Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

CARACTERIZACION DE UN SISTEMA DE MICROMANIPULACION OPTICA

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

TETH AZRAEL CORTES AGUILAR

ENSENADA BAJA CALIFORNIA MEXICO AGOSTO DEL 2005

TESIS DEFENDIDA POR

Teth Azrael Cortés Aguilar

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Victor Ruiz Cortés
Director del Comité

Dr. Kevin Arthur O`Donnell
Miembro del Comité

Dr. Serguei Miridonov
Miembro del Comité

Dr. Santiago Camacho López
Miembro del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Coordinador del programa de posgrado en Óptica

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

22 de Agosto de 2005

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

CICESE

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN ÓPTICA

CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE MICROMANIPULACIÓN ÓPTICA

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

TETH AZRAEL CORTÉS AGUILAR

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2005.

RESUMEN de la tesis de **Teth Azrael Cortés Aguilar**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ÓPTICA. Ensenada, Baja California. Agosto del 2005.

CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE MICROMANIPULACIÓN ÓPTICA

Resumen aprobado por:

Dr. Víctor Ruiz Cortés
Director de Tesis

El sistema de micromanipulación óptica es una técnica no invasiva que permite la manipulación de objetos inertes y biológicos de micrómetros de diámetro, mediante un haz láser enfocado. Este sistema ha generado nuevos métodos experimentales en el control dinámico de pequeños objetos, siendo extensiva su aplicabilidad a múltiples campos de la física y de la biología. La necesidad de conocer los alcances y los límites de esta técnica conducen a un estudio minucioso del diseño óptico involucrado en los arreglos experimentales, así como a la comprensión de los fenómenos físicos trascendentes, tales como la presión debida a la radiación y las fuerzas que se desencadenan al ocurrir la transferencia del momento de los fotones hacia el objeto.
A partir de la primera trampa óptica realizada por A. Ashkin (Ashkin, 1997), se han propuesto varios diseños para la construcción de micromanipuladores ópticos, desde la adaptación de múltiples haces, hasta la integración del láser pulsado para escisiones en objetos biológicos, cada uno, con un propósito de aplicación o demostración en particular.
En esta tesis se construyó y caracterizó un sistema de micromanipulación óptica con uno y dos haces de manipulación. Se realizaron mediciones experimentales sobre la fuerza principal causante del asimiento de objetos, y además se incluye un análisis de los efectos hidrodinámicos y termodinámicos inherentes a los objetos de experimentación. Así como la manipulación de especímenes biológicos.

Palabras clave: Micromanipulador Óptico, Pinzas Ópticas, Presión de la Radiación, Fuerza Gradiente, Manipulación biológica no invasiva.

ABSTRACT of the thesis presented by **Teth Azrael Cortés Aguilar** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in OPTICS. Ensenada, Baja California, Mexico. August 2002.

OPTICAL MICROMANIPULATION SYSTEM DESCRIPTION

An optical micromanipulation system is a noninvasive technique that allows the manipulation of biological and inert objects of micrometer diameter using a focused laser beam. This system has encouraged new experimental methods for dynamic control of small objects. Its applicability is extensive in many fields of physics and biology. The necessity of knowing its operational range has lead to meticulous study of the optical design of the experimental apparatus, and the understanding of physical phenomena, such as, radiation pressure and forces due to momentum transfer from photons to an object.

Starting with A. Ashkin's first optical trap, many optical micromanipulation designs have been proposed, from multiple beam adaptation techniques to pulsed lasers as optical scissors in biological objects, each of them with some application, purpose, or demonstration.

We built and characterized an optical micromanipulation system with one or two laser beams. Experimental measurements of gradient forces have been obtained. The thesis included a study of the hydrodynamic and thermodynamic effects that are inherent to the objects used in our experiments. Further biological specimens have been manipulated.

Keywords: Optical Micromanipulation, Optical Tweezers, Radiation Pressure, Gradient Force, Noninvasive biological manipulation.

DEDICATORIA

Deus Dominus et illuxit nobis. Deus meus es tu,
et confitebor tibi, Deus meus, et exaltabo te.

In Memoriam

Maria Guadalupe Robles Camarena

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia por su ayuda y la confianza en mi persona, y en especial a la paciencia, apoyo y consejos de mi mamá Rocío Aguilar Robles, de mis hermanos Abdel, Lizette y Eulises, así como también a la ayuda de mi bisabuela Filomena y sus hijos Virginia, Victor y familia.

Agradezco al Director de Tesis el Dr. Victor Ruiz Cortés, a los sinodales, la Dra. Rosa Mouriño, al Dr. Kevin O'Donell, al Dr. Serguei Miridonov y al Dr. Santiago Camacho por su apoyo, comentarios y correcciones.

Agradezco a la Dra. Carmen Paniagua y la Dra. Louerdes Trujillo del Departamento de Acuicultura del CICESE por la donación de muestras, al igual que a la Dra. Elena Tchaikina por el préstamo de equipo de laboratorio. Extiendo mi agradecimiento por el apoyo técnico brindado en la realización de esta tesis a Pedro Leree, Marco García, Fabian Cordero y Marcia Padilla

Agradezco a todos a mis compañeros de estudio los buenos y arduos momentos de trabajo y de esparcimiento que compartimos.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de los estudios de maestría y tesis llevados a cabo en el CICESE.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Introducción	2
I.2 Antecedentes	5
I.3 Objetivos	11
I.3.1 Objetivo general	11
I.3.2 Organización del trabajo	11
II. PRINCIPIO DE OPERACIÓN	13
II.1 La presión de la radiación	14
II.1.1 La fuerza de la presión de la radiación	15
II.1.2 Comportamiento en la cintura de la fuerza de la presión de la radiación para haces enfocados con perfil de intensidad gaussiano	22
II.2 Descripción de fuerzas	26
II.2.1 Análisis de las fuerzas que actúan sobre la partícula sin asimiento	26
II.2.1.1 Movimiento Browniano	32
II.2.1.2 Efectos de Floculación	39
II.2.2 Análisis de las fuerzas que actúan sobre la partícula durante el asimiento	42
II.2.2.1 Descomposición de fuerzas, la Fuerza de Esparcimiento, la Fuerza Gradiente y la Fuerza Resultante	45
III. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN	57
III.1 Diseño de un manipulador óptico y sus implicaciones	58
III.1.1 Esquema de un manipulador y los elementos que lo integran	59
III.1.2 Las ventajas del sistema afocal	62
III.1.3 El objetivo de microscopio, los efectos de aberración y viñeteo como menoscabo en la eficiencia del asimiento	70
III.1.4 Cálculo para el desplazamiento transversal de la cintura del haz enfocado según variaciones angulares en el espejo de la montura gimbal	78
III.2 Distribución de la potencia óptica en el arreglo experimental	81
III.2.1 Distribución de la potencia en el arreglo experimental de un sistema de manipulación dual	85
III.3 Longitud de onda de operación de los diodos láser para el sistema de manipulación dual	91

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV. APLICACIONES BIOLÓGICAS	93
IV.1 Aplicaciones biológicas del láser	94
IV.1.1 Efectos de la absorción de la energía	96
IV.1.2 Efectos de la longitud de onda en el metabolismo celular	100
IV.2 Experimentos de manipulación óptica con especímenes biológicos	101
IV.2.1 Discusión y conclusiones sobre los experimentos de manipulación óptica con especimenes biológicos.	110
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
V.1 Resultados experimentales sobre la medición de la fuerza gradiente para partículas dieléctricas	112
V.1.1 Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz	133
V.2 Discusión de resultados	137
VI. CONCLUSIONES	146
VI.1 Conclusiones	147
LITERATURA CITADA	150
APÉNDICE A Datos experimentales para la fuerza gradiente	154
APÉNDICE B Técnica de control de la platina por interfaz gráfica en la computadora	157
APÉNDICE C Platina ensamblada al nanoposiciondor	159
APÉNDICE D Descripción de los videos anexos a la tesis	160

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	(a) Diseño de pinzas ópticas propuesto por Bechhoefer y Wilson. 2002 (b) Diseño de pinzas ópticas propuesto por Fällman y Axner. 1997.....	6
2	(a) Diseño de pinzas ópticas propuesto por Liesener, *et al.*, 2000 (b) Diseño de pinzas ópticas propuesto por Glückstad *et al.*, 2002.....	7
3	(a) Diseño de pinzas ópticas propuesto por Emiliani *et al.*, 2004 (b) Diseño de pinzas ópticas propuesto por Ruiz y Wang, 2003.....	9
4	Refracción y reflexión para la incidencia de un rayo de luz sobre una esfera.....	21
5	Evolución longitudinal de la sección transversal de la presión de la radiación C_{pr} con la partícula localizada en el eje del haz con propagación en el eje z (Gouesbet *et al.*, 1994).	23
6	Descomposición axial y longitudinal de la fuerza de la presión de la radiación en la cintura de un haz gaussiano enfocado.....	24
7	Descripción de la fuerza de empuje para una esfera.....	27
8	Caída de una esfera a través de un fluido, sujeta a la fuerza de empuje, el peso de la esfera y la fuerza de arrastre.....	30
9	Posición de una sola esfera de poliestireno en la muestra preparada para asimiento óptico.....	32
10	Predicción de Einstein sobre los desplazamientos cuadráticos medios en el tiempo, para una partícula que presenta movimiento Browniano.....	34
11	Agrupación de partículas Coloidales.....	40
12	Floculación de partículas por efecto de cargas eléctricas.....	41
13	(a) Componente de fuerza de esparcimiento y componente de fuerza gradiente. (b) Trampa de dos haces en contra propagación...	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14	Refracción del rayo marginal al incidir sobre una esfera.....	49
15	Descomposición vectorial de fuerzas según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en una posición posterior al foco.....	50
16	Descomposición vectorial de fuerzas según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en una posición anterior al foco.....	52
17	Dirección de la fuerza resultante según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en distintas posiciones al interior respecto al foco.....	54
18	Dirección de la fuerza resultante según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en distintas posiciones al exterior respecto al foco.....	55
19	Esquema de un manipulador óptico con un solo haz para asimiento.....	59
20	Configuración del sistema afocal y sus variaciones.....	62
21	Plano de intersección de haces en un sistema afocal.....	63
22	Diagrama de manchas a la entrada del objetivo de microscopio sin efectos de truncamiento.....	65
23	Diagrama de manchas a la entrada del objetivo, con efectos de truncamiento para variaciones angulares.....	66
24	Efectos de truncamiento en el perfil de un haz de intensidad gaussiano.....	67
25	Diagrama de manchas, efectos de aberración inducidos por el sistema afocal.....	70

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
26	Objetivo de microscopio de apertura numérica grande, según diseño de Warren Smith (Smith, 1992).....	71
27	Diagrama de viñeteo para el objetivo de microscopio.....	72
28	Identificación del centroide y radio para un diagrama de manchas a la salida del objetivo de microscopio.....	73
29	Diagrama de manchas, efectos de aberración para variaciones angulares del haz de entrada al objetivo de microscopio.....	74
30	Porcentaje de energía comprendida en un área delimitada para variaciones angulares a la entrada del objetivo de microscopio.....	75
31	Degradación de fuerzas para desplazamientos fuera de eje.....	77
32	Relación de la inclinación angular y el desplazamiento transversal de la cintura.....	78
33	Esquema de medición de potencias contra variación en la fuente de corriente en el arreglo experimental para posiciones 4 y 5 del detector.....	82
34	Variación de la potencia óptica contra corriente de alimentación del diodo láser 1, para la posición 4 en el arreglo experimental...	82
35	Variación de la potencia óptica contra corriente de alimentación del diodo láser 1, para la posición 5 en el arreglo experimental...	84
36	Sistema de manipulación dual y esquema de posiciones para la medición de la potencia óptica.....	85
37	Medición de la potencia óptica para el diodo D1 y D2 en la posición 5 condicionada a carga única en la fuente de alimentación.....	88

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
38	(a) Distribución de la potencia óptica para el diodo D1 en el sistema de manipulación dual. (b) Distribución de la potencia óptica para el diodo D2 en el sistema de manipulación dual.....	89
39	Longitud de onda de los diodos D1 y D2 del sistema de manipulación dual para la potencia óptica máxima.....	92
40	Coeficiente de absorción del agua contra la longitud de onda de la luz.....	98
41	Asimiento óptico de glóbulos rojos diluidos en agua, muestra contaminada.....	102
42	Agrupamiento de microalgas *thalassiosira sp.* mediante asimiento óptico.....	104
43	Contracción de una microalga *Phaedactylum tricornutum* de contorno romboide por efecto del asimiento óptico a una forma esférica.....	106
44	Fenómeno de repulsión óptica en un residuo de agar	107
45	Manipulación de microalga *Rhodomonas sp*.....	109
46	Descripción de coordenadas para el asimiento de una partícula donde el eje z es colineal al eje óptico del sistema de manipulación.....	112
47	Distribución de la fuerza gradiente, cuando una partícula esta sometida a una fuerza de arrastre.....	114
48	Esquema de los elementos que componen el sistema de control de la platina por computadora, línea de control (a), y mediante generador de funciones, línea de control (b).	116
49	Desplazamiento de la platina, (a) mediante generador de funciones, (b) mediante equipo de cómputo.....	117
50	(a) Colocación de la muestra de partículas dieléctricas sobre el portaobjetos. (b) Colocación de la muestra *in situ* sobre el arreglo.....	119

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
51	Esquema de la medición de la fuerza gradiente para diferente posición de la trampa óptica en el plano del espécimen.....	122
52	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 10μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.....	123
53	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 10μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.....	124
54	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 5μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.....	125
55	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 5μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.....	126
56	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 3μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.....	127
57	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 3μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.....	128
58	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 2μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.....	129

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
59	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 2μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.....	130
60	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 1μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.....	131
61	Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 1μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.....	132
62	Esquema del arreglo experimental para la demostración de la dependencia de la fuerza gradiente del estado de polarización de la luz.....	133
63	Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz para la partícula de 5μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica, (a) en el eje x, (b) en el eje y.....	134
64	Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz para la partícula de 3μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica, (a) en el eje x, (b) en el eje y.....	135
65	Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz para la partícula de 2μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica, (a) en el eje x, (b) en el eje y.....	136
66	Comportamiento de la fuerza total Fr de la ecuación (17) según un incremento en el ancho del haz.....	139
67	Variación del ancho de la cintura del haz enfocado respecto a z y su relación con el diámetro de la partícula.....	140

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
68	Identificación de una fuerza de asimiento mínima y una fuerza de asimiento óptima según el comportamiento de la fuerza gradiente para distintos diámetros de la partícula.....	143
69	Variación de la fuerza gradiente respecto al diámetro de la partícula para polarización s y p del haz de asimiento.....	145
70	(a) Interfaz gráfica en pantalla del ordenador. (b) esquema de los elementos que componen el sistema de control.....	157
71	Diseño de la platina de aluminio ensamblada al nanoposicionador.....	159

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Cálculos numéricos de William Irving para el factor de eficiencia de la presión de la radiación (Irvine, 1965).....	20
II	Propuestas de mejor rendimiento al manipulador con modificación de parámetros al sistema afocal.....	68
III	Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 4.....	83
IV	Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 5.....	84
V	Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 5 para el diodo D1 bajo sistema de manipulación dual.....	86
VI	Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 5 para el diodo D2 bajo sistema de manipulación dual.....	87
VII	Tipos de interacción de la luz con la materia en aplicaciones medico biológicas (Greulich, 1999).....	94
VIII	Especificaciones técnicas de las partículas dieléctricas utilizadas en los experimentos.....	119
IX	Parámetros experimentales importantes en el asimiento óptico de partículas dieléctricas según su diámetro.....	119
X	Datos experimentales para la fuerza gradiente mediante la técnica del desplazamiento de la platina por el generador de funciones.....	152
XI	Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *x*, polarización s.....	153

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XII	Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *y*, polarización s.....	152
XIII	Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *x*, polarización p.....	153
XIV	Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *y*, polarización p.....	153

CAPÍTULO
I

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se comenta brevemente a manera de introducción el descubrimiento del fenómeno de asimiento óptico y la evolución de los arreglos experimentales de pinzas ópticas así como los objetivos que persigue este trabajo de tesis.

I.1 INTRODUCCIÓN

Las técnicas de asimiento óptico y manipulación de partículas neutras y organismos biológicos por láser proveen medios únicos para el control dinámico de posición y movimiento. El desarrollo de nuevos métodos experimentales comenzó con los trabajos publicados por Arthur Ashkin, (Ashkin, 1997).

El asimiento óptico de pequeñas partículas neutras por láser está basado en fuerzas desencadenadas por la presión de la radiación, originadas por la transferencia del momento de los fotones del haz de luz hacia la partícula dieléctrica, (Ashkin *et al.*, 1986). La fuente de luz coherente de un láser, genera una presión por radiación suficiente que permite el movimiento de materia observable en la tierra; aplicaciones significativas de la presión de la radiación, anteriores a los trabajos de Ashkin solo eran apreciables en la astronomía. Las fuerzas ejercidas son lo suficientemente grandes para acelerar, decelerar, desviar, guiar y asir establemente partículas de micrómetros de diámetro, como consecuencia de la alta intensidad y grandes gradientes alcanzados con un haz láser.

En aplicaciones biológicas de asimiento y manipulación óptica es posible aplicar fuerzas controladas sobre células vivas sin infligir daños considerables, en comparación con la técnica invasiva por punzones. Además, importantes resultados se están obteniendo en el estudio de moléculas motoras, donde, mediante un juego de pinzas ópticas es posible medir dichas fuerzas en el orden de los piconewton. Recientemente se están realizando investigaciones de las propiedades mecánicas de las membranas celulares a fin de

diagnosticar con anticipación posibles patologías destructivas del citoesqueleto celular, como ocurre en los distintos tipos de cáncer (Käs *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se han publicado numerosos artículos donde se aborda experimental (D'Helon *et al.*, 1994; Felgner *et al.*,1995 y Singer *et al.*, 2000) y teóricamente (Tlusty *et al.*, 1998 y Nieminen *et al.*, 2001) las fuerzas que ocurren en el asimiento. Por convención a la nomenclatura propuesta por Ashkin, se reconocen dos componentes de fuerza neta que se ejercen sobre una esfera dieléctrica inmersa en agua. La fuerza de esparcimiento, cuya componente apunta en la dirección de propagación de la luz incidente y la componente de fuerza gradiente que surge del gradiente de la intensidad de luz y apunta axialmente hacia la región de mayor intensidad del haz. La fuerza de esparcimiento y gradiente llegan a ser ortogonales entre sí. Se considera como asimiento estable cuando la razón de la fuerza gradiente entre la fuerza de esparcimiento es mayor o igual a la unidad $F_{grad}/F_{scat} \geq 1$, de ahí se deduce que la fuerza de esparcimiento sea considerada como un factor de inestabilidad cuando resulta ser predominante. En contraste, la fuerza gradiente es la causante principal de la estabilidad de una trampa, es debido a esta componente, por lo cual es posible guiar una partícula asida, en oposición a las fuerzas de arrastre hidrodinámicas (Lamb, 1945) inducidas por el movimiento.

En la sección posterior, se verá como con el transcurrir del tiempo se han propuesto distintos diseños ópticos de micromanipuladores, cada uno presenta sus ventajas y desventajas, y persigue un fin demostrativo o aplicativo según los intereses del diseñador. En este trabajo se construyó un sistema de pinzas ópticas con una tendencia a las aplicaciones de la manipulación óptica de especímenes biológicos. Se siguió un criterio de

diseño de mínima inversión y máximo rendimiento, con la intención de reducir el costo económico y contribuir a la expansión tecnológica. Además se caracterizó el sistema, con el propósito de conocer los alcances y límites permisivos por el diseño implementado.

No existe un método experimental universalmente aceptado que permita el cálculo de las fuerzas de asimiento, es de particular interés conocer el comportamiento y magnitud de la fuerza gradiente. En consecuencia, en este trabajo se propone e implementa un método para el cálculo de la fuerza gradiente.

Los experimentos de manipulación con especimenes biológicos, representan un campo virgen para la investigación. Por ser una labor interdisciplinaria la colaboración es sumamente importante si se desean alcanzar resultados destacables. En este trabajo se documentó gráficamente fenómenos ocurridos en muestras biológicas durante y posterior al asimiento óptico, discutibles y factibles para un análisis minucioso.

I.2 ANTECEDENTES

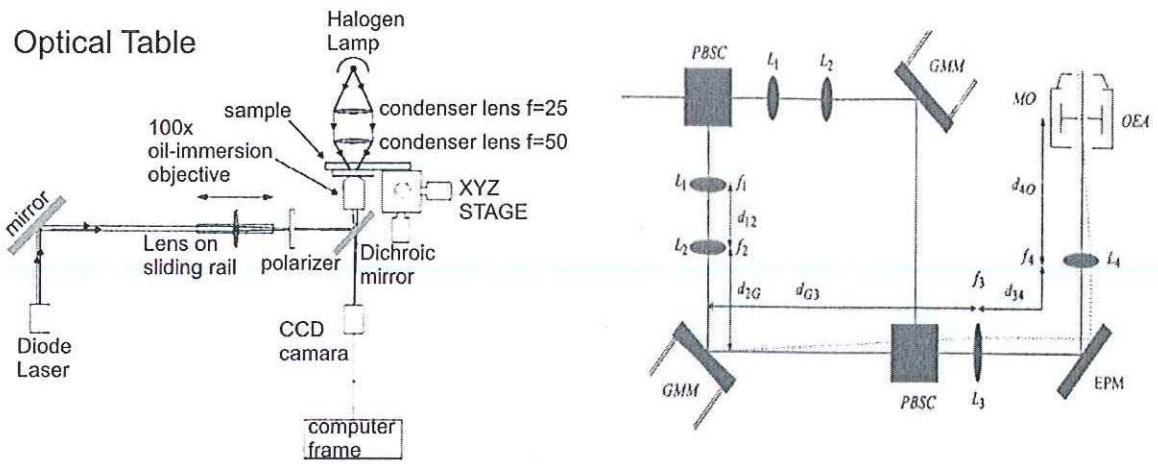
El asimiento óptico de pequeñas partículas fue un descubrimiento circunstancial. En 1970 Arthur Ashkin desarrollaba una investigación con el propósito de calcular el orden de magnitud de la fuerza debida a la presión de la radiación de la luz de un láser sobre una partícula de radio aproximado a la longitud de onda de la luz. Descubrió que a pesar de las pequeñas fuerzas que se ejercen, la aceleración sobre las partículas es significativa, debido a la pequeña masa de las partículas, aproximadamente 10^5g, donde g es la aceleración gravitacional (Ashkin, 1997).

Una observación sumamente importante de experimentos posteriores realizados por Ashkin (Ashkin *et al.*, 1986), fue la identificación de las componente de fuerza gradiente y de esparcimiento, lo cual, finalmente condujo a los primeros arreglos de trampas ópticas o pinzas ópticas.

El diseño más simple de una pinza óptica, consiste en adaptar un haz láser a la entrada de un objetivo de microscopio y sustituir el sistema de visión de los oculares por una cámara CCD (Charge Couple Device). El arreglo experimental de la figura 1 (a) propuesto por Bechhoefer y Wilson (Bechhoefer *et al.*, 2002) tiene a su favor la sencillez y el precio económico de su construcción, sin embargo, el inconveniente que presenta, estriba en la capacidad de manipulación por que no contempla el uso de un sistema afocal.

El diseño de un sistema de manipulación dual, como el que se muestra en la figura 1 (b), fue propuesto por Fällman y Axner (Fällman *et al.*, 1997), en él se hace hincapié en el uso de un sistema afocal, con el propósito de asegurar la no obstrucción del haz de luz a la

entrada del objetivo de microscopio, para variaciones angulares del espejo empotrado en la montura tipo gimbal GMM (Gimbal Mounted Mirror), además se contempla el uso de un prisma divisor de haz por polarización, para la generación y unión de dos haces manipuladores. El diseño propuesto en esta tesis esta basado en una modificación al arreglo de Fällman.

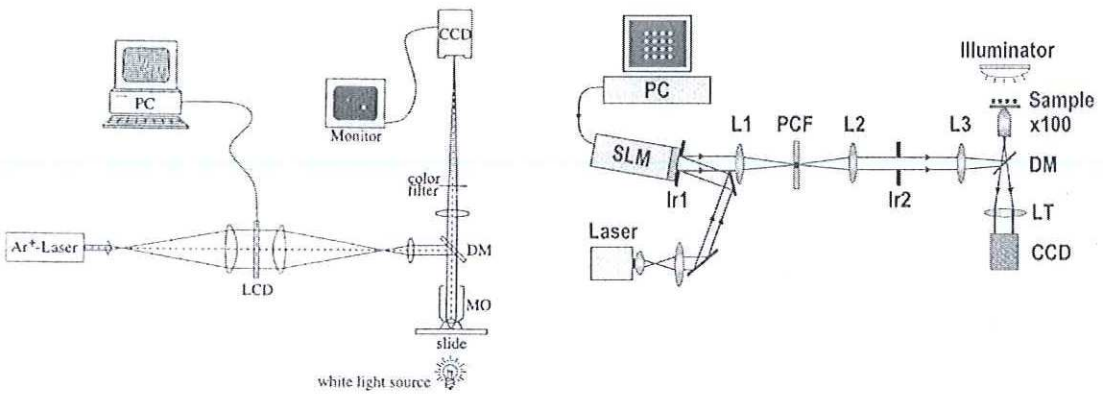


(a) (b)

Figura 1 (a) Diseño propuesto por Bechhoefer y Wilson, 2002. (b) Diseño propuesto por Fällman y Axner, 1997.

Siendo posible manipular una o dos trampas individualmente, los diseñadores han extendido la capacidad de las pinzas ópticas a la manipulación de varias trampas, así como a mejorar la eficiencia en el asimiento.

La utilización de hologramas generados por computadora usando un LCD (Liquid Crystal Display) con la finalidad de modificar la sección transversal de un haz y proyectar varias trampas en el plano del espécimen fue explorado por Liesener (Liesenar *et al.*, 2000). Esta técnica posee dos variantes en la incidencia del haz al holograma. En la figura 2 (a) se muestra el método de transmisión, cuya eficiencia en lo que respecta a potencia es muy baja, por otro lado el método por reflexión mejora la eficiencia pero aumenta el costo y la complejidad tecnológica requerida en el sistema.



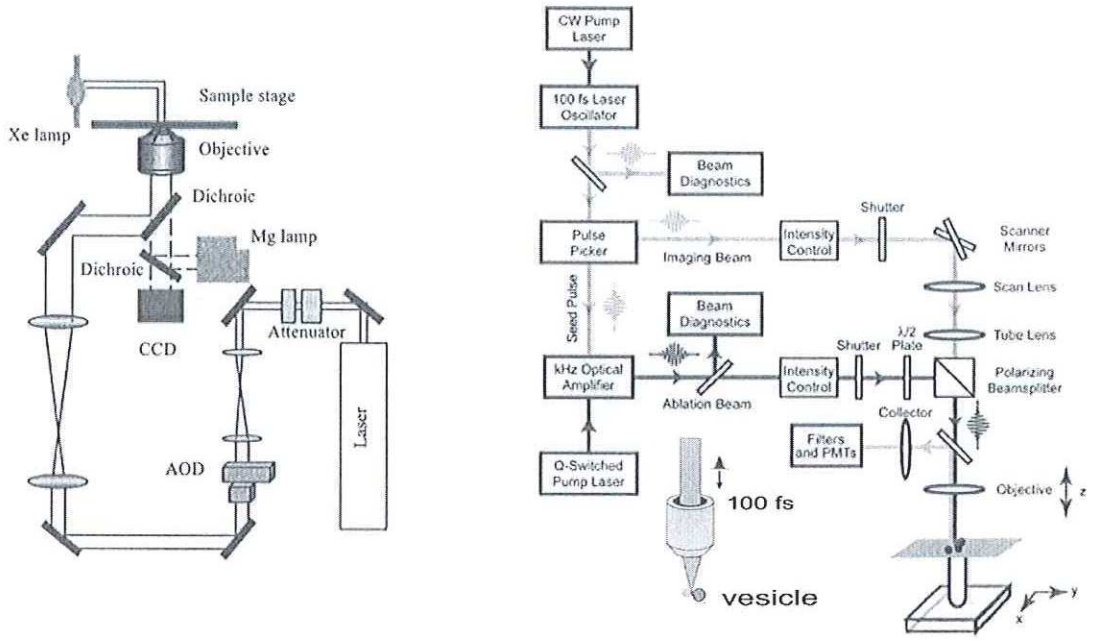
(a) **(b)**

Figura 2 (a) Diseño propuesto por Liesener *et al.*, 2000. (b) Diseño propuesto por Glückstad *et al.*, 2002.

Siendo el método por reflexión el idóneo, los esfuerzos de los diseñadores se encauzaron a reducir su complejidad. En un trabajo publicado por Glückstad, Eriksen y Daria (Glückstad

et al., 2002) se comenta la utilización de un modulador espacial de luz por fase SLM (Spatial Light Modulator), que permite generar dinámicamente un patrón de trampas en el plano del espécimen, figura 2 (b). Las propuestas de Liesener y de Glüsckstad sobre el diseño de pinzas ópticas presenta dos aspectos deficientes: en la generación de los patrones no se cuida el gradiente de la intensidad para cada una de las trampas, además la agilidad en la manipulación depende del tiempo maquina que requiere el ordenador para generar un patrón, dicho tiempo aumenta con la complejidad del patrón.

Un método plausible para la generación de "múltiples trampas" y su manipulación con relativa agilidad, es el propuesto por Emiliani, (Emiliani *et al.*, 2004). La utilización de un desviador acústico óptico AOD (Acoustic Optic Deflectors) del haz láser, implica realizar un barrido en posición de una sola trampa en el plano del espécimen en un lapso de tiempo muy corto, de tal manera que varias partículas sean capturadas "simultáneamente" figura 3 (a). Se puede decir que el estado de arte en lo que respecta al diseño de pinzas ópticas, se encuentra en la propuesta de Emiliani.



(a) **(b)**

Figura 3 (a) Diseño propuesto por Emiliani *et al.* 2004. (b) Diseño propuesto por Ruiz y Wang, 2003.

En algunas aplicaciones biológicas se requiere hacer incisiones sobre un espécimen. La introducción del láser pulsado en el diseño de pinzas ópticas conduce a la integración de un sistema más completo que extiende el campo de aplicación (Greulich, 1999). La figura 3 (b) muestra la propuesta de integración de un láser pulsado del orden de 10^{-15} segundo a un sistema de pinzas ópticas (Ruiz *et al.*, 2003).

Dado que la fuerza gradiente es la componente trascendental en el asimiento de partículas, recientemente se está realizando investigación sobre la modificación del perfil de la

intensidad del haz enfocado en las pinzas ópticas. De usarse haces con perfil Gaussiano, la experimentación se esta trasladando a la aplicación de haces con perfiles *Laguerre-Gaussian* (Dholakia *et al.*, 2002), estos haces poseen una sección transversal en forma de dona con cero intensidad al centro (haces *doughnut* y *cogwheel*). El estudio de este tipo de haces toma relevancia a partir del hecho de que un haz Gaussiano no puede asir cuerpos con un índice de refracción menor al medio circundante, en teoría este tipo de cuerpos y su contraparte pueden ser capturados en un pozo de potencial generado por un haz con perfil *Laguerre-Gaussian* (Jesacher *et al.*, 2004).

A pesar de que las pinzas ópticas surgieron circunstancialmente de un estudio de las fuerzas debido a la presión de la radiación. El análisis de las componente de fuerza, y en especial la de la fuerza gradiente no es abordada con la debida profundad. Los resultados experimentales publicados al respecto son pocos. La gran mayoría de los artículos científicos abordan el diseño y aplicaciones de las pinzas ópticas, limitando el cálculo de la fuerza gradiente al cálculo de la fuerza de arrastre hidrodinámica deducida por Stokes (Lamb, 1945). La obtención experimental de dicha fuerza es en sí un reto tecnológico por las complicaciones implicadas.

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de pinzas ópticas con manipulación dual, para el asimiento de especimenes biológicos. Caracterizar el instrumento en los siguientes parámetros: a) Sobre diseño óptico y sus implicaciones en el funcionamiento optimizado; b) Sobre la distribución de la potencia óptica en el arreglo y la identificación de los factores limitantes; c) Sobre la medición experimental de la fuerza gradiente en magnitud y comportamiento para muestras esféricas de poliestireno inmersas en agua destilada.

I.3.2 ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO

En el capítulo primero de esta tesis se comenta brevemente a manera de introducción el descubrimiento del fenómeno de asimiento óptico y la evolución de los arreglos experimentales de pinzas ópticas así como los objetivos que persigue este trabajo de tesis.

En el capítulo segundo se tratan los fundamentos teóricos que sustentan el fenómeno del asimiento óptico, su relación con la presión debida a la radiación, y los fenómenos físicos inherentes a las muestras que están presentes antes y después del asimiento.

En el capítulo tercero se aborda la caracterización del instrumento en general, resaltando los aspectos sobre diseño óptico, también se trata la distribución y aprovechamiento de la potencia óptica en el arreglo experimental.

En el capítulo cuarto se comentan los experimentos realizados con especimenes biológicos y se abordan brevemente los aspectos trascendentales en la interacción de láser con organismos vivos.

En el capítulo quinto se presentan los resultados experimentales sobre la medición de la fuerza gradiente en magnitud y comportamiento así como su discusión.

En el capítulo sexto se abordan las conclusiones del trabajo realizado en esta tesis.

CAPÍTULO
II

PRINCIPIO DE OPERACIÓN

En este capítulo se tratan los fundamentos teóricos que sustentan el fenómeno de asimiento óptico, su relación con la presión debida a la radiación, y los fenómenos físicos inherentes a las muestras que están presentes antes y después del asimiento.

II.1 LA PRESIÓN DE LA RADIACIÓN

En 1873 Maxwell publicó: "*En un medio en el que las ondas se propagan, hay una presión en la dirección normal a las ondas, numéricamente igual a la energía en una unidad de volumen*" (Hecht, 2000). Una onda electromagnética que incide en la superficie de un material interacciona con las cargas que constituyen el material masivo. Independientemente de que la onda sea absorbida parcialmente o reflejada, ejerce una fuerza sobre aquellas cargas y por consiguiente sobre la superficie misma. Por ejemplo en el caso de un buen conductor, el campo eléctrico $\vec{E}$ de la onda genera unas corrientes mientras que su campo magnético $\vec{H}$ genera unas fuerzas sobre esas corrientes. La presión de la radiación *P*, equivale a la densidad de la energía de la onda electromagnética. Una forma de expresar la presión de la radiación en términos de la magnitud del vector de Poyntig *S(t)* es (Hecht, 2000)

$$P(t) = \frac{S(t)}{c} \left[N/m^2 \right] . \qquad (1)$$

La ecuación anterior tiene unidades de fuerza entre área. Esta es la presión instantánea que se ejercería en una superficie perfectamente absorbente debida a la incidencia normal de un haz. Donde c es la velocidad de la luz en el vacío ($c = 2.997 \times 10^8 m/s$). El vector de Poynting se define como: $\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H}$

En consecuencia de que los campos eléctrico $\vec{E}$ y magnético $\vec{H}$ cambian rápidamente, S(t) también cambia rápidamente, por lo tanto es conveniente considerar el promedio en el tiempo de la presión de la radiación dado por (Hecht, 2000)

$$\langle P(t)\rangle_t = \frac{\langle S(t)\rangle_t}{c} = \frac{I}{c} \quad \left[N/m^2\right], \tag{2}$$

donde I es la irradiancia, la cual a su vez es proporcional al cuadrado de la amplitud del campo eléctrico $I \equiv \langle S(t)\rangle_t = \frac{c\varepsilon_0}{2} E_0^2$.

