



**BRUNO FEDOSSE ZORNIO**

**ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA TEORIA DE KRAMERS  
UTILIZANDO PINÇAS ÓPTICAS E DINÂMICA DE LANGEVIN**

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**BRUNO FEDOSSE ZORNIO**

**ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA TEORIA DE KRAMERS  
UTILIZANDO PINÇAS ÓPTICAS E DINÂMICA DE LANGEVIN**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RENÉ ALFONSO NOME SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA  
ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA  
POR BRUNO FEDOSSE ZORNIO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. RENÉ ALFONSO NOME  
SILVA.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

Zornio, Bruno Fedosse, 1990-  
Z77e      Estudo teórico e experimental da teoria de Kramers utilizando pinças ópticas e dinâmica de Langevin / Bruno Fedosse Zornio. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: René Alfonso Nome Silva.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cinética química. 2. Teoria de Kramers. 3. Dinâmica de Langevin. 4. Pinças ópticas. I. Silva, René Nome Alfonso. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Theoretical and experimental studies on Kramers theory using optical tweezers and Langevin dynamics

**Palavras-chave em inglês:**

Chemical kinetics

Kramers theory

Langevin dynamics

Optical tweezers

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Mestre em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:**

René Alfonso Nome Silva [Orientador]

Celso Aparecido Bertran

Pedro Francisco Aramendía

**Data de defesa:** 22-08-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe Elenir e ao meu pai Umberto como forma de reconhecimento por todo apoio e dedicação na minha formação pessoal e acadêmica. Agradeço em especial à minha irmã Clarice por toda ajuda (que não foi pouca) na confecção deste texto, e ao meu irmão Antonio pela admiração e ligação. À minha namorada Paola pelo companheirismo e paciência neste processo.

Às minhas avós Izaura e Neusa e ao meu avô Gelindo pelo carinho atribuído a mim, e às minhas tias Elizabete, Eliana e Débora, ao meu tio Gilberto pelo suporte quando necessário e à minha prima Marina pela amizade.

Agradeço ao pessoal que mora comigo, Guilherme, Vinicius, Henrique, Luiz Felipe, Rodrigo e Murilo, e ao nosso cão Tupi, por dividir cotidianamente o espaço (ou a bagunça) e pela amizade. Aos colegas de laboratório (a todos), mas em especial aos que mais convivo, Willian, Luís Gustavo, Guilherme Ferbonink, Shawan, José Carlos, Débora, Wanderléia e Marcelo, e ao pessoal do CAEQ pelos momentos de descontração.

Aos Professores Pedro Aramendía e Celso Bertran pela disponibilidade em participar da minha banca.

À professora Teresa Atvars pela infra-estrutura.

Ao meu orientador Rene Nome pelas conversas e pelo entusiasmo pela ciência.

Aos membros da CPG (Bel, Gabriela e Miguel) pela grande paciência e auxílio nas questões burocráticas.

Ao Instituto de Química da UNICAMP e ao CNPQ, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

## CURRÍCULO

- 2012 - 2014** Mestrado em Química.  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil  
Título: Estudo teórico e experimental da teoria de Kramers utilizando pinças ópticas e dinâmica de Langevin, Ano de obtenção: 2014  
Orientador: René Alfonso Nome Silva  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
*Palavras-chave: pinça óptica, dinâmica de Langevin, teoria de Kramers*  
*Áreas do conhecimento : Físico-Química*  
*Sectores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico*
- 2008 - 2012** Graduação em Bacharelado em Química.  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2006 - 2007** Ensino Profissional de nível técnico .  
Etec Conselheiro Antonio Prado, ETECAP, Brasil

---

### Formação complementar

- 2009 - 2009** Extensão universitária em VIBROS II - Curso de Espectroscopia Vibracional.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

---

### Projetos

- Projetos de pesquisa  
**2010 - 2011** Síntese de Complexos Trinucleares de Manganês e Crômio e sua Imobilização em Sílica SBA-15  
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (1);  
Integrantes: Bruno Fedosse Zornio; André Luiz Barboza Formiga (Responsável)
- 2009 - 2010** Síntese de Novos Precursores de Supermoléculas: Compostos Trinucleares de Manganês  
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (1);  
Integrantes: Bruno Fedosse Zornio; André Luiz Barboza Formiga (Responsável)

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos em revistas (Magazine)

1. FORMIGA, A. L. B., **ZORNIO, B. F.**  
NEMS, um desafio para os cientistas.. Novidades na Ciência SBQ Rio. , 2009.  
*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Hipertexto. Home page: <http://www.uff.br/sbqrio>*

#### Apresentação de trabalho e palestra

1. **ZORNIO, B. F.**, OLIVEIRA, F. J. V. E., FORMIGA, A. L. B.  
**Síntese de Complexos Trinucleares de Manganês e Crômio e sua Imobilização em Sílica SBA-15**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Unicamp; Cidade: Campinas; Evento: XIX Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp; Inst.promotora/financiadora: Cnpq*
2. **ZORNIO, B. F.**, OLIVEIRA, F. J. V. E., FORMIGA, A. L. B.  
**Facile Preparation of trinuclear chromium complex covalently bound to mesoporous SBA-**

**15, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)**

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [http://sbpmat.org.br/9encontro/especific\\_files/papers/H503.pdf](http://sbpmat.org.br/9encontro/especific_files/papers/H503.pdf); Cidade: Ouro Preto; Evento: IX Encontro da SBPMat; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais*

**3. ZORNIO, B. F., YOSHIDA, I. V. P.**

**Inserção de complexos trinucleares de Cr e Mn em matriz de siloxano, 2010.**  
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

*Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Unicamp; Cidade: Campinas; Evento: XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp; Inst.promotora/financiadora: Cnpq*

## **RESUMO**

### **ESTUDO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA TEORIA DE KRAMERS UTILIZANDO PINÇAS ÓPTICAS E DINÂMICA DE LANGEVIN**

No final do século XIX Van't Hoff empiricamente estabeleceu que a constante de velocidade de uma reação química é função exponencial da razão entre energia de ativação da reação pela energia térmica do ambiente (e, portanto função da temperatura). Há uma variada ordem nas escalas de tempos reacionais, sendo, em especial, as constantes de velocidade de reações lentas (por exemplo, de reações bioquímicas não catalisadas) muito complicadas de serem determinadas. Uma partícula difundindo em um meio viscoso que apresenta movimento aleatório – com posição média nula (em um intervalo de tempo suficientemente grande), e a variância da posição linearmente dependente em função do tempo – é dita browniana, e quando submetida a um potencial bi quadrático é um bom modelo para descrição de reações químicas. A partir da dinâmica de Langevin (que serve para descrever a dinâmica de uma partícula browniana) é derivada a teoria de Kramers para meio viscosos - que relaciona o formato da curva potencial com a constante de taxa de reações químicas. Experimentalmente pode-se recriar esse modelo utilizando pinças ópticas que são instrumentos capazes de aprisionar partículas da ordem micrométrica em suspensão; no caso, pode-se recriar um potencial bi estável utilizando uma pinça óptica dupla, ou seja, que possuem dois pontos de aprisionamento. Este estudo tem como objetivo avaliar a constante de taxa de um processo de transição entre poços de potencial de partículas brownianas teoricamente utilizando uma simulação de dinâmica de Langevin para sistemas em equilíbrio, tanto para sistemas antes de atingir o equilíbrio, assim como como para determinar experimentalmente o coeficiente de difusão a partir da trajetória temporal de uma única partícula utilizando-se de técnicas de microscopia. Os resultados teóricos obtidos são bastante condizentes com os resultados experimentais descritos na literatura, assim como as previsões da constante de taxa para tempos antes do equilíbrio apresentam correlação com o sistema em equilíbrio. Com relação à estimativa do coeficiente de difusão, os resultados apresentam um erro sistemático associado ao tamanho da trajetória temporal de uma única partícula.

## **ABSTRACT**

### **THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES ON KRAMERS THEORY USING OPTICAL TWEEZERS AND LANGEVIN DYNAMICS**

By the end of the XIX century, Van't Hoff has empirically established that the rate constants of chemical reactions are exponentially dependent on the ratio between the reaction activation energy and the environment thermal energy (and therefore function of temperature). There is a wide variety of reaction timescales, in particular, the rate constant of slow reactions (such as uncatalysed biochemical reactions) is difficult to determine. A diffusing particle in a viscous environment which exhibit random motion – with average position (in a sufficiently large time series) is zero, and the position variance is linearly time dependent – is called Brownian, and when is submitted into a biquadratic potential it's a good model to describe chemical reactions. By the Langevin dynamics (which serves to describe the Brownian particle motion) the Kramers theory for viscous media is derived – that theory connects the potential energy shape with the chemical rate constant -. Experimentally it is possible to create this model using optical tweezers. Optical tweezers are capable to trap micrometrical beads in suspension, it can generate a bi-stable potential using a double optical tweezers (that is with two trapping points). The main objective of this essay is to evaluate the rate constant of Brownian particles jumping between potential wells theoretically using Langevin dynamics simulations for the system at equilibrium and before reaching chemical equilibrium, as determinate experimentally the diffusion coefficient of single particle time path using video microscopy. The theoretical results is very consistent with experimental results described in literature, as well as the prediction of the rate constant for the system before reaches equilibrium are correlated with the rate constant for the system at equilibrium. For the diffusion coefficient estimative it was observed that there is a systematical source of errors, and it is related with the length of the time series of the single particle path.

## Sumário

TABELA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE VARIÁVEIS .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.2. Dinâmica Browniana .....	6
1.3. Dinâmica de Langevin.....	8
1.4. Teoria do estado de transição.....	9
1.5. Teoria de Kramers.....	11
1.6. Pinças ópticas .....	13
2. OBJETIVOS .....	16
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	16
3.1. Características gerais da Pinça Óptica: .....	16
3.2. Pinça Óptica Dupla.....	17
3.3. Montagem e alinhamento.....	19
3.4. Sistema de Partículas .....	21
3.5. Preparo da amostra.....	22
3.6. Aquisição de dados.....	22
3.7. Calibração da Imagem .....	24
3.8. Caracterização do movimento Browniano.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1. Simulação da Dinâmica de Langevin .....	27
4.1.1. Considerações sobre o programa.....	27
4.1.2. Resultados das Simulações .....	31
4.1.3. Momentos Estatísticos.....	35
4.1.3.1. Intervalos Contínuos .....	38
4.1.3.2. Intervalos Crescentes .....	39
4.1.4. Taxa antes da média .....	45
4.1.5. Número de Transições .....	48
4.2. Pinças Ópticas - Resultados Experimentais.....	52
4.2.1. Caracterização do movimento Browniano.....	52
4.2.2. Caracterização do potencial do laser.....	63
4.2.3. Simulação Pinça Dupla.....	65
4.2.3.1. Considerações sobre o programa .....	65
4.2.3.2. Resultados da Simulação.....	66
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	67
BIBLIOGRAFIA .....	69

## TABELA DE FIGURAS

Figura 1: Série temporal típica de um sistema de dois estados, retirado do trabalho de Hånggi e McClintock [1985].....	5
Figura 2: Diagrama das forças envolvidas na manipulação óptica (a) adaptado de ASHKIN [1997] e b) adaptado de ASHKIN e col. [1985] .....	14
Figura 3: Esquema óptico da pinça dupla. ....	18
Figura 4: Espectro de emissão da amostra $\text{LaF}_3/\text{Er}/\text{Yb}$ excitada pelo laser com comprimento de onda de 975 nm. A banda no infravermelho é do laser .....	20
Figura 5: Comparação entre os métodos de detecção do foco da objetiva: a) perfil de reflexão do laser captado pela câmera e b) imagem do material $\text{LaF}_3/\text{Er}/\text{Yb}$ quando exposto ao laser no ponto focal.....	21
Figura 6: a) amostra em escala de cinza; b) fundo em escala de cinza; c) amostra limiarizada; d) fundo limiarizado; e) subtração do fundo da amostra). ....	24
Figura 7: a) posição da partícula em função do tempo, b) histograma de distribuição de posições, c) curva potencial biestável. ....	29
Figura 8: Resultados dos histogramas de distribuição espacial para diferentes razões entre energia de ativação e energia térmica do ambiente ( $V_0=k_B \cdot 600\text{K}$ )..	32
Figura 9: a) Superfície potencial com as frequências $\omega_0$ e $\omega_b$ ; b) perfil da taxa de Kramers em função da viscosidade. ....	34
Figura 10: Gráficos dos momentos estatísticos quando o vetor posição é dividido de acordo com a primeira maneira, intervalos contínuos. Resultados para a) média b) variância c) simetria e d) curtose. ....	37
Figura 11: Gráficos dos momentos estatísticos quando o vetor posição é dividido de acordo com a segunda maneira, intervalos crescentes. Resultados para a) média b) variância c) simetria e d) curtose.....	38
Figura 12: Comparação entre as diferentes frequência de divisão $h=10$ e $h=50$ para as temperaturas de 300 e 600 K).....	40
Figura 13: Efeito da temperatura sobre a média das velocidades.....	41
Figura 14: Critério para determinação dos tempos de convergência $t_1$ e $t_2$ .....	42
Figura 15: Análises das curvas de potencial em função do tempo de convergência para as temperaturas de a) 300 K, b) 400 K, c) 500 K e d) 600K.....	44
Figura 16: Curvas de energia potencial em função da fração de tempo para a temperatura de 300K.....	46
Figura 17: Efeito da regressão polinomial sobre as regiões de poço e barreira para o tempo total e para 1% do tempo. ....	48
Figura 18: Curvas de decaimento exponencial do número de transições em função da razão $V_0/k_B T$ para diferentes tamanhos da série temporal. ....	51
Figura 19: Resultados experimentais para uma partícula browniana a) trajetória e b) posição em função do tempo .....	52
Figura 20: Resultados obtidos para o cálculo do coeficiente de difusão a) método 1 e b) método 2. ....	56
Figura 21: Comparação entre o periodograma experimental e teórico e entre as coordenadas do sistema. ....	61
Figura 22: Soma de séries temporais a) em vermelho a trajetória de um único experimento, em azul a soma das trajetórias de 24 experimentos; b) em vermelho	

o deslocamento de um único experimento, em azul a soma dos deslocamentos de 24 experimentos.....	62
Figura 23: Média e desvio padrão da estimativa do coeficiente de difusão em função do número de pontos da série temporal. ....	63
Figura 24: Constante de força do potencial em função da potencial de saída do laser. ....	64
Figura 25: Potencial na direção x em função de diferentes potenciais na direção y. ....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medidas de correlação entre distância e pixel feitas para diferentes perspectivas da régua. ....	25
Tabela 2: Resultados calculados dos fatores pré-exponencial de taxa de Kramers e TST .....	35
Tabela 3: tempos de convergência em função da temperatura.....	43
Tabela 4: Resultados calculados dos fatores pré-exponencial de taxa de Kramers e TST. ....	45
Tabela 5: Resultados para o fator pré-exponencial da taxa de Kramers em função da porcentagem de tempo .....	47
Tabela 6: Número de Transições calculado em função da temperatura e tamanho da série temporal.....	50
Tabela 7: Resultado para regressão de decaimento exponencial em função do tamanho da série temporal.....	51
Tabela 8: Comparação entre experimento e teoria e entre estimativas de coeficiente de difusão para o caso unidimensional. ....	58
Tabela 9: Comparação entre experimento e teoria e entre estimativas de coeficiente de difusão para o caso unidimensional. ....	59
Tabela 10: Resultados dos parâmetros ajustados da distribuição de posição constante de força.....	65

## LISTA DE VARIÁVEIS

$\alpha$  – polarizabilidade

$\beta$  –  $1/k_B \cdot T$

**D** - coeficiente de Difusão

**D<sub>cov</sub>** – coeficiente de difusão obtido pela covariância

**D<sub>hist</sub>** – coeficiente de difusão obtido pelo histograma de deslocamento

**D<sub>msd</sub>** – coeficiente de difusão obtido pelo deslocamento quadrático médio

**D<sub>teórico</sub>** - coeficiente de difusão teórico

**E<sub>a</sub>** - energia de ativação

**F<sub>esp</sub>** – força de espalhamento

**F<sub>grad</sub>** - força de gradiente

$\gamma$  - coeficiente de fricção

$\eta$  – viscosidade do meio

$\eta_m$  – índice de refração do meio

$\eta_p$  - índice de refração da partícula

**I** - intensidade luminosa

**k** – constante de taxa

**k<sup>0</sup>** – fator pré-exponencial da constante de taxa

**k<sup>0</sup><sub>kramers</sub>** - fator pré-exponencial de  $k_{kramers}$

**k<sub>B</sub>** – constante de Boltzmann

**k<sub>kramers</sub>** - constante de taxa obtida pelo modelo de Kramers

**k<sub>mol</sub>** – constante de força da mola

**k<sub>real</sub>** - constante de taxa real

**k<sub>tst</sub>** - constante de taxa obtida pelo modelo TST

**m** - massa da partícula

**N<sub>trans</sub>** – número de transições

**p<sub>i</sub>** – momento da partícula

**R** – constante universal dos gases

**r(t)** – trajetória bidimensional da partícula

**r<sub>p</sub>** - raio da partícula

**s** – secção de choque

**t** - tempo

**T** – temperatura

**$\tau_{lag}$**  – atraso de tempo

**$\tau_x$**  – tempo de residência na posição  $x$

**U(x)** – potencial do oscilador Harmônico

**V(x)** - função potencial

**V<sub>0</sub>** - altura da barreira potencial

**$\omega_0$**  – frequência do poço

$\omega_b$  - frequência da barreira  
 $\mathbf{x}(t)$  - posição da partícula  
 $\mathbf{x}_0$  - posição de referência  
 $\mathbf{x}_b$  - posição do máximo da barreira potencial  
 $\lambda$  - comprimento de onda da luz

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações Gerais

A classificação mais simples dada ao termo “reação química” infere em um processo no qual uma dada substância sofre certa transformação em relação à disposição de suas partículas, resultando em outra substância que apresenta propriedades diferentes da primeira. Por outra perspectiva, na qual se considera que o equilíbrio químico é o equilíbrio dinâmico das partículas, pode-se dizer que uma reação química é o processo de flutuação de concentração de certa entidade (dada aqui, geralmente em ordem molecular) que resulta na alteração dos estados dessa entidade [HOUSTON, 2001]. Em ambas as definições, o estudo da maneira como este processo se desenvolve com o tempo é chamado de cinética química.

Um dos princípios da cinética química é a velocidade de reação (ou taxa de reação) [HOUSTON, 2001]. O termo velocidade já nos traz implicitamente a noção de variação de uma grandeza espacial com o tempo (uma vez que  $v=dx/dt$ ), sendo, no caso das reações químicas, ligado com a taxa de variação da concentração de uma espécie pelo tempo da reação. Isto é, faz-se uma analogia entre posição (em mecânica) com concentração (em química). A definição formal de velocidade de reação genérica é dada pela Eq.1.

$$v = \frac{1}{\nu_i} \frac{d(x_i)}{dt} \quad \text{Eq.1}$$

sendo  $x_i$  referente às espécies químicas em questão e  $\nu_i$  aos seus respectivos coeficientes estequiométricos. De forma geral, pode-se atribuir uma direcionalidade e, assim, define-se que para os reagentes a velocidade é negativa e que para os produtos é positiva.

É importante ressaltar que a velocidade de reação é também função da temperatura e, a partir disto, é possível correlacionar a constante de velocidade com a temperatura. Empiricamente, no final do século XIX, Van't Hoff observou que a função  $\ln k=f(1/T)$  era linear [HOUSTON, 2001], sendo formalizada pela famosa equação de Arrhenius (Eq. 2).

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Eq.2}$$

De grosso modo, chegamos a duas grandes conclusões: a primeira delas é que a constante de velocidade é afetada exponencialmente pela temperatura e, sendo assim, uma pequena variação na temperatura leva a uma grande variação na constante de taxa. A segunda é o conceito de energia de ativação, que serve para introduzir a ideia de que uma reação química acontece somente quando o sistema acumula certa energia, que seja suficiente para que ocorra uma mudança no estado desse sistema.

Tendo em vista o elevado número de graus de liberdade de sistemas químicos, para se modelar o mecanismo de uma reação química se utiliza, frequentemente, uma descrição reduzida. Tal descrição consiste em um sistema de coordenadas que leva em consideração a energia do sistema em função do caminho de reação (leia-se caminho como sendo, por exemplo, o comprimento de uma ligação química ou o ângulo relativo entre três átomos em uma molécula). Neste sistema os estados estáveis, ditos inicial e final, têm energia definida em certo instante (ou posição) e estão separados por uma barreira energética. Para vencer esta barreira e formar os produtos da reação é preciso que haja energia, sendo o meio, portanto, o responsável para transferir essa energia para a partícula – vale dizer que a denominação dessa energia que o meio dispõe é chamada de energia térmica.

De fato, a definição de velocidade de reação vale para qualquer sistema. No entanto, é sabido que existem inúmeras classes de reações químicas, e conseqüentemente, é natural pensar que existam diferentes técnicas e escalas de tempo para se determinar a velocidade de uma reação química. Um exemplo simples, e bem ilustrativo, é o da rotação de uma ligação química: para a temperatura ambiente o tempo de meia vida (tempo necessário para converter 50% dos reagentes em produtos) da rotação da ligação simples C-C pode variar de 0,02 nanosegundos para uma molécula de etano a 100 bilhões de anos para a molécula do *cis*-difenil eteno [CLAYDEN et al., 2001]. Este resultado reflete, na verdade, um senso comum de que uma ligação simples pode girar livremente em relação a seu eixo, enquanto que uma molécula insaturada, em uma escala de tempo palpável, é rígida, não podendo, portanto, girar. No que diz respeito aos

experimentos voltados à determinação da constante de velocidade de uma reação tem-se duas situações-limite: se a reação for muito rápida é necessário um aparato experimental que seja capaz de medir quase que imediatamente as variações na concentração em função do tempo; já nos casos em que a reação é muito lenta (como no exemplo da rotação C-C do eteno) é inviável tentar observar variações nas concentrações, uma vez que estas variações não ocorrem em um tempo hábil. Nesse último caso, a maneira pela qual usualmente se determina a constante de taxa para reações muito lentas é com auxílio da equação de Arrhenius (Eq. 2): nesta abordagem, os experimentos são realizados em temperaturas mais altas e extrapolados para a temperatura ambiente. Esta metodologia, no entanto, pode apresentar limitações, já que o mecanismo da reação na grande maioria dos casos é dependente da temperatura. Assim sendo, muitas vezes ao realizar o experimento em temperaturas muito mais altas que a ambiente obtém-se a constante de velocidade para uma reação diferente daquela em temperatura mais baixas (apesar de ser o mesmo substrato). Limitações experimentais também são frequentes, já que é muito difícil realizar medidas em temperaturas mais altas que as do ponto de ebulição do solvente, ou mesmo, em condições em que o substrato pode se degradar [KIRBY e HOLLFELDER, 2009].

Determinar a constante de velocidade para reações muito lentas é de extrema importância, por exemplo, para as reações bioquímicas. Isto porque a grande maioria das reações em substratos biológicos é mediada por enzimas: avaliar a eficiência catalítica dessas enzimas requer comparação da razão entre a velocidade da reação catalisada e não catalisada. No entanto, muitos dos substratos biológicos são extremamente inertes quando em ausência de enzimas, havendo, portanto, constantes de velocidade muito baixas, que, como já dito, torna sua determinação muito trabalhosa. Considerando casos como esses é que se percebe a importância da obtenção das constantes de velocidade para reações muito lentas.

Nos casos gerais, para reações muito lentas, mudanças entre estados são geralmente muito sutis – por exemplo, é difícil observar pequenas variações na concentrações das entidades do sistema quando a velocidade é muito baixa.

