^{n+1} (i)^{n+2} \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2n+3}{(n+1)(n+2)} \frac{2n^2(n+1)(n+2)^2}{(2n+1)(2n+3)} [a_{n+1} + b_{n+1}] + \right. \right. \\ \left. \sum_{n=1}^{\infty} (i)^n (-i)^{n-1} (-i)^{n+1} (i)^n \frac{2n+1}{n(n+1)} \frac{2n-1}{(n-1)n} \frac{2n(n+1)^2(n-1)^2}{(2n+1)(2n-1)} [a_{n-1} + b_{n-1}] \right. \\ \left. + \sum_{n=1}^{\infty} \left( \frac{2n+1}{n(n+1)} \right)^2 \frac{2}{2n+1} \frac{(n+1)!}{(n-1)!} [a_n + b_n] \right\} \Bigg\} = \\ = -\frac{\pi |E_0|^2}{2k^2} \left\{ 2 \text{Re} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n(n+2)}{(n+1)} [a_{n+1} + b_{n+1}] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2(n+1)(n-1)}{n} [a_{n-1} + b_{n-1}] + \sum_{n=1}^{\infty} 2 \left( \frac{2n+1}{n(n+1)} \right) [a_n + b_n] \right\} \right\}$$

Fazendo na primeira somatória  $n+1 = n \rightarrow n = n-1$  e na segunda  $n-1 = n \rightarrow n = n+1$ :

$$I_2 = -\frac{\pi |E_0|^2}{2k^2} \left\{ 4 \text{Re} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} [a_n + b_n] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(n+1)(n-1)}{n} [a_n + b_n] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} [a_n + b_n] \right\} \right\} = \\ = -\frac{\pi |E_0|^2}{2k^2} \left\{ 4 \text{Re} \sum_{n=1}^{\infty} \left[ \frac{n(n+2)}{(n+1)} + \frac{(n+1)(n-1)}{n} + \frac{2n+1}{n(n+1)} \right] [a_n + b_n] \right\} =$$

$$\begin{aligned}
&= -\frac{\pi|E_0|^2}{2k^2} \left\{ 4 \operatorname{Re} \sum_{n=1}^{\infty} \left[ \frac{n^2(n+2) + (n+1)(n^2-1) + 2n+1}{n(n+1)} \right] [a_n + b_n] \right\} = \\
&= -\frac{\pi|E_0|^2}{2k^2} \left\{ 4 \operatorname{Re} \sum_{n=1}^{\infty} \left[ \frac{n^3 + 2n^2 + n^3 - n + n^2 - 1 + 2n + 1}{n(n+1)} \right] [a_n + b_n] \right\} = \\
&= -\frac{\pi|E_0|^2}{2k^2} \left\{ 4 \operatorname{Re} \sum_{n=1}^{\infty} \left[ \frac{2n^3 + 3n^2 + n}{n(n+1)} \right] [a_n + b_n] \right\} = \\
&= -\frac{\pi|E_0|^2}{2k^2} \left\{ 4 \operatorname{Re} \sum_{n=1}^{\infty} \left[ \frac{(2n+1)(n+1)}{(n+1)} \right] [a_n + b_n] \right\} = \\
&I_2 = -\frac{2\pi|E_0|^2}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} \operatorname{Re} \{ (2n+1) [a_n + b_n] \}
\end{aligned}$$

Quanto a  $I_3$ , vamos deixá-la por enquanto na sua forma integral.

De maneira similar, temos para o campo magnético  $\vec{H}$ ,

$$H_{i0} = \frac{k}{\mu\omega} \frac{\operatorname{sen}\varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] + (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] e^{i\rho} \right\}$$

$$H_{i\varphi} = -\frac{k}{\mu\omega} \frac{\cos\varphi}{2\rho} \sum E_n \left\{ (i)^{n+1} e^{-i\rho} [\pi_n - \tau_n] - (-i)^{n+1} e^{i\rho} [\pi_n + \tau_n] \right\}$$

$$H_{s0} = \frac{k}{\mu\omega} \frac{\operatorname{sen}\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right\}$$

$$H_{s\varphi} = -\frac{k}{\mu\omega} \frac{\cos\varphi}{\rho} \sum E_n \left\{ (-i)^{n+1} e^{i\rho} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] \right\}$$

e portanto:

$$\begin{aligned}
H_{i0} H_{i0}^* &= \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \left( \frac{\operatorname{sen}^2\varphi}{2\rho^2} \right) \sum E_n E_n^* \left\{ - (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \right. \\
&\quad \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_n + \tau_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \right\}
\end{aligned}$$

$$H_{s\theta}H_{i\theta}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \frac{\text{sen}^2\varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right. \\ \left. - (i)^{n'+1} (-i)^{n+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right\}$$

$$H_{s\theta}H_{s\theta}^* = \left( \frac{k}{\mu\omega} \right)^2 \frac{\text{sen}^2\varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \tau_n + a_n \pi_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}]$$

$$H_{i\varphi}H_{s\varphi}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \frac{\cos^2\varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \tau_{n'}] \right. \\ \left. - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'}] \right\}$$

$$H_{s\varphi}H_{i\varphi}^* = \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \frac{\cos^2\varphi}{2\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] \right. \\ \left. - (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] [\pi_{n'} - \tau_{n'}] \right\}$$

$$H_{s\varphi}H_{s\varphi}^* = \left( \frac{k}{\mu\omega} \right)^2 \frac{\cos^2\varphi}{\rho^2} \sum E_n E_{n'}^* \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [b_n \pi_n + a_n \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'}] \right\}$$

então dessa forma, ficamos com:

$$\int_0^{2\pi} (H_\theta H_\theta^* + H_\varphi H_\varphi^*) d\varphi = \sum E_n E_{n'}^* \frac{\pi}{2\rho^2} \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \left\{ \left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} [\pi_{n'} - \tau_{n'}] [b_n \tau_n + a_n \pi_n - b_n \pi_n - a_n \tau_n] \right\} - \right. \\ \left\{ (i)^{n+1} (i)^{n'+1} e^{-2i\rho} [\pi_n - \tau_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'} - b_{n'}^* \pi_{n'} - a_{n'}^* \tau_{n'}] \right\} - \\ \left\{ (-i)^{n+1} (i)^{n'+1} [\pi_{n'} + \tau_{n'}] [b_n \pi_n + a_n \tau_n + b_n \tau_n + a_n \pi_n] \right\} - \\ \left\{ (i)^{n+1} (-i)^{n'+1} [\pi_n + \tau_n] [b_{n'}^* \pi_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'} + b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \right\} + \\ \left. \left\{ 2(-i)^{n+1} (i)^{n'+1} \left\{ [b_n \tau_n + a_n \pi_n] [b_{n'}^* \tau_{n'} + a_{n'}^* \pi_{n'}] \right\} + \left\{ [b_{n'}^* \pi_{n'} + a_{n'}^* \tau_{n'}] [b_n \pi_n + a_n \tau_n] \right\} \right\} \right\}$$