II.1.1 LA FUERZA DE LA PRESIÓN DE LA RADIACIÓN

Considere el caso de una partícula cuyo radio a sea mayor a la longitud de la onda λ, que es iluminada por una fuente de luz distante. Sea I_0 la intensidad de la luz incidente, I la irradiancia de la luz esparcida a un punto a una distancia r de la partícula, sea k el número de onda definido como $k=2\pi/\lambda$, donde λ es la longitud de onda en el medio circundante. Entonces la irradiancia de la luz esparcida es (Van de Hulst, 1981)

$$I = \frac{I_0 F(\theta,\varphi)}{k^2 r^2}, \tag{3}$$

donde $F(\theta,\varphi)$ es una función adimensional de la dirección del esparcimiento. Sea el total de la energía esparcida en toda dirección igual a la energía de la onda incidente sobre un área C_{sca}, entonces por esta definición y la ecuación anterior tenemos (Van de Hulst, 1981)

$$C_{sca} = \frac{1}{k^2} \int F(\theta,\varphi) d\omega \ , \tag{4}$$

donde $d\omega = sen\theta d\theta d\varphi$ es el elemento del ángulo sólido y la integral se evalúa sobre todas las direcciones. De manera similar, la energía absorbida por la partícula debe ser igual a la energía incidente sobre el área C_{abs}, y la energía removida del haz original debe ser igual a la energía incidente sobre el área C_{ext}. Los coeficientes definidos como C_{ext}, C_{sca} y C_{abs} se denominan secciones transversales de la partícula para *extinción*, *esparcimiento* y *absorción* respectivamente y poseen unidades de área. Es necesario que en los coeficientes C_{ext}, C_{sca} y C_{abs} se cumpla la ley de conservación de la energía, como se expresa en la siguiente igualdad (Van de Hulst, 1981)

$$C_{ext} = C_{sca} + C_{abs} \ . \tag{5}$$

De acuerdo con las teorías de Maxwell, la luz lleva un momento tanto como energía. El momento removido del haz original es proporcional a C_{ext}. Si la parte C_{abs} no es reemplazada pero la parte C_{sca} es parcialmente remplazada por la componente en la dirección de propagación del momento de la luz esparcida, esta componente en cualquier

dirección es proporcional a $I\cos\theta$, el momento total en la dirección de propagación por la radiación esparcida es por lo tanto proporcional a la siguiente expresión (Van de Hulst, 1981)

$$\overline{\cos\theta}C_{sca} = \frac{1}{k^2}\int F(\theta,\varphi)\cos\theta d\omega \ . \tag{6}$$

En la ecuación anterior, la media del ángulo de esparcimiento $\overline{\cos\theta}$ se denomina factor de asimetría y se considera como una propiedad fundamental del medio esparcidor que afecta la transferencia de la energía radiante a través del medio. La parte del momento en la dirección de propagación que es removida del haz incidente y no es reemplazada por la componente en la misma dirección del momento de la luz esparcida es proporcional a (Van de Hulst, 1981)

$$C_{pr} = C_{ext} - \overline{\cos\theta}C_{sca} \ . \tag{7}$$

Para el caso de partículas *no* absorbentes $C_{ext}=C_{sca}=C$, y la expresión anterior se reescribe de la forma

$$C_{pr} = \left(1-\overline{\cos\theta}\right)C \ . \tag{8}$$

El momento correspondiente al coeficiente de la presión de la radiación C_{pr} ocurre sobre la partícula y por lo tanto una fuerza es ejercida sobre esta en la dirección de propagación de la onda incidente. Para el caso de una partícula cuya superficie es absorbente está fuerza debe ser igual a la fuerza ejercida sobre un área C_{pr} y su magnitud es (Van de Hulst, 1981)

$$F = \frac{I_0 C_{pr}}{c} \ . \tag{9}$$

La mayoría de las partículas tienen una sección transversal geométrica G. Para una esfera de radio a, entonces $G = \pi a^2$, las constantes adimensionales (Van de Hulst, 1981)

$$Q_{ext} = C_{ext}/G \ , \tag{10}$$

$$Q_{sca} = C_{sca}/G \ , \tag{11}$$

$$Q_{abs} = C_{abs}/G \ , \tag{12}$$

$$Q_{pr} = C_{pr}/G \ . \tag{13}$$

Son denominadas factores de eficiencia para extinción, esparcimiento, absorción y presión de la radiación respectivamente.

Para una esfera los factores de eficiencia son independientes de la orientación de la partícula y del estado de polarización de la luz incidente. Para todos los casos se debe cumplir que el factor de eficiencia de extinción sea igual a la suma de los factores de eficiencia de esparcimiento y de absorción (Van de Hulst, 1981)

$$Q_{ext} = Q_{sca} + Q_{abs} \ . \tag{14}$$

Una forma alternativa a la ecuación (9) para expresar la fuerza ejercida por la presión de la radiación en términos del factor de eficiencia de la presión de la radiación Q_{pr}, es la siguiente (Van de Hulst, 1981)

$$F = \frac{I_0 A}{c} Q_{pr} \ , \tag{15}$$

donde A es el área de la sección transversal de una partícula donde incide una irradiancia.

En un artículo publicado por William Irvine (Irvine, 1965) se proporcionan datos calculados numéricamente para los valores de Q_{pr} dado el índice relativo $n = n_1/n_2$, para partículas con un índice de refracción n_1 inmersas en un medio con un índice de refracción n_2. Para esferas dieléctricas, es decir, materiales no absorbentes la conductividad eléctrica es cero y el índice de refracción del material es una constante real.

Tabla I Cálculos numéricos de William Irvine para el factor de eficiencia de la presión de la radiación (Irvine, 1965).

n	Q_{pr}	$\overline{\cos\theta}$
1.20	0.97071	0.98563
	0.97071	0.98562
	0.97059	0.98551
	0.96228	0.97461
	0.97706	0.68775
1.33	0.96415	0.97177
	0.96415	0.97176
	0.96403	0.97153
	0.95661	0.95086
	0.99904	0.59884
1.50	0.96066	0.95196
	0.96057	0.95158
	0.95575	0.91802
	1.00800	0.55289

Un cálculo aproximado para la fuerza debida a la presión de la radiación en una partícula de 5μm de diámetro, si consideramos una eficiencia Q_{pr}=0.977, una área A=G=πa^2=19.635x10^{-12}m^2 y además suponemos un flujo de energía incidente en la partícula de $I_0 = {14mW}/{\pi(2.5\mu)^2} = 713x10^6 W/m^2$, usando la ecuación (15) se obtiene que F≈45.5pN. Si comparamos este resultado con el peso de la partícula (≈6pN) se observa que la fuerza debida a la presión de la radiación es enorme y satisfactoriamente congruente con el fenómeno de asimiento óptico. En este cálculo se consideró el flujo de energía incidente sobre un área igual a la sección transversal de la esfera.

Las leyes de la óptica geométrica son leyes asintóticas a las ondas electromagnéticas, válidas en el límite de longitudes de onda muy pequeñas. Desde la perspectiva de la óptica geométrica cuando un rayo incide sobre una superficie, un rayo se refleja y otro se refracta figura 4. La dirección del rayo refractado obedece la ley de Snell mientras que la intensidad y fase de ambos rayos dependen de los coeficientes de Fresnel. Para esferas dieléctricas grandes comparadas con la longitud de onda, es válido desde el *régimen de la óptica geométrica* usar rayos ópticos en la derivación de fuerzas de la presión de la radiación a partir del momento de la luz esparcida (Ashkin, 1992).

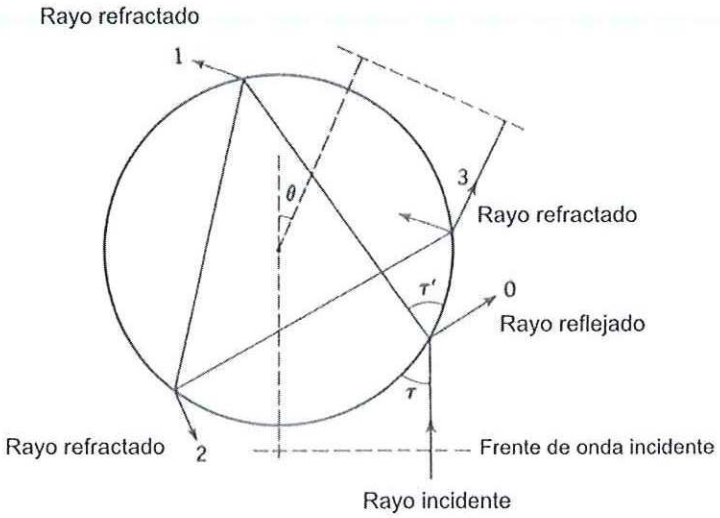


FIGURA 4 Refracción y reflexión para la incidencia de un rayo de luz sobre una esfera.

Un dato importante es la variación de la fuerza proveniente de la presión de la radiación respecto a la posición del centro de la partícula y la cintura del haz enfocado. Un análisis teórico de estas fuerzas fue documentado por Ren, Greha y Gouesbet (Gouesbet *et al.*, 1994).

II.1.2 COMPORTAMIENTO EN LA CINTURA DE LA FUERZA DE LA PRESIÓN DE LA RADIACIÓN PARA HACES ENFOCADOS CON PERFIL DE INTENSIDAD GAUSSIANO.

Mediante la teoría de Mie bajo la condición de coeficientes constantes del perfil del haz. Se usa por convención el centro de la cintura del haz O_G con respecto al centro de la partícula O_P, donde $z_0>0$ corresponde a una partícula localizada en la parte convergente del haz y $z_0<0$ corresponde a una partícula localizada en la parte divergente del haz (Gouesbet *et al.*, 1994 y Gouesbet *et al.*, 1996). En la figura 5 se muestra la evolución longitudinal de la sección transversal de la presión de la radiación contra z_0 ejercida por un haz gaussiano de 0.5μm de longitud de onda y un radio en la cintura del haz ω_0=5μm iluminando una partícula de índice de refracción relativo al medio de 1.5. El comportamiento de la sección transversal de la presión de la radiación C_{pr} depende de la razón $d/2\omega_0$. Para d=5μm, el diámetro de la partícula es un medio del diámetro de la cintura del haz $2\omega_0$, es decir el diámetro del haz a z_0=0. Cuando $|z_0|$ crece, el diámetro local del haz 2ω se incrementa y la razón $d/2\omega$ decrece significativamente abajo de su valor máximo de 0.5. Con una buena precisión, el promedio de la intensidad incidente sobre la sección transversal geométrica de

la partícula es casi igual a la intensidad incidente sobre el eje del haz. La intensidad incidente en el eje del haz tiene su máximo valor para z_0=0. Desde un punto de vista de la teoría de esparcimiento el hecho de que $d/2\omega$ sea pequeño significa que de acuerdo con la teoría de Mie C_{pr} es proporcional a la intensidad. Por lo tanto el decrecimiento de C_{pr} depende de la divergencia del haz cuanto mas alejamos la partícula de la posición de la cintura (Gouesbet *et al.*, 1994).

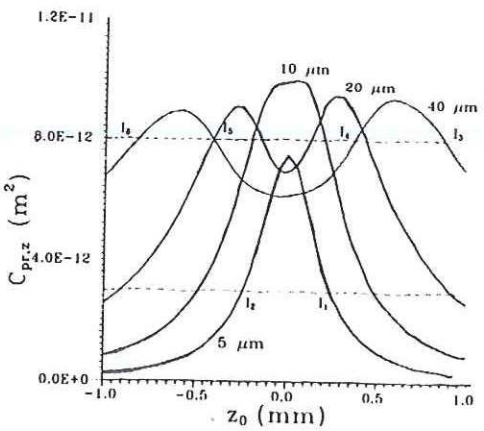


FIGURA 5 Evolución longitudinal de la sección transversal de la presión de la radiación C_{pr} con la partícula localizada en el eje del haz con propagación en el eje z (Gouesbet *et al.*, 1994).

Ashkin (Ashkin *et al.*, 1983) ha demostrado en experimentos de levitación óptica que una partícula puede ser capturada por un haz gaussiano enfocado. El asimiento resulta del

hecho de que en una región del haz la componente de la presión de la radiación longitudinal apunta en una dirección opuesta a la dirección de la luz incidente.

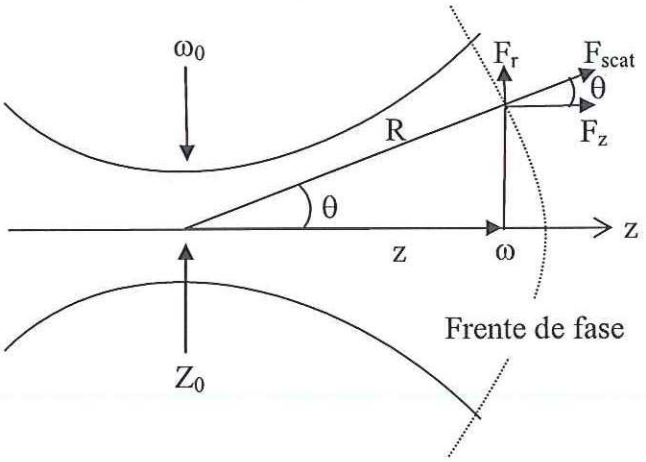


FIGURA 6 Descomposición axial y longitudinal de la fuerza de la presión de la radiación en la cintura de un haz gaussiano enfocado (*Ashkin et al.*, 1983).

Para una partícula esférica en el *régimen de Mie* $(a \geq \lambda)$, donde el radio de la partícula a es mayor que la longitud de onda λ del haz láser (Ashkin *et al.*, 1983), se tiene que dentro de un haz de onda plana, el esparcimiento es simétrico y la fuerza ejercida es paralela al vector de Poynting incidente. Sí la partícula está dentro de un haz con gradiente transversal, el

esparcimiento no es simétrico y la fuerza tiene un componente transversal adicional al vector de Poynting. La fuerza gradiente es proporcional a la sección transversal de esparcimiento de la partícula para haces paraxiales con polarización escalar en la dirección del vector de Poynting. Esta es una fuerza resultante no conservativa, debido a la remoción del momento incidente. La fuerza gradiente es una fuerza conservativa cuyo potencial es la energía libre de la partícula. En el campo lejano ($z \gg \pi\omega_0^2/\lambda$), la fuerza de esparcimiento es proporcional a la potencia óptica que incide directamente sobre la partícula y tiene una dirección normal al frente de fase esférico, cuyo centro de curvatura esta en la cintura del haz. Bajo aproximación paraxial, se pueden expresar las componentes que no son cero en la fuerza de esparcimiento F en coordenadas cilíndricas (Ashkin *et al.*, 1983).

$$F_z = K\omega^{-2} e^{\left(-2r^2/\omega^2\right)} \tag{16}$$

$$F_r = F_z \left(r/z \right) \tag{17}$$

Donde el tamaño de la cintura es $\omega = \lambda z / \pi\omega_0$ y K es una constante proporcional a la sección transversal de esparcimiento de la partícula y la potencia total del haz.

II.2 DESCRIPCIÓN DE FUERZAS

Existen fenómenos complejos de interacción de fuerzas en los especímenes ajenos al asimiento óptico que determinan el movimiento; dichos fenómenos son en sí mismos un campo de investigación. Por otro lado, cuando ocurre el asimiento óptico, las fuerzas desencadenadas conducen a un vector resultante cuyo sentido indica la dirección del movimiento de la partícula. En los experimentos desarrollados en este trabajo de tesis solo la fuerza de asimiento óptico puede ser controlada. Fuerzas ajenas cuyo origen sea la presión de la radiación inducida puede significar un factor favorable o desfavorable, únicamente los procesos involucrados pueden determinarlo. Con la finalidad de esclarecer tales procesos se propone desglosar el análisis de las fuerzas trascendentales cuando la partícula esta sin asimiento y cuando la partícula esta sometida al asimiento óptico.

II.2.1 ANÁLISIS DE LAS FUERZAS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARTÍCULA SIN ASIMIENTO

Suponemos como sólidos o partículas en suspensión a las esferas de poliestireno de 5μm de diámetro diluidas en agua desionizada, contenidas en un tanque cilíndrico de 200μm de altura y 7000μm de diámetro.

Por la teoría hidrostática de fluidos cuando un cuerpo está inmerso total o parcialmente en un líquido, este ejerce una presión sobre cada parte de la superficie del cuerpo en contacto

con el líquido, dado que la presión es mayor sobre las partes inmersas más profundamente, el resultante de todas las fuerzas es una fuerza de empuje hacia arriba (Sears *et al.*, 1957).

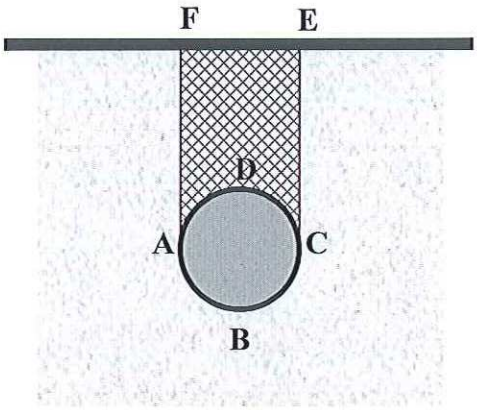


FIGURA 7 Descripción de la fuerza de empuje para una esfera.

En la Figura 7 la fuerza hacia arriba sobre el fondo es igual al peso del líquido, el cual esta verticalmente arriba de la superficie ABC, indicado como el peso del líquido adentro de ABCEFA. La fuerza hacia abajo sobre la superficie superior iguala el peso del líquido adentro de ADCEFA, la diferencia entre estas dos fuerzas es una fuerza vertical hacia arriba debido al peso del fluido ABCD que es desplazado por el sólido. La fuerza de empuje $\vec{F}_B$ está dada por (Lamb, 1945)

$$\vec{F}_B = V\vec{w}_f \,, \tag{18}$$

donde $\vec{F}_B$ es la fuerza de empuje, V es el volumen del fluido desplazado y $\vec{w}_f$ es el peso específico del fluido. El volumen de una esfera esta dado por la ecuación (Sears *et al.*, 1957)

$$V = \frac{1}{6}\pi d^3 \,. \tag{19}$$

Para una esfera de poliestireno con diámetro $d = 5\mu m$, su volumen es aproximadamente $6.5437\text{x}10^{-17}$ m^3, su equivalente en centímetros cúbicos es $6.5437\text{x}10^{-10}$ cm^3. La densidad del polímero de la esfera de poliestireno según datos del fabricante (ver tabla VIII) es de ρ=1.05 g/cm^3. Con los datos anteriores es posible conocer la masa de la esfera usando la ecuación (Sears *et al.*, 1957)

$$m = \rho V \,. \tag{20}$$

Se obtiene que la masa para una esfera de poliestireno es de m = $6.867\text{x}10^{-10}$g. El peso de un cuerpo de masa m en la Tierra ($\vec{g} = 9.8 m/s^2$) está dado por (Sears *et al.*, 1957)

$$\vec{w} = m\vec{g} \,. \tag{21}$$

La ecuación anterior señala que el peso de un objeto es el producto de su masa por la aceleración debida a la gravedad. Haciendo los cálculos para la fuerza ejercida por la gravedad $\vec{g}$ sobre una esfera de poliestireno de masa m = 6.867x10^{-10}g, se obtiene que $w_1 = 6.736 pN$. Ahora, haciendo los cálculos para el peso (fuerza ejercida por la gravedad) de un volumen esférico de agua de igual diámetro que las de las esferas de poliestireno, conociendo que la densidad del agua es de ρ=1 g/cm^3, el resultado para el peso es $w_2 = 6.419 pN$. Dado que w_2 es la fuerza de empuje que empuja la partícula hacia arriba y w_1 es la fuerza que empuja la partícula hacia abajo, se obtiene una fuerza resultante $F_R = 0.317 pN$.

De la figura 8, suponemos que una partícula se encuentra en reposo en la parte mas elevada del tanque a 200μm del fondo, nos interesa saber cuanto tiempo t_2 tarda en descender la partícula, si consideramos un tiempo inicial t_1=0. Además debe tomarse en consideración la fuerza de arrastre o de fricción F_{Drag} del fluido.

En hidrodinámica mediante la ley de Stokes se conoce que la fuerza ejercida sobre una esfera por el flujo de un fluido alrededor de esta viene dada por la ecuación (Lamb, 1945)

$$\vec{F}_{Drag} = 6\pi a \eta \vec{\upsilon}, \qquad (22)$$

donde a es el radio de la esfera, η es la viscosidad del fluido y υ es la velocidad relativa de la esfera con respecto al fluido para distancias grandes.

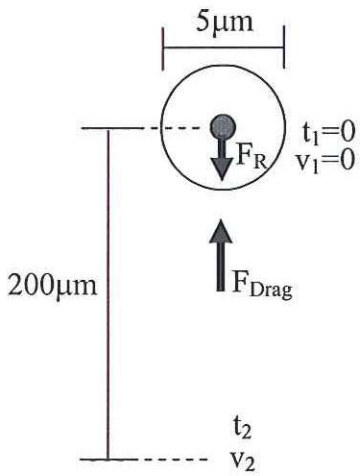


FIGURA 8 Caída de una esfera a través de un fluido, sujeta a la fuerza de empuje, el peso de la esfera y la fuerza de arrastre.

Para conocer la velocidad terminal de una esfera que cae a través de un fluido, que anteriormente estaba en reposo, se debe igualar el peso de la esfera más la suma de las fuerzas de empuje y de arrastre.

$$\frac{4}{3}\pi a^3 \vec{w}_f + 6\pi a \eta \vec{\upsilon} = \frac{4}{3}\pi a^3 \vec{w}_e \qquad (23)$$

El primer término de la ecuación (23) corresponde a la fuerza de empuje, el segundo término es la fuerza de arrastre y la expresión a la derecha del signo de igual es el peso de la partícula, donde $\vec{w}_f$ es el peso específico del fluido y $\vec{w}_e$ es el peso específico de la partícula. La sustracción de la fuerza de empuje al peso de la partícula se obtuvo anteriormente como la fuerza resultante F_R. De tal manera que despejando de la ecuación (23) la velocidad relativa υ del término para la fuerza de arrastre, llegamos a la siguiente ecuación.

$$\vec{\upsilon} = \frac{\vec{F}_R}{6\pi a \eta} \tag{24}$$

Si consideramos la viscosidad del fluido como la viscosidad del agua a 20°C se tiene que η=0.001 kg/m·s, el radio de la esfera es de 2.5μm y F_R=0.317pN. Entonces la velocidad de la partícula será de aproximadamente υ= 6.727x10^{-6} m/s. Suponiendo que la velocidad υ sea v_2 de acuerdo a la figura 8, entonces la velocidad promedio es $\overline{v} = 3.3635x10^{-6} m/s$. Por lo tanto el tiempo que tarda una partícula a la velocidad promedio en recorrer 200μm es de aproximadamente $t_2 \approx 200\mu m/\overline{v} \approx 1\min$. En la preparación de muestras para la experimentación de manipulación óptica en esferas dieléctricas, se adhiere una lámina de plástico con un grosor aproximado de 200μm a la superficie del portaobjetos, siendo el tiempo t_2 un valor aproximado al tiempo que le toma a una partícula de 5μm de diámetro sedimentarse en la muestra.

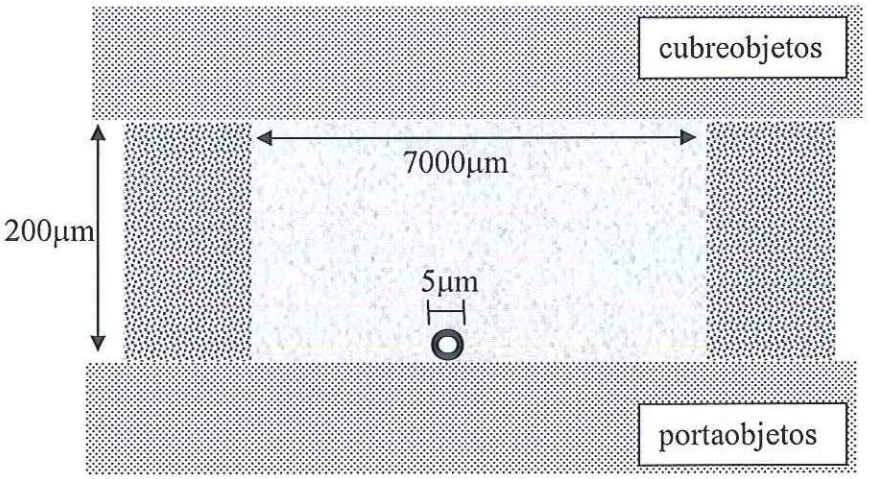


FIGURA 9 Posición de una sola esfera de poliestireno en la muestra preparada para asimiento óptico.

En base a los resultados anteriores, se deduce que bajo las condiciones de un fluido estático las esferas de poliestireno deben de estar en contacto con la superficie del portaobjetos, como se muestra en la figura 9. Pero, experimentalmente se observa que además de la precipitación, la partícula presenta un movimiento Browniano, que se caracteriza por ser en zigzag y en cualquier dirección para un sistema coordenado de tres ejes.

II.2.1.1 MOVIMIENTO BROWNIANO

El movimiento browniano es característico de cualquier tipo de suspensión en el que las partículas suspendidas tengan dimensiones muy pequeñas, este movimiento no se debe a

las corrientes del fluido, ni a su gradual evaporación, sino que es un efecto termodinámico entre la partícula y el fluido. Además se observa que la agilidad de las partículas aumenta en la medida en que el tamaño de la partícula y la viscosidad del fluido disminuyen. Descartando la posibilidad de explicar el movimiento en base a colisiones con los átomos del fluido. Revisando algunos fundamentos de la física clásica tenemos que *trabajo* se define como la aplicación de una fuerza constante sobre un cuerpo a lo largo de una determinada distancia y esta dado por la ecuación (Sears *et al.*, 1957)

$$\vec{L} = \vec{F}d\,, \tag{25}$$

donde $\vec{L}$ es trabajo teniendo Joules por unidad, $\vec{F}$ es la fuerza aplicada sobre una distancia *d*. El trabajo y la *energía cinética* de una partícula se igualan, entendiendo como energía cinética cuando una fuerza aumenta la velocidad de un cuerpo (Sears *et al.*, 1957).

$$\vec{E}_c = \vec{L} = \frac{1}{2}m\vec{\mathrm{v}}^2 \tag{26}$$

Hasta aquí, el movimiento browniano podría ser una violación a la segunda ley de la termodinámica, la cual señala que no existe un proceso cuyo único resultado sea la absorción de calor (energía cinética molecular) de una fuente y la conversión integra de este calor en trabajo. Bajo el argumento de que al moverse la partícula en el fluido, en lugar de disipar su energía cinética (movimiento de la partícula) en calor debido a la fricción,

ocurre que en ciertos momentos la velocidad de la partícula aumenta, significando de alguna manera que la partícula extrae energía calorífica (energía cinética molecular) del fluido y la transforma en energía cinética (movimiento de la partícula). Sin embargo, el argumento anterior no es del todo cierto, debido a que la segunda ley de la termodinámica no puede interpretarse de forma absoluta sino que en el caso del movimiento Browniano se satisface solo en promedio. La explicación al movimiento browniano fue propuesta en 1905 por Albert Einstein (Einstein, 1956). Einstein predijo la distancia con respecto al tiempo que debe recorrer una partícula suspendida en un fluido considerando los desplazamientos cuadráticos medios (desviación estándar) $<x^2>$, la gráfica de la figura 10 muestra tal predicción.

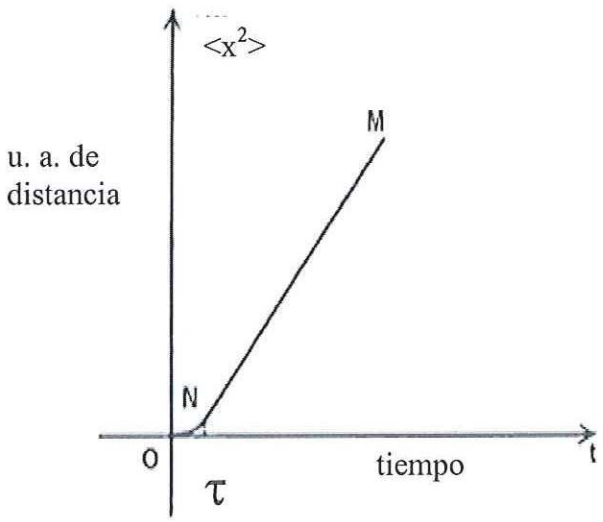


FIGURA 10 Predicción de Einstein sobre los desplazamientos cuadráticos medios en el tiempo, para una partícula que presenta movimiento Browniano.

Para derivar los desplazamiento cuadráticos medios del movimiento Browniano se debe considerar la ley de Stokes presentada en la ecuación (22) y plantear la ecuación de movimiento de Langevin (Braun, 2001)

$$m\dot{\upsilon} = -6\pi\eta a\upsilon + F(t) \ , \tag{27}$$

donde la fuerza estocástica *F(t)* es la fuerza que fluctúa aleatoriamente sobre la partícula de masa *m*. Se considera como fuerza sistemática a la generada por fricción, es decir la ecuación (22). Se reescribe la ecuación (27) de la siguiente forma

$$m\ddot{x}x = m\left(\frac{d}{dt}\left(x\dot{x}\right) - \dot{x}^2\right) = -6\pi\eta a x\dot{x} + xF(t) \ . \tag{28}$$

Tomando los promedios en el tiempo

$$m\left\langle\frac{d}{dt}\left(x\dot{x}\right)\right\rangle = m\frac{d}{dt}\left\langle x\dot{x}\right\rangle = m\left\langle\dot{x}^2\right\rangle - 6\pi\eta a\left\langle x\dot{x}\right\rangle + \left\langle xF(t)\right\rangle \ . \tag{29}$$

En la ecuación (29) se deben reconocer dos escalas de tiempo muy distintas, la escala en la que varia la fuerza sistemática o de fricción, ecuación (22), del orden de los segundos y la escala en la que varía la fuerza debida a las colisiones *F(t)* que es del orden de milésimas de microsegundo. Es posible conocer la fuerza sistemática si se conoce la velocidad de la

partícula, por otro lado la fuerza estocástica es impredecible en cualquier instante. Langevin (Braun, 2001) formuló la hipótesis de que la distribución de la fuerza estocástica es gaussiana y su determinación se reduce a conocer su media y desviación estándar. Se dice que la media de la fuerza estocástica es nula, si se considera un intervalo de tiempo grande, del orden de un segundo, debido a que en ese intervalo se ejercen fuerzas en un sentido y en otro, de tal manera que el promedio de fuerzas ejercidas se cancelará. Por otro lado se dice que las fuerzas estocásticas no están correlacionadas entre sí en distintos instantes de tiempo, esto se debe a que en un intervalo de un segundo la fuerza varía muchísimo, de tal manera que los valores para la fuerza al principio y al final del intervalo no poseen una relación estrecha. La suposición de estos planteamientos conduce a la siguiente expresión

$$\langle xF(t)\rangle = \langle x\rangle\langle F(t)\rangle = 0 \ . \tag{30}$$

Además, igualando la energía cinética promedio de translación de las moléculas del fluido a la de la partícula, se puede escribir la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{2}m\left\langle \dot{x}^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \ . \tag{31}$$

En la ecuación anterior, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura. Así, la ecuación (29) se simplifica a la siguiente expresión .

$$m\frac{d}{dt}\left\langle x\dot{x}\right\rangle = k_B T - 6\pi\eta a\left\langle x\dot{x}\right\rangle \ , \tag{32}$$

factorizando términos en la ecuación anterior, se llega a la siguiente ecuación diferencial.

$$\left(\frac{d}{dt}+\frac{6\pi\eta a}{m}\right)\left\langle x\dot{x}\right\rangle = \frac{k_B T}{m} \ . \tag{33}$$

La ecuación (33) tiene como solución

$$\left\langle x\dot{x}\right\rangle = \frac{1}{2}\frac{d}{dt}\left\langle x^2\right\rangle = Ce^{-\gamma\cdot t} + \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \ , \tag{34}$$

donde $\tau=\gamma^{-1}$ es un tiempo característico definido por:

$$\gamma \equiv \frac{6\pi\eta a}{m} \tag{35}$$

Para t=0 en la ecuación (34), se obtiene el valor para la constante C

$$0 = C + \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \ , \tag{36}$$

$$C = -\frac{k_B T}{6\pi\eta a} \ . \tag{37}$$

Sustituyendo C en la expresión (34) se obtiene

$$\frac{1}{2}\frac{d}{dt}\langle x^2\rangle = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}\left(1-e^{-\gamma\cdot t}\right) . \tag{38}$$

Finalmente integrando la ecuación (38), se llega a la siguiente expresión

$$\langle x^2\rangle = \frac{2k_B T}{6\pi\eta a}\left[t-\frac{1}{\tau}\left(1-e^{-\gamma\cdot t}\right)\right] . \tag{39}$$

Evaluando la ecuación (39) en el límite cuando $t \ll \tau$, se obtiene como resultado:

$$\langle x^2\rangle = \frac{k_B T t^2}{m} . \tag{40}$$

Mientras que el resultado para la evaluación de la ecuación (39) en el límite cuando $t \gg \tau$ se obtiene:

$$\langle x^2\rangle = \frac{2k_B T t}{6\pi\eta a} = \frac{k_B T t}{3\pi\eta a} . \tag{41}$$

La ecuación (40) corresponde al desplazamiento cuadrático medio en la gráfica de la figura 10 correspondiente a la sección O-N, note que tiene una trayectoria parabólica. Si

comparamos este comportamiento con las ecuaciones cinemáticas para movimientos con aceleración constante. Podemos aducir una semejanza al comportamiento de una partícula libre. Sin embargo al transcurrir el tiempo la ecuación (41) señala un comportamiento lineal para $<x^2>$ el cual corresponde a la sección N-M en la gráfica de la figura 10, lo cual conduce a un régimen difusivo según la hidrodinámica. Cabe señalar que de acuerdo a este régimen existe un tiempo T_H en el que las partículas estarán repartidas homogéneamente en todo el líquido, logrando de esta manera una mezcla uniforme. El tiempo T_H depende de la dimensión del recipiente que contiene al fluido. Es importante recalcar que después de un tiempo T_H la partícula logra un equilibrio total tanto en sus velocidades bajo el régimen de partícula libre, como en su posición respecto al recipiente.

II.2.1.2 EFECTOS DE FLOCULACIÓN

Extendiendo las ideas de la distribución de las partículas de poliestireno en el fluido es conveniente, considerar a la mezcla de partículas y fluido como una solución coloidal. Dependiendo del tipo de partículas brownianas y de los átomos o moléculas del fluido, se clasifica el coloide (Iler, 1979). Se considera como gel si las partículas coloidales tanto sólidas como líquidas están suspendidas en un líquido. Dentro de esta clasificación las partículas coloidales se agrupan de distintas maneras.

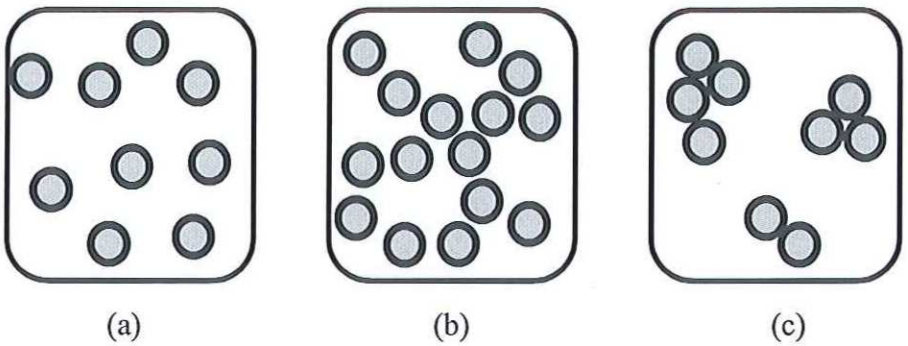


FIGURA 11 Agrupación de partículas Coloidales

En la figura 11, el caso (a) muestra una solución donde las partículas coloidales no están en contacto, siendo el caso mas común que se presenta en las muestras para asimiento óptico. En el caso (b) las partículas se acercan formando una especie del eslabones de una cadena, puede argumentarse que la diferencia entre el caso (a) y (b) se deba a la concentración de partículas, mas sin embargo el caso (b) se puede dar para concentraciones iguales en ambos casos. El caso (c) de la figura 11, es muy interesante, por que esta asociado con el fenómeno de floculación de partículas coloidales inmersas en líquidos ionizados.

En el proceso de floculación se puede considerar que las partículas están en contacto, sin embargo, lo que realmente está sucediendo es una interacción de cargas eléctricas opuestas entre ciertas zonas de la partícula y el fluido colindante, lo que provoca fuerzas de

atracción sumamente fuertes entre las partículas, como se esquematiza en la siguiente figura.

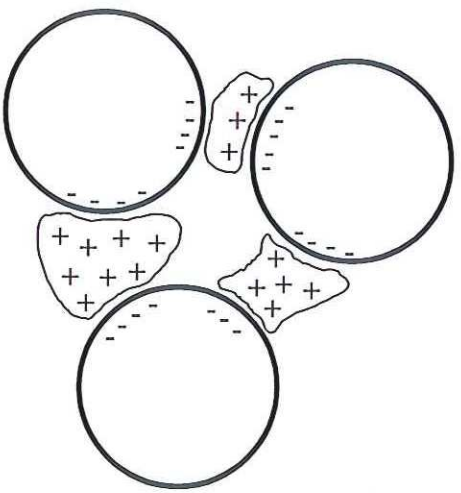


FIGURA 12 Floculación de partículas por efectos de cargas eléctricas.

Experimentalmente se observan flóculos en las muestras para asimiento óptico, cabe destacar que las partículas son presumiblemente dieléctricas y el fluido esta desionizado. Por lo que en rigor no debería de ocurrir el proceso de floculación, pero es de suponer que dadas las circunstancias ambientales en que se llevan acabo los experimentos, existe contaminación por moléculas ionizadas en las muestras. Se a corroborado experimentalmente que las fuerzas que atraen a las partículas en los flóculos son muy grandes, se observa que para un flóculo de dos partículas donde una de ellas es capturada

por el haz de luz, cuando la partícula es desplazada a través de la muestra, también se arrastra a la otra partícula que conforma el flóculo pero en ningún momento el haz láser esta incidiendo a su vez sobre esta. La presencia de flóculos o grumos es más persistente en muestras biológicas, aunque su causante sea distinto a la atracción de cargas eléctricas.

II.2.2 ANÁLISIS DE LAS FUERZAS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARTÍCULA DURANTE EL ASIMIENTO

Antes de comenzar el análisis de fuerzas debe establecerse la relación entre el radio de la partícula a y la longitud de onda λ del haz láser enfocado, se considera como *régimen de Rayleigh* cuando: $a \ll \lambda$, y como *régimen de Mie* cuando $a \geq \lambda$ (Ashkin *et al.*, 1983). Por lo tanto, dado que el trabajo experimental contempla el uso de un láser con una longitud de onda de 0.78μm y partículas de 0.5μm-5μm de radio, entonces según la clasificación anterior, se esta operando en el régimen de Mie.