Assim, podemos avaliar o comportamento reativo de certa entidade sob a perspectiva de uma única entidade reativa. Ou seja, como o equilíbrio dinâmico entre a conversão de um estado inicial (digamos reagentes) para um estado final (produtos) avaliado para uma única partícula. Desta maneira, a equação de Arrhenius (Eq. 2) deixa de estar associada à certa quantidade molar e passa a estar associada somente a uma única molécula, fazendo com que a Eq. 2 possa ser escrita da seguinte maneira:

$$k = Ae^{\frac{-V_0}{k_B T}} \text{ Eq. 3}$$

Note que a energia de ativação ( $E_a$ ) foi substituída pela grandeza  $V_0$ , chamada de altura da barreira para uma determinada função potencial (descrita por uma única molécula), e que a constante universal dos gases ( $R$ ) foi substituída pela constante de Boltzmann ( $k_B$ ). Um modelo em particular descrito por Kramers na década de 1940 [KRAMERS, 1940] relaciona o fator pré-exponencial “A” da Eq. 3 com os termos obtidos diretamente da curva de energia potencial do sistema – este modelo será mais bem discutido nas próximas secções. Pela descrição de Kramers, a própria forma da curva potencial referente a um sistema composto por uma única partícula é extremamente importante e pode trazer informações sobre a cinética do processo. O sistema pode ser físico, como descrito por Han e col. [1992], ou pode ser químico, como descrito nos estudos de Gillespie [1977] e de Siekierzycka e col. [2010]. Há, no entanto, uma série de trabalhos que descrevem a transição entre estados para sistemas bioquímicos, nos quais são, usualmente, estudadas as transições conformacionais de macromoléculas (como proteínas ou ácidos nucleicos). Nestes sistemas a superfície de energia potencial é obtida a partir das trajetórias conformacionais [DOBSON, 2003; LAI et al. 2011; LEVY et al. 2004]. Mais especificamente, uma série de trabalhos descreve como obter propriedades cinéticas do sistema a partir da curva de energia de potencial utilizando diretamente a teoria de Kramers [SOCCI et al. 1996; SCHULER 2002; BEST 2006; SCHULER 2008, CHUNG 2013].

Em geral esses estudos têm como característica obter a partir de uma série temporal de alguma propriedade (como posição ou intensidade luminosa) um gráfico de frequências e, assim, estimar o potencial no qual o sistema está

submetido. No que diz respeito ao perfil da série temporal para sistemas dinâmicos, observa-se constantemente um perfil que denota a flutuação da entidade em um estado definido, e em determinado instante, o sistema passa a flutuar em outro estado (como pode ser observado na Figura 1).

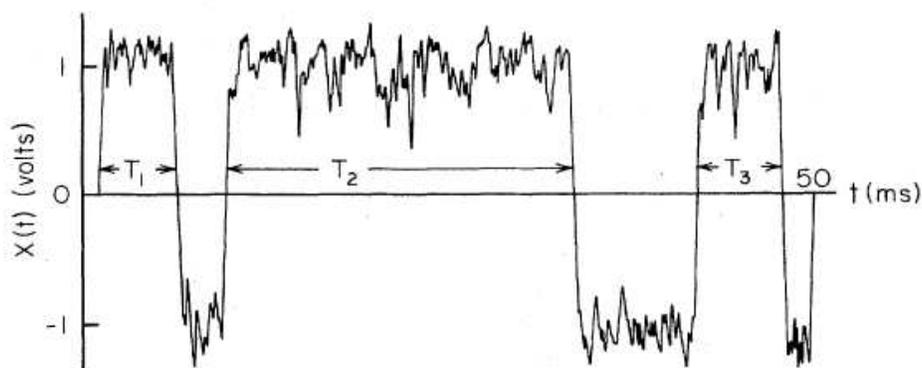


Figura 1: Série temporal típica de um sistema de dois estados, retirado do trabalho de Hänggi e McClintock [1985].

Ao traçar o comportamento de uma única partícula e considerando que se trata de um sistema unimolecular - isto é, no qual o gráfico da energia potencial em função das coordenadas de reação apresenta um estado estável para reagentes e produtos e um estado metaestável de transição. Nota-se que a série temporal em questão tem uma grande relação com a curva de energia potencial, uma vez que ela reflete: as regiões a) de estabilidade (região na qual a partícula passa a maior parte do tempo) que são representadas na figura pelas flutuações em  $x(t)=1$  ou  $x(t)=-1$  e b) de metaestabilidade (região nas quais há transições entre estados) na figura é representada pelos 'saltos'. De pronto se observa que o tempo associado a uma determinada transição (tempo que a partícula passa na região de metaestabilidade) é muito menor que o tempo no qual a partícula passa nas regiões estáveis - a esta fração de tempo é chamado de tempo de residência. No caso da Figura 1, estes tempos (de residência) são denotados pelos índices  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$  referentes às flutuações na vizinhança do estado estável  $x(t)=1$ .

Devido a essas considerações, uma reação química pode ser descrita como o movimento aleatório de uma partícula (que será descrita e definida como Browniana) em um potencial biestável simétrico ou assimétrico [NITZAN, 2010]. Aparentemente, esta situação está muito longe das descrições de uma reação

química clássica. Porém, a dinâmica de moléculas em solução é aleatória e os modelos matemáticos de ambas (cinética química e dinâmica browniana) são muito semelhantes, o que permite traçarmos um paralelo da situação em que existem espécies se interconvertendo de maneira imprevisível com o movimento aleatório de uma partícula em um potencial de duplo poço [NITZAN, 2010]. Assim sendo, para extrair os resultados bem conhecidos de cinética química a partir desta dinâmica, tais como dependência da constante cinética com a temperatura e barreira de ativação, a equação de Langevin correspondente, que se trata de uma equação diferencial utilizada para modelar partículas brownianas, deve ser resolvida.

### ***1.2. Dinâmica Browniana***

A origem das forças capazes de realizar movimentos erráticos em partículas microscópicas está na energia térmica do sistema. No que diz respeito a essa componente energética devem ser feitas duas considerações: a primeira delas é que não existe (em termos práticos e cotidianos) temperatura nula, uma vez que, sendo a temperatura uma propriedade que medimos e relacionamos com a energia térmica, não existe situação em que a energia é nula (mesmo quando possuímos temperaturas muito baixas). A segunda é que não existe um sistema completamente isolado, sendo as interações entre o sistema e a vizinhança os fatores responsáveis por fazer a energia se dissipar (por exemplo, por melhor que seja sua garrafa térmica, o líquido contido nela vai esfriar). No nível macroscópico, para se aproveitar a energia térmica para a realização de trabalho (e força) é necessária uma máquina a vapor e, portanto uma grande quantidade de calor e matéria envolvida. Já para sistemas microscópicos, a energia térmica do meio exerce grande influência nas partículas, o que a torna capaz de gerar trabalho (e força). O que nos permite inferir que, nessa perspectiva, um dos processos de dissipação de energia é, na verdade, a transferência da energia térmica do meio para a energia cinética de partículas [SIMHA, 1940].

A dinâmica destas partículas evidencia comportamentos erráticos causados pelas flutuações na posição das partículas de solvente. A imprevisibilidade da

posição da partícula em função do tempo levou à necessidade de tratar estas propriedades cinemáticas de uma maneira estatística. Ou seja, como as propriedades de uma única partícula em um determinado instante perdem o sentido, o objetivo é determinar o comportamento médio das partículas ao longo do tempo. Em homenagem ao botânico escocês Robert Brown, que observou o comportamento errático de partículas de pólen em água, dá-se a denominação de “partícula browniana” à partícula estudada nestas condições e de “movimento browniano” ao movimento errático das partículas [SALINAS, 2005]. O tratamento teórico dessas observações foi descrito por Einstein utilizando o formalismo da mecânica estatística para descrever o processo osmótico de partículas, que levou em consideração a lei de força de Stokes, que relaciona o coeficiente de fricção  $\gamma$  com a viscosidade do meio  $\eta$ , raio e massa da partícula ( $r_p$  e  $m$  respectivamente) (Eq. 4).

$$\gamma = \frac{6\pi r_p \eta}{m} \text{ Eq.4}$$

Dessa forma, originou-se a celebre equação de Stokes – Einstein (Eq. 5), que no início do século já apresentava boas estimativas para o número de Avogadro ( $N_A$ ) [EINSTEIN 1956] – pode-se relacionar a constante de Boltzmann  $k_b$  e  $N_A$  com a constante universal dos gases  $R$  -.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi r_p \eta} \text{ Eq.5}$$

Einstein pôde formular os pilares da descrição do movimento browniano. Ele constatou que a partícula se move em todas as direções sem preferência, indicando que sendo o deslocamento médio da partícula é nulo (Eq. 6) e o deslocamento quadrático médio (isto é, a área que a partícula percorre) é função linear do tempo (Eq. 7).

$$\langle x \rangle = 0 \text{ Eq.6} \quad \text{e} \quad \langle x^2 \rangle = 2Dt = \frac{k_B T}{3\pi r_p \eta} t \text{ Eq.7}$$

### 1.3. Dinâmica de Langevin

Na tentativa de simplificar a descrição de Einstein para o movimento Browniano, Paul Langevin desenvolveu em 1908 uma equação diferencial capaz de modelar a dinâmica de uma partícula Browniana [LEMONS, 1997] (Eq. 8).

$$\gamma \frac{dx}{dt} = -\frac{1}{m} \frac{dV(x)}{dx} + \frac{1}{m} \delta F(t) \quad \text{Eq.8}$$

Pela Descrição de Langevin (Eq. 8) podemos observar que se trata de um sistema dinâmico (balanço de forças) no qual uma partícula sob ação de um determinado potencial  $V(x)$  está sujeita a uma força resultante cujas componentes podem ser divididas em força de atrito e em uma força aleatória. O termo potencial  $V(x)$ , quando se tem como objetivo o estudo da dinâmica de transição entre estados, tem como função modelar a curva de potencial em função de coordenada de reação, sendo, portanto uma curva que apresenta duas regiões de estabilidade separadas por uma barreira (um polinômio de quarto grau é uma ótima função para descrever tal curva). A força de atrito, dada pelo termo  $\gamma dx/dt$ , pode ser interpretada em um sistema viscoso analogamente a um sistema mecânico clássico, isto é, como sendo a resistência que a partícula sofre para se movimentar. Entretanto, esta resistência está intimamente ligada à viscosidade do meio e à dimensão da partícula. A força aleatória (dada pelo termo  $\delta F$ ) é de fato o termo mais incomum desta equação, e é interpretado como uma força flutuante que o meio exerce sobre a partícula, sendo, portanto, a força responsável para manter a partícula em movimento; ela é dita aleatória uma vez que a cada instante apresenta diferentes intensidades e sentidos, mas, de uma maneira geral, a resultante desta força em um período de tempo suficientemente grande é nula, pois apresenta uma distribuição simétrica de intensidade e sentido. Este termo,  $\delta F(t)$ , satisfaz o Teorema das Flutuações-Dissipações (dado pela Eq. 9), é um resultado da mecânica estatística para tratar de sistemas fora do equilíbrio, e que leva em consideração a dissipação de energia da partícula em um meio fluido. Numericamente esse termo é obtido por uma variável randômica com média igual a zero e variância  $2\gamma k_B T$ .

$$\langle \delta F(t) \delta F(t') \rangle = 2\gamma k_B T (t - t') \quad \text{Eq. 9}$$

#### **1.4. Teoria do estado de transição**

Utilizando as considerações discutidas anteriormente, um dos modelos mais simples utilizado para se calcular a taxa de reação química é o modelo de Teoria do Estado de Transição (do inglês, *Transition State Theory*, TST). Tal modelo considera que: i) a constante de taxa da reação é o número de entidades que cruzam essa barreira por unidade de tempo e ii) assume que o tempo de transição (isto é, o tempo associado à passagem de uma partícula de uma região para outra) é muito maior que o tempo que o sistema leva para entrar em equilíbrio térmico na região do poço, o que significa que a distribuição da energia térmica é constante [NITZAN, 2010].

Esta duas considerações (i e ii) têm implicações importantes nas condições de contorno do problema. A consideração i afirma que a partícula atravessa a barreira energética potencial somente uma vez, condição que é chamada, geralmente, de ponto de não retorno, fazendo alusão ao fato de que a partícula não voltará ao seu estado inicial. Isto por sua vez, indica que o fluxo de partículas tem um único sentido. A segunda implica diretamente no tipo de ensemble usado para tratar o modelo, ou seja, considerar o equilíbrio térmico na região do poço significa dizer que a temperatura é fixa para todas as partículas.

Para determinar o fluxo entre as regiões de estabilidade define-se, usualmente uma superfície de divisão perpendicular ao topo da barreira [PECHUKAS, 1981]. Utilizando a lei de distribuição de velocidades de Maxwell em um ensemble micro canônico podemos obter uma expressão (Eq. 10) que correlaciona a velocidade da reação química com esta frequência do poço de potencial  $\omega_0$ . Considera-se que a região de poço apresenta um comportamento análogo a um oscilador harmônico, e, portanto, apresenta uma determinada frequência associada.

$$k_{TST} = \frac{\omega_0}{2\pi} e^{-\beta E_a} \text{ Eq.10}$$

Observe que a expressão geral de cálculo de constante de taxa utilizando o modelo da TST é similar à expressão de Arrhenius, ou seja, há um indicativo de

que o modelo pode ser ajustado com dados experimentais. O fator  $\omega_0$  pode ser interpretado como sendo o número de tentativas por unidade de tempo que a partícula faz para escapar do poço, e o termo  $E_a$  como a altura da barreira. Observe também que não foi colocada na Eq. 10, em momento algum, a temperatura como variável, indicando que ela foi mantida constante. Dessa forma, o Hamiltoniano pôde ser definido a partir do momento e da posição (modelo clássico) e aproximado por uma parábola. Com isso, a expressão da distribuição de partição foi dada em função apenas de  $N$ , situação pela qual se utiliza o ensemble micro canônico [PECHUKAS, 1981].

A fim de obter uma expressão para a constante de taxa válida para casos mais gerais podemos considerar o sistema como sendo multidimensional, e, para tanto, partimos da definição da energia do sistema pelo Hamiltoniano (Eq. 11), a partir do momento e massa da partícula ( $p_i$  e  $m_i$ , respectivamente) e o potencial do sistema ( $V(x_i)$ ).

$$H = \sum \frac{p_i^2}{2m_i} + V(x_i) \text{ Eq. 11}$$

Agora consideramos que o sistema não está mais submetido a uma curva potencial, mas sim a uma superfície potencial com um poço potencial de uma região ao redor de um ponto específico A (que digamos que seja o reagente) e um poço ao redor de um ponto específico B (o produto), que estão separados por uma superfície de transição. Mesmos com essas diferenças, obtemos também para esse modelo um resultado semelhante (obviamente com os termos referentes a um sistema de coordenadas mais complexo) ao caso unidimensional.

É prudente que algumas considerações sejam feitas a respeito do modelo: a primeira delas é que a taxa calculada pela TST é sempre uma estimativa acima da taxa real da reação, isto é,  $k_{TST} > k_{real}$ . Uma das maneiras de se explicar isso é que o modelo pressupõe que a partícula pode cruzar a barreira energética apenas uma vez (ponto de não retorno), porém é sabido que reações químicas estão sempre submetidas a equilíbrios dinâmicos, e, portanto, as espécies frequentemente saem de um estado em direção a outro. Como de fato o objetivo é simular uma reação química, é razoável pensar que o fluxo resultante entre uma

região e outra (ditas reagentes e produtos, por exemplo) tem duas componentes, ou seja, o fluxo resultante é a soma entre o fluxo de partículas que saem da região dos produtos em direção aos reagentes com o fluxo oposto (portanto, um vetor com direção oposta, ligado às partículas que saem dos reagentes em direção aos produtos). Conseqüentemente, este fluxo resultante real é menor que o fluxo resultante com apenas uma direção do modelo TST, fazendo com que haja uma superestimava da constante de velocidade. Já existem tentativas de melhoramento desses resultados, encontradas no método variacional da TST. Tais modelos se baseiam no aperfeiçoamento da superfície de divisão (que tem como finalidade minimizar os efeitos dos resultados obtidos) ou mesmo na inclusão de componentes, como as interações entre o solvente e a partícula, já que outra limitação deste modelo está relacionada com o acoplamento térmico entre a partícula e o meio, podendo ajudar a descrever de maneira mais precisa a relação entre a constante de velocidade e as frequências associadas aos movimentos das partículas. [PECHUKAS, 1981].

### **1.5. Teoria de Kramers**

Na tentativa de recriar um modelo que corrija as limitações explicitadas no tópico anterior e buscando estender as condições de aplicação da TST, pode ser incluída no modelo uma variável de efeitos dinâmicos. A introdução destes termos origina a Teoria de Kramers para estado de transição.

Em fase condensada, por exemplo, incluir efeitos dinâmicos é levar em consideração a interação da partícula reagente com o meio (lembrar que o modelo assume a reação química como sendo o movimento estocástico de uma partícula Browniana em um potencial biestável). Para tanto, considera-se que as forças que atuam sobre a partícula browniana satisfazem a equação de Langevin (Eq. 8) [HÄNGGI, 1985]. Dessa forma, podemos reescrever a Eq. 8 a partir da probabilidade, o que origina a equação de Fokker-Planck (Eq. 12).

$$\frac{dP(x, v, t)}{dt} = \frac{1}{m} \frac{dV}{dx} \frac{\partial P}{\partial v} - v \frac{\partial P}{\partial x} + \gamma \left[ \frac{\partial}{\partial v} (vP) + \frac{k_B T}{m} \frac{\partial^2 P}{\partial v^2} \right] \text{ Eq.12}$$

Em que

$$P_{eq} = \frac{e^{-\beta(\frac{mv^2}{2} + V(x))}}{Q} \text{ Eq.13}$$

A Eq.12 geralmente é resolvida considerando-se a força de interação entre o solvente e a partícula, sendo que há três casos para estabelecer em qual regime o sistema se encontra, dependendo dos valores da fricção ( $\gamma$ ). O primeiro caso é para constante de fricção  $\gamma$  baixa (*low damping limit*), caso em que o acoplamento térmico entre solvente e partícula é pequeno, e, portanto, o sistema não tem tempo para atingir o equilíbrio térmico, uma vez que a frequência da barreira é maior ( $\gamma < \omega$ ). O segundo caso diz respeito à situação na qual a constante de fricção tem valores intermediários (*moderate damping limit*), que é quando já se pode observar o equilíbrio térmico entre a partícula e o solvente na região do poço. Nos dois casos anteriores, a Eq. 12 deve ser resolvida sem nenhuma simplificação, diferentemente do terceiro caso, no qual  $\gamma$  é grande (*overdamped limit*), aparecendo, geralmente, em sistemas condensados. Nesta situação o acoplamento térmico entre solvente e partícula é muito alto, e desta forma a escala de tempo associada a  $\gamma$  é maior que qualquer outra escala de tempo no sistema. Desse modo, a Eq. 12 pode ser simplificada originando a equação de Smoluchowski (Eq. 15), a qual introduz a variável J, chamada de probabilidade de fluxo, sendo que, no estado estacionário é razoável pensar que essa grandeza seja constante ( $J(x,t)=J_{cte}$ ) [HÄNGGI, 1985; NITZAN, 2010].

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} J(x,t) \text{ Eq.14 em que}$$

$$J(x,t) = -D \left( \frac{\partial}{\partial x} + \beta \frac{dV}{dx} \right) P(x,t) \text{ Eq.15}$$

Resolvendo esta equação analiticamente finalmente obtemos uma expressão geral para constante de velocidade a partir do modelo desenvolvido por Kramers (Eq. 16), uma expressão similar a de Arrhenius.

$$k_{KRAMERS} = \frac{\omega_0 \omega_b}{2\pi\gamma} e^{-\beta E_b} = k_{KRAMERS}^0 \times e^{-\beta E_b} \text{ Eq.16}$$

A partir da Eq. 16 observa-se o aparecimento de um novo parâmetro com unidade de frequência ( $\omega_b$ ) que é chamado de frequência da barreira - neste caso, aproxima-se a barreira como um oscilador harmônico e portanto com uma

determinada frequência associada ( $\omega_b$ ), um caso análogo a aproximação feita para TST para se obter uma frequência associada a região do poço.

### ***1.6. Pinças ópticas***

Para que possamos estudar experimentalmente a teoria de Kramers é necessário que a partícula seja Browniana e que esteja submetida a um potencial quadrático. Para tanto, lançou-se mão da técnica de aprisionamento óptico para criar um sistema no qual a equação de Langevin (Eq.8), e, portanto de Kramers (Eq. 16) possa ser estudada.

A manipulação óptica de objetos microscópicos é um tema de extremo interesse contemporâneo. Esta técnica permite a realização de experimentos controlados de espectroscopia para caracterização estrutural e química de objetos individuais presentes dentro de fluidos em fluxo. Apesar de ter sido inventada há mais de 40 anos [ASHKIN, 1970], a técnica de aprisionamento óptico permanece um tema ativo em pesquisa devido à importância de objetos microscópicos.

O conceito fundamental por trás das técnicas ópticas de manipulação de partículas é a pressão de radiação. Grosso modo, tal termo pode ser definido como sendo a força que a luz exerce sobre uma superfície. Este conceito pode causar algum desconforto, já que a luz, por se tratar de uma onda eletromagnética, não seria capaz deslocar objetos a princípio. No entanto a natureza dessas forças surge de maneira bastante intuitiva: uma onda eletromagnética (como qualquer tipo de onda) possui certo momento linear ao viajar por um meio (por exemplo, ar, água, etc.). No entanto, ao passar de um meio para outro (por exemplo, ar-vidro) esse feixe de luz altera sua direção (ou é refletido ou é refratado) em consequência às características ópticas dos dois meios. Como o momento linear é uma grandeza vetorial, a mudança na direção de propagação do feixe acarreta na variação de seu momento (em decorrência do princípio da conservação do momento é fundamental que a variação no momento do feixe de luz seja transferida para esse novo meio). A alteração no momento de uma partícula é uma das maneiras de se definir força. Pelas Eq. 17 e 19 nota-se que a ordem de grandeza dessas forças é muito pequena, da ordem de pico

Newtons, o que implica que uma força dessa magnitude seja expressiva em sistemas microscópicos, como por exemplo, partículas de ordem micrométrica de algum material dielétrico (como poliestireno ou sílica) suspensas em um meio viscoso (como água). Uma maneira de descrever as forças envolvidas no processo de aprisionamento óptico é pela sua decomposição em duas componentes: a primeira é dita força de espalhamento, que tem a mesma direção do feixe de luz, e a segunda, chamada de força de gradiente, dada na direção de maior intensidade do gradiente formado pelo laser [NEUMAN e BLOCK, 2004; ASHKIN et al., 1985] (Figura 2).

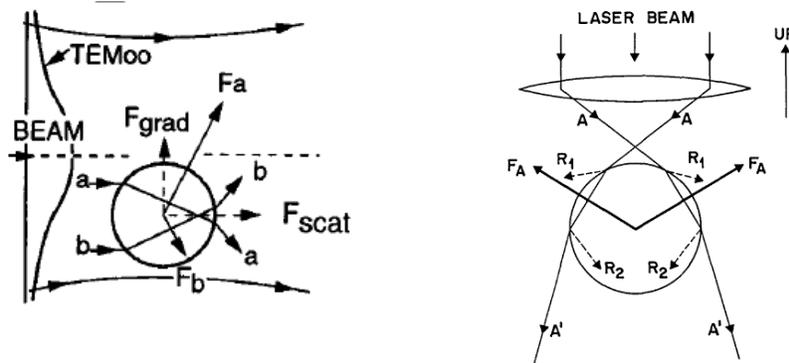


Figura 2: Diagrama das forças envolvidas na manipulação óptica (a) adaptado de ASHKIN [1997] e b) adaptado de ASHKIN e col. [1985]

Um sistema de partículas dielétricas com índice de refração maior que o meio ( $\eta_p > \eta_m$ ) e raio da partícula menor que o comprimento da luz ( $r_p < \lambda$ ) – essa condição, em termos numéricos é satisfeita quando a partícula apresenta raio de até poucas centenas de nanômetros [GRIER, 1997] – satisfaz as condições para espalhamento Rayleigh, e as componentes podem ser rapidamente separadas (Eq. 17 e 18).

$$F_{esp} = \frac{I_0 s \eta_m}{c} \quad \text{Eq.17}$$

$$\text{em que} \quad s = \frac{128\pi r_p^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad \text{Eq.18}$$

Pelas equações acima podemos observar que a componente da força de espalhamento é proporcional à intensidade  $I_0$  do laser e à secção de choque  $s$  (dada em  $m^2$ ), assim como a razão  $m$  entre os índices de refração ( $\eta_p / \eta_m$ ).

