



TESE DE MESTRADO

"Análise do Potencial de Calibração da Força Óptica
através de Dispositivos de Microscopia de Força Atômica"

GUSTAVO PIRES MARQUES

CAMPINAS
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN"

Departamento de Eletrônica Quântica

GUSTAVO PIRES MARQUES

"Análise do Potencial de Calibração da Força Óptica
através de Dispositivos de Microscopia de Força Atômica"

Tese de mestrado apresentada ao
Instituto de Física "Gleb Wataghin"
da Unicamp para obtenção do título
de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR GUSTAVO PIRES MARQUES E
ORIENTADA PELO PROF. DR. CARLOS LENZ CESAR.



CAMPINAS
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
VALKÍRIA SUCCI VICENTE – CRB8/5398 - BIBLIOTECA DO IFGW
UNICAMP**

M348a Marques, Gustavo Pires, 1978-
Análise do potencial de calibração da força óptica através
de dispositivos de microscopia de força atômica / Gustavo
Pires Marques. -- Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Carlos Lenz Cesar.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”.

1. Calibração. 2. Sensores. 3. Lasers.
4. Fotodetectores. 5. Microscopia de força atômica.
6. Pinças óticas. 7. Força ótica. 8. Cantilever de silício.
9. Cantilever piezoresistivo. 10. Piezoresistividade.
11. Condicionamento de sinais. 12. Baixa relação sinal ruído.
I. Cesar, Carlos Lenz, 1955- II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Física “Gleb Wataghin”. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of the calibration potential of optical force through atomic force microscopy devices

Palavras-chave em inglês:

Calibration

Sensors

Lasers

Photon detectors

Atomic force microscopy

Optical tweezer

Optical force

Silicon cantilever

Piezoresistive cantilever

Piezoresistivity

Signal conditioning

Low signal to noise ratio

Titulação: Mestre em Física

Banca Examinadora:

Carlos Lenz Cesar [Orientador]

Luiz Carlos Barbosa

Oswaldo Luiz Alves

Data da Defesa: 19-12-2005

Programa de Pós-Graduação em: Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE GUSTAVO PIRES MARQUES – RA 981298, APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 19/12/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

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

Prof. Dr. Luiz Carlos Barbosa – DEQ/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves – IQ/UNICAMP

Resumo

O microscópio de força atômica é uma ferramenta que possibilita a medida de forças precisamente localizadas com resoluções no tempo, espaço e força jamais vistas. No coração deste instrumento está um sensor a base de uma viga (cantilever) que é responsável pelas características fundamentais do AFM. O objetivo desta pesquisa foi usar a deflexão deste cantilever para obter uma calibração rápida e precisa da força da armadilha da pinça óptica, assim como testar e comparar com os métodos tradicionalmente utilizados para este propósito. Para isso, foi necessário analisar e entender o condicionamento de sinais utilizados no AFM. Foram estudados cantilevers tradicionais, cujo sistema de detecção é baseado na deflexão de um feixe laser em conjunto com fotodetectores, bem como cantilevers piezoresistivos. Cantilevers piezoresistivos fornecem uma alternativa simples e conveniente aos cantilevers ópticos. A integração de um elemento sensorial dentro do cantilever elimina a necessidade de um laser externo e de um detector utilizados na maioria dos AFMs. Isto elimina a etapa delicada de alinhamento da laser ao cantilever e fotodetector que normalmente precede uma medida com AFM, uma simplificação que expande o potencial do AFM para o uso em meios adversos, como câmaras de ultra alto vácuo ou, como no caso específico das Pinças Ópticas, onde existem esferas em solução líquida e também restrições de dimensão.

Abstract

The atomic force microscope (AFM) is a tool that enables the measurement of precisely localized forces with unprecedented resolution in time, space and force. At the heart of this instrument is a cantilever probe that sets the fundamental features of the AFM. The objective of this research has been using the deflection of this cantilever to get a fast and accurate calibration of optical tweezers trap force, as well as testing and comparing to the traditionally used methods of calibration for this purpose. For that it was necessary to resolve and understand the sensors signals conditioning used in the AFM. Traditional cantilevers, whose detection system is based on the deflection of a laser beam in addition with a photodetector, as well as piezoresistive cantilevers has been studied. Piezoresistive cantilevers provide a simple and convenient alternative to optically detected cantilevers. Integration of a sensing element into the cantilever eliminates the need for the external laser and detector used in most AFMs. This removes the delicate step of aligning the laser to the cantilever and photodetector which usually precedes an AFM measurement, a simplification which expands the potential of the AFM for use in difficult environments such as ultrahigh vacuum chambers or, as in Optical Tweezers specific case, where there are spheres into a liquid solution as well as dimensional constraints.

Sumário

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
SUMÁRIO	V
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FORÇAS NA NATUREZA	2
1.2 PINÇA ÓPTICA + AFM: MOTIVAÇÃO	2
1.3 OBJETIVO ESPECÍFICO	5
1.4 DESAFIOS	5
1.4.1 Alcance de forças: Pinça Óptica x AFM	6
1.4.2 Focalização do laser dentro da câmara	6
CAPÍTULO 2. PINÇA ÓPTICA	8
2.1 TEORIA DAS PINÇAS ÓPTICAS	9
2.1.1 Regime Rayleigh ($d \ll \lambda$)	12
2.1.2 O Regime Lorenz-Mie ($d \sim \lambda$)	13
2.1.3 Regime de Óptica Geométrica ($d \gg \lambda$)	15
2.2 INSTRUMENTAÇÃO	23
2.2.1 O Microscópio	23
2.2.2 O Laser	24
2.2.3 Construção e Alinhamento	25
2.2.4 O Sistema de Imagem	28
2.3 CALIBRAÇÃO	29
2.3.1 Força de Arraste	29
2.3.2 Equipartição da Energia	30

CAPÍTULO 3.	MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	31
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	32
3.2	MODOS DE IMAGEM DO AFM	34
3.2.1	<i>Contato</i>	34
3.2.2	<i>Não-contato</i>	34
3.2.3	<i>Tapping</i>	35
3.3	MEDINDO FORÇAS	35
3.4	CALIBRAÇÃO	37
3.5	PARÂMETROS FUNDAMENTAIS DOS CANTILEVERS	38
3.5.1	<i>Sensibilidade</i>	39
3.5.2	<i>Largura de Banda</i>	40
3.5.3	<i>Ruído</i>	41
3.5.4	<i>Resolução</i>	43
3.5.5	<i>Constante de mola</i>	43
CAPÍTULO 4.	CALIBRAÇÃO DA PINÇA COM AFM	44
4.1	FOCALIZAÇÃO DO FEIXE LASER NO CANTILEVER	44
4.1.1	<i>O Feixe Gaussiano</i>	46
4.2	DEFLEXÃO DO CANTILEVER — PICOMOTOR	55
4.2.1	<i>Calibração do picomotor</i>	56
4.2.2	<i>Calibração do cantilever com o picomotor</i>	57
4.3	FOTODETECTOR “BI-CELL”	58
4.3.1	<i>Princípio de funcionamento</i>	58
4.3.2	<i>Resistência Shunt, R_{SH}</i>	60
4.3.3	<i>Resistência Série, R_S</i>	60
4.3.4	<i>Capacitância de Junção, C_J</i>	60
4.3.5	<i>Responsividade, R_λ</i>	61
4.3.6	<i>Curva Característica I-V</i>	62

4.3.7	<i>Ruídos</i>	63
4.3.8	<i>Potência Equivalente de Ruído (NEP)</i>	64
4.3.9	<i>Polarização</i>	64
4.4	CONDICIONAMENTO DE SINAIS PARA O FOTODETECTOR	65
4.4.1	<i>Amplificador de Transimpedância</i>	66
4.4.2	<i>Amplificador de Subtração</i>	67
4.5	RESULTADOS OBTIDOS	70
CAPÍTULO 5. PIEZORESISTORES		73
5.1.1	<i>Tensor Piezoresistivo</i>	75
5.1.2	<i>Coefficientes Piezoresistivos</i>	76
5.2	RUÍDOS NOS PIEZORESISTORES	77
5.2.1	<i>Ruído Johnson</i>	78
5.2.2	<i>Ruído 1/f</i>	79
5.3	CONDICIONAMENTO DE SINAIS PARA CANTILEVERS PIEZORESISTIVOS	79
5.3.1	<i>Ponte de Wheatstone</i>	80
5.3.2	<i>Montagem Experimental</i>	82
5.4	RESULTADOS OBTIDOS	84
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS		86
APENDICE A. AMPLIFICADOR LOCK-IN		89
APENDICE B. FOLHAS DE ESPECIFICAÇÕES DOS COMPONENTES UTILIZADOS		93

Capítulo 1. Introdução

Recentes avanços em instrumentação científica possibilitaram a determinação direta de forças tão pequenas quanto forças intermoleculares que controlam interações biomoleculares. Utilizando ferramentas como *Surface Force Apparatus* – SFA¹, *Atomic Force Microscopy*- AFM², *Optical Tweezers* – OT³ e a *Biomembrane Force Probe*⁴ foi possível o entendimento da natureza destas forças e do papel fundamental que elas têm na manutenção da vida. Juntas estas técnicas fornecem uma janela de forças acessíveis de 10^{-6} – 10^{-14} N, embora individualmente suas respectivas janelas de força tenham sobreposição apenas em algumas regiões. A tabela 1.1 ilustra as janelas de força para as técnicas de medida de força disponíveis, ou técnicas de espectroscopias de força.

Técnica de Força	Alcance de Força
Surface Force Apparatus	10.000 – 1.000.000 pN
Atomic Force Microscopy	10 – 100.000 pN
Optical Tweezers	0.01 – 200 pN
Biomembrane Force Probe	0.01 – 1.000 pN

Tabela 1.1 Valores típicos da janela de forças das técnicas de espectroscopias de força disponíveis⁵

¹ Israelachvili *et al.*,1990 "Adhesion and short-range forces between surfaces. Part I: New apparatus for surface force measurements". Journal of Materials Research (1990), 5 : pp 2223-2231

² Binnig *et al.*,1986. "Atomic Force Microscope". Phys. Rev. Lett. 56, 930–933 (1986)

³ Ashkin, 1986. "Experimental Observation of Optically Trapped Atoms". Phys. Rev. Lett. 57, 314–317 (1986)

⁴ Evans *et al.*, 1995. "Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces". Biophys J 68: 2580–2587.

⁵ Leckband, D. 2000."Measuring The Forces That Control Protein Interactions". Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.29:1–26

1.1 Forças na Natureza

Forças intermoleculares são fundamentais para a existência da vida. Essencialmente, elas determinam as propriedades físicas dos sólidos, líquidos e gases e ainda são responsáveis pela organização de estruturas biológicas⁶. Coesão estrutural e interações biomoleculares são ditadas por uma complexa teia de fracas forças intermoleculares e não covalentes⁷. Essas forças são classificadas de acordo com o papel que elas apresentam no reconhecimento molecular. As forças envolvidas no mecanismo de *chave-e-fechadura* das ligações entre receptor-ligante são comumente chamadas interações específicas e incluem pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. Já as forças envolvidas no direcionamento das trajetórias dos ligantes para os receptores são tipicamente eletrostáticas e de van der Waals.⁸ É a sobreposição destas duas categorias que intermedia o processo de reconhecimento biomolecular.

1.2 Pinça Óptica + AFM: Motivação

A técnica de aprisionamento de partículas, baseada na transferência de momentum dos fótons, ficou conhecida como pinça óptica e surgiu em 1986 com o trabalho pioneiro de A. Ashkin⁹. Embora essa técnica não tenha sido desenvolvida para aplicações biológicas logo ficou claro que essa seria sua área principal de aplicação. Em um trabalho posterior, Ashkin et al. utilizaram a técnica para capturar e manipular partículas biológicas com tamanhos variando de décimos a centenas de micra demonstrando, desta forma, que este sistema funcionava como uma

⁶ Israelachvili, J. N. (1991). "*Intermolecular and Surface Forces; With Applications to Colloidal and Biological Systems*", Academic Press Inc. (London) LTD.

⁷ Leckband, D. & Israelachvili, J. (1993). "*Molecular-basis of protein function as determined by direct force measurements*". Enzyme Microb. Technol., 15, 450-459.

⁸ Leckband, D. & Israelachvili, J. (2001). "*Intermolecular forces in biology*". Quarterly Rev. Biophys., 34, 105-267.

⁹ A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, S. Chu, "*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*"; Optic Lett. 11:288-290 (1986).

“pinça óptica” para realizar manipulações intra e extracelulares, sem causar morte ou outros danos aos microorganismos estudados¹⁰. Desde então essa técnica tem tido uma grande variedade de aplicações na biologia molecular e áreas afins. Basicamente, a pinça óptica tem sido utilizada em duas vertentes: *manipulação direta de microorganismos* e *medidas de propriedades mecânicas de estruturas*. Para as aplicações da pinça como instrumento de medida de propriedades mecânicas é fundamental a calibração da força óptica. O procedimento padrão da calibração desta força tem sido através da medida do deslocamento de uma microesfera de sua posição de equilíbrio contra a força hidrodinâmica existente quando esta é arrastada por um fluido com determinada velocidade (Lei de Stokes). Para se obter resultados quantitativos deve-se conhecer com precisão o raio da esfera, a viscosidade do fluido, a velocidade de translação da microesfera no fluido e considerar também as distâncias da microesfera às paredes devido às interações hidrodinâmicas. Modelos teóricos para a força hidrodinâmica na presença de duas paredes em baixos números de Reynolds são conhecidos apenas para geometrias esféricas ou elipsóides de revolução. Por outro lado, a força óptica depende do índice de refração do fluido e da microesfera, do raio da microesfera, da potência do laser e da distribuição de intensidade do cone de luz incidente. Modelos teóricos para a força óptica foram desenvolvidos para microesferas e, usualmente, na aproximação de um cone formado por ondas planas. São modelos que ainda precisam de uma boa confirmação experimental. Alguns desses parâmetros são de difícil acesso, como o índice de refração da microesfera. Algo tão simples quanto a medida da potência do laser é complicada no caso da pinça óptica devido as grandes aberturas numéricas (>1) utilizadas. Os medidores de potência são construídos para medidas com incidência normal e o erro sistemático para cones de luz com grandes aberturas numéricas pode chegar a mais de

¹⁰A. Ashkin, J.M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria"; Science, **235**: 1517 - 1520 (1987).

20%. O fato de que a força óptica depende de parâmetros que mudam de acordo com o experimento, como o índice de refração do líquido (solução) e da microesfera, a potência e qualidade do modo do laser etc. mostra o quanto seria importante desenvolver uma forma rápida e precisa de calibração das forças ópticas para cada experimento e que independa de parâmetros variáveis. Com tal calibração poderíamos utilizar qualquer microesfera ou mesmo geometrias não esféricas, em qualquer solução, e extrair das mesmas medidas de força. Além disso, nem sempre é possível, ou conveniente, aprisionar partículas esféricas, ou mesmo selecionar determinada solução, como no caso de medidas intracelulares. Se a calibração for rápida e independente destes parâmetros poderemos escolher qualquer organela intracelular como *probe* da pinça óptica. Também poderemos acompanhar diferencialmente a evolução da força de microorganismos em soluções na qual a concentração de determinadas drogas ou outras substâncias variam ao longo do tempo, desde que o procedimento de calibração seja rápido o suficiente.

Paralelamente ao desenvolvimento da pinça óptica, a microscopia de força atômica (AFM), introduzida por Binnig¹¹ et al também em 1986, emergiu como uma importante técnica para aquisição de imagens e medida de forças, possibilitando aos pesquisadores não apenas obter imagens de micro e nano estruturas mas também examinar suas propriedades mecânicas. Em particular, o uso do microscópio de força atômica (AFM) veio preencher a lacuna na aquisição de imagens deixada pelo seu predecessor, o microscópio de varredura por tunelamento (STM), já que este, devido a seu princípio de funcionamento (corrente de tunelamento), funcionava apenas com materiais metálicos, o que impedia sua utilização em materiais biológicos. Outra característica importante da AFM é que esta técnica mede forças em uma escala que se superpõe

¹¹ Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, Ch. Phys. Rev. Lett. 56, 930(1986).

à da pinça óptica. Tal fato permite que uma técnica seja utilizada para calibrar a outra de forma rápida e precisa.

1.3 Objetivo específico

O objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento de um sistema experimental incorporando as duas técnicas, pinça óptica e AFM, em um mesmo microscópio, principalmente para a calibração da força óptica de uma maneira rápida e precisa. Além disso este novo método servirá para testar e comparar os modelos atualmente utilizados nas calibrações da pinça óptica.

1.4 Desafios

A instrumentação do sistema de detecção do AFM utilizada tinha que ser desenvolvida a partir de cantilevers de AFM usados e um fotodetector “bi-cell” de silício. A pinça óptica tinha de ser montada num microscópio invertido para satisfazer as necessidades de espaço requeridas pelo projeto. Assim, parte significativa desta pesquisa foi a montagem da instrumentação da pinça óptica e a construção da instrumentação necessária para a detecção da deflexão do cantilever de AFM. A seguir detalhamos alguns dos principais desafios a serem vencidos para a realização do objetivo inicial.

1.4.1 Alcance de forças: Pinça Óptica x AFM

Um dos desafios para esta calibração vinha do fato de que, tipicamente, o alcance de forças do AFM começa onde termina o da pinça óptica. A Figura 1.1 ilustra o fato.

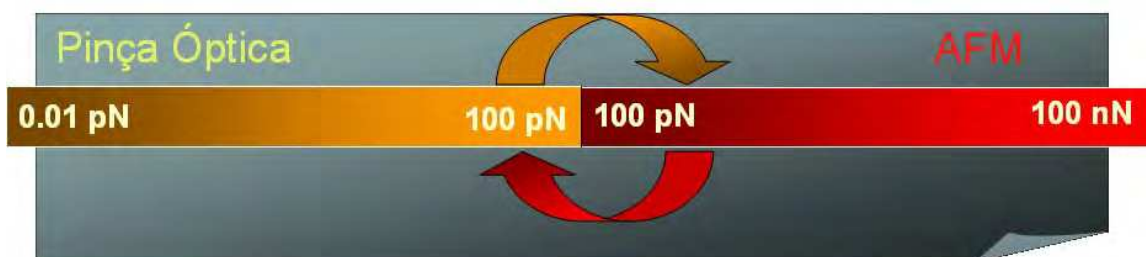


Figura 1.1 Alcance de forças da pinça óptica e do AFM. Em condições típicas uma começa onde termina a outra.

Para resolver este problema havia duas possibilidades: Estender o alcance de forças da pinça óptica ou aumentar a resolução obtida com o AFM. Ou ainda um pouco de cada, para que houvesse uma região de sobreposição entre as duas técnicas. Havia a necessidade de explorar os limites das duas técnicas.

1.4.2 Focalização do laser dentro da câmara

Um outro desafio que havia era com relação à focalização do feixe laser no cantilever em contato com a esfera presa pela pinça óptica. Devido a grande abertura numérica necessária para uma boa armadilha e a distância de trabalho (WD) típicas das objetivas com tais aberturas numéricas de no máximo $200\mu\text{m}$ sobrava pouco espaço para acomodar o feixe laser dentro da câmara da solução, principalmente levando em conta que o feixe deveria ser focado atingindo dimensões da ordem de $20\mu\text{m}$ quando estivesse em contato com o cantilever que possui dimensões da ordem de $(200\mu\text{m} \times 50\mu\text{m})$.

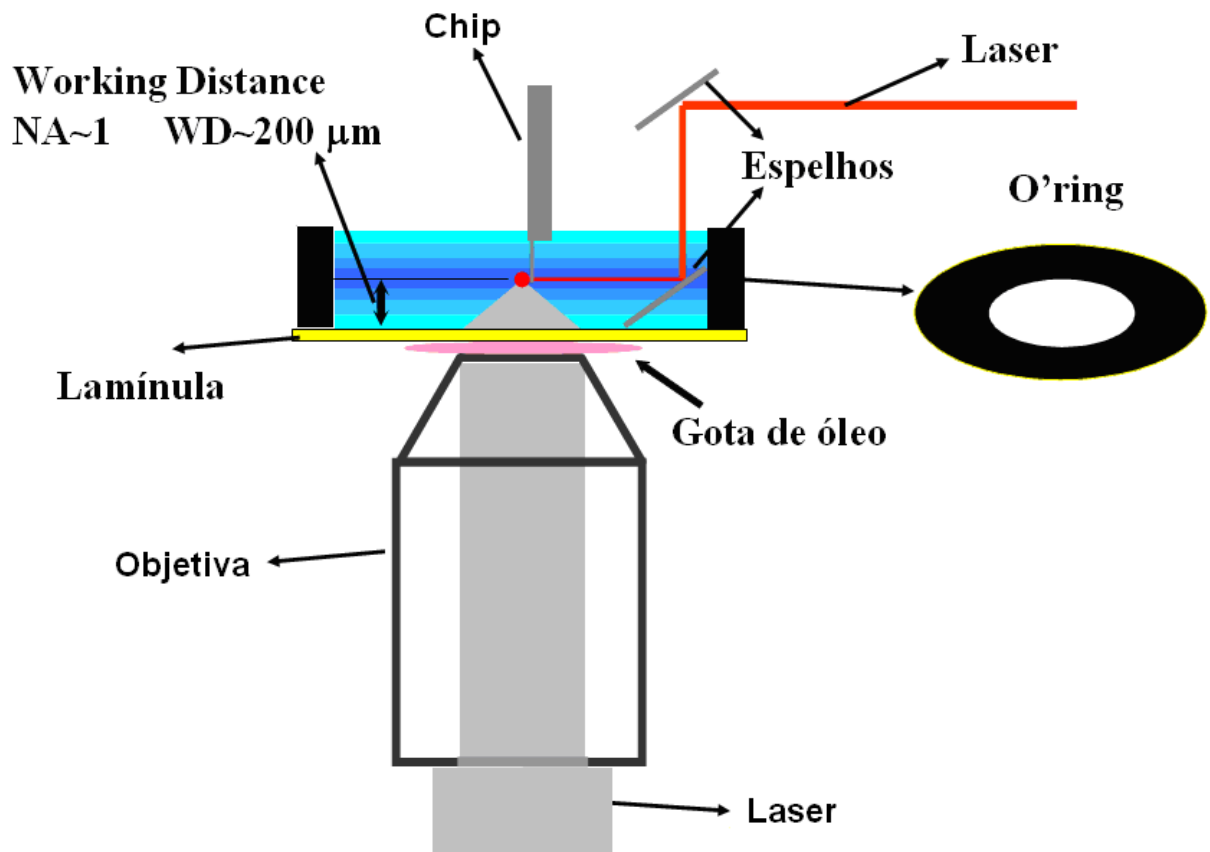


Figura 1.2 Esquema proposto inicialmente para a calibração da pinça óptica com um cantilever de AFM

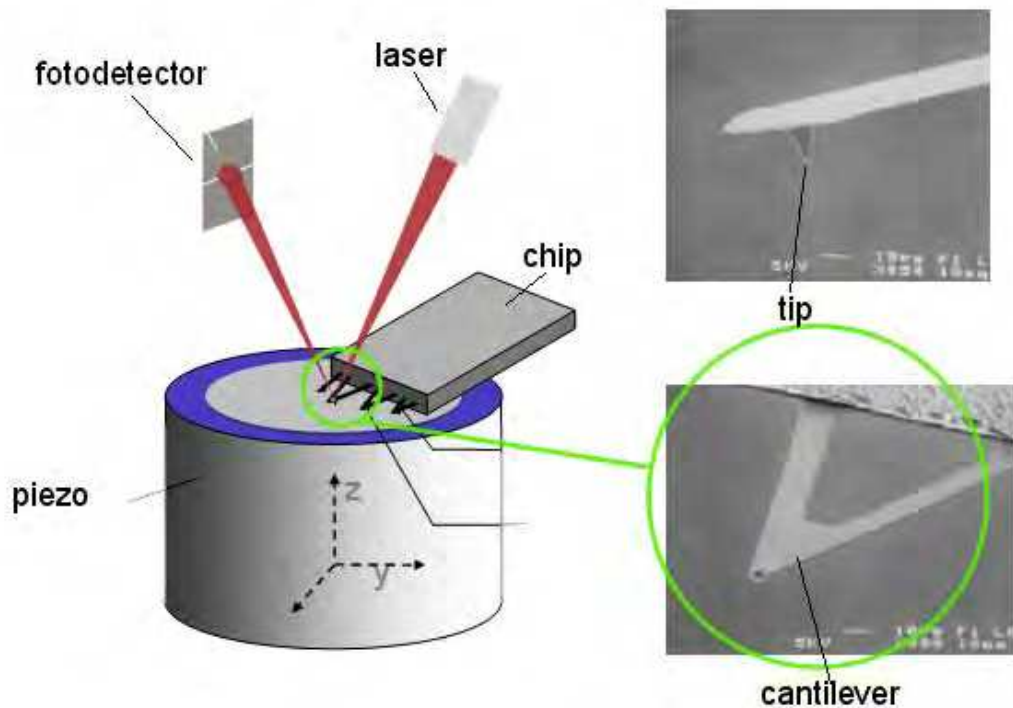


Figura 1.3 Componentes típicos de um AFM. Um feixe laser é focado nas superfície de um cantilever de silício microfabricado e refletido de volta para um fotodetector, possibilitando monitorar as deflexões do mesmo.

Capítulo 2. Pinça Óptica

O princípio fundamental da pinça óptica está na pressão de radiação exercida por um feixe de luz em partículas dielétricas. A pressão de radiação foi pela primeira vez observada no século XVII pelo astrônomo Johannes Kepler, que propôs que a radiação do sol forçava a calda do cometa apontar sempre na direção oposta ao seu deslocamento¹². Em 1873 James Clerk Maxwell mostrou em sua teoria do eletromagnetismo que a luz podia exercer força¹². Entretanto, experimentalmente isto não foi demonstrado até 1970 com o advento do laser¹³. A manipulação óptica de partículas dielétricas micrométricas, e até de átomos individuais tem sido possível desde então, mas só por volta de 1986 a pinça óptica foi aplicada a partículas biológicas. A partir daí, ela foi usada para manipular vírus e bactérias, células vivas, organelas, para inserir DNA dentro de diferentes tipos de células, para conectar DNA ao silício na tentativa de construção de uma interface biomecânica e para fertilizações in vitro¹⁴. Como ferramenta de medida a pinça óptica foi utilizada para estudar propriedades mecânicas de hemácias¹⁵, para medir e comparar deslocamentos celulares e forças de miosinas cardíacas¹⁶, para caracterização de motores biológicos moleculares¹⁷ e rigidez flexural de microtubos¹⁸, para medir o comprimento de uma

¹² Hecht, E. (1987) Optics. 2nd Ed. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.

¹³ Ashkin, A. (1970) "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure". Phys. Rev.Lett., 24, 156-159.

¹⁴[Anon], "Optical tweezer attaches single DNA molecular to silicon", Laser Focus World **34**, 9-9 (1998); C.S. Buer, K.T. Gahagan, A. Grover A et al., "Insertion of Agrobacterium rhizogenes into Ginkgo biloba using lasers as optical tweezers and scalpel", Plant Physiol **114**, 1613 (1997); A. Obruca, H. Strohmer, A. Blaschitz et al., "Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er : YAG) laser", Hum Reprod **12**, 2242 (1997)

¹⁵R.R. Huruta, M.L. BarjasCastro, S.T.O. Saad, F.F. Costa and C.L. Cesar, "A new method to study mechanical properties of red blood cells using optical tweezer", Blood **90**, 9-9 (1997)

¹⁶S. Sugiura, N. Kobayakawa, H. Fujita et al., "Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique - Molecular basis for cardiac adaptation", Circ Res **82**, 1029 (1998)

¹⁷N. Thomas, R.A. Thornhill, "The physics of biological molecular motors", J Phys D Appl Phys **31**, 253 (1998)

¹⁸H. Felgner, R. Frank, M. Schliwa, "Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers", J Cell Sci **109**, 509 (1996)

molécula de DNA¹⁹ e estudar a motilidade de espermatozóides humanos²⁰. Foi utilizada também para detectar concentrações ao nível de femtomolar de antígenos²¹ e permitiu a observação da ausência de travamento do movimento de rotação reversa de flagelos motores de bactérias²². As intensidades das forças envolvidas nas interações ao nível celular são da ordem de pico a femtoNewtons, devido ao tamanho microscópico das partículas que interagem. Um cubo de 1 μm de lado com densidade igual à da água (10³ kg/m³) tem massa de $m = (10^{-6})^3 \times 10^3 = 10^{-15}$ kg. Forças de picoNewtons nesse caso implicam em acelerações de 1000 m/s². A força necessária para ruptura de uma ligação antígeno-anticorpo é aproximadamente de 240 pN²³. Já as forças de motores moleculares tais como kinesina e miosina variam entre 7 a 9 pN²⁴.

2.1 Teoria das Pinças Ópticas

O efeito da pinça óptica é possível graças ao momento transportado pelo fóton. Quando um fóton atinge um objeto de índice de refração diferente daquele do meio do qual esta viajando, podem ocorrer em princípio três fenômenos: Reflexão, refração ou absorção. No caso da pinça óptica, o efeito do aprisionamento na região de maior intensidade do feixe deve-se

¹⁹K. Sakata-Sogawa, M. Kurachi, K. Sogawa K et al., "Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions", *Eur Biophys J Biophys* **27**, 55 (1998)

²⁰K. Konig, L. Svaasand, Y.G. Liu et al., "Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap", *Cell Mol Biol* **42**, 501 (1996)

²¹K. Helmerson, R. Kishore, W.D. Phillips et al., "Optical tweezers-based immunosensor detects femtomolar concentrations of antigens", *Clin Chem* **43**, 379 (1997)

²²H.C. Berg, R.M. Berry, "Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers", *P Natl Acad Sci USA* **94**, 14433 (1997)

²³ Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schilcher, K., and Schindler, H. (1996). "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscope". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3477-3481.

