



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
FÍSICO MATEMÁTICAS**
“Mat. Luís Manuel Rivera Gutiérrez”

“PINZAS ÓPTICAS”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

PRESENTA
JOSÉ BENITO RUIZ CARBAJAL

ASESORES
DRA. MARY CARMEN y MONSERRAT PEÑA GOMAR
DR. MAURICIO ORTIZ GUTIÉRREZ
Facultad de Ciencias Físico Matemáticas
“Mat. Luis Manuel Rivera Gutiérrez”
UMSNH

MORELIA, MICHOACÁN, septiembre de 2010

DEDICADA A

Dedico esta tesis en especial a mis papás, el señor JOSÉ BENITO RUIZ ESPINO y la señora ANSELMA CARBAJAL MARTÍNEZ, quienes me enseñaron todo lo bueno de lo que están hecho.

A mi papá por enseñarme buenos modales, por enseñarme a cultivar, cazar, trabajar, por todos sus consejos y sobre todo por darme un excelente ejemplo de vida por seguir.

A mi mamá por estar siempre conmigo, por aplaudir mis triunfos y por ayudarme a aprender de mis fracasos.

A todos mis hermanos ya que también me apoye en ellos para lograr finalizar la licenciatura en ciencias Físico Matemática.

A mi querida y amada esposa “Nancy Gabriela Avalos Pérez” por darme las fuerzas necesarias para permanecer en la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas. Sin su apoyo no hubiera sido posible finalizar esta carrera.

Gracias a todos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis papás: El señor JOSÉ BENITO RUIZ ESPINO Y La señora ANSELMA CARBAJAL MARTÍNEZ, por cada uno de los esfuerzos que hicieron para que yo lograra obtener la oportunidad de presentar esta tesis y obtener el grado de Licenciado en Ciencias Físico Matemático, así como también por haber confiado en mi y por todo el gran apoyo económico y emocional que siempre me brindaron.

Agradezco a mis hermanos: JUAN, ALICIA, MIGUEL ÁNGEL, BLANCA ESTELA, por todo el apoyo emocional que me brindaron y la paciencia que me tuvieron en el tiempo que duro mi carrera y en especial a mi hermana MARÍA GUADALUPE que siempre estuvo a mi lado durante este trayecto difícil pero muy satisfactorio de mi vida y por ser un factor importante para que yo decidiera estudiar esta carrera.

En general le doy las gracias a toda mi FAMILIA que siempre estuvieron cerca para apoyarme en todo.

Agradezco especialmente a la Doctora Maribel Ríos Cruz porque sin sus consejos no hubiera sido posible continuar en esta carrera. Y a los doctores Mary Carmen y Monserrat Peña Gomar y al Dr. Mauricio Ortiz Gutiérrez que me dieron la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis bajo sus asesorías ya que tuve la oportunidad de aprovechar al máximo todos los conocimientos que ellos tienen. En especial agradezco a la Dra. Blanca García Almendárez de la Universidad Autónoma de Querétaro por su asesoría y consejos en la técnica de crecimiento bacteriano.

En general agradezco a todos mis profesores: Dra. Takjana Bucakchinac, Dr. Humberto Cárdenas Trigos, Dr. Joaquín Estévez delgado, Dr. José Carlos Cortés Zavala, Dr. Cuauhtemoc Rivera Loaiza, Dr. Jorge Isidro Aranda Sánchez, Dr. Luis Valero Elizondo, M.C. Gabriel Arroyo Correa, Dr. Mariano Hernández Ramírez, etc...

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

“Mat. Luís Manuel Rivera Gutiérrez”

PINZAS ÓPTICAS

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS**

PRESENTA

JOSÉ BENITO RUIZ CARBAJAL

ASESORES

DRA. MARY CARMEN y MONSERRAT PEÑA GOMAR

DR. MAURICIO ORTIZ GUTIÉRREZ

MORELIA, MICHOACÁN, 22 de septiembre de 2010

RESUMEN

En esta tesis se implementa la técnica de pinzas ópticas para introducirse en los conceptos físicos que intervienen en el atrapamiento de una partícula por un haz enfocado, para ello se utilizará el arreglo experimental de un microscopio compuesto básico, es decir, solo se utiliza un objetivo de microscopio para ver las imágenes de las partículas y un ocular de microscopio para aumentar las imágenes, posteriormente se introduce un haz láser de $632.8nm$ de longitud de onda utilizando un divisor de haz y una cámara CCD para observar y monitorear las partículas mediante una computadora.

Para verificar el funcionamiento de la técnica de pinzas ópticas utilizamos partículas de látex de $936nm$ de diámetro aproximadamente, estas partículas se depositan sobre un portaobjeto el cual se coloca sobre la platina del microscopio para enfocar las partículas en el punto focal del microscopio compuesto. Una vez ya enfocada las partículas se realiza el atrapamiento y desplazamiento óptico.

