

PINZAS ÓPTICAS, UNA HERRAMIENTA EFICAZ PARA MICROMANIPULACIÓN

Optical Tweezers, An Effective Tool For Micromanipulation

IBIS RICARDEZ V.^{1,3}, EBER E. OROZCO G.^{1,2} y JOSÉ A. HERNÁNDEZ N.^{1,3}

¹Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, 72000 Puebla, Pue. México

²Departamento de Física, Universidad de Carabobo, FACYT,
Valencia, Estado Carabobo, Venezuela

³Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 86690 Tabasco, México
irvargas@inaoep.mx, eorozco@uc.edu.ve, adan.hernandez@dais.ujat.mx

Fecha de recepción: 05/09/2007, **Fecha de Revisión:** 27/10/2007, **Fecha de Aceptación:** 14/11/2007

Resumen

Desde su invención en 1986, las pinzas ópticas han emergido como una potente herramienta de micromanipulación que actualmente cuenta con una banda amplia de aplicaciones en biología y física, donde es posible guiar, atrapar y separar objetos microscópicos como una célula usando únicamente luz láser fuertemente enfocada. En este trabajo se describe el principio físico de las pinzas ópticas y se presenta la manipulación de un espermatozoide humano como muestra de una aplicación biológica.

Palabras clave: Células biológicas, manipulación óptica, micropartículas, pinzas ópticas.

Abstract

Since their invention in 1986, optical tweezers have emerged as a powerful tool micromanipulation that at the moment has a broad-reaching applications in biology and physics where one may guide, trap and sort microscopic objects as a cell only using strongly focused light laser. In this article the physical principle of the optical tweezers is described and the manipulation of a human sperm is presented as sample of a biological application.

Key words: Biological cells, optical manipulation, microparticles, optical tweezers.

1. Introducción

Desde el siglo XVII se conoce el hecho de que la luz ejerce presión sobre la materia en la que incide. Johannes Kepler observó que la dirección que tomaba la cola de los cometas, la cual es siempre en sentido contrario a la posición del sol, era debido al empuje de la radiación solar, pero ahora sabemos que tal efecto se debe al viento solar. Dos siglos después, en 1873 James Clerk Maxwell demostró teóricamente que la luz por sí misma podía ejercer fuerzas ópticas, denominadas presión de radiación.

Posteriormente, dentro del marco de la mecánica cuántica, con el trabajo de Einstein y Planck, se pudo explicar que la luz también se comporta como un flujo de corpúsculos llamados fotones, que al igual que las partículas materiales, pueden ejercer presión sobre los objetos, e incluso, transferir momento (Hecht, 2000). Sin embargo, debido al orden de magnitud de estas fuerzas (pN), hubo que esperar hasta 1986 para que el científico estadounidense A. Ashkin de los laboratorios Bell describiera experimentalmente el uso de un haz láser para atrapar y manipular micropartículas dieléctricas (Ashkin *et al.*, 1986). Un año después demostró la utilidad de su técnica en organismos vivos atrapando virus, bacterias y protozoos (Ashkin & Dziedzic, 1987; Ashkin *et al.*, 1987).

Este método de micromanipulación conocida como pinzas ópticas, es actualmente una herramienta moderna usada principalmente en investigación biológica y médica, donde es posible mover, atrapar, torcer, etc. objetos microscópicos con luz y sin necesidad de tener contacto mecánico con ellos. El rango de tamaños de los objetos para manipulación va de decenas de nanómetros a decenas de micrómetros.

En este trabajo se discuten los principios físicos que permiten la captura óptica y presentamos la manipulación de un gameto masculino como una muestra del alcance de dicha tecnología.