A componente da força de gradiente pode ser calculada em função do gradiente espacial de intensidade ( $\nabla I_0$ ) e da polarizabilidade da partícula.

$$F_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{c\eta_m^2} \nabla I_0 \quad \text{Eq. 19} \quad \text{em que} \quad \alpha = \eta_m^2 r_p^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad \text{Eq.20}$$

É sabido que o termo referente à polarizabilidade e à secção de choque é função do volume da partícula. Tomando como exemplo uma partícula de volume esférico, tem-se que a polarizabilidade é função do cubo do raio da partícula e a secção de choque é dada como a sexta potência do raio da partícula. Assim, nota-se pelas Eq. 17 e 19 que para partículas cada vez menores a força resultante decai em uma potência de ordem três para a força de gradiente, e em ordem de seis para a força de espalhamento. Dessa forma, nota-se que para partículas de ordem nanométricas a força é muito menor que para partículas de ordem micrométricas.

As pinças ópticas, mais especificamente, são capazes de criar um diagrama de forças no qual as forças se anulam e a partícula, inicialmente sob regime browniano, fica presa em um poço de potencial [ASHKIN et al., 1985]. Um laser colimado apresenta, inicialmente, um perfil de distribuição Gaussiano de intensidade luminosa radial (TEM<sub>00</sub>) em duas dimensões e sem mudança de intensidade ao longo do eixo de propagação. Porém, ao passar por uma objetiva esse feixe, que na região do foco apresenta maior intensidade luminosa, tem agora um perfil de distribuição de intensidade luminosa em três dimensões, (como pode ser visualizado no diagrama da Figura 2 b). Como a partícula tende a ir em direção a esse gradiente, ela acaba por ficar aprisionada (ou “pinçada”) na região do foco da objetiva.

Trabalhos recentes vêm utilizando pinças ópticas para determinação de energias de barreiras conformacionais para macromoléculas orgânicas, como ácidos nucleicos ou proteínas [WOODSIDE et al., 2006; GEBHARDT et al., 2010; NEUPANE et al., 2012; YU et al., 2012], ou combinando técnicas de aprisionamento óptico com técnicas como fluorescência [CHUNG et al., 2012] ou *Förster resonance energy transfer* (FRET) [CHUNG et al., 2009].

Pinças ópticas duplas geralmente são utilizadas nestes estudos, servindo para obter dados para moléculas individuais. No final dos anos 1990, McCann e colaboradores observaram pela primeira vez partículas brownianas saltando de um poço para outro utilizando pinças ópticas duplas [MCCANN et al., 1999]; ainda sob a mesma perspectiva de estudo, pode-se citar o trabalho recente realizado por Chen e colaboradores, que utilizaram pinças ópticas duplas para criar um potencial duplo e estudar, sob a ótica da cinética de Kramers, saltos de uma partícula em um meio viscoso [CHEN ET AL., 2012].

## **2. OBJETIVOS**

De uma maneira geral, este estudo tem como objetivo avaliar e estimar propriedades físico-químicas sob uma perspectiva estatística a partir de séries temporais.

Especificamente, objetiva-se avaliar a constante de velocidade – com o sistema antes e durante o estado de equilíbrio - para um processo de transição de uma partícula browniana em meio viscoso submetida a um potencial biquadrático, experimentalmente utilizando pinças ópticas e teoricamente utilizando uma simulação de dinâmica de Langevin.

Utilizando Microscopia óptica, pretende-se estimar o coeficiente de difusão pelo modelo de Stokes-Einstein a partir da trajetória individual de uma partícula manométrica em água.

## **3. PARTE EXPERIMENTAL**

### ***3.1. Características gerais da Pinça Óptica:***

A pinça óptica utilizada nesse estudo provem da empresa THORLABS (instrumento simples com apenas um feixe de aprisionamento), catalogado como OTKB, e consiste de um kit de montagem com componentes ópticos, eletrônicos, mecânicos e de controle. O equipamento consiste de um laser de diodo de comprimento de onda de 975 nm e potência máxima de 330 mW, ligado a controladores de temperatura e corrente, para garantir estabilidade da potência de

saída do laser, já em conexão com a fibra óptica. Na saída da fibra óptica há um conector FC que é ligado ao colimador. A luz linearmente polarizada e colimada do laser então passa por um telescópio kepleriano (na Figura 3 são representados pelas lentes “l1” e “l2”) com razão de aumento de 3 vezes, para que a abertura do feixe seja compatível com a entrada da objetiva (5 mm). O feixe de luz é então refletido por um espelho dicróico (Figura 3 “dicr”) para a lente objetiva ( Figura 3 “obj”), no caso uma Nikon de imersão em óleo com aumento nominal de 100x e abertura numérica 1,25. Esta lente objetiva está fixa e, portanto, para manter a amostra no foco do laser, utiliza-se um porta amostras suportado por um estágio XYZ (Nano Max311d). Controlado manualmente, este estágio pode percorrer até 4 mm em cada direção, com resolução de 20 nm; o uso de controladores piezo permite uma resolução de até 5 nm. Para iluminar o sistema é utilizada uma luz LED é focalizada na amostra com uma lente condensadora ( Figura 3 “cond”). Este feixe de luz visível então passa pelo espelho dicróico (Figura 3 “dicr”) sem refletir e é captado por uma câmera CCD. A Figura 3 representa a montagem óptica de uma pinça simples (lado esquerdo), observe que esta montagem é um microscópio invertido, já que a iluminação pela luz com a lente condensadora (Figura 3 “cond”) é feita por cima da amostra, e a lente objetiva abaixo da amostra - o sentido de propagação da luz visível é denotada pela setas azuis -. Na direção oposta temos o feixe de laser capaz de criar o aprisionamento. O ponto de aprisionamento coincide com o plano focal de visualização da objetiva, desta forma é possível observar a partícula aprisionada pela câmera CCD - o sentido de propagação do laser infravermelho é denotada pela setas vermelho -.

### ***3.2. Pinça Óptica Dupla***

Como já referenciado anteriormente, o estudo da dinâmica de Langevin será feito a partir de um experimento de pinças ópticas duplas, uma vez que com esse aparato poderemos criar um potencial biestável a fim de estudar a dinâmica da passagem de um poço para outro.

A Figura 3 é uma representação da montagem óptica de como a pinça óptica dupla é montada.

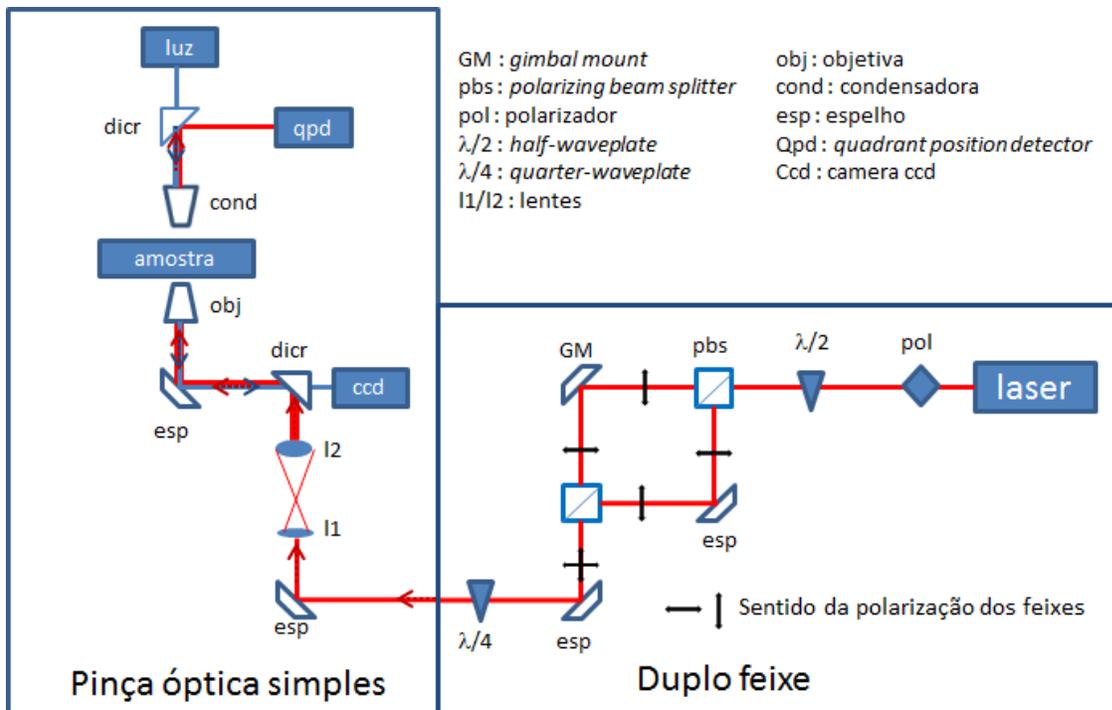


Figura 3: Esquema óptico da pinça dupla.

Esta montagem é similar a descrita por Chen e colaboradores [22]. O feixe que sai inicialmente do laser passa por um polarizador (pol), empregado para garantir que somente há uma direção de polarização da luz do laser – ao sair da fibra óptica, a luz do laser apresenta polarização em diversas direções -. Em seguida, tem-se uma lâmina de meia onda ( $\lambda/2$ ) – esse item é capaz de girar a polarização da luz em  $90^\circ$  graus com relação ao seu eixo -, cuja função na prática, é controlar a intensidade relativa dos dois feixes com polarização cruzada. Ao passar pelo divisor de feixe com polarização (Figura 3 “pbs”) o feixe é separado em dois com a polarização ortogonal - na figura a polarização dos feixes é representada pelas setas pretas -, estes feixes são refletidos por um espelho (esp), sendo que em um dos ramos este espelho estará suportado por um *gimbal mount* (GM) (suporte para espelhos que tem seus graus de liberdade horizontal e vertical independentes). Estes dois ramos são então realinhados com um segundo divisor de feixe com polarização (pbs), porém agora temos dois feixes de laser incoerentes (por terem polarização cruzada) e não colineares (os feixes devem estar somente próximos e paralelos). Os dois feixes passam por uma lâmina de quarto de onda ( $\lambda/4$ ) para que os mesmos se tornem circularmente polarizados,

conforme descrito na referência [22]. Estes dois feixes entram no sistema de pinça óptica já descrito anteriormente.

### ***3.3. Montagem e alinhamento***

Para adaptar o equipamento adquirido (pinça óptica simples) para a montagem descrita na secção anterior (pinça óptica dupla) foi necessário que se separasse o colimador do telescópio. O feixe foi alinhado utilizando duas íris após cada componente óptico descrito na Figura 3. A partir do momento em que o feixe entrou no telescópio, o procedimento para o alinhamento foi o mesmo empregado para a pinça óptica simples e descrito no manual de construção do aparato.

Além do alinhamento do laser, é necessário caracterizar a posição do foco para definir a região onde as partículas serão aprisionadas. Inicialmente, caracterizamos essa região como normalmente se faz para alinhar microscópios: a técnica consiste na montagem de um espelho no porta-amostra para refletir a luz do laser de volta para o sistema. O objetivo é fazer com que esse feixe de luz chegue à câmara CCD (que é capaz de detectar luz em comprimentos de onda no infravermelho próximo). Apesar de o feixe de 975 nm passar por um espelho dicróico (vide a montagem da Figura 3) que reflete a grande maioria dos fótons (no caso o espelho tem “corte” nominal em 805 nm refletindo, na prática, mais de 90% da luz em comprimentos de onda superiores a 830 nm), ainda há transmissão de uma parcela da luz, e que chega à câmara. Outra observação importante é que o filtro de proteção de radiação espúria no infravermelho próximo deve ser retirado da frente da câmara. Observando o perfil da imagem que, idealmente, exhibe círculos concêntricos (anéis de Newton) quando o espelho estiver no foco da lente, podemos avaliar onde está o feixe no foco do laser, assim como a qualidade do alinhamento (Figura 5 a).

Portanto para a rápida caracterização do foco (já que este é um procedimento que deve ser feito constantemente) foi desenvolvido um procedimento alternativo. Uma amostra de  $\text{LaF}_3$  (85%) co-dopado (por substituição do cátion) com  $\text{Er(III)}$ (5%) e  $\text{Yb(III)}$ (10%) (que foi gentilmente cedida pela aluna Emille Martinazzo Rodrigues do Laboratório de Materiais Funcionais -

LMF) quando excitada pelo laser em 975 nm (infravermelho próximo) exibe o fenômeno de conversão ascendente de energia. Trata-se de um mecanismo de transferência eletrônica de energia entre o par Er(III) e Yb(III) onde os fótons de baixa energia são absorvidos e os fótons no visível, isto é, em um comprimento de onda mais energético, são emitidos. Conseqüentemente, é possível observar uma coloração verde intensa quando o material é exposto no laser. O espectro de emissão obtido pode ser visualizado na Figura 4, na qual observamos as bandas de emissão em comprimentos de onda menores (409 nm, 523 nm, 541 nm, 654 nm), assim como a banda referente ao feixe de laser (972 nm), que tem intensidade muito maior que a emissão do material. O espectro foi obtido utilizando um equipamento da OCEAN OPTICS USB2000 *Miniature Fiber Optic Spectrometer* que foi acoplado no lugar da câmera CCD.

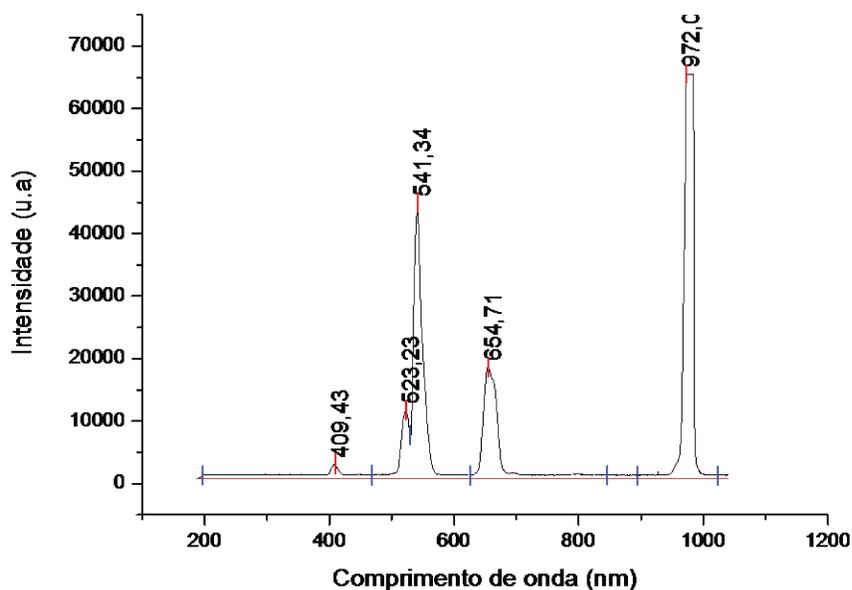


Figura 4: Espectro de emissão da amostra  $\text{LaF}_3/\text{Er}/\text{Yb}$  excitada pelo laser com comprimento de onda de 975 nm. A banda no infravermelho é do laser

A amostra então foi macerada a fim de obter um pó mais fino e posteriormente foi depositada sobre uma lâmina de microscópio, com uma espátula a amostra foi pressionada (sobre a lâmina) de modo a ficar coesa e com a superfície o mais homogênea possível. Assim, para fixar o material foi utilizado um pequeno pedaço de fita adesiva transparente. Esse sistema foi levado à pinça

óptica e, com o laser ligado, a amostra foi posicionada pelo estágio XYZ. Quando o sistema é colocado no foco, podemos observar o aparecimento de um círculo de grande intensidade na região central, que vai gradualmente desaparecendo em direção às bordas (Figura 5 b).

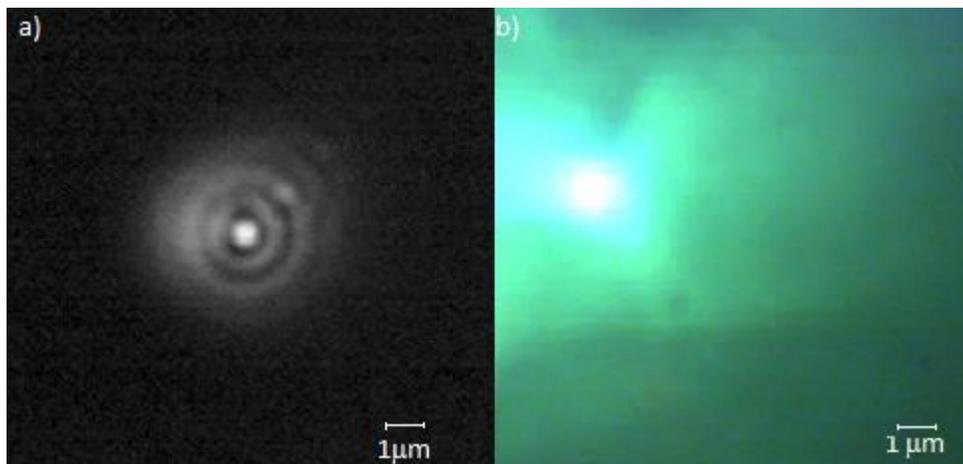


Figura 5: Comparação entre os métodos de detecção do foco da objetiva: a) perfil de reflexão do laser captado pela câmera e b) imagem do material LaF<sub>3</sub>/Er/Yb quando exposto ao laser no ponto focal.

### **3.4. Sistema de Partículas**

Inicialmente o sistema de partículas utilizado é uma suspensão de nano esferas de Poliestireno (PS) em água, com índice de refração  $\eta_{PS}=1,590$  e proporção de massa inicial igual a 10,16%, cedidas gentilmente pelo grupo de Coloides e Superfícies do Instituto de Química da UNICAMP. A fim de determinar a dispersão no tamanho das partículas, foi realizado um experimento de espalhamento de luz em um equipamento da Malvern MASTERSIZER 2000 no qual pode-se observar que as partículas exibem diâmetro hidrodinâmico médio de 437 nm.

Estas amostras se mostraram, no entanto, muito pequenas, e para o microscópio utilizado a imagem gerada não apresentava um grande contraste entre o meio e a partícula, o que na prática dificultava a determinação da posição da partícula. Por esse motivo utilizou-se uma amostra comercial de nano partículas de poliestireno com diâmetro médio de  $804 \pm 5$  nm (todas as informações foram cedidas pelo fabricante, cuja referência da amostra é: *Aldrich Chem. Co.* nº catálogo 4,173-3). De acordo com o regime de espalhamento

Rayleigh, regime no qual as forças ópticas podem ser separadas em força de espalhamento e de gradiente, a partícula deve ter um raio menor que o comprimento de onda incidente. No caso, quanto maior for essa diferença ( $r_p \ll \lambda$ ) mais próximo do regime de espalhamento Rayleigh. No entanto  $r_p$  é relativamente próximo de  $\lambda$  ( $r_p \sim 400\text{nm}$  e  $\lambda = 875\text{nm}$ ), porém ainda sim podemos utilizar a aproximação para o modelo de espalhamento Rayleigh [GRIER, 1997]. De fato é importante que a partícula não seja muito pequena, seja por conta das dificuldades que isso acarreta para a detecção da posição da partícula, ou seja por conta do diâmetro do ponto de aprisionamento (da ordem de  $1\ \mu\text{m}$ ), caso a partícula tenha um diâmetro muito menor que  $1\ \mu\text{m}$ , a eficiência e capacidade de aprisionamento são reduzidas drasticamente.

### ***3.5. Preparo da amostra***

Para poder realizar as medidas no microscópio foi necessária uma diluição da amostra recebida por um fator de 180.000 vezes. Desta forma, a concentração mássica resultante de partículas na amostra está na ordem de ppm,, a fim de garantir que somente uma partícula esteja sendo observada e posteriormente aprisionada. Em uma lâmina de microscópio comum, foram colados pedaços de fita adesiva com a finalidade de delimitar uma fronteira na qual cerca de  $50\ \mu\text{l}$  da amostra ficam contidas; posteriormente uma lamínula de microscópio (de largura nominal de  $0,1\text{mm}$  - já que a distância de trabalho da lente objetiva é de cerca de  $230\ \text{mm}$ ) foi depositada sobre a gota, delimitando dessa forma a amostra entre as fronteiras laterais (dadas pela fita adesiva) e as fronteiras inferior (lâmina) e superior (lamínula) Esta montagem serviu para minimizar os efeitos do fluxo criado na amostra por conta da evaporação do solvente que ocorria nas bordas do sistema quando não havia as definições de fronteiras.

### ***3.6. Aquisição de dados***

Para poder determinar os aspectos dinâmicos do nosso sistema de partículas existe a necessidade de determinar a posição da partícula em função do

tempo. O arranjo da pinça óptica permite gravar o que acontece em nível microscópico neste sistema. Os dados gerados são arquivos de vídeo no formato .AVI. Para se determinar a posição das partículas em função do tempo foi utilizada um programa livre de edição de imagens e vídeos baseado em linguagem JAVA e disponível para *download* na internet, chamado de *ImageJ*. O programa decompõe as filmagens em sucessivas imagens, *frame a frame*, e a posição das partículas é dada em função de uma grade (bidimensional) de *pixels*. Desta maneira cria-se um sistema de coordenadas de posição e de tempo. Para obter a posição da partícula devemos lançar mão de uma extensão do programa, também de acesso livre e que pode ser obtido na internet, chamado *Multi Tracker*. O programa consiste em analisar uma imagem binária ou limiarizada, de modo a determinar os limites das partículas e assim calcular a posição da mesma em função de seu centro de massa. Para o programa poder funcionar os vídeos gerados pela câmera da pinça óptica devem ser previamente convertidos como descrito a seguir.

O *software* da câmera CCD permite gravar tanto no formato RGB (*color*), quanto no formato de escalas de cinza (*8-bit image*), porém quando os arquivos são abertos no programa *ImageJ* são sempre abertos no formato RGB. Desta maneira, o primeiro passo após abrir o arquivo é transformá-lo em escalas de cinza, que pode ser feito pelos comandos – *Image* → *Type* → *8-bit* – ou automaticamente escolhendo a opção – *Convert to Grayscale* - ao abrir o arquivo. Após esta etapa deve-se limiarizar a imagem de modo que esta passe de escala de cinza para uma imagem binária – *Image* → *Adjust* → *Threshold* - os parâmetros devem ser no modo *Default* e *Red*, os valores de ajuste são função particular de cada imagem, e, portanto, devem ser ajustados de modo a otimizar caso a caso. Assim, a imagem já está no formato que pode ser analisada pelo *plugin Multi Tracker*, porém ainda há muito ruído na imagem (oriunda da sujeira das lentes, ou mesmo das aberrações na iluminação da amostra). Como o nosso interesse se concentra na partícula, idealmente deveríamos descontar esse tipo de ruído sistemático, do mesmo modo como fazem, por exemplo, os espectrofotômetros ao descontar o “branco”. No nosso caso, isso é feito gravando pelo mesmo tempo a

mesma região só que sem a presença da partícula, gerando um vídeo que é chamado de “fundo” e recebe o mesmo tratamento descrito acima. Após esta etapa podemos subtrair o fundo, literalmente, descontando o valor de cada *pixel* dessa imagem (vídeo de “fundo”) dos valores de pixels da imagem já com a partícula (vídeo da “amostra”). Com os dois vídeos abertos (“amostra” e “fundo”) podemos fazer essa subtração em – *Process* → *Image Calculator* - onde fica definido na caixa de diálogo “*Image 1* : ‘amostra’”, “*Image 2* : ‘fundo’” e com a opção “*Operation: ‘subtract’*”, deve-se marcar a opção “*Create new window*”. Essa nova imagem formada pode então ser analisada por – *Plugins* → *Multi Tracker* – novamente, os parâmetros de ajuste devem ser otimizados em função da sua imagem (Figura 6). Será gerada uma tabela indicando a frame e a posição (X, Y) em *pixels* da partícula, que pode ser lida em programas como *Origem*, *Matlab* ou *Excel*. O processo de tratamento da imagem está explicitado em seus passos na Figura 6, a seta em vermelho indica a posição da partícula.