El asimiento de partículas involucra el fenómeno de presión de la radiación y la ley de conservación del momento. Se dice que la magnitud del momento lineal de un fotón esta dado por la siguiente expresión (Fowles, 1989)

$$p = \frac{h\nu}{c} = \frac{h}{\lambda}, \tag{42}$$

donde p es la magnitud del momento, ν es la frecuencia asociada a la luz, c es la velocidad de la luz en el vacío, y h es la constante de Plack. Es importante notar en la ecuación anterior que el momento lineal del fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz, en otras palabras longitudes de onda pequeñas implica fotones con un momento lineal grande. La ley de la conservación del momento señala que en cualquier sistema o grupo de cuerpos que interactúen, la cantidad de momento total, antes de las acciones, es igual a la cantidad de momento total después de las acciones (Sears, 1957)

$$\Delta\vec{p} = \Delta\vec{p}_1 + \Delta\vec{p}_2 \ . \tag{43}$$

Debe señalarse que el momento lineal, es decir la masa m de un cuerpo por su velocidad v, es igual a la aplicación de una fuerza por un tiempo dado, este producto se denomina impulso, reescribiendo la ecuación anterior en términos del impulso tenemos

$$\sum \vec{F}t = 0 \ . \tag{44}$$

De tal manera que la ley de conservación del momento también se puede expresar como

$$\vec{F}t = m\vec{\mathrm{v}} = \vec{p} \ . \tag{45}$$

Las unidades del momento lineal son $[\,(kg \cdot m)/s\,]$ y las unidades del impulso son $[\,N \cdot s\,]$.

El fenómeno de la presión la radiación se interpreta de la siguiente manera. Suponga que un flujo de fotones incide normal a una superficie totalmente absorbente. Si consideramos que se esta cumpliendo la ley de conservación del momento, entonces un fotón cualquiera esta transfiriendo todo su momento, ecuación (42), a la superficie. Si N fotones por unidad de área inciden sobre la superficie cada segundo entonces la presión P es igual a la tasa de tiempo de la transferencia del momento lineal por unidad de área (Fowles, 1989).

$$P = \frac{Nh\nu}{c} \tag{46}$$

Si la intensidad de un haz es la potencia por unidad de área. Además si la energía de cada fotón es $h\nu$, entonces esto conduce a la siguiente igualdad

$$I = Nh\nu \ . \tag{47}$$

En consecuencia, es posible reescribir la presión de la radiación de la ecuación (46) como la ecuación (48), donde la presión radiación es directamente proporcional a la intensidad del haz de luz (Fowles, 1989), ver ecuación (2),

$$P_r = \frac{I}{c} \ . \tag{48}$$

Si ahora la superficie es perfectamente reflectora, entonces la presión es el doble del valor de la ecuación anterior

$$P_r = \frac{2I}{c} \ . \tag{49}$$

La expresión de la ecuación anterior es indubitable, por la siguiente razón, cuando el fotón va de regreso, sucede un doble cambio en el momento $p-(-p)=2p$. Por lo tanto cada fotón reflejado transfiere el doble del momento en comparación a cuando es absorbido.

II.2.2.1 DESCOMPOSICIÓN DE FUERZAS, LA FUERZA DE ESPARCIMIENTO, LA FUERZA GRADIENTE Y LA FUERZA RESULTANTE.

Hasta aquí, se puede afirmar que en la interacción de los fotones con la partícula, ya sea por absorción o ya sea por reflexión, siempre se cumple la ley de conservación del momento, ecuación (44). Esto implica por la ecuación (45) que se están ejerciendo fuerzas sobre la partícula y dado que estas fuerzas se cree que son de un orden de magnitud cercano y de preferencia mayor al peso relativo de la partícula inmersa en el fluido, por lo tanto se justifican los efectos dinámicos que se observan experimentalmente.

Sin embargo, en los efectos dinámicos que acontecen en las partículas es sumamente importante las direcciones en que se ejercen las fuerzas. En la literatura reportada hasta el

momento sobre manipulación de partículas mediante un haz láser que posee un modo transversal TEM_{00}, se distingue la acción de dos fuerzas trascendentales, la fuerza de esparcimiento F_{scat} y la fuerza gradiente F_{grad}, (Ashkin, 1997).

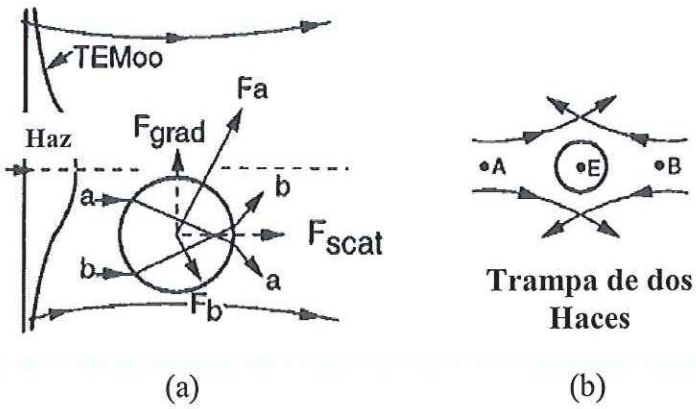


FIGURA 13. (a) Componente de fuerza de esparcimiento y componente de fuerza gradiente. (b) Trampa de dos haces en contra propagación (Ashkin, 1997).

En la figura 13 (a), considere un par de rayos *a* y *b* incidiendo simétricamente en la esfera alrededor de su centro y además la esfera posee un índice de refracción mayor al medio en que esta inmersa. Despreciando las reflexiones que puedan ocurrir en la superficie, entonces la mayoría de los rayos se refractan a través de la partícula, generando dos fuerzas F_a y F_b en la dirección del cambio del momento, que depende de la ley de refracción de Snell (Hecht, 2000)

$$n_1 sen\theta_1 = n_2 sen\theta_2 \tag{50}$$

donde n_1 es el índice de refracción del medio por el que viaja la luz antes de pasar al segundo medio de índice de refracción n_2, θ_1 es el ángulo del rayo incidente y θ_2 es el ángulo del rayo refractado, ambos con respecto a la normal de la superficie que delimita el medio 1 del medio 2. Por geometría, toda línea normal a la superficie de una esfera es un radio.

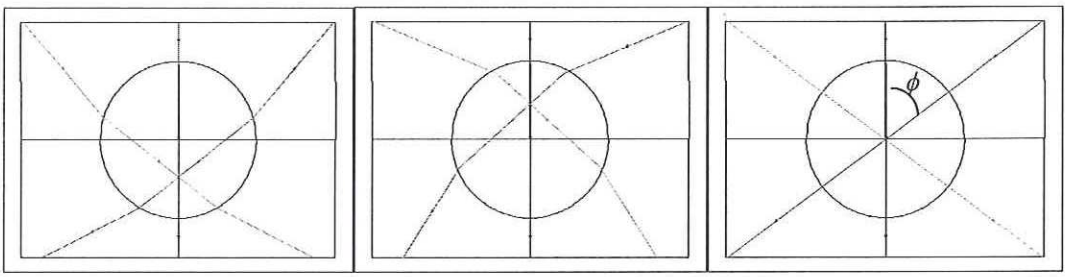
Por que la intensidad del rayo a es mas grande que la del rayo b, la fuerza F_a es mayor que F_b. Además por la simetría en que inciden los rayos, se puede ver que la fuerza neta puede descomponerse en dos componentes, la fuerza de esparcimiento F_{scat} cuya componente apunta en la dirección de la luz incidente y la fuerza gradiente F_{grad} que surge del gradiente de la intensidad de luz y apunta transversalmente hacia la región de mas intensidad del haz. Para una partícula sobre el eje del haz, F_a=F_b y no existe componente de fuerza gradiente neta. Para una partícula con índice de refracción menor al medio en que está inmersa y localizada fuera del eje del haz, entonces F_a es menor que F_b y la partícula es empujada hacia afuera del haz.

Ashkin (Ashkin, 1997) también propuso la construcción de una trampa óptica utilizando dos haces ligeramente divergentes con sus ejes colineales e incidiendo con propagación contraria sobre una esfera, figura 13 (b). Los puntos A y B son los focos de los haces. El efecto predominante en cualquier desplazamiento axial de la partícula de su punto de

equilibrio E es una fuerza de esparcimiento neta opuesta, mientras que cualquier desplazamiento radial es opuesto por la fuerza gradiente de ambos haces. Si se bloquea uno de los haces la partícula es guiada por el otro haz. Si el haz bloqueado se restaura la partícula es empujada nuevamente al punto de equilibrio E.

En los arreglos experimentales para asimiento óptico de partículas se considera indispensable el uso de objetivos de microscopio con apertura numérica grande, con la finalidad de que la fuerza de esparcimiento F_{scat} no domine sobre la relación $F_{grad}/F_{scat} \geq 1$, de tal forma que la partícula no sea empujada fuera del punto focal. Cabe señalar que el punto, donde el objetivo de microscopio enfoca el haz láser siempre esta en el plano objeto donde se encuentra la partícula.

Suponiendo que la aberración esférica en el arreglo es cero, entonces todos los rayos enfocan a un solo punto, tomando como referencia solamente el rayo marginal, entonces se identifican tres posibles casos en la posición del foco con respecto al centro de la esfera cuando el eje del haz enfocado pasa exactamente por el centro de la esfera. En la figura 14 (a) el foco está en una posición posterior al centro de la esfera, en el inciso (b) el foco está anterior al centro y en (c) el foco coincide con el centro. En las figuras 14, 15 y 16 la dirección de propagación del haz va de arriba hacia abajo.



(a) (b) (c)

FIGURA 14 Refracción del rayo marginal al incidir sobre una esfera.

El análisis de fuerzas presentado en las gráficas de los incisos de la figura 14, señalan la dirección en que la partícula se desplaza longitudinalmente a través del eje del haz enfocado. Cabe señalar que los trazos de rayos presentados en esta sección, fueron obtenidos mediante simulaciones realizadas mediante el programa de diseño óptico ZEMAX y sustentados en los fundamentos abordados en la referencia (Geary, 2002). La dirección de propagación del haz en la figura 14 va de arriba hacia abajo. En las gráficas presentadas en esta sección se considera que el máximo ángulo de convergencia del haz respecto al eje óptico es $\phi \approx 70°$ para un objetivo de microscopio con NA=1.2, donde ángulos de convergencia grandes aseguran una mayor contribución de la componente de la fuerza gradiente $F_{grad} sen(\phi)$ sobre la contribución de la componente de la fuerza de esparcimiento $F_{scat} \cos(\phi)$ (Ashkin, 1992).

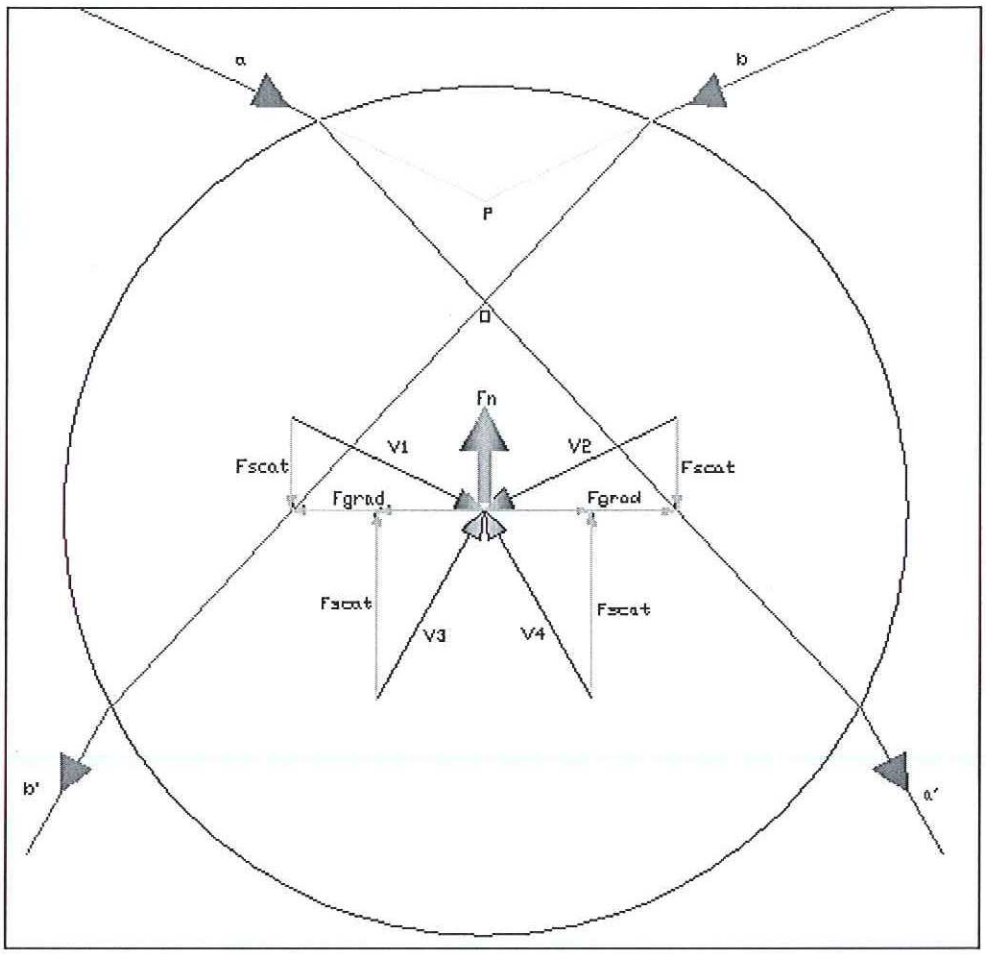


FIGURA 15 Descomposición vectorial de fuerzas según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en una posición posterior al foco.

La figura 15 muestra esquemáticamente las direcciones de las fuerzas que actúan sobre la partícula, para el caso (b) de la figura 14. El punto *P*, es un punto ficticio al que se enfocarían los rayos si el índice de refracción del medio y la partícula fuera el mismo, pero dado que los índices de refracción son diferentes el foco real es el punto *O*. La dirección en

la cual se desplace la partícula depende de la dirección de la fuerza resultante que se ejerza sobre el centro de masa del cuerpo, para el caso de una esfera con una distribución de densidad homogénea, el centro de masa coincide con el centro geométrico de la esfera. En la figura 15. El vector V1 es paralelo al rayo *a*, V2 es paralelo al rayo *b*, V3 es paralelo al rayo *b'* y V4 es paralelo al rayo *a'*. Los vectores V1 y V2 corresponden a la fuerza proveniente de la primera transferencia de momento para los fotones del rayo *a* y *b* respectivamente. Los vectores V3 y V4 corresponden a la fuerza proveniente de la segunda transferencia de momento para los fotones del rayo *b'* y *a'* respectivamente. Los vectores V1, V2, V3 y V4 tiene la misma magnitud debido a la suposición de que la transferencia de momento del fotón es total. Las componentes horizontales de los vectores corresponden a la fuerza gradiente F_{grad}, nótese que estas se anulan, situación que solo ocurre cuando el centro de la partícula está sobre el eje del haz enfocado.

Las componentes verticales de los vectores corresponden a la fuerza de esparcimiento F_{scat}, la suma se estas componentes da como resultado una fuerza neta en la dirección en la que se desplazará la partícula. Como se observa en la figura 15 la fuerza neta F_n apunta hacia arriba. Así la partícula tiende a desplazarse hacia el punto *P*.

En la figura 16 se hace un análisis similar al anterior, para el caso de la figura 14 (a) se observa que la fuerza neta apunta hacia abajo, y al igual que en el caso (b) la partícula se desplaza hacia el foco ficticio, punto *P*.

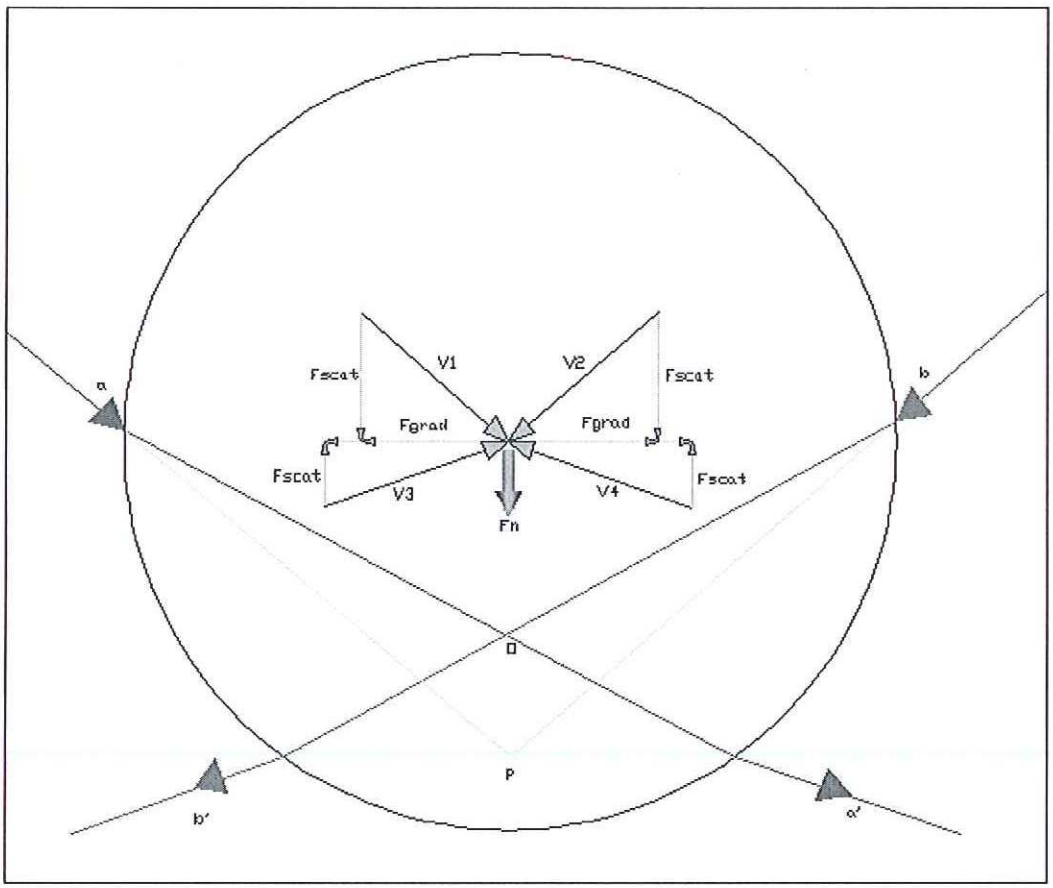


FIGURA 16 Descomposición vectorial de fuerzas según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en una posición anterior al foco.

En el caso (c) de la figura 14, el punto *P* y *O* de las figuras 15 y 16 coinciden en el centro de la esfera. Por lo tanto para este caso en especial las componentes de fuerza de esparcimiento de anulan al igual que las fuerzas gradientes resultando en una fuerza neta igual a cero. En consecuencia la partícula permanece estática, o en otras palabras en una

posición de equilibrio. Los casos presentados en la figura 14, demuestra que en el asimiento de partículas prevalece una situación de homeostasis.

Cabe recordar que en el análisis de fuerzas que actúan sobre la partícula sin asimiento óptico se supuso que la partícula está en el fondo del recipiente de muestra. Experimentalmente el asimiento se logra con un solo haz incidiendo sobre la partícula, en teoría la fuerza de esparcimiento que no se debe a la refracción de los fotones sobre la partícula sino a la reflexión, bajo la situación de homeostasis, debe impulsar a la partícula en la dirección de incidencia del haz, sin embargo dado que la partícula puede suponerse que está en contacto con la superficie plana del portaobjetos, entonces, este ejerce una fuerza de reacción con la misma magnitud pero en sentido opuesto, nulificando la fuerza de esparcimiento total y así la partícula alcanza una posición de equilibrio absoluta, donde la suma de todas las fuerzas es cero.

En las figuras 17 y 18 se muestra la dirección de la fuerza neta F_n para una partícula localizada fuera de eje (exceptuando los casos donde la partícula está en eje y en la posición de equilibrio) para un haz enfocado que se propaga de izquierda a derecha.

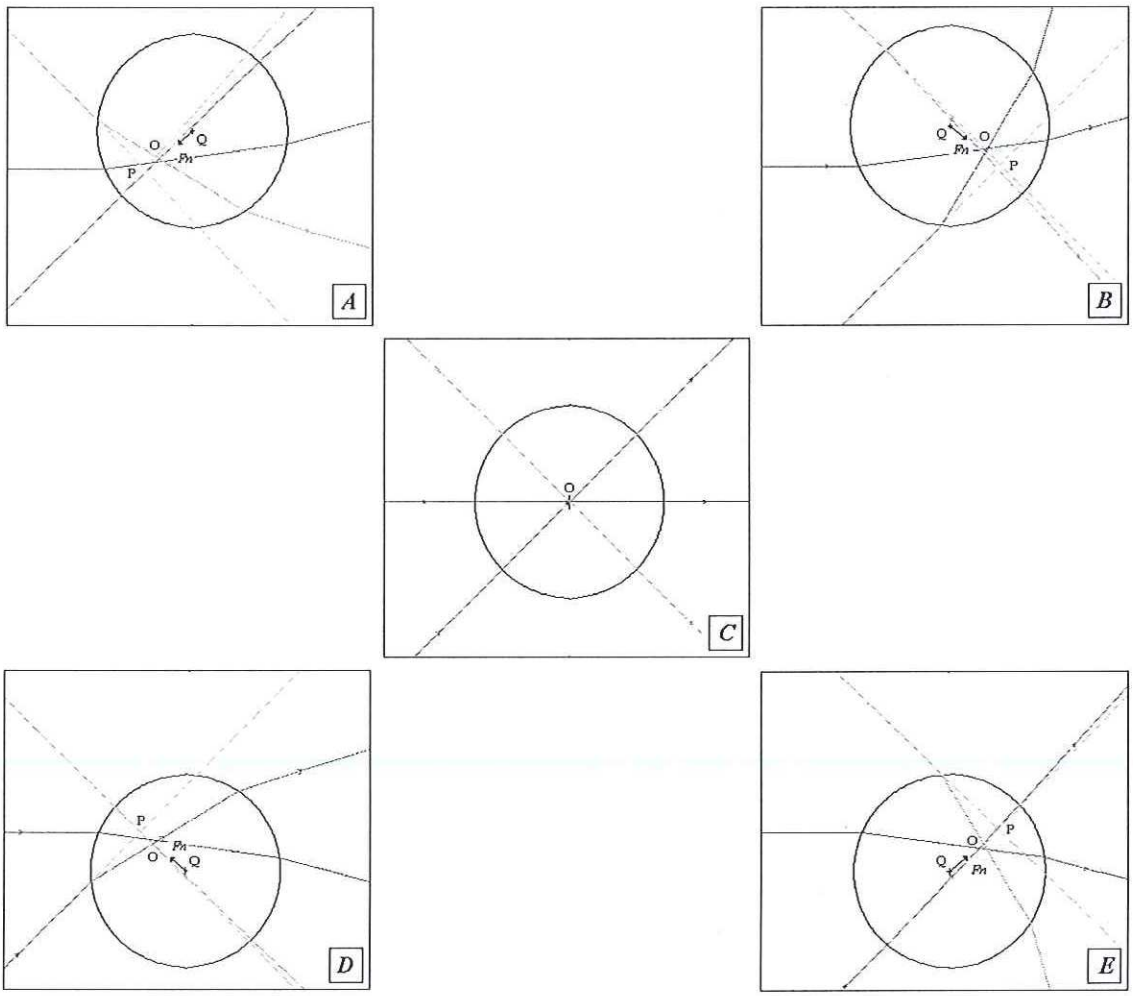


FIGURA 17 Dirección de la fuerza resultante según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en distintas posiciones al interior respecto al foco.

En los incisos *(A)*, *(B)*, *(D)* y *(E)* presentados en la figura 17, se señala el vector de fuerza resultante F_n, en cuya dirección se desplazara la partícula, hasta alcanzar la posición de equilibrio, inciso *(C)*. Cuando la partícula está fuera de eje, incisos *(A)*, *(B)*, *(C)* y *(D)* las

componentes de fuerza gradiente no se anulan, como sucede en los casos de las figuras 15 y 16.

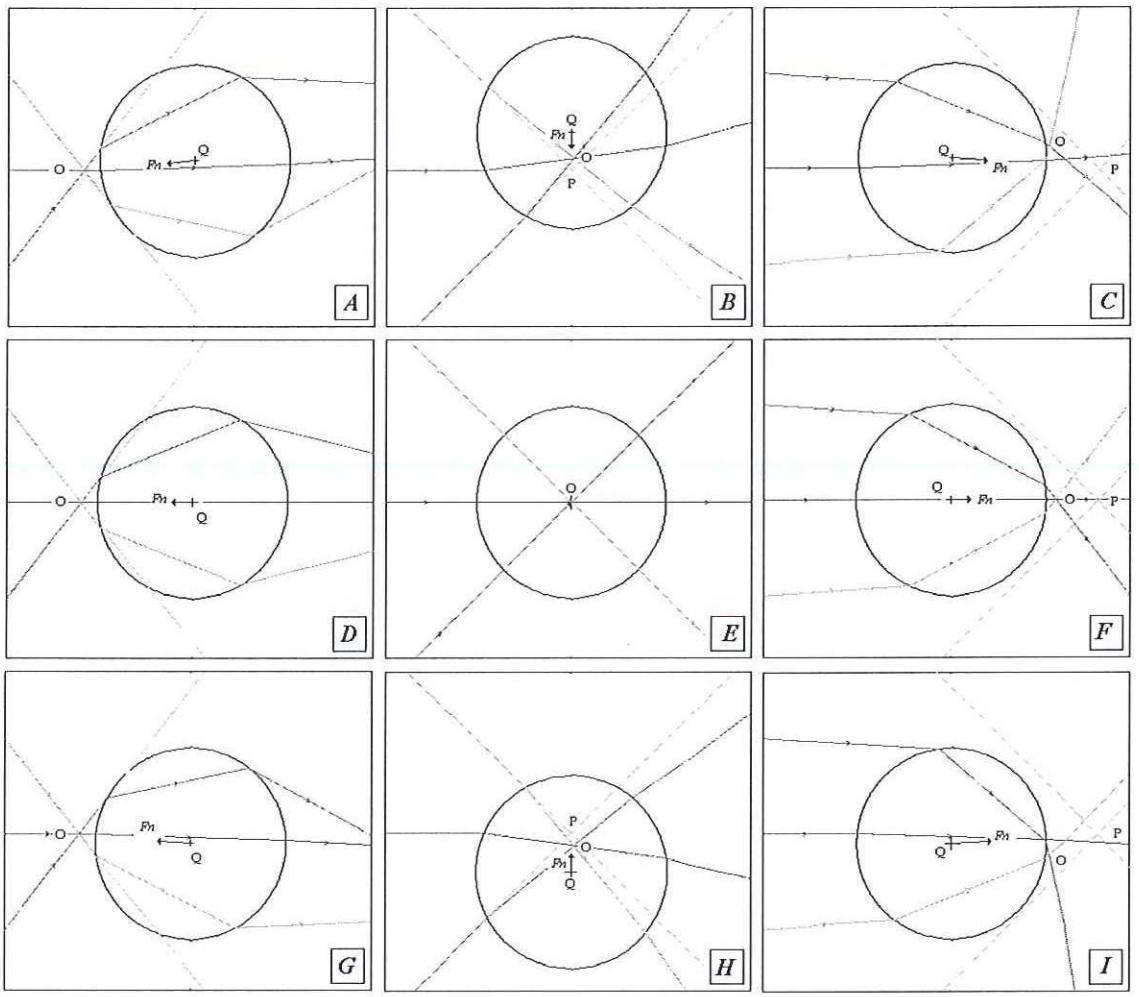


FIGURA 18 Dirección de la fuerza resultante según la refracción del rayo marginal sobre una esfera con su centro en distintas posiciones al exterior respecto al foco.

En la figura 18 se muestran los casos para los cuales el foco real, denotado por el punto *O,* se forma antes de la esfera, incisos *(A)*, *(D)* y *(G)*, y posterior a la esfera, incisos *(C)*, *(F)* y *(I)*. El vector de fuerza resultante *Fn* indica la dirección a la cual se desplazara la partícula. La fuerza resultante para estos casos es de menor magnitud que para los casos anteriores, figura 17, e incisos *(B)* y *(H)* en los cuales el foco está adentro de la esfera. Observe que en los incisos *(C)*, *(F)* e *(I)* de la figura 18, los rayos que alcanzan a salir de la esfera inciden sobre la superficie con un ángulo menor al ángulo critico. Ángulos más abiertos, hacen que los rayos incidentes sufran refracción parcial, donde predomina una fuerte reflexión interna en la esfera, el ángulo critico es $\theta_C = sen^{-1}(1.33/1.59) \approx 57^\circ$. En los casos de los incisos *(A), (B), (C), (G), (H)* e *(I)* la componente de fuerza gradiente no se anula, situación opuesta para los casos de los incisos *(D), (E)* y *(F)* donde la partícula está en eje, siendo el inciso *(E)* la situación de equilibrio.

CAPÍTULO
III

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN

En la primera sección de este capítulo se aborda la caracterización del instrumento en general, resaltando los aspectos sobre diseño óptico. En la segunda sección se trata la distribución y aprovechamiento de la potencia óptica en el arreglo experimental.

III.1 DISEÑO DE UN MANIPULADOR ÓPTICO Y SUS IMPLICACIONES

Un manipulador óptico o pinzas ópticas es un instrumento novedoso, que conjuga el sistema de visión magnificada de un microscopio convencional con un sistema de enfocamiento de un haz láser al plano del espécimen. El elemento óptico principal en ambos sistemas es el objetivo de microscopio, el cual también es el de mayor complejidad en lo que respecta a diseño óptico, agréguese que el objetivo de microscopio es en sí un sistema de varios elementos que no puede ser alterado por el diseñador del manipulador óptico. En la sección anterior se justificó la imposición de aberturas numéricas grandes en el objetivo, con el propósito de alcanzar un asimiento eficiente. Esto de alguna manera significa una limitación en el tamaño de las partículas que pueden ser manipuladas, restringiendo el uso del manipulador óptico a aquellas partículas o especímenes que puedan ser apreciables solo en el campo de visión del microscopio para el objetivo de abertura numérica señalada.

III.1.1 ESQUEMA DE UN MANIPULADOR ÓPTICO Y LOS ELEMENTOS QUE LO INTEGRAN

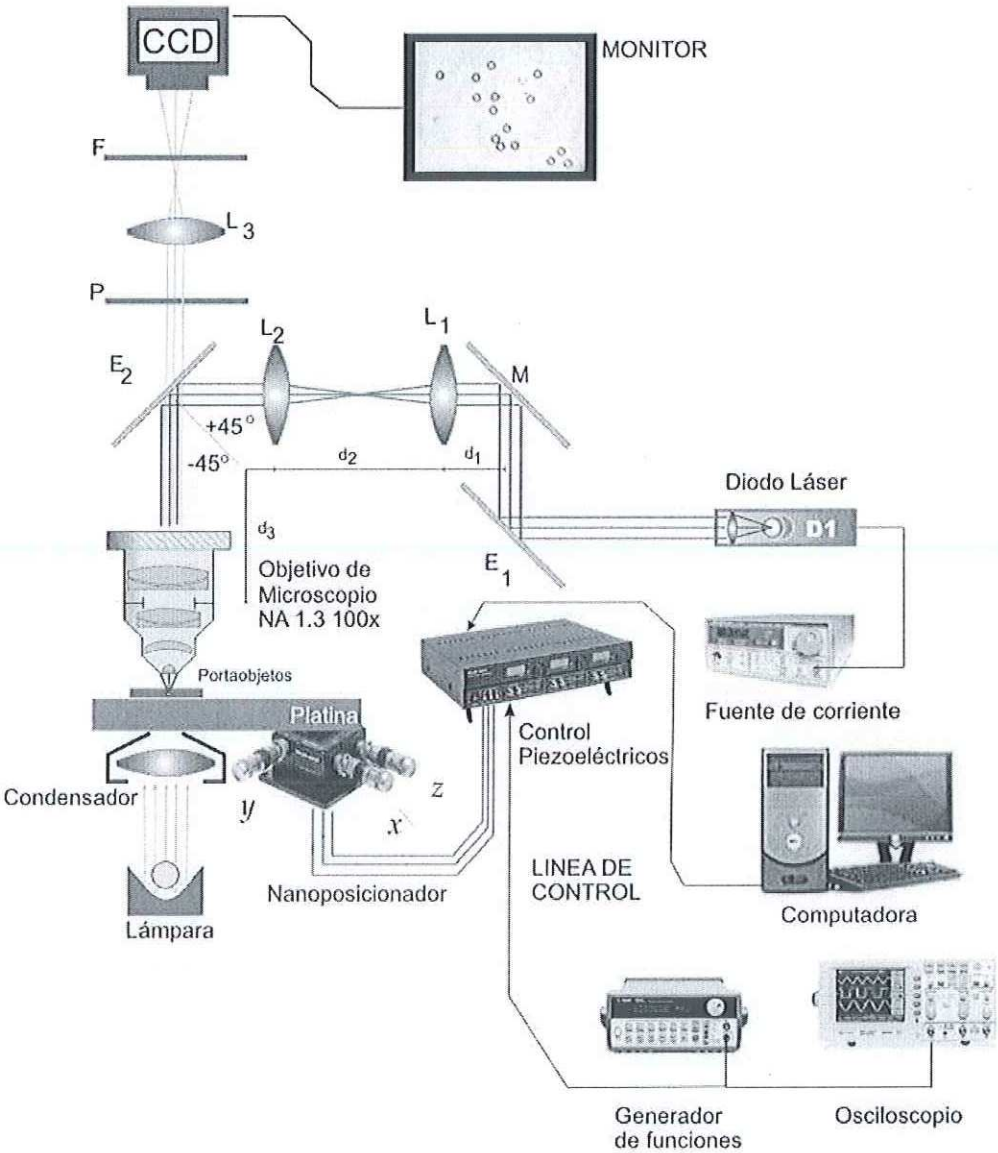


FIGURA 19 Esquema de un manipulador óptico con un solo haz para asimiento.

La información suministrada en este capítulo hace mención a los elementos reales utilizados en el arreglo experimental. Los componentes más elementales en la construcción de un manipulador son:

- Diodo láser más los elementos ópticos imprescindibles en la generación de un haz colimado. El diodo láser es de la marca Blue Sky Research, modelo PS026-00 Circulaser de 785nm, 50mW, incluye corrección asimétrica por lente cilíndrica (datos nominales del fabricante).
- Espejo con reflexión total a la longitud de onda del diodo láser, empotrado en una montura gimbal ***M***, la cual tiene la particularidad de lograr reflexiones en el haz colimado para ángulos muy pequeños, especialmente menores a un grado.
- Sistema afocal, compuesto por dos lentes biconvexas L_1 y L_2 Thorlabs LB1904 iguales en sus características de diámetro de 25.4mm y distancia focal de 125mm.
- Espejo dicroico E_2 con reflexión total a la longitud de onda de la luz emitida por el diodo Láser. La normal al centro de la superficie del espejo debe hacer un ángulo de -45° con el eje óptico del sistema de visión del microscopio y +45° con el eje óptico del sistema afocal.
- Objetivo de microscopio Nikkon 100xH W.D. 0.18mm de abertura numérica grande NA=1.2 con aceite de inmersión.
- Substrato con aceite de inmersión, entre el objetivo del microscopio y el cubreobjetos (Puede existir asimiento de partículas prescindiendo del aceite de inmersión NA=0.9)

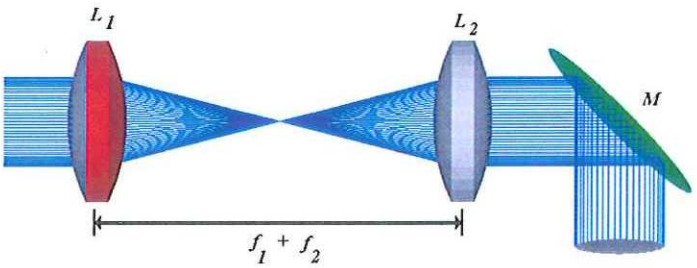
- Portaobjetos y cubreobjetos que contienen el espécimen de manipulación, montados sobre una platina con capacidad de desplazamiento en tres grados de libertad y con actuadores bajo control local y remoto. Al portaobjetos se le adhiere una lámina de plástico para contención de la muestra.

El sistema de visión, excluyendo, los elementos comunes al sistema del manipulador, está integrado por:

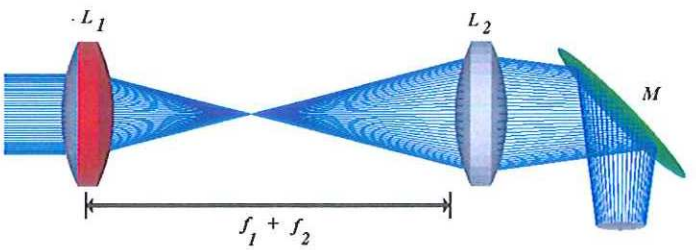
- Lámpara
- Condensador de Microscopio Baush & Lomb KHS 403 746
- Polarizador $\boldsymbol{P}$ y filtro supresor de banda $\boldsymbol{F}$ a la longitud de onda emitida por el diodo láser
- Lente Biconvexa $\boldsymbol{L_3}$ Thorlabs LB1901 F=75mm, D=25.4mm
- Cámara CCD Pulnix TM-7CN

En la manipulación de partículas el sistema afocal tiene particular relevancia entre los elementos ópticos que componen el sistema de pinzas ópticas. En la siguiente sección se abordaran las ventajas del sistema afocal a partir de su optimización, así como su repercusión en las fuerzas de asimiento de partículas dieléctricas y especímenes biológicos.