2. Física de las pinzas ópticas

El principio físico del confinamiento de una micropartícula puede describirse de acuerdo a su tamaño. Si el diámetro D de esta es menor que la longitud de onda λ del haz nos encontramos en el régimen de campos ópticos o régimen de Rayleigh (en la práctica $D > 0.4\lambda$). En el caso contrario estamos en el régimen de rayos ópticos (en la práctica $D > 10\lambda$). Debido a que el tamaño de las partículas utilizadas en este trabajo es de unos pocos micrómetros, aplicamos el régimen de rayos ópticos y hacemos un análisis geométrico para describir la fuerza de captura. Aquí descomponemos el haz de luz en rayos individuales, cada uno con apropiada intensidad y dirección que se propagan en líneas rectas en un medio de índice de refracción uniforme. En esta aproximación tanto la longitud de onda como los efectos de difracción pueden ser despreciados. De acuerdo a este modelo, la operación básica de las pinzas ópticas puede ser explicada por la transferencia de momento lineal asociada con el cambio de trayectoria de los rayos en una interfaz dieléctrica ya sea por reflexión o por transmisión, y por la tercera ley de Newton (Ashkin *et al.*, 1986; Ashkin, 1992).

Para entender este fenómeno, consideramos un haz con perfil de intensidad Gaussiano fuertemente enfocado por una lente. Justo abajo del foco (o cintura del haz) colocamos una partícula transparente de alto índice de refracción n (mayor al del medio circundante n_m), como se muestra en la Fig. 1. Nos concentramos únicamente en el rayo a con momento lineal P_{ai} incidiendo sobre la esfera, el cual sufre un cambio en su momento debido a la refracción. Este rayo emerge finalmente de la esfera con un momento P_{af} , por lo que de un simple análisis vectorial de momentos obtenemos el cambio total en su momento ΔP_a . Ocurre entonces una transferencia de momento de la luz a la partícula, y en consecuencia, una correspondiente fuerza de reacción sobre la partícula (cambio de momento ΔP_a por unidad de tiempo Δt) en sentido opuesto, esto es, por la conservación del momento lineal, la

fuerza F_a ejercida sobre la partícula por el rayo a apunta en sentido opuesto a ΔP_a , y puesto que el rayo b incide simétricamente respecto al eje del haz se obtiene de un mismo análisis la fuerza F_b .

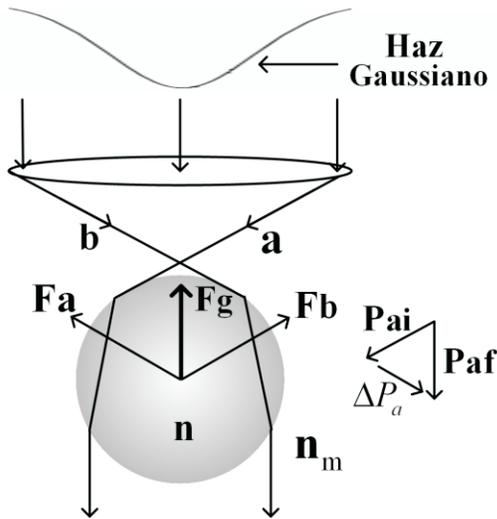


Fig. 1. Trazo de rayos mostrando las fuerzas de confinamiento axial de una partícula debido a un haz Gaussiano fuertemente focalizado. El diagrama de vectores indica el cambio de momento de la luz debido a la refracción.

Puesto que ambas fuerzas son de igual magnitud, el resultado total es una fuerza F_g que mueve a la partícula hacia la zona focalizada (trampa óptica) permitiendo que esta quede atrapada de forma estable y tridimensionalmente. Esta fuerza es conocida como fuerza gradiente debido a que apunta hacia la dirección de máxima intensidad del haz.