tal que as integrais ficam,

$$I_4 = \left( \frac{k}{\mu\omega} \right)^2 \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \left( \frac{k}{\mu\omega} \right)^2 \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \Rightarrow$$

$$I_4 = \frac{4\pi}{\mu^2 \omega^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \frac{4\pi}{\mu^2 \omega^2} |E_0|^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*]$$

$$I_5 = -\frac{k^2}{\mu^2 \omega^2} \frac{2\pi |E_0|^2}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n + b_n]\} \Rightarrow$$

$$I_5 = -\frac{2\pi |E_0|^2}{\mu^2 \omega^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n + b_n]\}$$

e

$$I_6 = \int_0^{\pi} d\theta \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2k^2} \frac{k^2}{(\mu\omega)^2} \sum E_n E_{n'}^* 2 \text{Re}\left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\varphi} \times \right.$$

$$\left. \times [b_n \tau_n \pi_{n'} + a_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \tau_n \tau_{n'} + b_n \pi_n \tau_{n'} - a_n \tau_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \tau_{n'} + a_n \tau_n \tau_{n'}] \right\} \Rightarrow$$

$$I_6 = \int_0^{\pi} d\theta \sin\theta \cos\theta \frac{\pi}{2(\mu\omega)^2} \sum E_n E_{n'}^* 2 \text{Re}\left\{ -(-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\varphi} \times \right.$$

$$\left. \times [b_n \tau_n \pi_{n'} + a_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \tau_n \tau_{n'} + b_n \pi_n \tau_{n'} - a_n \tau_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \tau_{n'} + a_n \tau_n \tau_{n'}] \right\}$$

Combinando  $I_1$  com  $I_4 = I_7$ ,  $I_2$  com  $I_5 = I_8$  e  $I_3$  com  $I_6 = I_9$ , e de acordo com a expressão de força  $F_i = \text{Re} \oint \left\{ -\frac{1}{2} [\varepsilon (E_0 E_0^* + E_\varphi E_\varphi^*) + \mu (H_0 H_0^* + H_\varphi H_\varphi^*)] n_i \right\} da$ , ficamos com:

$$I_7 = \left( \frac{4\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon + \mu \frac{4\pi}{\mu^2 \omega^2} |E_0|^2 \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right)$$

usando a relação  $\vec{k} \cdot \vec{k} = \omega^2 \varepsilon \mu$ :

$$I_7 = \left( \frac{8\pi}{k^2} |E_0|^2 \varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right)$$

$$I_8 = -2\pi |E_0|^2 \left( \frac{\varepsilon}{k^2} + \frac{\mu}{\mu^2 \omega^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n + b_n]\} =$$



$$= -\frac{4\pi|E_0|^2}{k^2}\varepsilon\sum_{n=1}^{\infty}\text{Re}\{(2n+1)[a_n+b_n]\}$$

e agora por último,

$$\begin{aligned} I_3 + I_6 = & \left( \frac{\pi\varepsilon}{k^2} + \frac{\pi\mu}{\mu^2\omega^2} \right) \int_0^\pi d\theta \sin\theta \cos\theta \sum E_n E_n^* \text{Re} \left\{ (-i)^{n'+1} (-i)^{n+1} e^{2i\rho} \times \right. \\ & [a_n \tau_n \pi_{n'} + b_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \pi_{n'} - a_n \tau_n \tau_{n'} + a_n \pi_n \tau_{n'} - b_n \tau_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \tau_{n'} + b_n \tau_n \tau_{n'}] + \\ & \left. [b_n \tau_n \pi_{n'} + a_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \pi_n \pi_{n'} - b_n \tau_n \tau_{n'} + b_n \pi_n \tau_{n'} - a_n \tau_n \pi_{n'} - a_n \pi_n \tau_{n'} + a_n \tau_n \tau_{n'}] \right\} \Rightarrow 0 \end{aligned}$$

Dessa forma, no final dos cálculos a força devido a pressão de radiação é:

$$\begin{aligned} F = & \frac{2\pi|E_0|^2}{k^2}\varepsilon\sum_{n=1}^{\infty}\text{Re}\{(2n+1)[a_n+b_n]\} - \\ & \left( \frac{4\pi}{k^2}|E_0|^2\varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \end{aligned}$$

definindo a relação entre a força e a seção de choque como  $C = \frac{F}{\varepsilon|E_0|^2}$ , a eficiência para

a pressão de radiação causada por uma onda plana é:

$$\begin{aligned} Q_{pr} = & \frac{C}{\pi a^2} = \frac{2}{k^2 a^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n+b_n]\} - \\ & \left( \frac{4\pi}{k^2}|E_0|^2\varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \Rightarrow \\ & Q_{pr} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} \text{Re}\{(2n+1)[a_n+b_n]\} - \\ & \left( \frac{4\pi}{k^2}|E_0|^2\varepsilon \right) \left( \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(2n+1)}{n(n+1)} \text{Re}[a_n b_n^*] + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{(n+1)} \text{Re}[b_n b_{n+1}^* + a_n a_{n+1}^*] \right) \end{aligned}$$



## *Apêndice 2*

```

(* definir os intervalos dos tamanhos da largura dos picos *)

conjuntodeintervalos =
{
{723,727}
,
{727.5,730}
,
{735.5,738}
,
{740,742}
,
{748,750.5}
,
{760.5,764}
,
{774.5,778}
,
{779.5,782}
};

(* programa -> acha a posição dos picos experimentais e compara a posição dos picos
teóricos para cada r do conjunto desejado *)

J[k_][z_] := BesselJ[k,z];
H[k_][z_] := BesselJ[k,z] - I BesselY[k,z];
j[k_][z_] := Sqrt[Pi/(2 z)] J[(k) + (1/2)][z];
h[k_][z_] := Sqrt[Pi/(2 z)] H[(k) + (1/2)][z];

n[l_] := (a1 + b1/(1*10^-7)^2);
a1 = 1.5683;
b1 = 10.087*10^-11;
w[l_] := (a2 + b2/(1*10^-7)^2);
a2 = 1.324;
b2 = 3.046*10^-11;
m[l_] := n[l]/w[l];
x[r_][l_] := (2*Pi*r*10^3*w[l])/1;

a[k_][x_,m_] = (j[k][x] D[m x j[k][m x],x]/m - m^2 j[k][m x] D[x j[k][x],x])/
(h[k][x] D[m x j[k][m x],x]/m - m^2 j[k][m x] D[x h[k][x],x]);

b[k_][x_,m_] = (j[k][x] D[m x j[k][m x],x]/m - j[k][m x] D[x j[k][x],x])/
(h[k][x] D[m x j[k][m x],x]/m - j[k][m x] D[x h[k][x],x]);

Clear[Q];
Q[x_,m_] :=
For[