²⁴Finer, J.T., Simmons, R. M., and Spudis, J.A. (1994). "Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps". *Nature* **368**, 113-119

principalmente a refração dos fótons através da partícula, enquanto a reflexão e a absorção causam um efeito de expulsão da partícula daquela região. A estabilidade da armadilha se dá devido a uma dominância da força de gradiente (devido ao efeito da refração) sobre a força de espalhamento (devido aos efeitos de reflexão e absorção). Para conseguir tal estabilidade é necessário um feixe fortemente focado.²⁵

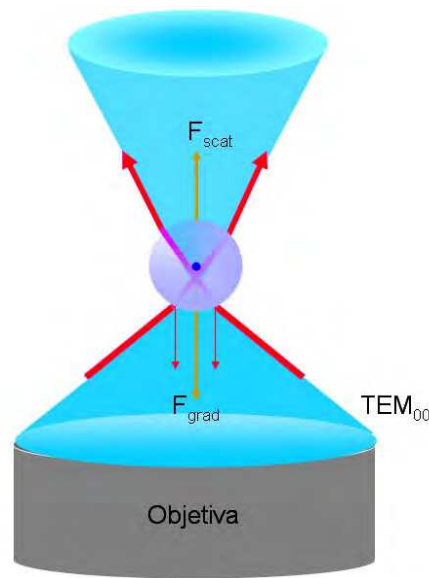


Figura 2.1 Esquema de forças em uma esfera dielétrica aprisionada por um feixe laser fortemente focado

A força óptica (F) exercida em uma partícula dielétrica por um feixe laser é dependente de 4 fatores fundamentais: A potência (P) da luz incidente, do índice de refração do meio n , da velocidade da luz (c) e de um fator adimensional de eficiência (Q), da seguinte forma:

$$F = Q \frac{nP}{c} \quad 2.1$$

O fator de eficiência Q , é uma representação da fração de potência utilizada para exercer força e é dependente da abertura numérica da objetiva empregada para focar o laser, do comprimento de

²⁵Ashkin A., “Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime” - Biophysical Journal 61 (2): 569-582 FEB 1992

onda λ e do estado de polarização da luz, do modo do laser, do índice de refração relativo entre meio e partícula, e da geometria da partícula aprisionada²⁶.

Partindo do momento transportado pelo fóton, podemos facilmente derivar a equação 2.1 para a força exercida em uma partícula devido à reflexão. Utilizando as expressões de momento e energia do fóton temos:

$$p_f = \frac{h}{\lambda} \text{ e como } v = \lambda f = \frac{c}{n} \text{ segue que}$$

$$p_f = n \frac{hf}{c} \Rightarrow p_f = n \frac{E_f}{c}$$

onde p_f é o momento do fóton, v é a velocidade da luz no meio de índice de refração n , E_f é a energia de um fóton com frequência f e c é a velocidade da luz no vácuo. Considerando reflexão total temos então:

$$F = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{2p_f N_f}{\Delta t} = 2 \frac{n N_f E_f}{c \Delta t} = 2 \frac{nP}{c}$$

Para uma reflexão total do feixe laser que se propaga no ar ($n=1$) com uma potência de 1W temos F da ordem de 10 nN, que é uma força bastante significativa para partículas da ordem de micrômetros de dimensão. Na pinça óptica, entretanto, as forças típicas da armadilha são da ordem de 0.01-100 pN, com fator de eficiência de transferência de momento Q da ordem de 0,2, ou seja dez vezes menor que no caso da reflexão total.

Os modelos teóricos existentes são dependentes do tamanho da partícula. No regime de Rayleigh, a partícula é muito menor que o comprimento de onda utilizado para aprisioná-la. No regime de Mie a partícula é muito maior que o comprimento de onda. No regime Lorenz-Mie a partícula é da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda.

²⁶ Svoboda, K. & Block, S. M. (1994) “*Biological application of optical forces*”- Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23, 247-285.

2.1.1 Regime Rayleigh ($d \ll \lambda$)

Neste regime, os campos eletromagnéticos são uniformes através da partícula dielétrica, de forma que estas podem ser tratadas como dipolos induzidos. As forças da armadilha se decompõem naturalmente em duas componentes. Força de espalhamento, F_{scatt} e força de gradiente, F_{grad} . A força de espalhamento é dada por:

$$F_{scatt} = n_m \frac{\langle S \rangle \sigma}{c}$$

onde $\sigma = \frac{8}{3} \pi (kr)^4 r^2 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2$ é a seção de choque de espalhamento de uma esfera de raio r . $\langle S \rangle$ é media temporal do vetor de *point*, n é o índice de refração da partícula, n_m é o índice de refração do meio onde a partícula está imersa, $m = n/n_m$ é o índice de refração relativo, e $k = 2\pi n_m / \lambda$ é o número de onda da luz. A força de espalhamento é proporcional ao fluxo de energia e aponta na direção de propagação feixe laser incidente.

A força de gradiente é a força de Lorentz agindo nos dipolos induzidos pelo campo elétrico da luz e é dada por²⁸:

$$\vec{F}_{grad} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} \times \vec{B} \quad 2.2$$

onde \vec{p} é o momento de dipolo da partícula. Considerando $\vec{p} = \alpha \vec{E}$ obtem-se

$$\vec{F}_{grad} = \alpha \left[(\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \times \vec{B} \right] \quad 2.3$$

²⁷ K. Svoboda and S. M. Block, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 247–285 (1994).

²⁸ Gordon J. P. “Radiation forces and momenta in dielectric media”- Phys.Rev.A 8:14-21

Utilizando a identidade vetorial $(\vec{E} \cdot \nabla)\vec{E} = \nabla\left(\frac{E^2}{2}\right) - \vec{E} \times \nabla \times \vec{E}$ e a equação de Maxwell

$\nabla \times \vec{E} + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = 0$ podemos escrever a equação 2.3 como

$$\vec{F}_{grad} = \alpha \left[\nabla \left(\frac{E^2}{2} \right) + \frac{\partial}{\partial t} (\vec{E} \times \vec{B}) \right] \text{ e tomando a média temporal}$$

$$\langle \vec{F}_{grad} \rangle = \frac{\alpha}{2} \nabla \langle E^2 \rangle,$$

onde $\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)$ é a polarizabilidade da partícula²⁹. A força de gradiente é proporcional e paralela ao gradiente da densidade de energia (para $m > 1$). Portanto, uma armadilha estável requer que a força de gradiente, que tem direção oposta a de propagação do feixe laser, seja maior que força de espalhamento. Então, ao mover o foco do feixe a partícula pode ser manipulada. Aumentando a abertura numérica diminui-se o *spot-size* e aumenta-se a intensidade do gradiente, aumentando as forças da armadilha óptica em todas as direções.

2.1.2 O Regime Lorenz-Mie ($d \sim \lambda$)

Neste regime nem a teoria eletromagnética nem a teoria de óptica geométrica são adequadas para explicar os resultados experimentais. Em 2001, Tlusty et al³⁰. introduziram uma teoria que simplifica os cálculos da força óptica neste regime ao explorar as propriedades de um feixe altamente localizado. Eles argumentam que para tais feixes, a diferença de fase através do *spot-size* 2ω é desprezível e portanto a energia da partícula pode ser calculada da seguinte forma.

²⁹ K. Svoboda and S. M. Block, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 247–285 (1994).

³⁰ 12T. Tlusty, A. Meller, and R. Bar-Ziv, “Optical gradient forces of strongly localized fields,” Phys. Rev. Lett. 81, 1738–1741 ~1998!.

$$W = -\alpha \int_V U dV$$

onde $\alpha = \frac{\epsilon_p}{\epsilon_0} - 1$ polarizabilidade e a integração é sobre o volume V da partícula.

A força de gradiente surge devido à variação de W em resposta a uma variação de coordenada da partícula. Os campos eletromagnéticos localizados próximos ao ponto focal podem ser aproximados por um feixe gaussiano 3D. A densidade de energia deste feixe pode ser expressa por:

$$U(\rho, z) = U_0 \exp\left(-\frac{\rho^2}{2\omega^2} - \frac{z^2}{2\omega^2 \epsilon}\right)$$

onde $U_0 = \frac{1}{2} \epsilon_0 E^2$ é a máxima densidade de energia do feixe no foco, ρ é a distância radial do eixo do feixe, z é a distância ao longo do eixo, ω e $\omega \epsilon$ são as dimensões da cintura do feixe laser nas direções transversal e axial respectivamente. As interações das polarizações induzidas com os campos formam um poço de potencial. A força de restauração proveniente deste poço calculada para o caso onde o feixe tem simetria radial ($\epsilon=1$) é dada por

$$F(r) = \partial_r W(r) = \alpha U_0 \omega^2 4\pi e^{-(\alpha^2 + u^2)/2} [au \cosh(au) - \sinh(au)]$$

onde $a = R/\omega$ e $u = r/\omega$ são o raio e a coordenada normalizada pelo raio da cintura do feixe ω respectivamente. Para pequenas perturbações em torno da origem chegaram a seguinte expressão para o constante de mola da armadilha:

$$k = \alpha U_0 \omega \frac{4\pi}{3} a^3 e^{-a^2/2}$$

Thusty et al. mostraram que estas expressões, bem como as expressões completas para a força de restauração não linear para grandes perturbações estão em excelente concordância com os experimentos, para todos os tamanhos de partículas.

Uma outra opção, para este regime, muito mais precisa e complexa, é a Teoria de Lorenz-Mie generalizada (GLMT), uma extensão da teoria de Mie do espalhamento. Ela permite calcular os campos espalhados e forças de radiação exercidas sobre uma partícula de tamanho qualquer colocada em um feixe gaussiano³¹ ou em um perfil de feixe mais geral³².

2.1.3 Regime de Óptica Geométrica ($d \gg \lambda$)

Quando o diâmetro da partícula sendo aprisionada é muito maior que o comprimento de onda do laser utilizado podemos explicar o fenômeno do aprisionamento através de óptica geométrica. Daremos mais atenção a este regime pois corresponde a situação de maior interesse na nossa pesquisa. Analisaremos inicialmente o efeito da incidência de um único raio sobre uma esfera dielétrica de índice de refração n_2 maior que o do meio a sua volta n_1 . Ao incidir em um meio com índice de refração diferente, o raio sofre reflexão com probabilidade R e transmissão com probabilidade T . R e T são os coeficientes de Fresnel dependentes da polarização e dados por (utilizando a lei de Snell):

$$R_s = \left(\frac{\sin(\sigma - \mu)}{\sin(\sigma + \mu)} \right)^2 \quad T_s = 1 - R_s; \quad R_p = \left(\frac{\tan(\sigma - \mu)}{\tan(\sigma + \mu)} \right)^2 \quad T_p = 1 - R_p \quad 2.4$$

onde o subscrito s indica uma polarização perpendicular ao plano de incidência e o p uma polarização paralela. R em geral é da ordem de 1% e, portanto, T é da ordem de 99%. Assim, podemos exemplificar o fenômeno do aprisionamento considerando apenas o efeito predominante, ou seja, a refração dos raios de luz. Considere então dois raios simétricos que são refratados na esfera dielétrica:

³¹ G. Gouesbet, B. Maheu, G. Gréhan, J. Opt. Soc. Am. A 5 (1988) 1427.

³² James A. Lock, APPLIED OPTICS _ Vol. 43, No. 12 _ 20 April 2004

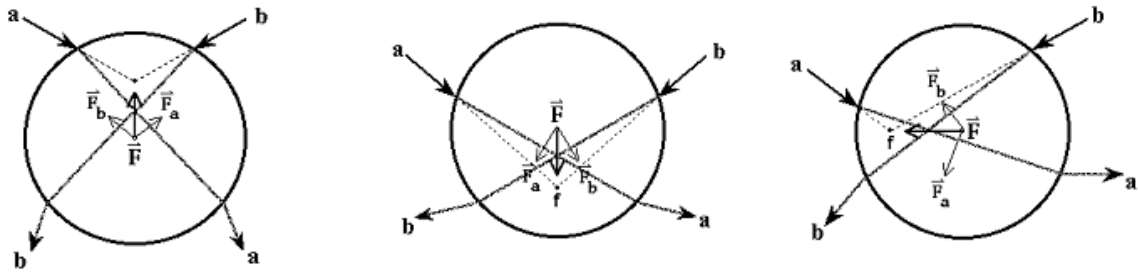


Figura 2.2 Dois raios simétrico **a** e **b** incidindo sobre a esfera com índice de refração $n_2 > n_1$ sendo refratados pela mesma. No processo ocorre transferência de momento dos fótons para a esfera ocasionando uma força \vec{F} sempre direcionada para a região de maior intensidade do laser (foco).

A variação no momento do fóton devido à refração da origem a forças F_a e F_b , mostradas na direção da variação do momento. A força resultante dos dois raios age na direção de maior intensidade da luz, deste modo levando a o centro da esfera para o foco do laser.

Para levar em conta os efeitos secundários devido à reflexão na superfície da esfera e às múltiplas reflexões dentro da esfera, é necessária uma análise cuidadosa do trajeto de um único raio que incide sobre a esfera. A figura abaixo ilustra o fenômeno:

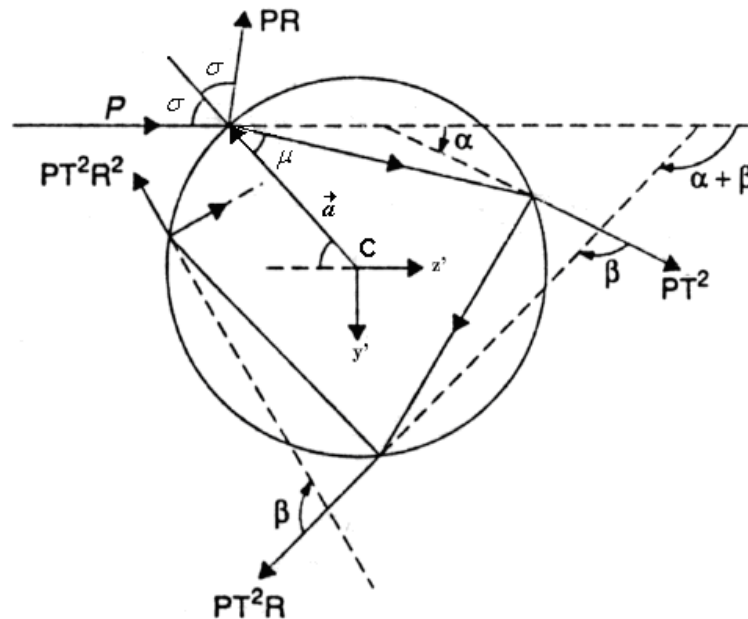


Figura 2.3 Trajeto de um único raio incidindo sobre a esfera dielétrica com ângulo σ e refratando com ângulo μ . O esquema ilustra as inúmeras reflexões e refrações que um raio sofre nestas condições. O eixo Z' tem a direção do raio incidente e o eixo Y' é ortogonal ao eixo Z' tal que $\hat{y}' \times \hat{z}' = \hat{x}'$ e a direção de \hat{x}' é dada por $\hat{z}' \times \hat{a}$. Da geometria obtemos os ângulos $\alpha = 2(\sigma - \mu)$ e $\beta = \pi - 2\mu$.

Podemos calcular a força que atua na esfera nas direções y' e z' através do cálculo da variação de momento por unidade de tempo nestas direções ¹. A força óptica total agindo sobre a esfera é a soma das contribuições devido ao raio refletido PR , e do número infinito de raios refratados emergentes de potências sucessivamente decrescentes $PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n, \dots$:

$$F_{z'} = \frac{n_1 P}{c} - \left[\frac{n_1 PR}{c} \cos(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right] \quad 2.5$$

$$F_{y'} = 0 - \left[\frac{n_1 PR}{c} \sin(\pi + 2\sigma) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right] \quad 2.6$$

Para realizar os somatórios, escrevemos as forças no plano complexo $F_c = F_{z'} + iF_{y'}$:

$$F_c = \frac{n_1 P}{c} \left[1 + R \exp(2i\sigma) - T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n \exp[i(\alpha + n\beta)] \right] \quad 2.7$$

Notamos então que o terceiro termo é a somatória de uma progressão geométrica de razão $R \exp(i\beta)$. Então:

$$F_c = \frac{n_1 P}{c} \left[1 + R \exp(2i\sigma) - T^2 \exp(i\alpha) \left(\frac{1}{1 - R \exp(i\beta)} \right) \right] \quad 2.8$$

Tomando agora parte real e parte imaginária obtemos da equação acima:

$$F_S = F_{z'} = \frac{n_1 P}{c} \left[\underbrace{1 + R \cos(2\sigma) - \frac{T^2 [\cos(2\sigma - 2\mu) + R \cos(2\sigma)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\mu)}}_{\varrho} \right] \quad 2.9$$

$$F_G = F_{y'} = \frac{n_1 P}{c} \left[\underbrace{R \sin(2\sigma) - \frac{T^2 [\sin(2\sigma - 2\mu) + R \sin(2\sigma)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\mu)}}_{\varrho} \right] \quad 2.10$$

Assim, cada raio dá origem a um termo de força de espalhamento F_S e a um termo de força de gradiente F_G . Precisamos agora calcular o efeito de todos os raios componentes do feixe

laser incidindo sobre a esfera dielétrica. Para isso devemos levar em conta que as objetiva comerciais de que dispomos obedecem à condição do seno de Abbe.³³ Ou seja, um raio que incide perpendicularmente na abertura de uma objetiva de distância focal f , a uma distância r do seu centro é refratado com um ângulo θ tal que $\sin \theta = \frac{r}{f}$. A figura abaixo ilustra o fenômeno:

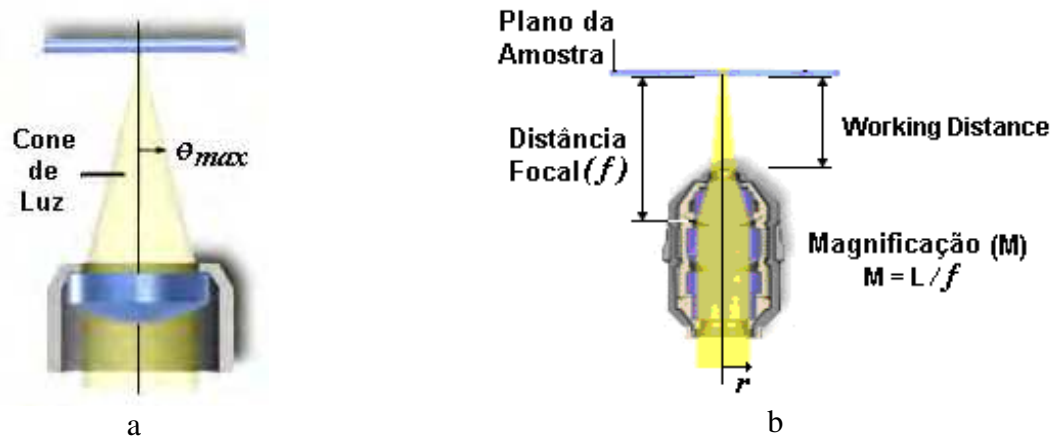


Figura 2.4 a) Feixe focado pela objetiva com ângulo θ_{max} correspondente ao raio mais distante do eixo (r_{max}). A abertura numérica é definida em função deste ângulo: $NA = n \sin(\theta_{max})$ onde n é o índice de refração do meio entre a objetiva e a amostra. **b)** Esquema das variáveis envolvidas na condição de seno de Abbe. L é o comprimento do tubo (160mm).

Como a força exercida por cada raio na esfera depende do ângulo de incidência σ , é preciso calcular este ângulo em função do ângulo de convergência θ e do ângulo azimutal φ que define a direção no espaço de cada raio. Para isso utilizamos o sistema de coordenadas abaixo, onde o foco da objetiva está na origem dos eixos e o vetor \vec{S} , que liga a origem ao centro da esfera, faz um ângulo γ com o eixo \mathbf{X} :

³³ Min Gu, P. C. Ke, X. S. Gan; "Trapping force by a high numerical-aperture microscope objective obeying the sine condition" - Rev. Sci. Instrum., Vol. 68, No. 10, October 1997

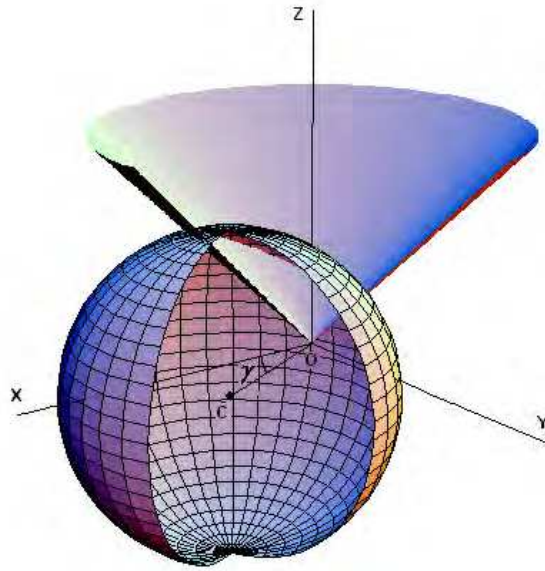


Figura 2.5 Sistema de coordenadas utilizado no modelo teórico. C é o centro da esfera e γ é o ângulo entre OC e o eixo X. Sem perda de generalidade, o segmento OC está contido no plano XZ.

Escrevemos em coordenadas esféricas o vetor $\vec{\delta}$ que liga a origem ao ponto de incidência de um raio com ângulo de refração θ e ângulo azimutal φ como:

$$\vec{\delta} = (\delta \sin \theta \cos \varphi, \delta \sin \theta \sin \varphi, \delta \cos \theta) \quad 2.11$$

O vetor \vec{S} neste sistema é escrito como:

$$\vec{S} = (S \sin \gamma, 0, S \cos \gamma) \quad 2.12$$

A figura abaixo ilustra a configuração destes vetores:

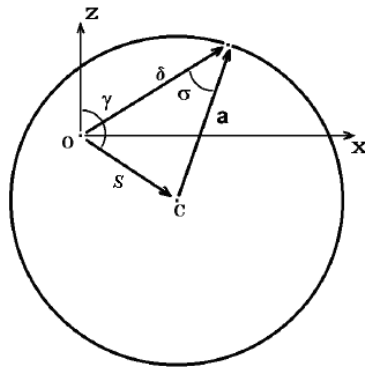


Figura 2.6 Esquema dos vetores utilizados para o cálculo do ângulo de incidência σ . O vetor \vec{a} dá a direção normal no ponto de incidência e tem módulo igual ao raio da esfera. Em geral, $\vec{\delta}$ e \vec{a} não estão no plano XZ.

Da Lei dos Cosenos:

$$\sigma = \cos^{-1} \left(\frac{\delta^2 + a^2 - S^2}{2\delta a} \right) \quad 2.13$$

E como

$$\vec{a} = \vec{\delta} - \vec{S} \Rightarrow a^2 = \delta^2 + S^2 - 2\vec{\delta} \cdot \vec{S} \quad \text{Portanto:}$$

$$\delta = S(\cos \gamma \cos \theta + \cos \varphi \sin \gamma \sin \theta) + \sqrt{1 - S^2 + S^2(\cos \gamma \cos \theta + \cos \varphi \sin \gamma \sin \theta)^2} \quad 2.14$$

já que $\delta \geq 0$. Assim obtemos:

$$\sigma = \cos^{-1} \left(\frac{\sqrt{a^2 - S^2 + S(\cos \gamma \cos \theta + \cos \varphi \sin \gamma \sin \theta)^2}}{a} \right) \quad 2.15$$

Levando em conta agora a condição de seno de Abbe ($r = f \sin \theta$):

$$\sigma(r, \varphi, S, \gamma) = \cos^{-1} \left(\frac{\sqrt{a^2 - S^2 + \frac{S}{f^2}(\sqrt{f^2 - r^2} \cos \gamma + r \cos \varphi \sin \gamma)^2}}{a} \right) \quad 2.16$$

Utilizando a lei de Snell obtemos o ângulo de refração μ :

$$\mu(r, \varphi, S, \gamma) = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n} \frac{\sqrt{S^2 - \frac{S}{f^2}(\sqrt{f^2 - r^2} \cos \gamma + r \cos \varphi \sin \gamma)^2}}{a} \right) \quad 2.17$$

Assim determinamos as forças F_z e F_y devido a cada raio com direção definida pelo par (r, φ) .

Para encontrarmos as forças nas direções \hat{x}, \hat{y} e \hat{z} precisamos decompor os versores \hat{z}' e \hat{y}' naquelas direções. Claramente o versor \hat{z}' é dado por:

$$\hat{z}' = -(\sin \theta \cos \varphi, \sin \theta \sin \varphi, \cos \theta) = -\frac{1}{f} (r \cos \varphi, r \sin \varphi, \sqrt{f^2 - r^2}) \quad 2.18$$

Já o versor \hat{y}' é dado por:

$$\hat{y}' = \hat{z}' \times \hat{x}' = \hat{z}' \times (\hat{z}' \times \hat{a}) = \hat{z}' \times (\hat{S} \times \hat{z}') \quad 2.19$$

$$\Rightarrow \hat{y}' = \left(\frac{f^2 \sin \gamma - (r\sqrt{f^2 - r^2} \cos \gamma \cos \varphi + r^2 \cos^2 \varphi \sin \gamma)}{f^2}, \right. \\ \left. - \frac{r \sin \varphi (\sqrt{f^2 - r^2} \cos \gamma + r \cos \varphi \sin \gamma)}{f^2}, \frac{r(r \cos \gamma - \sqrt{f^2 - r^2} \cos \varphi \sin \gamma)}{f^2} \right) \quad 2.20$$

Agora basta realizarmos uma integração na abertura de entrada da objetiva para o cálculo da força resultante:

$$\vec{F}_{total} = \int_0^{2\pi r_{max}} \int_0^r \frac{n_1}{c} (Q_z \hat{z}' + Q_y \hat{y}') I(r, \varphi) r dr d\varphi \quad 2.21$$

onde $I(r, \varphi)$ é a intensidade na entrada da objetiva. Fizemos a integração numericamente no software *Mathematica* para o caso de uma intensidade uniforme na entrada da objetiva, para

$\gamma = 0$ e $\gamma = \frac{\pi}{2}$:

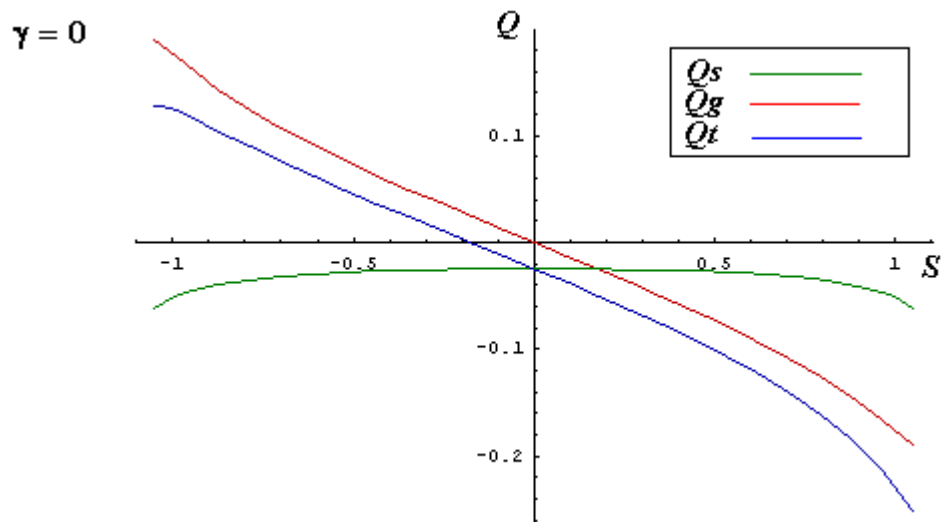


Figura 2.7 Gráfico das forças de espalhamento (Q_s), de gradiente (Q_g) e total (Q_t) na direção z.