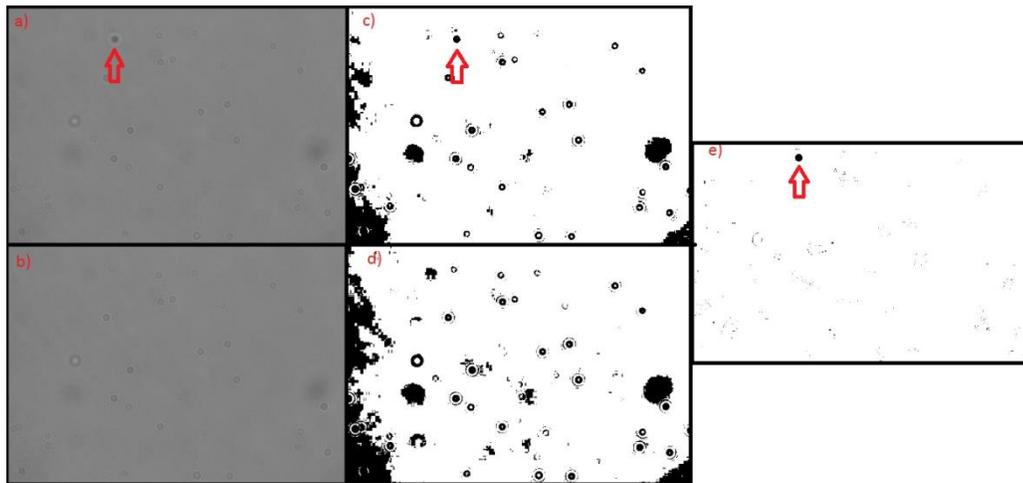


Figura 6: a) amostra em escala de cinza; b) fundo em escala de cinza; c) amostra limiarizada; d) fundo limiarizado; e) subtração do fundo da amostra).

### **3.7. Calibração da Imagem**

Após o processamento de imagens é possível obter o posicionamento das partículas em uma grade de *pixels*. No entanto, é necessária uma informação analógica (isso é, em função de coordenadas espaciais reais) em unidades de metros, por exemplo. Para tanto foi utilizada uma régua de calibração com

espaçamento de 10  $\mu\text{m}$ , o que possibilitou determinar a relação entre o espaçamento em *pixels* e a distância em unidades reais.

Mesmo que o espaçamento entre as marcações da régua seja precisamente controlado em 10  $\mu\text{m}$ , as medições podem trazer um erro associado por conta da delimitação da fronteira de suas marcações. Na tentativa de minimizar tal efeito foram realizadas medidas em diferentes perspectivas da régua (mostradas na Tabela 1), assim como tratamento de imagem realizada pelo programa ImageJ. O procedimento para tratamento das imagens foi similar ao utilizado para tratar os vídeos das amostras.

Tabela 1: Medidas de correlação entre distância e pixel feitas para diferentes perspectivas da régua.

Distância em Pixel	Distância real ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho do Pixel ( $\mu\text{m}$ )
199	10	0,0502
397	20	0,0503
595	30	0,0504
794	40	0,0503

Podemos observar na Tabela 1 que a correlação entre a grade de *pixels* e as medidas reais é de 50 nm, tornando possível converter os resultados obtidos digitalmente em termos de distâncias reais.

### **3.8. Caracterização do movimento Browniano**

Uma das preocupações com relação a amostra esta relacionada com a presença ou não de gradientes de fluxo no porta amostra, no caso em que não há fluxo do solvente a movimentação da partícula é consequência apenas das flutuações térmicas do sistema, no caso em que há fluxo no solvente a partícula se movimenta na direção deste fluxo, e conseqüentemente o seu movimento deixa de ser aleatório e as Equações 6 e 7 não são validas. Para determinar se a partícula do nosso estudo se encontrava em regime de movimento browniano ( e que portanto não havia fluxo de solvente), foram utilizadas duas formas de tratamento de dados obtidos por microscopia - importante ressaltar que nesse

momento não foi utilizado aprisionamento óptico, a partícula estava difundindo livremente pelo campo de visão, de maneira que esse experimento pode ser realizado com qualquer microscópio similar ao descrito pela Figura 3-, formulado por Catipovic e col. [2013]. Para tanto, foram gravados 9 vídeos com 100 quadros (sendo, 42 quadros por segundo) com partículas de 474 nm de diâmetro – esses parâmetros são similares ao sistemas descrito na publicação para realização de estimativas -, dos quais se obtiveram com auxílio do programa *ImageJ* as posições da partícula no plano focal, como resultado se obtém uma matriz com a primeira coluna referente ao passo temporal de gravação ( na pratica o frame do vídeo) e as outras duas colunas as posições independentes nos eixos x e y das partículas. Embora ainda ocorra difusão no eixo z, com a técnica de microscopia só conseguimos obter dados em um determinado plano focal. Ainda de acordo com a referencia [CATIPOVIC, et al 20013], com estes resultados pudemos tratar os dados sob duas perspectivas diferentes, porém equivalentes: a primeira delas (chamado de Método 1) permite calcular o coeficiente de difusão (aqui chamado de “ $D_{hist}$ ”) a partir da análise do histograma de distribuição das posições ao se considerar o caso como unidimensional (isso é, os eixos x e y sendo tratados de maneira independente). Dessa forma, a variância do histograma ( $\sigma^2$ ) foi relacionada com a equação do coeficiente de difusão. A segunda maneira (Método 2) permite calcular o coeficiente de difusão (denominado “ $D_{msd}$ ”) utilizando os valores do deslocamento quadrático médio.

Os resultados para estes experimentos não foram muito satisfatórios – seja por conta na quantidade de dados experimentais, ou seja por conta da robustez do modelo - e, como consequência, um novo conjunto de 12 vídeos com 1000 quadros (31 quadros por segundo) com partículas de 804 nm de diâmetro ( aumentamos o diâmetro da partícula para facilitar a aquisição de dados, porém mantendo a validade com relação ao regime de espalhamento Rayleigh) foi realizado, sendo, ainda, que este experimento foi feito em duplicada para avaliar a reprodutibilidade dos dados. Os dados foram então tratados por um modelo descrito por Vestergaard e col. [2014] que relacionam o coeficiente de difusão (denominado “ $D_{cov}$ ”) a partir da covariância dos resultados.

Apesar da maneira pela qual se calcula o coeficiente de difusão ser diferente em cada método aplicado (seja “ $D_{\text{hist}}$ ”, “ $D_{\text{msd}}$ ” ou “ $D_{\text{cov}}$ ”), todos esses resultados devem ser equivalentes e, portanto comparáveis, afinal em todos os casos as equações 6 e 7 são validas, a única diferença se dá pela maneira pela qual se calcula a variância das posições.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Simulação da Dinâmica de Langevin

#### 4.1.1. Considerações sobre o programa

O programa utilizado para o estudo teórico da dinâmica de Langevin foi desenvolvido pelo Grupo de Espectroscopia de Femtosegundos e de Moléculas Individuais da UNICAMP para MATLAB de acordo com a referência [BIALEK, 2012] e funciona resolvendo de maneira discreta a Equação de Langevin – em contraposição ao cálculo diferencial (Equação 8) que leva em consideração passos diferenciais, o cálculos numéricos levam em considerações passos discretos, apesar de aproximado os resultados numéricos provêm resultados que jamais poderiam ser obtidos analiticamente -, na prática resolve-se a seguinte equação:

$$y(n+1) = y(n) + \alpha E' y(n) [1 - y^2(n)] + \sqrt{\frac{\alpha}{2}} \zeta(n) \quad \text{Eq. 21}$$

em que

$$E' = \frac{V_0}{(k_B T)} \quad \text{Eq.22}$$

$$y = \frac{x}{x_0} \quad \text{Eq.23}$$

$$\alpha = \frac{4k_B T \Delta t}{\gamma x_0^2} \quad \text{Eq. 24}$$

no qual  $V_0$  é a altura da barreira potencial (a ser definida) e  $x_0$  é a posição de equilíbrio. O termo  $\zeta(n)$  se refere a um gerador de números aleatórios gaussianos com média igual a zero (comumente conhecido como ruído branco), que é uma série sem correlação cuja densidade espectral é constante, ou seja, o espectro de potência apresenta mesma intensidade para todas as frequências.

Os parâmetros iniciais podem ser definidos arbitrariamente e, por isso, nos estudos preliminares, tais parâmetros foram explorados de maneira aleatória para adquirir familiaridade com o programa. Foram observadas nessa etapa algumas limitações do mesmo. A primeira delas, e mais evidente, é com relação ao número de pontos: conceitualmente, o número de pontos simula o tempo do experimento; como, por definição, a cinética é lenta, é necessário o acúmulo de muitos pontos para o cálculo ter sentido (isto é para que ocorram eventos suficientes), fazendo com que o maior problema encontrado aqui seja referente à demanda computacional, que se torna muito grande e, portanto, muito complicada para o tratamento de dados. Outro ponto limitante para a simulação é o valor da razão entre energia térmica e energia de ativação, uma vez que se observou que para valores maiores do que 10 (isto é,  $V_0 > 10k_B T$ ) os eventos se tornam ainda mais raros, o que tornaria necessária a obtenção de uma quantidade ainda maior de pontos, acarretando em um esforço computacional ainda maior.

Com o avanço na familiarização com o programa, os valores iniciais definidos começaram a ter sentido físico, simulando de fato o sistema a ser estudado – para tanto, os valores para os parâmetros de estudo foram definidos com base no raio das partículas ( $r_p \sim 500\text{nm}$ ) e na viscosidade da água ( $8.9 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ ) [23].

Para dar continuidade foi escolhida uma função potencial biestável e simétrica, que na prática pode ser representada por um polinômio de 4º grau, definido pela função (Eq. 25):

$$V(x) = V_0 \times \left(1 - \left(\frac{x}{x_0}\right)^2\right)^2 \quad \text{Eq. 25}$$

Como já dito anteriormente, resolver a equação de Langevin para um potencial biestável é, na verdade, obter a posição em função do tempo. A dinâmica de uma partícula browniana em um potencial biestável, assim como em uma reação química, é a flutuação (sobre uma coordenada) de alguma entidade sobre algum potencial; no nosso sistema de estudo, mais especificamente, é a flutuação de uma pequena esfera de poliestireno sobre um potencial bi quadrático. Considerando, então, essa bi estabilidade, é intuitivo pensar que tal partícula

oscila sobre um ponto de equilíbrio até que em um determinado intervalo de tempo, pequeno e imprevisível, esta atravessa para outra região de estabilidade. Desta maneira, já é possível prever que obteremos como resultado um comportamento parecido com aquele já descrito para análises conformacionais de enzimas, proteínas e DNA [SOCCI, 1996; WOODSIDE et al., 2005].

A partir desse resultado qualitativo já é possível observar as relações entre o perfil da posição em função do tempo, histograma de distribuição e função potencial. É importante definir  $-x_0$  e  $x_0$  como sendo as regiões de mínimo de energia potencial (regiões do poço) e  $x_b$  como sendo a posição da barreira (neste caso  $x_b=0$ ).

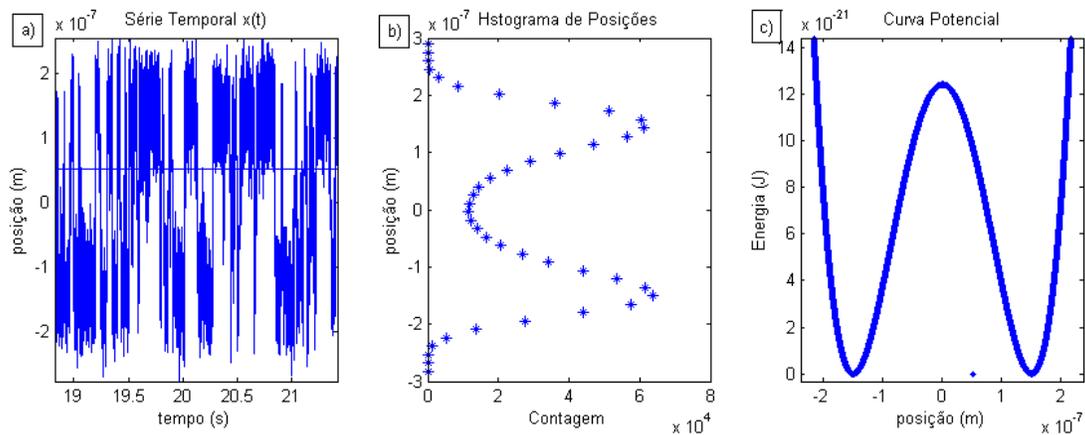


Figura 7: a) posição da partícula em função do tempo, b) histograma de distribuição de posições, c) curva potencial biestável.

Pela Figura 7 podemos dizer que inicialmente a partícula se encontra em uma determinada posição inicial ( $-x_0$ ), oscilando em um potencial quadrático similar a um oscilador harmônico (parábola) e, portanto, com certa frequência de oscilação devido às flutuações de energia no sistema; em determinado momento o sistema transfere uma determinada quantidade de energia para essa partícula, tornando-a capaz de atingir o ponto de meta estabilidade (em  $x_b=0$ ). Neste ponto existem dois caminhos possíveis para a partícula: ou retornar para a posição de equilíbrio inicial ( $-x_0$ ) ou ir para a outra posição de equilíbrio ( $x_0$ ). Nesse ponto, é importante salientar a importância com relação as medidas espaciais do sistema. Pela Figura 7 observamos que a distância entre os poços de potencial é de cerca de 300 nm, e a amplitude de oscilação da partícula é de aproximadamente 100 nm. No entanto para tais simulações foi definido uma partícula com diâmetro de

aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  ( $r_p=500\text{nm}$ ), ou seja as dimensões da partícula são cerca de três vezes maiores que as dimensões da curva de potencial, dessa maneira é importante ressaltar que amplitude das flutuações dentro do poço são menores que quando comparadas a própria partícula, o que significa que tais oscilações são bastante sutis, e os dados obtidos sempre se referem ao centro de massa da partícula.

É de senso comum que para uma determinada curva de potencial o sistema tende há ficar mais tempo nas regiões de estabilidade que metaestabilidade, e que, portanto a transição do sistema da região estável para a meta estável é pouco frequente, à esse processo pode ser dito que é raro, e como consequência é lento. Outro fator também calculado pelo programa é a constante de velocidade obtida pela pelo inverso da média do tempo em que o sistema permanece no estado  $-x_0$  ou  $x_0$  (tempo de residência), como explicitado pela Eq. 26.

$$k_{sim} = \frac{1}{\tau_{-x_0}} = \frac{1}{\langle t \rangle_{-x_0}} \text{ Eq. 26}$$

O programa realiza esse cálculo definindo de modo *ad hoc* as regiões dos estados inicial A e final B, e, desta maneira, calculando a média de tempo (chamada de tempo de residência  $\tau_x$ ) em que a partícula fica em determinada região, sem considerar os pontos da transição. Este resultado serve também para determinar se o resultado tem coerência física. Como se tem por definição que a razão entre as taxas das transição de  $-x_0 \rightarrow x_0$  e  $x_0 \rightarrow -x_0$  (que são funções inversamente proporcionais ao tempo de residência em  $-x_0$  e  $x_0$ ) é igual a constante de equilíbrio do sistema, que, nesse caso, por se tratar de um potencial bi quadrático simétrico, tem valor unitário, define-se na prática rejeitar o resultado obtido pelo calculo do programa se o valor gerado para a constante de equilíbrio estiver acima da faixa de erro de 0,5 % (Eq. 27).

$$0,995 \leq \frac{\langle t \rangle_{x_0}}{\langle t \rangle_{-x_0}} \leq 1,005 \text{ Eq. 27}$$

### 4.1.2. Resultados das Simulações

No final da simulação obtemos os valores de  $x(t)$  (que é uma série temporal), e então podemos traçar um perfil de distribuição da posição da partícula (como mostrado na Figura 7 b), que tem semelhança a uma soma de funções de distribuição gaussiana centrada nos pontos  $-x_0$  e  $x_0$ . Outra maneira de abordar esse comportamento é levar em consideração um perfil de distribuição de Boltzmann para um potencial bi quadrático:

$$\rho = \rho_0 \times e^{-\beta V(x)} \quad \text{Eq.28}$$

Assumindo neste caso como função potencial

$$V(x) = V_0 \times \left(1 - \left(\frac{x}{x_0}\right)^2\right)^2 \quad \text{Eq.29}$$

em que 
$$V(x) = \frac{V_0}{x_0^4} \times (x^2 - x_0^2)^2 \quad \text{Eq.30}$$

E substituindo na formula de Boltzmann obtemos

$$\rho = \rho_0 \times e^{-\frac{V_0}{k_B \times T \times x_0^4} \times (x^2 - x_0^2)^2} \quad \text{Eq.31}$$

Este resultado demonstrou ser muito útil, pois a partir do histograma de distribuição foi possível obter os parâmetros termodinâmicos, como a posição de equilíbrio ( $x_0$  e  $-x_0$ ) e a razão entre energia de ativação e energia térmica do ambiente. Isso é feito utilizando a extensão *curve fitting toolbox* do MATLAB, cuja equação é definida por:

$$f(x) = -a_1 \times e^{\left(\frac{-b_1}{x_0^4}\right) \times \left((x^2 - x_0^2)^2\right)} \quad \text{Eq.32}$$

Comparando as Eq. 31 e 32 é fácil notar a relação entre as grandezas  $a_1$  e  $\rho_0$  assim como  $b_1$  e  $V_0/(kBT)$ .

Como é possível observar, há uma relação direta entre o potencial e o perfil de distribuição espacial. Podemos interpretar a Figura 8 observando que quanto maior a diferença entre energia de ativação e energia térmica do ambiente, maior é a diferença na contagem de valores nas regiões de estabilidade e

metaestabilidade. Por exemplo, para as simulações em questão, utilizou-se como altura da barreira  $V_0=600 \cdot k_B$ , ou seja, para um experimento a temperatura ambiente ( $\sim 300K$ ), a razão entre  $V_0/k_B \cdot T$  é dois, e portanto o histograma de distribuição é o azul (na Figura 8), para a temperatura de  $500K$ , a razão é de  $1,2$  (curva preta na Figura 8).

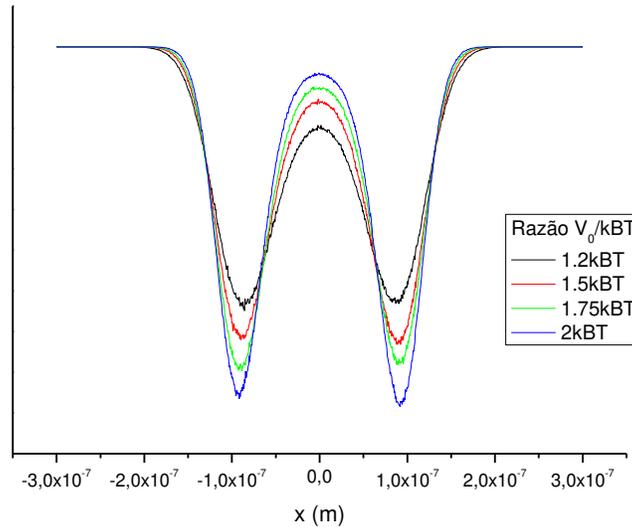


Figura 8: Resultados dos histogramas de distribuição espacial para diferentes razões entre energia de ativação e energia térmica do ambiente ( $V_0=k_B \cdot 600K$ ).

A extensão da ideia de obter a curva de potencial a partir do histograma de distribuição espacial vem com a aplicação da estatística de Boltzmann (Eq. 28). Utilizar funções exponenciais pode levar a uma erro associado muito grande, e, por isso, ao obter o logaritmo da Eq. 28 obtemos uma função polinomial mais bem comportada, e, portanto com um erro associado menor (Eq. 33).

$$V(x) = \ln(\rho_0) \times \beta^{-1} - \ln(\rho) \beta^{-1} = \frac{V_0}{x_0^4} \times (x^2 - x_0^2)^2 \text{ Eq. 33}$$

Com este potencial, é possível obter os parâmetros  $\omega_0$  e  $\omega_b$  (frequência do poço e da barreira, respectivamente) (Figura 9 a) e, portanto, calcular a taxa de Kramers (Eq. 16). Estes parâmetros são obtidos pelo ajuste na região do poço e da barreira por um polinômio de  $2^\circ$  grau, feito usualmente decompondo a curva de potencial na região do poço como uma parábola para cima e na região da barreira como uma parábola para baixo. Para cada uma dessas parábolas existe uma frequência de oscilação característica, caso que pode ser facilmente

demonstrado usando-se como exemplo um oscilador harmônico (ou um sistema massa-mola), cujas equações que o descrevem são dadas abaixo (Eq. 34 e 35):

$$F = m \frac{d^2 x}{dt^2} = -kx \quad \text{Eq.34}$$

$$\frac{d^2 x}{dt^2} = -\left(\frac{k_{mol}}{m}\right)x \quad \text{Eq.35}$$

Resolvendo para  $x(t)$  temos:

$$x(t) = A \cos\left(\left(\frac{k_{mol}}{m}\right)^{\frac{1}{2}} t + \phi\right) = A \cos(\omega t + \phi) \quad \text{Eq. 36}$$

Pela definição, sabemos que:

$$U(x) = -\int F dx = \int k_{mol} x dx = \frac{1}{2} k_{mol} x^2 \quad \text{Eq.37, portanto } U''(x) = k_{mol} \quad \text{Eq.38}$$

Então substituindo a Eq. 38 na Eq. 36 obtém-se

$$\omega = \left(\frac{U''(x)}{m}\right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq.39}$$

Ou seja, a frequência de oscilação em uma função de segundo grau é definida como sendo proporcional à raiz quadrada da segunda derivada desta função.

Para determinar se o programa estava de fato funcionando, foi calculado o fator pré-exponencial ( $k_{kramers}^0$ ) da Eq. 16, com o intuito de se comparar com os resultados experimentais. Para isso, simulou-se um sistema para uma partícula de poliestireno (densidade de  $1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) com raio de 500 nm e cuja distância entre os poços do potencial é de 220 nm (ou seja,  $x_0$  é igual a 110 nm) –esses valores foram escolhidos para que os resultados pudessem ser comparáveis aos experimentos de McCann e col. [1999], no qual usou-se uma partícula de raio de 300 nm e distância entre os poços de 350 nm, obtendo-se como fator pré-exponencial  $k_{McCann}^0 \sim 80 \text{ Hz}$ , - e de Chen e col. [2012], partícula de raio de 500 nm e distância de 430 nm, com  $k_{Chen}^0 \sim 49 \text{ Hz}$ .

Foram obtidos também os fatores pré-exponenciais para meios com diferentes viscosidades, para que seja possível observar o decaimento da taxa de Kramers com o aumento da viscosidade (Figura 9 b) [HÄNGGI, 1985; NITZAN,

2010]. Os resultados são mostrados na Tabela 2 e são referentes aos dados obtidos para uma temperatura de 293 K.

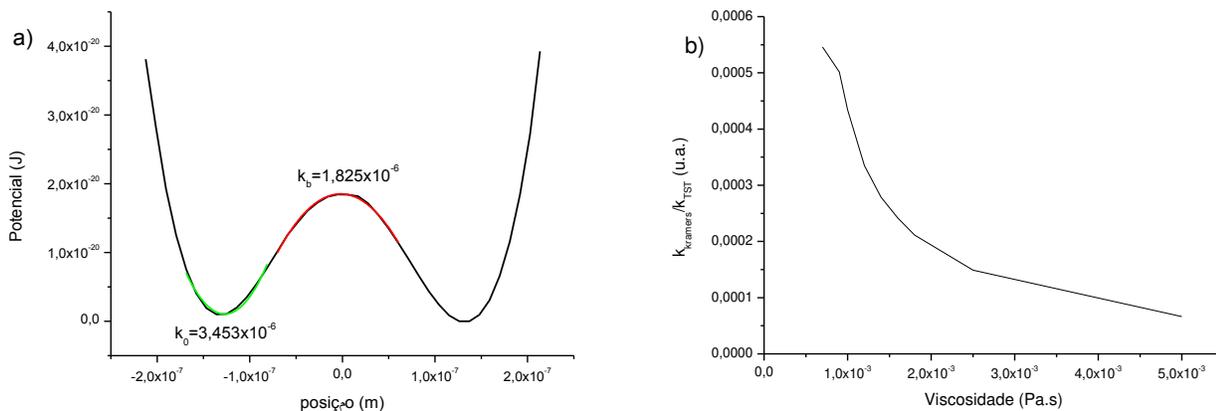


Figura 9: a) Superfície potencial com as frequências  $\omega_0$  e  $\omega_b$ ; b) perfil da taxa de Kramers em função da viscosidade.