```

```

        iii = 1 ; soma = 0 ;
        ,
        True
        ,
        iii ++ ;
        ,
        incremento =
        (2/(x^2))(2 iii + 1) ( (Abs[a[iii][x,m]]^2 + (Abs[b[iii][x,m]]^2 ) ) ;
        soma += incremento ;
        If [ iii > 70 , Return[soma]; ];
    ];
Q[r_][l_] := Q[x[r][1],m[l]] ;
Q[r_,lmin_,lmax_,l_] :=
If[ lmin<l<lmax , Q[x[r][1],m[l]] , Abort[]; -100000 ];

Clear[search];
search[r_][{lmin_,lmax_}] :=
(
For[
    lstart = lmin , lstart <= lmax , lstart += (lmax-lmin)/4 ,
    resultado =
    Timing[
        CheckAbort[
            FindMinimum[-Q[r,lmin,lmax,l] , {1,{lstart,lstart+1}},Compiled->False]
            ,
            Null
        ]
    ];
    Print[resultado];
    If[ resultado[[2]] != Null , Return[ resultado[[2,2,1,2]] ]; ];
];
);

(*definir um conjunto de raios possíveis e o incremento*)

conjuntoders = Range[4.2, 5.2, 0.01];

Timing[
For[
    jjj=1,jjj<=Length[conjuntodeintervalos],jjj++,
    intervalo = conjuntodeintervalos[[jjj]] ;
    Print["intervalo=",intervalo];
    For[
        kkk=1,kkk<=Length[conjuntoders],kkk++,
        r = conjuntoders[[kkk]] ;
        Print["r =",r];
        lresultante = search[r][intervalo] ;

```

```

        If[
            lresultante===Null
            ,
            conjuntoders = DeleteCases[conjuntoders,r] ;
            kkk--;
        ];
    ];
];
]
SetDirectory["c:"];
Save["conjuntoders",conjuntoders];
(*raio encontrado*)

conjuntoders
(*encontrado o r pode se plotar o gráfico com a função desejada*)

```

(\* programa para o feixe gaussiano em função do comprimento de onda \*)

$$d[\lambda] := (a1 + b1 / (\lambda * 10^{-4})^2);$$

$$a1 = 1.5683;$$

$$b1 = 10.087 * 10^{-11};$$

$$w[\lambda] := (a2 + b2 / (\lambda * 10^{-4})^2);$$

$$a2 = 1.324;$$

$$b2 = 3.046 * 10^{-11};$$

$$a = 4.66;$$

$$x0 = 4.66;$$

$$\lambda n[\lambda] = \lambda / w[\lambda];$$

$$s[\lambda] = \frac{\lambda n[\lambda]}{2 \pi w0};$$

$$mn[\lambda] = \frac{d[\lambda]}{w[\lambda]};$$

$$xa[\lambda] = \frac{2 \pi a}{\lambda n[\lambda]};$$

$$l0[\lambda] = \text{IntegerPart} \left[ \left( \frac{2 \pi x0}{\lambda n[\lambda]} - \frac{1}{2} \right) \right];$$

$$l1[\lambda] = \text{IntegerPart} \left[ 1.5 \left( \frac{2 \pi a}{\lambda n[\lambda]} - \frac{1}{2} \right) \right];$$

$$q[n_, \lambda] = \frac{2 s[\lambda] \left( n + \frac{1}{2} \right) x0}{w0};$$

$$Z[n_, p_, \varphi0_] = \left( \frac{-i e^{i \text{Sign}[p] \varphi0}}{n + \frac{1}{2}} \right)^{\text{Abs}[p]-1} (1 - \text{KroneckerDelta}[p, 0])$$

$$+ \frac{i n (n+1)}{n + \frac{1}{2}} \text{KroneckerDelta}[p, 0];$$

```

J[k_][z_] := BesselJ[k, z];
H[k_][z_] := BesselJ[k, z] - I BesselY[k, z];
j[k_][z_] := Sqrt[Pi / (2 z)] J[(k) + (1 / 2)] [z];
h[k_][z_] := Sqrt[Pi / (2 z)] H[(k) + (1 / 2)] [z];

an[n_, ml_, x_] = (j[n][x] D[ml x j[n][ml x], x] / ml - ml^2 j[n][ml x] D[x j[n][x], x])
/ (h[n][x] D[ml x j[n][ml x], x] / ml - ml^2 j[n][ml x] D[x h[n][x], x]);
an[n_, λ_] := (an[n, λ] = an[n, mn[λ], xa[λ]]);
Table[an[n, λ], {n, 0, 100}, {λ, 0.710, 0.760}];

```

```

anst[n_, mn_, xa_] = Conjugate[an[n, mn, xa]];
anst[n_, λ_] := (anst[n, λ] = anst[n, mn[λ], xa[λ]]);
Table[anst[n, λ], {n, 0, 100}, {λ, 0.710, 0.760}];

```

```

bn[n_, ml_, x_] = (j[n][x] D[ml x j[n][ml x], x] / ml - j[n][ml x] D[x j[n][x], x]) /
(h[n][x] D[ml x j[n][ml x], x] / ml - j[n][ml x] D[x h[n][x], x]);
bn[n_, λ_] := (bn[n, λ] = bn[n, mn[λ], xa[λ]]);
Table[bn[n, λ], {n, 0, 100}, {λ, 0.710, 0.760}];

```

```

bnst[n_, mn_, xa_] = Conjugate[bn[n, mn, xa]];
bnst[n_, λ_] := (bnst[n, λ] = bnst[n, mn[λ], xa[λ]]);
Table[bnst[n, λ], {n, 0, 100}, {λ, 0.710, 0.760}];

```

$$F[n_, \lambda_] = e^{-\left(\left(\frac{x_0}{w_0}\right)^2 + \left(s[\lambda] \left(n + \frac{1}{2}\right)\right)^2\right)};$$

```

gTM[n_, p_, φo_, λ_] =
Z[n, p, φo] F[n, λ]
((BesselI[Abs[p] - 1, q[n, λ]] + e^{-i Sign[p] 2 φo} BesselI[Abs[p] + 1, q[n, λ]]))
(1 - KroneckerDelta[p, 0]) + Cos[φo] BesselI[1, q[n, λ]] KroneckerDelta[p, 0]);
gTMst[n_, p_, φo_, λ_] = Conjugate[gTM[n, p, φo, λ]];