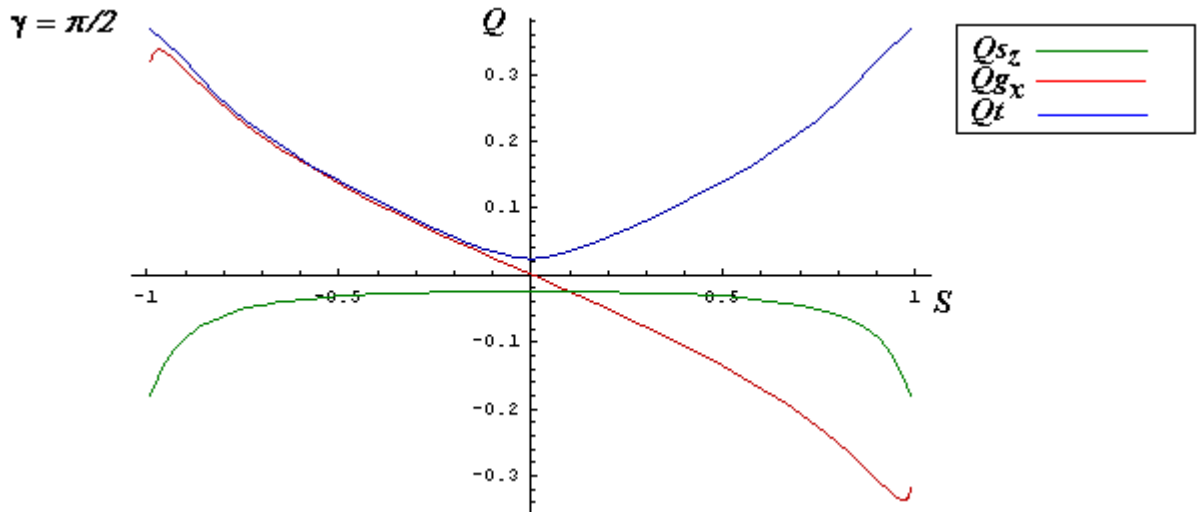


Figura 2.8 Gráfico das forças de espalhamento (Q_{sz}) na direção z, de gradiente (Q_{gx}) na direção x e total ($Q_t = \sqrt{Q_{sz}^2 + Q_{gx}^2}$)

Podemos observar das simulações acima a assimetria existente entre as forças da armadilha na direção de propagação do feixe, Figura 2.7 e na direção perpendicular a propagação, Figura 2.8, que é cerca de duas vezes maior. É a constante de mola da armadilha associada à direção perpendicular ao feixe que objetivamos calibrar com o cantilever de AFM.

2.2 Instrumentação

A figura abaixo mostra a montagem experimental construída para a pinça óptica:

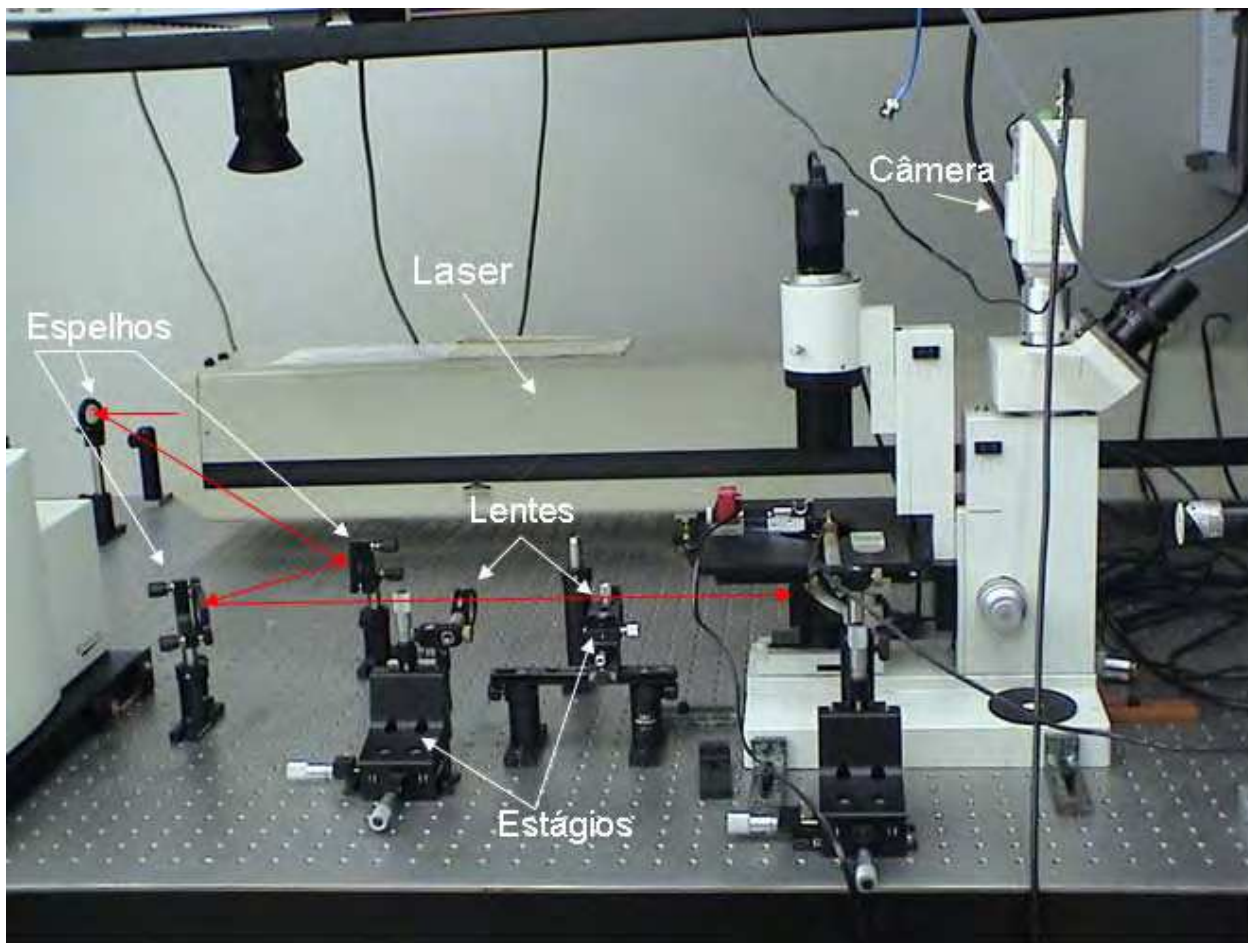


Figura 2.9 Montagem experimental da pinça óptica.

2.2.1 O Microscópio

Qualquer microscópio com uma porta de epi-iluminação pode ser utilizado para a construção da pinça óptica (comprometendo, entretanto, a microscopia de fluorescência).

Existem três requisitos indispensáveis para o microscópio. O primeiro é a necessidade de um espelho dicróico para a reflexão do laser da pinça enquanto transmite a luz visível. O segundo é

uma objetiva com grande abertura numérica ($NA > 1$) para a obtenção de uma armadilha real. E o terceiro é a estabilidade do estágio e do acoplamento da câmera de vídeo ao microscópio.

2.2.2 O Laser

A seleção do laser deve levar em conta os requisitos específicos necessários de: Comprimento de onda, potência, estabilidade e qualidade do modo do feixe. Para não causar danos a materiais biológicos, que em geral são mais transparentes para grandes comprimentos de onda e, ao mesmo tempo, para que o laser não seja muito absorvido pela água ao redor do material que se vai manipular, que em geral é mais transparente para curtos comprimentos de onda, deve-se utilizar lasers com comprimentos de onda na janela de 800nm a 1100nm .

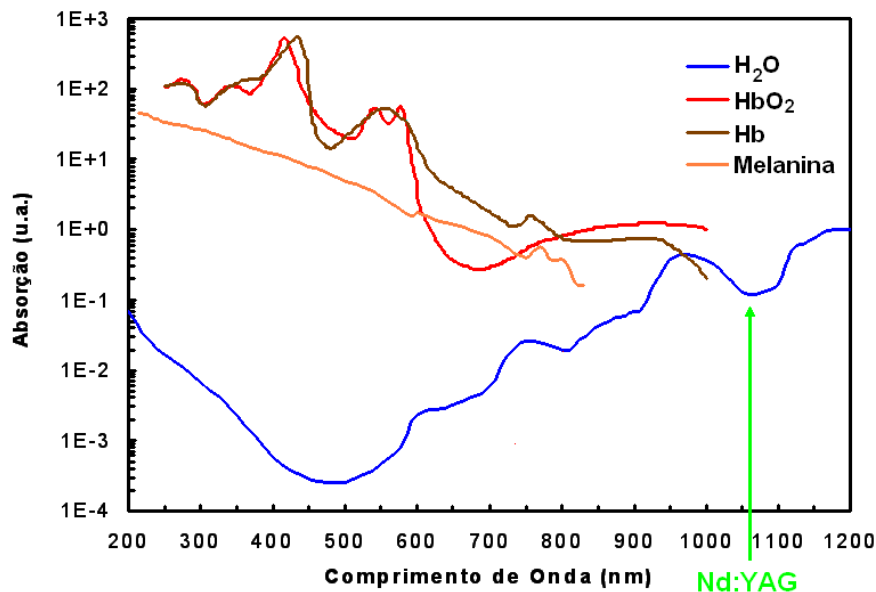


Figura 2.10 Espectro de absorção de alguns materiais biológicos e da água

Para a obtenção de uma armadilha estável, o laser deve operar em modo contínuo (CW) e apresentar um feixe com baixo ruído que possa ser focalizado com menor diâmetro possível. O diâmetro do menor ponto focal será da ordem do comprimento de onda do laser utilizado e é

descrito como um spot limitado pela difração. Em geral utiliza-se o modo TEM_{00} , mas pode-se utilizar também o modo TEM_{01} (do-nut) com leve aumento no desempenho da armadilha³⁴.

Em nosso caso utilizamos um laser de Nd:YAG, CW de comprimento de onda 1064nm, operando no modo TEM_{00} com capacidade de fornecer até 10W de potência. No entanto, a potência utilizada é sempre de no máximo um 1W, pois com potências maiores existe o risco de danos permanentes na objetiva devido à absorção do laser pela mesma e conseqüente superaquecimento.

2.2.3 Construção e Alinhamento

Para que haja estabilidade durante o aprisionamento, todo o aparato deve ser montado em uma mesa óptica específica que isole o sistema de vibrações indesejáveis. O diagrama da figura 14 ilustra os componentes principais da montagem.

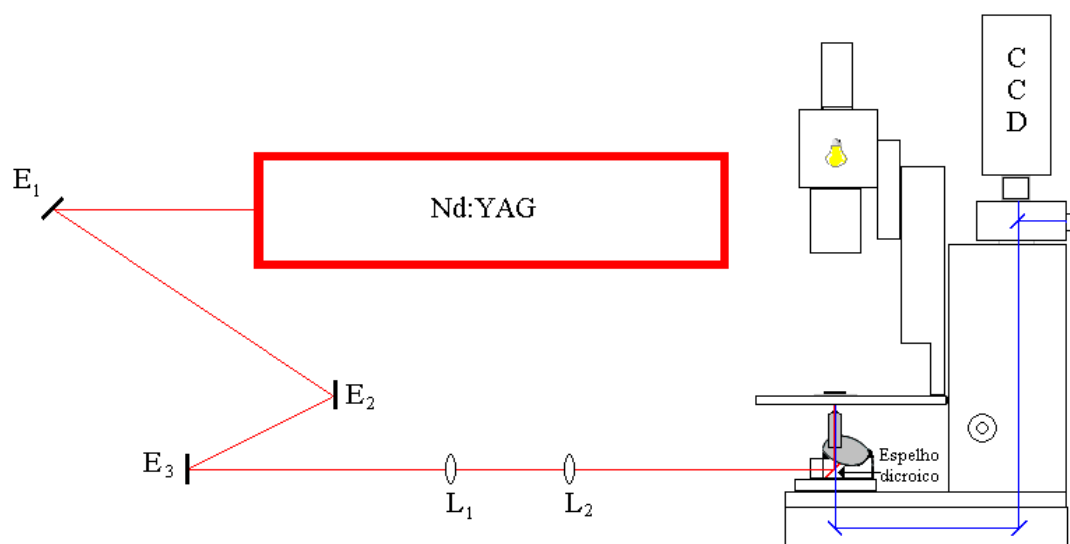


Figura 2.11 Diagrama da montagem da pinça óptica.

³⁴ Ashkin A., "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime" Biophysical Journal 61 (2): 569-582 FEB 1992

O primeiro espelho E_1 é utilizado para levar o feixe laser para a direção do microscópio, já proporcionando um ajuste da altura do feixe com relação à entrada do microscópio. Os espelhos E_2 e E_3 tem papel fundamental durante o alinhamento do sistema, permitindo não só com que o feixe saia na horizontal, mas também um ajuste da inclinação deste no plano, fator este que possibilita o feixe entrar perpendicularmente ao plano de abertura de entrada da objetiva proporcionando um ponto focal limitado pela difração. Já o telescópio formado pelas lentes L_1 e L_2 tem dupla função. A de ampliar o diâmetro do feixe para que este preencha completamente a abertura da objetiva como ilustra a Figura 2.12 e a de possibilitar enxergar a partícula aprisionada pela objetiva. Isto porque o plano objeto não coincide com o plano focal da objetiva. Para isto, ajusta-se a distância entre L_1 e L_2 até que se possa ver com nitidez a partícula aprisionada. A Figura 2.13 ilustra o procedimento.

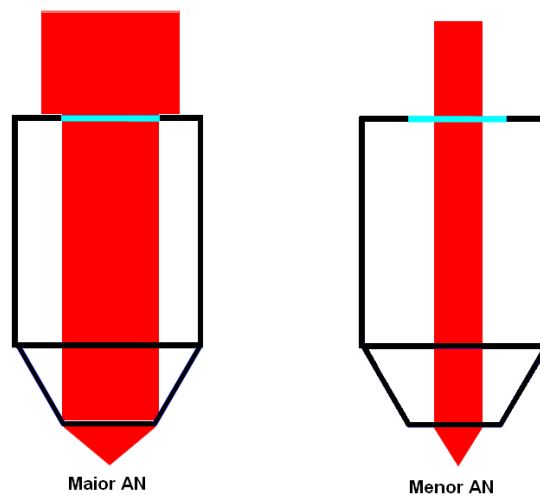


Figura 2.12 Preencher a entrada da objetiva possibilita maior abertura numérica

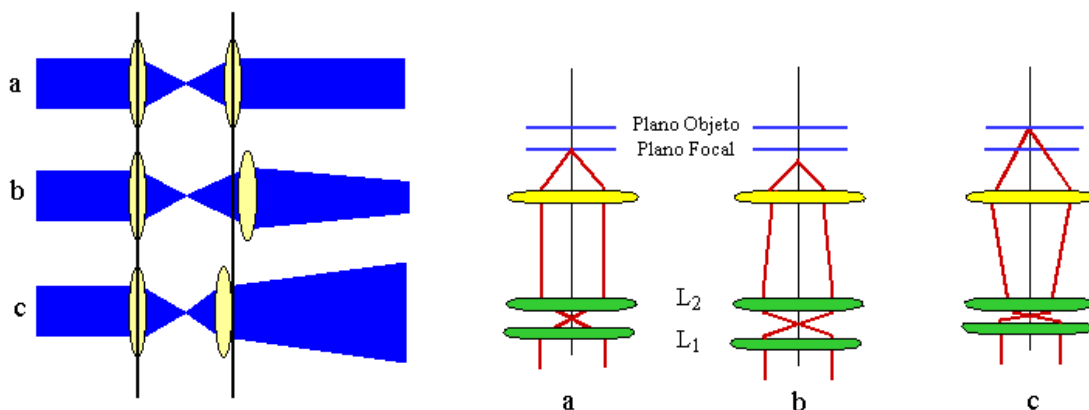


Figura 2.13 Utilização do telescópio para levar o foco do laser da pinça para o plano objeto permitindo a visualização da partícula aprisionada. Em (a) a distância d entre L_1 e L_2 é igual a soma das distâncias focais das mesmas $f_1 + f_2$ e o feixe é focalizado no plano focal da objetiva. Em (b) d é maior que $f_1 + f_2$ e o feixe é focado antes do plano focal da objetiva. Em (c) d é menor que $f_1 + f_2$ e o feixe é focalizado no plano objeto permitindo a visualização do mesmo na tela da TV.

Para a realização do alinhamento, inicialmente sem as lentes L_1 e L_2 com a ajuda de um cartão para visualização do infravermelho e dos espelhos E_1 , E_2 e E_3 ajusta-se o feixe horizontalmente e de modo a entrar pela abertura da objetiva. Coloca-se uma lamínula após a objetiva sob o estágio do microscópio e ajusta-se a altura deste até que se tenha uma imagem do padrão de difração do spot laser na tela da TV. Isto ocorre porque parte do feixe é refletida pela lamínula. Além disso, é necessário que o filtro de IR seja removido da câmera para a visualização do laser. Logo em seguida, utiliza-se os espelhos E_2 e E_3 para fazer com que o feixe entre perpendicular ao plano da abertura da objetiva, gerando um spot limitado pela difração completamente simétrico, conforme ilustra a Figura 2.14.

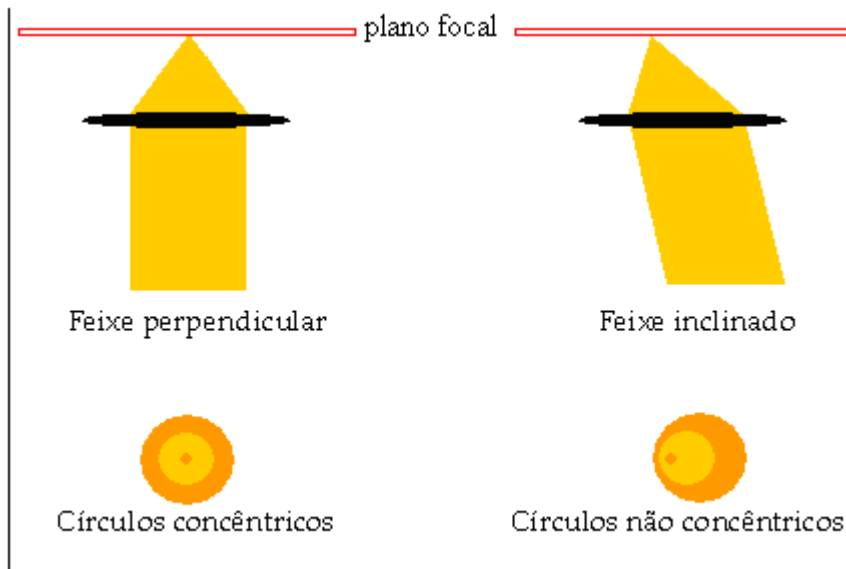


Figura 2.14 Ilustração da imagem vista na TV durante o processo de alinhamento.

Em seguida colocam-se as lentes L_1 e L_2 de modo a não alterar o centro do padrão de difração na tela da TV e então, ajusta-se a distância entre L_1 e L_2 até que se obtenha um spot limitado pela difração simétrico novamente. Alterando-se a relação entre os focos de L_1 e L_2 regula-se o diâmetro do feixe na entrada da objetiva, preenchendo-a completamente. Por fim adiciona-se uma solução de esferas da ordem de alguns micrômetros e com uma esfera aprisionada, faz-se o ajuste fino em L_1 e L_2 para conseguir uma focalização ideal a mesma.

2.2.4 O Sistema de Imagem

Adaptamos uma câmera VHS analógica ao tubo de observação binocular do microscópio. Esta é então ligada diretamente a uma televisão comum e a uma placa de captura em computador para digitalização e análise via software.

2.3 Calibração

A dificuldade que circunda a computação teórica da rigidez da armadilha óptica implica que esta deve ser determinada experimentalmente. Tais armadilhas, apresentam forças restauradoras diretamente proporcionais ao deslocamento, similarmente a molas de Hook, para pequenos deslocamentos da posição de equilíbrio. Assim são caracterizadas por constantes de rigidez k fixas para uma dada condição experimental. Uma vez conhecida a constante de rigidez da armadilha, a força pode então ser determinada utilizando-se a lei de Hook $F=kx$. A calibração da rigidez pode ser feita de várias maneiras³⁵, das quais destacamos duas:

2.3.1 Força de Arraste

Esta técnica determina a rigidez ou constante de mola da armadilha através da aplicação de uma força de viscosidade conhecida a uma partícula aprisionada e mede seu deslocamento da posição de equilíbrio. A rigidez é dada então por:

$$k = \frac{f}{x}$$

onde f é a força de arraste conhecida e x é o deslocamento da partícula da posição de equilíbrio.

Utiliza-se em geral a lei de Stokes:

$$F = 6\pi\eta r v$$

Onde η é a viscosidade do meio, r é o raio da partícula e v é a velocidade relativa da partícula em relação à solução. Tal expressão é válida apenas se a esfera é mantida longe das paredes da câmara da solução. Caso contrário, é preciso acrescentar um fator de correção³⁵:

$$F = 6\pi\eta r v k$$

³⁵ K. Svoboda and S. M. Block, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 247–285 (1994).

$$k = \frac{1}{1 - \frac{9}{16}(r/h) + \frac{1}{8}(r/h)^3 - \frac{45}{256}(r/h)^4 - \frac{1}{16}(r/h)^5}$$

onde h é a distância das paredes ao centro da esfera.

2.3.2 *Eqüipartição da Energia*

Alternativamente, a rigidez da armadilha pode ser determinada a partir do movimento Browniano da partícula aprisionada. Quanto maior o deslocamento médio quadrático da partícula, menor a rigidez da armadilha. Utilizando o teorema da eqüipartição da energia para um poço de potencial harmônico, temos

$$\frac{1}{2}k\langle x \rangle^2 = \frac{1}{2}k_B T$$

$$\Rightarrow k = \frac{k_B T}{\langle x \rangle^2}$$

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

Capítulo 3. Microscópio de Força Atômica (AFM)

O AFM, um descendente da família das microscopias de varredura (SPM-*scanning probe microscopy*), foi inventado por Binnig et al. em 1986 seguindo o advento do microscópio de tunelamento STM (*scanning tunnelling microscope*) também por Binnig et al. em 1982. Desde então, o AFM se tornou uma técnica de análise de superfícies bem estabelecida, capaz de realizar imagens de alta resolução de superfícies de materiais isolantes e condutores em uma grande variedade de condições, bem como imagens submoleculares de materiais biológicos³⁶. Também provou ser uma ferramenta indispensável na determinação de forças intermoleculares.

O AFM tem uma resolução de força teórica de 10^{-15} N³⁷ e emprega sensores com o raio da ponta da ordem de 10 – 15 nm³⁸ fornecendo regiões de contato tão pequenas quanto 10 nm²³⁹. A alta resolução de força e a pequena área de contato superam as limitações do aparato de força superficial (SFA), e é ideal para as medidas de interações de moléculas individuais. O estabelecimento do AFM como uma ferramenta de medida de força também levou a elucidação de propriedades nanomecânicas adicionais, tais como a elasticidade e a plasticidade de moléculas.

³⁶ Hansma, H. G., Kim, K. J., Laney, D. E., Garcia, R. A., Argaman, M., Allen, M. J. & Parsons, S. M. (1997) “*Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review*”. J. Struct. Biol., 119, 99-108.

³⁷ Smith, S. B., Cui, Y. & Bustamante, C. (1996) “*Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules.*” - Science, 271, 795-799.

³⁸ Thundat, T., Zheng, X. -Y., Shrap, D., Allison, D. P., Warmack, R. J., Joy, D. C. & Ferrell, T. L. (1992) “*Calibration of atomic force microscope tips using biomolecules.*” - Scanning Microscopy, 6, 903-910.

³⁹ Lee, G. U., Chrisey, L. A. & Colton, R. J. (1994a) “*Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA.*” - Science, 266, 771-773.

3.1 Instrumentação

O AFM investiga a superfície de uma amostra com uma fina ponta de silício, integrada a extremidade de um cantilever microfabricado com uma constante de mola k (N/m) conhecida. Um feixe laser é focado na superfície metálica do cantilever em forma de V e, após, refletido do cantilever para um fotodiodo de quadrante sensível a posição. Um mapa da topografia da superfície da amostra é gerado ao monitorar-se as deflexões do cantilever (um resultado de forças que agem entre a ponta e a superfície) à medida que a ponta varre a superfície da amostra. Ao monitorar a posição do feixe laser através dos sinais de saída de cada um dos segmentos do fotodiodo deflexões tão pequenas quanto 0.1 \AA podem ser detectadas ⁴⁰. Os principais componentes do AFM são mostrados esquematicamente na Figura 3.1:

A vantagem principal do AFM como uma ferramenta de imagem é que ele não sofre das limitações de difração dos microscópios óticos ou eletrônicos. Tais microscópios baseados em ondas são geralmente limitados à resolução da mesma ordem que o comprimento de onda utilizado pra fazer a imagem. Esta capacidade impressionante foi convincentemente demonstrada através de imagens de resolução atômica de cristais não condutores como mostra a Figura 3.2:

⁴⁰ Rugar, D. & Hansma, P .K. (1990) “*Atomic force microscopy.*” - Physics today, 43, 23-30.

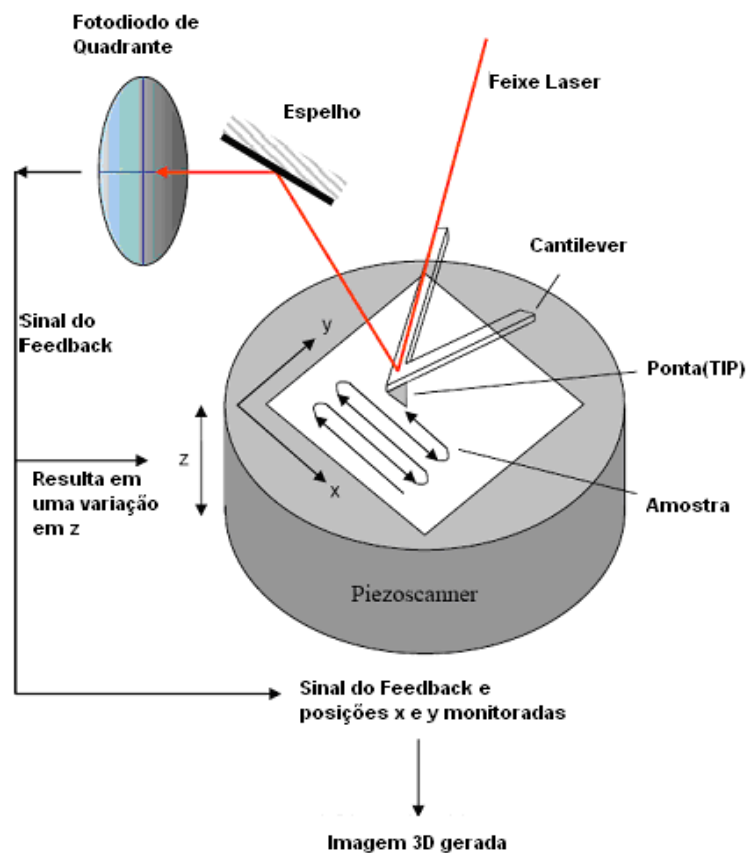


Figura 3.1 Diagrama esquemático de um AFM. Tipicamente a ponta fica levemente em contato com a amostra (via mecanismo de feedback) e parada em uma mesma coordenada x,y enquanto a amostra é deslocada pelo piezoscanner para a varredura linha por linha e a obtenção da imagem 3D desejada. À medida que a ponta passa por regiões elevadas da superfície da amostra, forças repulsivas aumentam entre a ponta e a amostra, resultando em uma variação na deflexão do cantilever. Um circuito de feedback é empregado para manter a altura da ponta com relação à amostra fixa através do controle da coordenada z da amostra, mantendo também uma força de interação entre ponta-amostra constante. Imagens 3D que são representativas da topografia da superfície da amostra são portanto obtidas monitorando-se o sinal de feedback e a posição (x,y) da amostra. (Adaptado de Allen, 1997)

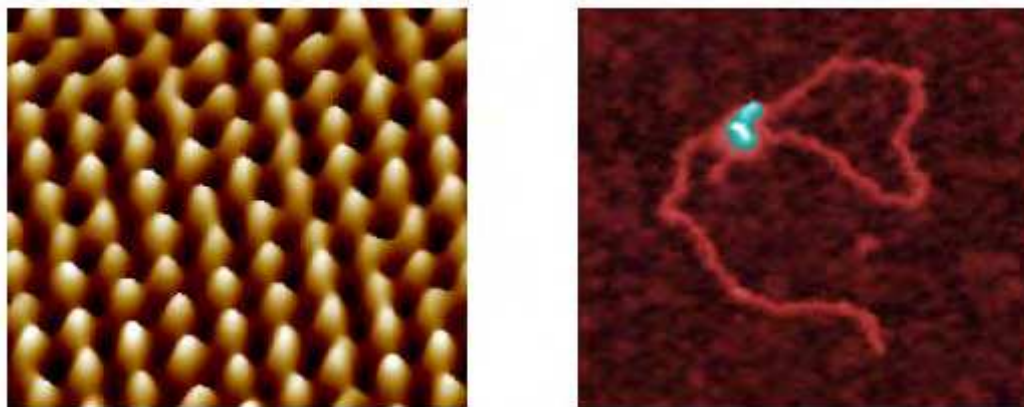


Figura 3.2 a) imagem de mica com resolução atômica no modo de contato de 5nm. Imagem obtida com NanoScope-SPM, cortesia Digital Instrument, Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA. b) Imagem de DNA no modo tapping de 252nm. Imagem obtida com o NanoScope-SPM, cortesia do Laboratório Bustamante, Instituto de Biologia Molecular, Universidade de Oregon, Eugene.

3.2 Modos de Imagem do AFM

Existem 3 modos de imagem principais que são usados para investigar a superfície de amostras, dependendo da sensibilidade de cada uma. Os modos utilizados são:

3.2.1 Contato

Neste modo a ponta é trazida em contato físico com a superfície do substrato. A desvantagem deste modo de imagem é que ele pode causar deformações em superfícies muito sensíveis devido as grandes forças repulsivas entre ponta e amostra que são da ordem de nanonewtons⁴¹. Os modos de não-contato e tapping foram desenvolvidos para contornar este problema. (Lindsay, 1993).

3.2.2 Não-contato

Neste modo o cantilever é feito oscilar em sua frequência de ressonância com a ponta muito próxima, mas sem tocar, a superfície da amostra. Infelizmente, esta técnica perde em sensibilidade a pequenas variações na separação entre ponta e amostra e como resultado demonstra menor resolução do que os demais modos de imagem ⁴².