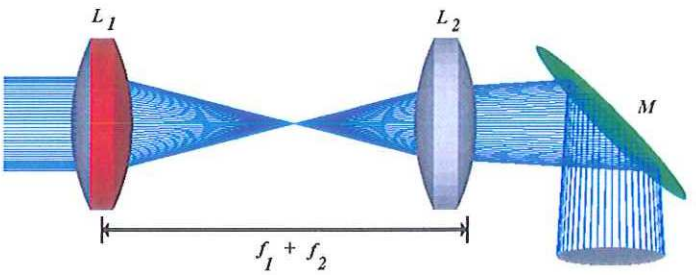
III.1.2 LAS VENTAJAS DEL SISTEMA AFOCAL



(a)



(b)



(c)

FIGURA 20 Configuración del sistema afocal y sus variaciones.

El sistema afocal, figura 20 (a), tiene la peculiaridad de recibir un haz colimado (izquierda a derecha) a la entrada y entregar un haz colimado a la salida con el mismo diámetro y sin modificaciones sustanciales en sus parámetros de distribución de intensidad. Esta compuesto por dos lentes biconvexas con características idénticas. El sistema afocal es parte importante en el manipulador por que haces colimados de diámetro pequeño que entran al sistema a un cierto ángulo respecto al eje óptico, a la salida serán dirigidos a una distancia dada donde los haces se intersecan independientemente del ángulo de entrada, además el área en común de intersección es igual al área transversal del haz.

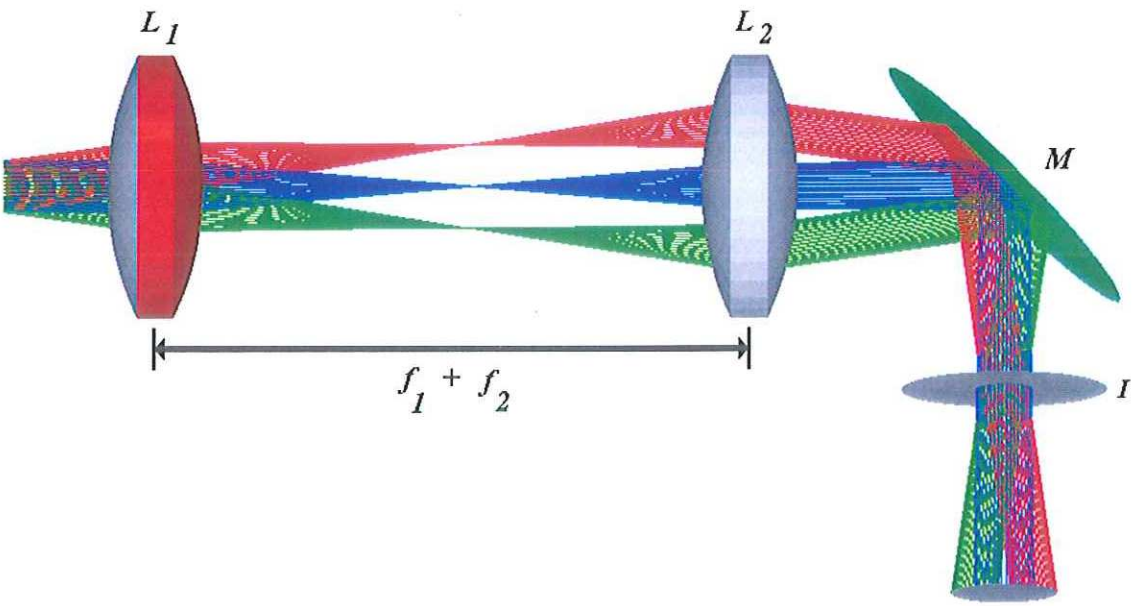


FIGURA 21 Plano de intersección de haces en un sistema afocal.

En la figura 20, inciso (b) y (c) se muestra un sistema convergente y divergente respectivamente alrededor del sistema afocal, es decir los desplazamientos de la lente L_2 son mínimos con respecto a la distancia de separación entre L_1 y L_2, en un sistema afocal ideal. Esta distancia debe ser igual a la suma de la distancia focal posterior de L_1 más la distancia focal anterior de L_2, por simplicidad considérese f_1+f_2. Considerando la presencia del objetivo de microscopio, ir de un sistema afocal a un sistema convergente implicará una disminución en la distancia del foco a la última lente del objetivo de microscopio y viceversa cuando se va de un sistema afocal a un sistema divergente, aunque para este último caso existe una perdida de energía inherente por truncamiento del haz a consecuencia de la abertura limitadora de entrada del objetivo.

En la figura 21 se muestra la incidencia de tres haces (de izquierda a derecha) con diferente inclinación a la entrada del sistema afocal, uno a incidencia paralela al eje óptico del sistema y los otros dos a un ángulo cualquiera, siempre y cuando los haces no sufran viñeta por los elementos ópticos. Obsérvese que en el plano I los haces se intersecan. La distancia de dicho plano con respecto a la última lente del sistema afocal depende de la distancia focal de la lente, de la contribución de la aberración esférica y de la disposición angular de los haces a la entrada, donde se busca primordialmente variaciones angulares muy pequeñas, solo alcanzables con la montura gimbal. Es en el plano de intersección I donde debe estar la abertura de entrada del objetivo de microscopio.

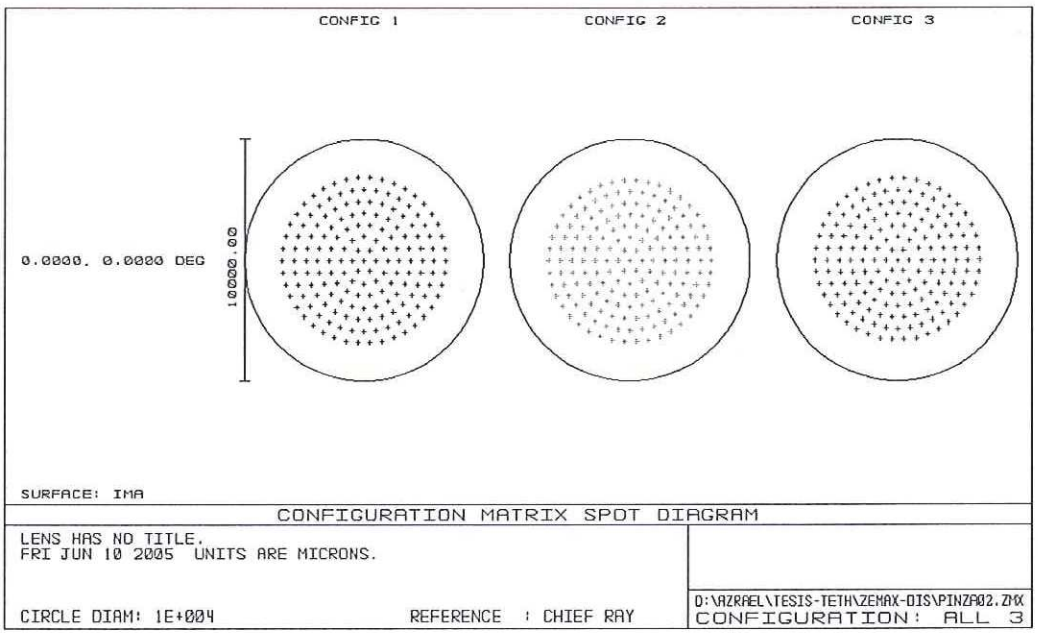


FIGURA 22 Diagrama de manchas a la entrada del objetivo de microscopio. Sin efectos de truncamiento.

Utilizando el programa ZEMAX de diseño óptico, se realizaron simulaciones de trazos de rayos usando los elementos ópticos reales, al igual que las distancias factibles en el arreglo para el sistema afocal. La figura 22 muestra los diagramas de manchas en el plano ***I*** para los haces que son reflejados por el espejo de la montura gimbal, para una variación angular máxima de un grado, obsérvese que la totalidad de los rayos llegan al plano ***I***, así también, el área transversal que cubren es la misma. La circunferencia en línea sólida es una referencia.

La figura 23, muestra como las variaciones angulares mayores a 1 grado impiden que la totalidad de los rayos lleguen al plano de intersección. De manera secuencial la distribución transversal de rayos es: 0°,1.1°, 1.2°, 1.3°, 1.4°, 1.5°, 1.6°, 1.7°, 1.8°, 1.9° y 2°.

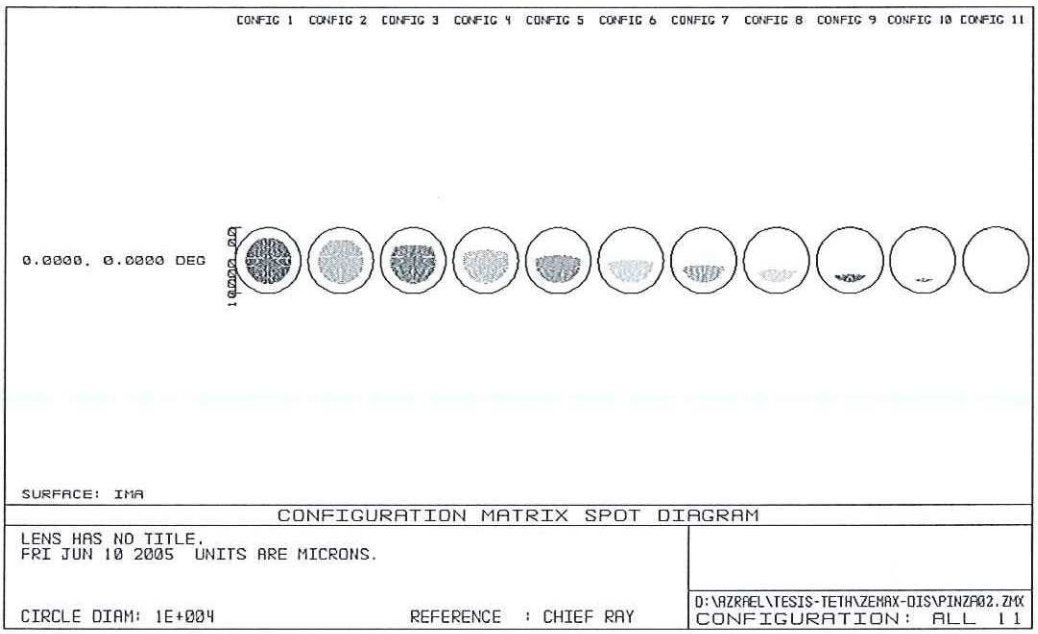


FIGURA 23 Diagrama de manchas a la entrada del objetivo, con efectos de truncamiento para variaciones angulares.

Dado que el haz colimado lleva una distribución de intensidad gaussiano o dicho en otras palabras un modo TEM00, entonces la energía truncada que llega al objetivo sufre una distorsión severa, tal y como se muestra de forma secuencial en los incisos de la figura 24.

Esto representa un efecto indeseable en la operación de un manipulador óptico, no solamente por la perdida de energía que conlleva el sesgo, sino además, por la afectación en la distribución de intensidad y consecuentemente en la acción de la fuerza gradiente durante el asimiento de una partícula.

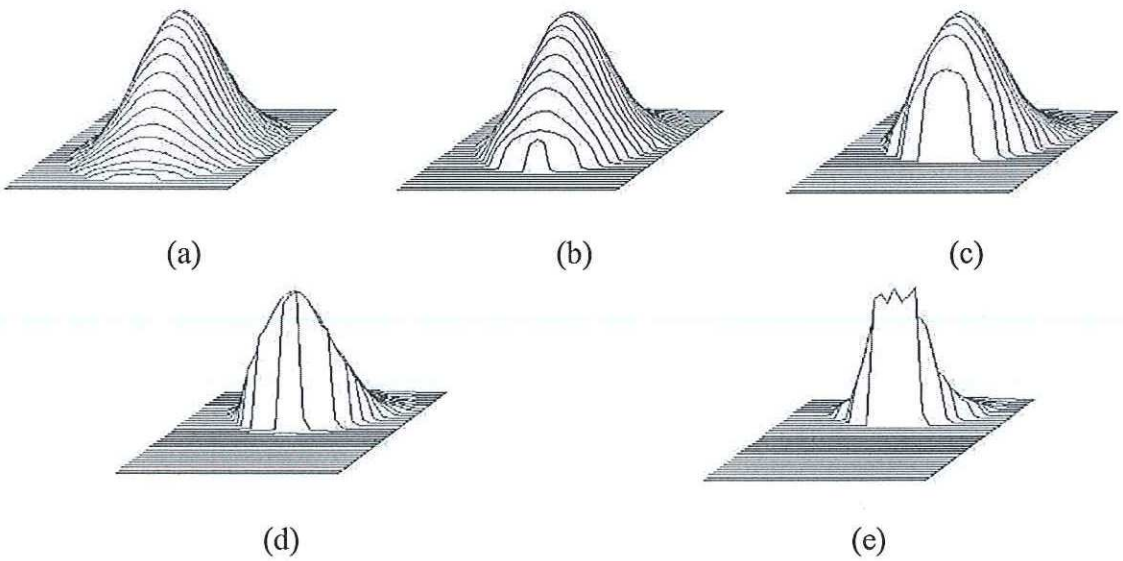


FIGURA 24 Efectos de truncamiento en el perfil de un haz de intensidad gaussiano.

Por lo tanto el diseño de un manipulador óptico no solamente implica la búsqueda del mejor rendimiento en base a perdidas menores de energía, sino además, implica el cuidado de preservar la distribución de intensidad del haz. Con el auxilio del programa ZEMAX se plantearon varios posibles diseños para el sistema afocal, variando la distancia focal y el

diámetro de las lentes, con el propósito de lograr mayores variaciones angulares sin menoscabo en el rendimiento del manipulador. A continuación se presenta un estudio de cuatro propuestas para mejorar el desempeño del sistema de manipulación.

TABLA II Propuestas para el mejor rendimiento del manipulador con modificación de parámetros al sistema afocal.

	L_1	L_2	$\Delta\theta$	C
CASO I	Thorlabs LB1904 F=125mm D=25.4mm	Thorlabs LB1904 F=125mm D=25.4mm	1°	198 mm
CASO II	Thorlabs LB1904 F=125mm D=25.4mm	Thorlabs LB1901 F=75mm D=25.4mm	1.6°	111 mm
CASO III	Thorlabs LB1904 F=125mm D=25.4mm	Coherent 239723 Doblete Acromatico 587.6 nm F=80mm D=50mm	3.2°	100 mm
CASO IV	Thorlabs LB1901 F=75mm D=25.4mm	Thorlabs LB1904 F=125mm D=25.4mm	0.2°	111 mm

En la tabla II, el caso I corresponde al sistema afocal implementado en el arreglo real del manipulador óptico. Las lentes L_1 y L_2 son iguales, $\Delta\theta$ es la variación angular máxima posible. En la figura 23 se observa que en una variación de 1.1° existe truncamiento del haz. La distancia **C** es la distancia de la lente L_2 al plano de intersección, el cual en la mayoría de los casos concuerda con el plano donde se localiza el foco paraxial. En el caso

II, L_1 y L_2 tienen el mismo diámetro pero L_2 tiene una distancia focal menor. Se mejora por 0.6° el valor máximo posible para $\Delta\theta$ y disminuye C, con respecto al caso anterior, sin embargo se presentan efectos indeseables por aberración esférica y curvatura de campo. Con el propósito de disminuir las aberraciones del caso II, la lente L_2, en el caso III se sustituye por un doblete acromático de menor distancia focal efectiva y mayor diámetro respecto a L_1. El caso III resulta ser el óptimo, alcanzando un $\Delta\theta$ de 3.2°. La implementación real de este diseño afocal no fue posible llevarlo acabo por limitaciones de presupuesto y disposición de las monturas adecuadas. El peor de los casos es el IV, donde existe fuerte viñeteo por la lente L_2, y baja considerablemente el rendimiento del manipulador.

Otro de los factores que afectan el desempeño de un manipulador óptico, son las aberraciones del sistema, en la figura 25 se muestra un ejemplo de los efectos de la aberración esférica y notoriamente curvatura de campo para el caso II de la tabla 1. En recordación, distorsiones severas en la distribución de intensidad transversal del haz, implicará efectos no deseados en la interacción de la fuerza gradiente con la partícula.

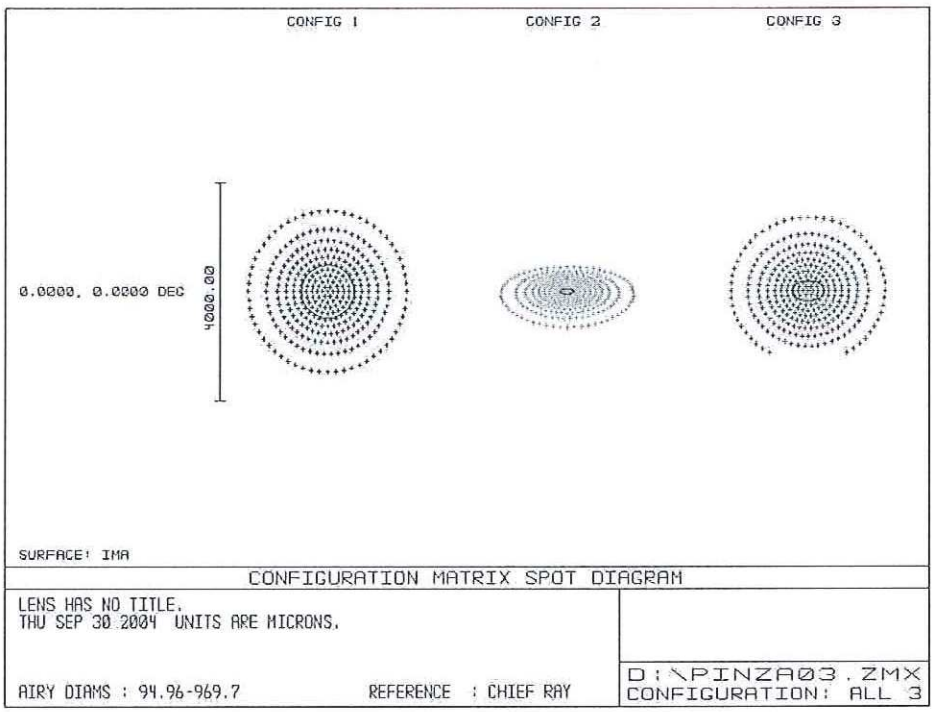


FIGURA 25 Diagrama de manchas, efectos de aberración inducidos por el sistema afocal.

III.1.3 EL OBJETIVO DE MICROSCOPIO, LOS EFECTOS DE ABERRACIÓN Y VIÑETEO COMO MENOSCABO EN LA EFICIENCIA DEL ASIMIENTO

Como ya se mencionó, el objetivo de microscopio es el elemento más complejo y de mayor importancia tanto en el sistema de manipulación como en el de visión, y es en sí mismo un sistema compuesto de varias lentes. Los objetivos de abertura numérica grande son sistemas apocromáticos diseñados para reducir al mínimo las aberraciones, especialmente

la aberración esférica. En la figura 26 se muestra el diseño de un objetivo de microscopio apocromático extraído del libro "Lens Design" del autor Warren Smith (Smith, 1992), a pesar de que no es fidedigno con las dimensiones reales de un objetivo real, es útil para las simulaciones, se debe recalcar que los resultados presentados para este diseño, en especial los datos angulares, no deben tomarse en consideración para un diseño real e integral del sistema de manipulación, antes bien, sólo son útiles para un entendimiento fenomenológico. El sistema apocromático lo integran las siguientes lentes, dos dobletes acromáticos para corrección de la aberración cromática axial en dos longitudes de onda: azul en 486nm y rojo en 656nm; un menisco positivo que tiene como función principal incrementar la abertura numérica, y una lente hemisférica con cara plana hacia el espécimen. Se debe tomar en cuenta que la máxima abertura numérica del objetivo se alcanza por el índice de refracción del líquido de inmersión que forma una capa entre la última lente y el cubreobjetos.

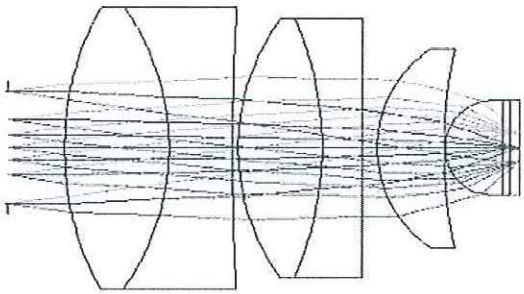


FIGURA 26 Objetivo de microscopio de apertura numérica grande, según diseño de Warren Smith (Smith, 1992).

La gráfica de la figura 27 señala el porcentaje de rayos viñeteados para haces colimados que inciden con un ángulo respecto al eje óptico, nótese que a partir de 9° los haces se viñetean. Los rayos de color verde y rojo de la figura 26 inciden a +/- 9° respecto al eje óptico.

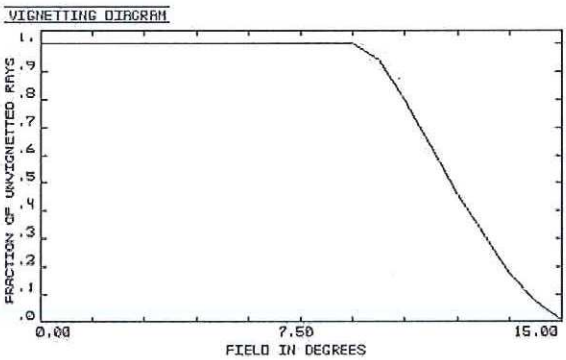


FIGURA 27 Diagrama de viñeteo para el objetivo de microscopio.

En la Figura 28 se muestra un corte transversal de la distribución de rayos en un plano o un diagrama de manchas en particular, el punto rojo indica el centroide. El diámetro de la circunferencia en color negro es de 2mm. Una referencia del desparramamiento de los rayos con respecto al punto de referencia (centroide) es la raíz media cuadrática del radio (valor rms), que en este ejemplo es de 356.185μm, además el radio GEO da información

del rayo más alejado de la referencia, que en este ejemplo es de 530.317μm, ver recuadro inferior de la figura 28.

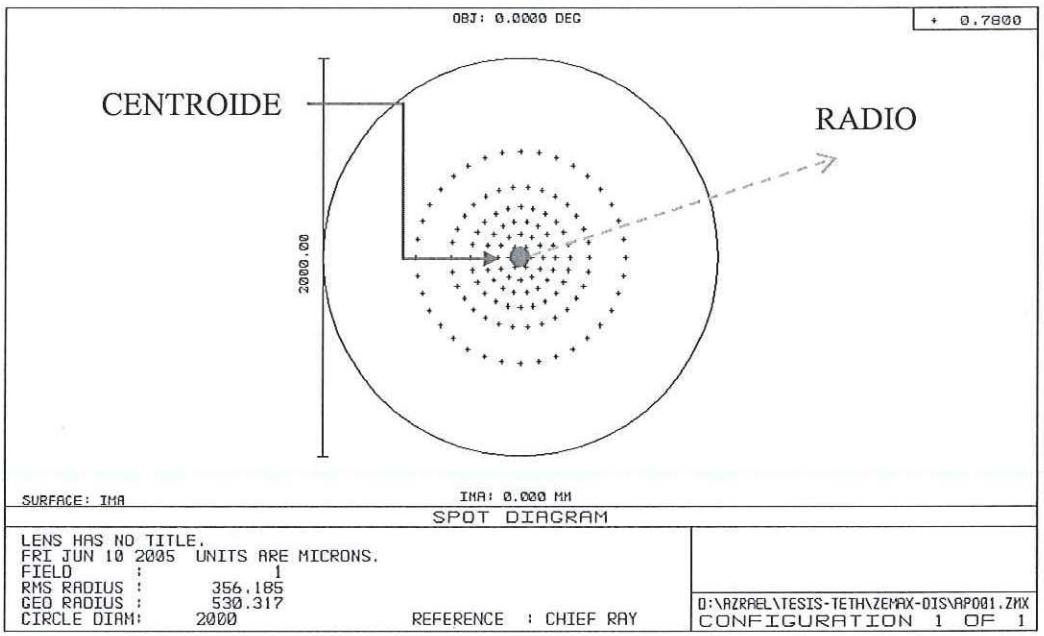


FIGURA 28 Identificación del centroide y radio para un diagrama de manchas a la salida del objetivo de microscopio.

Los diagramas de manchas de la figura 29, muestran la distribución de los rayos en el plano del espécimen para haces que inciden a un cierto ángulo respecto al eje óptico, en el inciso (a) el ángulo de incidencia es de 0°, para este caso los rayos que entran al objetivo de microscopio son paralelos al eje óptico, en los siguiente incisos en los cuales se incrementa el ángulo de incidencia: (b) ángulo de incidencia de 5°, (c) ángulo de incidencia de 7.5°, (d)

ángulo de incidencia de 10° y (e) ángulo de incidencia de 13°, se observa un incremento en el radio rms y por lo tanto del área de la mancha focal, también se observa la presencia de efectos no deseados de aberración, en conjunto todos estos efectos tienden a afectar la distribución de fuerzas en el asimiento óptico con la excepción del caso ideal del inciso (a).

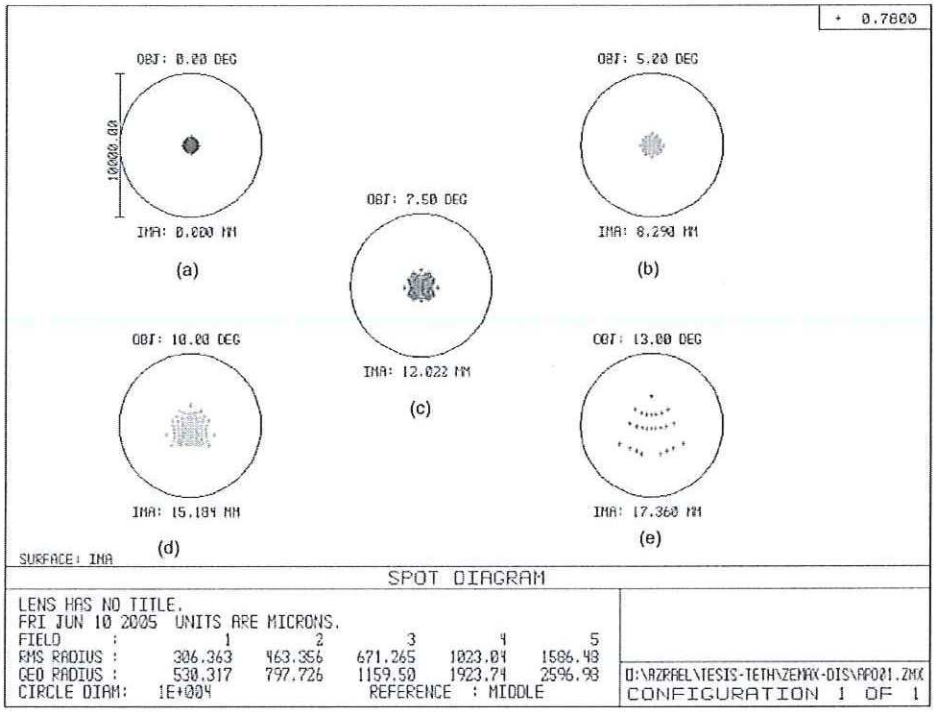


FIGURA 29 Diagrama de manchas, efectos de aberración para variaciones angulares del haz de entrada al objetivo de microscopio.

La gráfica de la figura 30 es interesante, por que en ella se muestra el porcentaje de energía encerrada en un círculo respecto a la longitud del radio que parte del centroide. Cada línea de distinto color señala que para diferentes ángulos del haz de entrada con respecto al eje óptico, el diámetro del círculo que contiene la totalidad de la energía crece conforme aumenta el ángulo, esto es válido siempre y cuando los rayos con distintas inclinaciones no sufran viñeteo por las lentes que componen el objetivo de microscopio.

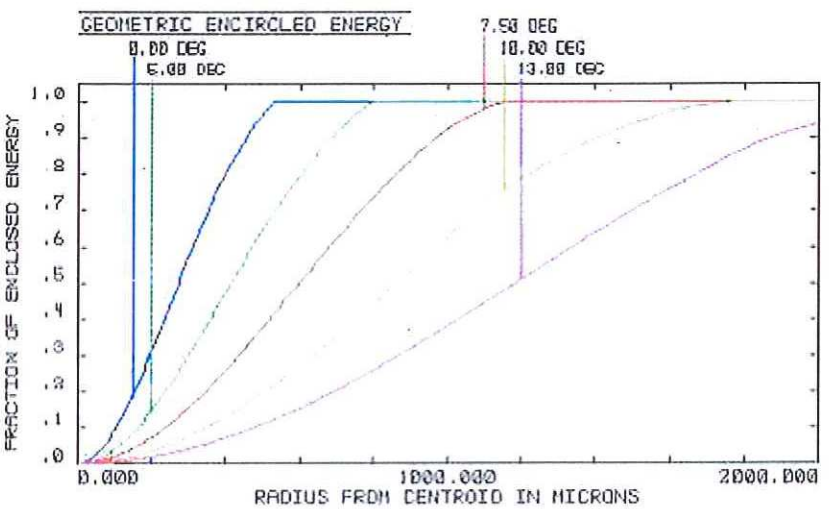


FIGURA 30 Porcentaje de energía comprendida en un área delimitada para variaciones angulares a la entrada del objetivo de microscopio.

Por lo tanto, si la energía está comprendida en una superficie circular mayor que aquella para la cual los rayos inciden paralelamente al eje óptico, entonces es de suponer que el

gradiente de fuerzas del haz enfocado disminuya, es decir, aumenta el diámetro del área transversal de enfocamiento y por lo tanto cabe esperar que las fuerzas que intervienen en el asimiento disminuyan a pesar de que la misma energía este atravesando el objetivo. En conclusión la máxima fuerza de asimiento ocurrirá cuando el haz que incide sobre la entrada del objetivo de microscopio sigua una trayectoria paralela al eje óptico. Si la conclusión anterior es cierta, entonces existirá una degradación de la fuerza de asimiento en el plano del espécimen, como se muestra en la figura 31, donde el recuadro exterior representa el área para la cual las pinzas pierden fuerza debido al viñeteo. Por otro lado, el cuadro del interior es el área sobre la cual las pinzas son efectivas. Sin embargo, las fuerzas resultantes Fx y Fy del asimiento, que incluyen la fuerza gradiente y de esparcimiento disminuyen conforme nos alejamos del centro. Un desplazamiento ortogonal del foco en el eje x o y, en el plano del espécimen se logra girando una sola perilla de la montura gimbal, si el desplazamiento en uno de estos dos ejes se hace a la misma distancia, es de esperar que Fx sea igual a Fy. Es importante señalar que se considera el centro del plano del espécimen como el punto donde incide normal el eje óptico, y para fines prácticos también puede considerarse como el centro de la imagen proyectada por el sistema de visión, sin embargo esto no es necesariamente cierto si el sistema esta fuera de eje. Al desplazar una partícula asida con un movimiento uniforme, es decir girar una perilla de la montura gimbal a la misma velocidad, es decir la fuerza debido al arrastre es igual durante el movimiento, no implica que la partícula este asida con la misma fuerza, sino por efectos inherentes a la óptica del objetivo siempre existirá un debilitamiento de las fuerzas en el asimiento si nos alejamos del centro y de manera opuesta, un exacerbamiento de las fuerzas en el asimiento

si nos acercamos al centro. Cabe señalar que en esté análisis no se está incluyendo los efectos de la polarización en las fuerzas de asimiento.

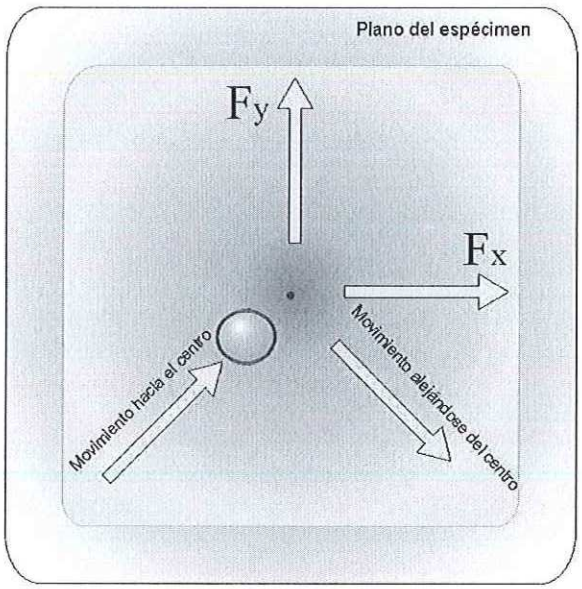


FIGURA 31 Degradación de fuerzas para desplazamientos fuera de eje.

Bajo un criterio de observación empírica en los experimentos, es fácil percibir este fenómeno y observar los efectos de la variación de fuerza de asimiento para distintas posiciones de una partícula en la pantalla. Cuando una partícula está en el eje óptico, pero el haz no lo está, entonces, cuando acercamos el haz a la partícula, esta se atrapa rápidamente, situación que no ocurre con la misma rapidez si la partícula está

considerablemente retirada del centro, de hecho es necesario acercar el foco del haz a la partícula a una distancia menor.

III.1.4 CÁLCULO PARA EL DESPLAZAMIENTO TRANSVERSAL DE LA CINTURA DEL HAZ ENFOCADO SEGÚN VARIACIONES ANGULARES EN EL ESPEJO DE LA MONTURA GIMBAL

En demostraciones anteriores se ha comprobado que la variación angular del espejo gimbal en un solo eje representado en la figura 32, como el ángulo *u* respecto al eje óptico, debe de ser menor a 1°, con el propósito de que la distribución del haz conserve su perfil y la mayor cantidad de energía posible a la entrada del objetivo de microscopio.

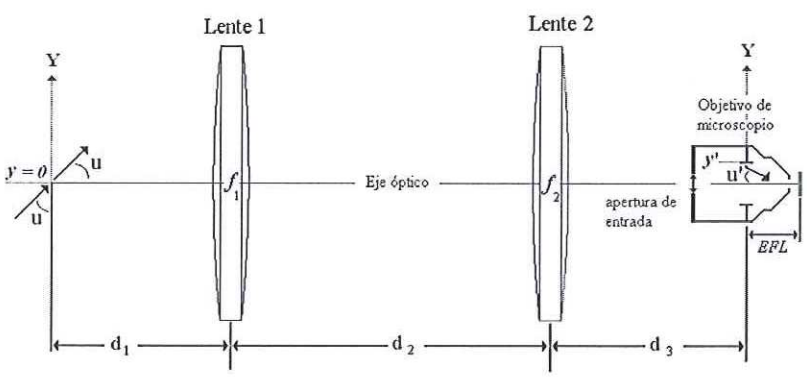


FIGURA 32 Relación de la inclinación angular y el desplazamiento transversal de la cintura.

Dado que la variación angular de u debe ser sumamente pequeña, entonces es posible usar la aproximación paraxial al trazo de un rayo cualquiera que entra al arreglo con una altura y respecto al eje óptico del sistema, y obtener un rayo a la salida con una altura y' y un ángulo u'.

Todo el sistema puede describirse en base a una matriz de transferencia (Saleh *et al.*, 1991). Para tal efecto, es necesario indicar una distancia d_1 que parte de la entrada del sistema a la lente 1, otra distancia d_2 correspondiente a la longitud que separa las lentes 1 y 2, por último una distancia d_3 que va de la lente 2 al final del sistema. Además se considera a las lentes 1 y 2 como lentes delgadas con una distancia focal f_1 y f_2 respectivamente.

$$M_T = \begin{bmatrix} 1 & d_3 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f_2 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & d_2 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f_1 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & d_1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \tag{51}$$

Note que en el producto matricial para llegar a la matriz de transferencia del sistema M_T, no se incluyen las lentes que componen al objetivo de microscopio, sin embargo se considera que el final del sistema esta adentro del objetivo, a una distancia tal que entre el plano imagen y la pupila del sistema, sea igual a la distancia focal efectiva del objetivo de microscopio *EFL*. La matriz de transferencia del sistema es:

$$M_T = \begin{bmatrix} 1 - \frac{(d_2+d_3)}{f_1} - \frac{d_3}{f_2} + \frac{d_2 d_3}{f_1 f_2} & (d_1+d_2+d_3) - \frac{(d_1 d_2 + d_1 d_3)}{f_1} - \frac{(d_1 d_3 + d_2 d_4)}{f_2} + \frac{d_1 d_2 d_3}{f_1 f_2} \\ -\frac{1}{f_1} - \frac{1}{f_2} + \frac{d_3}{f_1 f_2} & 1 - \frac{d_1}{f_1} - \frac{(d_1+d_2)}{f_2} + \frac{d_1 d_2}{f_1 f_2} \end{bmatrix}. \quad (52)$$

La solución para la altura y el ángulo de un rayo a la salida del sistema, partiendo de un rayo a la entrada con valores para la altura y el ángulo con respecto al eje que son conocidos, es:

$$\begin{bmatrix} y' \\ u' \end{bmatrix} = [M_T] \begin{bmatrix} y \\ u \end{bmatrix}. \quad (53)$$

Si y=0, es decir la altura del rayo a la entrada del sistema es cero, entonces:

$$y' = \left((d_1+d_2+d_3) - \frac{(d_1 d_2 + d_1 d_3)}{f_1} - \frac{(d_1 d_3 + d_2 d_4)}{f_2} + \frac{d_1 d_2 d_3}{f_1 f_2} \right)(u) \quad (54)$$

$$u' = \left(1 - \frac{d_1}{f_1} - \frac{(d_1+d_2)}{f_2} + \frac{d_1 d_2}{f_1 f_2} \right)(u) \quad (55)$$

Conociendo el valor de u' y la distancia focal efectiva del objetivo de microscopio *EFL*, la distancia Δy en el plano imagen, se calcula fácilmente por la siguiente ecuación.

$$\Delta y = (EFL)(u') \ . \quad (56)$$

Para el arreglo real donde d_1=10mm, d_2=250mm, d_3=200mm, f_1=f_2=125mm y la distancia focal efectiva del objetivo de microscopio es aproximadamente 2mm, entonces $\Delta y \approx 2\text{x}10^{-3}(u)$. Fällman y Axner (Fällman *et al.*, 1997) proponen un diseño de pinzas ópticas diferente al aquí propuesto y obtienen para el desplazamiento en el plano imagen (plano del espécimen) del haz enfocado la expresión: $\Delta y \approx 5\text{x}10^{-3}(u)$, observe que los resultados son del mismo orden de magnitud y cercanos entre sí. Nuevamente el ángulo u debe ser menor a 1° y depende del ajuste que se haga con las perillas de la montura gimbal.