Na simulação podemos observar que o valor do fator pré-exponencial para a viscosidade da água ( $\sim 9 \times 10^{-4}$  Pa.s) é da ordem de  $\sim 60$  Hz, mesma ordem dos dois experimentos aos quais pretende-se comparar os resultados, assim como a frequência de amortecimento ( $\gamma$ ) que é da ordem de  $10^{-7}$ , condizente com os dados de McCann e col. [1999].

Tabela 2: Resultados calculados dos fatores pré-exponencial de taxa de Kramers e TST

viscosidade (Pa.s)	7,00E-04	8,00E-04	9,00E-04	1,00E-03	1,20E-03	1,40E-03	1,60E-03	1,80E-03	2,50E-03	5,00E-03
<b>k0 (N/m)</b>	2,52E-06	2,93E-06	3,04E-06	3,20E-06	3,42E-06	3,24E-06	3,39E-06	3,41E-06	3,49E-06	3,45E-06
<b>kb (N/m)</b>	2,41E-06	2,90E-06	3,37E-06	3,11E-06	2,67E-06	2,52E-06	2,47E-06	2,40E-06	2,29E-06	1,83E-06
<b>gamma (1/s)</b>	1,26E+07	1,44E+07	1,62E+07	1,80E+07	2,16E+07	2,52E+07	2,88E+07	3,24E+07	4,50E+07	9,00E+07
<b>w0 (1/s)</b>	6,94E+04	7,48E+04	7,63E+04	7,81E+04	8,09E+04	7,87E+04	8,05E+04	8,07E+04	8,17E+04	8,12E+04
<b>wb (1/s)</b>	6,79E+04	7,45E+04	8,02E+04	7,71E+04	7,14E+04	6,93E+04	6,87E+04	6,76E+04	6,62E+04	5,91E+04
<b>ktst (1/s)</b>	1,09E+05	1,18E+05	1,20E+05	1,23E+05	1,27E+05	1,24E+05	1,27E+05	1,27E+05	1,28E+05	1,28E+05
<b>kkr(over) (1/s)</b>	5,95E+01	6,16E+01	6,01E+01	5,33E+01	4,26E+01	3,45E+01	3,06E+01	2,68E+01	1,91E+01	8,48E+00
<b>k/ktst</b>	5,46E-04	5,24E-04	5,02E-04	4,34E-04	3,35E-04	2,79E-04	2,42E-04	2,12E-04	1,49E-04	6,65E-05

### 4.1.3. Momentos Estatísticos

O potencial obtido pela dinâmica de Langevin é dependente estritamente da posição da partícula, e, portanto, qualquer informação sobre o sistema é obtida pela sua posição em função do tempo. Outras informações relevantes sobre o sistema podem estar contidas em análises estatísticas para além da distribuição populacional de posições, que são obtidas pelo histograma das posições. Na tentativa de prever transições entre estados, Scheffer e col. [2012] tentaram estudar o perfil potencial biestável com respeito à maneira com que as entidades do sistema se relacionam, e que são refletidas, por exemplo, na função de correlação. De maneira análoga, Biggs e colaboradores lançaram mão dos momentos de distribuição (média, variância, assimetria e curtose) em função do tempo para observar indícios se o sistema em estudo está prestes a sofrer algum tipo de transição [BIGGS et al., 2009].

E de fato, foi com essa perspectiva (observando a evolução temporal das propriedades estatísticas) que os resultados das simulações, em especial em relação a série temporal ( $x(t)$ ), podem ser tratados. O perfil de certa distribuição estatística pode ser descrito por uma série de potências, sendo cada termo desta série chamado de momento. O primeiro deles, eo mais comum, que está elevado à primeira potência, é a média, que tem como função representar em uma distribuição a tendência central deste conjunto de dados. O segundo termo,

elevado ao quadrado, é a variância, uma medida da dispersão destes dados com relação à média, em outras palavras, é a largura à meia altura da distribuição. O terceiro e quarto termos (elevados ao cubo e à quarta potência, respectivamente) são a simetria e a curtose, termos com os quais estamos menos familiarizados. De maneira geral, a simetria é o parâmetro que mede o quanto a curva de frequências se afasta da posição central (média), enquanto que a curtose é uma medida relacionada ao achatamento do topo da curva, ou seja, mais precisamente é a dispersão dos valores com relação a uma distribuição normal (com média zero e variância um).

Em termos práticos o resultado da posição, que é dado no MATLAB como um vetor, foi decomposto de duas maneiras distintas, para que os momentos pudessem ser avaliados em diferentes intervalos de tempo sob diferentes perspectivas: a primeira, e mais intuitiva, foi dividi-lo em partes iguais (intervalos contínuos) – por exemplo, um vetor de “N” pontos pode ser dividido em N/n vetores de “n” pontos, como  $v_1=(x_1,x_2,x_3,\dots,x_n)$ ,  $v_2=(x_{n+1},\dots,x_{2n})$ , ... ,  $v_{N/n}=(x_{N-n+1},\dots,x_N)$ ; a segunda maneira consiste em fracionar este vetor posição em vetores cada vez maiores (intervalos crescentes) - um vetor de N pontos será dividido em “N/h” vetores, em que “h” é um parâmetro arbitrário (chamado de frequência de divisão), de maneira que os vetores subsequentes contenham o vetor anterior mais “h” pontos, ou seja,  $v_1=(x_1,x_2,x_3,\dots,x_h)$ ,  $v_2=(x_1,x_2,\dots,x_h,\dots,x_{h+1},\dots,x_{2h})$ , ... ,  $v_{N/h}=(x_1,\dots,x_h,\dots,x_{2h},\dots,x_N)$ . Para melhor funcionamento do programa essa análise de dados foi feita de maneira interativa utilizando o MATLAB, no qual o comando “propriedade” é substituído por “mean” (média), “var” (variância), “skewness” (simetria) e “kurtosis” (curtose).

```

h=50;
nv=N/h;
for j=1:nv;
    'propriedade1'(j)='propriedade'(xis(((j-1)*h+1):(j*h)));
    'propriedade2'(j)='propriedade'(xis(1:(j*h)));
end

```

Após uma determinada simulação utilizando  $N=1 \times 10^5$  (em um passo com  $\Delta t=1 \times 10^{-3}$ ) obtivemos o vetor da posição e o dividimos da primeira maneira com  $n=50$ , isto é, obtivemos 2000 vetores de mesmo tamanho e que representam intervalos de tempo subsequentes (cada um representando os pontos da posição da partícula em  $5 \times 10^{-2}$  s); para cada um desses novos vetores divididos calculamos os momentos estatísticos, cujos resultados estão na Figura 10. O resultado da simulação também foi submetido à divisão de acordo com a segunda maneira: utilizando  $h=50$ , obtivemos também 2000 vetores, que representam intervalos de tempo cada vez maiores (o primeiro vetor representa os primeiros  $5 \times 10^{-2}$  s, o segundo os primeiros  $10 \times 10^{-2}$  s, o terceiro  $15 \times 10^{-2}$  s, e assim por diante). Os resultados estão na Figura 11.

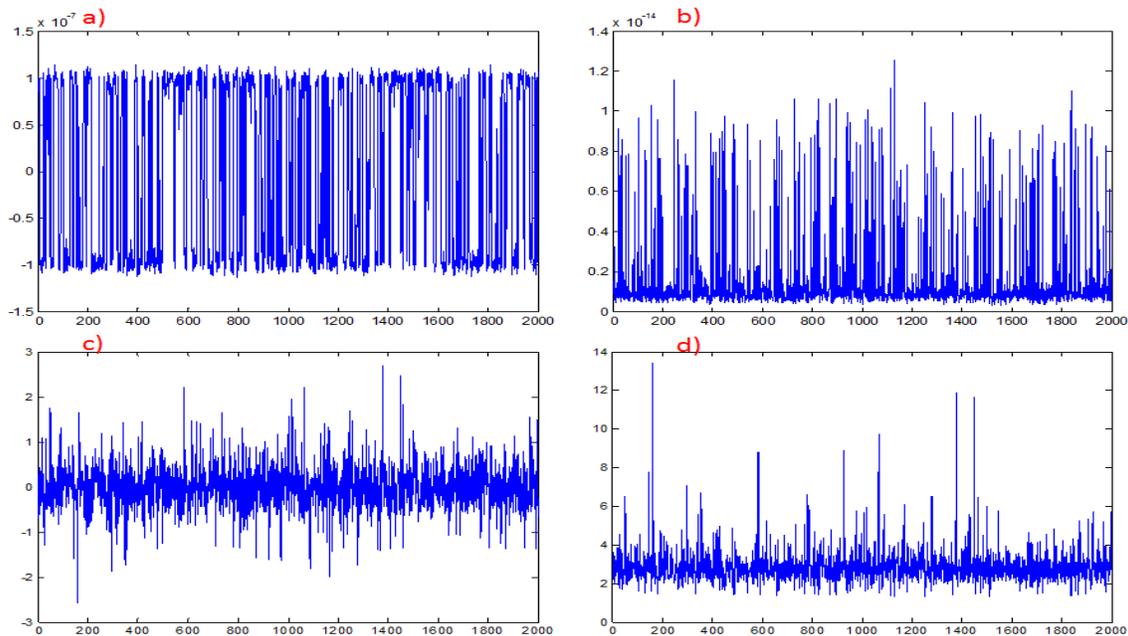


Figura 10: Gráficos dos momentos estatísticos quando o vetor posição é dividido de acordo com a primeira maneira, intervalos contínuos. Resultados para a) média b) variância c) simetria e d) curtose.

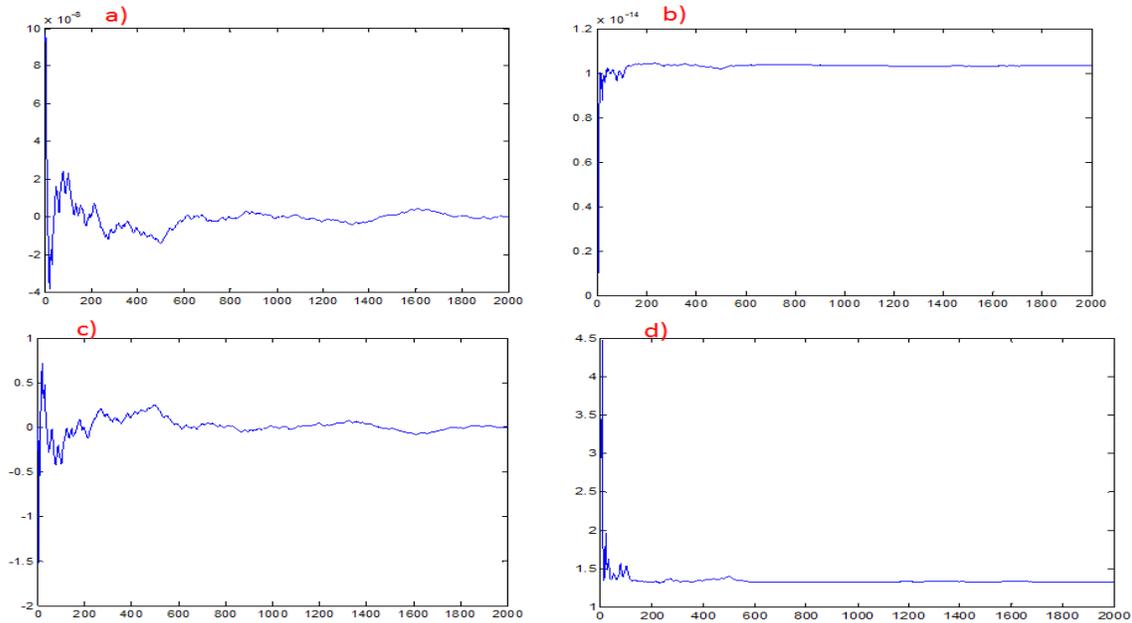


Figura 11: Gráficos dos momentos estatísticos quando o vetor posição é dividido de acordo com a segunda maneira, intervalos crescentes. Resultados para a) média b) variância c) simetria e d) curtose.

#### 4.1.3.1. Intervalos Contínuos

Ao particionar o vetor posição o que se calcula são os momentos estatísticos em um determinado intervalo de tempo – por exemplo, para a média (dada na Figura 10a) cada ponto é o resultado do cálculo do valor médio da posição que a partícula ocupou no intervalo de tempo estudado, sendo, dessa forma natural esperar que o perfil deste gráfico seja parecido com o perfil dos dados originais (posição em função do tempo), como é explicitamente observado ao se comparar as Figuras 10a e 7b. Podemos, no entanto, ressaltar uma diferença entre esses gráficos que está relacionada com a dispersão dos dados em torno das posições de equilíbrio ( $x_0$  e  $-x_0$ ): enquanto nos dados originais ( $x(t)$ ) há uma dispersão muito grande em torno das posições de equilíbrio, isso não ocorre quando obtemos a média das posições em um intervalo contínuo. Tal diferença pode ser útil, já que nessa segunda perspectiva as posições referentes às transições são mais bem definidas.

Em relação às medidas da variância nos intervalos de tempo podemos correlacionar cada pico a uma transição entre estado, cujo comportamento é resultado do fato de que a variância é uma medida de dispersão, sendo a grosso

modo, a diferença da distância do ponto em questão com a média elevada ao quadrado, sendo, portanto, que quanto maior essa distância, maior a variância. Conseqüentemente, frações de tempo que apresentam transições entre estados apresentam uma maior dispersão na posição quando comparadas às frações de tempo em que não ocorrem essas transições. No nosso trabalho não foi observado nenhum padrão referente às análises do terceiro e do quarto momentos estatísticos, que se mostraram, por sua vez, muito ruidosos e de difícil interpretação.

#### 4.1.3.2. *Intervalos Crescentes*

Observar como os momentos estatísticos se comportam em determinados intervalos, apesar de trazer informações relevantes a respeito da dinâmica, não nos forneceu muitas informações sobre como o sistema evolui temporalmente, afinal frações consecutivas de tempo não é (ou é pouco), a princípio, correlacionadas entre si. No entanto, se dividirmos o tempo não mais em intervalos iguais, mas sim em intervalos cada vez maiores estaremos calculando como as propriedades estatísticas estão variando com o tempo. Por exemplo, idealmente quando  $t \rightarrow \infty$  a média geral ( $\langle x(t) \rangle$ ) do nosso sistema bi quadrático e equipotencial é zero; porém, é natural esperar que nos primeiros instantes a média das posições seja diferente de zero – considerando, por exemplo, que a simulação tenha começado na região dos reagentes –, mas a medida que o tempo passa, a partícula começa a flutuar entre os estados (de reagentes e de produtos), fazendo com que a média das posições passe a convergir para zero. De fato observamos que cada um dos parâmetros apresenta um perfil em que nos instantes iniciais há grandes variações, e que no decorrer do tempo o resultado converge para um determinado valor (como é visto na Figura 11).

Notamos primeiramente que os perfis de variação dos momentos podem ser comparados dois a dois, já que a média e a simetria (primeiro e terceiro momentos) são simétricos em relação à abscissa e demoram mais para convergir, enquanto que a variância e a curtose (segundo e quarto momentos) apresentam a mesma simetria com relação à abscissa e convergem mais rapidamente. Obviamente, os gráficos, apesar de possuírem um perfil semelhante entre si,

apresentam diferentes valores para a convergência. No caso da média, a convergência se dá para o valor médio das posições (idealmente zero); para a variância o valor de convergência é o quadrado do desvio padrão (que é a própria variância por definição). A simetria também tende a zero, já que por se tratar de um potencial simétrico não esperamos que exista algum desvio para um lado ou outro, mas sim que se distribuam igualmente frente a um eixo (mesmo que, no entanto, os valores de simetria nos instantes iniciais variem tipicamente em torno de -1,5 e 1,5). Em relação à curtose, os valores são sempre positivos, o que evidencia que os picos das distribuições são alongados em relação à curva normal.

Para poder utilizar esses resultados de maneira sistemática é necessário definir uma frequência de divisão. A Figura 12 mostra dois resultados para simulações com  $N=(1 \times 10^5)$  e, portanto, tempo total de 100 s, para temperaturas diferentes (em cada gráfico estão descritos as diferentes frequências de divisão, sendo elas,  $h=10$  e  $h=50$ ). Ao analisarmos os gráficos, podemos concluir (qualitativamente) que não houve mudanças significativas no tempo de convergência para ambas as frequências, isto é, para  $h=10$  e  $h=50$  o tempo de convergência foi aproximadamente de 55 s para  $T=300$  K e de 40 s para  $T=600$  K. Desta forma, para diminuir o custo computacional, foi tomado como padrão utilizar  $k=50$  para todas as análises.

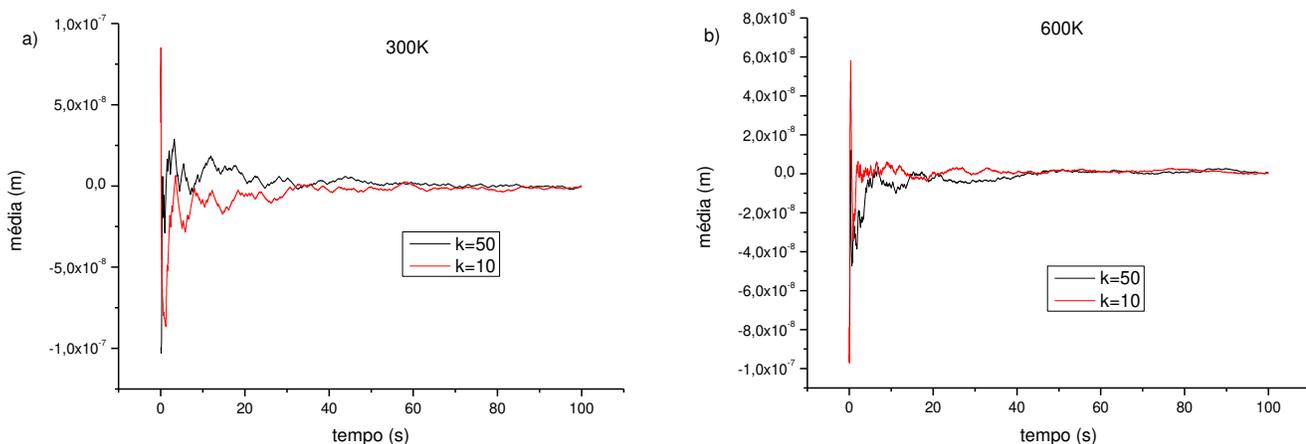


Figura 12: Comparação entre as diferentes frequência de divisão  $h=10$  e  $h=50$  para as temperaturas de 300 e 600 K)

Também foi avaliado como comportamento o efeito da temperatura, cujos resultados são mostrados na Figura 13. Podemos observar qualitativamente que temperaturas mais altas apresentam um tempo de convergência menor. Tal resultado já era esperado, afinal assume-se que em temperaturas maiores a constante de velocidade da reação é cada vez maior e, portanto, a oscilação entre estados é dada numa maior frequência, o que acarreta no menor tempo de convergência da média da posição.

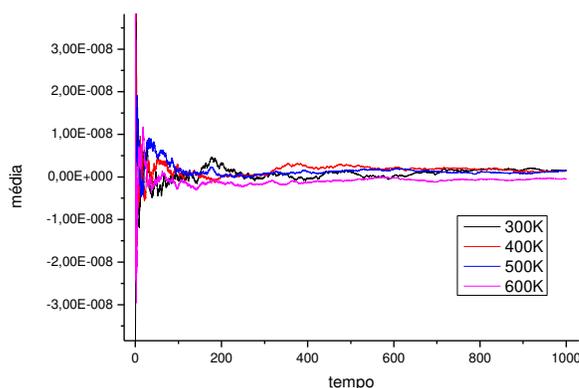


Figura 13: Efeito da temperatura sobre a média das velocidades

O foco será, a partir de agora, sobre como a média (primeiro momento) evolui em função do tempo. Fisicamente esse parâmetro pode ser diretamente correlacionado como um critério de equilíbrio. O sistema em questão é descrito classicamente, e o potencial é somente função da posição da partícula – como já dito anteriormente, utilizamos como critério para julgar se a simulação tem sentido físico quando a razão entre os tempos de residência é igual a unidade (para um sistema equipotencial). Isso porque, a princípio, no equilíbrio a partícula passa a mesma fração de tempo tanto na região dos produtos, quanto na região dos reagentes. Outra implicação resultante da forma do potencial está relacionada à simetria, isto é, a amplitude do lado dos reagentes é igual a amplitude do lado dos produtos, e, quando estes dois critérios forem satisfeitos, teremos que a média das posições será igual a zero (para superfícies bi quadráticas e equipotenciais). Desta forma, é intuitivo compreender que o valor da média tende a zero conforme o sistema tende ao equilíbrio. Como grande conclusão disto temos que é a partir deste perfil de evolução temporal da média que podemos achar o tempo de

convergência a zero, e, portanto, atribuir a esse valor o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio.

O desafio se torna agora definir o próprio tempo de convergência, sendo possível obter a curva de potencial a partir do histograma de distribuição de um vetor posição até o tempo de convergência. Como critério de convergência traçamos sobre a evolução temporal da média três retas, sendo que uma delas representa o valor médio e as outras duas representam esse valor mais ou menos o desvio padrão (Figura 14). Isso permite que quando os pontos dos gráficos parem de variar fora das linhas de delimitação (média  $\pm$  desvio padrão), pode-se tomar como t1 o tempo de convergência em que a média parcial se iguala à média total pela primeira vez e como t2 o valor obtido pela segunda vez.

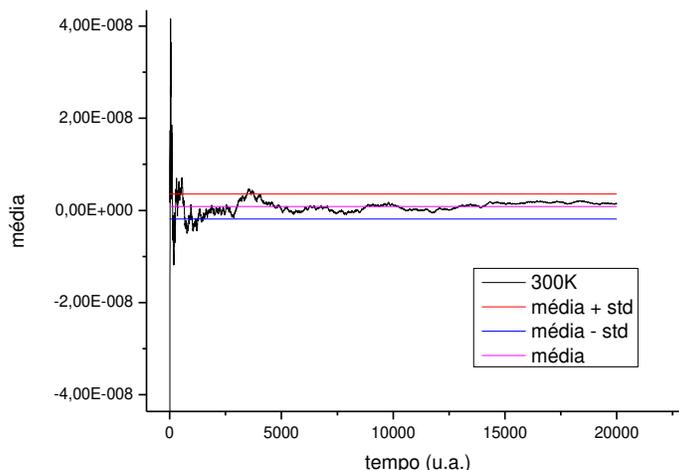


Figura 14: Critério para determinação dos tempos de convergência t1 e t2

A partir disso pudemos criar a Tabela 3, que contempla os tempos de convergência em função da temperatura. Para que possamos afirmar que de fato não é necessário para criar a curva de potencial todo o tempo da simulação, e conseqüentemente, poder obter a taxa da reação química pela teoria de Kramers, escolheu-se fracionar o vetor posição das simulações para os tempos indicados em t1 e t2; com isso, as análises estatísticas para obtenção da função potencial foram realizadas, cujos resultados podem ser observados na Figura 15.

Tabela 3: tempos de convergência em função da temperatura.

Temperatura (K)	tempo conv. 1 (t1) (s)	% do tempo total -1000s	Tempo conv. 2 (t2) (s)	% do tempo total - 1000s
300	250,05	25,01%	648,8	64,88%
400	317,25	31,72%	628,55	62,86%
500	182	18,20%	396,45	39,65%
600	184	18,46%	320,25	32,02%

Podemos observar que a curva de potencial para os tempos de convergência t1 e t2 foram muito similares às obtidas utilizando o tempo total para todas as temperaturas; é possível observar que a taxa de Kramers tem uma divergência, da ordem de 1% a 2%, maior para todos os resultados. Para 300K ( $k^0=45,72 \pm 0,99$ ), para 400 K ( $k^0=47,72 \pm 0,34$ ) e em 500 K ( $k^0=53,01 \pm 1,32$ ) e finalmente para e 600 K ( $k^0=55,72 \pm 0,46$ ). Apesar de não ser muito evidente, observa-se também que há certa correlação entre os tempos de convergência e a temperatura, já que para temperaturas mais altas (para 600K t1=184s) apresentam um tempo de convergência menor quando comparado a temperaturas mais baixas (para 300K t1=250s).