⁴¹ Lindsay, S. M., Lyubchenko, Y. L., Tao, N. J., Li, Y. Q., Oden, P. I., Derose, J. A. & Pan, J.(1993) “*Scanning-tunneling-microscopy and atomic-force microscopy studies of biomaterials at a liquid-solid interface.*” - J. Vac. Sci. Technol. A-Vac. Surf. Films, 11, 808-815.

⁴² Magonov, S. N. & Whangbo, M. H. (1996) "*In Surface Analysis with STM and AFM.*" VCH Publisher, New York. Chapter 3, Scanning probe microscopes. pp 21-49.

3.2.3 Tapping

O modo de tapping combina alta resolução e rápida aquisição de imagens do modo de contato com a característica não destrutiva do modo de não-contato. Neste modo o cantilever é feito oscilar na sua frequência de ressonância e a ponta levemente toca superfície da amostra. A medida em que ponta e a amostra entram em contato intermitente, a amplitude vibracional do cantilever diminui. É esta variação na amplitude que é monitorada para produzir imagens da topografia da amostra. A determinação da diferença de fase entre as oscilações excitando o cantilever e as produzidas pela ponta durante o contato intermitente com a superfície fornecem informações sobre propriedades da superfície tais como adesão e viscoelasticidade, que em geral não são detectadas pelos outros modos de imagem.

O AFM tem sido empregado na obtenção de imagens de alta resolução de biomoléculas tais como proteínas, DNA, membranas de lipídios e células.

3.3 Medindo Forças

Os primórdios da espectroscopia de força foram dominados pelo AFM. A habilidade desta técnica em medir forças de adesão discretas da ordem de 10 pN foi primeiro identificada por Hoh *et al.* em 1992⁴³, que atribuiu tal força àquela necessária para romper uma simples ligação de hidrogênio. Desde aquele tempo, o AFM tem sido empregado na investigação de interações do tipo receptor-ligante, mecanismos de desenovelamento de proteínas (*unfolding*) e forças intramoleculares dentro de polímeros. Na aplicação do AFM como uma técnica de medida de forças, a deflexão do cantilever é monitorada à medida que a ponta (*tip*) é posta em contato com a

⁴³ Hoh, J. C., Cleveland, J. P., Prater, C.B., Revel, J. -P. & Hansma, P. K. (1992) “*Quantized adhesion detected with the atomic force microscope.*” - J. Am. Chem. Soc., 114, 4917-4919.

superfície da amostra e então separada. Se a constante de mola do cantilever é conhecida, esta deflexão pode ser traduzida em uma força. Os dados obtidos a partir da deflexão do cantilever são então utilizados para construir a curva Força vs. Distância ⁴⁴(Figura 3.3).

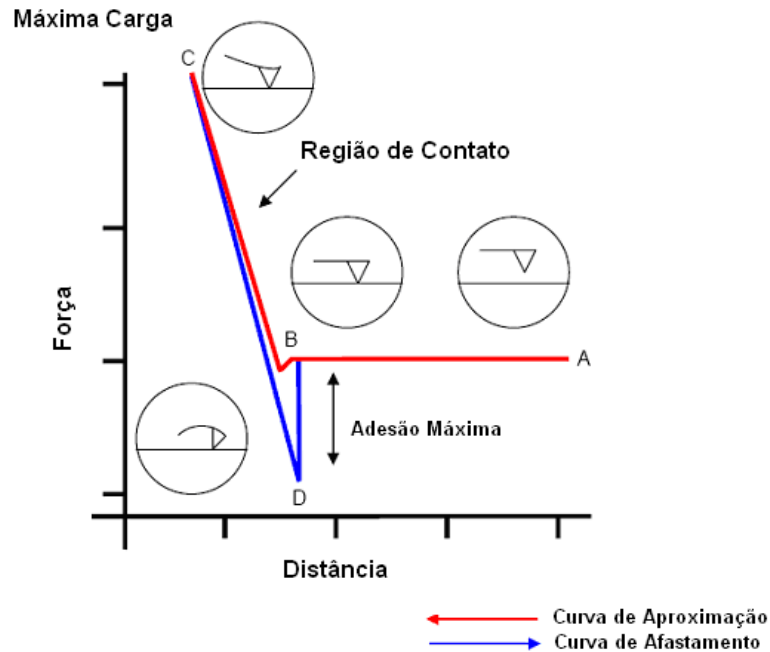


Figura 3.3 Curva Força vs. Distância.

No início da medida de uma força (A) o cantilever está na sua posição de equilíbrio. À medida que a ponta e amostra são aproximadas (curva de aproximação) a ponta alcança uma distância (B) onde a ponta salta para o contato com a amostra. Este “salto para o contato” é resultado das forças atrativas da superfície da amostra que excedem a força exercida pela constante de mola do cantilever. As forças responsáveis por esta forte atração são predominantemente devido a forças de van der Waals. O cantilever continua aproximando-se da superfície da amostra até um ponto de máxima carga (C). A ponta é então afastada da superfície da amostra (curva de afastamento). Durante o afastamento, a ponta pode aderir à superfície da amostra devido a interações não específicas (forças de capilaridade, forças eletrostáticas) ou

⁴⁴ Cappella, B. & Dietler, G. (1999) “Force-distance curves by atomic force microscopy.” - Surf. Sci. Reports, 34, 1-104.

devido a interações específicas entre moléculas complementares na ponta e na superfície da amostra, como por exemplo em um par receptor-ligante (D). Ponta e amostra são separadas quando quebram-se tais ligações e o cantilever volta ao seu estado inicial. Durante o ciclo de medida de força, a deflexão do cantilever é monitorada por um laser sendo refletido do cantilever para um fotodetector de quadrante.

Medidas de força são tipicamente obtidas a partir de gráficos do sinal de deflexão do cantilever (A ou V) versus distância do movimento do cantilever (m). O sinal de deflexão do cantilever pode ser convertido na força sentida pela ponta da seguinte forma: inicialmente este é convertido para a distância de deflexão (m) utilizando o coeficiente angular da região de contato da curva de força (A/m ou V/m. A lei de Hook ($F = -kd$) é então utilizada para converter a distância de deflexão para força (N), onde d é a distância pela qual o cantilever é defletido a partir da sua posição de repouso, e k é a constante de mola do cantilever determinada empiricamente.

3.4 Calibração

Foi estabelecido que para medidas exatas na escala de piconewtons é essencial experimentalmente calibrar a constante de mola do cantilever. As constantes de mola dos cantilevers disponíveis comercialmente variam de 0.01 – 1.0 N/m. Entretanto, as constantes de mola dadas pelo fabricante podem variar significativamente das obtidas experimentalmente⁴⁵, acentuando a necessidade de uma calibração precisa. Os métodos experimentais disponíveis incluem a medida da variação na frequência de ressonância devido a adição de massas

⁴⁵ Cleveland, J. P., Manne, S., Bocek, D. & Hansma, P. K. (1993) "A non-destructive method for determining the spring constant of cantilevers for surface force microscopy." - Rev. Sci. Instrum., 64, 403-405.

conhecidas (tipicamente esferas de tungstênio, 10^{-12} Kg) à extremidade do cantilever⁴⁶, a medida da deflexão do cantilever quando pressionado contra um outro cantilever com constante de mola conhecida⁴⁷, ou alternativamente a medida do espectro de excitação térmico do cantilever⁴⁸. Florin *et al.*, (1995)⁴⁹ experimentalmente revisaram os métodos acima expostos e concluíram que o método de excitação térmico era o método mais preciso para cantilever com k pequenas, que são comumente utilizados em experimentos biológicos. Nesta técnica de excitação térmica, a ponta é mantida longe da amostra de modo que o movimento experimentado por ela é devido puramente a flutuações térmicas. Através da utilização do teorema da equipartição da energia é possível determinar a constante de mola, k, a partir da medida do deslocamento quadrático médio do cantilever:

$$k = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle^{1/2}}$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura (K) e $\langle x^2 \rangle$ é o deslocamento quadrático médio do oscilador⁴⁸.

3.5 Parâmetros Fundamentais dos Cantilevers

O objetivo de qualquer sensor é medir sinais de interesse na presença de ruído, e fazer isso em uma escala de tempo compatível com o sinal. Além disso, o sensor não pode ser intrusivo demais afetando o sinal ou mudando as condições ambientes. Uma grande resposta a um pequeno

⁴⁶ Cappella, B. & Dietler, G. (1999) “*Force-distance curves by atomic force microscopy.*” - Surf. Sci. Reports, 34, 1-104.

⁴⁷ Butt, H.-J., Siedle, K., Siefert, K., Fendler, K., Seeger, T., Bamberg, E., Wiesenhorn, A. L., Goldie, K. & Engel, A. (1993) “*Scan speed limit in atomic force microscopy*” - J. Microscopy, 69, 75-84.

⁴⁸ Hutter, J. L. & Bechhoefer, J. (1993) “*Calibration of atomic-force microscope tips.*” - Rev. Sci. Instrum., 64, 1868-1873.

⁴⁹ Florin, E. L., Rief, M., Lehmann, H., Ludwig, M., Dornmair, C., Moy, V. T. & Gaub, H. E. (1995) “*Sensing specific molecular-interactions with the atomic-force microscope.*” - Biosens. Bioelectron., 10, 895-901.

sinal é claramente desejada e é medida como *sensibilidade*. Uma saída sem um sinal de entrada é o *ruído*. *Resolução* é definida como o ruído dividido pela sensibilidade, e é uma medida do menor sinal que se pode resolver. Deve portanto ser tão pequeno quanto possível. A janela de frequência que pode ser medida é a *largura de banda*, e está relacionada à velocidade do sensor, bem como à taxa de amostragem e duração total da medida. Finalmente para um cantilever de AFM, a *constante de mola* do cantilever determinará como ele interage com o ambiente. Estes termos importantes serão explicados em mais detalhes a seguir:

3.5.1 Sensibilidade

Para transdutores que convertem um sinal de entrada em um sinal elétrico, a sensibilidade determina quão grande o sinal de voltagem de saída é dada uma entrada particular. Para um sensor de força, é portanto usualmente expressa em unidades de Volts por Newton [V/N], e para sensores de deslocamento em Volts por metro [V/m]. Em um piezoresistor, uma mudança na resistência é geralmente convertida em uma voltagem utilizando-se uma Ponte de Wheatstone seguida por um amplificador de instrumentação, como mostrado na figura abaixo:

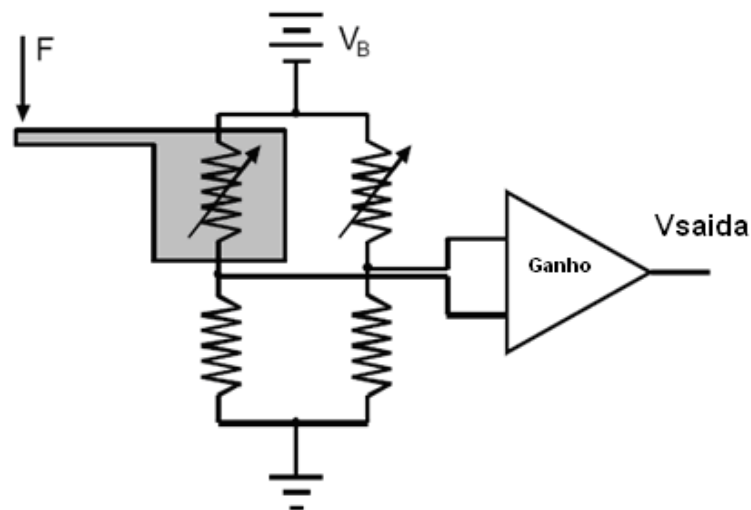


Figura 3.4 Cantilever piezoresistivo em um circuito de uma ponte de Wheatstone. O piezoresistor é metade de um divisor de tensão, de modo que quando há uma variação de resistência, a voltagem de saída varia. A outra metade da ponte é outro divisor de tensão, balanceado com um resistor variável para anular o sinal de saída quando não há deflexão do cantilever. Um amplificador de instrumentação fornece ganho.

É evidente da figura que a sensibilidade pode ser feita arbitrariamente grande variando-se o ganho do amplificador de instrumentação. Por esta razão, a sensibilidade por si só contém pouca informação. A sensibilidade é portanto algumas vezes expressa como uma variação fracional por sinal, tal como $\Delta R/R$ por Newton [N^{-1}] para a variação de resistência de um sensor de força piezoresistivo. Este tipo de sensibilidade é frequentemente dado em partes por milhão, onde $10^{-6} N^{-1}$ é equivalente a 1 ppm/N. Enquanto sensibilidade pode ser uma métrica útil, o parâmetro real de interesse na maioria das aplicações é a resolução. Para determinar a resolução o ruído deve ser conhecido.

3.5.2 Largura de Banda

A janela de frequências que é medida é conhecida como largura de banda da medida. O limite superior pode ser selecionado através de filtros eletrônicos, ou pode ser especificado pela taxa de amostragem da medida, pela largura de banda do amplificador, pela frequência de ressonância do cantilever, ou perdas capacitivas nos fios utilizados no experimento, entre outras possibilidades. O limite inferior de frequência da largura de banda é geralmente selecionado em função da duração da medida, ou novamente por filtros eletrônicos. Para uma medida que dura apenas um segundo, um sinal de 1MHz parece imutável. A resposta mecânica do cantilever é atenuada acima da ressonância, de modo que a máxima largura de banda da medida para um cantilever é geralmente dada pela sua frequência de ressonância. A escolha da largura de banda determina a fonte de ruído dominante. Se sinais de frequência baixa são de interesse primário, ruídos de alta frequência podem ser eliminados através do condicionamento de sinais adequado, para a filtragem de ruído de altas frequências.

3.5.3 Ruído

Para o circuito na Figura 3.4, ruído é qualquer tensão $V_{saída}$ que esteja presente quando não exista força aplicada ao cantilever. Uma simples medida do ruído é tomar o quadrado do valor $V_{saída}$, fazer uma média no tempo, e tomar a raiz quadrada. Se este valor rms fosse por exemplo de 1mV, então este valor seria considerado o limite inferior de sinal que pode ser medido com aquele circuito. É geralmente interessante, entretanto, considerar a distribuição de freqüências do ruído, obtida via transformada de Fourier do sinal de saída quando a entrada é zero. Se existe ruído em freqüências que não são de interesse para a medida, estes podem ser filtrados eletronicamente, efetivamente aumentando a relação sinal-ruído. Exemplos de formas de onda simuladas em computador são mostradas a seguir:

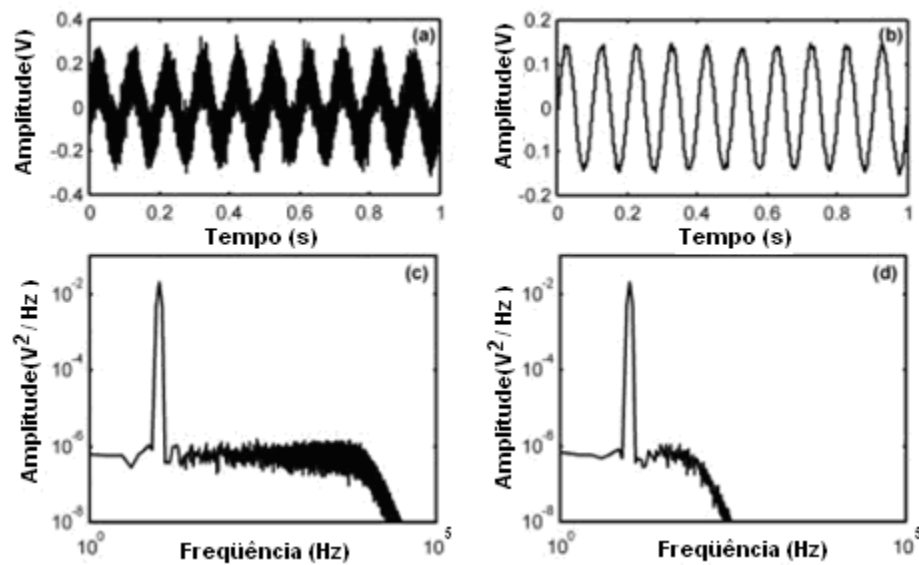


Figura 3.5 Sinais simulados no Matlab na presença de ruído branco. **a)** mostra um sinal senoidal na freqüência de 10Hz, 100mV rms e largura de banda de medida de 10Khz. **b)** mostra a mesma forma de onda depois de aplicado um filtro passa baixa com freqüência de corte em 100Hz. **c)** e **d)** mostram a densidade espectral de potência das formas de onda (PSD).

Porque o ruído total depende da largura de banda da medida, a densidade espectral de potência (PSD) [V^2/Hz] é geralmente avaliada. A PSD é uma medida da potência do sinal em uma banda de frequência de 1 Hz. Embora V^2 não seja unidade de potência [W], é assumido ser a potência dissipada em um resistor de 1 Ω . Para conseguir a potência total de duas ondas senoidais não coerentes, as amplitudes quadradas devem ser somadas. Ao somar a PSD sobre todas as frequências na largura de banda, o ruído total pode ser computado. Como um exemplo, o ruído branco na Figura 3.5 tem PSD de $6 \cdot 10^{-7} V^2/Hz$, de modo que o ruído em largura de banda de 100 kHz tem um potência total de ruído de $(6 \cdot 10^{-7} V^2/Hz) (10^5 Hz) = 0.06 V^2$ ou 240mV. Já o ruído em uma largura de banda de 100 Hz é de $(6 \cdot 10^{-7} V^2/Hz) (10^2 Hz) = 0.00006 V^2$ ou 8 mV. Além de simplesmente filtrar uma forma de onda para remover ruídos, é muitas vezes necessário a utilização de um amplificador lock-in. Um amplificador lock-in multiplica o sinal de entrada por uma onda senoidal de referência. Considere uma componente senoidal do sinal (após uma decomposição de Fourier) com amplitude A_1 em uma frequência ω_1 . Se o sinal de referência do lock-in tivesse amplitude unitária e frequência ω_0 , então o sinal de saída seria dado

$$A_1 \sin(\omega_1 t) \sin(\omega_0 t) = \frac{A_1}{2} \sin[(\omega_0 - \omega_1)t] + \frac{A_1}{2} \sin[(\omega_0 + \omega_1)t] \quad 3.1$$

Metade da potência das componentes de frequência do sinal próximas a ω_0 serão deslocadas para DC, e a outra metade para $2\omega_0$. Os componentes DC podem então ser filtradas com um filtro passa baixa de largura de banda B . Isto é equivalente a ter um filtro passa banda de largura de banda $\pm B$ centrado na frequência ω_0 .

Esta técnica também é utilizada nos amp-ops modulados ou “chopped” para contornar o problema dos ruídos de baixa frequência ($1/f$). No entanto, modular um sinal para remover ruído é possível apenas se a frequência do sinal puder ser alterada antes da introdução do ruído. Como

um exemplo, o ruído devido à deriva térmica da resistência de um piezoresistor não pode ser removido por modulação, pois o ruído da deriva é introduzido no mesmo ponto e ao mesmo tempo em que o sinal, e os dois não podem ser separados.

3.5.4 Resolução

A resolução do sensor determina a mínima força ou deslocamento que pode ser medido. Resolução é definida como o ruído dividido pela sensibilidade. A quantidade total de ruído é dependente da largura de banda da medida. Assim, resolução deve ser dada como a mínima força ou deslocamento detectável em uma dada largura de banda. Ela é frequentemente dada em unidades de N/ Hz ou m/ Hz para medidas em uma largura de banda de 1Hz. Se o ruído é constante em função da frequência, tal medida é suficiente para computar a resolução em qualquer largura de banda. Se o nível de ruído varia irregularmente com a frequência, então a resolução deve ser dada para a largura de banda relevante, como 10pN em uma largura de banda de 10 Hz a 1 kHz.

3.5.5 Constante de mola

A constante de mola, k [N/m], de um cantilever também é crítica para desempenho do sensor. Quanto maior a constante de mola de um cantilever melhor sua sensibilidade para deslocamento, e quanto menor melhor sua sensibilidade para força.

Capítulo 4. Calibração da pinça com AFM

Este capítulo trata dos itens fundamentais para detecção e calibração da deflexão do feixe laser refletido do cantilever. A Figura 4.1 ilustra a configuração proposta para a calibração da força óptica utilizando um cantilever de AFM.

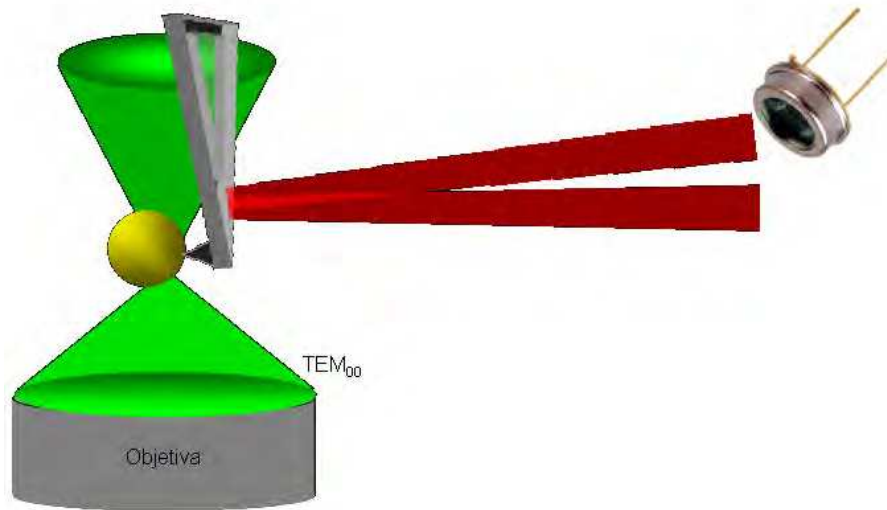


Figura 4.1 Calibração da força óptica com cantilever de AFM. O feixe laser é focado no cantilever em contato com a esfera aprisionada pela força óptica e refletido para o fotodetector bi-célula. À medida que o cantilever é deslocado em direção a esfera aprisionada pela luz, desloca a mesma da sua posição de equilíbrio.

Para tanto, precisá-va-se inicialmente de uma curva de calibração para o cantilever, ou seja, do sinal obtido pelo fotodetector, $V(x)$ em função do deslocamento horizontal sofrido pela extremidade do cantilever, x . Convertendo então esta curva para $V(F)$ através da relação $F=kx$, a força óptica seria calibrada utilizando um sistema de imagem. A primeira tarefa foi focar o feixe laser na região maciça do cantilever que tem da ordem de $20\mu\text{m}^2$.

4.1 Focalização do Feixe Laser no Cantilever

A figura abaixo mostra a montagem experimental utilizada para o estudo das diversas partes do sistema de detecção óptica da deflexão do cantilever:

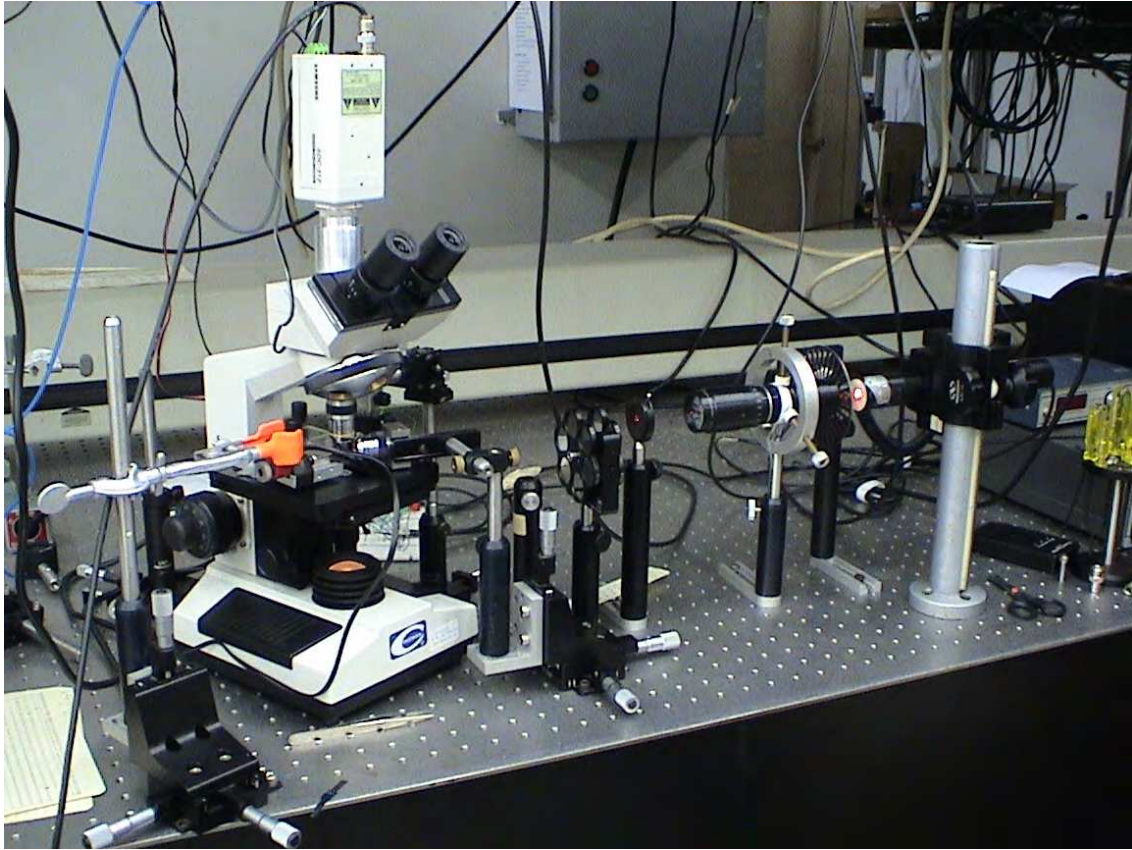


Figura 4.2 Montagem experimental utilizada para o estudo do sistema de detecção óptica da deflexão do cantilever. Da direita para a esquerda: Laser, chopper, beam expander, pinhole, filtros de atenuação, suporte da objetiva e microscópio convencional.

As figuras abaixo mostram a geometria, as dimensões e as propriedades mecânicas dos cantilevers utilizados:

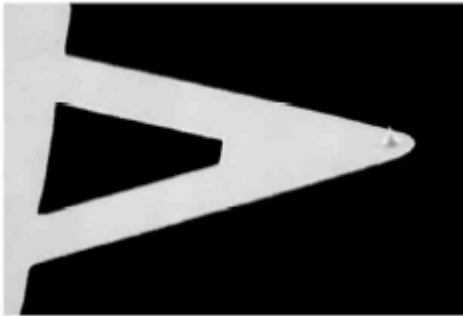


Figura 4.3 Cantilever de AFM

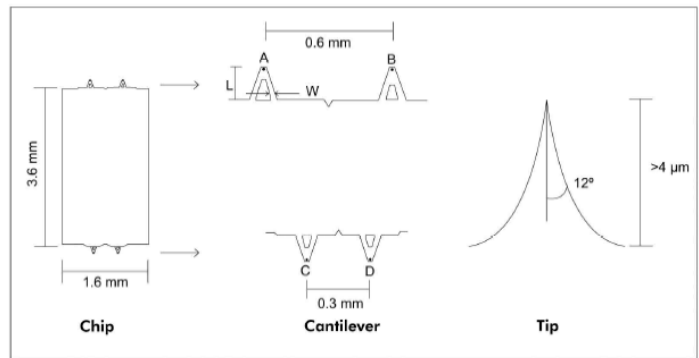


Figura 4.4 Dimensões do chip, dos cantilevers e do tip

Cantilever type	A	B	C	D
Standard mode of operation	Contact			
Cantilever length	180 μm	180 μm	85 μm	85 μm
Cantilever width	25 μm	38 μm	18 μm	28 μm
Cantilever thickness	1 μm	1 μm	1 μm	1 μm
Force Constant	0.26 N/m	0.40 N/m	1.6 N/m	2.1 N/m
Resonant Frequency	40 kHz	45 kHz	140 kHz	160 kHz

Figura 4.5 Propriedades mecânicas e dimensões típicas de cantilevers de AFM comerciais para o modo de contato.

Como utilizamos um laser de HeNe, cujo modo TEM_{00} é um feixe gaussiano, foi necessário um estudo sobre a óptica dos feixes gaussianos para que pudéssemos focá-lo na região do cantilever específica para este fim.

4.1.1 O Feixe Gaussiano

Ondas cujas normais às suas frentes de onda são raios paraxiais são chamadas *ondas paraxiais*. Uma maneira de construir uma onda paraxial é começar com uma onda plana $A \exp(ikz)$, considerá-la como uma onda portadora e modificar seu envelope constante A , fazendo-o variar lentamente com a posição na direção z , de modo que a amplitude da onda seja dada por:

$$U(\vec{r}) = A(\vec{r}) \exp(-ikz) \quad 4.1$$

e com a restrição de que $\Delta A \ll A$ dentro da distância de um comprimento de onda $\lambda = \frac{2\pi}{k}$.