III.2 DISTRIBUCIÓN DE LA POTENCIA ÓPTICA EN EL ARREGLO EXPERIMENTAL

En esta sección se describirá la distribución de la potencia óptica en el arreglo experimental. Como se muestra en la figura 33 y 36 se han seleccionado cinco posiciones de referencia para el monitoreo de la potencia óptica, cabe señalar que la potencia registrada en la posición cinco es la potencia efectiva en el asimiento y manipulación de partículas.

En la figura 34 y tabla de datos III se muestra la potencia óptica registrada a la salida del diodo láser (Posición 1), se observa un comportamiento lineal de 0.1262mW en la potencia mínima a 42.18mW en la potencia máxima.

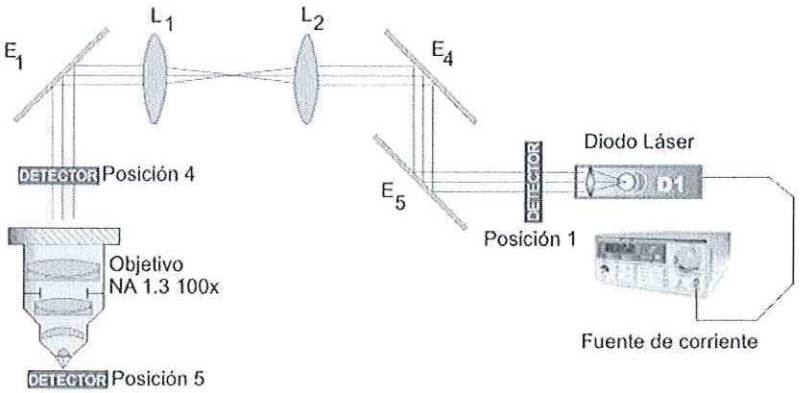


FIGURA 33 Esquema de medición de potencias contra variación en la fuente de corriente en el arreglo experimental para posiciones 4 y 5 del detector.

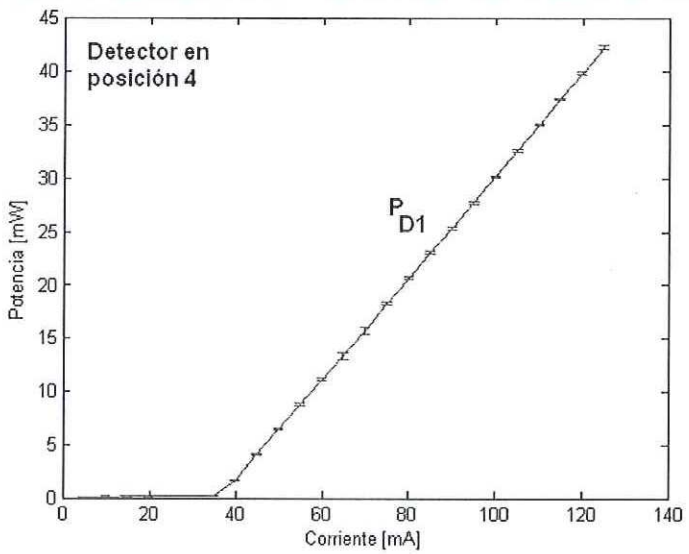


FIGURA 34 Variación de la potencia óptica contra corriente de alimentación del diodo láser 1, para la posición 4 en el arreglo experimental.

TABLA III Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 4.

Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ
5	0.1262	0.0047	50	6.458	0.0438	95	27.68	0.1095
10	0.1302	0.0050	55	8.78	0.1102	100	30.16	0.0894
15	0.1326	0.0061	60	11.162	0.1130	105	32.58	0.1095
20	0.1368	0.0066	65	13.344	0.3242	110	34.98	0.1095
25	0.1454	0.0043	70	15.662	0.3238	115	37.38	0.1095
30	0.1608	0.0061	75	18.242	0.1494	120	39.84	0.1342
35	0.2158	0.0085	80	20.62	0.1483	125	42.18	0.2049
40	1.6272	0.0177	85	22.92	0.1095			
45	4.092	0.0217	90	25.32	0.0837			

Se espera que la potencia óptica registrada en la posición 5 sea la potencia que incida en el plano del espécimen. En la figura 35 y tabla de datos IV se observa un comportamiento lineal entre una potencia mínima de 0.0826mW y una potencia máxima de 13.72mW. Por los datos de la tabla III y IV se observa que la desviación estándar de la potencia óptica dada una cierta corriente se alimentación en el diodo láser es pequeña.

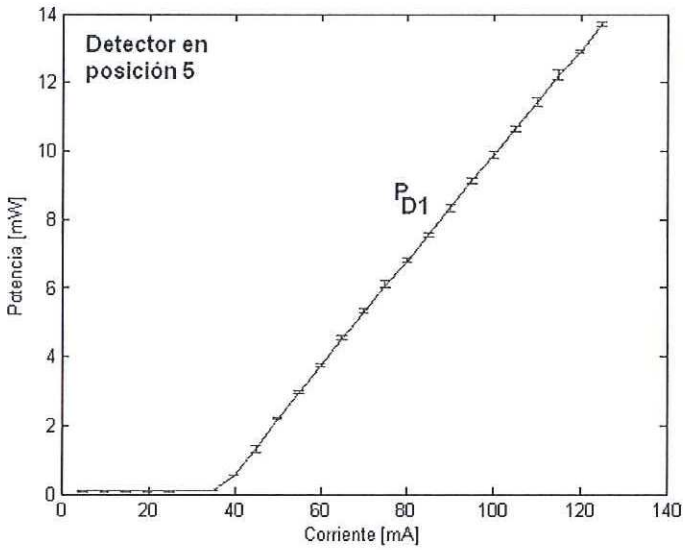


FIGURA 35 Variación de la potencia óptica contra corriente de alimentación del diodo láser 1, para la posición 5 en el arreglo experimental.

TABLA IV Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 5.

Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ
5	0.0826	0.0078	50	2.194	0.0207	95	9.136	0.0885
10	0.0836	0.0074	55	2.964	0.0483	100	9.902	0.0983
15	0.0834	0.0065	60	3.748	0.0576	105	10.656	0.0945
20	0.0856	0.0075	65	4.532	0.0581	110	11.434	0.1117
25	0.088	0.0072	70	5.312	0.0676	115	12.232	0.1392
30	0.0922	0.0064	75	6.096	0.0891	120	12.924	0.0358
35	0.1102	0.0076	80	6.794	0.0483	125	13.72	0.0480
40	0.5522	0.0054	85	7.57	0.0620			
45	1.3261	0.1057	90	8.352	0.0835			

III.2.1 DISTRIBUCIÓN DE LA POTENCIA ÓPTICA EN EL ARREGLO EXPERIMENTAL DE UN MANIPULADOR DUAL

La implementación de un sistema de manipulación dual implica la utilización de un segundo haz láser y por lo tanto de un segundo espejo empotrado en una montura gimbal E_2, así como la introducción de un prisma divisor de haz por polarización a la longitud de onda de trabajo, el cual tiene como finalidad transmitir la mayor cantidad de energía proveniente de ambos haces a la entrada del sistema afocal. El haz del diodo 1 debe arribar al prisma con una polarización lineal tipo s respecto a la cara interna, mientras que el haz del diodo 2 debe llevar una polarización lineal tipo p, de tal manera que ambos haces posean una polarización ortogonal entre sí.

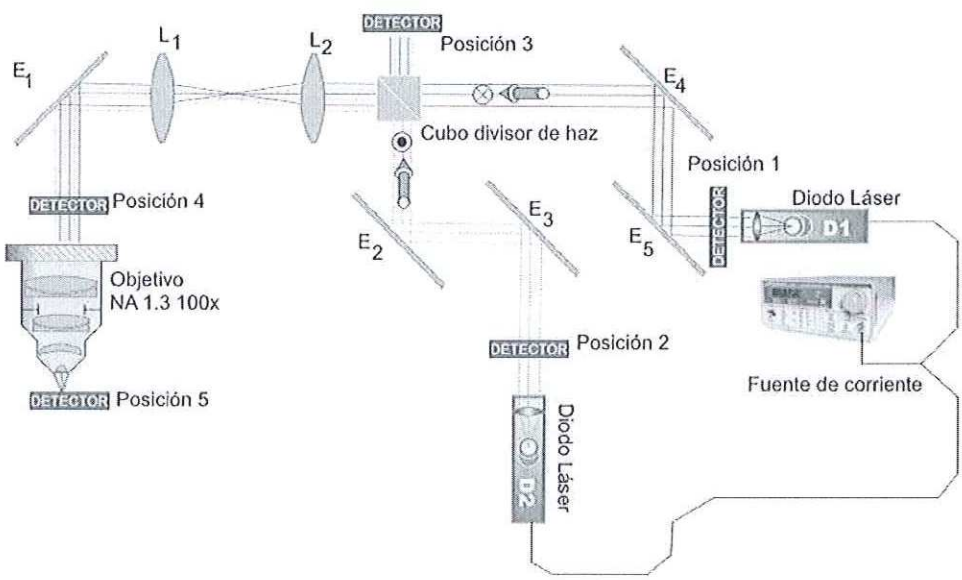


FIGURA 36 Sistema de manipulación dual y esquema de posiciones para la medición de la potencia óptica.

La posición 5 en el arreglo experimental, figura 36, corresponde a la potencia óptica efectiva que es enfocada sobre el espécimen y la cual lleva acabo el asimiento de las partículas. De las mediciones realizadas se observa que existen considerables factores de perdida de la potencia óptica en el sistema. Debe señalarse que la operación del diodo D1 y D2 es diferente, la potencia nominal máxima según el fabricante es de 50mW, para una misma corriente de 126mA el diodo D1 tiene una potencia óptica en la posición 1 de 70mW, mientras que el diodo D2 tiene una potencia óptica en la posición 2 de 49.76mW, cuando la fuente de alimentación opera bajo carga única. En la tabla V se muestran los datos de la potencia registrada en la posición 5 para una variación en la fuente de corriente entre 30mA y 125mA en el diodo láser D1 operando bajo carga de alimentación única en la fuente.

TABLA V Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 5 para el diodo D1 bajo sistema de manipulación dual.

Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ
30	0.0890	0.0084	65	4.442	0.0732	100	9.846	0.1289
35	0.1030	0.0080	70	5.216	0.0912	105	10.528	0.0486
40	0.4618	0.0097	75	5.986	0.1019	110	11.306	0.0973
45	1.3038	0.0068	80	6.758	0.1136	115	12.100	0.1105
50	2.1160	0.0167	85	7.532	0.1351	120	12.766	0.0089
55	2.9180	0.0216	90	8.272	0.0840	125	13.560	0.0070
60	3.7100	0.0158	95	9.062	0.1023			

En la tabla VI se muestran los datos de la potencia registrada en la posición 5 para una variación en la fuente de corriente entre 30mA y 125mA en el diodo láser D2 operando bajo carga de alimentación única en la fuente.

TABLA VI Datos de la corriente de alimentación, potencia óptica y desviación estándar detectada en la posición 5 para el diodo D2 bajo sistema de manipulación dual.

Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ	Corriente [mA]	Potencia [mW]	σ
30	0.0854	0.0078	65	2.888	0.0130	100	7.098	0.0044
35	0.0908	0.0073	70	3.486	0.0054	105	7.696	0.0054
40	0.1112	0.0077	75	4.088	0.0109	110	8.296	0.0089
45	0.4370	0.0083	80	4.688	0.0083	115	8.904	0.0151
50	1.0714	0.0084	85	5.288	0.0130	120	9.498	0.0130
55	1.6760	0.0084	90	5.890	0.0100	125	10.112	0.0083
60	2.2880	0.0109	95	6.488	0.0109			

La gráfica de la figura 37 corresponde a los datos de la tabla V y tabla VI para el diodo D1 y D2 respectivamente. Note que el láser D1 suministra una potencia óptica máxima de 13.5mW mientras que el láser D2 suministra 10.112 mW. Además, debe resaltarse la variación lineal de la potencia óptica respecto a la corriente y las repercusiones de este comportamiento en las fuerzas que se desencadenan en el asimiento óptico.

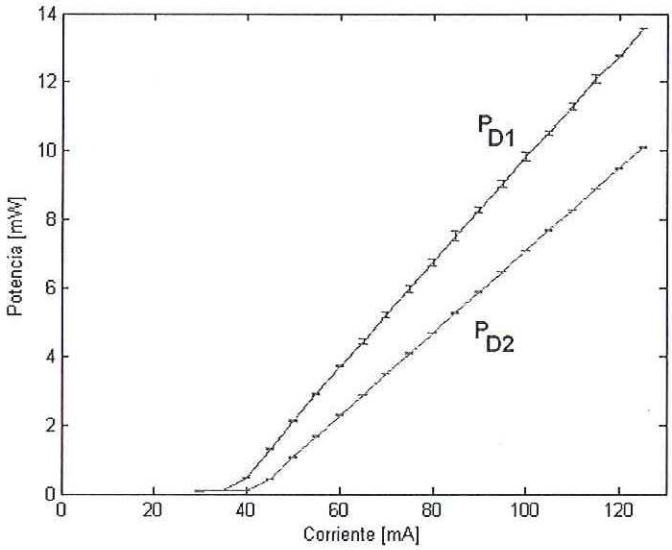
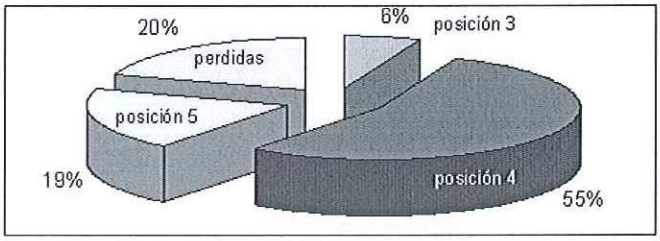


FIGURA 37 Medición de la potencia óptica para el diodo D1 y D2 en la posición 5 condicionada a carga única en la fuente de alimentación.

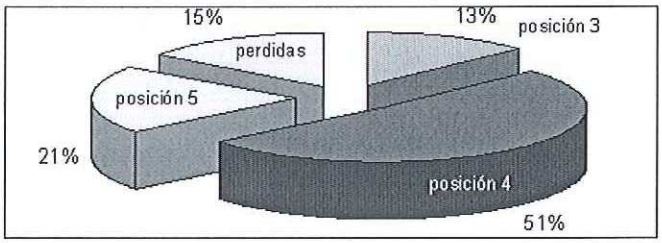
Para estimar las perdidas de la potencia óptica en el arreglo se midió la potencia en cada una de las cinco posiciones señaladas en la figura 36, los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la figura 38. Observe que en el arreglo de manipulador dual, el diodo D1 presenta un mejor rendimiento que el diodo D2 en lo que respecta al aprovechamiento de la potencia óptica.

Diodo D1 *unica carga*	[mW]	
Potencia Maxima 125 mA	69.8	100.00%
Posicion 3	4.184	5.99%
Posicion 4	38.1	54.58%
Posicion 5	13.56	19.43%
Perdidas	13.956	19.99%



(a)

Diodo D2 *unica carga*	[mW]	
Potencia Maxima 125 mA	48.94	100.00%
Posicion 3	6.454	13.19%
Posicion 4	25.08	51.25%
Posicion 5	10.112	20.66%
Perdidas	7.294	14.90%



(b)

FIGURA 38 (a) Distribución de la potencia óptica para el diodo D1 en el sistema de manipulación dual. (b) Distribución de la potencia óptica para el diodo D2 en el sistema de manipulación dual.

En un sistema de manipulación dual se desea que los diodos láser D1 y D2 operen con independencia, esto se puede hacer de varias formas. Una de ellas es alimentar en serie o en paralelo ambos diodos y regular la intensidad mediante un filtro variable de densidad neutra. Otra forma es aprovechar la polarización lineal de los diodos láser y sustituir el filtro de densidad por un polarizador lineal, asegurando que la polarización que llegue al prisma sea la correcta, aunque esto implica la desventaja de rotar la polarización del diodo. En ambos casos se inducirán perdidas. La alimentación en serie nos asegura que ambos

diodos entregaran la misma potencia para la misma corriente de alimentación pero en decremento de la vida útil en uno de ellos por efectos térmicos de desgaste. Por otro lado la alimentación en paralelo hará que la potencia sea dispar. Para ambas configuraciones de alimentación se corre el riesgo de daño por sobre carga cuando uno de los diodo entre en corto. En el mejor de los casos se desea que tanto el diodo D1 como el diodo D2 sean alimentados con una fuente de corriente por separado.

Para ambos casos de la figura 38, observe que la potencia en la posición 3 no es aprovechable en el asimiento, mientras que el porcentaje de perdidas, suponemos que se debe principalmente al truncamiento del haz en el interior del objetivo de microscopio, lo cual corresponde a un sesgo de alrededor del 50 % de la energía que llega a la entrada del objetivo de microscopio. De los artículos publicados sobre pinzas ópticas, es en el trabajo desarrollado por Valentina Emiliani (Emiliani *et al.*, 2004) donde se comenta una perdida del 50 % de la potencia óptica solamente en el objetivo de microscopio. Por otro lado el sistema manipulación dual tiene como deficiencia el repercutir negativamente sobre el aprovechamiento de la potencia óptica, cerca del 50 % llega a la entrada del objetivo de microscopio. La dificultad de alinear el prisma en el sistema así como la polarización no completamente lineal de los haces y las posibles perdidas por transmisión en el espejo dicroico reducen la energía aprovechable. En conclusión, para el sistema de manipulación dual desarrollado en este trabajo de tesis solo el 20 % de la energía total entregada por los diodos láser contribuye realmente en el fenómeno de asimiento óptico. Cabe señalar que

por razones de diseño, abordadas en secciones anteriores, la eficiencia se puede reducir drásticamente para asimientos y manipulaciones alejados del eje óptico (ver figura 31).

En los experimentos orientados a la medición de la fuerza gradiente no se utilizó el sistema de manipulación dual, figura 36. Un sistema de manipulación simple como el de la figura 33 tiene una eficiencia mayor en el aprovechamiento de la energía efectiva en el asimiento. Haciendo los cálculos respectivos según los datos suministrados de la tabla III y tabla IV, aproximadamente se incrementa la energía aplicable a un 33 % por la exclusión del prisma divisor de haz.

III.3 LONGITUD DE ONDA DE OPERACIÓN DE LOS DIODOS LÁSER PARA EL SISTEMA DE MANIPULACIÓN DUAL

Según la información suministrada por el fabricante los diodos láser deberían de emitir a una longitud de onda típica de 780nm en un rango que va de 775nm a 795nm para la potencia nominal de 50mW. La longitud de onda de operación de los diodos láser es un parámetro sumamente importante en la manipulación de especímenes biológicos. La mayoría de los organismos absorben longitudes de onda en el visible donde la incidencia de altas intensidades a dichas longitudes de onda puede alterar su metabolismo. Por otro lado longitudes de onda en el infrarrojo cercano no afectan el metabolismo salvo el calor ambiental que se genere por la absorción de las moléculas de agua.

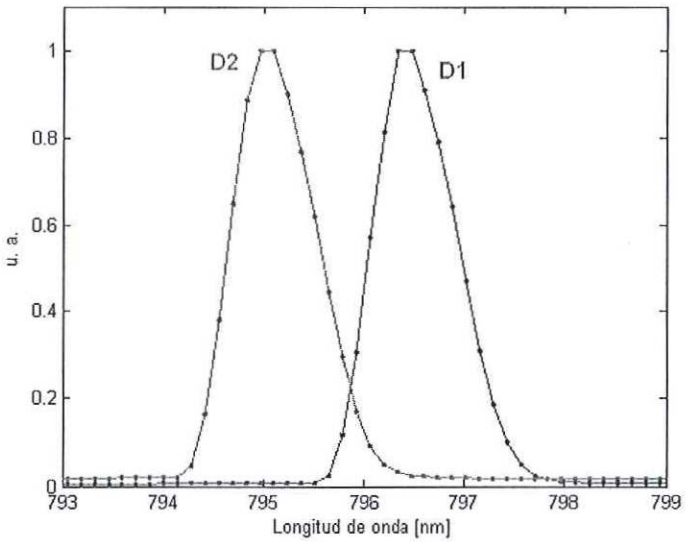


FIGURA 39 Longitud de onda de los diodos D1 y D2 del sistema de manipulación dual para la potencia óptica máxima.

Para conocer el ancho espectral de los diodos láser estos fueron caracterizados en un espectrómetro ORIEL modelo INSTASPEC IV. En la figura 39 podemos observar que ambos diodos tienen un ancho espectral aproximado a 1nm con longitudes de onda centrada en 795nm y 796.5nm para el diodo D2 y diodo D1 respectivamente operando a la potencia máxima.

CAPÍTULO
IV

APLICACIONES BIOLÓGICAS

En este capítulo se comentan los experimentos realizados con especimenes biológicos y se abordan brevemente los aspectos trascendentales en la interacción del láser con organismos vivos.

IV.1 APLICACIONES BIOLÓGICAS DEL LÁSER

Cuando la energía emitida por un láser de onda continua (cw) es absorbida por un material se genera calor, cuando se enfoca la luz se producen enormes densidades de potencia. Por otro lado. En un láser pulsado donde el lapso en que se deposita la energía es del orden de 10^{-9} segundos no existe flujo de calor, es decir, durante el tiempo de absorción el material esta aislado térmicamente y posterior a la incidencia del pulso, el calor se expande en una onda de choque que en un medio acuoso alcanza una velocidad mínima de 1 mm ns^{-1} y se presentan fenómenos como la ablación.

Las técnicas médicas y biológicas que utilizan láser proveen un amplio rango de efectos, desde un ligero calentamiento para estimulación hasta coagulación y generación de plasma (Greulich, 1999). En la tabla VII se muestra el tipo de interacción dependiendo de la intensidad del láser y sus efectos en el material biológico.

TABLA VII Tipos de interacción de la luz con la materia en aplicaciones medico biológicas (Greulich, 1999).

Intensidad	Tipo de interacción	Mecanismo de interacción	Aplicación
$mWcm^{-2}$	Estimulación	Influencia sobre ciertos elementos del metabolismo	Estimulación por calor
$kWcm^{-2}$	Coagulación	Fijación de tejido	Sellado de tejido
$MWcm^{-2}$	Evaporación	Evaporación del agua del tejido	Incisión
$GWcm^{-2}$	Ablación	Destrucción de enlaces moleculares	Ablación en tejido
$TWcm^{-2}$	Plasma	Destrucción molecular total	Ablación en tejido

Utilizando las potencias ópticas de nuestro arreglo (Tabla IX) y los diámetros de las partículas que fue posible manipular esperamos que en un espécimen con un diámetro de 1 μm asido a la potencia máxima reciba una intensidad de 1.71 $MWcm^{-2}$, a la potencia óptima reciba 663 $kWcm^{-2}$ y a la potencia mínima reciba 370 $kWcm^{-2}$, mientras que un espécimen con un diámetro de 10 μm asido a la potencia máxima reciba una intensidad de 10.19 $kWcm^{-2}$, a la potencia óptima reciba 6.63 $kWcm^{-2}$ y a la potencia mínima reciba 3.7 kW cm^{-2}. En consecuencia a lo señalado en la Tabla VII esperamos que en la manipulación de especímenes de 1 μm a 10 μm de diámetro ocurra coagulación y en el peor de los casos evaporación.

Un láser cw provee una potencia promedio alta, sin embargo no es lo suficiente para provocar efectos por múltiples fotones (arribo de muchos fotones en un tiempo muy corto en un área muy pequeña) y provocar la destrucción del espécimen por ablación. Para este tipo de láser la longitud de onda es el parámetro sobresaliente por los efectos que se pueden generar en contraste con un láser pulsado enfocado donde la intensidad pico es la variable más importante.

En la interacción que ocurre en la manipulación de material biológico, la longitud de onda hace la diferencia entre el perturbar a un microorganismo o el actuar sin perturbación. El mayor daño para los organismos manipulados por láser es el provocado por la absorción y el calentamiento.

IV.1.1 EFECTOS DE LA ABSORCIÓN DE LA ENERGÍA

Para muchas substancias calcular la absorción es difícil y por lo regular dicha información no está disponible. La mayoría de los datos experimentales se determinan usando la ley de Lambert Beer (Greulich, 1999), la cual contempla que la intensidad de la luz incidente sobre una capa muy delgada de material con un ancho *dx* se reduce por absorción a una fracción *dI/I*. En la mayoría de los casos la capa de absorción es una solución molecular con una concentración c_{M}. Las propiedades del material pueden ser descritas por un factor ε, el coeficiente de extinción molar y absorción pueden expresarse formalmente como (Greulich, 1999)

$$dI/I = \varepsilon \cdot c_{\mathrm{M}} \cdot dx \,. \tag{57}$$

Las cantidades *dI* y *dx* son diferenciales que indican que la ecuación es estrictamente válida para infinitesimales en el grosor de la capa y en la perdida de intensidad. Integrando y despejando para la intensidad en la ecuación anterior.

$$I(x) = I_0 e^{-\varepsilon \cdot c_{\mathrm{M}} \cdot x} \,. \tag{58}$$

Para una sustancia dada se define una sección transversal α de absorción molecular o atómica

$$k_a = \alpha_1 \cdot I \,, \tag{59}$$

donde k_a es una razón constante del número de fotones absorbidos por el número de fotones incidentes por segundo. Desafortunadamente, en un tejido o muestra biológica no puede ser calculado el coeficiente de extinción molar ε porque es desconocida la concentración c_M de las moléculas absorbentes. Por lo tanto, el producto $\varepsilon \cdot c_M$ tiene que ser tratado como un simple valor matemático, el cual se denomina profundidad de penetración, es decir el grosor de la capa para la cual la intensidad de la luz decae un 36.7 % (e^{-1}). En una muestra biológica la absorción y profundidad de penetración es dependiente de la longitud de onda, dado que un microorganismo es un conjunto de una variedad muy grande de moléculas, en una aproximación heurística las siguientes reglas son válidas.

- En el rango del ultravioleta (250-450 nm) el ácido desoxirribonucleico (ADN) (260 nm) y las proteínas (280-300 nm) son los principales absorbedores.
- Para longitudes de onda en el visible (450 -780 nm) puede haber numerosos agentes absorbedores, como por ejemplo la hemoglobina, la clorofila, y enzimas como nicotinamida adenina dinucleotido (NAD). La absorción es alta para muestras específicas, especialmente aquellas responsables de la coloración de la muestra.
- Para longitudes de onda en el infrarrojo cercano (780-3000 nm) la absorción en material biológico esta regida por la absorción del agua. Por otro lado la

conductividad térmica del agua es baja (0.58 [W/(m·K)]) y daños por disipación del calor a estructuras cercanas pueden ser mínimas.

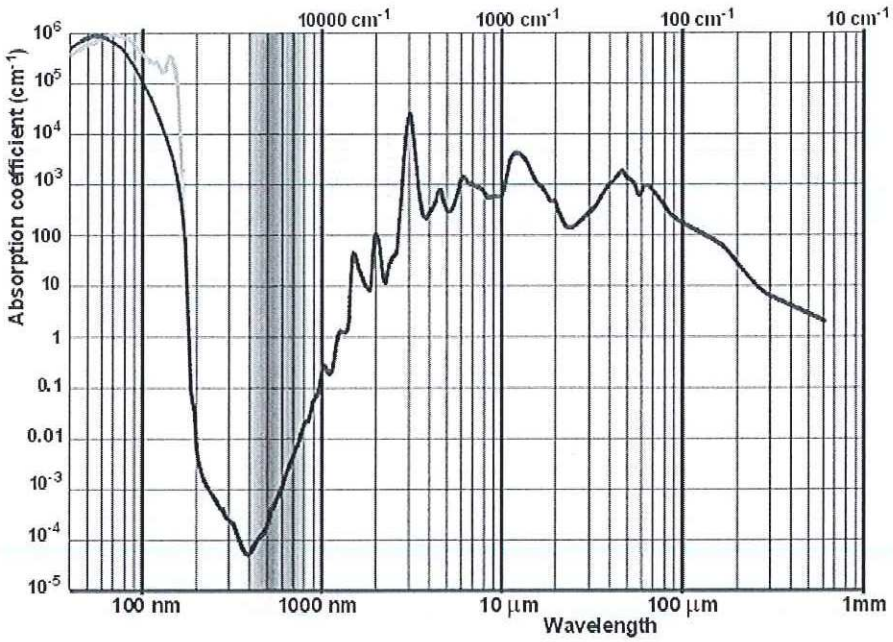


FIGURA 40 Coeficiente de absorción del agua contra la longitud de onda del espectro electromagnético (Bernath, 1981).

La generación de calor provocada por la absorción de la luz del láser esta gobernada por varios procesos:

- Solamente la energía absorbida puede ser transformada en calor.
- Frecuentemente parte de esta energía es usada para romper enlaces moleculares y en procesos fotoquímicos.

- Durante la absorción el calor generado comienza a disiparse hacia el ambiente. Cuando se utiliza un láser cw el proceso esta regido por el equilibrio entre calentamiento y disipación, donde la constante de conductividad térmica del material llega a ser un parámetro relevante.

La cantidad de energía absorbida puede ser calculada cuando la profundidad de penetración para una longitud de onda es conocida, mientras que el orden de magnitud de la energía usada en procesos fotoquímicos puede ser estimada. Por otro lado el problema radica en conocer la disipación del calor. Existen varias fórmulas para cuantificar los efectos térmicos, Sin embargo estas han sido desarrolladas para medios inertes y materia sólida, la cual, prácticamente absorbe toda la energía del haz incidente y además transforma toda la energía en calor. Un incremento en la temperatura sobre materia sólida debida a un láser cw puede ser calculado por la siguiente ecuación (Greulich, 1999)

$$\Delta T = (1-R)\frac{\mathrm{P}}{\pi \cdot \mathrm{r} \cdot \mathrm{K}}, \tag{60}$$

donde R es la reflexión del material, P es la potencia del láser, r es el radio del haz y K es la constante de conductividad térmica. Para el agua la constante de conductividad térmica es 0.58 [W/(m·K)]. Es complicado calcular el incremento de la temperatura en un material biológico transparente debido a la dificultad de estimar cuanta luz es absorbida. Algunos resultados experimentales fueron publicados por Liu *et al.* (1995), sobre el incremento en la temperatura de células manipuladas por un láser Nd:YAG con una longitud de onda de

1064 nm donde la temperatura en la membrana celular fue medida en base al espectro de fluorescencia. Algunos de los incrementos de temperatura encontrados por los autores son: para una célula ovario de un hamster $\Delta T \approx 1.15 \pm 0.25$ °C / 100 mW, para un liposoma $\Delta T \approx 1.45 \pm 0.15$ °C / 100mW.

IV.1.2 EFECTOS DE LA LONGITUD DE ONDA EN EL METABOLISMO CELULAR.

Pruebas experimentales han mostrado que las longitudes de onda en el infrarrojo cercano son las apropiadas para la manipulación óptica (Greulich, 1999). Uno de los resultados más convincentes es la observación de la división nuclear (mitosis) y la salud de la progenie posterior a la manipulación óptica (Liang *et al.*, 1996). En un estudio desarrollado por Liang y colaboradores (1996), se obtuvieron resultados al variar la longitud de onda del láser; después de tres minutos de asimiento en células de ovario de hamster; se observó que el menor daño ocurrió a 960 nm, donde casi el 100 % de las células presentaron mitosis, a una longitud de onda de 830 nm la mitosis de redujo al 90 %. A longitudes de onda por debajo de los 750 nm la mitosis sigue presentándose pero en menor porcentaje. Por otro lado, se encontró que a 900 nm se logró una mitosis en el 60 % y a 1,064 nm fue igual. Sin embargo, con tiempos de asimiento más largos se incrementó el daño, después de diez minutos la mitosis se redujo a un 20 %.

Otras observaciones interesantes son las mostradas por Vorobjev (1993), que encontró la formación anormal de puentes de cromosomas después de la manipulación óptica.

IV.2 EXPERIMENTOS DE MANIPULACIÓN ÓPTICA CON ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

La demostración de la factibilidad de la manipulación óptica en especímenes biológicos es una sección singularmente importante para este trabajo de tesis. El campo de investigación es amplio ante la inmensurable cantidad de especímenes que se pueden analizar. Es bajo esta perspectiva, que el trabajo interdisciplinario es indispensable en este campo.

Para los biólogos las pinzas ópticas representan una herramienta con grandes aplicaciones, sin embargo, la manipulación óptica va más allá de ser solo una herramienta.

No se debe olvidar que la manipulación óptica es un fenómeno más de la interacción entre la energía con la materia, donde la fenomenología física implicada debe conjuntarse con la fenomenología biológica para poder llegar a comprender plenamente los mecanismos de interacción y sus consecuencias.

A continuación se presentan algunos de los experimentos de manipulación óptica realizados en especímenes biológicos.

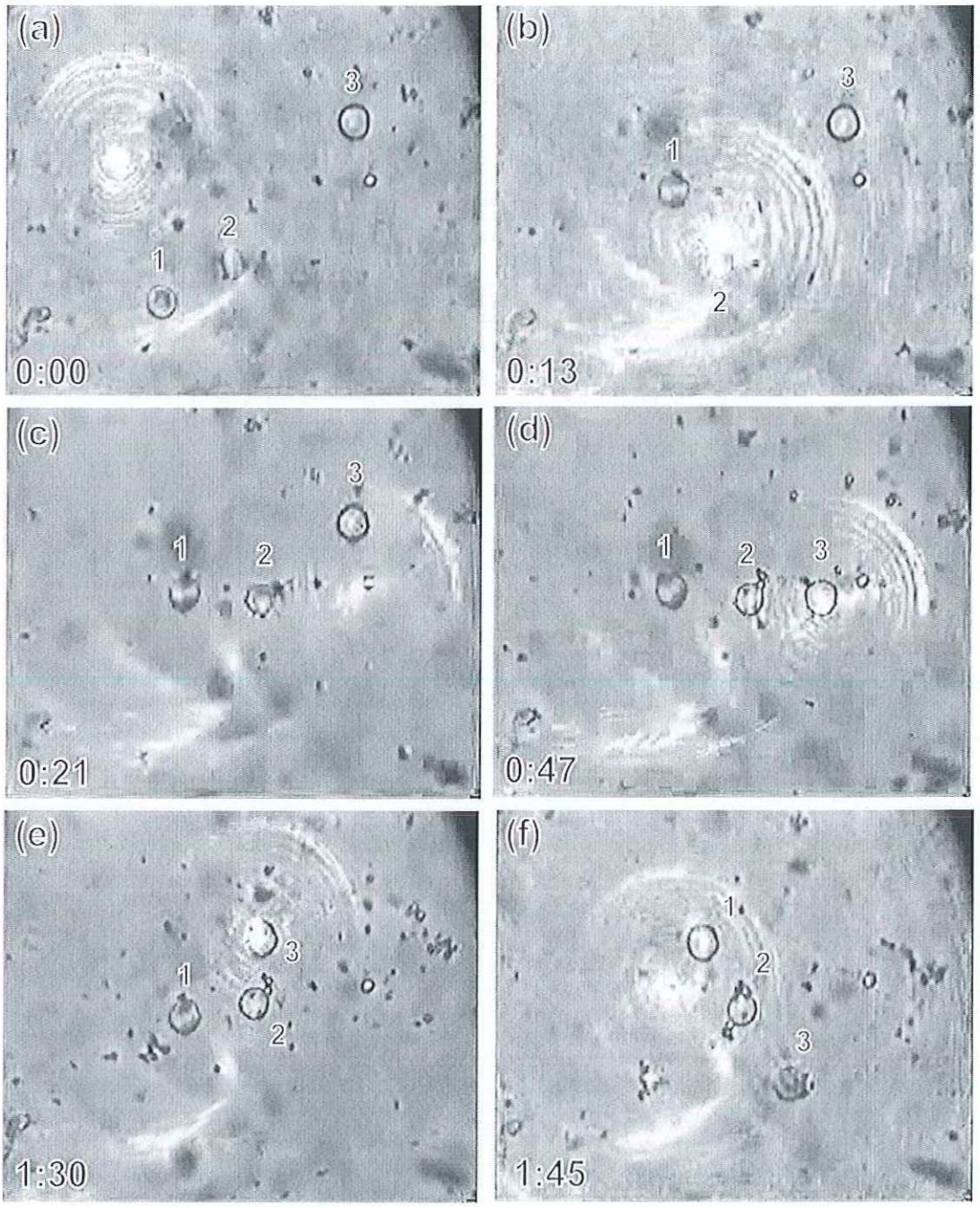


FIGURA 41 Asimiento óptico de glóbulos rojos diluidos en agua, muestra contaminada con material vegetal. Tiempo en segundos. a) Posición de los glóbulos 1, 2 y 3 previa a la manipulación, b) posición posterior a la manipulación del glóbulo 1, c) posición posterior a la manipulación del glóbulo 2, d) alineamiento de los glóbulos 1, 2 y 3 después de su manipulación, e) manipulación de glóbulo 3, f) alineamiento de los glóbulos por manipulación.