En un análisis de rayos más completo aparecen en realidad dos fuerzas. Una es la fuerza gradiente, descrita anteriormente, y la otra surge debido a la reflexión que sufren los rayos incidentes. De igual modo, bajo un simple análisis vectorial de momentos se encuentra que la fuerza resultante de los rayos reflejados apunta siempre en la dirección de propagación del haz, es decir, en sentido contrario a la fuerza de gradiente y es conocida como fuerza de esparcimiento F_s (Ashkin, 1992). Puesto que la luz es altamente transmitida (partículas transparentes), la fuerza de

esparcimiento es menor que la fuerza gradiente, condición que debe cumplirse para el confinamiento (Ashkin, 1991). Más aun, para obtener confinamiento axial, la F_g es tal que puede vencer a la F_s y al peso W de la partícula, es decir, $F_g > (F_s + W)$. Por esta razón no se presenta aquí el análisis de F_s , ya que además solo la fuerza gradiente es la responsable de la captura en este caso. Una desviación de la posición estable de la partícula en el centro de la trampa provocará una fuerza restauradora que la conducirá de nuevo a su posición de equilibrio, la cual puede ser calculada usando la expresión (Ashkin, 1992).

$$F = Q \left(\frac{nP}{c_0} \right) \quad (1)$$

Esta es la máxima fuerza ejercida por la trampa, Q es una constante de escalamiento que depende del tamaño de la esfera y de la diferencia de índice de refracción entre la esfera y el medio n_m que la rodea, por lo general agua. P es la potencia del láser y c_0 es la velocidad de la luz en el vacío.

3. Pinza óptica básica

En la Fig. 2 se describe el arreglo óptico básico de pinzas ópticas con un solo haz. Con este sistema se capturaron y manipularon microesferas dieléctricas transparentes de sílice.

El haz proveniente de un láser de Argón a una longitud de onda de 514 nm es expandido con el sistema de lentes L1 y L2 con el fin de que el haz llene completamente la apertura de salida del objetivo de microscopio y aumentar así el gradiente de intensidad focal, puesto que así se alcanza un buen confinamiento axial, es decir, en dirección vertical.

El par de espejos M1 y M2 sirven para controlar la dirección del haz, el cual posteriormente es desviado hacia el objetivo de microscopio de 100X (de inmersión en aceite) mediante el cubo divisor. De esta manera se logra

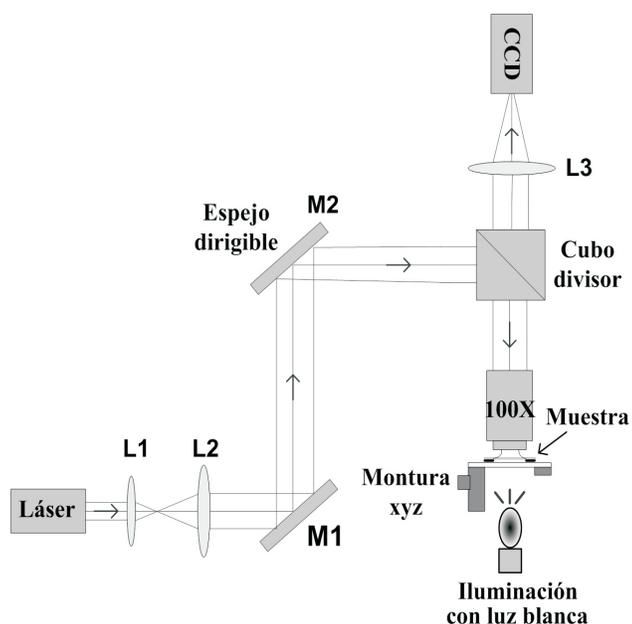


Fig. 2. Arreglo básico de pinzas ópticas para el confinamiento y manipulación de micropartículas.

tener un haz fuertemente enfocado sobre la muestra, la cual reposa en una montura con desplazamiento en xyz . La muestra consiste de microesferas sólidas de sílice ($n = 1.45$) suspendidas en agua ($n_m = 1.33$).