Assim :

$$\frac{\partial A(\vec{r})}{\partial z} \lambda \ll A \Rightarrow \frac{\partial A(\vec{r})}{\partial z} \ll kA \Rightarrow \frac{\partial^2 A(\vec{r})}{\partial z^2} \ll k \frac{\partial A(\vec{r})}{\partial z}$$

Para que esta onda satisfaça a equação de Helmholtz, A deve satisfazer a seguinte equação:

$\nabla^2 U + k^2 U = 0 \Rightarrow \nabla_T^2 A - i2k \frac{\partial A}{\partial z} + \frac{\partial^2 A}{\partial z^2} = 0$, onde $\nabla_T^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2}$ é o operador Laplaciano

transversal. Levando em conta a restrição de onda paraxial, o último termo desta equação pode ser desprezado se comparado ao segundo termo, restando então:

$$\nabla_T^2 A - i2k \frac{\partial A}{\partial z} = 0 \quad 4.2$$

Esta é a equação de Helmholtz paraxial. A solução mais simples desta equação resulta em uma onda paraboloidal para $U(r)$, que é a aproximação paraxial da onda esférica:

$$\frac{A_1 \exp[-ikr]}{r} \approx \exp[-ikz] \underbrace{\frac{A_1 \exp[-ik \frac{x^2 + y^2}{2z}]}{2z}}_{A(\vec{r})}, \text{ se } x^2 + y^2 \ll z^2$$

Uma outra solução da equação paraxial de Helmholtz fornece o feixe Gaussiano. É obtida a partir do envelope da onda paraboloidal por uma simples transformação, $z \rightarrow z + iz_0$ (z_0 é conhecido como parâmetro *Rayleigh*):

$$A(\vec{r}) = \frac{A_1 \exp[-ik \frac{x^2 + y^2}{2(z + iz_0)}]}{z + iz_0} \quad 4.3$$

Para separar a amplitude e a fase deste envelope complexo, escrevemos a função $\frac{1}{z + iz_0}$

em termos de sua parte real e parte imaginária e definimos duas novas funções reais, $R(z)$ e $W(z)$ tais que:

$$\frac{1}{z + iz_0} = \frac{z}{z^2 + z_0^2} - i \frac{z_0}{z^2 + z_0^2} = \frac{1}{R(z)} - i \frac{\lambda}{\pi W^2(z)}$$

$$\Rightarrow R(z) = z \left[1 + \left(\frac{z_0}{z} \right)^2 \right] \text{ e } W(z) = W_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}, W_0 = \left(\frac{\lambda z_0}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad 4.4$$

A amplitude complexa do feixe gaussiano é dada em termos destas novas variáveis por:

$$U(\vec{r}) = A(\vec{r}) \exp(-ikz) = \frac{A_1 \exp\left[-ik \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{R(z)} - i \frac{\lambda}{\pi W^2(z)}\right)\right]}{z + iz_0} \exp(-ikz)$$

$$= \frac{A_1 \exp\left[-ik \frac{\rho^2}{2} \left(\frac{1}{R(z)} - i \frac{\lambda}{\pi W^2(z)}\right)\right]}{z + iz_0} \exp(-ikz) \text{ que ainda pode ser manipulada para:}$$

$$U(r) = A_0 \frac{W_0}{W(z)} \exp\left[-\frac{\rho^2}{W^2(z)}\right] \exp\left[-i(kz - \zeta(z)) - ik \frac{\rho^2}{2R(z)}\right] \quad 4.5$$

onde $A_0 = \frac{A_1}{iz_0}$ e $\zeta(z) = \tan^{-1} \frac{z}{z_0}$

A seguir algumas propriedades importantes do feixe gaussiano:

4.1.1.1 Intensidade

A intensidade de um feixe gaussiano é dada por:

$$I(\vec{r}) = |U(\vec{r})|^2 \Rightarrow I(\rho, z) = I_0 \left[\frac{W_0}{W(z)}\right]^2 \exp\left[-\frac{2\rho^2}{W^2(z)}\right] \quad 4.6$$

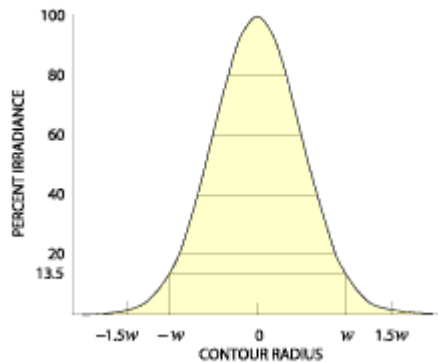


Figura 4.6 Perfil de intensidade de um feixe gaussiano para um dado z .

4.1.1.2 Raio do Feixe

Em qualquer plano transverso, a intensidade assume seu valor de pico no eixo do feixe, e cai por um fator de $1/e^2$ na distância radial $\rho = W(z)$. Como 86% da potência do feixe está concentrada dentro de um círculo de raio $W(z)$, este é considerado o raio do feixe. A dependência em z do raio do feixe é dada por:

$$W(z) = W_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}, W_0 = \left(\frac{\lambda z_0}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad 4.7$$

Este assume seu valor mínimo W_0 no plano $z=0$, chamado *beam waist*. O diâmetro do *waist*, $2W_0$ é chamado *spot size*. Para $z \gg z_0$:

$$W(z) \approx W_0 \left(\frac{z}{z_0} \right) = \theta_0 z \quad 4.8$$

onde $\theta_0 = \frac{\lambda}{\pi W_0}$

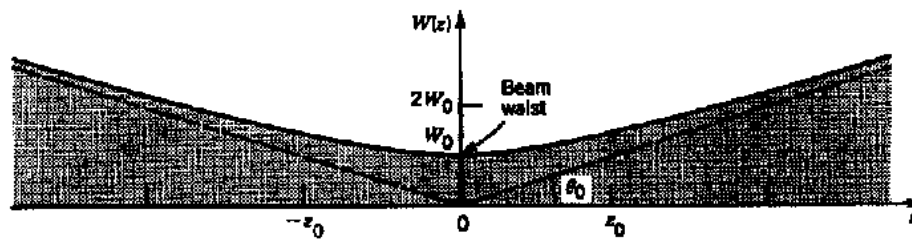


Figura 4.7 O raio do feixe $W(z)$ tem o seu valor mínimo W_0 em $z = 0$, alcança $\sqrt{2}W_0$ em $z = \pm z_0$ e aumenta linearmente a medida em que z aumenta.

4.1.1.3 Profundidade de Foco

A distância axial dentro da qual o raio do feixe é menor ou igual a $\sqrt{2}W_0$ é conhecido como profundidade de foco ou parâmetro confocal. Pode ser visto da equação para o raio do feixe que o parâmetro confocal é duas vezes o alcance Rayleigh, $2z_0$, e da equação para W_0 obtemos:

$$2z_0 = \frac{2\pi W_0^2}{\lambda}$$

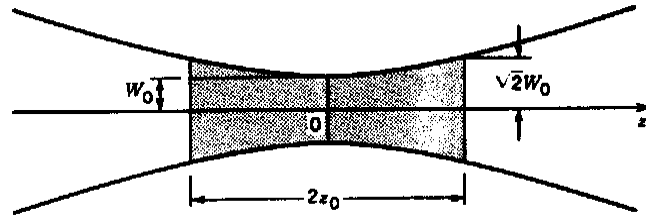


Figura 4.8 A profundidade do foco de um feixe gaussiano

4.1.1.4 Transmissão através de uma lente

A fase introduzida em um feixe que passa por uma lente de distância focal f é dada por:

$$\exp(i \frac{k\rho^2}{2f}) \quad 4.9$$

Assim a fase do feixe gaussiano que chega a uma lente com largura W e raio de curvatura R , após passar pela lente é alterada para:

$$kz + k \frac{\rho^2}{2R} - \zeta - k \frac{\rho^2}{2f} = kz + k \frac{\rho^2}{2R'} - \zeta, \text{ onde } \frac{1}{R'} = \frac{1}{R} - \frac{1}{f} \quad 4.10$$

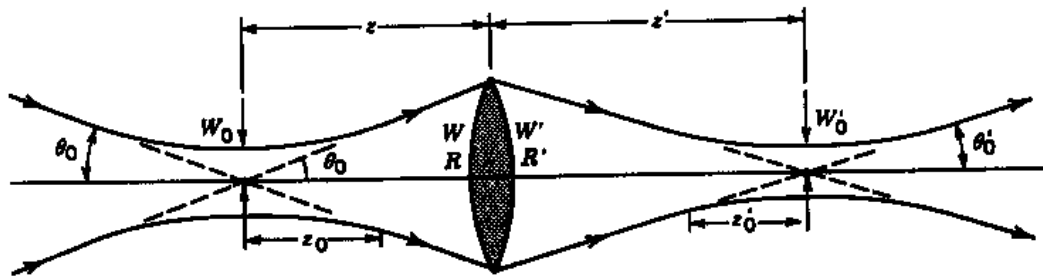


Figura 4.9 Transmissão de um feixe gaussiano através de uma lente fina

Concluimos que a onda transmitida é ainda um feixe gaussiano com largura $W'=W$ a raio de curvatura R' , onde R' satisfaz a equação $\frac{1}{R} - \frac{1}{R'} = \frac{1}{f}$. Além disso, como os parâmetros de um

feixe gaussiano podem ser determinados a partir de sua largura e de sua curvatura em um determinado ponto, obtemos o novo raio mínimo W_0' e a nova posição do waist :

$$W_0' = \frac{W}{\left[1 + (\pi W^2 / \lambda R')^2\right]^{1/2}} \quad \text{e} \quad -z' = \frac{R'}{1 + (\lambda R' / \pi W^2)^2} \quad 4.11$$

Substituindo agora $R(z) = z \left[1 + \left(\frac{z_0}{z}\right)^2\right]$ e $W(z) = W_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2\right]^{1/2}$ nas três equações acima, as

seguintes expressões que relacionam os parâmetros dos dois feixes são obtidas:

Raio do waist

$$W_0' = MW_0$$

Localização do waist

$$(z' - f) = M^2(z - f)$$

Profundidade de Foco

$$2z_0' = M^2(2z_0)$$

Magnificação

$$M = \frac{M_r}{(1 + r^2)^{1/2}}, \quad M_r = \left| \frac{f}{z - f} \right|, \quad r = \frac{z_0}{z - f}$$

Se uma lente é colocada no waist de um feixe gaussiano, como mostra a figura abaixo, os parâmetros do novo feixe gaussiano são obtidos substituindo-se $z=0$ nas equações acima:

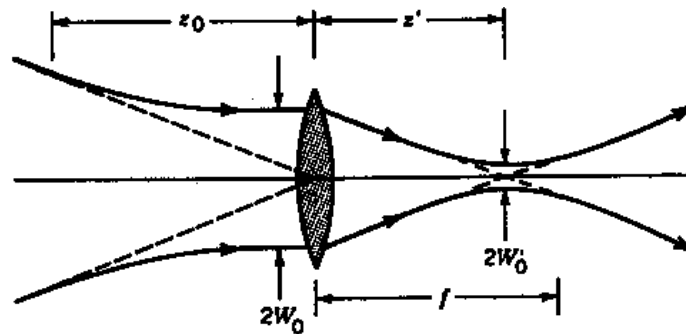


Figura 4.10 Focando um feixe com waist na lente

$$W_0' = \frac{W_0}{\left[1 + (z_0/f)^2\right]^{1/2}} \quad \text{e} \quad z' = \frac{f}{1 + \left(\frac{f}{z_0}\right)^2}$$

Quando o parâmetro de Rayleigh z_0 é muito maior que a distancia focal da lente, como mostra a Figura 4.11, podemos aproximar as expressões acima por:

$$W_0' = \frac{W_0}{\left[1 + (z_0/f)^2\right]^{1/2}} \quad \text{e} \quad z' = \frac{f}{1 + \left(\frac{f}{z_0}\right)^2} \quad 4.12$$

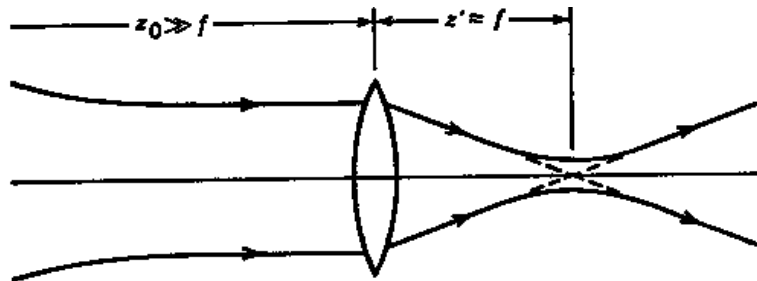


Figura 4.11 Focando um feixe colimado.

Estas foram as expressões que utilizamos para o cálculo do spot size, já que o parâmetro confocal do laser utilizado é da ordem de 1 metro, enquanto a distância focal da lente utilizada é da ordem de 10 cm.

Devido às correções para as aberrações esféricas preferimos utilizar uma objetiva de microscópio, com aumento de 4x, para focalizar o feixe laser. Para estimarmos a distância focal, utilizamos o fato de que eram objetivas projetadas para um tubo de microscópio com comprimento de 160mm. Com a ajuda das figuras abaixo obtemos:

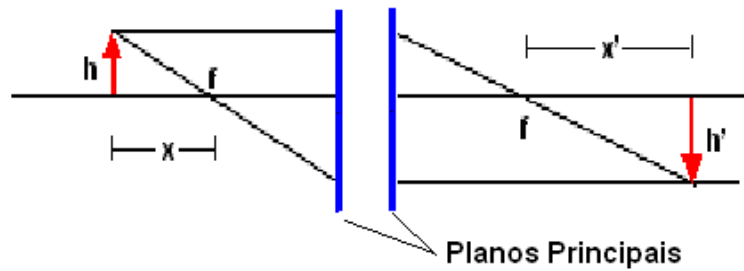


Figura 4.12 Esquema de uma objetiva de microscópio.

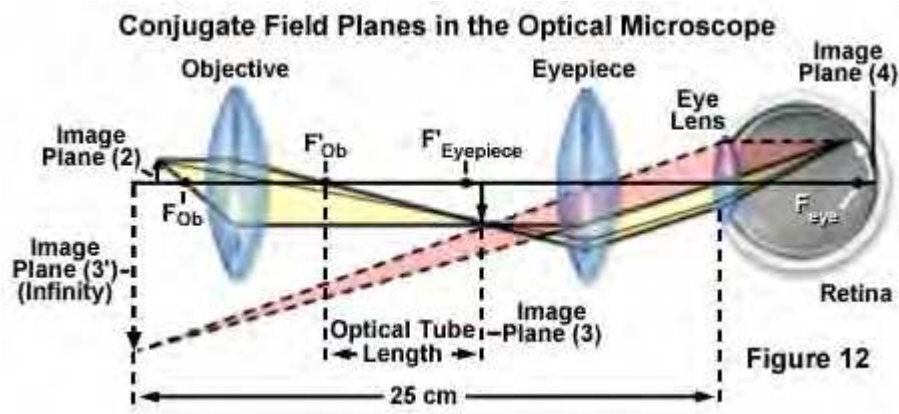


Figura 4.13 Planos conjugados em um microscópio óptico

Da Figura 4.12 por semelhança de triângulos temos:

$$\frac{x'}{h'} = \frac{f}{h} \Rightarrow f = \frac{x'}{m}, \text{ onde } m = \frac{h'}{h}$$

E da Figura 4.13 temos que o comprimento do tubo é igual a x' . Então, como neste caso $x' = 160\text{mm}$ e $m = 4$, $f = 40\text{mm}$. Utilizando a equação 4.12 obtemos o tamanho do spot size. O diâmetro inicial do feixe utilizado é de $2w = 0.8\text{mm}$. Assim encontramos para o raio do waist do novo feixe:

$$w_0 = \frac{\lambda f}{\pi w} = \frac{632,8\text{nm} \cdot 40\text{mm}}{\pi \cdot 0.4\text{mm}} \approx 20\mu\text{m} \Rightarrow 2w_0 \approx 40\mu\text{m}$$

Este valor de spot size ainda era grande comparado as dimensões do cantilever utilizado, com largura dos braços de $18\mu m$. Assim foi necessário expandir o feixe. Utilizamos um beam expander com aumento de 10x para tanto:

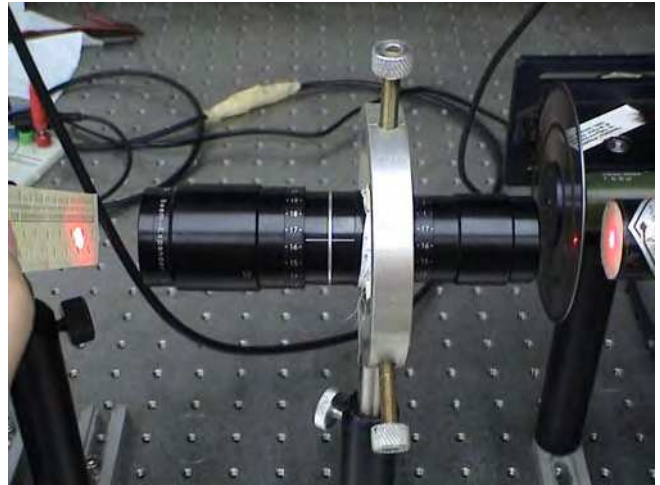
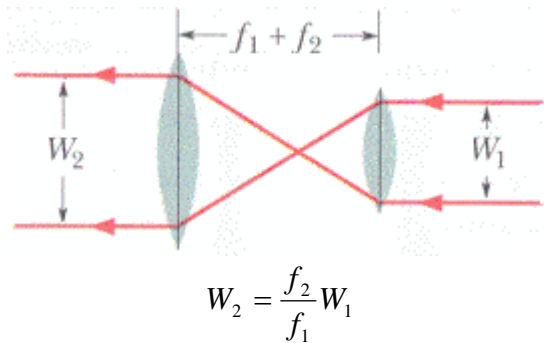


Figura 4.14. Esquema ilustrando um beam expander **Figura 4.15** Beam Expander de 10x utilizado

Com a expansão do feixe obtivemos um spot size 10 vezes menor, aproximadamente de $4\mu m$ de diâmetro, compatível com as dimensões do cantilever utilizado.

A seguir imagens feitas por um microscópio convencional durante a focalização do feixe laser no cantilever.



Figura 4.16 Cantilever visto lateralmente na tela da TV após aumento de 100x do microscópio



Figura 4.17 Visualização do feixe laser sendo focado no cantilever

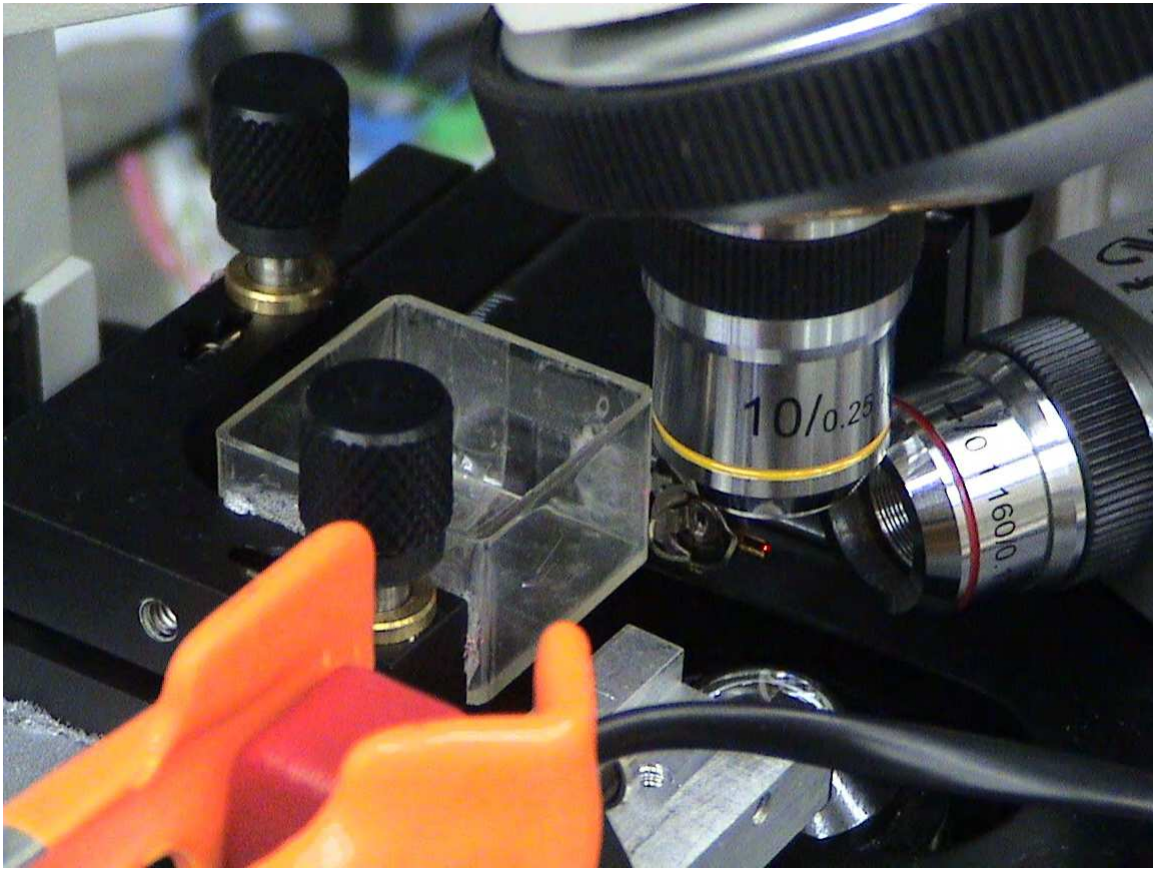


Figura 4.18 Detalhe da focalização do feixe laser pela objetiva(da horizontal) no cantilever

4.2 Deflexão do Cantilever — Picomotor

Precisávamos defletir o cantilever com precisão de nanômetros. Utilizamos um picomotor (Newfocus) controlado por computador e com resolução melhor que 30 nm. Foi construído um software em LabView para o controle e para a calibração deste pico motor.



Figura 4.19 Picomotor, controlado por computador, utilizado para defletir o cantilever

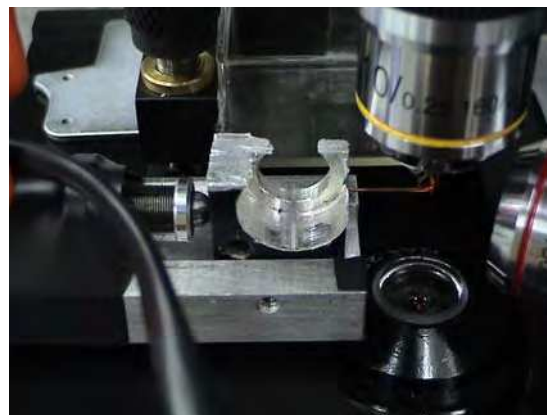
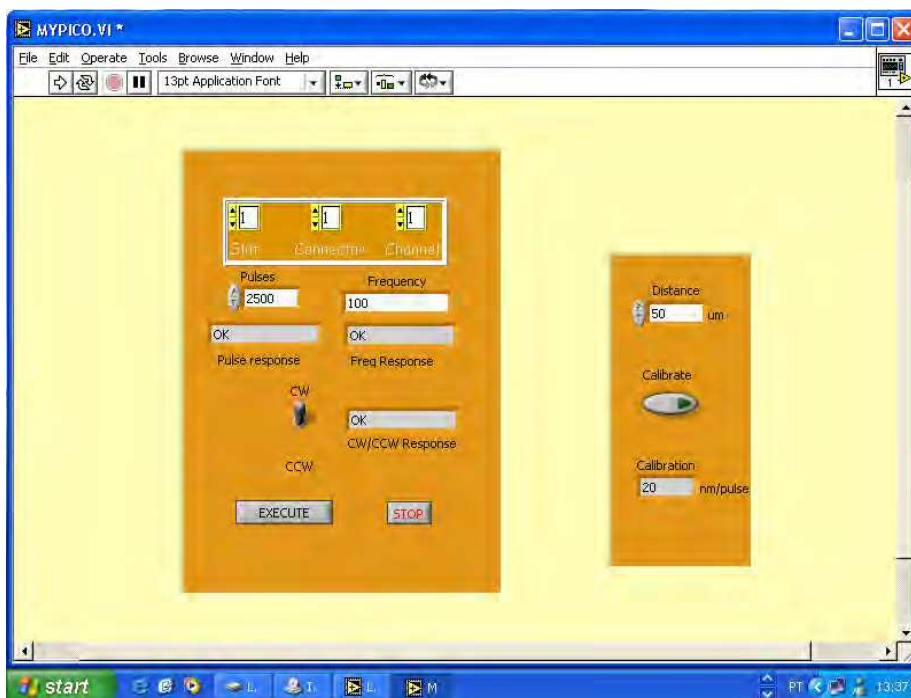


Figura 4.20 Peça construída para isolar o movimento translacional do movimento rotacional do picomotor.

Abaixo a imagem vista no monitor do computador do painel de controle do VI (Virtual Instrument) construído em LabView para o controle e a calibração do picomotor:



4.2.1 Calibração do picomotor

A Calibração do picomotor foi feita da seguinte maneira: Com a ajuda de uma câmara de *Neubauer*, de um microscópio e uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio, calibramos na tela de uma TV a distância de $50\mu\text{m}$. Após, colocamos um corante na superfície interna de uma cubeta de acrílico e focalizamos uma das partículas deste corante para que servisse de referência

na tela da TV quando a cubeta fosse empurrada pelo picomotor. Este foi controlado via software, que manda uma determinada quantidade de pulsos a uma determinada frequência para o picomotor. Então, após um determinado número de pulsos que permitia uma destas partículas cruzar completamente a distância calibrada na tela da TV, obtivemos uma calibração do deslocamento do picomotor para cada pulso de tensão recebido de $20 \pm 2nm / pulso$.

4.2.2 Calibração do cantilever com o picomotor

A Figura 4.21 mostra a configuração utilizada na calibração do sinal da fotodetector com a utilização do picomotor.

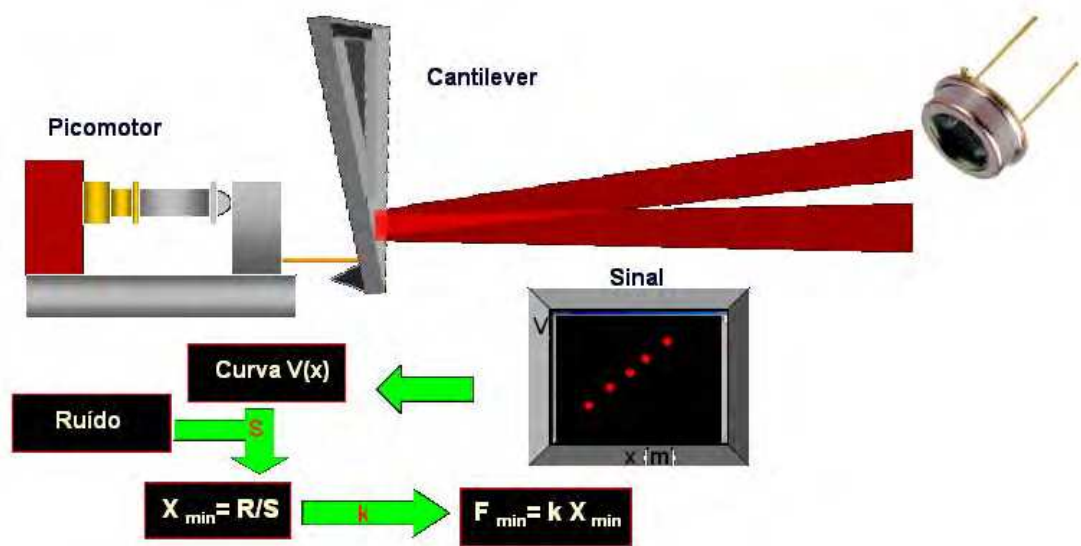


Figura 4.21 Esquema da calibração da deflexão do cantilever com o picomotor

O cantilever foi colocado em um suporte com ajustes x, y e z sobre o microscópio e em contato com o picomotor. Este então empurrava o cantilever com pulsos controlados enquanto o fotodetector registrava o sinal $V(x)$. A partir desta curva obtêm-se a sensibilidade S do sensor que, juntamente com o ruído do sistema possibilitava a determinação da mínima deflexão

detectável, x_{\min} (MDD). Com este parâmetro determina-se a mínima força detectável ou a resolução de força do sistema, F_{\min} .

4.3 Fotodetector “Bi-Cell”

A seguir as principais características do fotodetector utilizado nos experimentos ornecido pelo fabricante⁵⁰.

4.3.1 Princípio de funcionamento

O Silício é um semicondutor com um gap de energia de 1.12 eV a temperatura ambiente. Este é o gap entre a banda de valência e a banda de condução. Os elétrons podem saltar para a banda de condução por colisões com partículas ou fótons com energias maiores que 1.12eV, que correspondem a comprimentos de onda menores que 1100 nm. Os elétrons resultantes na banda de condução são livres para conduzir corrente elétrica.

Devido ao gradiente de concentração, a difusão dos elétrons da região tipo N para a região tipo P e a difusão de buracos da região tipo P para a região tipo N, geram um voltagem interna através da junção. A inter-difusão de elétrons e buracos entre as regiões N e P através da junção resulta em uma região ausente de portadores que é chamada região de depleção. Qualquer polarização reversa aplicada se soma a voltagem inerna e alarga esta região. Os pares electron-buraco gerados pela luz são varridos para fora da região de depleção por deriva e são coletados por difusão da região não depletada. A corrente gerada é proporcional potência da radiação incidente. A luz é absorvida exponencialmente com a distância e é proporcional ao coeficiente de absorção. O coeficinete de absorção é muito alto para comprimrntos de onda curtos na região do

⁵⁰ “Photodiode Characteristics and Applications”- UDT Sensor, Inc. – www.udt.com

UV e é pequeno para grandes comprimentos de onda. Daí, fótons na região do UV são absorvidos em uma fina camada da superfície mais externa, enquanto o silício se torna transparente para comprimentos de onda maiores que 1200nm. Além disso, fótons com energia menores que o band gap do silício não são absorvido de maneira alguma.