```

```

gTE[n_, p_, φo_, λ_] =
Z[n, p, φo] F[n, λ]
(-i Sign[p] (BesselI[Abs[p] - 1, q[n, λ]] - e^{-i Sign[p] 2 φo} BesselI[Abs[p] + 1, q[n, λ]]))
(1 - KroneckerDelta[p, 0]) + Sin[φo] BesselI[1, q[n, λ]] KroneckerDelta[p, 0];
gTEst[n_, p_, φo_, λ_] = Conjugate[gTE[n, p, φo, λ]];

```

```

U[n_, m_, p_] [φo_, λ_] := an[n, λ] anst[m, λ] gTM[n, p, φo, λ] gTMst[m, p + 1, φo, λ] +
bn[n, λ] bnst[m, λ] gTE[n, p, φo, λ] gTEst[m, p + 1, φo, λ];
V[n_, m_, p_] [φo_, λ_] := i bn[n, λ] anst[m, λ] gTE[n, p, φo, λ] gTMst[m, p + 1, φo, λ] -
i an[n, λ] bnst[m, λ] gTM[n, p, φo, λ] gTEst[m, p + 1, φo, λ];

```

```

S[n_, m_, p_] [φo_, λ_] := (an[n, λ] + anst[m, λ]) gTM[n, p, φo, λ] gTMst[m, p + 1, φo, λ] +
(bn[n, λ] + bnst[m, λ]) gTE[n, p, φo, λ] gTEst[m, p + 1, φo, λ];

```



$T[n\_ , m\_ , p\_ ] [\varphi o\_ , \lambda\_ ] := i (bn[n, \lambda] + anst[m, \lambda]) gTE[n, p, \varphi o, \lambda] gTMst[m, p+1, \varphi o, \lambda] -$   
 $i (an[n, \lambda] + bnst[m, \lambda]) gTM[n, p, \varphi o, \lambda] gTEst[m, p+1, \varphi o, \lambda];$

$c1[n\_ , m\_ , p\_ ] [\varphi o\_ , \lambda\_ ] :=$   
 $\left( c1[n, m, p] [\varphi o, \lambda] = \right.$   
 $(S[m, n, p-1] [\varphi o, \lambda] + S[n, m, -p] [\varphi o, \lambda] - 2 U[m, n, p-1] [\varphi o, \lambda] - 2 U[n, m, -p] [\varphi o, \lambda])$   
 $\left( \frac{KroneckerDelta[m, n+1]}{m^2} - \frac{KroneckerDelta[n, m+1]}{n^2} \right) \Bigg);$

$c2[n\_ , m\_ , p\_ ] [\varphi o\_ , \lambda\_ ] := \frac{2 n + 1}{n^2 (n + 1)^2} KroneckerDelta[n, m]$   
 $(T[m, n, p-1] [\varphi o, \lambda] - T[n, m, -p] [\varphi o, \lambda] - 2 V[m, n, p-1] [\varphi o, \lambda] + 2 V[n, m, -p] [\varphi o, \lambda]);$

$nmin[p\_ , \lambda\_ ] = Max[\{p, lo[\lambda] - 6\}];$   
 $mmin[p\_ , \lambda\_ ] = Max[\{1, p-1, lo[\lambda] - 6\}];$   
 $nmax[\lambda\_ ] = Min[\{la[\lambda], lo[\lambda] + 6\}];$

$c[\varphi o\_ , \lambda\_ ] := \sum_{p=1}^{20} \sum_{n=nmin[p, \lambda]}^{nmax[\lambda]} \sum_{m=mmin[p, \lambda]}^{nmax[\lambda]} \frac{2}{(xa[\lambda])^2} \frac{(n+p)!}{(n-p)!}$

$(c1[n, m, p] [\varphi o, \lambda] + c2[n, m, p] [\varphi o, \lambda]);$

$cz[\varphi o\_ , \lambda\_ ] :=$

$\sum_{n=40}^{60} \sum_{p=-n}^n \frac{4}{(xa[\lambda])^2}$   
 $\left( \frac{1}{(n+1)^2} \frac{(n+1+Abs[p])!}{(n-Abs[p])!} \right.$   
 $Re[(an[n, \lambda] + anst[n+1, \lambda] - 2 an[n, \lambda] anst[n+1, \lambda])$   
 $gTM[n, p, \varphi o, \lambda] gTMst[n+1, p, \varphi o, \lambda] +$   
 $(bn[n, \lambda] + bnst[n+1, \lambda] - 2 bn[n, \lambda] bnst[n+1, \lambda])$   
 $gTE[n, p, \varphi o, \lambda] gTEst[n+1, p, \varphi o, \lambda] +$   
 $\frac{2 n + 1}{n^2 (n + 1)^2} \frac{(n+Abs[p])!}{(n-Abs[p])!}$   
 $Re[i (2 an[n, \lambda] bnst[n, \lambda] - an[n, \lambda] - bnst[n, \lambda])$   
 $gTM[n, p, \varphi o, \lambda] gTEst[n, p, \varphi o, \lambda]] \Bigg);$

(\*encontrado o raio pelo programa de onda plana, pode se utilizar o programa e as expressões acima para se fazer os gráficos em função do comprimento de onda para as posições paralela e perpendicular à polarização\*)

$wo = 0.5; (*definir o "spot size"*)$

$(* gTM = Sqrt[(Fx)^2 + (Fz)^2] = Sqrt[(Re[c[0, \lambda]])^2 + (cz[0, \lambda])^2]$   
 $gTE = Sqrt[(Fy)^2 + (Fz)^2] = Sqrt[(Im[c[Pi/2, \lambda]])^2 + (cz[Pi/2, \lambda])^2]$   
 $gTEM = Sqrt[(Fx)^2 + (Fy)^2 + (Fz)^2] = Sqrt[(Abs[c[Pi/4, \lambda]])^2 + (cz[Pi/4, \lambda])^2] *)$