La observación del confinamiento se realiza mediante una cámara CCD cuando la muestra es iluminada con una lámpara convencional de luz blanca. La lente L3 permite enfocar la imagen de la escena a la CCD. La muestra es llevada al foco de la trampa mediante desplazamientos verticales ya que el objetivo permanece estático. De este modo las microesferas son atrapadas en 3D tal como lo predice la teoría.

En la Fig. 3 vemos una secuencia de imágenes mostrando la captura y manipulación tridimensional de una microesfera inorgánica de sílice con $5 \mu\text{m}$ de diámetro.

En las imágenes (a)-(b) se aprecia como la partícula es capturada. El haz proyectado sobre la muestra (círculo luminoso), cuyo diámetro es del orden del tamaño de la esfera, es dirigido hacia la partícula, el cual la succiona y la desplaza a otro

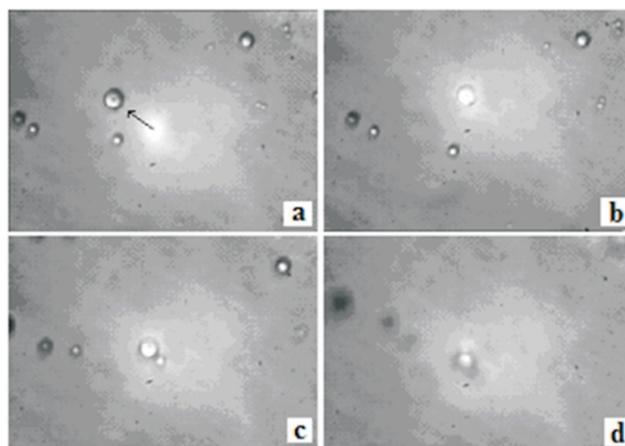


Fig. 3. De (a)-(b) se muestra el confinamiento y desplazamiento de la esfera. La captura en 3D es mostrada de (c)-(d).

3D se muestra de (c)-(d). Primero vemos la partícula atrapada, posteriormente la muestra es desplazada verticalmente hacia abajo manteniéndose sujeta la partícula, en consecuencia las otras partículas se desenfocan respecto a la que está capturada, lo que prueba efectivamente la captura en 3D. La potencia usada para el confinamiento fue de 15 mW sobre la muestra. Es obvio que para una mayor eficiencia de la trampa se requiere aumentar la potencia pero se corre el riesgo de provocar daño óptico.

4. Aplicaciones. Manipulando un espermatozoide

Las aplicaciones de las pinzas crecen vertiginosamente. Actualmente cuenta con amplias aplicaciones en ciencias biológicas donde se perfilan como una herramienta de trabajo para estudiar tejidos como los organelos de una célula, las moléculas de un virus o el mecanismo de transporte de una enzima, en tanto que para los médicos es una tecnología de alta precisión, útil en microcirugía y en la aplicación de métodos de reproducción asistida. Resulta difícil dar un panorama general de las aplicaciones de las pinzas ópticas puesto que es muy vasta, pero damos algunos ejemplos de referencias recientes donde se plantean algunas de sus aplicaciones más importantes, estas son: McGloin, 2006; Dholakia & Reece, 2006; Kuyper & Chiu, 2002.

En el caso de manipulación de material orgánico como una célula, se utilizan láseres que emiten en el infrarrojo ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) puesto que estos resultan ser inocuos para ese tipo de muestras debido a la poca absorción que presentan.

Como ejemplo de una aplicación en el campo de la biología, en la Fig. 4 podemos apreciar la captura y manipulación de un gameto masculino humano, realizada con el sistema experimental de la Fig. 2.

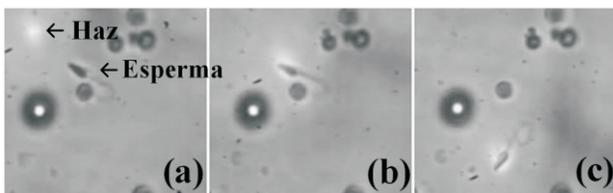


Fig. 4. Captura y manipulación de un esperma humano con el arreglo estándar de pinzas ópticas de un solo haz.