As figuras abaixo ilustram detalhes do fotodetector utilizado:

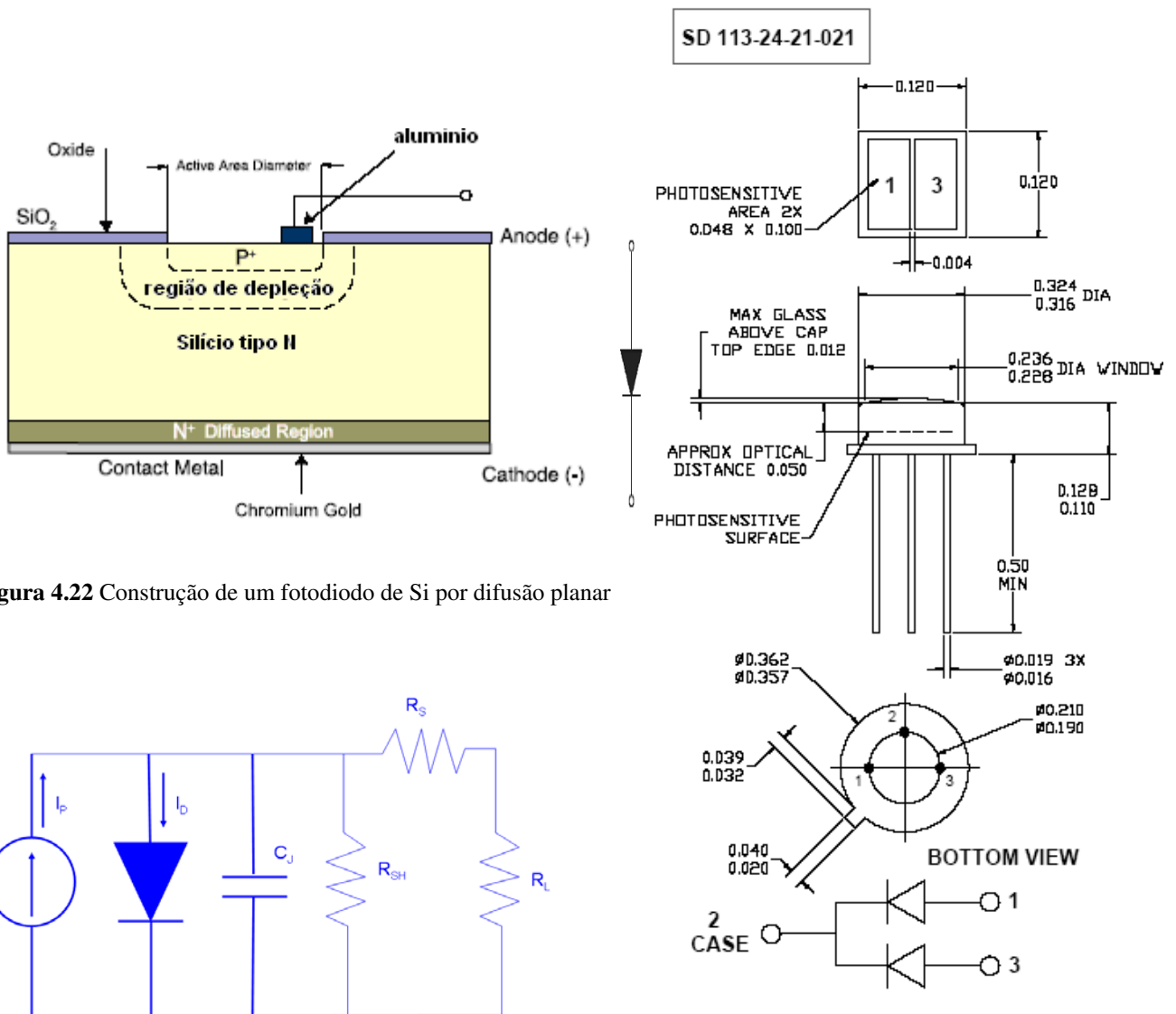


Figura 4.22 Construção de um fotodiodo de Si por difusão planar

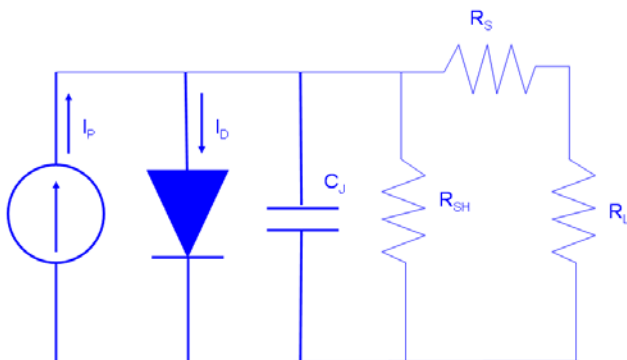


Figura 4.23 Circuito equivalente de um fotodiodo. R_{SH} é a resistência de shunt, R_L é a carga vista pelo fotodiodo, C_J é a capacitância de junção e I_P é a fotocorrente e I_D é a corrente de escuro

Figura 4.24 Vista esquemática e dimensões do fotodiodo utilizado (em polegadas)

4.3.2 Resistência Shunt, R_{SH}

A Resistência Shunt é a inclinação da curva corrente-voltagem do fotodiodo na origem, i.e. $V=0$. Embora um fotodiodo ideal deva ter resistência shunt infinita, os valores reais variam de dezenas a milhares de Mega ohms. É usada na determinação da corrente de ruído do fotodiodo no modo fotovoltaico (não polarizado). Para uma melhor performance do fotodiodo uma maior resistência shunt é desejada.

4.3.3 Resistência Série, R_s

A Resistência Série de um fotodiodo vem da resistência dos contatos e da resistência do silício que não está em depleção. É dado por:

$$R_s = \frac{(W_s - W_d)\rho}{A} + R_C \quad 4.13$$

onde W_s é a espessura do substrato, W_d é a largura da região de depleção, A é a área difundida da junção, ρ é a resistividade do substrato e R_C é a resistência do contato. É usada para determinar a linearidade do fotodiodo no modo fotovoltaico ($V=0$). Embora fotodiodos ideais devam ter resistência série nula, valores típicos variam de 10 a 1000 ohms.

4.3.4 Capacitância de Junção, C_J

As fronteiras da região de depleção agem como placas de um capacitor de placas paralelas. A capacitância de junção é diretamente proporcional à área difundida e inversamente proporcional a largura da região de depleção. Além disso, substratos com maior resistividade têm menores C_J . É dependente da polarização reversa de acordo com:

$$C_j = \frac{\epsilon_{Si} \epsilon_0 A}{\sqrt{2\mu\rho(V_A + V_i)}} \quad 4.14$$

onde ϵ_0 é a permissividade do vácuo, ϵ_{Si} é a constante dielétrica do silício, μ é a mobilidade dos elétrons, ρ é a resistividade do silício, V_i é a voltagem intrínseca do silício e V_A é a voltagem aplicada. C_j é utilizada na determinação da velocidade de resposta do fotodiodo.

4.3.5 Responsividade, R_λ

A responsividade de um fotodiodo de Si é uma medida de sua sensibilidade à luz, e é definida como a razão da fotocorrente I_P com a potência da luz incidente P em um dado comprimento de onda (λ):

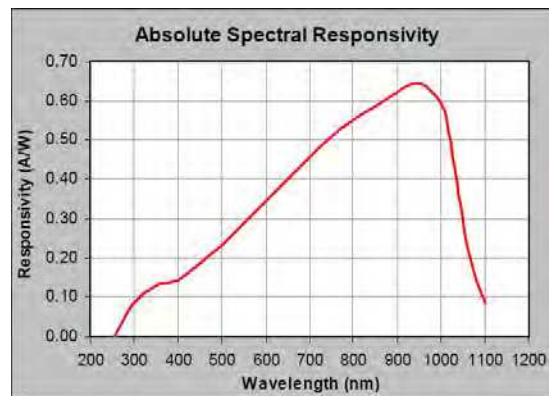


Figura 4.25 Responsividade do fotodetector utilizado (dado pelo fabricante)

$$R_\lambda = \frac{I_P}{P}$$

4.3.6 Curva Característica I-V

A curva corrente-voltagem característica de um fotodiodo sem nenhuma luz incidente é similar a de um diodo retificador. Quando o fotodiodo é diretamente polarizado, existe um aumento exponencial na corrente. Quando uma polarização reversa é aplicada, uma pequena corrente de saturação I_{SAT} aparece. Ela está relacionada com a corrente de escuro I_D por:

$$I_D = I_{SAT} \left(e^{\frac{qV_A}{k_B T}} - 1 \right)$$

onde q é a carga do elétron, V_A é a voltagem aplicada de polarização, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

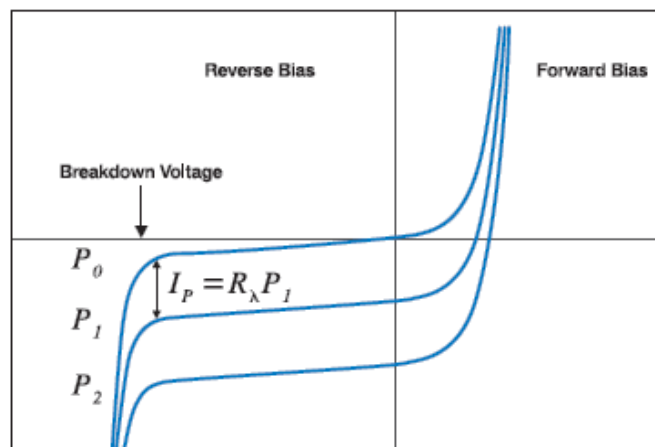


Figura 4.26 Curvas I-V características para três potências de luz incidente

Iluminando o fotodiodo com radiação óptica, desloca-se a curva I-V de uma quantidade igual a fotocorrente I_P :

$$I_{TOTAL} = I_{SAT} \left(e^{\frac{qV_A}{k_B T}} - 1 \right) - I_P$$

4.3.7 Ruídos

Em um fotodiodo, duas fontes de ruído podem ser identificadas: Shot noise e Johnson noise:

4.3.7.1 Ruído Shot

O ruído shot está relacionado a flutuações estatísticas em ambas – fotocorrente e corrente de escuro. A magnitude do ruído shot é expressa como o valor rms da corrente shot noise I_{sn} :

$$I_{sn} = \sqrt{2q(I_p + I_D)\Delta f}$$

onde q é a carga do elétron, I_p é a fotocorrente gerada, I_D é a corrente de escuro e Δf é a largura de banda de medida do ruído. Shot noise é a fonte de ruído dominante quando o modo de operação é fotocondutivo (polarizado).

4.3.7.2 Ruído Johnson ou Térmico

A resistência shunt em um fotodetector tem um ruído Johnson associado a ela. Isto se deve a geração térmica de portadores. A magnitude desta corrente de ruído gerada é dada por:

$$I_{jn} = \sqrt{\frac{4k_B T \Delta f}{R_{SH}}}$$

onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, R_{SH} é a resistência shunt do fotodiodo e Δf é a largura de banda de medida do ruído. Este tipo de ruído é o dominante no modo de operação fotovoltaico (não polarizado).

4.3.7.3 Ruído Total

A corrente total de ruído gerada em um fotodetector é dada por:

$$I_m = \sqrt{I_{sn}^2 + I_{jn}^2}$$

4.3.8 Potência Equivalente de Ruído (NEP)

Potência equivalente de ruído é a quantidade de potência de luz incidente em um fotodetector, que gera uma fotocorrente igual à corrente total de ruído I_m . NEP é definida como:

$$NEP = \frac{I_m}{R_\lambda}$$

4.3.9 Polarização

Um sinal de fotodiodo pode ser medido como voltagem ou corrente. Medidas de corrente demonstram de longe melhor linearidade, *offset*, e performance de largura de banda. A fotocorrente gerada é proporcional à potência da luz incidente e deve ser convertida para voltagem usando uma configuração de transimpedância. O fotodiodo pode ser operado com ou sem uma polarização reversa aplicada, dependendo das necessidades específicas de cada aplicação. Eles são conhecidos como modo “fotocondutivo” (polarizado) e modo “fotovoltaico” (não polarizado).

4.3.9.1 Modo Fotocondutivo

A aplicação de uma polarização reversa (i.e. catodo positivo, anodo negativo) pode aumentar enormemente a velocidade de resposta e a linearidade destes instrumentos. Isto se deve ao aumento na largura da região de depleção e conseqüentemente ao decréscimo na capacitância de junção. Aplicar uma polarização reversa, entretanto, aumentará as correntes de escuro e de ruído.

4.3.9.2 Modo Fotovoltaico

O modo fotovoltaico de operação é preferido quando o fotodiodo é usado em aplicações de baixa frequência (até 350 kHz), e por isso foi o modo em que o utilizamos. Também é indicado para aplicações com níveis de luz ultrabaixos. Além de oferecer uma simples configuração operacional, as fotocorrentes neste modo apresentam menos variações na responsividade em função da temperatura.

4.4 Condicionamento de sinais para o fotodetector

Abaixo a figura 23 ilustra o circuito construído para o condicionamento de sinais do fotodiodo:

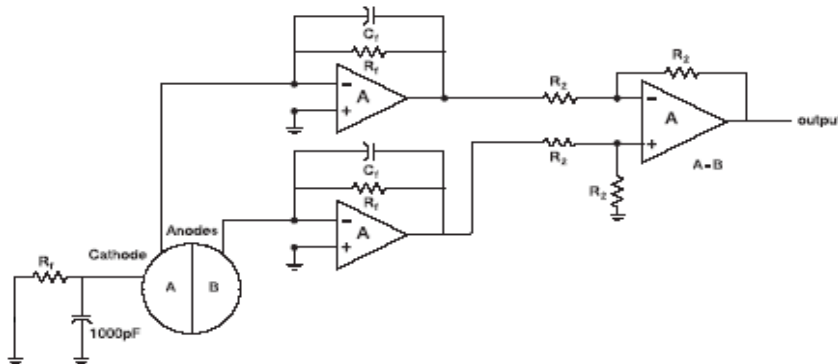


Figura 4.27 Circuito construído para a utilização do fotodiodo

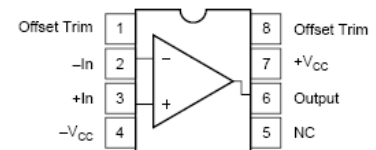


Figura 4.28 Amplificador OPA37 ultralow noise utilizado no circuito ao lado

O primeiro estágio é um amplificador de transimpedância que tem por objetivo tornar a impedância vista pelo fotodetector a menor possível, já que este funciona de modo análogo a uma fonte de corrente, convertendo a corrente gerada no fotodetector em tensão. O segundo estágio é

um amplificador de diferenças que é responsável pela subtração dos sinais fornecidos por cada elemento do fotodiodo anteriormente convertidos em tensão pelo primeiro estágio.

4.4.1 Amplificador de Transimpedância

Uma das características principais dos amplificadores operacionais é o elevado ganho. Assim, mantendo a entrada positiva aterrada, qualquer diferença de potencial positiva na entrada inversora de um amplificador causa um grande sinal de saída negativo. Colocando um resistor de feedback, R_F , da saída para a entrada negativa, ou seja, fazendo uma realimentação negativa, drenamos o potencial da entrada inversora através de R_F para a saída, V_o . No caso ideal de ganho infinito (amplificador ideal), toda corrente chegando a entrada inversora será forçada pelo amplificador a passar através de R_F , para manter o potencial da entrada inversora próximo de zero, igual ao da entrada não inversora mantendo assim V_o com um valor finito. V_o é portanto dada por:

$$V_o = -R_F I_P$$

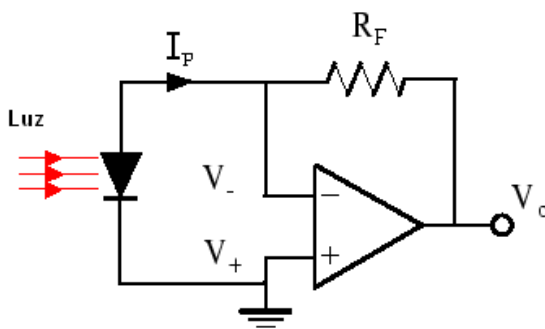


Figura 4.29 Amplificador de transimpedância

Vale notar que a impedância de entrada deste amplificador é idealmente zero, característica muito desejável para maximizar a velocidade de resposta de componentes que

apresentam capacitâncias internas como os fotodiodos. Além disso o ganho pode ser feito arbitrariamente grande através da escolha de R_F apropriado sem prejuízos na velocidade de resposta.

4.4.2 Amplificador de Subtração

A Figura 4.30 mostra a configuração utilizada para subtrair dois sinais V_1 e V_2 :

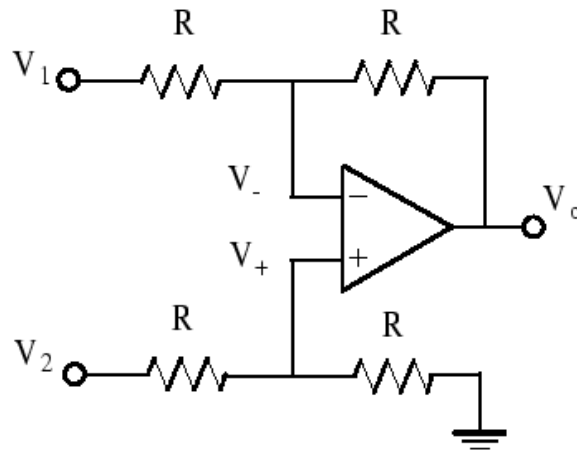


Figura 4.30 Amplificador subtrador

Utilizando o modelo do ampop ideal podemos chegar a função de transferência deste circuito facilmente:

$$V_o = A(V_+ - V_-) \text{ e como}$$

$$V_+ = \frac{V_2}{2} \quad \text{e} \quad V_- = V_1 - \frac{V_1 - V_o}{2R} R = \frac{V_1 + V_o}{2} \text{ segue}$$

$$V_o = A \left(\frac{V_2}{2} - \frac{V_1 + V_o}{2} \right) \Rightarrow V_o \left(1 + \frac{A}{2} \right) = A \left(\frac{V_2 - V_1}{2} \right) \text{ e no limite de } A \rightarrow \infty$$

$$\Rightarrow V_o = V_2 - V_1$$

Inicialmente o circuito eletrônico construído para o condicionamento do sinal do fotodetector foi montado em um protoboard, com amplificadores de uso geral (LM741) e com resistores comuns com precisão de 5%. Tais amplificadores aumentavam os ruídos do nosso sistema de medidas. Como desejávamos obter a melhor resolução com o fotodetector e conseqüentemente diminuir os ruídos da eletrônica, adquirimos amplificadores *ultralow noise* (OPA37) para a substituição dos comuns, cuja principal diferença está nas tensões e correntes de ruído intrínsecas e na corrente de polarização de entrada que em amplificadores operacionais construídos a base de transistores de efeito de campo (Fet) é da ordem de 1000 vezes menor que a corrente de polarização de amplificadores operacionais a base de transistor bipolar de junção (Bjt) como os LM741.

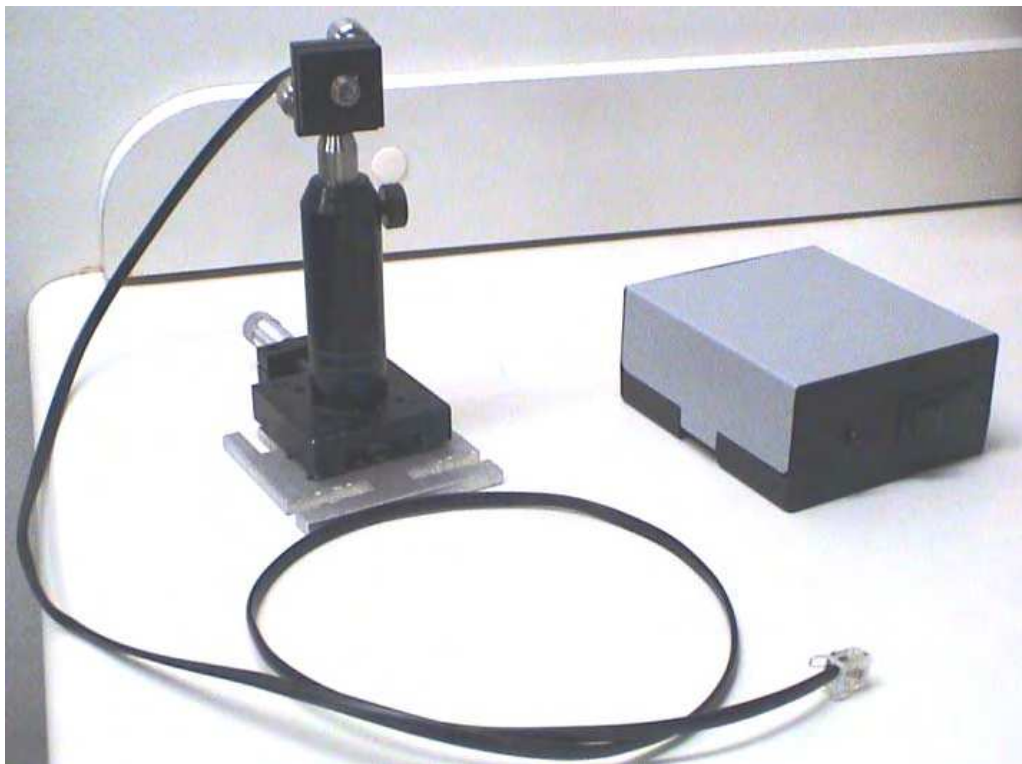


Figura 4.31 Fotodetector e eletrônica para o condicionamento do sinal configurados para fácil utilização

Substituímos os resistores comuns por resistores de precisão (1%) para uma maior linearidade e rejeição de modo comum do nosso sinal, e também alimentamos os amplificadores com baterias para minimizar ruídos. Foram acrescentados ainda capacitores para a estabilidade dos OpAmps OPA 37, pois estes não são compensados internamente para estabilidade em frequência como o LM741.



Figura 4.32 Fotodetector e suporte com regulagem.



Figura 4.33 Saída BNC do sinal proporcional a diferença das fotocorrentes e conector para o fotodetector.

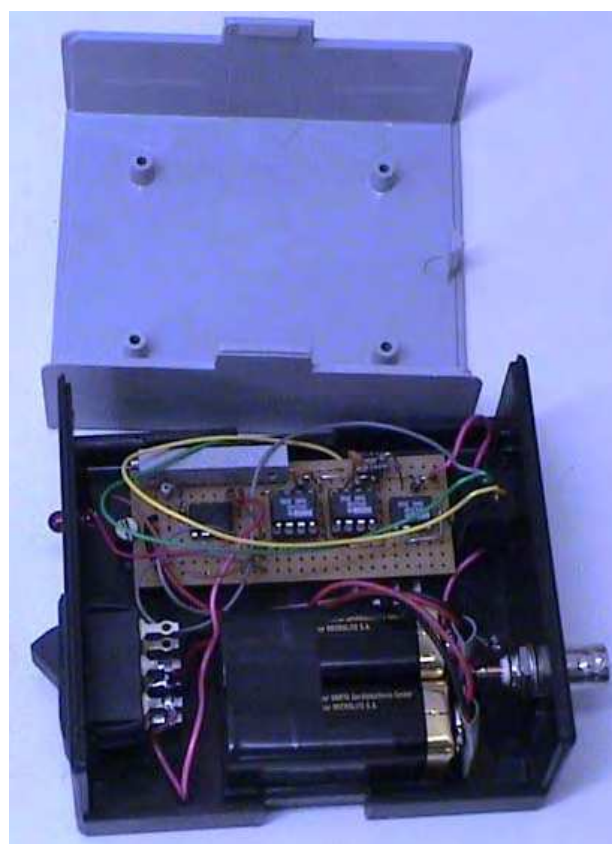


Figura 4.34 Eletrônica para o condicionamento do sinal (internamente). Baterias alimentam o circuito para minimizar ruídos.

O sinal era então levado diretamente da saída BNC do módulo na **Figura 4.33** a um lock-in para aquisição e filtragem de ruídos.

4.5 Resultados Obtidos

A figura abaixo é a imagem vista no monitor do computador do VI construído para o controle e a aquisição de dados do experimento de detecção óptica da deflexão do cantilever, utilizando um fotodetector e um picomotor. Isto foi possível graças à facilidade que o Lock-in utilizado (SR833) oferecia de comunicação via GPIB.

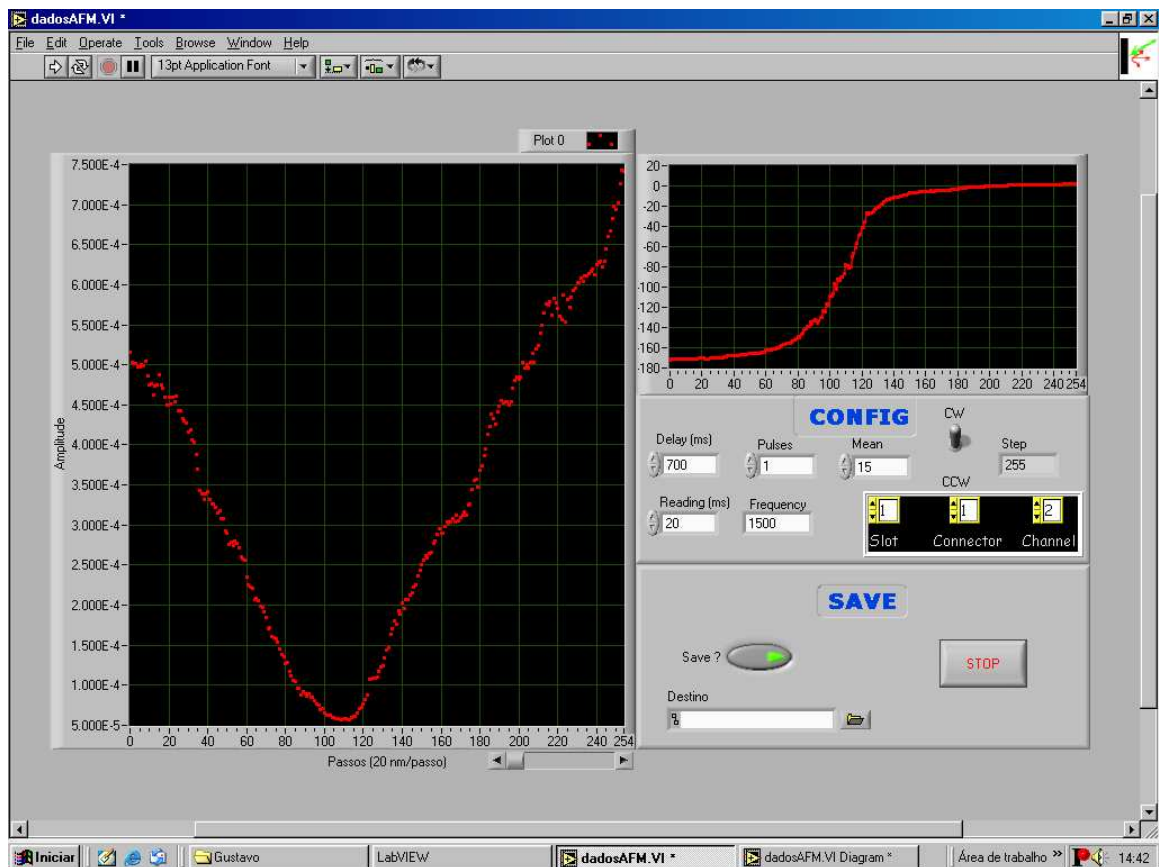


Figura 4.35 VI construído em LabView para controle e aquisição de dados durante o experimento. O gráfico da esquerda representa a variação da intensidade do sinal detectado pelo lock-in (R) à medida que o picomotor empurra o cantilever. O gráfico da direita representa a variação da fase do sinal de entrada com relação ao sinal de referência

O lock-in dava apenas o módulo do sinal fornecido pela eletrônica, gerando uma figura simétrica em forma de V no gráfico a esquerda da Figura 4.35. A medida em que a haste empurrada pelo picomotor se aproximava do cantilever de AFM, este sentia uma atração pela

mesma devido a forças de van der Waals e sofria um deslocamento da sua posição de equilíbrio defletindo o feixe laser. Após mais alguns passos do picomotor o cantilever passava pela sua posição de equilíbrio e logo após invertia o sentido da deflexão inicial. Então o sinal fornecido pelo circuito ao lock-in, que é proporcional à subtração das intensidades que chegam em cada elemento do fotodiodo, começa a diminuir, passando por um mínimo e voltando novamente a aumentar com a mesma inclinação. Seleccionamos a região à direita do mínimo do melhor conjunto de dados obtido para realizarmos uma regressão linear com o objetivo de obter a sensibilidade do fotodetector para este sistema:

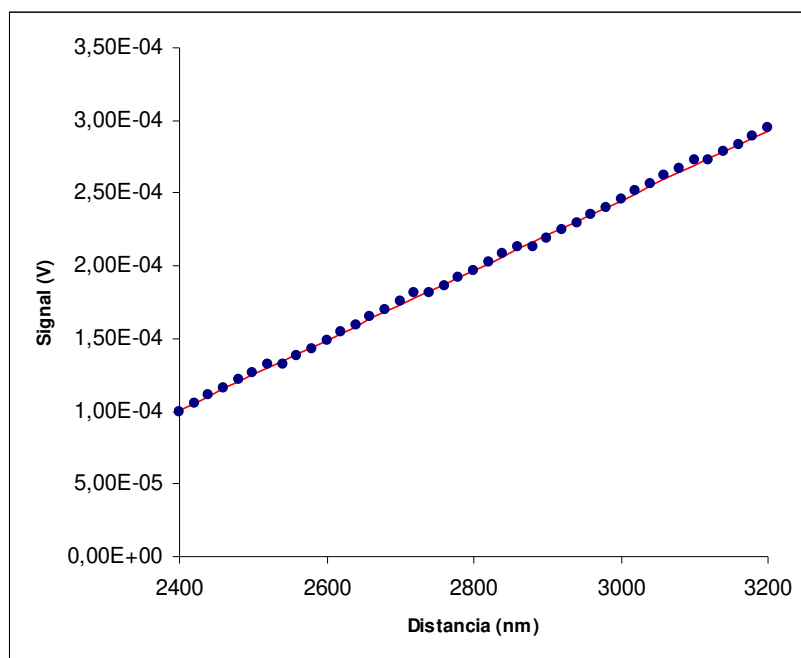


Figura 4.36 Pontos seleccionados para a realização da regressão linear.