En las imagenes de la figura 41 se muestra la manipulación de glóbulos rojos y su eventual alineación (Fig. 41c y f). En la preparación de la muestra se diluyo sangre en agua contaminada con material vegetal de una planta suculenta de la especie *Mesembryanthemum sp.*. Se corroboró la identificación de los cuerpos circulares de aproximadamente 3 μm a 5 μm de diámetro numerados en la figura 41 como glóbulos rojos o eritrocitos mientras que los cuerpos oscuros menores a 1 μm de diámetro son parte del material vegetal. Se observó que los glóbulos rojos eran fácilmente manipulables al igual que los demás objetos de origen vegetal.

Un aspecto interesante durante el asimiento de glóbulos rojos fue observar la deformación de la membrana celular cuando los corpúsculos estaban sometidos a un desplazamiento. Esto hace suponer que el asimiento óptico no estaba ocurriendo sobre toda la célula, como era de esperar sino que el asimiento estaba aconteciendo específicamente sobre un órgano interno (consultar apéndice D). Desde un punto de vista óptico, esto quiere decir que el órgano celular capturado posee un índice de refracción mayor al del citoplasma y la membrana, así como al del medio circundante.

Otros especímenes manipulables utilizados, fueron las microalgas *Thalassiosira sp.* y *Phaeodactylum tricornutum* donadas por el cepario del Departamento de Acuicultura del CICESE. La muestra de residuos de Agar y microalgas *Rhodomonas sp.* fueron donadas por la Dra. Rosa Reyna Mouriño del Departamento de Microbiología del CICESE.

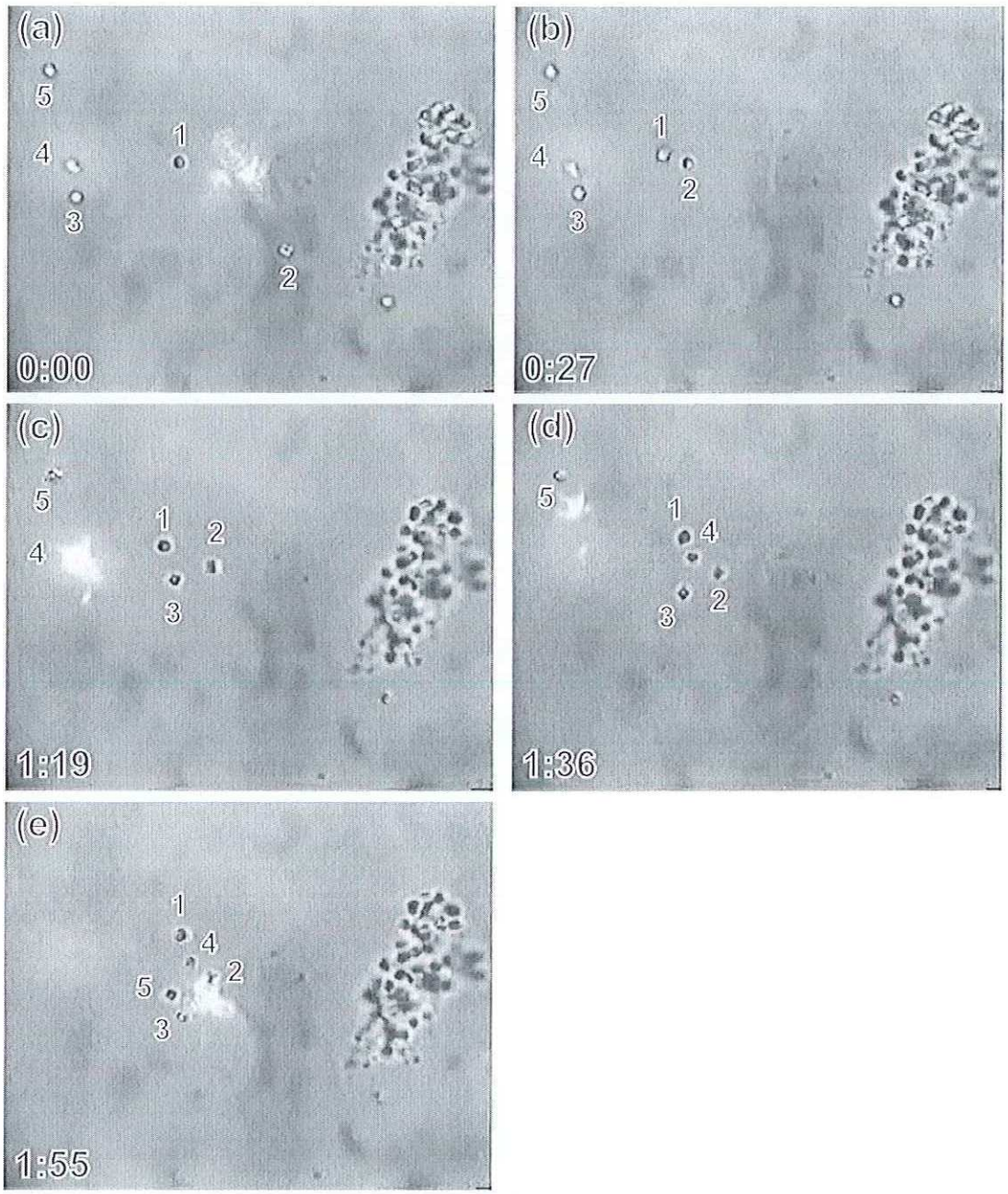


FIGURA 42 Agrupamiento de microalgas *Thalassiosira sp.* mediante asimiento óptico. Tiempo en segundos. a) Posición de cinco microalgas previas a su manipulación óptica, b) desplazamiento de microalga 2, c) desplazamiento de microalga 3, d) desplazamiento de microalga 4, e) agrupación final de las cinco microalgas.

La secuencia de imágenes de la figura 42 muestra como se agruparon cinco microalgas *Thalassiosira sp.* que estaban repartidas de forma aleatoria previamente al asimiento óptico, (Fig. 42a). Este tipo de algas fueron fácilmente asidas y manipuladas, cuando no estaban aglomeradas, sin embargo, cuando las microalgas están aglomeradas no pueden ser asidas y no se les puede separar. El contorno de estas microalgas se asemeja a un cuadrado (consultar apéndice D).

En la figura 43 se muestra una microalga con contorno romboide *Phaeodactylum tricornutum* (consultar apéndice D). Este tipo de microalga no fue manipulable, sin embargo se observo un caso excepcional, que al incidir el haz de asimiento sobre el espécimen este cambia su forma, contrayendo su cuerpo hasta alcanzar una forma esférica, (Fig. 43 c y f). Cuando se retira el haz del espécimen este vuelve a su forma inicial después de un cierto tiempo, (Fig. 43 c y f).

Las microalgas *Phaeodactylum tricornutum* presentan adherencia en uno de los extremos alargados a la superficie del portaobjetos que en consecuencia impide el desplazamiento inducido por asimiento óptico, se observó que es posible rotar la microalga alrededor de su punto de adherencia.

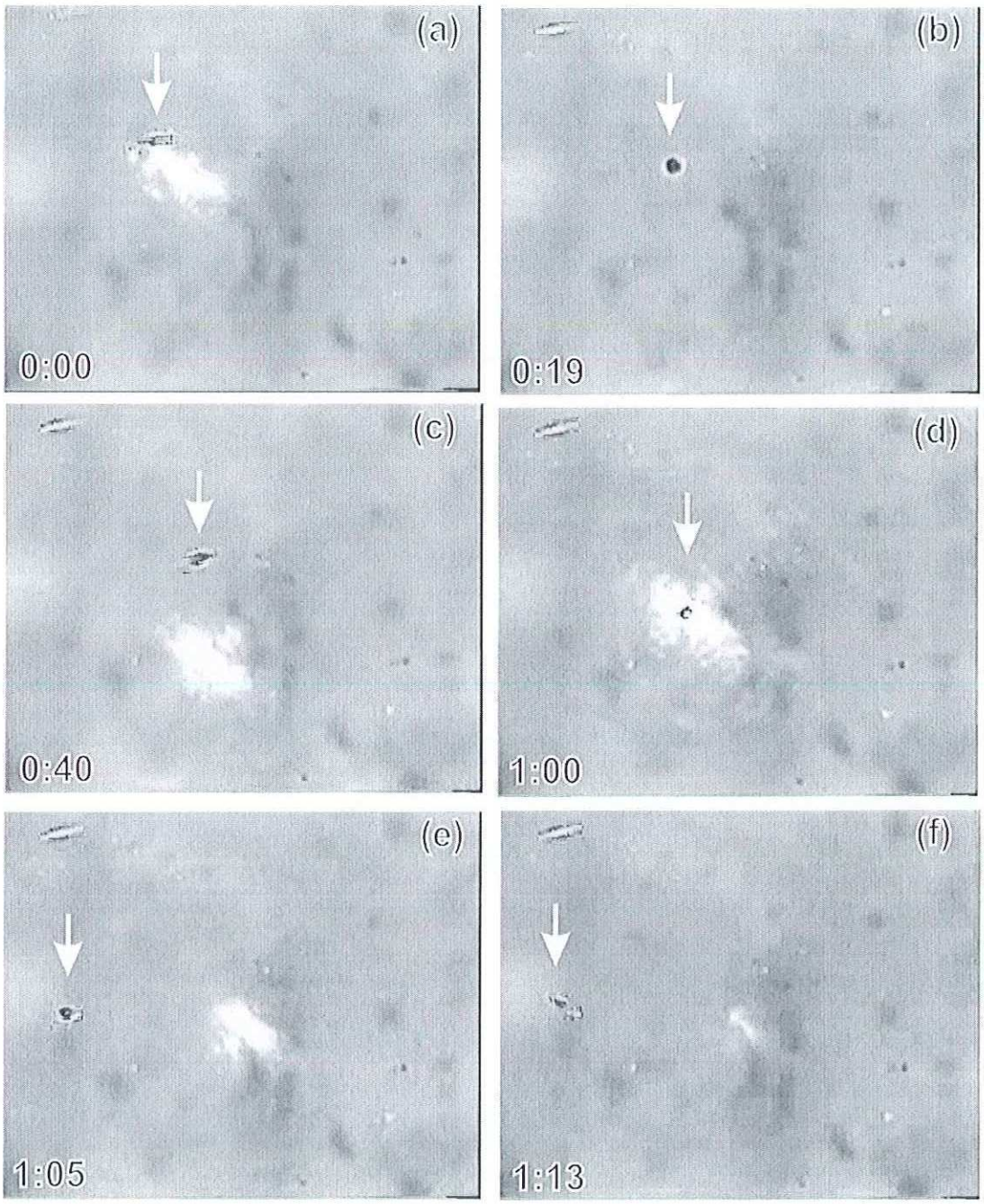


FIGURA 43 Contracción de una microalga *Phaeodactylum tricornutum* de contorno romboide (a, c y f) por efecto del asimiento óptico a una forma esférica (b, d y e). Tiempo en segundos.

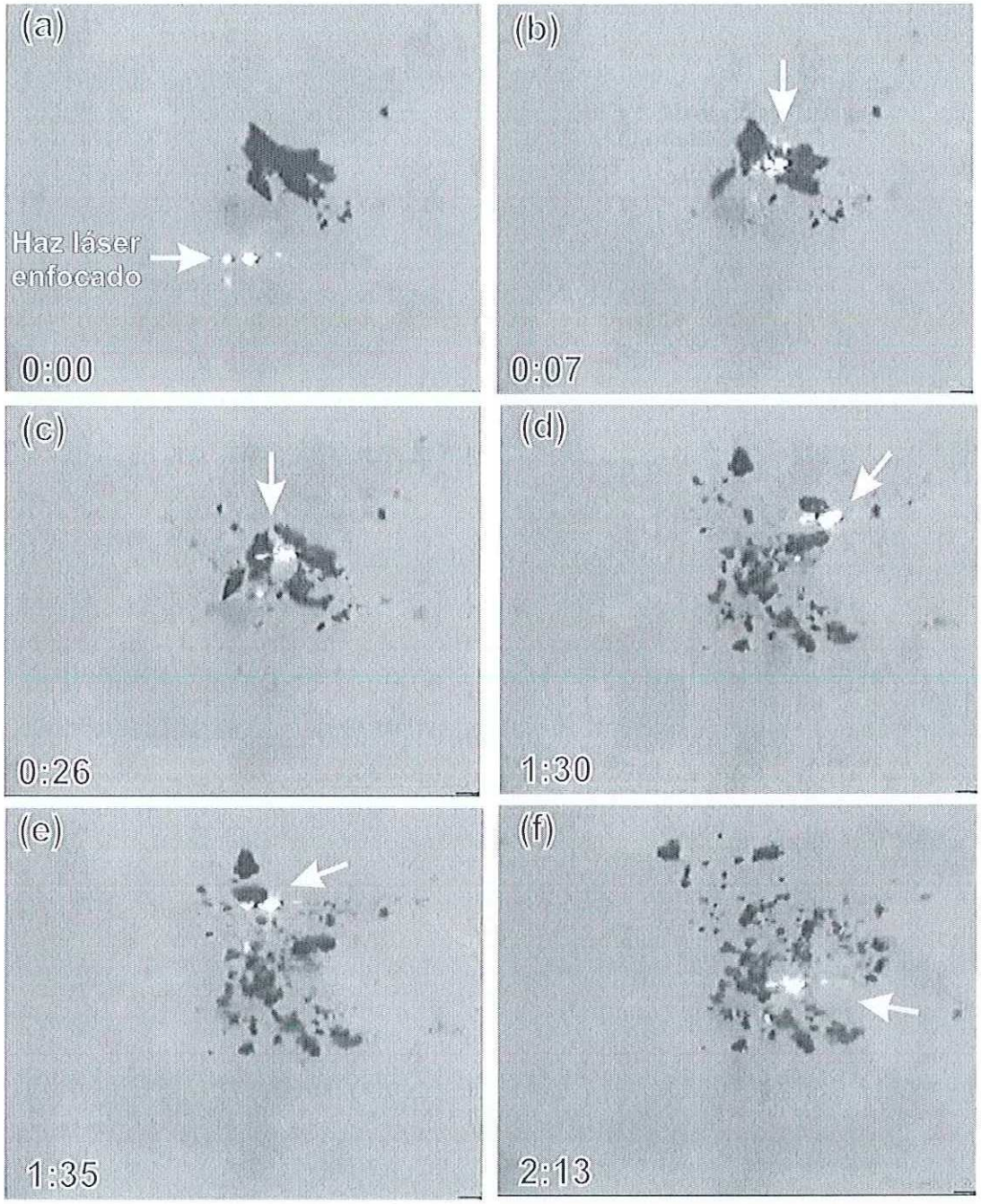


FIGURA 44 Fenómeno de repulsión óptica en residuos de agar. a) residuo de agar previo a la incidencia del haz, b), c), d), e) y f) incidencia del haz sobre el residuo y su eventual destrucción en cuerpos mas pequeños. Tiempo en segundos.

En la figura 44 se muestra la destrucción de un residuo de agar de una muestra de esporas al incidir el haz láser sobre él. El fenómeno de repulsión optica observado en la figura 44 ocurre cuando el índice de refracción de los cuerpos inmersos es menor al del medio que los contiene. La fuerza de repulsión es lo opuesto a la fuerza gradiente y actúa alejándose de la región de mayor intensidad para un haz TEM00.

En la Figura 45 se muestra la manipulación de una microalga *Rhodomonas sp.* donde la luz del láser ha sido bloqueada por un filtro antes de llegar al CCD, la posición de la cintura en el plano del espécimen se localiza al centro de la imagen. En la figura 45a la microalga 1 no esta bajo la incidencia del haz y presenta una rotación dextrógira, posteriormente desplazando la platina se lleva la microalga 1 a la posición de la cintura del haz (Fig. 45b), donde esta siente los efectos del asimiento cambiando el sentido de su rotación y disminuyendo su velocidad hasta quedar totalmente estática, entonces la microalga 1 puede ser manipulada fácilmente (Fig. 45c y d). Además se demuestra como la microalga 1 es capaz de empujar la microalga 2 (Fig 45e) y de llevarla a una nueva posición (Fig. 45f) y en ningún momento el haz estuvo incidiendo sobre la microalga 2. En el experimento después de retirar el haz láser de la microalga, esta nunca volvió a recuperar su movimiento de rotación, por lo que suponemos que sufrió un daño.

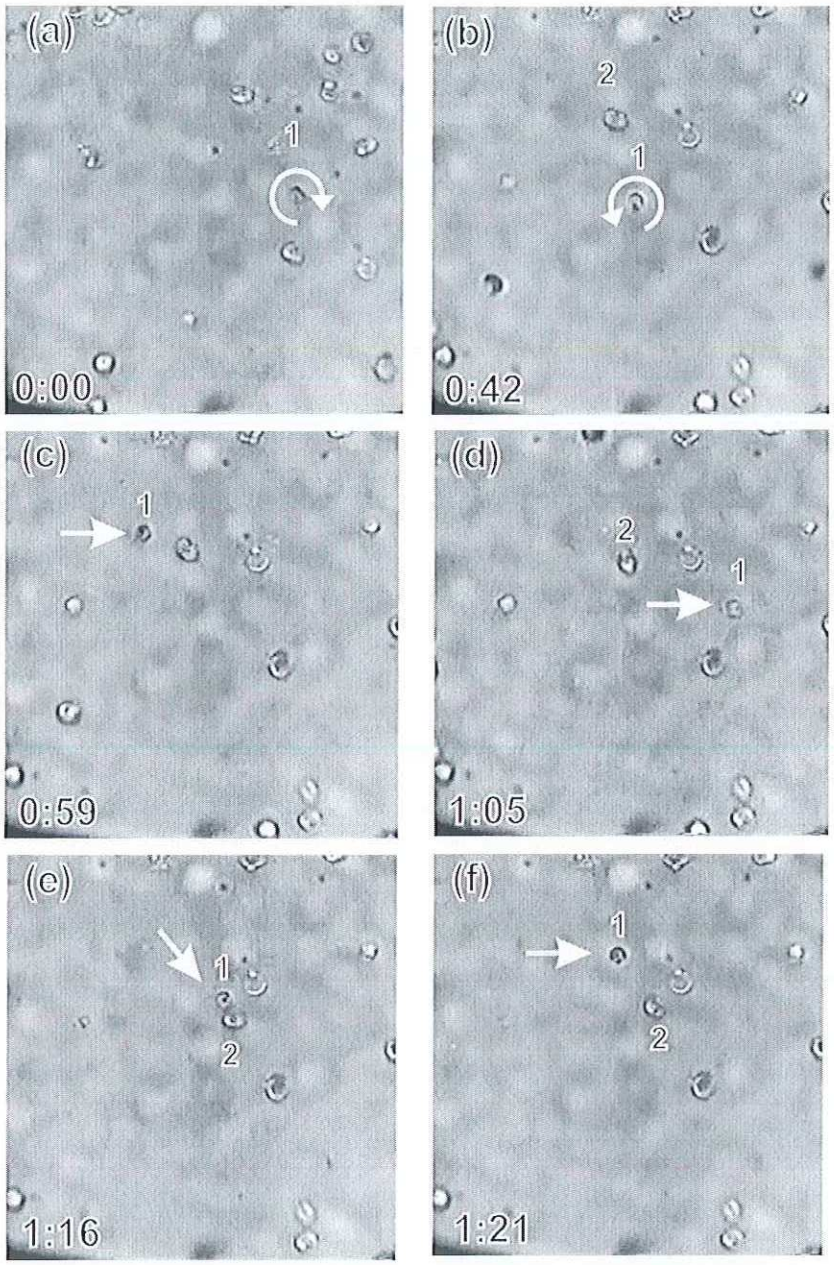


FIGURA 45 Manipulación de microalga *Rhodomonas sp.* Tiempo en segundos. a) Identificación de la microalga 1 previa a la incidencia del haz, presenta un movimiento de rotación, b) bajo la incidencia del haz cambia el sentido de rotación y disminuye su velocidad hasta quedar estática, c), d) y f) desplazamiento de microalga 1, e) desplazamiento de la microalga 2 por empuje de la microalga 1.

IV.2 DISCUSION Y CONCLUSIONES SOBRE LOS EXPERIMENTOS DE MANIPULACIÓN ÓPTICA CON ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

En este trabajo al igual que lo reportado Greulich en 1999, fue posible manipular glóbulos rojos en el espectro del infrarrojo, aunque el utilizó un sistema mas complejo para realizar manipulaciones mas dirigidas.

En el caso de las microalgas estudiadas no se tienen antecedentes de manipulación óptica, sin embargo, otros investigadores han demostrado la manipulación de organelos al interior de otro tipo de algas como *Pyrocystis noctiluca* (Letiz., *et al* 1994) y rizoide de alga *chara* (Letiz., *et al.* 1995).

Los experimentos en especimenes biológicos demuestra la capacidad de las pinzas ópticas para la manipulación de microorganismos amorfos y estructuras no esféricas como lo ocurrido en las microalgas y glóbulos rojos. Además se observó el fenómeno de repulsión óptica en residuos de agar (Fig. 44).

CAPÍTULO
V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados experimentales sobre la medición de la fuerza gradiente en magnitud y comportamiento así como su discusión.

V.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES SOBRE LA MEDICIÓN DE LA FUERZA GRADIENTE PARA PARTÍCULAS DIELÉCTRICAS.

La fuerza gradiente es la fuerza causante del asimiento óptico, conocer su comportamiento y magnitud es parte trascendental. Para la medición experimental de la fuerza gradiente se propone considerar la posición del centro de la partícula en un plano *x-y* (plano del espécimen) paralelo a la superficie donde reposa la partícula sobre el portaobjetos. El haz de asimiento incide en la dirección del eje *z*, figura 46.

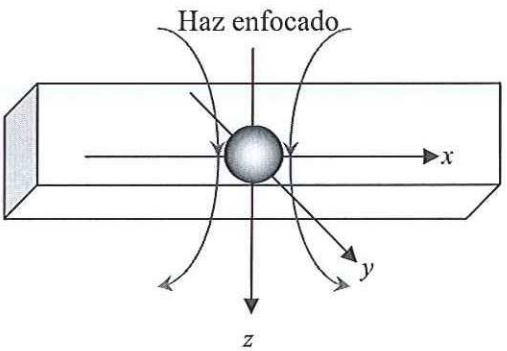


FIGURA 46 Descripción de coordenadas para el asimiento de una partícula donde el eje z es colineal al eje óptico del sistema de manipulación.

Dado que el desplazamiento de la partícula en *z*, es decir en la dirección de propagación del haz es nulo, ya sea debido a que la partícula está en contacto con el portaobjeto, ya sea por la presencia de una fuerza de reversión originada por el mismo haz de luz cuando la partícula se localiza antes de la cintura, figura 16. Solo las fuerzas que actúan en el plano *x-y* provocan un desplazamiento, por simplicidad se considerará únicamente la

componente de fuerza en x, infiriendo un comportamiento semejante en y por la simetría del haz y de la partícula; los datos de calibración del fabricante de las partículas señalados en la tabla VIII aseguran la esfericidad de las mismas, mientras que el diodo láser PS026-00 emite en modo TEM00. Planteando una ecuación para el movimiento de la partícula asida al plano x-y, considerando solamente las acciones que tienen lugar en el eje x, se llega a la siguiente expresión.

$$m\ddot{x} = F_{Drag}(v) + F_x(t) - F_{Grad}(P_{opt}) \tag{61}$$

donde, m es la masa de la partícula, y $\ddot{x}$ es la aceleración, que es la cuantificación directa de los fenómenos dinámicos que acontecen en el desplazamiento de la partícula. Analizando la ecuación (61), dada la circunstancia de inmersión de la partícula, debe considerarse la fuerza de arrastre generada por el líquido siempre presente durante el movimiento del medio respecto a la partícula y en el sentido del desplazamiento del medio, en la ecuación (61) dicha fuerza se conoce como la ley de Stokes, ecuación (22) y se denota como $F_{Drag}(v)$, la cual depende linealmente de la velocidad relativa entre el medio y la partícula valida para líquidos laminares con numero de Reynolds menor a la unidad (Re<1). Los efectos termodinámicos (movimiento browniano) están representados por $F_x(t)$, cabe recordar que esta fuerza es de carácter estocástica y varía de forma imprevisible con el tiempo, sin embargo, debe recalcarse que el desplazamiento medio originada por esta fuerza es menor a 1 nm, mientras que el diámetro de la partícula mas pequeña utilizada en los experimentos es de 1,000 nm y el diámetro de la cintura del haz enfocado es de

700 nm, por lo tanto las fuerzas estocásticas del movimiento Browniano son despreciables durante el asimiento óptico.

La componente de fuerza en x que induce el haz de luz para asir la partícula se denota como la fuerza gradiente $F_{grad}(P_{opt})$ originada por la transferencia del momento lineal del fotón a la partícula y depende principalmente de la potencia óptica entregada por la fuente de luz. Se conjetura que el asimiento de una partícula se logra cuando $\ddot{x} = 0$, es decir, la suma de fuerzas en x debe ser nula, o sea, no debe de existir un desplazamiento de la partícula debido a la difusión o efectos hidrodinámicos inducidos que ocurran en el fluido circundante por vibraciones mecánicas originadas al exterior de la muestra. La ecuación (61) no proporciona una interpretación completa del asimiento, se debe dilucidar el comportamiento de la fuerza gradiente que actúa sobre la partícula.

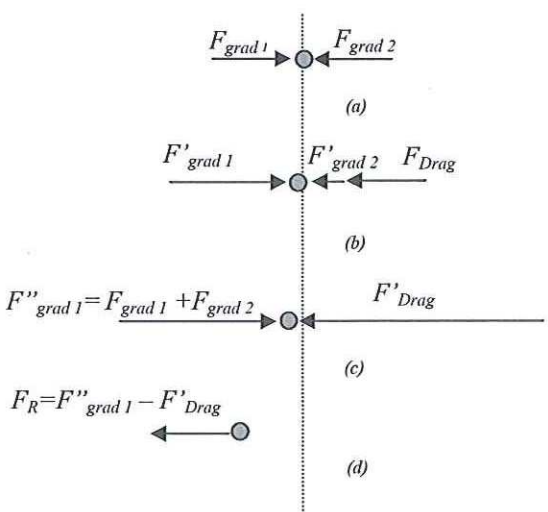


FIGURA 47 Distribución de la fuerza gradiente, cuando una partícula esta sometida a una fuerza de arrastre.

En el caso (a) de la figura 47 la partícula está asida y el foco coincide con el centro geométrico de la partícula, no existen efectos dinámicos inducidos en el fluido o por corrimiento del haz y en consecuencia se tiene un sistema estático donde F_{Drag} es igual a cero. Pero la fuerza gradiente que actúa sobre la partícula, se ejerce en sentidos opuestos y de igual magnitud $F_{grad\ 1} = F_{grad\ 2}$ esto conlleva al equilibrio en la posición de la partícula. Cuando se inducen efectos hidrodinámicos, es decir, un movimiento de la partícula en el fluido o se puede aducir bajo otra perspectiva que la partícula es inmutable en su posición y es el fluido el que se desplaza. Entonces surge una fuerza de arrastre F_{Drag}, para el caso (b) $F_{Drag}<F_{grad\ 1}+F_{grad\ 2}$, la presencia de esta fuerza provoca una distribución en la magnitud de las fuerzas gradientes donde $F'_{grad\ 1}>F'_{grad\ 2}$, el incremento en la magnitud de $F'_{grad\ 1}$ es igual a la disminución en magnitud de $F'_{grad\ 2}$, porque la fuerza gradiente surge del gradiente de intensidad del haz, entonces la simetría en la redistribución de fuerzas gradientes se debe a la simetría en la distribución de intensidad del haz láser en el modo TEM00 que incide sobre la partícula, ver figura 18. Se puede ver claramente que $F'_{grad\ 1}=F'_{grad\ 2}+F_{Drag}$ y la partícula conserva su posición cuando se induce un flujo en el fluido. El caso (c) sucede cuando la fuerza de arrastre domina sobre la fuerza gradiente, o sea, $F'_{Drag,}>F''_{grad\ 1}$ donde $F''_{grad\ 1}=F_{grad\ 1}+F_{grad\ 2}$, esta desigualdad conduce a una suma de fuerza donde surge una fuerza resultante $F_{R=}F'_{Drag}-F''_{grad\ 1}$ en la dirección de la fuerza $F'_{Drag,}$ como se puede apreciar en el caso (d). Si esta situación llega a ocurrir entonces se pierde el asimiento de la partícula. Por lo tanto es posible calcular la fuerza gradiente que logra confinar la partícula a una posición dada aproximando la fuerza de arrastre a la fuerza gradiente cuando observamos que la partícula se escapa de la trampa óptica y sigue el

movimiento de las demás partículas en la muestra, en los resultados experimentales se reporta el promedio de la fuerza gradiente para cinco mediciones.

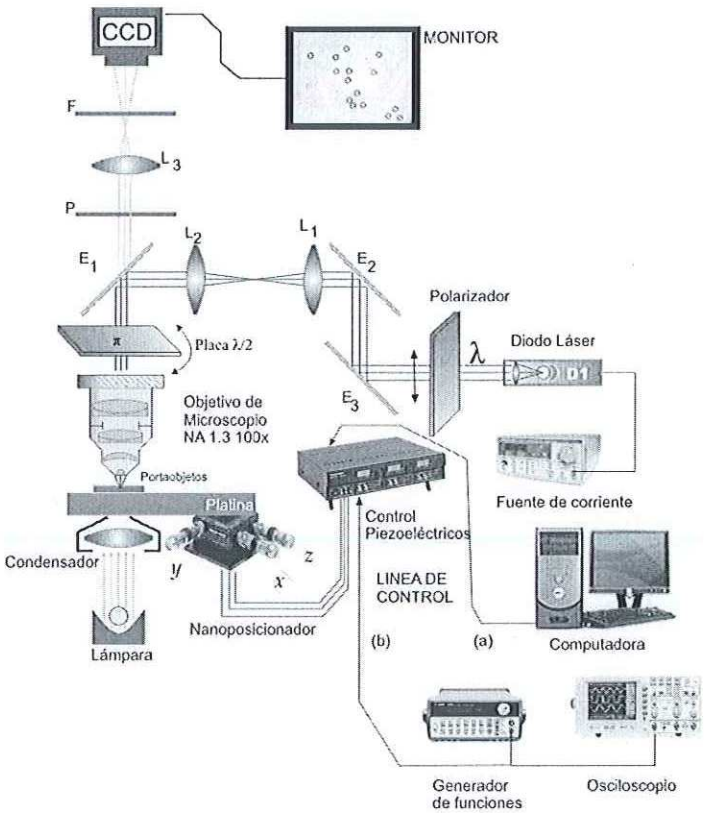


FIGURA 48 Esquema de los elementos que componen el sistema de control de la platina por computadora, línea de control (a), y mediante generador de funciones, línea de control (b).

En este trabajo de tesis se implementaron dos técnicas para el desplazamiento de la platina, los cuales arrojaron resultados diferentes. En la primera de ellas se recurrió al control de la platina mediante un equipo de cómputo, el cual manda una señal binaria codificada en una tarjeta GPIB-NI (*National Instrument*) a través de un bus de datos IEEE-488 hacia la fuente

de voltaje de los piezoeléctricos, modelo 17PCW001 de manufactura Melles Griot; el cual, a su vez envía una señal analógica de 0-75 volts en DC decodificada hacia los dispositivos piezoeléctricos, modelo 17ANC001-NanoBlock Melles Griot. Para código fuente ver apéndice B. En la segunda técnica se recurrió al control de la platina mediante un generador de funciones que suministra una señal eléctrica de referencia entre 0-10 volts en AC. En esta técnica el desplazamiento de la platina sigue un movimiento oscilatorio simple con un desplazamiento máximo para los dispositivos piezoeléctricos de 20μm.

Los resultados de la magnitud de la fuerza gradiente obtenidos mediante la técnica del generador de funciones son confiables. Por otro lado los resultados obtenidos para el comportamiento de la fuerza gradiente por la técnica de control mediante la computadora arroja resultados distintos que no son confiables por los cambios abruptos en la velocidad.

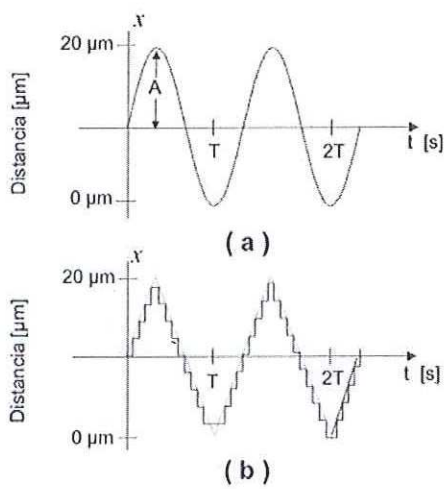


FIGURA 49 Desplazamiento de la platina, (a) mediante generador de funciones, (b) mediante equipo de cómputo.

Como se puede apreciar en la gráfica (a) de la figura 49, la técnica de desplazamiento de la platina por generador de funciones produce un movimiento oscilatorio simple. Para calcular la velocidad de fuga en esta técnica, se considera la ecuación (62) para un movimiento oscilatorio cuya variación de la distancia respecto al tiempo sea

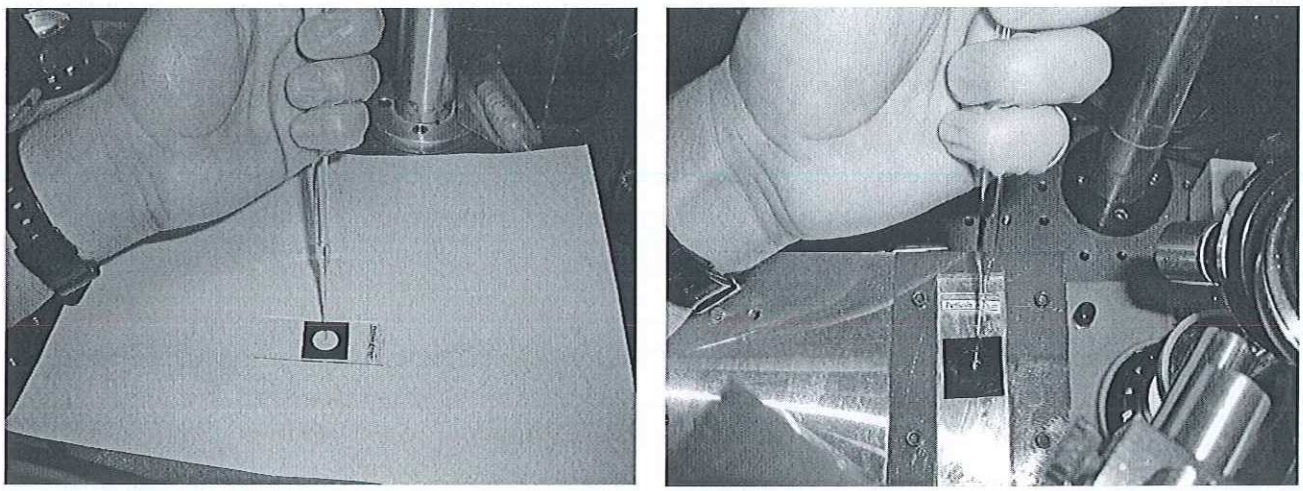
$$x(t) = Asen\left(\frac{2\pi}{T}t\right) \tag{62}$$

donde A es igual a 10μm, es decir la mitad del recorrido total para un final de carrera máximo de 20μm para los elementos piezoeléctricos. Sea T el periodo de oscilación. La variación de la velocidad respecto al tiempo es

$$v(t) = \frac{A \cdot 2\pi}{T}\cos\left(\frac{2\pi}{T} \cdot t\right) \tag{63}$$

Suponemos la velocidad de fuga como la máxima velocidad alcanzable a una cierta frecuencia de oscilación, lo cual ocurre cuanto t=T, es decir, cuando el valor de la función trigonométrica de la ecuación anterior sea igual a la unidad. Los resultados obtenidos corresponden a una variación oscilatoria de la platina con una aceleración dada por $a = (2\pi/T)^2 \cdot x(t)$. En las mediciones experimentales aproximamos la $\ddot{x}$ de la ecuación 61 a cero, si suponemos un desplazamiento a velocidad constante de la platina. Para la técnica de control del desplazamiento de la platina mediante el generador de funciones, la

velocidad se modifica aumentando o disminuyendo la frecuencia de la señal sinusoidal de alimentación a la fuente de los dispositivos piezoeléctricos. La gráfica (b) de la figura 49, corresponde al desplazamiento de la platina controlado por el equipo de cómputo, observe que es matemáticamente difícil conocer la velocidad de fuga por que el desplazamiento es muy abrupto y dado que en la realidad los escalones están muy separados la aproximación a una pendiente no es factible. Para esta técnica la velocidad de desplazamiento se controla por el número de escalones en la rampa.