(\*programa gaussiano em função da posição foco-centro \*)

$$a = 4.5;$$

$$\lambda n = 1.064 / 1.33;$$

$$s = \frac{\lambda n}{2 \pi w_0};$$

$$mn = \frac{1.6}{1.33};$$

$$xa = \frac{2 \pi a}{\lambda n};$$

$$lo[xo\_] = \text{IntegerPart} \left[ \left( \frac{2 \pi xo}{\lambda n} - \frac{1}{2} \right) \right];$$

$$la = \text{IntegerPart} \left[ 1.5 \left( \frac{2 \pi a}{\lambda n} - \frac{1}{2} \right) \right];$$

$$q[n\_ , xo\_ ] = \frac{2 s \left( n + \frac{1}{2} \right) xo}{w_0};$$

$$z[n\_ , p\_ , \varphi o\_ ] = \left( \frac{-i e^{i \text{Sign}[p] \varphi o}}{n + \frac{1}{2}} \right)^{\text{Abs}[p]-1} (1 - \text{KroneckerDelta}[p, 0])$$

$$+ \frac{i n (n+1)}{n + \frac{1}{2}} \text{KroneckerDelta}[p, 0];$$

$$f1[n\_ , x\_ ] = \sqrt{\frac{\pi x}{2}} \text{BesselJ} \left[ n + \frac{1}{2}, x \right];$$

$$f1x[n\_ , x\_ ] = \partial_x f1[n, x];$$

$$f2[n\_ , x\_ ] = \sqrt{\frac{mn \pi x}{2}} \text{BesselJ} \left[ n + \frac{1}{2}, mn x \right];$$

$$f2x[n\_ , x\_ ] = \partial_x f2[n, x];$$

$$g[n\_ , x\_ ] = \sqrt{\frac{\pi x}{2}} \left( \text{BesselJ} \left[ n + \frac{1}{2}, x \right] + i \text{BesselY} \left[ n + \frac{1}{2}, x \right] \right);$$

$$gx[n\_ , x\_ ] = \partial_x g[n, x];$$

```

an[n_] :=
  (an[n] = (mn f2[n, xa] flx[n, xa] - fl[n, xa] f2x[n, xa]) /
    (mn f2[n, xa] gx[n, xa] - g[n, xa] f2x[n, xa]));
Table[an[n], {n, 0, 120}];
anst[n_] := (anst[n] = Conjugate[an[n]]);
Table[anst[n], {n, 0, 120}];

```

```

bn[n_] :=
  (bn[n] = (f2[n, xa] flx[n, xa] - mn fl[n, xa] f2x[n, xa]) /
    (f2[n, xa] gx[n, xa] - mn g[n, xa] f2x[n, xa]));
Table[bn[n], {n, 0, 120}];
bnst[n_] := (bnst[n] = Conjugate[bn[n]]);
Table[bnst[n], {n, 0, 120}];

```

$$F[n_, xo_] = e^{-\left(\left(\frac{xo}{wo}\right)^2 + \left(s\left(n + \frac{1}{2}\right)\right)^2\right)};$$

```

gTM[n_, p_, xo_, phi_] =
  Z[n, p, phi] F[n, xo]
  ((BesselI[Abs[p] - 1, q[n, xo]] + e^{-i Sign[p] 2 phi} BesselI[Abs[p] + 1, q[n, xo]])
    (1 - KroneckerDelta[p, 0]) + Cos[phi] BesselI[1, q[n, xo]] KroneckerDelta[p, 0]);
gTMst[n_, p_, xo_, phi_] = Conjugate[gTM[n, p, xo, phi]];

```

```

Z[n, p, phi] F[n, xo]
  (-i Sign[p] (BesselI[Abs[p] - 1, q[n, xo]] - e^{-i Sign[p] 2 phi} BesselI[Abs[p] + 1, q[n, xo]])
    (1 - KroneckerDelta[p, 0]) + Sin[phi] BesselI[1, q[n, xo]] KroneckerDelta[p, 0]);
gTEst[n_, p_, xo_, phi_] = Conjugate[gTE[n, p, xo, phi]];

```

```

U[n_, m_, p_][xo_, phi_] := an[n] anst[m] gTM[n, p, xo, phi] gTMst[m, p + 1, xo, phi] +
  bn[n] bnst[m] gTE[n, p, xo, phi] gTEst[m, p + 1, xo, phi];
V[n_, m_, p_][xo_, phi_] := i bn[n] anst[m] gTE[n, p, xo, phi] gTMst[m, p + 1, xo, phi] -
  i an[n] bnst[m] gTM[n, p, xo, phi] gTEst[m, p + 1, xo, phi];
S[n_, m_, p_][xo_, phi_] := (an[n] + anst[m]) gTM[n, p, xo, phi] gTMst[m, p + 1, xo, phi] +
  (bn[n] + bnst[m]) gTE[n, p, xo, phi] gTEst[m, p + 1, xo, phi];
T[n_, m_, p_][xo_, phi_] := i (bn[n] + anst[m]) gTE[n, p, xo, phi] gTMst[m, p + 1, xo, phi] -
  i (an[n] + bnst[m]) gTM[n, p, xo, phi] gTEst[m, p + 1, xo, phi];

```

```

c1[n_, m_, p_][xo_, phi_] :=
  (S[m, n, p - 1][xo, phi] + S[n, m, -p][xo, phi] - 2 U[m, n, p - 1][xo, phi]
    - 2 U[n, m, -p][xo, phi]) (
    KroneckerDelta[m, n + 1] / m^2 - KroneckerDelta[n, m + 1] / n^2);

```

```

c2[n_, m_, p_][xo_, phi_] := 2 n + 1 / n^2 (n + 1)^2 KroneckerDelta[n, m]
  (T[m, n, p - 1][xo, phi] - T[n, m, -p][xo, phi] - 2 V[m, n, p - 1][xo, phi]
    + 2 V[n, m, -p][xo, phi]);

```

```

nmin[p_, xo_] := Max[{p, lo[xo] - 20}];
mmin[p_, xo_] := Max[{1, p - 1, lo[xo] - 20}];
nmax[xo_] := Min[{la, lo[xo] + 20}];

```

```

c[xo_, φo_] := Sum[Sum[Sum[1/2 * (n+p)!/(n-p)! * (c1[n, m, p][xo, φo]
+ c2[n, m, p][xo, φo]);

```

```

cz[xo_, φo_] :=

```

```

Sum[Sum[1/(n+1)^2 * (n+1+Abs[p])!/(n-Abs[p])!
Re[(an[n] + anst[n+1] - 2 an[n] anst[n+1])
gTM[n, p, xo, φo] gTMst[n+1, p, xo, φo] +
(bn[n] + bnst[n+1] - 2 bn[n] bnst[n+1])
gTE[n, p, xo, φo] gTEst[n+1, p, xo, φo]] +
p/(n^2 (n+1)^2 * (n-Abs[p])!
Re[i (2 an[n] bnst[n] - an[n] - bnst[n])
gTM[n, p, xo, φo] gTEst[n, p, xo, φo]]];