A partir destes dados, após um tratamento estatístico, obtivemos a sensibilidade para o nosso sistema de detecção óptica da deflexão do cantilever de $2,7 \cdot 10^{-7}$ V/nm. Obtivemos também o mínimo deslocamento e a mínima força detectável com este sistema: 1nm e 10pN respectivamente, este último considerando uma constante de mola de 0,01N/m. Assim, com este

sistema seria possível calibrar as forças ópticas na faixa de 10-100pN, não fosse o fato de que era necessário ainda resolver o problema de detecção da deflexão do feixe laser refletido do cantilever dentro da câmara com a solução de esferas dielétricas. As dificuldades relacionadas a este fato motivaram a busca de uma outra solução.

Capítulo 5. Piezoresistores

A variação de resistência de um condutor metálico quando sujeito a uma deformação mecânica foi pela primeira vez observada por Lord Kelvin em 1856⁵¹. O valor da resistência R de um bloco de material pode ser definida em termos de sua resistividade ρ e suas dimensões pela seguinte equação:

$$R = \rho \frac{L}{WH}$$

onde L é o comprimento, W é a largura e H é a altura de um material isotrópico.

Um fio esticado fica mais longo e fino, o que aumenta sua resistência devido à alteração em sua geometria apenas. Qualquer material pode sofrer uma alteração na resistência devido a alterações geométricas apenas, mas o termo piezoresistivo refere-se especificamente a alterações na resistividade do material devido a tensões em semicondutores. As propriedades elétricas de alguns semicondutores dopados respondem a tensões com variações de resistência cem vezes maior do que aquela atribuída apenas à geometria.

Piezoresistores em silício são criados pela introdução de átomos dopantes para a criação de portadores de carga. Quando o silício experimenta pressão / tensão e, portanto se comprime / expande, o espaçamento entre os átomos da rede varia, afetando o gap de energia da banda. Esta variação também aumenta ou diminui o número de portadores disponíveis na região dopada, que é medida como uma variação na resistência⁵², pois a resistividade depende da concentração de elétrons excitados n e buracos p nas bandas e também de suas mobilidades:

⁵¹W. Thomson (Lord Kelvin), "On the electrodynamic qualities of metals", Proc. Royal Society, pp 546-550, 1857

⁵² F. J. Giessibl and B. M. Trafas, "Piezoresistive cantilevers utilized for scanning tunneling and scanning force microscope in ultrahigh vacuum." Rev. Sci. Inst., vol. 65, no. 6, pp. 1923-1929, 1994.

$$\rho = \frac{1}{q(n\mu_n + p\mu_p)} \quad 5.1$$

onde q é a carga unitária, n e p são as concentrações dos elétrons e buracos, e μ_n e μ_p são as mobilidades do elétron e do buraco respectivamente.

O primeiro cantilever de AFM foi criado na Universidade de Stanford por Marco Tortonese em 1991⁵³. Ao implantar boro, um caminho condutor foi criado na superfície de um cantilever de silício. Com uma voltagem aplicada a corrente flui por um braço e retorna pelo outro como ilustrado pela Figura 5.1:

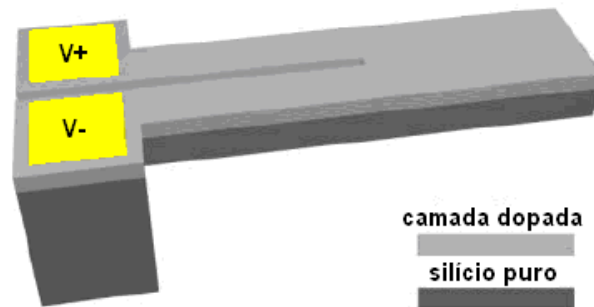
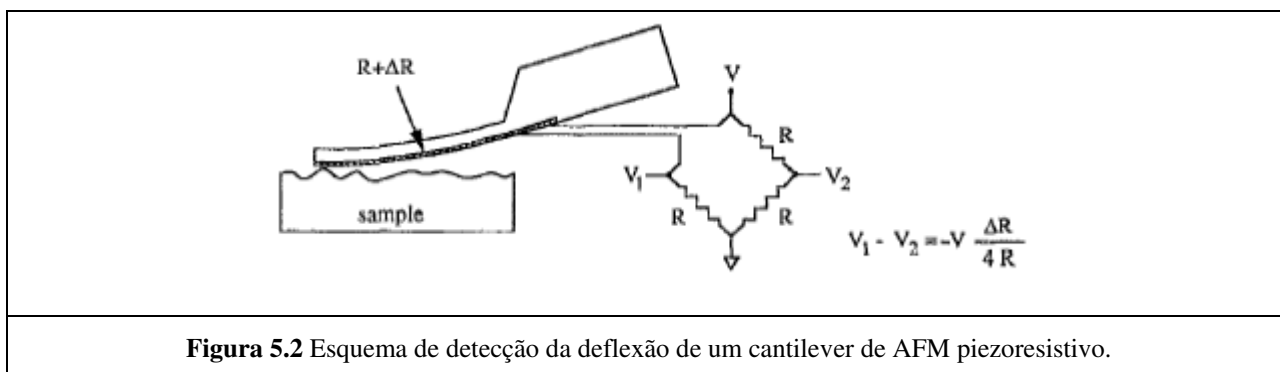


Figura 5.1. Esquema de um cantilever piezoresistivo. A camada superior conduz devido a estar dopada com boro. Aplicar uma tensão nos contatos gera um fluxo de corrente saindo de um terminal em direção ao outro, contornando a separação física existente entre cada braço do cantilever.

Com uma deflexão vertical e para baixo do cantilever, a tensão criada na camada superior resulta em um aumento da resistência e, ao contrário, se o cantilever sofre uma deflexão vertical para cima, a pressão criada na camada superior resulta em uma diminuição da resistência. Assim a deflexão pode ser medida como uma variação de resistência do cantilever e para isto comumente utiliza-se uma ponte de Wheatstone com alimentação DC:

⁵³ M. Tortonese, H. Yamada, R. C. Barrett, and C. F. Quate, "Atomic force microscopy using a piezoresistive cantilever." Transducers 97. 1997 International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, pp. 448-451, 1991.



É fácil notar que este tipo de detector de força é ideal para a solução do nosso problema, já que poderia facilmente ser posicionado dentro do câmara com a solução das partículas a serem pinçadas para uma calibração da força óptica em um microscópio invertido.

O efeito piezoresistivo no silício tem uma natureza anisotrópica e pode ser descrito utilizando um tratamento tensorial.

5.1.1 Tensor Piezoresistivo

O tensor de piezoresistividade caracteriza a variação na resistividade do material sujeito a uma tensão. Este tensor é encontrado na teoria da condução da carga elétrica em um condutor ôhmico anisotrópico. A relação linear mais geral relacionando campo elétrico E e densidade de corrente J é:

$$E_i = \rho_{ij} J_j$$

Onde ρ_{ij} são os componentes da tensor de resistividade e a convenção de Einstein é utilizada. Os subscritos j e i estão relacionados à direção da densidade de corrente e campo elétrico, respectivamente. Em geral, os subscritos 1,2 e 3 são usados para representar as componentes x , y , e z dos vetores num sistema de coordenadas cartesiano. A resistividade de um cristal semiconductor não tencionado é um escalar, ou seja, $\rho_{11}=\rho_{22}=\rho_{33}=\rho$ e as outras componentes são zero. Quando este semiconductor é mecanicamente tencionado, sua simetria cúbica é quebrada e a

resistividade não é mais isotrópica⁵⁴. Assim, J não é paralela a E e ρ_{ij} para $i \neq j$ pode não ser mais zero.

A piezoresistência de um material é freqüentemente representada por um conjunto de constantes empíricas: os coeficientes piezoresistivos. A variação relativa em ρ_{ij} até a segunda ordem na tensão é dada por:

$$\frac{\Delta\rho_{ij}}{\rho^0} = \pi_{ijkl}\sigma_{kl} + \pi_{ijklmn}\sigma_{kl}\sigma_{mn} + O(\sigma^3)$$

onde ρ_0 é a resistividade para o material não tensionado, σ_{kl} e σ_{mn} são tensores de tensão de segunda ordem, π_{ijkl} e π_{ijklmn} são os coeficientes piezoresistivos de primeira e segunda ordem respectivamente e $O(\sigma^3)$ é o termo dependente da tensão de ordem superior que geralmente pode ser desprezado.

5.1.2 Coeficientes Piezoresistivos

A simetria da estrutura do diamante reduz o número de coeficientes piezoresistivos de primeira ordem a 3 e o número dos de segunda ordem a 9. Geralmente, uma convenção de contração é usada para reduzir a complexidade da legenda dos índices através de um esquema de renumeração usando uma notação de 6 componentes. (sufixos mudam de 11, 22, 33, 23, 13 e 12 para 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente). Tabela 3.1 mostra os três coeficientes de piezoresistividade de primeira ordem (FOPR) e os nove coeficientes de segunda ordem (SOPR) e seus correspondentes⁵⁵:

⁵⁴ C.S. Smith, "Macroscopic symmetry and properties of crystals", in F. Seitz and D. Turnbull (ed.), Solid State Physics, Vol. 6, Academic Press, New York, pp.175-249, 1958.

⁵⁵ K. Matsuda, K. Suzuki, K. Yamamura, and Y. Kanda, "Nonlinear piezoresistive coefficients in silicon", J. Appl. Phys., 73, 1838-1847, 1993.

FOPR π_{ijkl}	SOPR π_{ijklmn}
$\pi_{11}=\pi_{22}=\pi_{33}$	$\pi_{111}=\pi_{222}=\pi_{333}$
$\pi_{12}=\pi_{21}=\pi_{13}=\pi_{31}=\pi_{23}=\pi_{32}$	$\pi_{112}=\pi_{113}=\pi_{212}=\pi_{223}=\pi_{313}=\pi_{323}$
$\pi_{44}=\pi_{55}=\pi_{66}$	$\pi_{122}=\pi_{211}=\pi_{133}=\pi_{311}=\pi_{233}=\pi_{322}$
	$\pi_{123}=\pi_{213}=\pi_{312}$
	$\pi_{144}=\pi_{255}=\pi_{366}$
	$\pi_{166}=\pi_{155}=\pi_{244}=\pi_{266}=\pi_{344}=\pi_{355}$
	$\pi_{616}=\pi_{626}=\pi_{515}=\pi_{535}=\pi_{424}=\pi_{434}$
	$\pi_{414}=\pi_{525}=\pi_{636}$
	$\pi_{456}=\pi_{546}=\pi_{645}$

Tabela 5.1 Coeficientes independentes de primeira e segunda ordem de um cristal cúbico

A dependência dos coeficientes piezoresistivos com relação à concentração de impurezas para diferentes temperaturas foi estudada por Kanda⁵⁶. Em concentrações de dopagem abaixo de 10^{18} cm^{-3} os coeficientes piezoresistivos dependem fortemente da temperatura. Entre $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $+150 \text{ }^\circ\text{C}$ para ambos materiais tipo p ou n, os coeficientes de primeira ordem diminuem com o aumento da temperatura por aproximadamente:

$$\frac{1}{\pi_{ijkl}} \frac{\delta \pi_{ijkl}}{\delta T} = -3 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$$

5.2 Ruídos nos Piezoresistores

Sensores piezoresistivos têm duas principais fontes de ruído, ambos distinguíveis facilmente em um espectro de ruído vs Freqüência, como mostrado na Figura 5.3. Em baixas freqüências, todos resistores sofrem de flutuações na condutância, geralmente chamadas ruído 1/f porque a densidade de potência deste ruído (PSD) [V^2/Hz] tem esta dependência com a freqüência. Além deste, existe o ruído Johnson que é independente da freqüência e aparece no espectro de

⁵⁶ Y. Kanda, "Piezoresistance effect of silicon." Sensors and Actuators A, vol. 28, pp. 83-91, 1991.

frequência como uma linha horizontal. A origem do ruído Johnson é bem entendida e se dá devido à geração térmica de portadores no resistor⁵⁷ A origem do ruído $1/f$, por outro lado, é ainda uma área de pesquisa ativa.

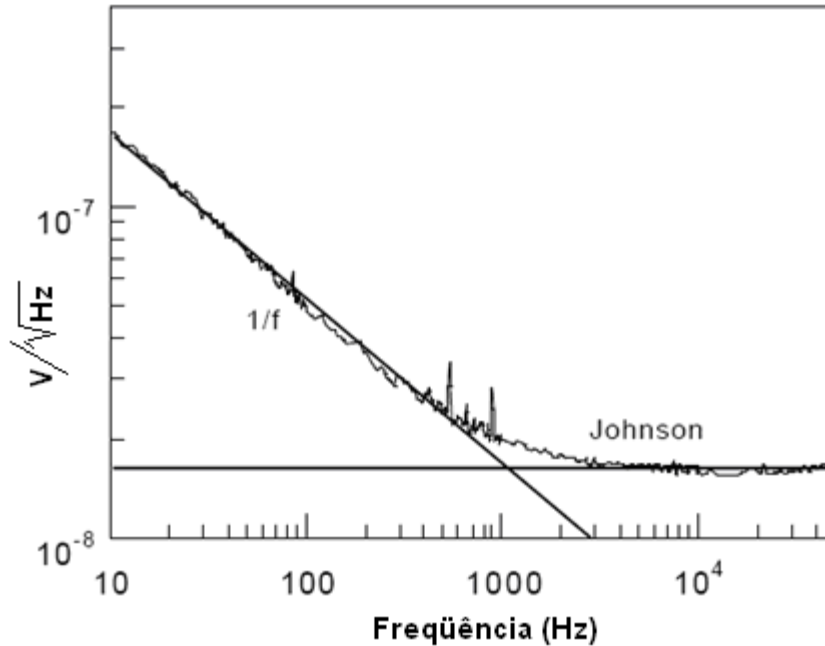


Figura 5.3 Típico espectro de ruído de um cantilever piezoresistivo mostrando ruídos Johnson e $1/f$.⁵⁸

5.2.1 Ruído Johnson

O ruído Johnson de um piezoresistor é um limite fundamental, dado pela energia térmica dos portadores em um resistor, e depende apenas da resistência, R e temperatura, T . É um ruído branco, independente da frequência. A densidade espectral de potência deste ruído, S_J (unidades de $[V^2/Hz]$) em uma dada largura de banda, de f_{min} a f_{max} é dada por:

$$S_J = 4k_B T R (f_{max} - f_{min}) \quad 5.2$$

⁵⁷ H. Nyquist, "Thermal Agitation of Electric Charge in Conductors." *Phys. Rev.*, vol. 32, pp. 110-113, 1928.

⁵⁸ Harley, J. A. and Kenny, T. W., "High-sensitivity piezoresistive cantilevers under 1000 Å thick" - *Applied Physics Letters* Volume 75, Number 2 - 12 July 1999

5.2.2 Ruído 1/f

Em 1969, F. N. Hooge publicou a observação empírica de que a densidade espectral do ruído $1/f$ (unidades de $[V^2/Hz]$) de um resistor homogêneo é dependente do número total de portadores no resistor de acordo com a equação:

$$S_H = \frac{\alpha V_B^2}{Nf} \quad 5.3$$

Onde V_B é a tensão de polarização através do resistor com um número total de carregadores N , f é a frequência e α é um parâmetro adimensional. Se a equação acima é integrada de f_{min} a f_{max} , então tensão de ruído nesta largura de banda é dada por:

$$V_H^2 = \frac{\alpha V_B^2}{N} \ln \left(\frac{f_{max}}{f_{min}} \right) \quad 5.4$$

Note que para qualquer década de frequência, o ruído integrado é constante. O ruído total entre 1 Hz e 10 Hz é o mesmo que entre 1 kHz e 10 kHz. Embora a largura de banda seja muito maior no último caso, o nível de ruído é o mesmo.

5.3 Condicionamento de Sinais para Cantilevers Piezoresistivos

A equação geral para um sensor baseado em uma variação fracional de resistência x , em resposta a uma variável a ser medida, é $R = R_0 f(x)$, assumindo $f(0) = 1$.⁵⁹ Para o caso onde a relação é linear tem-se:

$$R_s = R_0(1 + x)$$

⁵⁹ Palás-Areny R., Webster J. G., *Sensors and Signal Conditioning*, John Wiley

No caso do cantilever piezoresistivo que adquirimos, o valor de x dado pelo fabricante é da ordem de $10^{-6}/nm$. Como precisamos detectar deslocamentos sub-angstrom para alcançarmos a resolução desejada de força, precisamos ser capazes de medir variações de resistência da ordem de 10^{-2} ppm ($0,2\text{ m}\Omega$ para uma resistência de $2\text{ k}\Omega$ como a do cantilever utilizado).

5.3.1 Ponte de Wheatstone

O método usual para medida de pequenas variações de resistência é o arranjo conhecido por ponte de Wheatstone. A figura abaixo ilustra esta configuração:

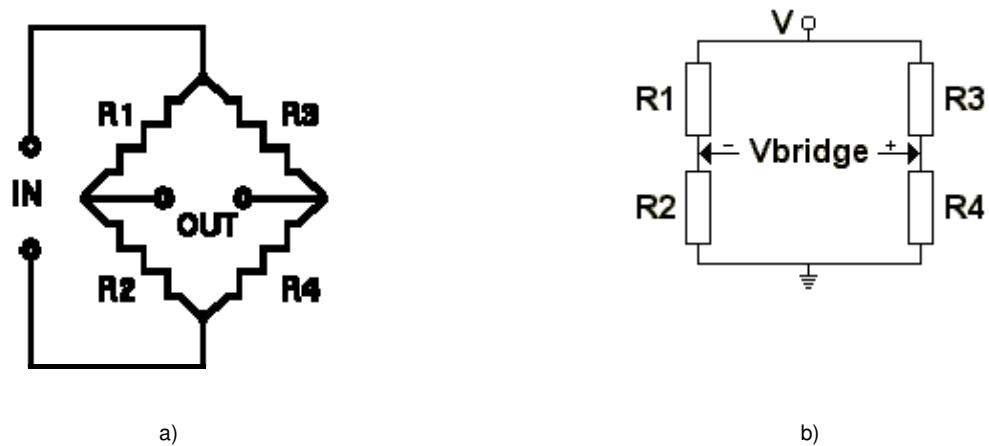


Figura 5.4 Ponte de Wheatstone. a) Forma usual. b) Forma análoga (Dois divisores de tensão em paralelo)

A tensão no braço esquerdo da ponte é dada por:

$$V_- = \frac{R_2}{R_1 + R_2} V_{in}$$

Similarmente no braço direito é dada por:

$$V_+ = \frac{R_4}{R_3 + R_4} V_{in}$$

Assim a voltagem na saída é dada por:

$$V_{out} = V_+ - V_- = \left(\frac{R_4}{R_3 + R_4} - \frac{R_2}{R_1 + R_2} \right) V_{in} \quad 5.5$$

Consideramos então que $R_4 = R_s$. Para que a ponte esteja equilibrada (com $x=0$) $\frac{R_1}{R_2} = \frac{R_3}{R_0} = k$.

Substituindo este parâmetro na equação 5.5 obtemos:

$$V_{out} = \frac{kx}{(k+1)(k+1+x)} V_{in} \quad 5.6$$

Vemos a partir da equação 5.6 que a linearidade de V_{out} com relação a x só está garantida se a condição $x \ll k+1$ for satisfeita. Nesta situação a sensibilidade da ponte é dada por:

$$S = \frac{dV_{out}}{dR_s} = \frac{1}{R_0} \frac{k}{(k+1)(k+1+x)} V_{in} \quad 5.7$$

O valor máximo da sensibilidade em função de k é obtido quando $\frac{dS}{dk} = 0$ que resulta em:

$$k^2 = 1 + x$$

Como no nosso caso x é da ordem de 10^{-7} , a condição de máxima sensibilidade que deve ser satisfeita pelos resistores é dada por $k \approx 1$, que resulta em:

$$S = \frac{dV_{out}}{dR_s} = \frac{1}{4R_0} V_{in}$$

que para uma resistência da ordem de 2000Ω e para um voltagem de alimentação da ponte de $10V$ é da ordem de $S \approx 1mV/\Omega$. Para detectarmos variações da ordem de $0,2 m\Omega$, levando em conta esta sensibilidade, precisamos detectar sinais de voltagem da ordem de $0,2 \mu V$. Portanto precisamos manter os ruídos eletrônicos em uma escala pelo menos dez vezes menor.

5.3.2 Montagem Experimental

Foi utilizado um lock-in para excitar a ponte e simultaneamente adquirir o sinal de saída da mesma, objetivando minimizar o principal tipo de ruído deste tipo de sensor que é o flicker, cujo espectro é da forma $\frac{1}{f}$. Utilizamos inicialmente frequências baixas, de no máximo 100Hz, devido ao descasamento de impedâncias nos braços da ponte para sinais AC. Para isolar ao máximo o experimento do ambiente externo foram utilizados cabos coaxiais para transportar o sinal de cada braço da ponte às entradas diferenciais A e B do Lock-in conforme ilustra o esquema abaixo:

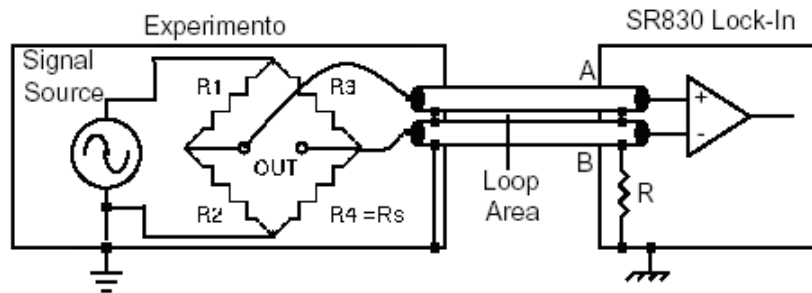


Figura 5.5. Esquema da ligação utilizada no experimento.

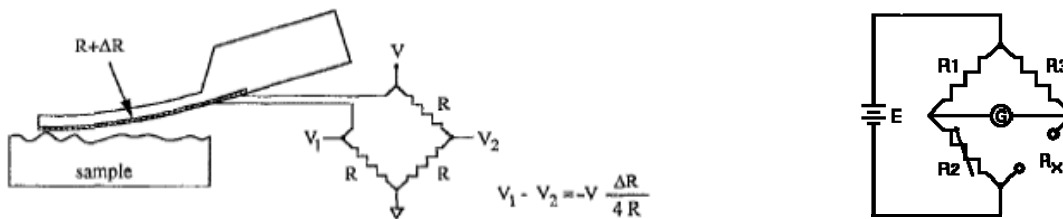


Figura 5.6 Esquema de detecção da deflexão do cantilever de AFM piezoresistivo.

Inicialmente balanceávamos a ponte com uma alimentação DC. Em seguida alternávamos para alimentação AC para a aquisição da medida pelo lock-in, à medida que empurrávamos o

cantilever com uma alavanca acionada por um picomotor e controlado pelo computador. As figuras abaixo mostram o dispositivo final construído:

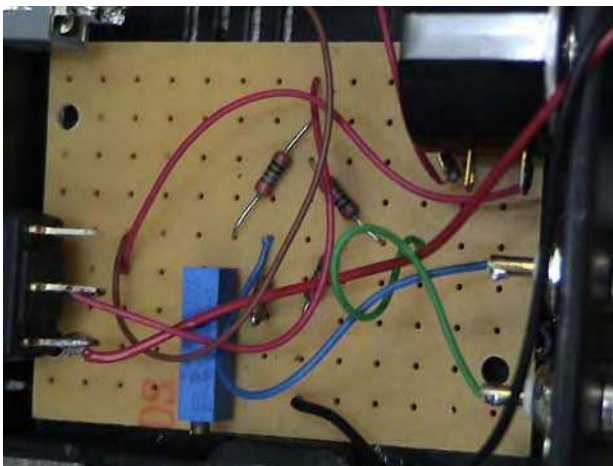


a



b

Figura 5.7 Dispositivo construído para a primeira parte do condicionamento do sinal do cantilever piezoresistivo (Ponte de Wheatstone) a) Vista frontal: Saídas dos sinais de cada braço da ponte e potenciômetro para o ajuste do zero da tensão. b) Vista traseira: conector para o piezoresistor e chave comutadora entre alimentação AC e DC da ponte.

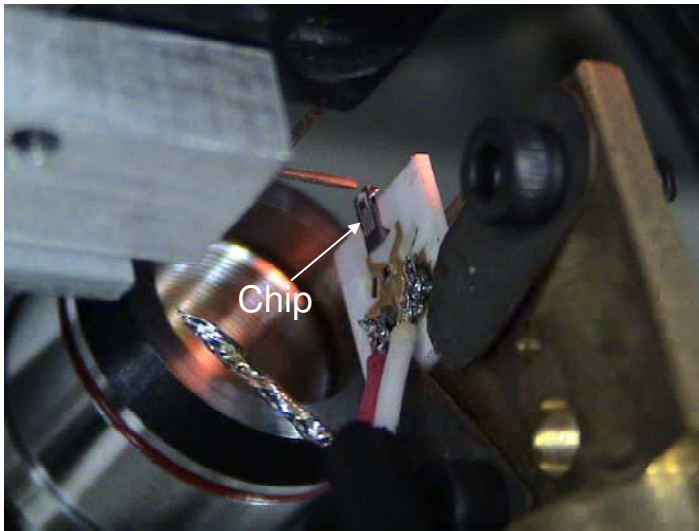


a



b

Figura 5.8 a) Dispositivo internamente b) Plug do cabo utilizado para ligar o piezoresistor ao dispositivo (2 vias + malha)



a



b

Figura 5.9 a) Suporte utilizado para fixação e movimentação do cantilever piezoresistivo. b) Imagem do cantilever na TV (180 μm de comprimento)

5.4 Resultados Obtidos

Abaixo está um gráfico dos dados obtidos com o cantilever piezoresistivo a medida que era empurrado pelo picomotor:

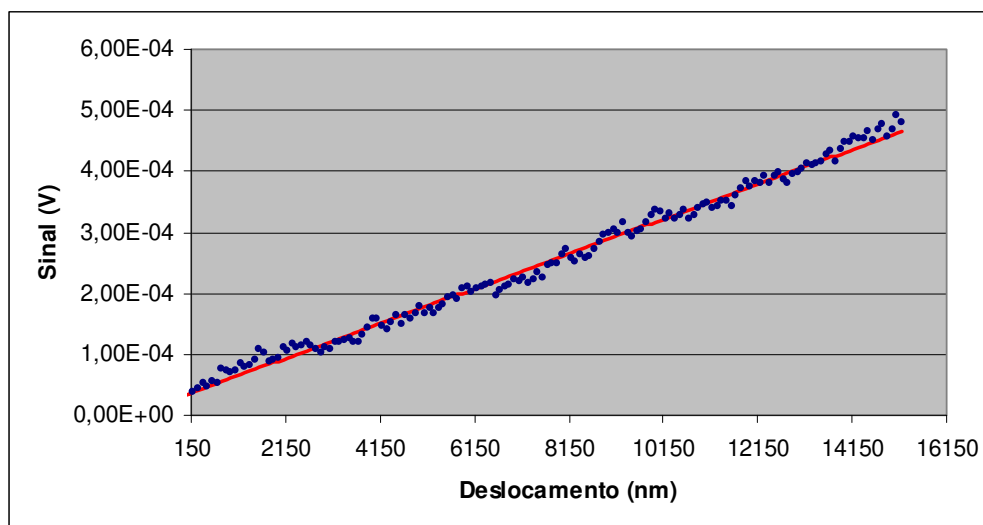


Figura 5.10 Pontos obtidos com o cantilever piezoresistivo e regressão linear.