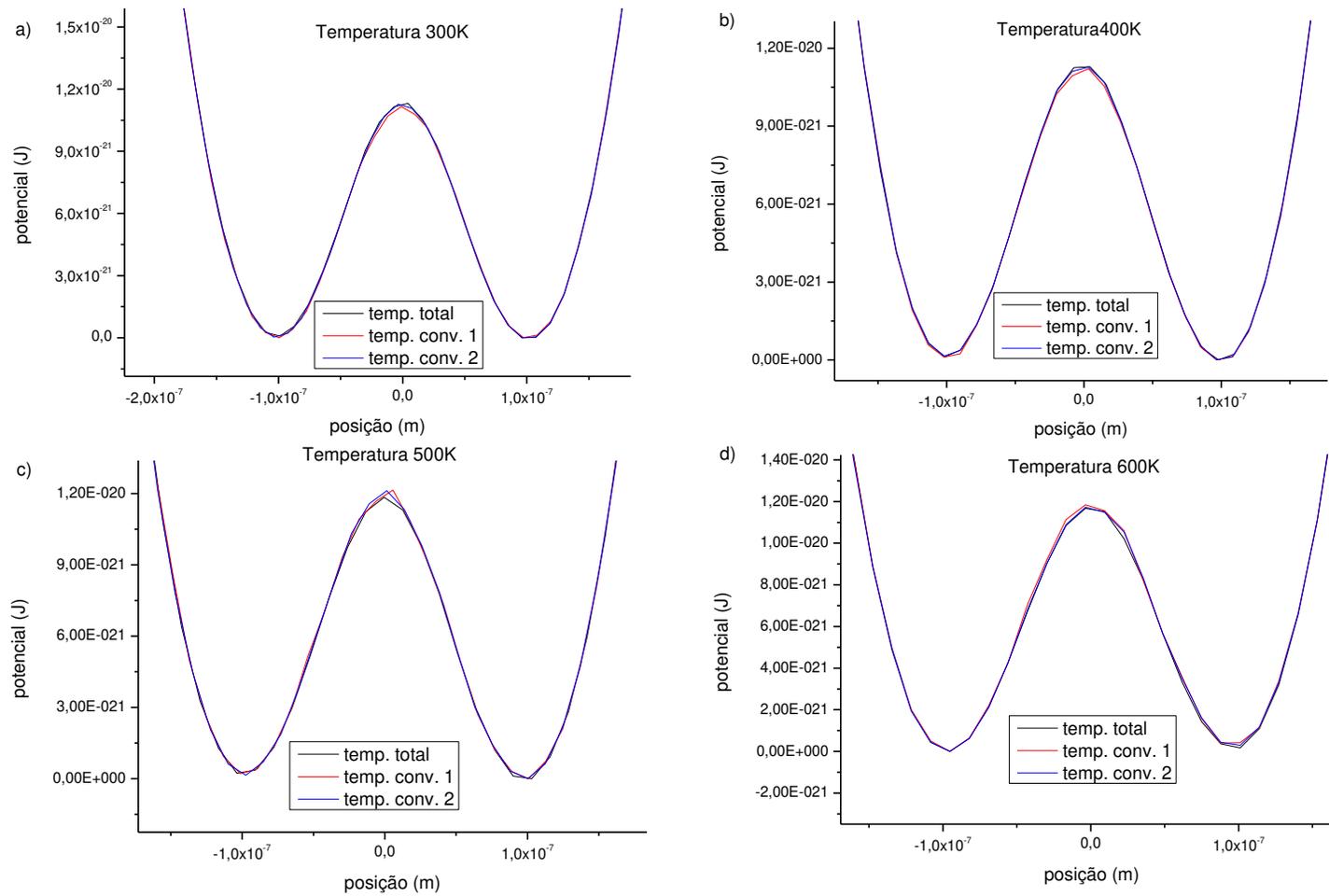


Figura 15: Análises das curvas de potencial em função do tempo de convergência para as temperaturas de a) 300 K, b) 400 K, c) 500 K e d) 600K

**Tabela 4: Resultados calculados dos fatores pré-exponencial de taxa de Kramers e TST.**

temperatura	ttot	t1	t2									
	300			400			500			600		
<b>k0</b> ( $10^{-5}$ N/m)	24,01	24,08	24,20	25,29	25,60	25,23	27,45	27,95	28,56	29,58	29,69	29,83
<b>kb</b> ( $10^{-5}$ N/m)	24,75	22,91	24,64	25,42	24,48	24,88	27,28	27,50	28,87	28,81	29,60	28,70
<b>gamma</b> ( $10^7$ 1/s)	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
<b>w0</b> ( $10^4$ 1/s)	6,77	6,78	6,80	6,95	6,99	6,94	7,24	7,31	7,39	7,52	7,53	7,55
<b>Wb</b> ( $10^4$ 1/s)	6,87	6,61	6,86	6,97	6,84	6,89	7,22	7,25	7,43	7,42	7,52	7,40
<b>ktst</b> ( $10^5$ 1/s)	1,06	1,07	1,07	1,09	1,10	1,09	1,14	1,15	1,16	1,18	1,18	1,19
<b>kk(over)</b> (1/s)	46,25	44,57	46,33	48,11	47,50	47,54	51,93	52,60	54,48	55,40	56,26	55,52
<b>k/ktst</b> ( $10^{-4}$ )	4,35	4,18	4,34	4,41	4,32	4,36	4,57	4,58	4,70	4,69	4,76	4,68

#### **4.1.4. Taxa antes da média**

Este modelo tem como finalidade explorar a relação entre curva de energia potencial e a velocidade do processo, e foi mostrado que para uma simulação (sistema) com tempo muito longo a curva potencial é muito semelhante àquela de um sistema nos iniciais de equilíbrio (como foi definido o tempo de convergência acima). Porém a motivação deste trabalho vem na tentativa de estimar a velocidade de reações muito lentas, e, portanto um sistema no qual o tempo de convergência é muito longo – em uma ordem experimentalmente impraticável. Em decorrência disso a meta se torna determinar a velocidade antes do sistema atingir o equilíbrio, ou seja, obter o potencial antes que o sistema alcance o estado de equilíbrio.

O procedimento adotado para estimar a constante de velocidade para tempos inferiores ao tempo de convergência foi fracionar a série temporal (x(t)) para uma porcentagem do tempo total da simulação – por exemplo, se uma simulação tem um tempo total de 100 s, pode-se ‘cortar’ 1% desta serie temporal, gerando uma nova série com 1 s. Para as simulações anteriores observa-se que a fração dos tempos de convergência t1 é da ordem de 30% para as temperaturas menores (300K e 400K) e da ordem de 20% para as temperaturas maiores (500K

e 600K) (Tabela 4). Com base nestes dados foram geradas novas simulações para temperaturas entre 200K e 600K, e os resultados obtidos foram fragmentados em séries temporais de 1%, 5%, 10%, 20% e 30% com relação ao tempo total de simulação. A partir destas frações da série original foi extraída a curva potencial definida pela estatística de Boltzmann (Eq. 28), e posteriormente estimada a constante de velocidade pela teoria de Kramers (Eq. 16). A Figura 16 mostra as curvas de energia potencial em função da porcentagem de tempo.

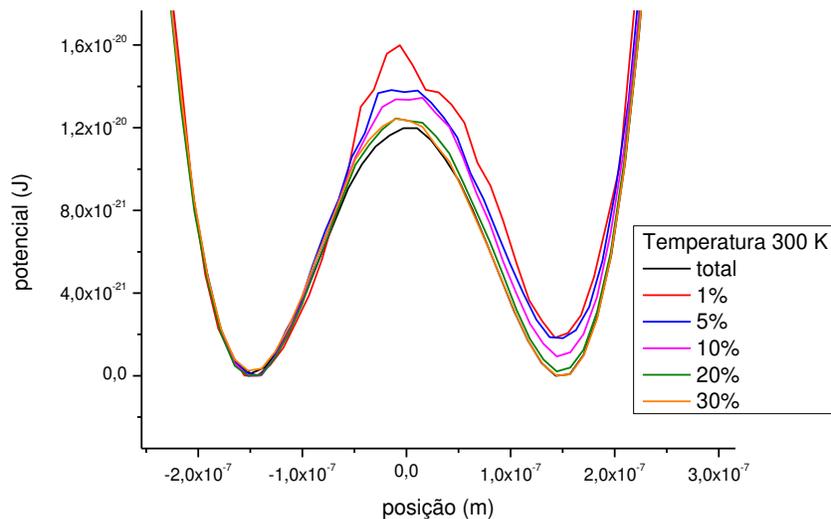


Figura 16: Curvas de energia potencial em função da fração de tempo para a temperatura de 300K.

Com base na Figura 16 é possível observar como a curva potencial é cada vez mais parecida com a curva potencial referente ao tempo total conforme a porcentagem de tempo aumenta. Este resultado é bastante intuitivo, e pode ser analisado sob duas perspectivas: a primeira, e mais evidente é de que quanto maior a porcentagem temporal, mais próximo do equilíbrio está o sistema. A segunda maneira de pensar, e não tão direta, está relacionada com a amostragem, já que quanto maior a série temporal, maior a quantidade de dados e consequentemente melhor a qualidade amostral. Mais objetivamente, nota-se que para a fração de 1% a curva potencial (principalmente na região da barreira) é bastante irregular, para as frações de 5% e 10% já se observa (ainda na região da barreira) uma maior regularidade, e, por fim, para as porcentagem de 20% e 30% a curva já apresenta um formato praticamente igual ao potencial referente ao

tempo total. Nota-se também que com o aumento da porcentagem há uma diminuição na altura da barreira, o que é consequência direta da distribuição, pois quanto menor a porcentagem, menor a amostragem na região de transição (barreira), fazendo com que o histograma de posições apresente uma menor contagem para as posições de transição. Assim, ao aplicar a Eq. 33, quanto menor a contagem no histograma maior será o valor da energia potencial, como se observa na Figura 16.

A razão entre os mínimos de energia (região de poço) nos traz informações a respeito da constante de equilíbrio, que para um sistema equipotencial tem de ser o mais próximo da unidade, já que as energias são iguais nos dois poços. Assim sendo, nota-se que quanto maior a porcentagem mais próximos são os valores de energia para as regiões de estabilidade, e conseqüentemente, a razão entre essas energias é cada vez mais próxima da unidade – observe que para as porcentagem de 20% e 30% os mínimos apresentam as mesma energia, sendo um indício de que o sistema se encontra em estado de equilíbrio.

Tabela 5: Resultados para o fator pré-exponencial da taxa de Kramers em função da porcentagem de tempo

Temperatura (K)	$k_{\text{Kramers total}}$	$k_{\text{Kramers 1\%}}$	$k_{\text{Kramers 5\%}}$	$k_{\text{Kramers 10\%}}$	$k_{\text{Kramers 20\%}}$	$k_{\text{Kramers 30\%}}$
200	49,44876	42,08818	46,18542	47,07575	52,96173	52,45894
300	50,34686	53,91414	56,29986	53,85376	50,79831	51,56666
400	47,01915	40,60493	43,00662	48,99141	48,65289	47,9078
500	47,78728	63,1589	50,39484	46,53477	49,75402	47,25923
600	48,32524	43,69996	41,16054	46,21443	48,30711	48,50886

Os resultados para o cálculo do fator pré-exponencial para a taxa de Kramers estão na Tabela 5. Nota-se que quanto maior a temperatura, mais próxima do tempo total é a fração de 30 % do valor do fator pré-exponencial da teoria de Kramers ( $k_{\text{kramers}}^0$ ). Mais precisamente, é possível notar que há uma tendência de que a partir de 10% de tempo,  $k_{\text{kramers}}^0$  é já suficientemente próximo do valor para tempo total (ficando em uma faixa de 2% a 6% de diferença), ou seja, com apenas uma fração de 10% do tempo já é possível estimar com uma boa precisão a taxa de Kramers. Outro resultado apresentado na Tabela 5 é que,

apesar da curva de potencial obtida para uma fração de apenas 1% de tempo ser bastante irregular e, portanto, ter pouca semelhança com a curva de potencial para o tempo total, os valores para  $k_{\text{kramers}}^0$  apresentam uma diferença de aproximadamente 10 a 15% (com exceção do resultado para 500K no qual há uma diferença de 32%). Esta pequena diferença é aparentemente contraditória, já que uma grande divergência é evidente entre as curvas de potencial quando comparada com o a curva potencial para o tempo total. Entretanto, para o cálculo da taxa de Kramers é feita uma regressão para um polinômio de 2º grau nas regiões de poço e barreira e, ao executar tal processo, a região irregular da barreira se torna suave, apresentando uma frequência associada não tão diferente do caso para o tempo total (Figura 17).

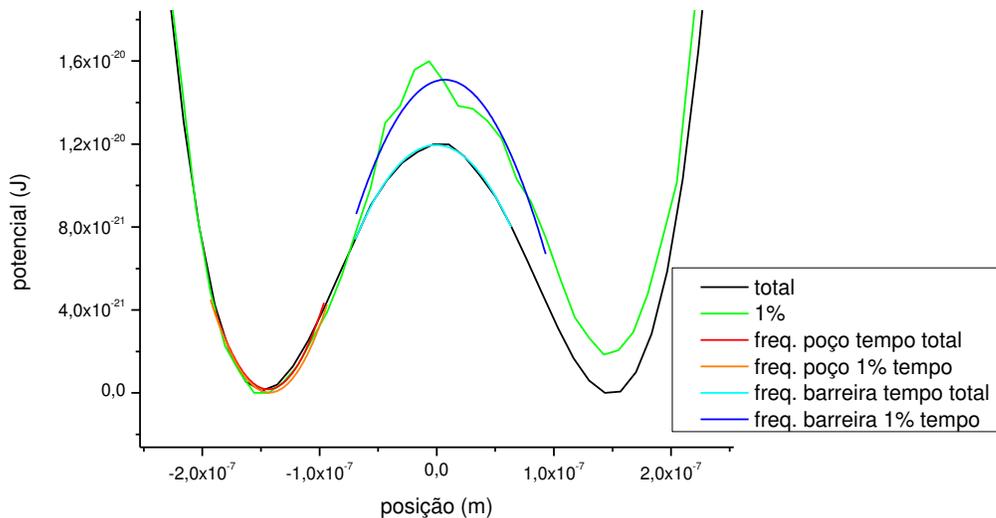


Figura 17: Efeito da regressão polinomial sobre as regiões de poço e barreira para o tempo total e para 1% do tempo.

#### 4.1.5. Número de Transições

Examinando esse sistema sob a perspectiva de um sistema estocástico dinâmico que sofre transições entre estados, e considerando que essa transição é um processo de primeira ordem, tem-se que a constante de velocidade tem ordem de frequência (Hz ou  $s^{-1}$ ). As próprias equações de TST e de Kramers para o cálculo da constante de velocidade (Eq. 10 e 16, respectivamente) levam em

consideração as frequências presentes na curva potencial do sistema. É evidente a relação da unidade de frequência com processos periódicos (desenvolvido no tempo) e, de fato, a transição entre estados em um processo de primeira ordem é cíclico. Sob esse entendimento pode-se definir um processo cíclico como sendo o número de ciclos igual ao produto entre a frequência do processo e tempo associado de observação. Este conceito já é bem estabelecido e são inúmeros os exemplos disso, neste trabalho especificamente, podemos citar o caso do número de *frames* de um vídeo, que é o produto entre a taxa de gravação ( $frames \cdot s^{-1}$ ) pelo tempo ( $t$ ) do vídeo.

Em vista disso surge a possibilidade de tentar relacionar a constante de velocidade (com unidade de frequência) com o número de transições do processo (aqui sendo o número de ciclos). Pode-se inferir, portanto, que o produto entre o tempo de observação (no caso da nossa simulação, como sendo o próprio tempo da simulação) e a constante de taxa está intimamente relacionado com o número de transições entre um estado e outro. Com esse raciocínio, se atribui que há uma correspondência entre a constante de velocidade e a frequência da transição entre os estados.

A metodologia utilizada para avaliar tal relação consiste na determinação do número de transições para a série temporal  $x(t)$ . Para tanto, foi implementado um algoritmo capaz de contabilizar essas transições. Tal algoritmo consiste na ideia de que a partir de uma delimitação (na posição  $x_b=0$ , isto é, no máximo da barreira) a série temporal é binarizada, ou seja, se  $x(t)<0$  pode-se definir que  $x_{binarizado}(t)=-1$ , ou que se  $x(t)>0$  tem-se  $x_{binarizado}(t)=+1$ , sendo, então, que a partir deste resultado é obtida a correlação de pontos ( $x_{binarizado}(t) \cdot x_{binarizado}(t+1)$ ). Se esta correlação for negativa diz-se que houve transição entre estados, e essa transição deve contabilizada para definir a direção da mudança de estado, a passagem de produtos para reagente, por exemplo, sendo essa contagem de transição ao fim dividida por dois, uma vez que se considera que há o mesmo número de transições de ida e volta. Os resultados para o número de transições em função da temperatura e do tamanho da série temporal são mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Número de Transições calculado em função da temperatura e tamanho da série temporal.

Temperatura (K)	Número de Transições					
	Tempo total	1%	5%	10%	20%	30%
200	412	5,5	23	40,5	58,5	99,5
300	1730	6	68,5	131,5	322	486
400	3673	32,5	192,5	378,5	775,5	1144
500	5481	60	286	531	1100	1732,5
600	7376	77,5	420	821	1535	2339

É evidente que quanto maior o tamanho da série temporal, maior é o número de transições. Porém, observa-se pela Tabela 6 que quanto maior a temperatura, maior o número de transições para o mesmo intervalo de tempo. Se essa premissa estiver correta, que também é intuitiva, já que quanto maior a temperatura, mais 'rápido' é o processo, levando, portanto, a transições entre estados mais frequentes. Para avaliar esta conjectura partimos da equação de Arrhenius (Eq. 2) e multiplicamos ambos os lados pelo tempo associado à série temporal, assim, tanto a constante de velocidade ( $k$ ), quanto o fator pré-exponencial ( $A$ ) (ambos com unidades de  $s^{-1}$ ) se tornam números adimensionais ( $N_{trans}$  e  $A'$ , respectivamente); assim temos que o número de transições ( $N_{trans}$ ) é um decaimento exponencial da razão entre a energia de ativação e a energia térmica do ambiente ( $E_a/RT$ ) – ou, para um sistema que consiste de apenas uma partícula, a razão entre  $V_0/k_B T$  - (Eq. 40).

$$k(s^{-1}) * t_{associado}(s) = A(s^{-1}) * t_{associado}(s) * e^{\frac{-E_a}{RT}} \equiv N_{trans} = A' * e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Eq. 40}$$

Os resultados apresentados na Tabela 6 foram traçados em função da razão  $V_0/k_B T$  (na qual  $V_0=900(K)*k_b$ ), foram feitas as regressões para decaimento exponencial (resultados na Tabela 7) e os gráficos são apresentados na figura 18.

Tabela 7: Resultado para regressão de decaimento exponencial em função do tamanho da série temporal.

Tempo	$N_{\text{trans}} = A' \cdot \exp(-R_0 \cdot (V_0/k_B T))$			
	A'	$A(s^{-1}) = (A'/t_{\text{obs}})$	$R_0$	$R^2$
Total	30740	307,4	0,9527	0,9997
1%	516,6	516,6	1,242	0,9795
5%	2227	445,4	1,119	0,9941
10%	4432	443,2	1,137	0,9908
20%	6782	339,1	0,9967	0,9967
30%	10610	353,6	1,006	0,9991

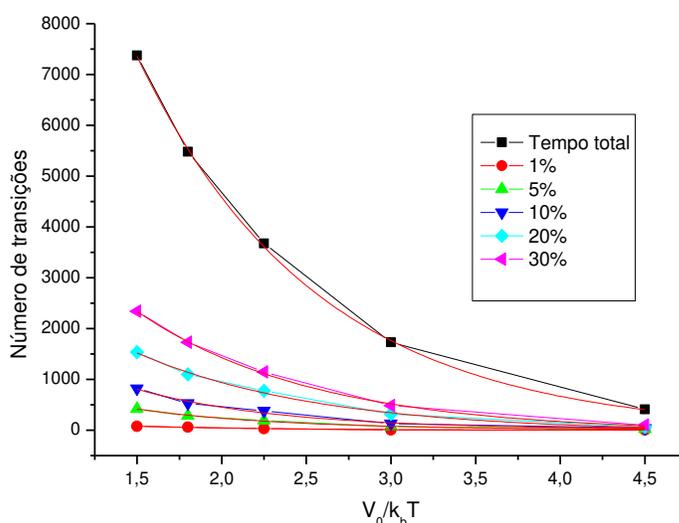


Figura 18: Curvas de decaimento exponencial do número de transições em função da razão  $V_0/k_B T$  para diferentes tamanhos da série temporal.

Podemos então correlacionar a Eq. 40 com a regressão para o decaimento exponencial. O parâmetro  $R_0$  idealmente é unitário, isso porque a abscissa é a razão entre a barreira potencial e a energia térmica do ambiente ( $V_0/k_B T$ ). Observa-se que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) também é muito próximo da unidade, demonstrando que as regressões têm grande correlação com os dados. Do parâmetro  $A'$  é possível obter os fatores pré-exponenciais da equação de Arrhenius ( $A$ ), que são cerca de uma ordem de grandeza maior (como observados nos dados na Tabela 7) quando comparados com os fatores pré-exponenciais da teoria de Kramers ( $k_{\text{kramers}}^0$ ) (dados na Tabela 5). Tais resultados podem ser consequência de uma superestimativa sistemática da contagem do número de

transições com o algoritmo desenvolvido, já que em alguns casos a partícula passa pela região limítrofe ( $x=0$ ) sem de fato passar por uma transição (ou seja, não atravessa a barreira potencial), sendo essas transições chamadas de transições não reativas.

Essa perspectiva apresenta coerência com a própria definição de constante de taxa a partir dos tempos de residência ( $\tau_A$ ) (Eq. 26). Afinal, se  $\tau_A$  é o tempo em que a partícula passa em média em determinado estado, o inverso de  $\tau_A$  (definido com constante de velocidade) é de fato relacionado com a frequência das transições entre estados.

## 4.2. Pinças Ópticas - Resultados Experimentais

### 4.2.1. Caracterização do movimento Browniano.

Qualitativamente, como já explicitado, uma partícula é dita browniana quando seu deslocamento em função do tempo é imprevisível, a Figura 19 mostra uma trajetória típica de uma partícula browniana.