```

(\* pode se utilizar o programa e as expressões acima para se fazer os gráficos em função da posição foco-centro para a direção de movimento paralela e perpendicular à polarização \*)

```

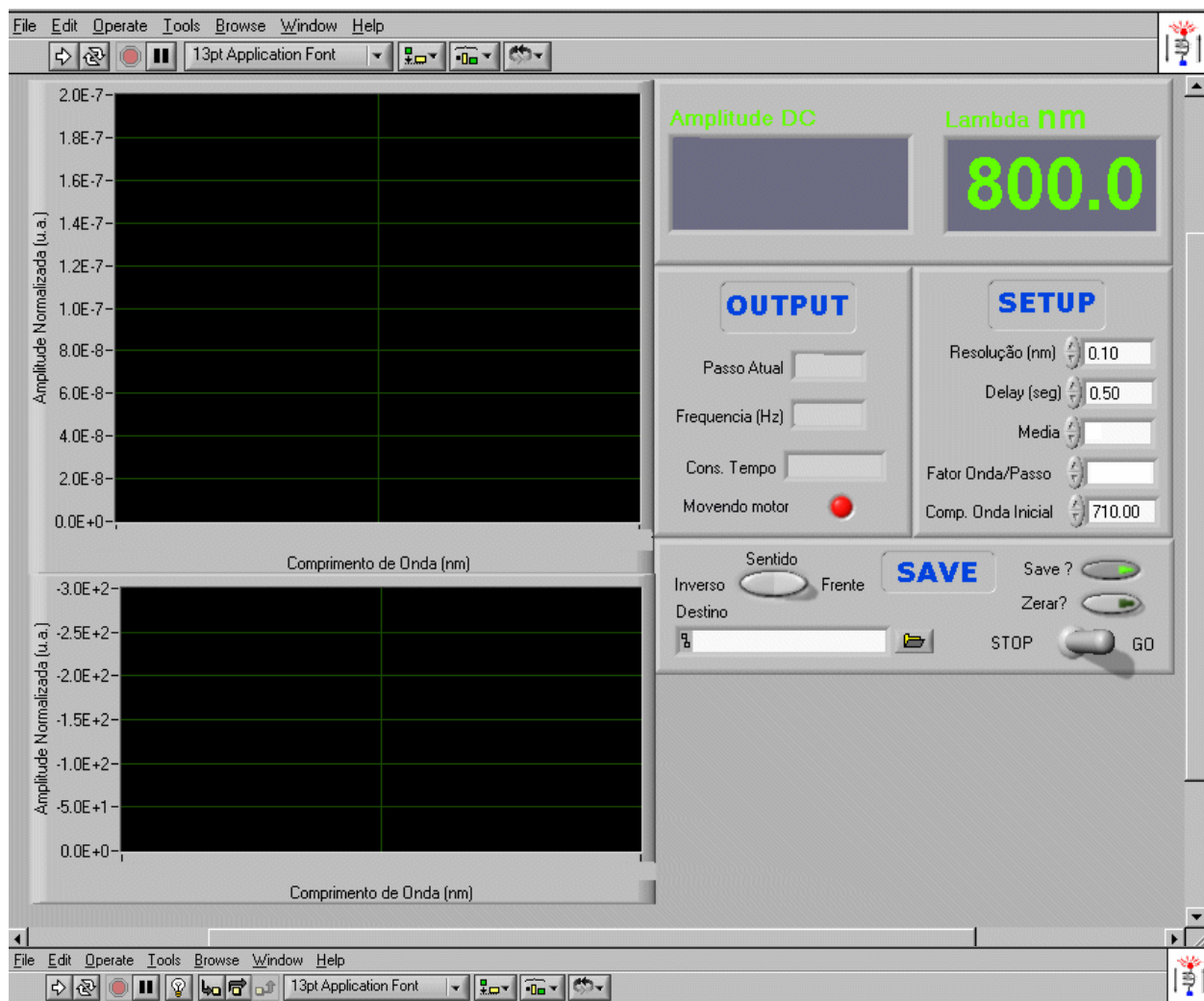
wo = 0.5; (*definir o "spot size"*)

```

```

(* Paralela = Sqrt[(Fx)^2 + (Fz)^2] = Sqrt[(Re[c[xo,0]])^2 + (cz[xo,0])^2]
Perpendicular = Sqrt[(Fy)^2 + (Fz)^2] = Sqrt[(Im[c[xo,Pi/2]])^2 + (cz[xo,Pi/2])^2] *)

```





## Referências

---

- 1 Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm, S. Chu: "Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles". Optics Lett. 11, pg. 288, 1986.
- 2 A. Ashkin, J. Dziedzic: "Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria". Science 235, pg. 1517, 1987.
- 3 C.S. Buer, K.T. Gahagan, A. Grover A et al.: "Insertion of Agrobacterium rhizogenes into Ginkgo biloba using lasers as optical tweezers and scalpel". Plant Physiol. 114, pg. 1613, 1997.
- 4 [Anon]: "Optical tweezer attaches single DNA molecular to silicon". Laser Focus World, 34, pg. 9, 1998.
- 5 A. Obruca, H. Strohmer, A. Blaschitz et al.: "Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er : YAG) laser". Hum. Reprod. 12, pg. 2242, 1997.
- 6 S. Sugiura, N. Kobayakawa, H. Fujita et al.: "Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique - Molecular basis for cardiac adaptation". Circ. Res. 82, pg. 1029, 1998.
- 7 N. Thomas, R.A. Thornhill: "The physics of biological molecular motors". J. Phys. D: Appl. Phys. 31, pg. 253, 1998.
- 8 H. Felgner, R. Frank, M. Schliwa: "Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers". J. Cell Sci. 109, pg. 509, 1996.
- 9 K. Sakata-Sogawa, M. Kurachi, K. Sogawa K et al.: "Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions". Eur. J. Biophys. 27, pg. 55, 1998.

- 
- 10** K. Konig, L. Svaasand, Y.G. Liu et al.: "Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap". *Cell Mol. Biol.* 42, pg. 501, 1996.
- 11** K. Helmerson, R. Kishore, W.D. Phillips et al.: "Optical tweezers-based immunosensor detects femtomolar concentrations of antigens". *Clin Chem* 43, pg. 379 1997.
- 12** H.C. Berg, R.M. Berry: "Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, pg. 14433, 1997.
- 13** K. Ajito e K. Torimitsu: "Single nanoparticle trapping using a Raman tweezers microscope". *Appl. Spectros.* 56, pg. 541, 2002.
- 14** S. Chu, J. E. Bjorkholm, A. Ashkin, and A. Cable: "Experimental Observation of Optically Trapped Atoms". *Phys. Rev. Lett.* 57, pg. 314, 1986.
- 15** A. Ashkin and J. M. Dziedzic: "Observation of Radiation-Pressure Trapping of Particles by Alternating Light Beams". *Phys. Rev. Lett.* 54, pg. 1245, 1985.
- 16** A. Ashkin: "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure". *Phys. Rev. Lett.* 24, pg. 156, 1970.
- 17** A. Ashkin, J. M. Dziedzic: "Stability of Optical Levitation by Radiation Pressure". *Appl. Phys. Lett.* 24 (12), pg. 586, 1974.
- 18** S. Chu, L. Hollberg, J. E. Bjorkholm, A. Cable, and A. Ashkin: "Three-dimensional viscous confinement and cooling of atoms by resonance radiation pressure". *Phys. Rev. Lett.* 55, pg. 48, 1985.
- 19** A. Ashkin, J. Dziedzic, T. M. Yamane: "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams". *Nature* 330, pg. 769, 1987.