A partir destes dados, após um tratamento estatístico, obtivemos uma calibração para o nosso sistema de detecção da deflexão do cantilever piezoresistivo de $2,9 \cdot 10^{-8}$ V/nm. Obtivemos também o mínimo deslocamento e a mínima força detectável com este sistema: 397nm e 397nN respectivamente, este último considerando uma constante de mola de 1N/m que é fornecida pelo fabricante. Estes resultados são bem piores que os obtidos anteriormente com o sistema de deflexão óptico (1nm e 10pN). Isto mostra que o nível de ruído existente no sinal deste sensor para as frequências utilizadas é demasiadamente grande para permitir resoluções sub-angstrom que seriam necessárias com este tipo de detector, devido a sua maior rigidez. Além disso apresenta menor sensibilidade que no caso óptico. Estes resultados indicam que é preciso aumentar a sensibilidade do sensor através de uma outra topologia de circuito ou baixar muito os níveis de ruído deste detector para utilizá-lo na calibração da força óptica. Uma possibilidade é aumentar a frequência para a faixa de kHz e balancear a ponte nestas condições. Entretanto surge o problema de balanceamento da ponte de Wheatstone em altas frequências, onde capacitâncias e indutâncias parasitas começam a ser relevantes.

Capítulo 6. Conclusões e Perspectivas

As principais constatações foram:

- O sistema de detecção óptico da deflexão do cantilever de AFM apresenta a resolução necessária para a calibração da força óptica como era esperado da literatura, no entanto tal sistema apresenta características desfavoráveis para a utilização na calibração da força óptica, principalmente dadas as condições específicas deste problema como a necessidade de alinhamento, focalização e detecção do feixe laser que passa por uma solução.
- O sistema de detecção piezoresistivo da deflexão do cantilever de AFM apresenta características ideais para a utilização na calibração da força óptica, principalmente por dispensar a utilização de laser e detector externo. Entretanto não conseguimos inicialmente a resolução necessária para a calibração da força óptica com tal sistema, principalmente devido ao fato de que os cantilevers que existiam comercialmente a época da realização desta pesquisa apresentavam constantes de mola muito altas (1N/m) exigindo resoluções de deflexão muito altas.

Acreditamos que novos esforços para atingir os objetivos iniciais devem seguir na direção do sistema de detecção piezoresistivo. Recentemente Harley⁶⁰ construiu cantilevers piezoresistivos ultrafinos com resoluções de força de até $8.6 \text{ fN}/(\text{Hz})^{1/2}$ e com constantes de mola tão baixas quanto às da pinça óptica (10^{-5} N/m). Vale notar que com tais cantilevers a calibração

⁶⁰ Harley, J. A. and Kenny, T. W., “*High-sensitivity piezoresistive cantilevers under 1000 Å thick*” - Applied Physics Letters Volume 75, Number 2 - 12 July 1999

da força óptica seria imediata, pois as deflexões do cantilever seriam da mesma ordem que o deslocamento da partícula aprisionada(μm), facilitando imensamente o condicionamento de sinais.

Uma segunda alternativa, para tentar melhorar a resolução dos cantilever duros (1 N/m) é uma nova topologia de circuito conhecida como Loop de Anderson⁶¹. Ela supera significativamente a performance da clássica ponte de Wheatstone em muitas aplicações de instrumentação. Usando subtração ativa como tecnologia chave, o loop de Anderson fornece maior precisão com menor excitação se comparado à ponte de Wheatstone e realiza funções adicionais de medidas. As principais desvantagens da ponte de Wheatstone em nosso caso é a baixa sensibilidade fornecida e a dificuldade de separar ruídos autogerados quando utilizando alimentação.

O Loop de Anderson utiliza um subtrador diferencial ativo para medir a diferença de potencial através de duas ou mais impedâncias que são atravessadas pela mesma corrente. O subtrador entrega em sua porta de saída a diferença entre duas diferenças de potencial selecionadas e possivelmente amplificadas observadas por suas portas de entrada. Diferentes fatores de amplificação podem ser usados ao observar as várias diferenças de potencial do loop e este pode conter qualquer número prático de impedâncias monitoradas.

As principais vantagens desta topologia em nosso caso são a maior sensibilidade fornecida, a possibilidade imediata de excitação AC para separar o sinal dos ruídos $1/f$, bem como a possibilidade direta de compensação através da utilização de um segundo sensor piezoresistivo na diferença de potencial de referência, cancelando completamente as variações da piezoresistividade com a temperatura.

⁶¹ Karl F. Anderson, “*The new current loop: NASA's successor to the Wheatstone bridge*”, ISA Transactions. Vol. 36. No. 4. pp. 351-356. 1998

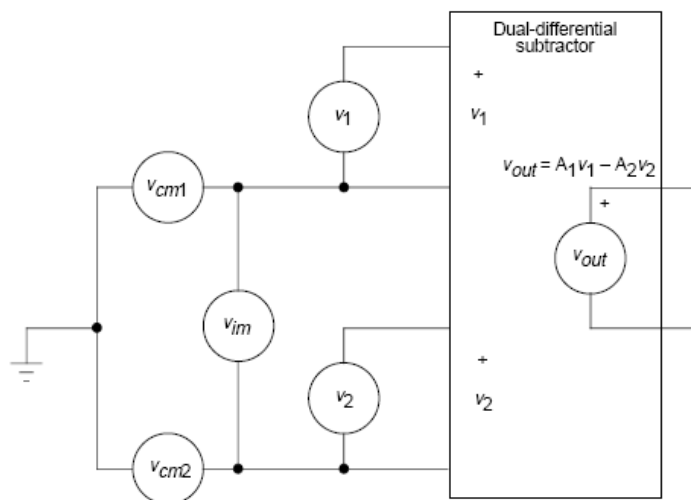


Figura 6.1 Subtrador de Anderson

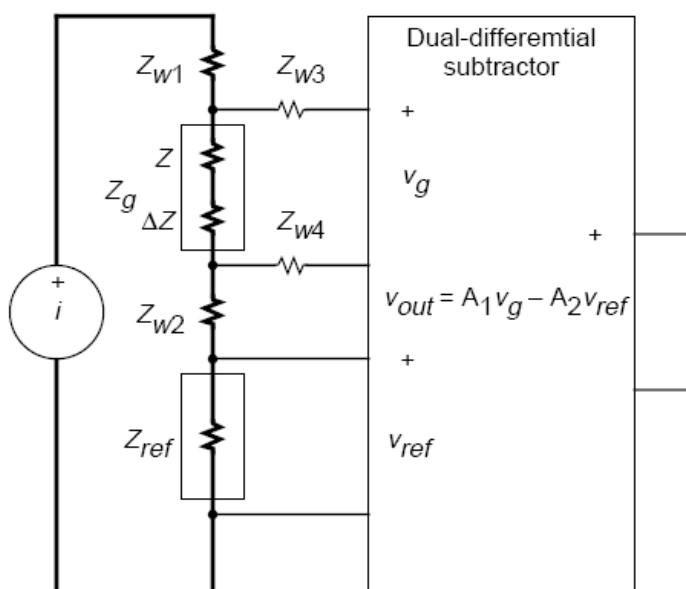


Figura 6.2 Loop de Anderson

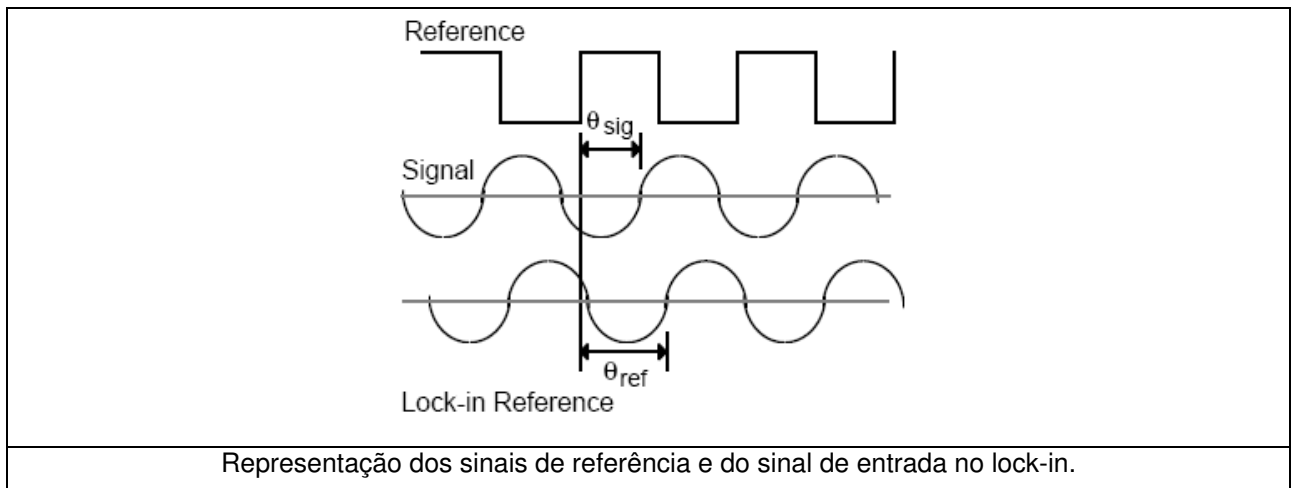
Se $Z_{ref} = Z$ então

$$V_{OUT} = i\Delta Z$$

Esta sensibilidade é 4 vezes maior que a fornecida pela ponte de Wheatstone nas mesmas condições de dissipação de potência.

Apêndice A. Amplificador Lock-in

Amplificadores lock-in são usados para detectar e medir sinais AC muito pequenos (até alguns nanovolts). Medidas exatas podem ser feitas mesmo quando pequenos sinais são obscurecidos por ruídos dezenas de milhares de vezes maior. Estes amplificadores utilizam uma técnica conhecida como “*phase sensitive detection*” (PSD), ou seja detecção sensível à fase. Sinais de ruído em frequências diferentes da frequência de referência em que é realizado o experimento são rejeitados e não afetam a medida. No dia grama abaixo o sinal de referência é uma onda quadrada na frequência ω_r . Este poderia ser o sinal de referência fornecido por um chopper que modula um feixe laser incidindo em um fotodetector. Como resposta do fotodetector teríamos um sinal dado por $V_{sig}(t) = V_{sig} \sin(\omega_r t + \theta_{sig})$. O lock-in gera sua própria onda de referência dada por $V_L(t) = V_L \sin(\omega_L t + \theta_{ref})$.



O lock-in amplifica o sinal e então o multiplica pelo seu sinal de referência usando um PSD ou multiplicador digital. A saída do PSD é simplesmente o produto de duas ondas senoidais:

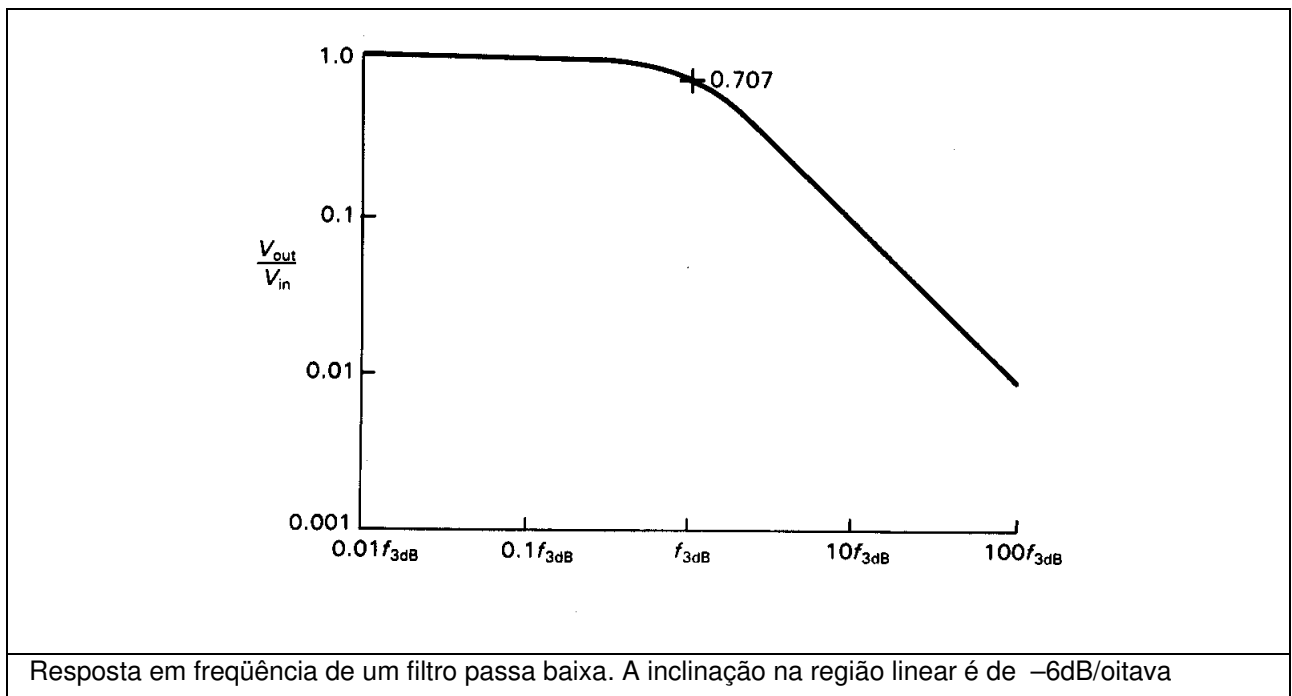
$$V_{PSD}(t) = V_{sig} V_L \sin(\omega_r t + \theta_{sig}) \sin(\omega_L t + \theta_{ref})$$

$$\Rightarrow V_{PSD}(t) = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos[(\omega_r - \omega_L)t + \theta_{sig} - \theta_{ref}] - \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos[(\omega_r + \omega_L)t + \theta_{sig} + \theta_{ref}]$$

Notamos que se ω_L for igual a ω_r , o sinal do PSD será separado em um componente DC e em um componente AC que poderiam ser facilmente separados por um filtro passa-baixa (FPB):

$$V_{PSD}(t) = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos(\theta_{sig} - \theta_{ref}) - \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos(2\omega_{ref}t + \theta_{sig} + \theta_{ref})$$

Esta é a estratégia do lock-in. Ele utiliza um “phase-locked-loop” (PLL) para gerar seu sinal de referência na mesma frequência de referência ω_r . O PLL trava (locks) o seu oscilador interno a frequência do sinal de referência, rastreando-a continuamente, o que possibilita uma onda senoidal de referência com frequência ω_r e com uma fase fixa θ_{ref} . A saída do PSD passa então por um FPB. Este remove os sinais AC com frequências maiores que a sua largura de banda. Assim, se o sinal de interesse está misturado com ruídos indesejados, cujas frequências são suficientemente distantes da frequência de referência, estes serão filtrados pelo FPB e somente o sinal de interesse na frequência ω_r não será afetado.



A constante de tempo do Lock-in nada mais é que do que $\frac{1}{2\pi f_{3dB}}$, onde f_{3dB} é a frequência de -3dB do filtro passa-baixa. Assim a constante de tempo define a largura de banda do filtro passa-baixa, ou seja, quanto maior a constante de tempo menor a f_{3dB} fazendo a atenuação do filtro começar a frequências menores, diminuindo sua largura de banda.

O sinal DC filtrado por este FPB é proporcional a $V_{PSD} = V_{sig} \cos \theta$, onde $\theta = \theta_{sig} - \theta_{ref}$ é a diferença de fase entre o sinal de referência e o sinal do oscilador interno do lock-in. Ajustando θ_{ref} podemos fazer $\theta = 0$ e assim $V_{PSD} = V_{sig}$. Se no entanto $\theta = 90^\circ \Rightarrow V_{PSD} = 0$. Esta dependência da fase pode ser eliminada se adicionamos um segundo PSD, que multiplica o sinal de entrada pelo sinal do oscilador interno do lock-in com uma diferença de fase de $+90^\circ$:

$$V_{PSD}(t) = V_{sig} V_L \sin(\omega_r t + \theta_{sig}) \sin(\omega_L t + \theta_{ref} + 90^\circ) = V_{sig} V_L \sin(\omega_r t + \theta_{sig}) \cos(\omega_L t + \theta_{ref})$$

Assim o sinal DC filtrado será proporcional a $V_{PSD} = V_{sig} \sin \theta$. Teremos agora dois sinais:

$$X = V_{sig} \cos(\theta) \quad \text{e} \quad Y = V_{sig} \sin(\theta)$$

Estes duas quantidades representam o sinal como um vetor de módulo V_{sig} que faz um ângulo θ com relação ao sinal de referência do oscilador do lock-in. Ou seja podemos medir o sinal independentemente da fase calculando seu módulo:

$$R = \sqrt{X^2 + Y^2} = V_{sig}$$

A fase também pode ser calculada da seguinte maneira:

$$\theta = \tan^{-1} \frac{Y}{X}$$

Abaixo o diagrama em bloco do lock-in utilizado resume as principais etapas. Os filtros Notch filtram os ruídos da rede elétrica em f_{rede} e $2f_{rede}$:

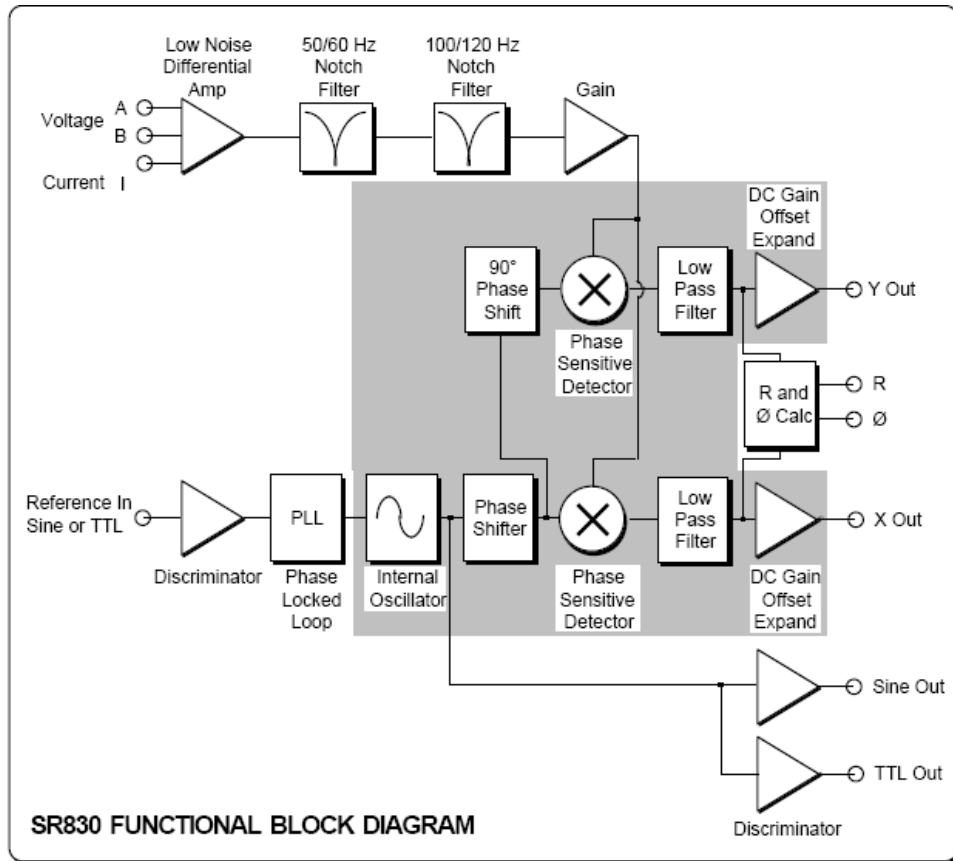


Diagrama em bloco do Lock-in utilizado em nosso experimento (SR830 da Stanford Research Systems)

Apêndice B. Folhas de Especificações dos componentes utilizados

OPA37

Ultra-Low Noise, Precision OPERATIONAL AMPLIFIERS

FEATURES

- LOW NOISE: $4.5\text{nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ max at 1kHz
- LOW OFFSET: $100\mu\text{V}$ max
- LOW DRIFT: $0.4\mu\text{V}/^\circ\text{C}$
- HIGH OPEN-LOOP GAIN: 117dB min
- HIGH COMMON-MODE REJECTION: 100dB min
- HIGH POWER-SUPPLY REJECTION: 94dB min
- FITS OP-07, OP-05, AD510, AND AD517 SOCKETS

APPLICATIONS

- PRECISION INSTRUMENTATION
- DATA ACQUISITION
- TEST EQUIPMENT
- PROFESSIONAL AUDIO EQUIPMENT
- TRANSDUCER AMPLIFIERS
- RADIATION HARD EQUIPMENT

DESCRIPTION

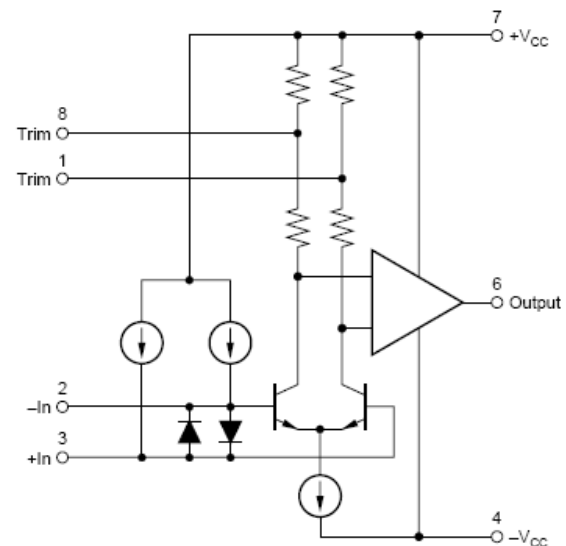
The OPA27 and OPA37 are ultra-low noise, high-precision monolithic operational amplifiers.

Laser-trimmed thin-film resistors provide excellent long-term voltage offset stability and allow superior voltage offset compared to common zener-zap techniques.

A unique bias current cancellation circuit allows bias and offset current specifications to be met over the full -55°C to $+125^\circ\text{C}$ temperature range.

The OPA27 is internally compensated for unity-gain stability. The decompensated OPA37 requires a closed-loop gain ≥ 5 .

The Burr-Brown OPA27 and OPA37 are improved replacements for the industry-standard OP-27 and OP-37.



SPECIFICATIONS

At $V_{CC} = \pm 15V$ and $T_A = +25^\circ C$, unless otherwise noted.

PARAMETER	CONDITIONS	OPA27G OPA37G			UNITS
		MIN	TYP	MAX	
INPUT NOISE ⁽⁶⁾ Voltage, $f_o = 10Hz$ $f_o = 30Hz$ $f_o = 1kHz$ $f_B = 0.1Hz$ to $10Hz$ Current, ⁽¹⁾ $f_o = 10Hz$ $f_o = 30Hz$ $f_o = 1kHz$			3.8	8.0	nV/\sqrt{Hz}
			3.3	5.6	nV/\sqrt{Hz}
			3.2	4.5	nV/\sqrt{Hz}
			0.09	0.25	$\mu Vp-p$
			1.7		pA/\sqrt{Hz}
			1.0		pA/\sqrt{Hz}
		0.4	0.6	pA/\sqrt{Hz}	
OFFSET VOLTAGE ⁽²⁾ Input Offset Voltage Average Drift ⁽³⁾ Long Term Stability ⁽⁴⁾ Supply Rejection	$T_{A MIN}$ to $T_{A MAX}$		± 25	± 100	μV
			± 0.4	± 1.8 ⁽⁶⁾	$\mu V/^\circ C$
			0.4	2.0	$\mu V/mo$
		$\pm V_{CC} = 4$ to $18V$ $\pm V_{CC} = 4$ to $18V$	94	120 ± 1	± 20
BIAS CURRENT Input Bias Current			± 15	± 80	nA
OFFSET CURRENT Input Offset Current			10	75	nA
IMPEDANCE Common-Mode			$2 \parallel 2.5$		$G\Omega \parallel pF$
VOLTAGE RANGE Common-Mode Input Range Common-Mode Rejection	$V_{IN} = \pm 11VDC$	± 11	± 12.3		V
		100	122		dB
OPEN-LOOP VOLTAGE GAIN, DC	$R_L \geq 2k\Omega$ $R_L \geq 1k\Omega$	117	124		dB
			124		dB
FREQUENCY RESPONSE Gain-Bandwidth Product ⁽⁵⁾ Slew Rate ⁽⁵⁾ Settling Time, 0.01%	OPA27 OPA37 $V_O = \pm 10V$, $R_L = 2k\Omega$ OPA27, $G = +1$ OPA37, $G = +5$ OPA27, $G = +1$ OPA37, $G = +5$	5 ⁽⁶⁾	8		MHz
		45 ⁽⁶⁾	63		MHz
		1.7 ⁽⁶⁾	1.9		V/ μs
		11 ⁽⁶⁾	11.9		V/ μs
			25		μs
RATED OUTPUT Voltage Output Output Resistance Short Circuit Current	$R_L \geq 2k\Omega$ $R_L \geq 600\Omega$ DC, Open Loop $R_L = 0\Omega$	± 12	± 13.8		V
		± 10	± 12.8		V
			70	60 ⁽⁶⁾	Ω mA
POWER SUPPLY Rated Voltage Voltage Range, Derated Performance Current, Quiescent	$I_O = 0mADC$		± 15		VDC
			± 4	± 22	VDC
			3.3	5.7	mA
TEMPERATURE RANGE Specification Operating		-40		+85	$^\circ C$
		-40		+85	$^\circ C$

NOTES: (1) Measured with industry-standard noise test circuit (Figures 1 and 2). Due to errors introduced by this method, these current noise specifications should be used for comparison purposes only. (2) Offset voltage specification are measured with automatic test equipment after approximately 0.5 seconds from power turn-on. (3) Unnulled or nulled with $8k\Omega$ to $20k\Omega$ potentiometer. (4) Long-term voltage offset vs time trend line does not include warm-up drift. (5) Typical specification only on plastic package units. Slew rate varies on all units due to differing test methods. Minimum specification applies to open-loop test. (6) This parameter guaranteed by design.

Fotodetector

SPECIFICATIONS (PER ELEMENT)

Responsivity: 0.32 A/W min., 0.38 A/W typ. @ 632.8nm; 0.50 A/W min., 0.62 A/W typ. @ 900nm

Non-uniformity between elements: 5% deviation max., 1% typ.

Part Number	Total Area per Element (mm ²)	Shunt Resistance ¹		Dark Current ¹ at 5V		Breakdown Voltage ² at 10μA Typ. (V)	Capacitance ³ Typ.		NEP ⁴ at 632.8nm Typ. (W/√Hz)	NEP ⁵ at 950nm Typ. (W/√Hz)	Light ⁶ Power Density Typ. (mW/cm ²)	Response Time ⁷ at 10V Typ. (ns)
		Min. (MΩ)	Typ. (nA)	Max. (nA)	at 0V (pF)		At 10V (pF)					
Bi-Cell (Two Element Detectors)												
SD 066-24-21-011	0.67	500	0.2	1.0	50	15	3	2.1x10 ⁻¹⁴	1.2x10 ⁻¹⁴	10	7	
SD 113-24-21-021	3.1	250	0.9	5.0	50	60	13	4.3x10 ⁻¹⁴	2.5x10 ⁻¹⁴	10	8	
SD 160-24-21-021	2.3	300	0.7	3.5	50	45	9	4.3x10 ⁻¹⁴	2.5x10 ⁻¹⁴	10	7	
SD 385-24-21-041	18.5	40	6.0	31.0	50	390	85	5.0x10 ⁻¹⁴	2.9x10 ⁻¹⁴	10	32	
Quadrant (Four Element Detectors)												
SD 055-23-21-011	0.25	800	0.1	0.4	50	15	3	2.1x10 ⁻¹⁴	1.2x10 ⁻¹⁴	10	7	
SD 085-23-21-021	2.25	350	0.6	3.5	50	45	9	4.3x10 ⁻¹⁴	2.5x10 ⁻¹⁴	10	7	
SD 118-23-21-021	1.61	450	0.5	2.5	50	35	7	4.3x10 ⁻¹⁴	2.5x10 ⁻¹⁴	10	7	
SD 197-23-21-041	4.79	175	1.4	7.5	50	100	20	4.3x10 ⁻¹⁴	2.5x10 ⁻¹⁴	10	8	
SD 225-23-21-040	5.4	100	1.2	6.5	50	102	24	4.3x10 ⁻¹⁴	2.5x10 ⁻¹⁴	10	8	
SD 380-23-21-051	17.8	100	5.0	27.0	50	375	75	5.2x10 ⁻¹⁴	3.0x10 ⁻¹⁴	10	30	

* All specifications are per element. All values at 23°C

- Dark Current and Shunt Resistance vary with temperature as follows; for T≠23°C, $I_{DT} = I_{D23} \cdot 1.09^{\Delta T}$, $R_{SHT} = R_{SH23} \cdot 0.9^{\Delta T}$, where $\Delta T = (T-23)$ and I_{D23} and R_{SH23} are values at 23°C.
- Typical values listed. Minimum value shall be 50% of typical.
- Typical values listed. Maximum value shall be 20% higher than the typical.
- Test conditions are $V_B = 10\text{mV}$, and 632.8 nm.
- Test conditions are $V_B = 10\text{mV}$, and 950 nm.
- In photovoltaic mode. Maximum linear current specifies the level at which the output current characteristic deviates more than 10% from the straight line. The short circuit current saturates at approximately 10 times this level.
- Response Time (transition time between 10% and 90% of the output signal amplitude) measured at 670 nm with a 50Ω load. Shorter wavelengths will result in faster rise and fall times.

Storage and Operating Temperature Range for all photodiodes is -40°C to 110°C, except for the SD225-23-21-040, which is -25°C to 100°C.