(a) (b)

FIGURA 50 (a) Colocación de la muestra de partículas dieléctricas sobre el portaobjetos. (b) Colocación de la muestra *in situ* sobre el arreglo.

En la preparación de muestras, fotografía (a) figura 50, se adhiere al portaobjetos una lámina plástica de aproximadamente 200μm de grosor para contención de la sustancia de prueba, después de colocada la sustancia se coloca el cubreobjetos y se presiona levemente

expulsando el líquido sobrante propiciando un sellado hermético que favorece la experimentación de larga duración, reduciendo el tiempo de desecación en la muestra por evaporación. Posteriormente, puesto el portaobjetos en la platina, se pone en foco la muestra, en lo que se denomina plano del espécimen que es observado por el usuario a través de un monitor. En la fotografía (b) de la figura 50 se muestra la colocación de la muestra *in situ* sobre el arreglo experimental cuando el portaobjetos fue previamente acondicionado. Se recomienda que la disposición física de la computadora, generador de funciones, fuente de corriente del diodo láser, monitor y perillas de las montura gimbal estén en una posición cómoda para el usuario, de tal manera que sea ágil el proceso de manipulación.

Los experimentos se realizaron con partículas dieléctricas esféricas de la compañía *Duke Scientific*, con certificación de la NIST (*National Institute of Standards and Technology*) de los Estados Unidos de América. Las especificaciones técnicas según datos del certificado de calibración para cada una de las partículas de acuerdo al diámetro nominal se señalan en la tabla VIII.

Algunos de los datos experimentales importantes en la manipulación, según el diámetro de las partículas dieléctricas son la fuerza, la velocidad y la potencia óptica para un asimiento en condición estable mínima, óptima y máxima, como se resume en la tabla IX.

TABLA VIII Especificaciones técnicas de las partículas dieléctricas utilizadas en los experimentos.

Diámetro Nominal	1μm	2μm	3μm	5μm	10μm
Diámetro Medio	1.020μm ±0.022μm	2.013μm ±0.025μm	3.063μm ±0.027μm	4.996μm ±0.035μm	10.15μm ±0.06μm
Desviación estándar	0.011μm	0.022 μm	0.03 μm	0.05 μm	0.10 μm
Composición Química	Poliestireno $(C_8H_8)x$	Poliestireno $(C_8H_8)x$	Poliestireno $(C_8H_8)x$	Poliestireno $(C_8H_8)x$	Poliestireno $(C_8H_8)x$
Densidad	1.05 g/cm^3	1.05 g/cm^3	1.05 g/cm^3	1.05 g/cm^3	1.05 g/cm^3
Índice de refracción	1.59 @ *(589nm)*	1.59 @ *(589nm)*	1.59 @ *(589nm)*	1.59 @ *(589nm)*	1.59 @ *(589nm)*
Número de catálogo	4010A	4202A	4203A	4205A	4210A

TABLA IX Parámetros experimentales importantes en el asimiento óptico de partículas dieléctricas según su diámetro.

		$F_{gradiente}$ *[pN]*	V_{escape} *[μm/s]*	$P_{óptica}$ *[mW]*
1μm	*Mínima*	0.13	14.20	0.46
	Óptima	0.90	95.88	5.21
	Máxima	2.28	242.02	13.56
2μm	*Mínima*	0.26	13.82	0.46
	Óptima	1.94	103.16	5.21
	Máxima	5.56	295.3	13.56
3μm	*Mínima*	0.42	14.95	0.46
	Óptima	2.97	105.18	5.21
	Máxima	6.93	245.42	13.46
5μm	*Mínima*	0.20	4.30	0.46
	Óptima	3.46	73.0	5.21
	Máxima	10.28	218.1	13.56
10μm	*Mínima*	1.10	11.70	2.91
	Óptima	2.55	27.00	5.21
	Máxima	12.33	130.9	13.56

En los experimentos, para cada una de las partículas se hizo un barrido de la fuerza gradiente en el plano del espécimen, para lo cual se desplazó la trampa óptica en distintas posiciones al plano, como se esquematiza en la figura 51.

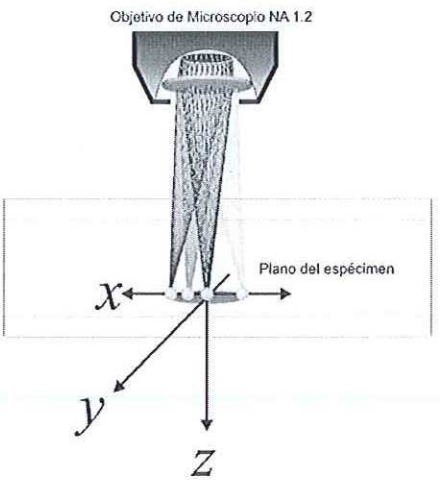
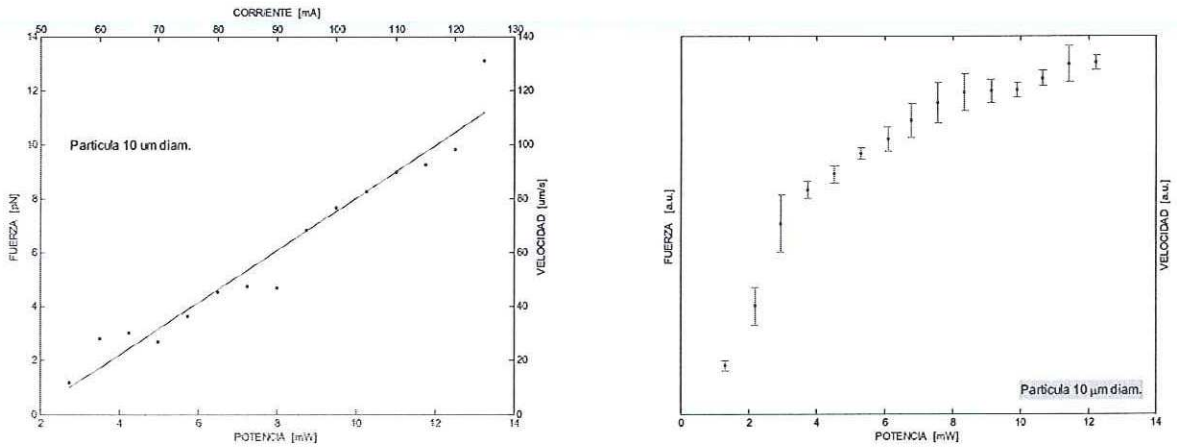


FIGURA 51 Esquema de la medición de la fuerza gradiente para diferente posición de la trampa óptica en el plano del espécimen

Algunos de los parámetros experimentales importantes mencionados en la tabla IX están presentes en las siguientes gráficas para la estimación de la fuerza gradiente durante el asimiento. Para consultar tabla de datos completa ver apéndice A. En la segunda sección de este capítulo se lleva acabo el análisis y discusión de los resultados experimentales que se presentan a continuación.

Considerando primeramente una partícula de 10μm de diámetro y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la medición experimental de la fuerza gradiente se encontraron los resultados mostrados en la figura 52. En nuestro sistema se encontró para el caso del desplazamiento de la platina controlado por el generador de funciones gráfica (a) figura 52, que una partícula de 10μm de diámetro es asida con una fuerza mínima de 1.1pN, al ir aumentando la potencia se observa un comportamiento lineal hasta una fuerza máxima de 12.33pN, alcanzando una velocidad máxima a la que podía ser manipulada de aproximadamente 130.9μm/s, para más información ver tablas IX y X.



(a) (b)

FIGURA 52 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 10μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.

Como ya se mencionó anteriormente los datos obtenidos por la técnica de control de la platina por la computadora no son confiables en su magnitud, sin embargo el comportamiento reportado en la gráfica (b) de la figura 52 muestra ser repetitivo para partículas de distinto diámetro, los experimentos se repitieron cinco veces de tal forma que las barras de error corresponden a la desviación estándar de la fuerza gradiente para una potencia dada. Exceptuando la gráfica de la figura 53 que se obtuvo mediante la técnica de control de la platina por computadora, las demás gráficas sobre la medición experimental de la fuerza gradiente en el plano del espécimen se obtuvieron mediante la técnica de control que utiliza el generador de funciones.

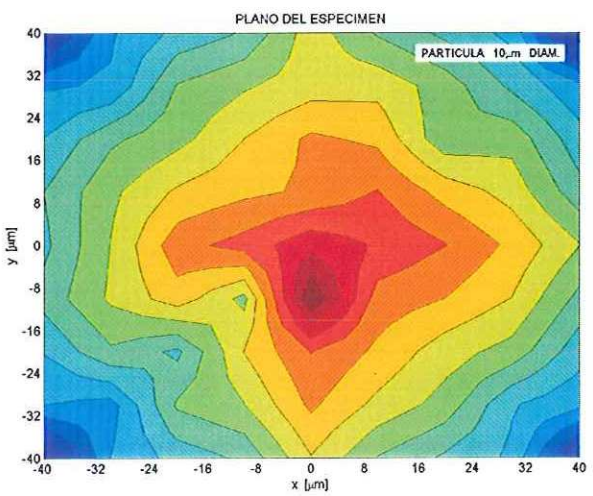
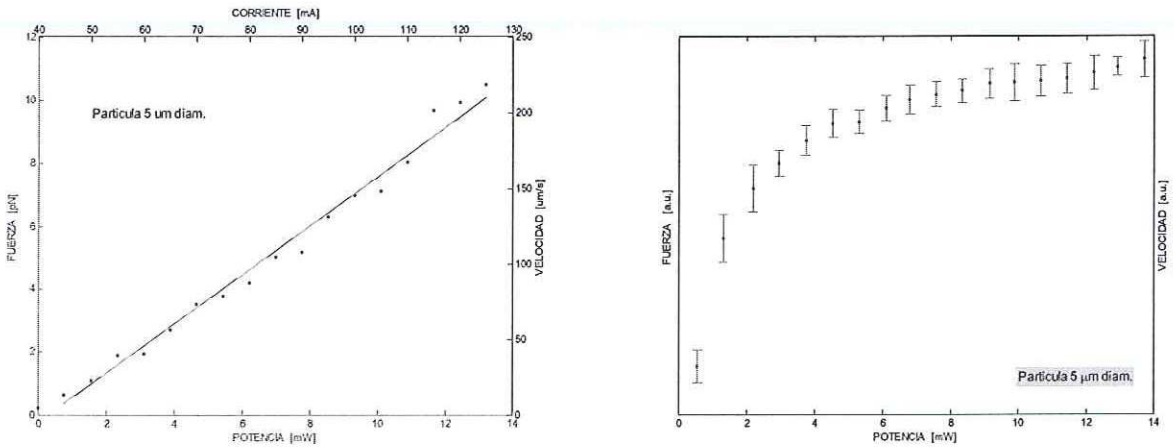


FIGURA 53 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 10μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.

Considerando una partícula de 5μm de diámetro y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la medición experimental de la fuerza gradiente se encontraron los resultados mostrados en la figura 54. En nuestro sistema se encontró para el caso del desplazamiento de la platina controlado por el generador de funciones gráfica (a) figura 54, que una partícula de 5μm de diámetro es asida con una fuerza mínima de 0.2pN, al ir aumentando la potencia se observa un comportamiento lineal hasta una fuerza máxima de 10.28pN, alcanzando una velocidad máxima a la que podía ser manipulada de aproximadamente 218.1μm/s, para más información ver tablas IX y X.



(a) (b)

FIGURA 54 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 5μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.

La gráfica de la figura 55 se obtuvo mediante la técnica de control de la platina por el generador de funciones para la medición experimental de la fuerza gradiente en el plano del espécimen para partículas de 5μm de diámetro, según se esquematiza en la figura 51. Observe que la fuerza gradiente se degrada hacia los extremos del plano del espécimen, tendiendo a ser más intensa hacia el cuadrante superior izquierdo. Por el análisis de fuerzas realizado en capítulos anteriores se esperaría que la fuerza gradiente más intensa se localizara en el centro del plano, como esta ocurriendo en la gráfica de la figura 53 para partículas de 10μm de diámetro, sin embargo, posiblemente la tendencia observada en la figura 55 deba su causa a desalineaciones en el sistema de manipulación.

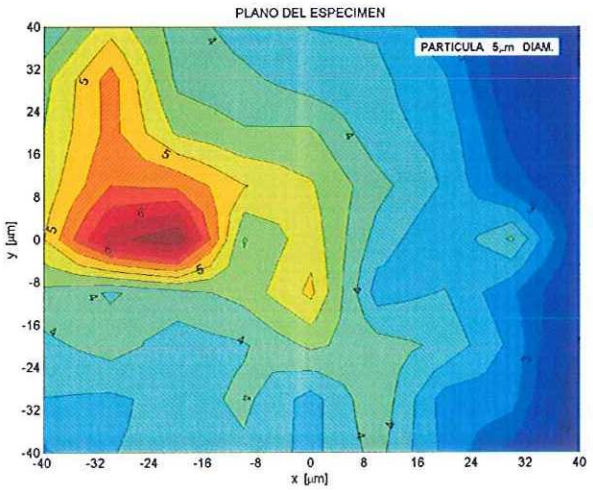
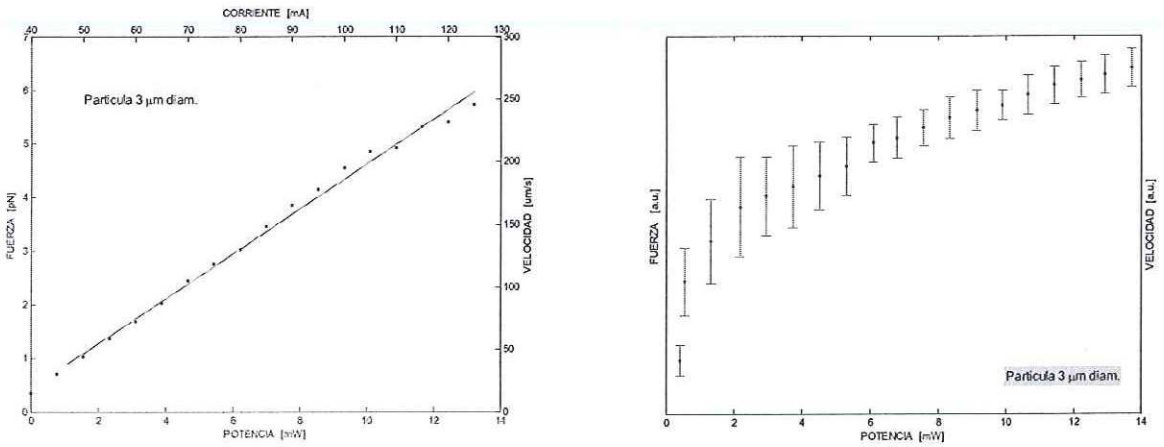


FIGURA 55 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 5μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.

Considerando una partícula de 3μm de diámetro y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la medición experimental de la fuerza gradiente se encontraron los resultados mostrados en la figura 56. En nuestro sistema se encontró para el caso del desplazamiento de la platina controlado por el generador de funciones gráfica (a) figura 56, que una partícula de 3μm de diámetro es asida con una fuerza mínima de 0.42pN, al ir aumentando la potencia se observa un comportamiento lineal hasta una fuerza máxima de 6.93pN, alcanzando una velocidad máxima a la que podía ser manipulada de aproximadamente 245.2μm/s, para más información ver tablas IX y X.



(a) (b)

FIGURA 56 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 3μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.

La gráfica de la figura 57 se obtuvo mediante la técnica de control de la platina por el generador de funciones para la medición experimental de la fuerza gradiente en el plano del espécimen para partículas de 3μm de diámetro, según se esquematiza en la figura 51. Observe que la fuerza gradiente se degrada hacia los extremos del plano del espécimen, tendiendo a ser más intensa hacia el cuadrante superior izquierdo. Por el análisis de fuerzas realizado en capítulos anteriores se esperaría que la fuerza gradiente más intensa se localizara en el centro del plano, sin embargo, al igual que en caso anterior de la gráfica de la figura 55 para partículas de 5μm, posiblemente la tendencia observada en la figura 57 deba su causa a desalineaciones en el sistema de manipulación.

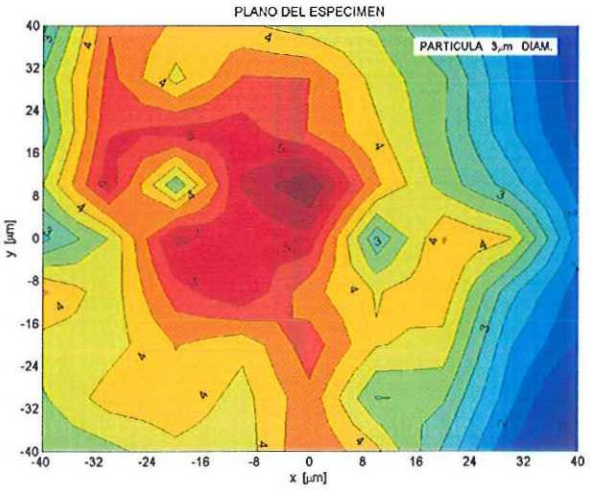
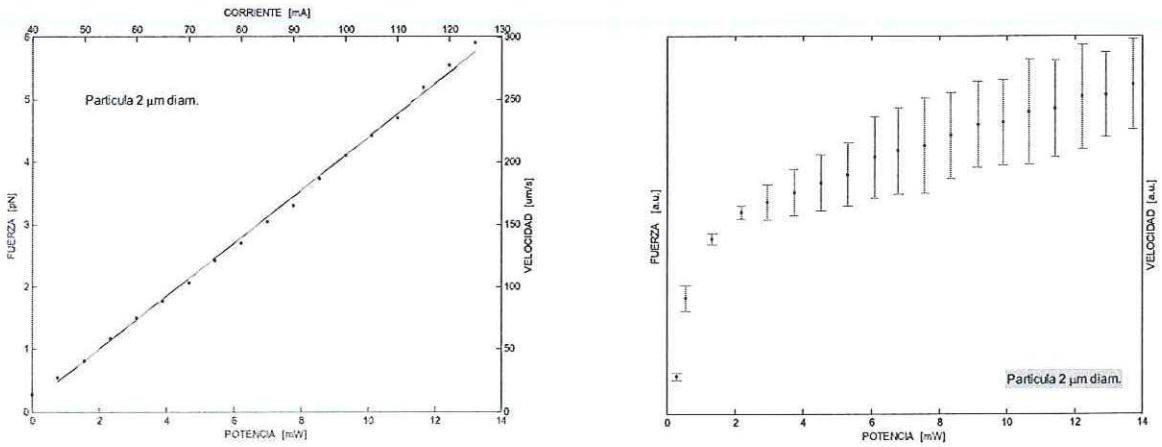


FIGURA 57 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 3μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.

Considerando una partícula de 2μm de diámetro y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la medición experimental de la fuerza gradiente se encontraron los resultados mostrados en la figura 58. En nuestro sistema se encontró para el caso del desplazamiento de la platina controlado por el generador de funciones gráfica (a) figura 58, que una partícula de 2μm de diámetro es asida con una fuerza mínima de 0.26pN, al ir aumentando la potencia se observa un comportamiento lineal hasta una fuerza máxima de 5.56pN, alcanzando una velocidad máxima a la que podía ser manipulada de aproximadamente 295.2μm/s, para más información ver tablas IX y X.



(a) (b)

FIGURA 58 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 2μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.

La gráfica de la figura 59 muestra los resultados experimentales obtenidos para la medición de la fuerza gradiente en el plano del espécimen para partículas de 2μm de diámetro, como se da a entender en el esquema de la figura 51. Observe que la fuerza gradiente se degrada hacia los extremos del plano del espécimen, tendiendo a ser más intensa hacia el cuadrante superior izquierdo. Por el análisis de fuerzas realizado en capítulos anteriores se esperaría que la fuerza gradiente más intensa se localizara en el centro del plano, sin embargo, al igual que en casos anteriores, posiblemente la tendencia observada en la figura 59 deba su causa a desalineaciones en el sistema de manipulación.

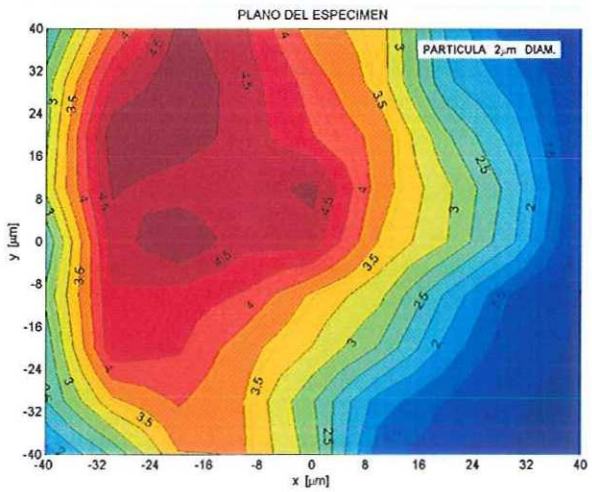
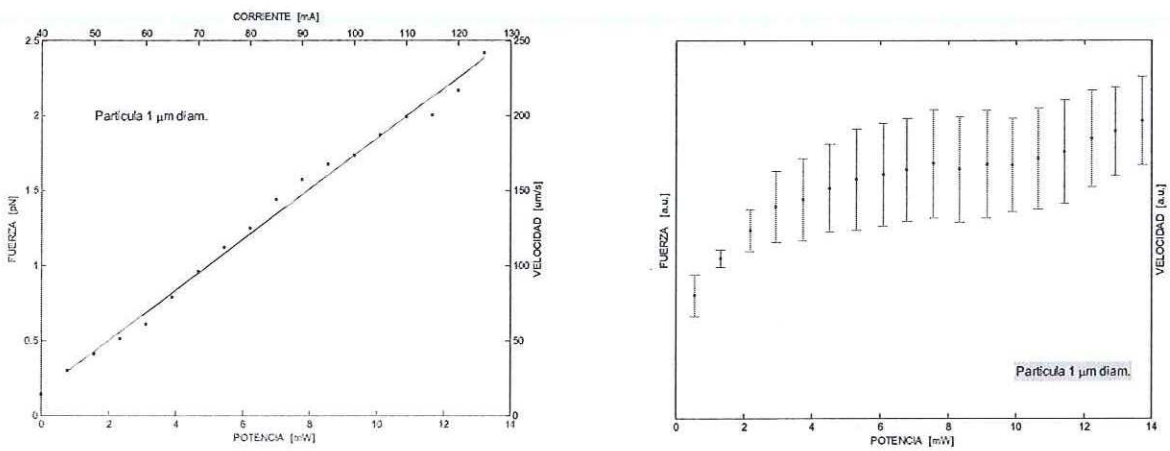


FIGURA 59 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 2μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.

Considerando una partícula de 1μm de diámetro y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la medición experimental de la fuerza gradiente se encontraron los resultados mostrados en la figura 60. En nuestro sistema se encontró para el caso del desplazamiento de la platina controlado por el generador de funciones gráfica (a) figura 60, que una partícula de 1μm de diámetro es asida con una fuerza mínima de 0.13pN, al ir aumentando la potencia se observa un comportamiento lineal hasta una fuerza máxima de 2.28pN, alcanzando una velocidad máxima a la que podía ser manipulada de aproximadamente 242μm/s, para más información ver tablas IX y X.



(a) (b)

FIGURA 60 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 1μm de diámetro por desplazamiento de la platina, (a) controlado por generador de funciones, (b) controlado por computadora.

La gráfica de la figura 61 muestra los resultados experimentales obtenidos para la medición de la fuerza gradiente en el plano del espécimen para partículas de 1μm de diámetro. Observe que la fuerza gradiente se degrada hacia los extremos del plano del espécimen, tendiendo a ser más intensa hacia el cuadrante superior izquierdo, ya que se esperaría que la fuerza gradiente mas intensa se localizara al centro del plano, entonces al igual que en los casos anteriores, posiblemente la tendencia observada en la figura 61 deba su causa a desalineaciones en el sistema de manipulación, además cabe señalar que las condiciones experimentales son susceptibles de modificarse con el tiempo.

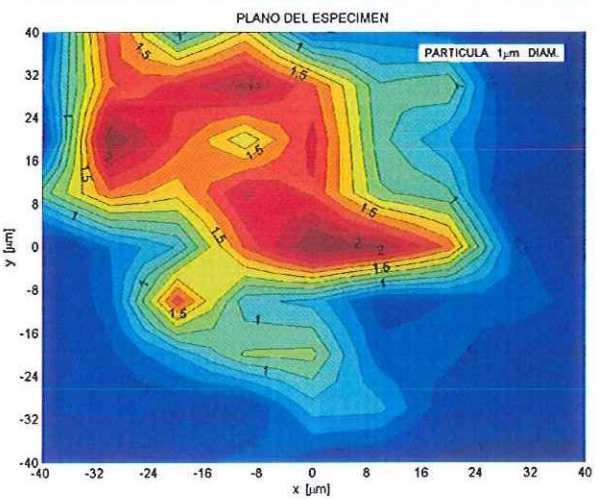


FIGURA 61 Medición experimental de la fuerza gradiente para la partícula de 1μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica en el plano del espécimen.

V.1.1 DEPENDENCIA DE LA FUERZA GRADIENTE RESPECTO A LA POLARIZACIÓN DE LA LUZ

Los siguientes resultados se obtuvieron alternando de forma ortogonal el plano de polarización del haz de asimiento, rotando 45° la placa $\lambda/2$ anterior al objetivo de microscopio. Además para diferentes posiciones de la trampa óptica en el eje correspondiente al desplazamiento de la platina, ver figura 62, se observa que un desplazamiento en x es paralelo a un plano de polarización p, mientras que una polarización s es paralela a un desplazamiento en y. Se recomienda colocar un polarizador posterior al diodo láser con el propósito de asegurar una polarización lineal durante los experimentos.

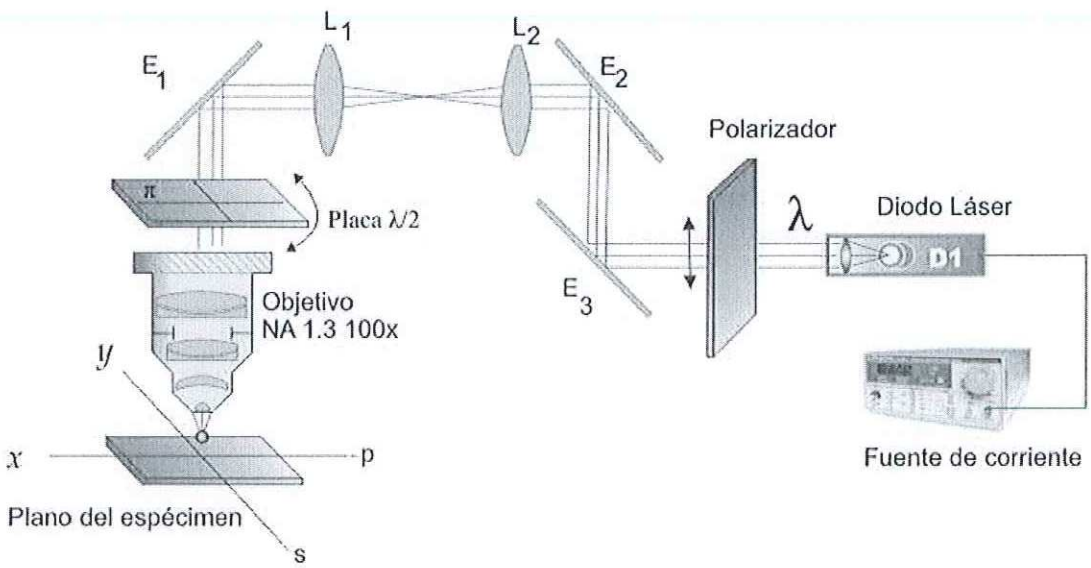


FIGURA 62 Esquema del arreglo experimental para la demostración de la dependencia de la fuerza gradiente del estado de polarización de la luz.

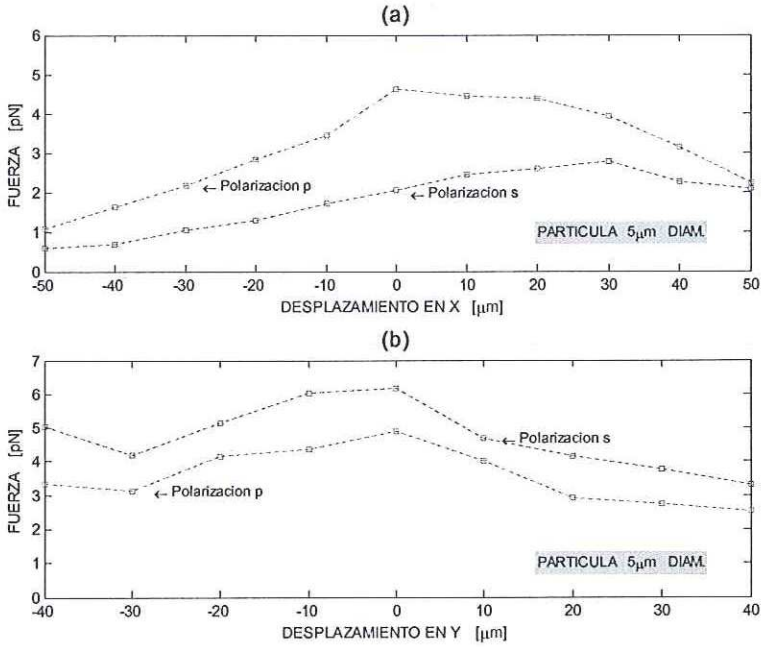


FIGURA 63 Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz para la partícula de 5μm de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica, (a) en el eje x, (b) en el eje y.

Se considera la posición cero, es decir, el origen en el plano del espécimen como el punto de intersección del eje óptico si la alineación del sistema es óptima. En la obtención de estos resultados la potencia del diodo láser fue de 5.14mW en referencia posterior al objetivo de microscopio.

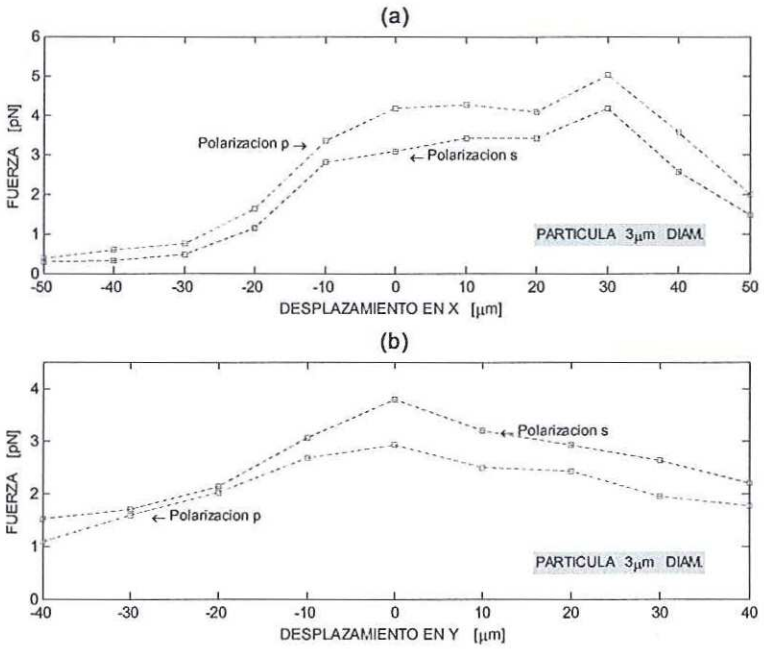


FIGURA 64 Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz para la partícula de $3\mu m$ de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica, (a) en el eje x, (b) en el eje y.

En términos de polarización, el *plano de incidencia* es ortogonal al plano del espécimen y la *superficie dieléctrica* donde ocurre la refracción en la partícula es un plano tangencial al punto de incidencia del fotón sobre la superficie esférica de la partícula, de tal manera que un plano de polarización TE es perpendicular al plano de incidencia y un plano de polarización TM es paralelo al plano de incidencia. Por las ecuaciones se Fresnel se tiene que la reflexión es un parámetro que depende de ángulo de incidencia del plano de polarización respecto a la normal del plano de tangencia en la superficie dieléctrica. Dado

que la fuerza gradiente depende a su vez de la cantidad de fotones refractados en la partícula que contribuyen con un cambio en la dirección de la transferencia del momento, es de suponer una dependencia de la fuerza gradiente respecto al estado de polarización del haz de asimiento.

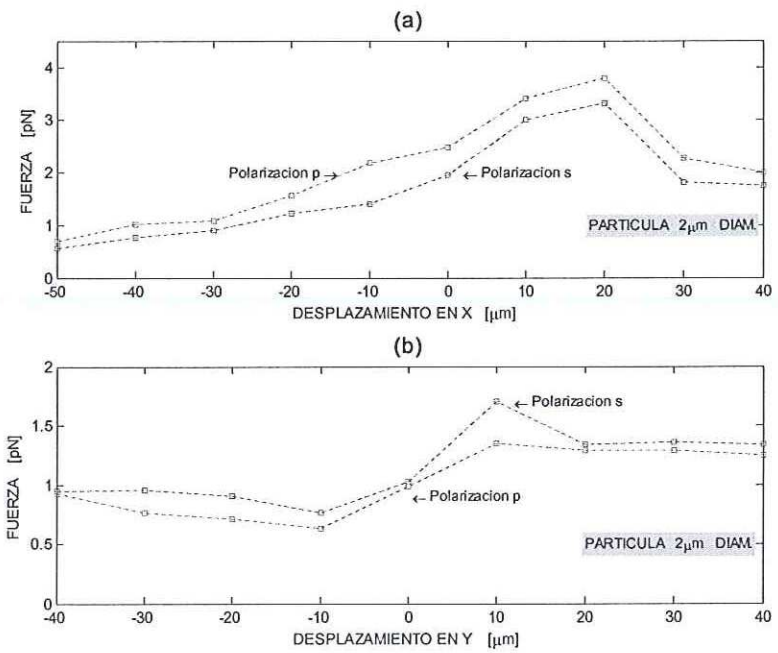


FIGURA 65 Dependencia de la fuerza gradiente de la polarización de la luz para la partícula de $2\mu m$ de diámetro por desplazamiento de la platina para diferentes posiciones de la trampa óptica, (a) en el eje x, (b) en el eje y.

V.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En las partículas de 10μm de diámetro el movimiento Browniano es significativamente menor en comparación al que se presenta en partículas de menor diámetro, haciéndose imperceptible para partículas de 20μm de diámetro. Esto representa una reducción en la dinámica de las partículas por efectos termodinámicos. Partículas de estas dimensiones no son fácilmente manipulables.

Empíricamente las partículas de 5 μm de diámetro y de diámetros menores son fácilmente manipulables si se opera arriba de la velocidad media óptima y procurando que la concentración de partículas en la muestra sea baja.

Para condiciones invariantes en la viscosidad del medio (η) y la potencia del haz de captura. Existe un incremento proporcional en la fuerza de asimiento de las partículas conforme aumenta el diámetro (a) de la partícula, es obvio tal comportamiento a partir de la expresión usada para calcular tal fuerza, denotada como F_{Drag}, en la ecuación (22).

Para condiciones invariantes en la viscosidad del medio (η). Existe un incremento proporcional en la fuerza de asimiento conforme disminuye la velocidad media de escape $\bar{\upsilon}_{escape}$. En otras palabras, partículas de menor diámetro soportan velocidades de arrastre mayores, sin embargo, la fuerza Fr disminuye en la misma proporción al incremento de Fz, ver ecuación (16) y (17), en consecuencia, esto conduce a la hipótesis mecánica de un

incremento en la fuerza de "fricción" (inercia) debido a un incremento en la fuerza normal a la partícula suministrado por *Fz*. En los experimentos *Fr* actúa en el plano del espécimen como una fuerza en la dirección de *x* o de *y* aproximada a la fuerza gradiente.

El límite de difracción debido al objetivo de microscopio, repercute en el diámetro mínimo del disco de Airy del haz enfocado ($\approx 0.8\mu$m), lo cual determina la cantidad de partículas con diámetro de 1μm que pueden ser capturadas en la región focal. Es decir, se observa que en la muestra de partículas de 1μm de diámetro quedan atrapadas mas de una partícula, tanto axial como longitudinalmente, fenómeno que no ocurre para partículas de diámetro mayor.

Si la variación de la potencia óptica es lineal (ver sección *III.2.*) entonces se espera que el comportamiento de la fuerza gradiente sea lineal, como esta ocurriendo con los resultados obtenidos mediante la técnica que utiliza el generador de funciones para desplazar la platina, gráfica (a) de las figuras 52, 54, 56, 58 y 60. La magnitud de los resultados obtenidos por esta técnica, son similares y congruentes a los resultados reportados (Sato *et al.*, 1991). Sin embargo, en los resultados obtenidos por la técnica de control mediante la computadora, los resultados no son lineales, gráfica (b) de las figuras 52, 54, 56, 58 y 60.