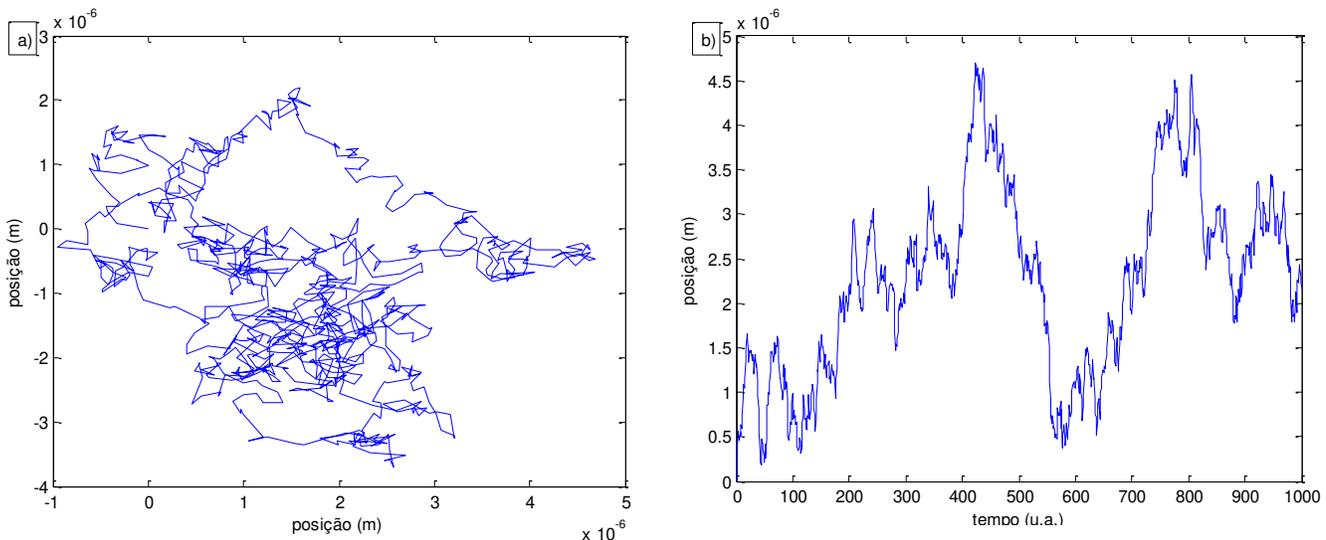


Figura 19: Resultados experimentais para uma partícula browniana a) trajetória e b) posição em função do tempo

No entanto, mesmo com esse comportamento errático, estas partículas apresentam algumas propriedades estatísticas que estão intimamente relacionadas com fenômenos de transporte em meios viscosos. De acordo com a teoria do movimento Browniano, é sabido que o deslocamento médio de uma

partícula submetida a tais condições é zero, permitindo, dessa maneira, o uso da equação de Einstein, que equaciona o percurso quadrático médio em função do tempo. Na teoria, esse percurso quadrático médio – que pode ser interpretado como a dispersão da partícula frente a uma posição de referência - tem uma resposta linear em função do tempo. Sabendo-se que o modelo leva em consideração que o movimento no espaço tem componentes independentes (a posição em determinada coordenada não é função da posição das outras coordenadas), podemos escrever:

$$rms = \langle r^2 \rangle = n_{dim} \times 2Dt \quad \text{Eq. 41}$$

Conceitualmente a Eq. 41 foi derivada para um sistema de muitos corpos e tempo grande. Para a trajetória de cada partícula há uma variância relacionada após determinado intervalo de tempo, e, portanto um coeficiente de difusão associado. Toma-se a média desses valores e obtém-se o coeficiente de difusão médio das partículas em determinado substrato. Há duas considerações importantes sobre esse modelo: a primeira delas é com relação às escalas de tempo, e a segunda é com relação à amostragem das trajetórias.

Dependendo da escala de tempo que se observa, o tipo de movimento de uma partícula microscópica em meios viscosos pode ser balístico (determinístico) para tempos pequenos ou difusivo (browniano) para tempos grandes. Experimentalmente a transição de um movimento balístico para um difusivo foi observada e determinada como sendo da ordem de nano a micro segundos ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  s) [LI et al., 2010; HUANG et al., 2011], ou seja, para tempos superiores a  $10^{-6}$  segundos a partícula pode ser considerada browniana. Desse modo, para os experimentos e simulações realizados nesse trabalho a ordem de tempo associada permite concluir que a partícula se encontra de fato em regime difusivo. Porém, no que diz respeito à amostragem das trajetórias, geralmente se leva em consideração um *ensemble* das trajetórias das partículas, isto é, para cada experimento (ou simulação) obtém-se um conjunto de muitas trajetórias para se atingir um resultado médio.

Entretanto, o nosso sistema de interesse apresenta uma única partícula, e, conseqüentemente, uma única trajetória por experimento/simulação. A partir da

década de 1990, com a evolução das técnicas de microscopia foi necessário o desenvolvimento e o aprimoramento das teorias para estimar coeficientes de difusão a partir de trajetórias individuais [QIAN et al.,1991; SAXTON, 1997]. A determinação do coeficiente de difusão a partir das trajetórias individuais se torna cada vez menos precisa quanto menor for a duração da série temporal dos resultados. Experimentalmente, obter séries temporais cada vez maiores é complicado, pois a detecção da partícula se torna cada vez mais complicada com o passar do tempo, já que a mesma pode sair do campo de visão do microscópio. Obter este tipo de propriedade - que é resultado de uma estática para muitos corpos acaba se tornando um desafio quando se trata de moléculas individuais [VESTERGAARD et al., 2014].

Os estudos preliminares para a caracterização do movimento Browniano foram baseados no trabalho de Catipovic e col. [2013], no qual descrevia duas maneiras diferentes (porém equivalentes) para determinar o coeficiente de difusão (“ $D_{hist}$ ” e “ $D_{msd}$ ” - maiores detalhes experimentais estão descritos na secção 3.8), ambos baseados em microscopia. Com o programa *ImageJ* foi determinada as posições independentes nos eixos x e y da partícula para cada instante. Com esta matriz de resultado podemos tratar os dados de duas maneiras diferentes: a primeira delas ( em seu trabalho chama de “Método 1”) permite calcular o coeficiente de difusão “ $D_{hist}$ ” a partir da análise do histograma de distribuição das posições ao se considerar o caso como unidimensional (isso é, com os eixos x e y sendo tratados de maneira independente) - Figura 20a, observe que o somatório do número de eventos no histograma de posições deve ser igual ao número de eventos totais, no caso em questão, 9 videos com 100 frames cada um e as posições tratadas separadamente obtemos um número total de eventos de 1800 - (Eq. 42); dessa forma, a variância do histograma ( $\sigma^2$ ) foi relacionada com a equação do coeficiente de difusão – já que  $\langle r \rangle^2 (10^{-18}) \ll \langle r^2 \rangle (10^{-13})$  – e considerando  $t_{total}=2,38$  s obtivemos como resultado  $D_{hist}= 5,23 \times 10^{-14} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  (Figura 20 a).

$$Var(x) = \langle r^2 \rangle - \langle r \rangle^2 \approx \langle r^2 \rangle = 2Dt_{total} \text{ Eq. 42}$$

A segunda maneira (no artigo chamada de “Método 2”) permite calcular o coeficiente de difusão “ $D_{msd}$ ” utilizando os valores do deslocamento quadrático médio (Eq. 43):

$$\langle r^2(\tau_{lag}) \rangle = \frac{\sum_{i=1}^N (r(t_i + \tau_{lag}) - r(t_i))^2}{N} \quad \text{Eq. 43}$$

No qual a variável  $\tau_{lag}$  é o tempo no qual desejamos calcular o deslocamento quadrático médio,  $t_i$  é o tempo relativo à  $i$ -ésima medida e  $N$  o número de observações. Na prática, este cálculo foi feito de maneira interativa utilizando o MATLAB:

```
for j = 0:1:sqrt(length(x))
msdx(j+1) = mean((x(j+1:end)-x(1:end-j)).^2);
end
tx = deltat*[0:1:length(msdx)-1];
```

para  $j=0$  observamos que  $msdx_0=0=media((x_1-x_1)^2, (x_2-x_2)^2, \dots)$ ; para  $j=1$  temos  $msdx_1=media((x_2-x_1)^2, (x_3-x_2)^2, \dots)$ ; para  $j=2$   $msdx_2=media((x_3-x_1)^2, (x_4-x_2)^2, \dots)$ , e assim sucessivamente até  $j=raiz(tamanho(x))$ . Em termos práticos, a cada interação o deslocamento quadrático médio é feito para tempos ( $\tau$ ) (abscissa) cada vez maiores, e, portanto o resultado ‘ $msdx(\tau_{lag})$ ’ é dado pela estatística de menos pontos. Por exemplo, se quisermos obter o deslocamento quadrático médio para  $\tau_{lag}=1s$  em um experimento em que cada observação é feita numa taxa de 10 Hz (10 quadros por segundo) devemos medir o deslocamento quadrático médio da observação entre  $x_1$  e  $x_{11}$ , entre  $x_2$  e  $x_{12}$ , até  $x_{N-10}$  e  $x_N$ , sendo possível observar que quanto maior  $\tau_{lag}$ , maior a dispersão dos pontos em relação a média dos pontos e menor a razão sinal ruído [SAXTON, 1997; MICHALET, 2010]. A consequência direta deste fato vai contra a intuição, pois, de fato, quanto mais pontos tiver a curva maior será o erro associado a estes pontos. Como se pode observar na Figura 20b, foram feitos vários experimentos a fim de se obter uma média destes valores. O resultado médio do deslocamento quadrático médio em

função da temperatura foi linearizado, e a partir do coeficiente angular foi determinado o coeficiente de difusão  $D_{msd}=5,63 \times 10^{-13} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ .

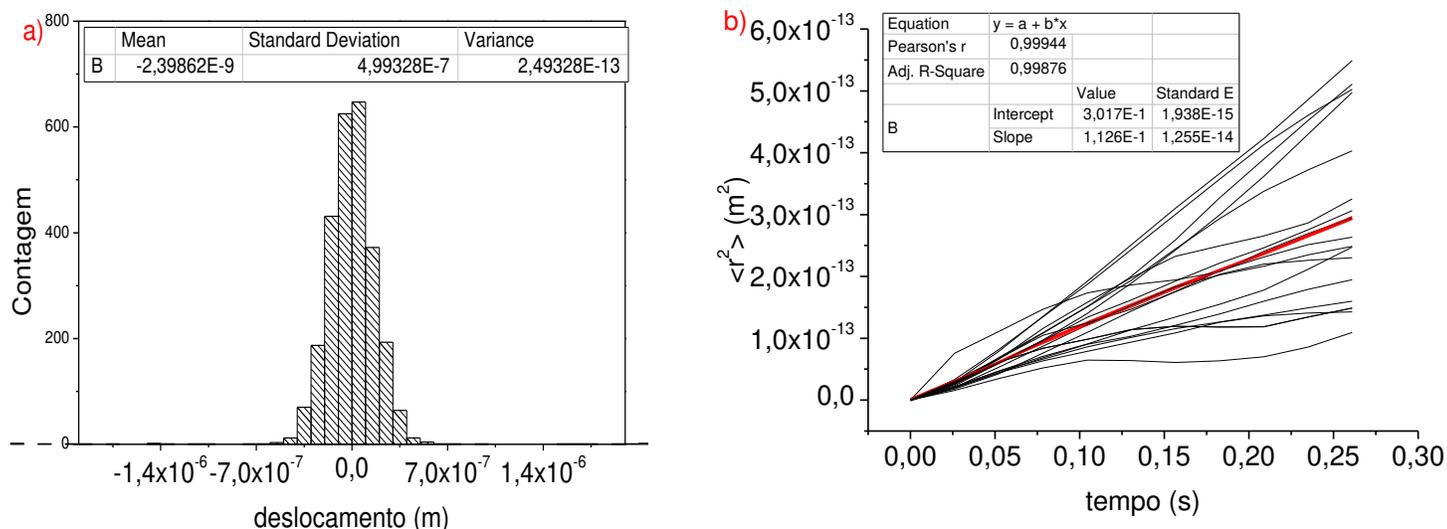


Figura 20: Resultados obtidos para o cálculo do coeficiente de difusão a) método 1 e b) método 2.

Apesar do conjunto de dados ser o mesmo para ambos os Métodos, houve uma grande discrepância entre os resultados para coeficiente de difusão obtido. A fim de comparar os resultados, e, portanto observar qual dos dois métodos melhor se aproxima com o modelo, para o sistema em questão podemos calcular, utilizando a lei de Stokes - Einstein (Eq. 5), o coeficiente de difusão teórico (“ $D_{teórico}$ ”). Usando  $k_B=1,38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ,  $T=294,65\text{K}$ ,  $r_p=0,236 \times 10^{-6} \text{ m}$ , e  $\eta=8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$  obtém-se  $D_{teórico}=1,020 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ . Observa-se, portanto uma grande discrepância na ordem de 2 ordens de grandeza para o Método 1 e de cerca de 50% para o Método 2. De acordo com a Catipovic e col. [2010], é natural que o erro associado a esse tipo de medida fique na ordem de 30%. No entanto, no mesmo artigo é relatado que, geralmente, o Método 1 apresenta um erro associado menor (da ordem de 15%), enquanto que como Método 2 é obtido um erro na ordem de 30%. De qualquer forma, observa-se que os erros associados ao experimento (para ambos os Métodos) (em comparação ao resultado teórico) ficaram muito diferentes ao relatado no artigo. Apesar de ter sido comentado na referência que erros dessa magnitude, os quais são atribuídos a diversos fatores, sendo entre eles o método utilizado para determinar a posição da partícula em

função do tempo – é importante que seja destacado esse ponto, já que as partículas utilizadas eram de difícil detecção, pois têm tamanho na ordem de resolução do microscópio -, assim como a presença de gradientes de velocidade no porta amostra [CATIPOVIC et al., 2010], é importante ressaltar que o tamanho da série temporal é de extrema relevância nesse tipo de experimento.

Claramente observou-se que a dispersão entre os dados para coeficiente de difusão é grande, ou seja, o modelo utilizando o deslocamento quadrático médio ou pela variância do histograma (“ $D_{hist}$ ” e “ $D_{msd}$ ”, respectivamente) são limitados. Na tentativa de melhorar os resultados obtidos para diminuir a discrepância entre o resultado teórico e experimental foram adotadas duas medidas: a primeira delas foi aumentar o tamanho da série temporal – os vídeos passaram de 100 frames para 1000 quadros no total (na seção 3.8 para mais detalhes experimentais) -, a segunda medida adotada foi utilizar um modelo capaz de estimar o coeficiente de difusão a partir da covariância dos deslocamentos (“ $D_{cov}$ ”) [VESTERGAARD et al., 2014], novamente, é importante ressaltar que esse novo resultado para o coeficiente de difusão é equivalente aos outros, a diferença é justamente o modelo estatístico para obtenção dos resultados. Conceitualmente a covariância é uma forma de medir a relação entre duas variáveis, sendo a função de correlação a normalização da covariância.

O procedimento descrito por Vestergaard e colaboradores [VESTERGAARD et al., 2014] foi implementado no *MATLAB*, e para uma série de 12 vídeos foi obtido  $D_{rms}$  e  $D_{cov}$ . Os resultados foram tratados para uma e duas dimensões ( $x$  e  $y$  para o caso unidimensional e  $r=(x^2+y^2)^{1/2}$  para o caso bidimensional). Para efeito de comparação, foi desenvolvido um programa capaz de simular a trajetória de uma partícula Browniana, definindo as variáveis da simulação com propriedades idênticas às experimentais (esferas de 804 nm de diâmetro em água na temperatura ambiente). Das trajetórias obtidas (seja experimentalmente, ou seja pela simulação) foi possível obter as estimativas para o coeficiente de difusão utilizando a covariância ou o deslocamento quadrático médio (“ $D_{rms}$ ” e “ $D_{cov}$ ”). Os resultados são sumarizados nas Tabelas 8 e 9 (para o caso uni e bidimensional), as colunas “diferença” dizem respeito ao erro obtido

pela estimativa do coeficiente de difusão - “ $D_{rms}$ ” e “ $D_{cov}$ ” – com relação ao resultado teórico ( $D_{teórico}$ ) obtido pelo modelo de Stokes-Einstein para esse sistema em particular.

Tabela 8: Comparação entre experimento e teoria e entre estimativas de coeficiente de difusão para o caso unidimensional.

Trajetória	EXPERIMENTAL				SIMULAÇÃO			
	$D_{cov} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$D_{msd} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Diferença%		$D_{cov} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$D_{msd} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Diferença%	
x1	3,73E-13	4,22E-13	37,86	29,69	6,83E-13	7,25E-13	13,79	20,79
y1	4,66E-13	3,26E-13	22,36	45,69	6,66E-13	6,32E-13	10,96	5,29
x2	3,79E-13	2,60E-13	36,86	56,68	6,16E-13	5,71E-13	2,63	4,87
y2	3,58E-13	3,55E-13	40,36	40,86	5,94E-13	3,43E-13	1,04	42,86
x3	4,55E-13	4,22E-13	24,20	29,69	6,28E-13	4,03E-13	4,63	32,86
y3	4,55E-13	5,58E-13	24,20	7,04	6,26E-13	4,94E-13	4,29	17,70
x4	4,08E-13	3,85E-13	32,03	35,86	4,55E-13	4,11E-13	24,20	31,53
y4	3,62E-13	2,80E-13	39,69	53,35	6,88E-13	8,82E-13	14,62	46,94
x5	3,51E-13	4,01E-13	41,52	33,19	6,76E-13	7,30E-13	12,62	21,62
y5	3,30E-13	3,40E-13	45,02	43,36	6,29E-13	6,10E-13	4,79	1,63
x6	3,38E-13	4,64E-13	43,69	22,70	6,45E-13	6,79E-13	7,46	13,12
y6	3,78E-13	4,31E-13	37,02	28,19	5,38E-13	4,92E-13	10,37	18,03
x7	4,43E-13	4,61E-13	26,19	23,20	6,71E-13	6,80E-13	11,79	13,29
y7	3,98E-13	3,33E-13	33,69	44,52	5,51E-13	5,31E-13	8,20	11,53
x8	3,80E-13	3,44E-13	36,69	42,69	5,65E-13	5,96E-13	5,87	0,70
y8	4,24E-13	4,02E-13	29,36	33,03	5,64E-13	5,11E-13	6,04	14,87
x9	3,76E-13	3,40E-13	37,36	43,36	6,56E-13	7,94E-13	9,29	32,28
y9	3,96E-13	2,79E-13	34,03	53,52	5,67E-13	3,62E-13	5,54	39,69
x10	4,18E-13	4,06E-13	30,36	32,36	6,86E-13	6,37E-13	14,29	6,13
y10	3,68E-13	2,87E-13	38,69	52,18	5,58E-13	5,29E-13	7,04	11,87
x11	3,98E-13	2,24E-13	33,69	62,68	6,63E-13	6,74E-13	10,46	12,29
y11	3,77E-13	2,55E-13	37,19	57,52	5,74E-13	5,67E-13	4,37	5,54
x12	3,28E-13	3,00E-13	45,35	50,02	6,60E-13	5,85E-13	9,96	2,54
y12	3,30E-13	3,42E-13	45,02	43,02	6,72E-13	5,46E-13	11,96	9,03
<b>Média</b>	3,87E-13	3,59E-13			6,28E-13	5,83E-13		
<b>Desvio padrão</b>	4,05E-14	7,91E-14			6,02E-14	1,33E-13		

Tabela 9: Comparação entre experimento e teoria e entre estimativas de coeficiente de difusão para o caso bidimensional.

Trajetória 2D	EXPERIMENTAL				SIMULAÇÃO			
	$D_{cov} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	$D_{msd} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	Diferença%		$D_{cov} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	$D_{msd} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	Diferença%	
r1	4,62E-13	3,74E-13	23,03	37,69	5,90E-13	6,71E-13	1,70	11,79
r2	3,53E-13	3,08E-13	41,19	48,69	6,32E-13	4,57E-13	5,29	23,86
r3	4,78E-13	4,90E-13	20,36	18,36	6,93E-13	4,49E-13	15,46	25,20
r4	3,91E-13	3,32E-13	34,86	44,69	5,12E-13	6,46E-13	14,70	7,63
r5	3,67E-13	3,70E-13	38,86	38,36	6,84E-13	6,70E-13	13,96	11,62
r6	3,29E-13	4,48E-13	45,19	25,36	6,10E-13	5,85E-13	1,63	2,54
r7	4,02E-13	3,97E-13	33,03	33,86	6,22E-13	6,05E-13	3,63	0,79
r8	3,85E-13	3,73E-13	35,86	37,86	4,98E-13	5,54E-13	17,03	7,70
r9	3,98E-13	3,10E-13	33,69	48,35	6,72E-13	6,00E-13	11,96	0,04
r10	3,80E-13	3,47E-13	36,69	42,19	5,84E-13	5,83E-13	2,70	2,87
r11	4,04E-13	2,89E-13	32,69	51,85	5,76E-13	6,20E-13	4,04	3,29
r12	3,36E-13	3,21E-13	44,02	46,52	6,56E-13	5,66E-13	9,29	5,70
<b>Media</b>	3,90E-13	3,63E-13			6,16E-13	5,93E-13		
<b>Desvio padrão</b>	4,27E-14	5,95E-14			6,26E-14	7,17E-14		

Primeiramente deve-se ressaltar que nas tabelas 8 e 9 foi apresentadas o resultado para cada trajetória individualmente para que fique claro como os resultados de fato apresentam uma variância de resultados bem significativa. É possível extrair duas conclusões importantes: a primeira é que os resultados para o sistema unidimensional e bidimensional são equivalentes, isto é, apresentam um resultado semelhante (seja na média, desvio padrão ou mesmo na diferença com o resultado teórico); a segunda conclusão é que de fato as estimativas para o coeficiente de difusão utilizando a covariância apresentam um desvio padrão sempre menor que o método obtido pelo deslocamento quadrático médio.

No entanto, deve-se destacar que a partir dos resultados apresentados é evidente a diferença na estimativa do coeficiente de difusão entre os resultados experimentais e teóricos, enquanto há uma diferença de aproximadamente 30% a 45% para os resultados experimentais, os resultados teóricos, em contra partida, apresentam uma diferença na maioria dos casos de aproximadamente 10% (chegando até 20%). Estes resultados mostram, portanto, que provavelmente há um erro sistemático nos experimentos que provocam sempre uma subestimativa

do resultado obtido. Uma tentativa de avaliar tal resultado parte da análise do sistema pela qual a partícula difunde.

A relação linear entre o deslocamento quadrático médio e o tempo apresentada pela Eq. 41 é válida somente para sistemas em que a partícula difunde livremente no meio. No entanto, para sistemas nos quais há fluxo no solvente, muitas partículas (e, portanto, há interações eletrostáticas), ou mesmo quando a partícula está presa numa caixa, o deslocamento quadrático médio não é necessariamente função linear do tempo e, como consequência, o valor do coeficiente de difusão pode ser maior (para difusão com fluxo) ou menor (para difusão com interação ou difusão numa caixa) [QIAN et al., 1991]. Em outras palavras, o erro sistemático observado pode ser consequência do fato de que a partícula em questão não estava difundindo livremente no meio.

Para determinar qual o regime a partícula está submetida, foi utilizado o método descrito por Vestergaard e colaboradores [Vestergaard et al., 2014] o qual consiste que a partir da trajetória podemos calcular o periodograma experimental ( $P_{exp}$ ) (que se trata de uma estimativa do espectro de potência) dos deslocamentos a partir de uma transformada de senos, e comparar com o periodograma teórico ( $P_{teo}$ ).

$$P_{exp} = \frac{2(\Delta\tilde{x}_k)^2}{[(N+1)\Delta t]} \text{ Eq. 43, em que } \Delta\tilde{x}_k = \sum_{n=1}^N \text{sen}\left(\frac{\pi kn}{N+1}\right) \Delta x_n \text{ Eq. 44}$$

$$P_{teo} = 2D(\Delta t)^2 + 2[\sigma^2(\Delta t)^2 - 2DR_{cam}(\Delta t)^2] \left(1 - \cos\frac{\pi k}{N+1}\right) \text{ Eq. 45}$$

Nestas equações o termo  $\Delta\tilde{x}_k$  representa a transformada de senos das trajetórias, o termo  $\sigma$  é uma estimativa do erro da detecção da partícula,  $N$  o número de observações,  $D$  o coeficiente de difusão estimado e  $R_{cam}$  um parâmetro constante, na referência [Vestergaard et al., 2014] é determinado como sendo igual a 1/6, e está relacionado com o tempo de exposição da câmera. A distribuição desta função é apresentada na Figura 21, para efeito de comparação mostra-se que para a simulação – um sistema modelo no qual sabe-se com certeza que estas partículas difundem livremente – o periodograma tem exatamente o mesmo perfil que o resultado experimental. Observa-se também que

o perfil é o mesmo, independentemente da direção, e que, portanto, a difusão é livre e separável com relação às coordenadas.

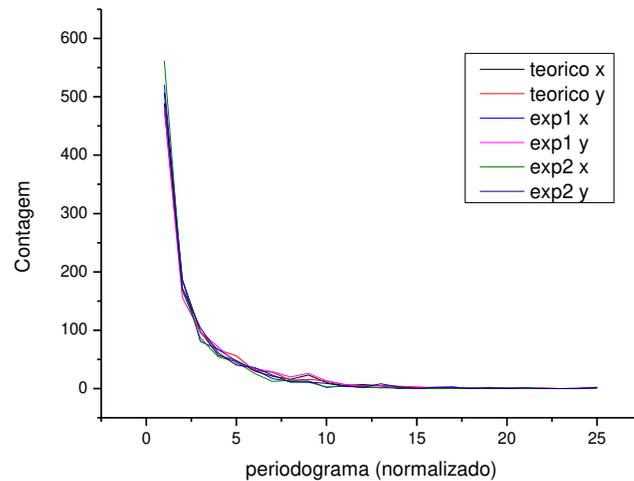


Figura 21: Comparação entre o periodograma experimental e teórico e entre as coordenadas do sistema.