- 
- 20** Tese de Doutorado de Gaston Esteban Tudury – Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Física Gleb Wataghin.
- 21** A. Ashkin, J. M. Dziedzic: “Observation of Resonances in Radiation Pressure on Dielectric Particles”. *Phys. Rev. Lett.* 38 (23), pg.1351, 1977.
- 22** A. Ashkin, J. M. Dziedzic: “Observation of Optical of Dielectric Particles by Light-Scattering”. *Appl. Optics* 20 (10), pg.1803, 1981.
- 23** P. W. Barber e R. K. Chang: “Optical effects associated with small particles”, World Sci., 1988.
- 24** G. Gouesbet: “Exact description of arbitrary-shaped beams for use in light-scattering theories”. *J. Opt. Soc. Am. A* 13 (12), pg. 2434, 1996.
- 25** P. A. M. Neto e H. M. Nussenzveig: “Theory of optical tweezers”. *Europhys. Lett.* 50 (5), pg. 702, 2000.
- 26** A. Mazolli, P. A. M. Neto e H. M. Nussenzveig: “Theory of trapping forces in optical tweezers”, *Proc. R. Soc. London A: Mayh. Phys. Eng. Sci.* 459 (2040), pg. 3021, 2003.
- 27** Tese de Doutorado de Alexander Mazolli – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Física.
- 28** C. F. Bohren, D. R. Huffman: “Absorption and scattering of light by small particles”, John Wiley, 1983.
- 29** H. C. Van de Hulst: “Light Scattering by Small Particles”, Dover, 1981.
- 30** J. D. Jackson: “Classical Eletrodynamics”, John Wiley, 1999.
- 31** H. M. Nussenzveig: “Diffraction Effects in Semiclassical Scattering”, Cambridge, 1992.
- 32** H. Goldstein: “Classical Mechanics”, Addison-Wesley, 1969.

- 
- 33 G. Gouesbet, B. Maheu, and G. Gréhan: "Light scattering from a sphere arbitrarily located in a Gaussian beam, using a Bromwich formulation", J. Opt. Soc. Am. A 5 (9), pg. 1427, 1988.
- 34 J. B. Bateman, E. J. Weneck, D. C. Eshler: "Determination of Particle Size and Concentration from Spectrophotometric Transmission", J. Colloid Science 14, pg. 308, 1959.
- 35 L. Mees, G. Gouesbet, G. Gréhan: "Interaction Between Femtosecond Pulses and a Spherical Microcavity: internal fields", Optics Communications 199, pg. 33, 2001.
- 36 L. W. Davis, "Theory of Eletromagnetic Beams", Phys. Rev. A 19, pg. 1177 , 1979.
- 37 K. F. Ren, G. Gouesbet, and G. Gréhan: "Integral Localized Approximation in Generalized Lorenz-Mie Theory", Appl. Opt. 37 (19), pg. 4218, 1998.
- 38 J. A. Lock: "Improved Gaussian Beam-Scattering Algorithm", Appl. Opt. 34 (3), pg. 559, 1995.
- 39 J. A. Lock, G. Gouesbet: "Rigorous justification of the localized approximation to the beam-shape coefficients in generalized Lorenz-Mie theory. I. On-axis beams.", J. Opt. Soc. Am. A 11 (9), pg. 2503, 1994.
- 40 J. A. Lock: "Excitation efficiency of a morphology-dependent resonance by a focused Gaussian beam.", J. Opt. Soc. Am. A 15 (12), pg. 2986, 1998.
- 41 J. P. Barton, D. R. Alexander, S. A. Schaub: "Theoretical Determination of Net Radiation Force and Torque for a Spherical Particle Illuminated by a Focused Beam.", J. Appl. Phys. 66 (10), pg. 4594, 1989.
- 42 B. Richards, E. Wolf: "Eletromagnetic Diffraction in Optical Systems II. Structure of the Image Field in an Aplanatic System", Proc. R. Soc. Lon. A 253 (1274), pg. 358, 1959.

- 
- 43 J. X. Cheng, A. Volkmer, X. S. Xie: "Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", J. Opt. Soc. Am. B 19 (6), pg. 1363, 2002.
- 44 G. Gouesbet, G. Gréhan, B. Maheu: "Localized interpretation to compute all the coefficients  $g_n^m$  in the generalized Lorenz-Mie theory", J. Opt. Soc. Am. A 7 (6), pg. 998, 1990.
- 45 K. F. Ren, G. Gréhan, G. Gouesbet: "Radiation Pressure Forces Exerted on a Particle Arbitrarily Located in a Gaussian Beam by Using the Generalized Lorenz-Mie Theory, and Associated Resonance Effects", Optics Communications 108, pg. 343, 1994.
- 46 K. F. Ren, G. Gréhan, G. Gouesbet: "Symmetry relations in generalized Lorenz-Mie theory", J. Opt. Soc. Am. A 11 (6), pg. 1812, 1994.
- 47 P. R. Fisher, R. Merkl, and G. Gerisch: "Quantitative analysis of cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium discoideum* by using an image processing system and a novel chemotaxis chamber providing stationary chemical gradients". J. Cell. Biol. 108, pg. 973, 1989.
- 48 C. G. Xie, M. A. Dinno, Y. Q. Li: "Near-infrared Raman Spectroscopy of Single Optically Trapped Biological Cells". Optics Letters 27, pg. 249, 2002.
- 49 S. H. Lin: "Advances in Multi-photon Processes and Spectroscopy", World Sci., 1987.
- 50 W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb: "2-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", Science 248 (4951), pg. 73, 1990.
- 51 C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, W. W. Webb: "Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, pg. 10763, 1996.