En la gráfica de la figura 66 se analiza como ocurre el asimiento en la cintura del haz enfocado, y la relación que existe entre la sección transversal de la partícula y la sección transversal del haz conforme avanza longitudinalmente en la dirección de propagación.

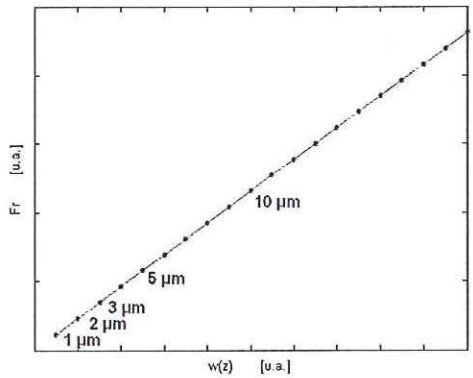


FIGURA 66 Comportamiento de la fuerza total Fr de la ecuación (17) según un incrementa en el ancho del haz.

Debido a la apertura numérica grande del objetivo de microscopio es de esperar que las normales al frente de onda incidan oblicuamente a la superficie de las esferas, mayor será la inclinación de dichas normales conforme estas se aproximen a los extremos del haz. Ashkin (Ashkin *et al.*, 1983) propone descomponer la fuerza a la normal del frente de onda para un haz con distribución de intensidad Gaussiano, en sus dos componentes, radial *Fr* ecuación (16) y longitudinal *Fz,* ecuación (17). La relación r/z depende fuertemente de la apertura numérica del objetivo de microscopio. Además la componente de fuerza radial depende del gradiente de la distribución de la intensidad del haz, como se muestra en la figura 67.

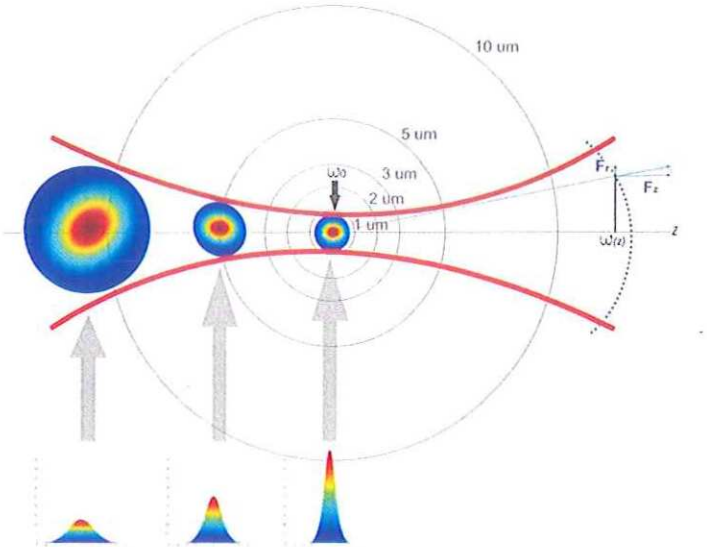


FIGURA 67 Variación del ancho de la cintura del haz enfocado respecto a z y su relación con el diámetro de la partícula

En la cintura de un haz gaussiano el frente de onda es plano, es decir, sus normales son paralelas. Conforme el frente de onda converge la oblicuidad con la que las normales inciden respecto a la superficie de la partícula asida decrece. Trasladando esta idea al comportamiento de las componentes de fuerza radial y longitudinal, se deduce, un decremento en la componente radial Fr conforme el frente de onda se acerca a la cintura. Por lo tanto, considerando que el centro de las partículas asidas coincide con la posición de la cintura y que esta posee un radio aproximado al límite de difracción, se puede ver que en una partícula de 1μm de diámetro Fr es menor que para cualquier otra partícula de diámetro mayor. En síntesis, la magnitud de Fr es mayor en proporción a la distancia que

existe entre la superficie de la partícula que interacciona con el frente de onda y el centro de la misma. En consecuencia para conocer un comportamiento aproximado de la fuerza *Fr* con respecto a la cintura se debe investigar como varia la integral para la expresión de *Fr* dada una sección transversal del haz enfocado en correspondencia a la variación de su ancho respecto a la distancia. Integrando la ecuación (17), tenemos:

$$F_r = \int_0^{2\pi}\int_0^{\rho}\left(\frac{K}{z\omega_{(z)}^2}\right) r e^{-2r^2/\omega_{(z)}^2} r dr d\theta \tag{64}$$

donde el tamaño de la cintura es $\omega = \lambda z / \pi\omega_0$ y K es una constante proporcional a la sección transversal de esparcimiento de la partícula y la potencia total del haz. Resolviendo la primera integral de 0 a 2π que abarca la totalidad de la sección transversal, obtenemos:

$$F_r = 2\pi \int_0^{\rho}\left(\frac{K}{z\omega_{(z)}^2}\right) r^2 e^{-2r^2/\omega_{(z)}^2} dr \tag{65}$$

En la gráfica 66 se muestra el resultado arrojado por la integral de *Fr* según un incremento lineal respecto a la distancia en el ancho del haz. Por simplicidad se toma el limite superior ρ igual a ω en los cálculos. Si la relación ω/z es mayor que cero entonces *Fr* tiende a ser creciente, note que esto depende de la apertura numérica del objetivo de microscopio. Por lo tanto conforme las partículas asidas aumentan de diámetro la fuerza radial *Fr* que experimentan será mayor, sin embargo, esto no nos asegura que el asimiento de las partículas será viable desde el punto de vista de la manipulación, por que no se están

tomando en cuenta factores mecánicos y termodinámicos que facilitan el asimiento y movilidad de los cuerpos inmersos en un líquido. En conclusión, partículas asidas de mayor diámetro están sujetas a una fuerza *Fr* mayor, el comportamiento de esta fuerza depende de la variación del ancho del haz y esta a su vez de la distancia respecto al foco. *Fr* es directamente proporcional a la potencia del haz. La potencia necesaria para que una partícula en reposo venza el arrastre generado por el flujo de un líquido esta regido por un fenómeno hidrodinámico. Ya que *Fr* posee presumiblemente un modelo lineal es de esperar que la fuerza gradiente posea un comportamiento similar.

De los resultados anteriores se extrae una observación en sumo grado importante. Existe una velocidad media (fuerza) **mínima** para la cual la partícula se considera subjetivamente que esta asida cuando esta puede ser manipulada sin riesgo de quedar inmersa en efectos hidrodinámicos o termodinámicos ajenos a la manipulación, ver tabla IX.

Existe una velocidad media (fuerza) **óptima** a partir de la cual la partícula se considera subjetivamente que esta asida cuando esta puede ser manipulada a través de inclinaciones en la montura del espejo Gimbal, a una velocidad confiable al operador humano, ver tabla IX. Por lo general esta velocidad media óptima se alcanza a partir de los 5mW de potencia después del objetivo de microscopio (posición 5 en la figura 33) o 26mW y 70mA, en potencia y corriente respectivamente para el diodo láser (posición 1 en la figura 33). La importancia de esta última observación radica en el planteamiento de que no es necesario aplicar toda la potencia óptica para lograr un asimiento estable en una partícula, basta

alcanzar la potencia óptima, evitando la inducción de daños por absorción, principalmente en los especímenes biológicos. En la figura 68 se divide la región de potencia óptica mínima (0.55mW-5.32mW) y óptima (6.09mW-13.72mW) para el asimiento de partículas de 1μm, 2μm, 3μm, 5μm y 10μm de diámetro según los datos obtenidos por la técnica de desplazamiento de la platina mediante el generador de funciones.

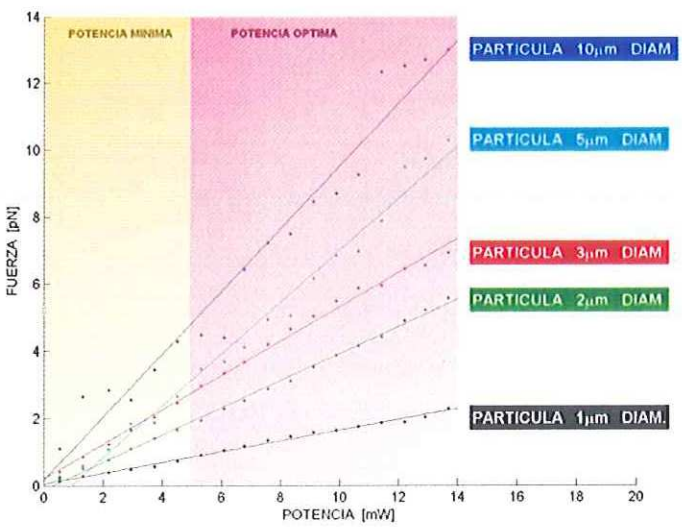


FIGURA 68 Identificación de una fuerza de asimiento mínima y una fuerza de asimiento óptima según el comportamiento de la fuerza gradiente para distintos diámetros de la partícula.

La incertidumbre en la medición de la fuerza gradiente crece para partículas de 3μm, 2μm y 1μm, y puede tener su causa en la presencia de agentes externos que contaminan la muestra y alteran la viscosidad del medio modificando drásticamente las condiciones experimentales

Como consecuencia de las aberraciones inducidas por el objetivo de microscopio la fuerza gradiente decae del centro hacia los extremos en el plano del espécimen. Suponemos que el centro del plano del espécimen es intersecado por el eje óptico del sistema. Este aspecto fue predicho y abordado teóricamente (figura 31) por medio de simulaciones, en la sección *III.1.3.* Las gráficas de las figuras 51, 53, 55, 57 y 59 corroboran experimentalmente tal predicción para partículas de 10μm, 5μm, 3μm, 2μm y 1μm de diámetro respectivamente.

Los resultados presentados en la sección *V.1.1* señalan que la fuerza gradiente depende en conjunto de la polarización y de la dirección del desplazamiento. Cuando la partícula se somete a un desplazamiento de la platina en el eje x, una polarización tipo p respecto a la dirección del desplazamiento aporta una mayor fuerza que una polarización tipo s, gráfica (a) de las figuras 63, 64 y 65, por el contrario, si ahora el desplazamiento es en el eje y, una polarización tipo s aporta una mayor fuerza que una polarización tipo p gráfica (b) de las figuras 63, 64 y 65. Además se observa en el decaimiento de las fuerzas respecto al diámetro de la partícula un acercamiento de las curvas para ambas polarizaciones cuando el diámetro de la partícula es muy pequeño figura 69, lo cual, nos lleva a conjeturar que los

efectos de la polarización en la fuerza gradiente pueden omitirse si el diámetro de la partícula es menor a $1\mu m$ de diámetro

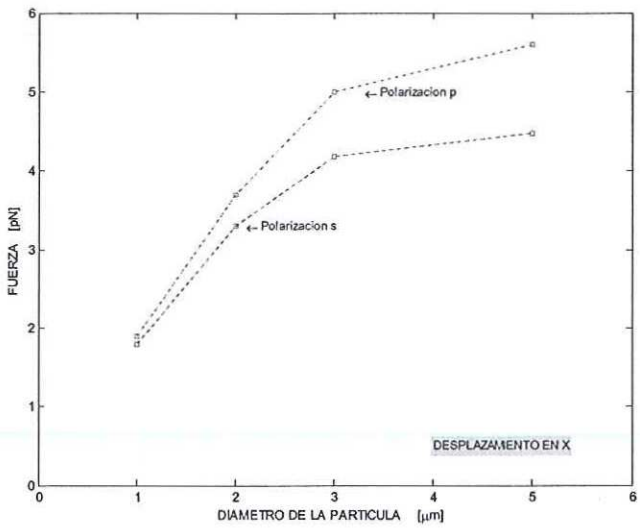


FIGURA 69 Variación de la fuerza gradiente respecto al diámetro de la partícula para polarización s y p del haz de asimiento.

Una hipótesis sobre la dependencia de la fuerza gradiente respecto a la polarización se puede sustentar por la cantidad de rayos refractados y su repercusión en la transferencia del momento de los fotones a la partícula, considerando el caso de la figura 69 se puede decir que una mayor cantidad de fotones se están refractando y contribuyendo en el asimiento para una polarización tipo p cuando el desplazamiento es paralelo a dicha polarización.

CAPÍTULO
VI

CONCLUSIONES

En este capítulo se abordan las conclusiones del trabajo realizado en esta tesis.

V.1 CONCLUSIONES

1. Se realizó una investigación exhaustiva sobre las distintas técnicas publicadas sobre diseño de pinzas ópticas, con el propósito de aplicar estos conocimientos en este trabajo de tesis. En la construcción del sistema de pinzas ópticas se implementó un sistema de manipulación simple y dual, que contempla el desplazamiento de la trampa en el plano del espécimen por medio de inclinaciones en un espejo plano empotrado en una montura gimbal. Se implementaron dos técnicas distintas sobre el control del desplazamiento de la platina con el propósito de realizar los experimentos pertinentes a la medición de fuerzas, además de brindar un método complementario en la manipulación de especimenes.

2. Se analizó los principios de operación del asimiento óptico como un fenómeno que surge debido a la presión de la radiación. Se abordó los fundamentos teóricos de la presión de la radiación desde la perspectiva de la teoría de esparcimiento de Mie. Sin embargo dicha teoría no es totalmente extensiva al fenómeno del asimiento óptico y principalmente en la descripción de las fuerzas desencadenadas, en consecuencia, se hizo una revisión de la teoría formulada por Ashkin (Ashkin, 1997) sobre confinamiento óptico que esclarece la descomposición de fuerzas mediante la transferencia del momento de los fotones al espécimen, las cuales pueden ser fácilmente analizadas por la refracción de la luz en los cuerpos.

3. **Se propone analizar el asimiento óptico como un fenómeno físico integral**. La presencia de fenómenos inherentes al asimiento óptico como la fuerza de Bouyant, el movimiento Browniano y efectos de Floculación, son factores ineludibles que deben considerarse en el proceso de manipulación de los especimenes. Para tal efecto, se analizaron los fenómenos anteriores y posteriores al asimiento óptico, esencialmente en sus efectos sobre la fuerza causante del asimiento.

4. **Se caracterizó el sistema de pinzas ópticas**. El sistema de manipulación óptica fue analizado mediante simulaciones en el programa ZEMAX de diseño óptico, con el propósito de optimizar el sistema, así como el de conocer sus alcances y limitaciones. Se hizo un cálculo del desplazamiento axial de la trampa en el plano del espécimen dada una desviación angular. Además, se hizo un análisis de la distribución y aprovechamiento de la potencia óptica en el arreglo experimental.

5. **Se realizaron experimentos de asimiento y manipulación óptica en especímenes biológicos.** Se demostró la factibilidad de la manipulación óptica en eritrocitos y microalgas de diferente especie, además se observó el fenómeno de repulsión óptica en un grumo de esporas. Se recalcó la importancia de la longitud de onda como parámetro importante en el asimiento óptico de especimenes vivos.

6. **Se obtuvieron resultados experimentales sobre la magnitud y comportamiento de la fuerza gradiente.** La fuerza causante principal del asimiento óptico es la fuerza

gradiente, los resultados obtenidos sobre magnitud son congruentes y similares con resultados publicados. También se presentaron mediciones experimentales sobre la variación de la fuerza en el plano del espécimen. Además se hicieron mediciones sobre la dependencia de la fuerza respecto al estado de polarización de la luz.

LITERATURA CITADA

Ashkin, A. y Gordon, J.P. 1983. "Stability of radiation-pressure particle traps: an optical Ernshaw theorem". Opt. Lett. 8(10):511-515 p.

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

Ashkin, A. 1992. "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime". Biophys. J. 61:569-582 p.

Ashkin, A. 1997. "Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers". Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4853-4860 p.

Bechhoefer, J., y Scott, W. 2002. "Faster, cheaper, safer optical tweezers for the undergraduate laboratory". Am. J. Phys. 70(4):393-400 p.

Bernath, P. 1981. "The spectroscopy of water vapour: Experiment, theory and applications", Phys. Chem. 4:1501-1509 p.

Braun, E. 2001. "Un movimiento en zigzag". Fondo de Cultura Económica. Segunda Edición. México. 107 p.

D'Helon, C., Dearden, E.W., Rubinsztein, H., y Hecknberg, N.R. 1994. "Measurement of the optical and trapping range of a single-beam gradient optical trap for micron-sized latex spheres". J. Mod. Opt. 41(3):595-601 p.

Dholakia, K., Spalding, G., y McDonald, M. 2002. "Optical tweezers the next generation" Physics World. Octubre. 31-35 p.

Einstein, A. 1956. "Investigations on the theory of the Brownian Movement". Dover Publications, Inc. Primera edición. New York. 122 p.

Emiliani, V., Sanvitto, D., Zahid, M., Gerbal F., y Coppey, M. 2004. "Multiple force optical tweezers to generate gradients of forces". Opt. Express. 12(17):3906-3910 p.

Fällman, E., y Axner, O. 1997. "Design for fully steerable dual-trap optical tweezers". Appl. Opt. 36(10):2107-2113 p.

Felgner, H., Müller, O., y Schliwa, M. 1995. "Calibration of light forces in optical tweezers". Appl. Opt. 34(6):977-982 p.

Fowles, G.R. 1989. "Introduction to modern optics". Dover Publications, Inc. Segunda edición. New York. 328 p.

Geary, J.M. 2002. "Introduction to Lens Design". Willmann Bell, Inc. Primera edición. Richmond. 462 p.

Glückstad, J., Eriksen, L., y Daria, V. 2002. "Fully dynamic multiple-beam optical tweezers". Opt. Express. 10(4):597-602 p.

Gouesbet, G., Gréhan, G., y Ren, K.F. 1994. "Radiation pressure forces exerted on a particle arbitrarily located in a Gaussian beam by using the generalized Lorentz-Mie theory and associated resonance effects". Opt. Comm. 108(5):343-354 p.

Gouesbet, G., Gréhan, G., y Ren, K.F. 1996. "Prediction of reverse radiation pressure by generalized Lorenz-Mie Theory". Appl. Opt. 35(15):2702-2706 p.

Greulich, K.O. 1999. "Micromanipulation by light in Biology and Medicine: the laser microbeam and optical tweezers". Birkhäuser. Primera edición. Berlin. 300 p.

Hecht, E. 2000. "Óptica". Tercera edición. Addison Wesley Iberoamericana. Madrid. 722 p.

Käs, J., Guck, J., Moon, T.J., y Cunnigham, C.C. 2000. "Optical deformability of soft dielectric materials". Phys. Rev. Lett. 84(23):5451-5454 p.

Iler, R.K. 1979. "The Chemistry of silica : solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry". John Wiley. Primera edición. New York, 866 p.

Irvine, W. 1965. "Light Scattering by Spherical Particles: Radiation Pressure, Asymmetry Factor, and Extinction Cross Section". J. Opt. Soc. Am. 55:16-20 p.

Jesacher, A., Fürhapter, S., Bernet, S., y Ritsch, M. 2004. "Size selective trapping with optical cogwheel tweezers". Opt. Express. 12(17):4129-4135 p.

Lamb, H. 1945. "Hydrodynamics". Dover Publications, Inc. Sexta edición. New York. 738 p.

Leitz, G., Greulich, K.O. y Schnepf, E. 1994. "Laser microsurgergery and optical trapping in the marine dinophyte *Pyrocystis noctiluca*". Botan. Acta 107:90-94 p.

Leitz, G., Schnepf, E. y Greulich, K.O. 1995 "Micromanipulation of statoliths in gravity sensing *Chara* rhizoids by optical tweezers". Planta 197(2):278-288 p.

Liang, K., Tong, T., Ching, T., Shin, D., Kimel, D., y Berns. 1996. "Wavelength dependence of cell heating induced by IR optical tweezer". Biophys J. 70:1-5 p.

Liesener J., Reicherter, M., Haist, T., y Tiziani, H.J. 2000. "Multi-fuctional optical tweezers using computer generated holograms". Opt. Comm. 185:77-92 p.

Liu, Y., Cheng D.K., Sonek, G.J., y Berns. 1995. "Two-photon near and far-field fluorescence microscopy with continuous-wave excitation", Opt. Lett.. 20(21):2246-2248 p.

Nieminen, T. A., Rubinsztein, H., Heckenberg, N.R., y Bishop, A.I. 2001. "Numerical modeling of optical trapping". Computer Phys. Comm. 142:468-471 p.

Sato, S., Ohyumi, M., Shibata, H., y Inaba H. 1991. "Optical trapping of small particles using a 1.3 μm compact InGaAzP diode laser". Opt. Lett. 16(5):282-284 p.

Saleh, B., y Teich, M. 1991. "Fundamentals of photonics". John Wiley & Sons Inc. New York. 966 p.

Ruiz I., y Wang P. 2003. "Optical trapping and Ablation: putting light to work" Neurophysics Laboratory Report. 10 p.

Singer, W., Bernet, S., Hecker, N., y Ritsch, M. 2000. "Three-dimensional force calibration of optical tweezers". J. Mod. Opt. 47(14):2921-2931 p.

Smith, W.J. 1992. "Modern Lens Design: a resource manual". Segunda edición. McGrawHill. 471 p.

Tlusty T., Meller A., y Bar-Ziv R. 1998. "Optical Gradient Forces of Strongly localized Fields". Phys. Rev. Lett. 81(8):1737-174 p.

Van de Hulst, H.C. 1981. "Light Scattering by Small Particles". Dover Publications. Primera edición. New York. 470 p.

Vorobjev, I., Liang, H., Wright, W.H., y Berns, M. 1993. "Optical trapping for chromosome manipulation: a wavelength dependence of induced chromosome bridges". Biophys. J. 64:533-538 p.

APÉNDICE A

DATOS EXPERIMENTALES PARA LA FUERZA GRADIENTE

TABLA X Datos experimentales para la fuerza gradiente mediante la técnica del desplazamiento de la platina por el generador de funciones.

	10μm diám.		5μm diám.		3μm diám.		2μm diám.		1μm diám.	
P **[mW]**	v_{esc} *[μm/s]*	F_{grad} *[pN]*	v_{esc} *[μm/s]*	F_{grad} *[pN]*	v_{esc} *[μm/s]*	F_{grad} *[pN]*	v_{esc} *[μm/s]*	F_{grad} *[pN]*	v_{esc} *[μm/s]*	F_{grad} *[pN]*
13.56	130.9	12.33	218.1	10.28	245.42	6.93	295.30	5.56	242.02	2.28
12.76	98.1	9.25	206.6	9.73	231.34	6.54	277.59	5.23	216.89	2.04
12.10	92.3	8.70	201.3	9.48	227.82	6.44	259.62	4.89	200.05	1.88
11.30	89.7	8.45	167.1	7.87	210.73	5.95	235.24	4.43	199.17	1.87
10.52	82.6	7.79	148.1	6.98	207.72	5.87	221.04	4.16	186.73	1.75
9.84	76.62	7.22	145.4	6.85	194.77	5.50	205.33	3.87	173.16	1.63
9.06	68.2	6.43	130.9	6.16	178.06	5.03	186.98	3.52	167.38	1.57
8.27	46.8	4.41	107.5	5.06	164.99	4.66	165.12	3.11	156.95	1.47
7.53	47.5	4.48	104.7	4.93	148.28	4.19	152.30	2.87	144.01	1.35
6.75	45.5	4.29	87.2	4.11	129.93	3.67	134.96	2.54	124.90	1.17
5.98	36.5	3.44	78.5	3.70	118.37	3.34	121.13	2.28	112.09	1.05
5.21	27.0	2.55	73.0	3.46	105.18	2.97	103.16	1.94	95.88	0.90
4.44	30.2	2.84	56.0	2.64	86.95	2.45	88.46	1.66	78.79	0.74
3.71	28.0	2.64	40.2	1.89	72.13	2.03	74.89	1.41	61.07	0.57
2.91	11.7	1.104	39.2	1.85	59.06	1.66	58.55	1.10	51.39	0.48
2.11	-	-	22.7	1.07	44.10	1.24	40.84	0.76	41.46	0.39
1.30	-	-	13.0	0.61	30.28	0.85	27.01	0.50	30.03	0.28
0.46	-	-	4.3	0.20	14.95	0.42	13.82	0.26	14.20	0.13

TABLA XI Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *x*, polarización s.

		DESPLAZAMIENTO EN *X*										
		-50	*-40*	*-30*	*-20*	*-10*	*0*	*10*	*20*	*30*	*40*	*50*
5μm diám.	v_{esc} *[μm/s]*	13.8	25.7	34.5	42.1	62.8	74.7	89.2	94.9	97.4	93.6	73.5
	F_{grad} *[pN]*	0.65	1.21	1.62	1.98	2.96	3.52	4.20	4.47	4.59	4.41	3.46
3μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	-	11.3	16.3	40.2	99.4	108	121	120	147	90	52
	F_{grad} *[pN]*	-	0.32	0.46	1.13	2.81	3.07	3.42	3.41	4.18	2.55	1.47
2μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	29.5	40.2	47.1	64.1	73.5	103	158	175	95.6	91.8	-
	F_{grad} *[pN]*	0.55	0.75	0.88	1.20	1.38	1.95	2.99	3.30	1.80	1.73	-
1μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	-	66.6	139	193	160	164	-	-	-	-	-
	F_{grad} *[pN]*	-	0.62	1.31	1.82	1.51	1.51	-	-	-	-	-

TABLA XII Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *y*, polarización s.

		DESPLAZAMIENTO EN *Y*								
		-40	*-30*	*-20*	*-10*	*0*	*10*	*20*	*30*	*40*
5μm diám.	v_{esc} *[μm/s]*	106	88.6	109	127	130	99.4	88.6	79.8	70.4
	F_{grad} *[pN]*	5.03	4.17	5.15	6.01	6.16	4.68	4.17	3.76	3.31
3μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	53.4	59.7	75.4	108	133	113	103	93.0	77.9
	F_{grad} *[pN]*	1.51	1.68	2.13	3.05	3.78	3.02	2.93	2.63	2.20
2μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	50.2	50.9	47.7	40.2	54.6	90.5	71.0	72.3	71.0
	F_{grad} *[pN]*	0.94	0.95	0.90	0.75	1.03	1.70	1.33	1.36	1.33

TABLA XIII Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *x*, polarización p.

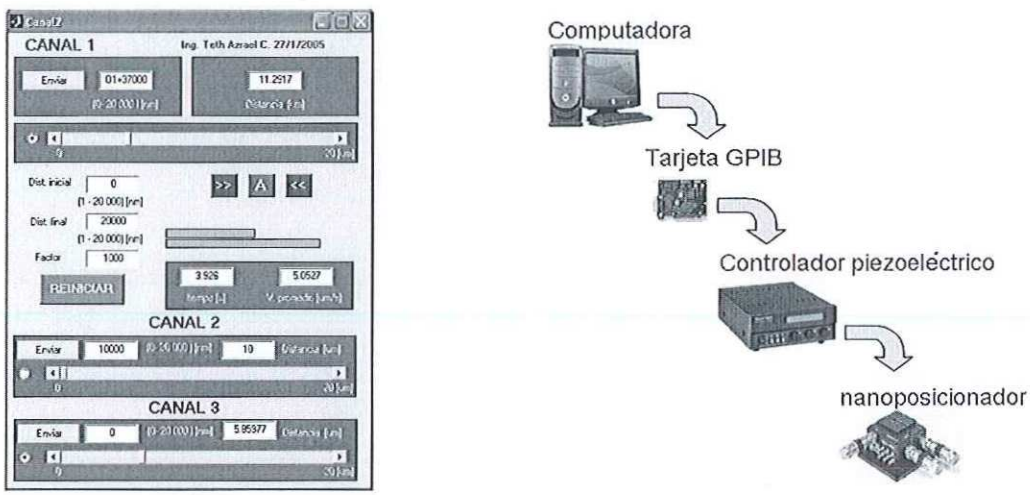
		DESPLAZAMIENTO EN *X*										
		-50	*-40*	*-30*	*-20*	*-10*	*0*	*10*	*20*	*30*	*40*	*50*
5μm diám.	v_{esc} *[μm/s]*	27.0	32.6	45.8	62.8	80.4	97.4	109	119	118	105	88.6
	F_{grad} *[pN]*	1.27	1.53	2.16	2.96	3.79	4.59	5.15	5.62	5.57	4.97	4.17
3μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	13.8	21.3	25.7	57.8	118	147	151	144	177	125	70.4
	F_{grad} *[pN]*	0.39	0.60	0.72	1.63	3.34	4.16	4.27	4.09	5.01	3.55	1.99
2μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	37.0	53.4	57.8	82.3	115	131	180	201	120	105	-
	F_{grad} *[pN]*	0.69	1.00	1.09	1.55	2.18	2.47	3.40	3.79	2.26	1.99	-
1μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	-	160	112	208	184	168	-	-	-	-	-
	F_{grad} *[pN]*	-	1.51	1.05	1.96	1.74	1.58	-	-	-	-	-

TABLA XIV Datos experimentales para la fuerza gradiente por desplazamiento en eje *y*, polarización p.

		DESPLAZAMIENTO EN *Y*								
		-40	*-30*	*-20*	*-10*	*0*	*10*	*20*	*30*	*40*
5μm diám.	v_{esc} *[μm/s]*	71.0	66.6	87.9	92.3	104	84.9	62.2	58.4	53.4
	F_{grad} *[pN]*	3.34	3.13	4.14	4.35	4.91	4.00	2.93	2.75	2.51
3μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	38.3	55.9	71.0	94.9	103	88.6	85.4	69.1	62.2
	F_{grad} *[pN]*	1.08	1.58	2.00	2.68	2.91	2.5	2.41	1.95	1.75
2μm diám	v_{esc} *[μm/s]*	49.0	40.2	37.7	33.3	52.1	71.6	68.5	68.5	65.9
	F_{grad} *[pN]*	0.92	0.75	0.71	0.62	0.98	1.34	1.29	1.29	1.24

APÉNDICE B

TÉCNICA DE CONTROL DE LA PLATINA POR INTERFAZ GRÁFICA EN LA COMPUTADORA



(a) (b)

FIGURA 70 (a) Interfaz gráfica en pantalla del ordenador. (b) esquema de los elementos que componen el sistema de control.

En la interfaz gráfica cada uno de los canales controla un eje en el dispositivo nanoposicionador por piezoeléctricos sobre el cual se ensambla la platina (apéndice C) y sobre esta descansa la muestra de experimentación colocada en un portaobjetos, ver figura 50.

```
function B3_Callback(hObject, eventdata, handles)
   global photon12
        gpib0=0; pad=12; sad=0; tmo=11; eot=1; eos=hex2dec('0c0d');
        photon12=mygpib('dev',gpib0,pad,sad,tmo,eot,eos);
        IbaREADDR = 6;
        retval = mygpib('config',photon12,IbaREADDR,1);
        comando = 'R1=1,T=0';
        retval = mygpib('wrt',photon12,comando);

Di=str2double(get(handles.E3,'string'));
vi=floor(65535*(Di/20000));
Df=str2double(get(handles.E4,'string'));
vf=floor(65535*(Df/20000));
if Di>Df
   set(handles.E3,'string','Error');                          % .E3 [Dist. Inicial_CANAL 1]
    set(handles.E1,'string','Ctrl+C');                        % .E1 [Enviar_CANAL 1]
else
F =str2double(get(handles.E5,'string'));                      % .E5 [Dist. Final_CANAL 1]
tic;
yy=[vf 0];y=vi;axes(handles.axes1);                           % .axes1 [gráfica_CANAL 1]
for i=vi:vf;
   y=y+F;if y>vf;break;end;
   yy(1,2)=y;
   barh(yy,'stack','g');axis off;
   drawnow;
   comando=['O1+' num2str(y)];
   retval=mygpib('wrt',photon12,comando);
   set(handles.E1,'string',comando);
   D=(y/65535)*20;
   set(handles.E2,'string',num2str(D));                       % .E2 [Distancia_CANAL 1]
   s= get(handles.B4,'value');                                % .B4 [A_CANAL 1]
   if s==1;break;end;
end;
t=toc;
set(handles.E6,'string',num2str(t));                          % .E6 [tiempo_CANAL 1]
v=(D-(Di/1000))/t;set(handles.E7,'string',num2str(v));        % .E7 [V. promedio_CANAL 1]
end;
```

Sección del código de la función para desplazamiento de la platina activado por el botón [>>], parte principal de la estructura lógica de la interfaz gráfica programada en MATLAB con auxilio de la librería mygpib.dll utilizada en la línea 6.

APÉNDICE C

PLATINA ENSAMBLADA AL NANOPOSICIONADOR

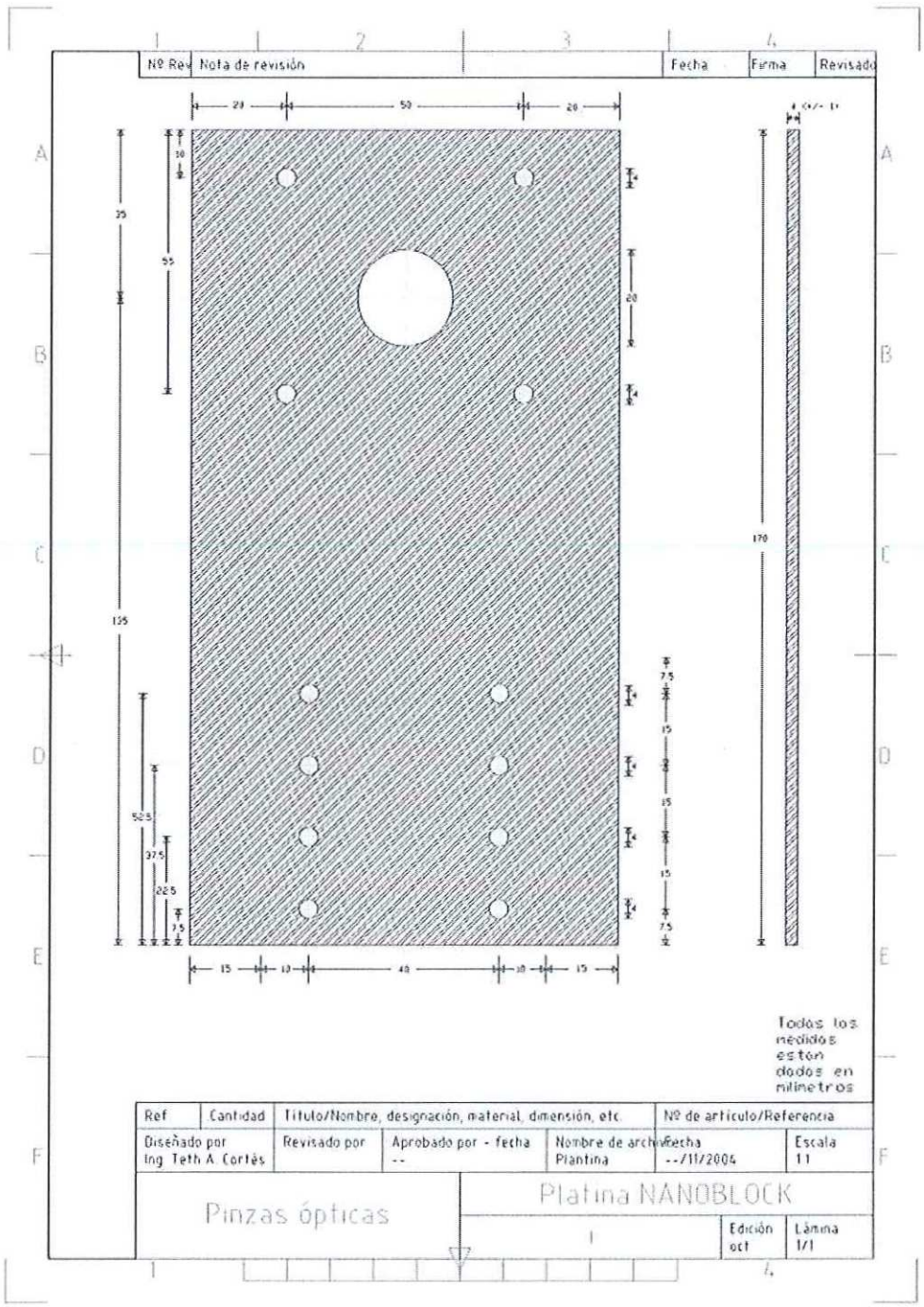


FIGURA 71 Diseño de la platina de aluminio ensamblada al nanoposicionador.

APÉNDICE D

DESCRIPCIÓN DE LOS VIDEOS ANEXOS A LA TESIS

2particulas.WMV *0:32 s*

En este video se documenta la manipulación simultánea de dos partículas dieléctricas.

2particulas1.WMV *0:38 s*

En este video se documenta la diferencia de la fuerza de asimiento según el haz de incidencia en la manipulación de dos partículas dieléctricas.

alga1.WMV *2:04 s*

En este video se documenta la manipulación de microalgas *Thalassiosira sp.*

alga2.WMV *3:57 s*

En este video se documenta la contracción de una microalga *Phaeodactylum tricornutum* de contorno romboide por efecto del asimiento óptico a una forma esférica.

alga3.WMV *1:32 s*

En este video se documenta la manipulación de microalgas *Rhodomonas sp.* y posterior afectación en su movilidad inherente.

celula1.WMV *4:01 s*

En este video se documenta la manipulación óptica de eritrocitos y la deformación de la membrana celular durante el desplazamiento inducido.

espora.WMV *2:20 s*

En este video se documenta el fenómeno de repulsión óptica en un residuo de agar.