En (a) podemos ver nuevamente la sección transversal del haz (círculo luminoso) proyectado sobre la muestra, lo que representa la trampa óptica. Mediante sensibles micro desplazamientos de la muestra, la célula es llevada a la trampa donde es capturada por la cabeza como se aprecia en (b) y posteriormente es desplazada a otra posición, nuevamente bajo desplazamiento de la muestra como puede verse en (c), lo que muestra que efectivamente el gameto está atrapado.

La célula se encuentra suspendida en agua destilada y es atrapada con una potencia de 25 mW. Aquí la captura es bidimensional y es debida a la fuerza de esparcimiento. El gameto es confinado y arrastrado por efecto de la presión de radiación del haz contra el fondo de la muestra (portaobjeto) cuando este se encuentra por encima del foco del haz. El plano focal coincide con el fondo de la muestra (Ricárdez *et al*, 2005). Este método puede ser aplicable para la manipulación de otros tipos de materiales biológicos como leucocitos, eritrocitos, bacterias, etc., los cuales son objetos de estudio y análisis mientras permanecen sujetadas por las delicadas y eficaces brazos de las pinzas ópticas.

5. Conclusiones

Se ha presentado el fundamento básico de las pinzas ópticas de un solo haz en los aspectos teórico y experimental. También se mostró la eficacia de la técnica en la manipulación de un esperma humano, lo que podría aplicarse a procesos de inseminación artificial *in vitro*, por ejemplo, ya que además el método es no invasivo. Como se ha podido apreciar, las pinzas ópticas constituyen hoy en día una gran herramienta para la manipulación de otros tipos de microobjetos.

A nivel mundial, se trabaja actualmente en el desarrollo de nuevas técnicas de manipulación más eficaces que faciliten las aplicaciones y que permitan un mayor control en los métodos de capturas múltiples, por ejemplo. También se trabaja en el desarrollo experimental de las pinzas nanométricas para lograr la manipulación de objetos biológicos más pequeños como moléculas, virus, bacterias, DNA, etc; los cuales son de este orden de magnitud (Novotny *et al.*, 1997; Kuyper & Chiu, 2002).

6. Agradecimiento

Al Dr. Rubén Ramos García, impulsor de las pinzas ópticas en el NAOE, por su valiosa contribución en el desarrollo de este trabajo.

7. Bibliografía

Ashkin, A., J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm & S. Chu. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* 11 (5): 288-290.

Ashkin, A. & J. M. Dziedzic. (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 235 (4795): 1517-1520.

Ashkin, A., J. M. Dziedzic & T. Yamane. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 330 (6150): 769-771.

Ashkin, A. (1991). The study of cells by optical trapping and manipulation of living cells using infrared laser beams. *ASGSB Bulletin* 4 (2): 133-146.

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

Dholakia, K. & P. Reece. (2006). Optical micromanipulation takes hold. *Nanotoday* 1 (1): 18-27.

Hecht, E. (2000). *Óptica*, 3ra Ed. Addison-Wesley Latinoamericana. Madrid.

Kuyper, C. L. & D. T. Chiu. (2002). Optical trapping: A versatile technique for biomanipulation. *Applied Spectroscopy* 56 (11): 300A-312A.

McGloin, D. (2006). Optical tweezers: 20 years on. *Phil. Trans. R. Soc. A* 364: 3521–3537.

Novotny, L., R. X. Bian & X. S. Xie. (1997). Theory of nanometric optical tweezers. *Phys. Rev. Lett.* 79 (4): 645-648.

Ricárdez, I., M. D. Iturbe, R. Ramos, K. Volke & V. Ruíz. (2005). Hollow spheres as individual movable micromirrors in optical tweezers. *Opt. Express* 13 (3): 968-976.