Para definir qual a origem do erro sistemático da estimativa do coeficiente de difusão foi feito um estudo para avaliar qual influência que o tamanho da série temporal tem sobre a qualidade dessa estimativa. Para isso partiu-se da premissa que para a trajetória de uma partícula browniana, ou analogamente, para uma série temporal aleatória, é necessário definir arbitrariamente o instante inicial, ou seja, para este caso pode-se tomar como instante inicial da trajetória qualquer ponto da série. Sendo assim, para cada vídeo (com 1000 frames) existe uma série temporal com 1000 pontos, e a partir da premissa anterior, tomou-se a soma de duas (ou mais) séries temporais para originar uma nova série temporal com uma quantidade de pontos cada vez maior (Figura 22). Para essa nova série foi calculado o deslocamento, e estimado, enfim, o coeficiente de difusão.

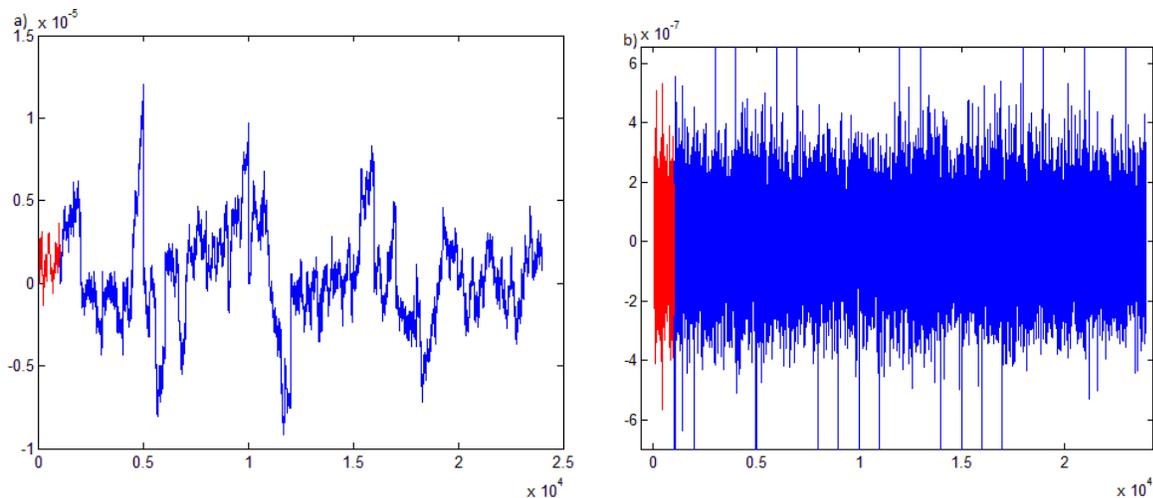


Figura 22: Soma de séries temporais a) em vermelho a trajetória de um único experimento, em azul a soma das trajetórias de 24 experimentos; b) em vermelho o deslocamento de um único experimento, em azul a soma dos deslocamentos de 24 experimentos.

Para o estudo da influência do tamanho da série temporal para estimativa do coeficiente de difusão foi adotado o seguinte método: a partir de todas as possíveis combinações entre, por exemplo, duas trajetórias (dentre as 24 trajetórias experimentais) foram escolhidas 24 destas combinações e calculadas para cada uma destas novas trajetórias a estimativa do coeficiente de difusão a partir da covariância, depois para a combinação entre três trajetórias, quatro trajetórias, e assim sucessivamente até a combinação entre 23 trajetórias (uma vez que no nosso caso só existem 24 possíveis combinações); este método foi utilizado para evitar que houvesse viés na ordem das trajetórias. Para os resultados de  $D_{cov}$  foram obtidos a média e os respectivos desvios padrão. Assim, pode-se avaliar como a média e o desvio padrão variavam em função da quantidade de pontos da série temporal (Figura 23). Como se pode observar, os resultados para séries cada vez maiores têm um desvio padrão associado cada vez menor, porém em relação à média tem-se que os resultados oscilam entre o valor sobre-estimado ( $\sim 7 \times 10^{-13}$ ) do coeficiente de difusão teórico ( $D_{teo} = 6.0023 \times 10^{-13}$ ).

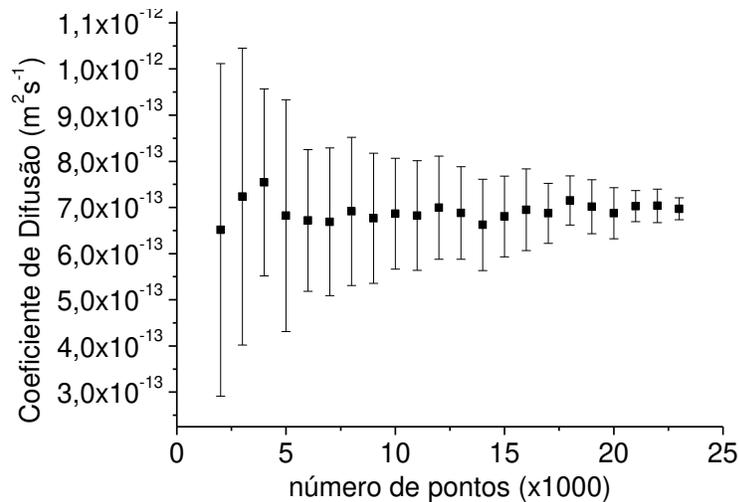


Figura 23: Média e desvio padrão da estimativa do coeficiente de difusão em função do número de pontos da série temporal.

De fato, obter propriedades dinâmicas a partir de trajetórias individuais parte do princípio de que a amostragem sobre um intervalo de tempo longo é equivalente a uma amostragem sobre muitas partículas – ou seja, é baseada na hipótese ergódica. No entanto, não há uma definição clara de quanto é esse tempo e na prática, por conta de limitações experimentais, há um limite no tamanho desta série temporal. Em decorrência deste fato, observou-se que para os experimentos quanto maior o número de pontos da série temporal, melhor o resultado. Foi possível constatar que o deslocamento quadrático médio apresenta um grande erro associado quanto maior for o intervalo de tempo. Assim, estimar o coeficiente de difusão utilizando a covariância dos deslocamentos é o modelo que melhor se adequa às predições teóricas e que apresenta o menor erro associado.

#### 4.2.2. Caracterização do potencial do laser

A caracterização do poço de potencial criado no foco do laser pode ser obtida a partir do teorema da equiparação, que considera que a distribuição da posição de uma partícula submetida a um potencial harmônico é consequência de flutuações térmicas [CHEN et al., 2012; MALAGNINO et al., 2002]. Com isso, a partir do histograma da posição da partícula, e, considerando um modelo Gaussiano, podemos extrair o potencial criado pela pinça óptica em função somente das coordenadas do sistema.

Utilizando a extensão *curve fitting toolbox* do MATLAB obteve-se uma curva com a fórmula:

$$\rho(x, y) = \rho_0 \times e^{-\frac{1}{kB \times T} \times (k_{mol}^x(x-x_0)^2 + k_{mol}^y(y-y_0)^2)} \quad \text{Eq. 46}$$

$$f(x, y) = a_1 \times e^{-((x-b1)/c1)^2} a_2 \times e^{-((y-b2)/c2)^2} \quad \text{Eq.47}$$

E a relação

$$k_{mol} = \frac{k_B \times T}{c} \quad \text{Eq.48}$$

No qual o parâmetro  $k_{mol}$  (constante de força) tem unidade de força sobre comprimento (no sistema internacional, S.I.,  $N.m^{-1}$ ), e está intimamente relacionado com a frequência de poço (discutido anteriormente na Eq. 39), e o parâmetro  $c$  com unidade de comprimento (no S.I., m), que se refere ao desvio padrão da distribuição de posição na direção escolhida. Os resultados obtidos estão plotados na Figura 24 e sumarizados na Tabela 10.

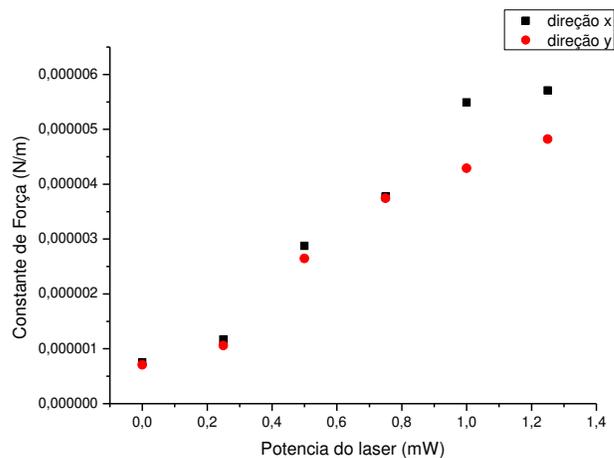


Figura 24: Constante de força do potencial em função da potência de saída do laser.

Os resultados demonstram um comportamento linear da constante de força em função da potência de saída, o que demonstra que são compatíveis com os resultados da literatura [MALAGNINO et al., 2002; SINGER et al., 2000]. Há certo desvio da idealidade, já que em teoria o feixe de laser produz um potencial simétrico nas direções  $x$  e  $y$ , o que não é observado nos resultados obtidos.

Porém, os resultados são muito próximos e podem ser consequência da maneira para se determinar a posição da partícula.

Tabela 10: Resultados dos parâmetros ajustados da distribuição de posição constante de força.

Potência(W)	0.1	0.25	0.5	0.75	1	1.25
$c1^2 (\mu\text{m}^2)$	0,165	0,101	0,0426	0,0324	0,0223	0,0214
$c2^2(\mu\text{m}^2)$	0,173	0,112	0,046	0,0327	0,0285	0,0254
$kx(10^{-7}\text{N/m})$	7,53	1,170	2,876	3,774	5,490	5,7101
$ky(10^{-7}\text{N/m})$	7,06	1,062	2,645	3,742	4,288	4,8228

### 4.2.3. Simulação Pinça Dupla

#### 4.2.3.1. Considerações sobre o programa

Os estudos teóricos envolvendo as pinças ópticas duplas foram realizados a partir da adaptação de um programa disponibilizado por Volpe e Volpe [2013]. O programa, tradicionalmente, simula uma partícula micrométrica de um material dielétrico suspenso em um meio viscoso (em coerência com o modelo de Langevin) sob influência de duas forças: a primeira chamada de “passo determinístico”, que representa as forças oriundas do aprisionamento ótico – neste regime (determinístico) está relacionado à constante de força ‘*stiffness*’ do poço de potencial – e a segunda chamada de “passo difusivo”, que representa o caráter aleatório das forças exercidas pelo meio.

Para adaptar o programa a fim de simular um sistema mais parecido com o que desejamos estudar experimentalmente, a equação da força no “passo determinístico” com relação à coordenada x foi mudada para satisfazer um potencial bi quadrático. Nas demais coordenadas (y e z) não alteramos a equação da força.

Além da modificação das equações de movimento, foi inserida ao programa uma calculadora para obtenção do potencial, que foi obtido a partir da estatística de Boltzmann. Baseado na distribuição espacial (histograma das posições), e aplicando o logaritmo, podemos obter diretamente o potencial do poço (gerado

pela pinça dupla). Esta calculadora pode gerar o resultado no espaço ou apenas em uma coordenada específica.

#### 4.2.3.2. Resultados da Simulação

Com esta simulação pudemos obter o resultado da constante de taxa a partir da teoria de Kramers, já que é conhecido o perfil do potencial. No entanto, vale dizer que esta simulação não se restringe à descrição do potencial nas coordenadas em que são evidentes os saltos entre estados, e que comumente usamos para descrever a constante de taxa de Kramers (chamadas de coordenadas de reação em um sistema químico), mas também possibilita representar uma superfície de potencial onde estão presentes outras coordenadas (aqui chamadas de coordenadas não reacionais), relacionadas, por exemplo, a outros graus de liberdade que não os eletrônicos em um sistema químico.

A Figura 25 mostra o perfil do potencial somente na coordenada reacional (isto é, na coordenada  $x$ ) em função da variação da constante de força nas coordenadas. A curva referente ao potencial médio (azul escuro) mostra o potencial médio na coordenada de reação com sua respectiva barra de erros. Podemos observar que somente nas simulações limítrofes (isto é, quando  $k_{\text{mol}}^y = 1e^{-5} \text{ Nm}^{-1}$  e  $k_{\text{mol}}^y = 1e^{-9} \text{ Nm}^{-1}$ ) os valores do potencial em função da posição se encontram fora da barra de erros. Tal resultado mostra que para as simulações as coordenadas de reação não reativas (aqui representadas pelas coordenadas em  $y$ ) não alteram significativamente o perfil do potencial na coordenada reativa, e, portanto, não alteram a taxa de Kramers para as reações químicas.

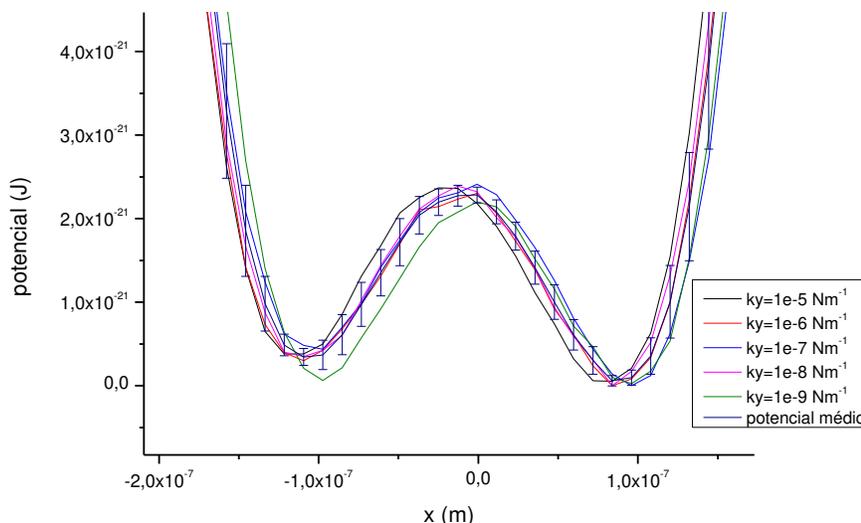


Figura 25: Potencial na direção x em função de diferentes potenciais na direção y.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Quanto ao estudo teórico da dinâmica de Langevin, podemos tirar como conclusão que a partir do histograma de distribuição espacial da partícula é possível obter parâmetros termodinâmicos do sistema (curva de energia potencial), assim como parâmetros cinéticos utilizando a teoria de Kramers. Os resultados para o fator pré-exponencial  $k_{\text{kramers}}^0$  são condizentes (na ordem de grandeza) com dados experimentais da literatura. Observou-se também que a constante de velocidade obtida pela teoria de Kramers decresce em função da fricção do meio, condizente com o fato de estar submetido a um meio com alta viscosidade. Foi desenvolvido um método capaz de determinar o tempo mínimo para que o sistema entre em equilíbrio, e, portanto determinar a constante de velocidade. Em decorrência deste método foram obtidas as curvas de energia potencial (para aplicação da teoria de Kramers) para sistemas antes de atingir o equilíbrio, e observou-se que para estes sistemas fora do equilíbrio podem ser obtidas boas estimativas para constante de velocidade. Observou-se também que o número de transições entre estados está intimamente relacionados com a frequência (constante de velocidade), e seguem um perfil de Arrhenius.

Com relação à parte experimental pode-se observar que a pinça óptica apresenta constante de força condizente com a literatura, e a simulações feitas para um sistema de pinça dupla mostram que as coordenadas não reacionais não

alteram o perfil da curva de energia potencial e não alteram, portanto, a constante de velocidade. Quanto à caracterização do movimento browniano utilizando microscopia, observou-se um grande erro associado na determinação do coeficiente de difusão obtido a partir da distribuição dos deslocamentos, assim como a partir do deslocamento quadrático médio. Para tanto foi utilizado um método que estimasse o coeficiente de difusão a partir da análise da covariância dos deslocamentos; observou-se que tal método apresenta um erro sistemático associado, e que está intimamente relacionado com o tamanho da série temporal.

Quanto às perspectivas futuras, tem-se a ideia dese ajustar o sistema de pinças ópticas duplas para avaliar a constante de velocidade para dinâmica de Langevin experimentalmente, assim como obter o tempo mínimo experimental para o sistema atingir equilíbrio para que seja possível avaliar a estimativa da constante de velocidade para o sistema dentro e fora do equilíbrio. Pretende-se também, tanto na parte experimental como na teórica, utilizar as informações dos tempos de transição e da densidade espectral para a avaliação das constantes de velocidade da reação, sem requerer a descrição da curva de energia potencial.

## BIBLIOGRAFIA

ASHKIN, Arthur et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. **Optics letters**, v. 11, n. 5, p. 288-290, 1986.

ASHKIN, Arthur. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. **Physical review letters**, v. 24, n. 4, p. 156, 1970.

ASHKIN, Arthur. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 10, p. 4853-4860, 1997.

BEST, Robert B.; HUMMER, Gerhard. Diffusive model of protein folding dynamics with Kramers turnover in rate. **Physical review letters**, v. 96, n. 22, p. 228104, 2006.

BIALEK, W. "Biophysics: Searching for principles" New Jersey, N.J., Princeton University Press, 2012.

BIGGS, Reinetta; CARPENTER, Stephen R.; BROCK, William A. Turning back from the brink: detecting an impending regime shift in time to avert it. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 826-831, 2009.

CATIPOVIC, Marco A. et al. Improving the quantification of Brownian motion. **American Journal of Physics**, v. 81, n. 7, p. 485-491, 2013.

CHEN, Feng-Jung et al. Thermally activated state transition technique for femto-Newton-level force measurement. **Optics Letters**, v. 37, n. 9, p. 1469-1471, 2012.

CHUNG, Hoi Sung et al. Single-molecule fluorescence experiments determine protein folding transition path times. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 981-984, 2012.

CHUNG, Hoi Sung; EATON, William A. Single-molecule fluorescence probes dynamics of barrier crossing. **Nature**, 2013.

CHUNG, Hoi Sung; LOUIS, John M.; EATON, William A. Experimental determination of upper bound for transition path times in protein folding from single-molecule photon-by-photon trajectories. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 29, p. 11837-11844, 2009.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. "Organic Chemistry", New York, N.Y., Oxford University Press, 2001.

DOBSON, Christopher M. Protein folding and misfolding. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 884-890, 2003.

EINSTEIN, Albert. **Investigations on the Theory of the Brownian Movement**. Courier Dover Publications, 1956.

GEBHARDT, J. Christof M.; BORNSCHLÖGL, Thomas; RIEF, Matthias. Full distance-resolved folding energy landscape of one single protein molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2013-2018, 2010.

GILLESPIE, Daniel T. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. **The journal of physical chemistry**, v. 81, n. 25, p. 2340-2361, 1977.

GRIER, David G. Optical tweezers in colloid and interface science. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 2, n. 3, p. 264-270, 1997.

HAN, Siyuan; LAPOINTE, J.; LUKENS, J. E. Effect of a two-dimensional potential on the rate of thermally induced escape over the potential barrier. **Physical Review B**, v. 46, n. 10, p. 6338, 1992.

HANGGI, Peter et al. Bistability driven by colored noise: theory and experiment. **Physical Review A**, v. 32, n. 1, p. 695, 1985.

HÄNGGI, Peter; TALKNER, Peter; BORKOVEC, Michal. Reaction-rate theory: fifty years after Kramers. **Reviews of Modern Physics**, v. 62, n. 2, p. 251, 1990.

HUANG, Rongxin et al. Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid. **Nature Physics**, v. 7, n. 7, p. 576-580, 2011.

HUSTON, Paul L. "Chemical Kinetics and Reaction Dynamics", 1<sup>o</sup> ed., New York, N.Y., McGraw-Hill, 2001.

KESLIN, Joseph. Viscosity of Liquid Water in the Range—8 C to 150 C. **J. Phys. Chem. Ref. Data**, v. 7, n. 3, 1978.

KIRBY, Anthony John; HOLLFELDER, Florian. **From enzyme models to model enzymes**. Royal Society of Chemistry, 2009.

KRAMERS, Hendrik Anthony. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. **Physica**, v. 7, n. 4, p. 284-304, 1940.

LAI, Zai-Zhi; LU, Qiang; WANG, Jin. Exploring the thermodynamic landscape, kinetics, and structural evolution of a protein conformational transition with a microscopic double-well model. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 14, p. 4147-4159, 2011.

LEMONS, Don S.; GYTHIEL, Anthony. Paul Langevin's 1908 paper "On the Theory of Brownian Motion"["Sur la théorie du mouvement brownien," CR Acad. Sci.(Paris) 146, 530–533 (1908)]. **American Journal of Physics**, v. 65, n. 11, p. 1079-1081, 1997.

LEVY, Yaakov; WOLYNES, Peter G.; ONUCHIC, José N. Protein topology determines binding mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 511-516, 2004.

LI, Tongcang et al. Measurement of the instantaneous velocity of a Brownian particle. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1673-1675, 2010.

MALAGNINO, N. et al. Measurements of trapping efficiency and stiffness in optical tweezers. **Optics Communications**, v. 214, n. 1, p. 15-24, 2002.

MCCANN, Lowell I.; DYKMAN, Mark; GOLDING, Brage. Thermally activated transitions in a bistable three-dimensional optical trap. **Nature**, v. 402, n. 6763, p. 785-787, 1999.

MICHALET, Xavier. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. **Physical Review E**, v. 82, n. 4, p. 041914, 2010.

NEUMAN, Keir C.; BLOCK, Steven M. Optical trapping. **Review of scientific instruments**, v. 75, n. 9, p. 2787-2809, 2004.

NEUPANE, Krishna et al. Transition Path Times for Nucleic Acid Folding Determined from Energy-Landscape Analysis of Single-Molecule Trajectories, **Physical Review Letters**, v. 109, n. 6, p. 068102, 2012.

NITZAN, A. *“Chemical Dynamics in condensed Phases – Relaxation, Transfer, and Reactions in Condensed Molecular Systems”* New York, N.Y., Oxford University Press, 2010.

PECHUKAS, Philip. Transition state theory. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 159-177, 1981.

QIAN, Hong; SHEETZ, Michael P.; ELSON, Elliot L. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. **Biophysical journal**, v. 60, n. 4, p. 910-921, 1991.

SALINAS, Silvio RA. Einstein e a teoria do movimento browniano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n. 2, p. 263-269, 2005.

SAXTON, Michael J. Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. **Biophysical journal**, v. 72, n. 4, p. 1744-1753, 1997.

SCHEFFER, Marten et al. Anticipating critical transitions. **Science**, v. 338, n. 6105, p. 344-348, 2012.

SCHULER, Benjamin; EATON, William A. Protein folding studied by single-molecule FRET. **Current opinion in structural biology**, v. 18, n. 1, p. 16-26, 2008.

SCHULER, Benjamin; LIPMAN, Everett A.; EATON, William A. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. **Nature**, v. 419, n. 6908, p. 743-747, 2002.

SIEKIERZYCKA, Joanna R. et al. Polymer glass transitions switch electron transfer in individual molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1240-1242, 2010.

SIMHA, R. The Influence of Brownian Movement on the Viscosity of Solutions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 25-34, 1940.

SINGER, Wolfgang et al. Three-dimensional force calibration of optical tweezers. **Journal of modern optics**, v. 47, n. 14-15, p. 2921-2931, 2000.

SOCCI, N. D.; ONUCHIC, José N.; WOLYNES, Peter G. Diffusive dynamics of the reaction coordinate for protein folding funnels. **The Journal of chemical physics**, v. 104, n. 15, p. 5860-5868, 1996.

VESTERGAARD, Christian L.; BLAINEY, Paul C.; FLYVBJERG, Henrik. Optimal estimation of diffusion coefficients from single-particle trajectories. **Physical Review E**, v. 89, n. 2, p. 022726, 2014.

VOLPE, Giorgio; VOLPE, Giovanni. Simulation of a Brownian particle in an optical trap. **American Journal of Physics**, v. 81, p. 224, 2013

WOODSIDE, Michael T. et al. Direct measurement of the full, sequence-dependent folding landscape of a nucleic acid. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 1001-1004, 2006.

YU, Hao et al. Direct observation of multiple misfolding pathways in a single prion protein molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5283-5288, 2012.