Después de haber logrado el confinamiento de las partículas de látex se procedió a fijar las partículas sobre la superficie del portaobjeto. Esto se hizo con el propósito de ordenar las partículas en un lugar específico, para analizarlas ya sea individualmente o en grupo. Se utiliza el haz láser para confinar y desplazar a las partículas de látex y posteriormente se incrementa la potencia del láser para fijarlas y formar letras.

Debido a la gran importancia de esta técnica en el área de la medicina y biología, se utilizaron muestras vivas. Para ello fue necesario implementar la técnica de activación de las bacteria de *Lactococcus lactis* UQ2 (*L. lactis*) y la bacteria de *Lactobacillus casei* Shirota® (*L.casei* Shitota®) y finalmente se realizó el atrapamiento óptico como ejemplo ilustrativo.

ÍNDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1	Antecedentes	2
1.2	Objetivo general	5
1.3	Objetivos particulares	5
1.4	Estructura	5

CAPITULO 2. TEORÍA

2.1	Lentes simples	6
2.1.1	Formación de imágenes con lentes positivas	8
2.1.2	Formación de imágenes con lentes negativas	9
2.1.3	Poder de amplificación de una lente simple	9
2.2	La lupa	12
2.3	Objetivo de microscopio	12
2.4	Oculares de microscopios	15
2.5	El microscopio compuesto	17
2.6	Movimiento Browniano	19
2.7	Pinzas ópticas	20
2.8	Presión de radiación	24
2.9	Tipos de haces	26
2.9.1	Haces Gaussianos	27
2.9.2	Haces Hermitianos-Gaussianos	29
2.9.3	Haces Laguerre-Gaussiano	30
2.9.3.1	Haces Bessel	30

CAPITULO 3. MATERIALES

3.1	Partículas de látex	32
3.1.1	Preparación de las partículas de poliestireno	33
3.2	Bacteria de <i>Lactococcus lactis</i>	33
3.3	Bacteria de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	34
3.4	Preparación de muestras biológicas	35
3.4.1	Preparación de químicos y materiales de laboratorio	36
3.5	Activación de las bacterias	36
3.5.1	Recuperación de bacterias	37

CAPITULO 4. DISEÑO EXPERIMENTAL RESULTADOS

4.1	Diseño experimental	38
4.2	Desarrollo experimental	39
4.2.1	Atrapamiento de partículas de látex	40
4.2.2	Atrapamiento de la bacteria de <i>Lactobacillus casei</i>	42
4.2.3	Atrapamiento de la bacteria de <i>Lactococcus lactis</i>	44

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

46

BIBLIOGRAFÍA

48

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Las pinzas ópticas utilizan las fuerzas ejercidas por un haz de luz muy concentrado para atrapar y mover objetos con tamaños que van desde decenas de nanómetros a decenas de micrómetros. Desde su introducción en 1986, las pinzas ópticas se han convertido en una herramienta importante para la investigación en los campos de la biología, la química física y la física de la materia condensada suave. Los recientes avances prometen sacar las pinzas ópticas de los laboratorio para introducirlas a las etapas de fabricación y el diagnóstico, e incluso convertirse en productos de consumo. La próxima generación de las trampas de un solo haz óptico ofrece nuevas oportunidades para la investigación fundamental y aplicada [1].

En el área de la biología se estudia la velocidad de crecimiento tomando en cuenta el número de células por unidad de tiempo, el crecimiento microbiano se refiere al crecimiento poblacional analizando el comportamiento global de todo un sistema de colonias. Con la implementación de las pinzas ópticas, se podrá manipular a un solo organismo y ver independientemente del desarrollo en diferentes condiciones de vida y entender la química individual del fenómeno local.

En esta tesis se quiere implementar la técnica de pinzas ópticas para introducirse en los conceptos físicos que intervienen en el atrapamiento de una partícula por un haz enfocado. Para ello se implementará un microscopio compuesto y se estudiarán sus características, posteriormente se relazará el arreglo general de las pinzas ópticas y se mostrarán algunos ejemplos en la manipulación de partículas inertes y biológicas.

A continuación se dará una breve reseña histórica del desarrollo de las pinzas ópticas y sus deferentes aplicaciones, se menciona en detalle los objetivos de esta tesis y finalmente se dará una descripción general de cada capítulo que contempla este trabajo.

1.1 Antecedentes

Las fuerzas que intervienen en el confinamiento de una partícula micrométrica como la fuerza de esparcimiento y las fuerzas de gradiente, fueron reportadas por primera vez en 1970 por Arthur Ashkin [2]. Ashkin observó la aceleración de partículas esféricas de látex transparentes de 0.59, 1.31 y 2.68 micrómetros de diámetro suspendidas libremente en líquidos y gases por la fuerza de presión de radiación para un láser de luz visible. Más tarde, trabajando en los Laboratorios Bell, Ashkin y sus colegas reportaron la primera observación de lo que es ahora referido comúnmente como una trampa óptica o pinzas ópticas donde se utilizaron partículas de látex de $25nm$ hasta $10\mu m$ de tamaño suspendidas en agua.