- 
- 52 H. J. Koester, D. Baur, R. Uhl, S. W. Hell: "Ca<sup>2+</sup> Fluorescence Imaging with Pico- and Femto second Two-Photon Excitation: Signal and Photodamage", *Biophys. J.* 77, pg. 2226, 1999.
- 53 K. Konig: "Laser Tweezers and Multiphoton Microscopes in Life Sciences". *Hyst. and Cell Biol.* 114, pg. 79, 2000.
- 54 K. S. Biswas, H. S. Thatte, S. F. Najjar, J. Rhee, V. Birjiniuk, M. D. Crittenden, T. Michel, and S. F. Khuri: "Multi-photon Microscopy in the Evaluation of Human Saphenous Vein". *Journal of Surgical Research* 95, 37, 2001.
- 55 V. E. Centonze and J. G. White: "Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging", *Biophys. J.* 75, pg. 2015, 1998.
- 56 D. A. Long: "Raman Spectroscopy", McGraw-Hill International, 1977.
- 57 K. Inoue, K. Watanabe: "Resonant Hyper-Raman Scattering due to the Forbidden LO phonon in SrTiO<sub>3</sub>". *Phys. Rev. B* 39 (3), pg. 1977, 1989.
- 58 H. Vogt: "Hyper-Raman Tensors of the Zone-Center Optical Phonons in SrTiO<sub>3</sub> and KTaO<sub>3</sub>", *Phys. Rev. B* 38 (8), pg. 5699, 1988.
- 59 W. Mohler, A. C. Millard, and P. J. Campagnola: "Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins", *Methods* 29, pg. 97, 2003.
- 60 Dissertação de Mestrado de Adriana Fontes – Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Física Gleb Wataghin.
- 61 J. Happel, H. Brenner: "Low Reynolds Number Hydrodynamics with Special Applications to Particulate Media, Dordrecht : Klumer, 1991.
- 62 W. Wright, J. Sonek, M. Berns: "Parametric Study of the Forces on Microspheres Held by Optical Tweezers". *Appl. Opt.* 33 (9), pg. 1735, 1994.

- 
- 63 H. Felgner, O. Müller, M. Schliwa: "Calibration of light forces in optical tweezers". Appl. Opt. 34 (6), pg. 977, 1995.
- 64 Who, Whorld Health Organization, 2001.
- 65 R. Killick-Kendrick: "The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host". Ann. Parasitol. Hum. Comp 65 (Suppl. I), pg. 37, 1990.
- 66 E. Handman: "Cell Biology of leishmania", Adv. Parasitol 44, pg. 1, 2000.
- 67 P.S.T. Veras, A Topilko, N. Gouhier, M.-F. Moreau, M. Rabinovitch, M. Pouchelet: "Fusion of Leishmania amazonensis parasitophorous vacuoles with phagosomes containing zymosan particles: Cinemicrographic and ultrastructural observations", Braz. J. Med. Biol. Res 29, pg. 1009, 1996.
- 68 J. A Maga, J.H. LeBowitz: "Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod", Trends Cell Biol. 9, pg. 409, 1999.
- 69 H. Liang, K. T. Vu, P. Krishnan, T. C. Trang, D. Shin, S. Kimel, M. W. Berns, "Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping." Biophys. J. 70 (3), pg. 1529, 1996.
- 70 H. Liang, W. H. Wright, W. He, M. W. Berns. "Micromanipulation of chromosomes in PTK-2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical forces (optical tweezers)". Exp. Cell Res. 204 (1), pg.110, 1993.
- 71 S. Shohet e N. Mohandas. "Red Cell Membranes", Churchill-Livingston, 1988.
- 72 R. Hochmuth, P. Worthy, E. Evans: "Red Cell Extensional Recovery and the Determination of Membrane Viscosity". Biophys. J. 26, pg.101, 1979.
- 73 Tese de Doutorado de Marcelo Brandão – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Médicas.

- 
- 74 E. Evans, R. Hochmuth: "Membrane viscoelasticity". *Biophys. J.* 16, pg. 1, 1976.
- 75 R. Waugh; E. Evans: "Thermoelasticity of Red Blood Cell Membrane". *Biophys. J.* 26, pg. 115, 1979.
- 76 S. H. Embury, R. P. Hebbel, N. Mohandas: "Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice", Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- 77 M. M. Brandão<sup>\*1</sup>, A. Fontes<sup>\*2</sup>, M. L. Barjas-Castro<sup>\*1</sup>, L. C. Barbosa<sup>\*2</sup>, F. F. Costa<sup>\*1</sup>, C. L. Cesar<sup>\*2</sup>, S. T. O. Saad<sup>\*1</sup> - <sup>\*1</sup>Hematology and Hemotherapy Center. <sup>\*2</sup>Instituto de Física Gleb Wataghin: "Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease"; *European Journal of Haematology* 70(4), pg. 207, 2003.
- 78 Y. Suzuki, N. Tateish, I. Cicha, et al. "Decreased deformability of the X-ray-irradiated red blood cells stored in manitol-adenine-phosphate medium." *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 22, pg. 133, 2000.
- 79 R. J. Davey, N.C. McCoy, M. Yu, J. A. Sullivan, et al. "The effect of prestorage irradiation on post transfusion red cell survival". *Transfusion* 22, pg. 96, 1992.
- 80 I. Cicha, Y. Suzuki, N. Tateish, et al. "Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in manitol-adenine-phosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress". *Vox Sang* 79, pg. 75, 2000.
- 81 M. L. Barjas-Castro<sup>\*1</sup>, M. M. Brandão<sup>\*1</sup>, A. Fontes<sup>\*2</sup>, F. F. Costa<sup>\*1</sup>, C. L. Cesar<sup>\*2</sup>, S. T. O. Saad<sup>\*1</sup> - <sup>\*1</sup>Hematology and Hemotherapy Center. <sup>\*2</sup>Instituto de Física Gleb Wataghin: "Elastic properties of irradiated red blood cell units measured by optical tweezer"; *Transfusion* 42(9), pg. 1196, 2002.
- 82 M. M. Brandão<sup>\*1</sup>, S. T. O. Saad<sup>\*1</sup>, C. L. Cesar<sup>\*2</sup>, A. Fontes<sup>\*2</sup>, F. F. Costa<sup>\*1</sup>, M. L. Barjas-Castro<sup>\*1</sup> - <sup>\*1</sup>Hematology and Hemotherapy Center. <sup>\*2</sup>Instituto de Física Gleb Wataghin, "Elastic

---

properties of stored red blood cells from sickle trait donor units"; *Vox Sanguinis* 85, pg. 213, 2003.

**83** E. M. Purcell: "Life at Low Reynolds Number". *A. J. Phys.* 45 (3), pg. 124, 1977.

**84** J. Happel, H. Brenner: "Low Reynolds Number Hydrodynamics with Special Applications to Particulate Media, Dordrecht : Klumer, 1991.

**85** S. Kim, S. J. Karrila: "Microhydrodynamics", Butterworth, 1991.