A finales de 1980, Arthur Ashkin y sus colegas aplicaron la técnica al área de las ciencias biológicas, atrapando un virus de mosaico del tabaco individual y la bacteria *Escherichia coli* [3]. A través de la década de los 90's y después, investigadores como Carlos Bustamante, James Spudich, y Steven Block fueron los pioneros en el uso de la trampa óptica para caracterizar los motores biológicos a escala molecular. Estos motores moleculares son ubicuos en biología, y son los responsables de la locomoción y la acción mecánica dentro de la célula. Las trampas ópticas permitieron a estos biofísicos observar las fuerzas y la dinámica de los motores a un nivel de nano escala o de molécula única; la trampa óptica de espectroscopía de fuerza ha permitido desde entonces llegar a un mayor entendimiento de la naturaleza estocástica de estas fuerzas generadoras en la molécula.

En 1986, Steven Chu, logro utilizar las pinzas ópticas en su trabajo sobre enfriamiento y atrapamiento de átomos. Esta investigación le valió a Chu el Premio Nobel en Física de 1997 [4]. En una entrevista [5], Steven Chu describió como Ashkin había visualizado por primera vez el uso de las pinzas ópticas como un método para atrapar átomos. Ashkin fue

capaz de atrapar partículas mas grandes (de 10 a 10,000 nanómetros de diámetro) pero Chu extendió estas técnicas para el atrapamiento de átomos (0.1 nanómetros de diámetro).

A principios del siglo XXI, dentro del área de la biología y la medicina se logró usar las pinzas ópticas para probar las propiedades viscoelásticas de biopolímeros (como el ADN), las membranas celulares, las fibras de la proteína agregadas, el gel de las fibras en el citoesqueleto, y las estructuras compuestas (como los chromatin y cromosomas). Se ha encontrado que las células no sólo usan las fuerzas mecánicas si no también la movilidad, la motilidad, la clasificación de los cromosomas durante la reproducción, la regulación de la transcripción del gen, la interdisciplinariedad y la señalización intercelular y la respiración [1,6,7,8].

En el campo de la cirugía intracelular, las pinzas ópticas prometen modificar los cromosomas de las células vivas [1,9]. En una escala más grande, las pinzas ópticas son útiles para seleccionar los microbios individuales de las poblaciones heterogéneas. Además, su habilidad de transportar y modificar las células precisamente ha llevado a las aplicaciones clínicas en tales áreas como la fertilización artificial [1,10].

En 2003 la técnica de pinzas ópticas es aplicada en el campo de la clasificación celular o células ordenadas, creando una gran intensidad en el área de óptica debido a que la célula puede ser clasificada por sus características ópticas intrínsecas [11,12].

En el 2004 se logró un nuevo diseño de pinzas ópticas llamado DLBT (Diode Láser Bar Trapping) lo que logró un sistema mucho más pequeño, compacto y de bajo costo comparado con los ya existentes. Este sistema fue liderado por Applegate et al [13].

En el 2006 se propuso modificar la técnica de pinzas ópticas utilizando las llamadas pinzas holográficas [16]. Que en lugar de un solo punto de confinamiento, se crearían varios puntos muy próximos el uno al otro. Para ello se planteó la necesidad de un modulador de fase espacial (SPM) capaz de transmitir la luz formando varios anillos (estos anillos formarían múltiples trampas distribuidas según sea conveniente) [1,16]. Esta técnica permite atrapar una célula en varios puntos, evitando así que se reoriente y solucionando también,

hasta cierto punto, el problema de capturar partes localizadas de la célula, ya que puede colocar los puntos de modo que se atrape únicamente la membrana de la célula.

En enero del 2007 se propuso una modificación de las pinzas ópticas usando trampas de fibra óptica. Estas trampas utilizan el mismo fundamento que las pinzas ópticas, pero la diferencia es que no aprovechan la focalización del haz, si no más bien utilizan dos haces divergentes que surgen en sentido opuesto de dos fibras puestas una delante de otra. Se utilizan dos fibras empujando en sentido opuesto para que se compense la fuerza de esparramiento, así la partícula queda confinada en el punto donde la fuerza ejercida por los dos haces quede compensada de una fibra con la otra, pero aun tendríamos el problema de que la partícula gire en torno al eje de propagación de los haces, pero no girará en ningún otro eje [16].

En 2008 fue utilizada la técnica de pinzas ópticas para capturar y manipular un gameto masculino humano. En el caso de manipulación de material orgánico fue necesaria la utilización de un láser que emitiera en el infrarrojo, es decir, con una longitud de onda de $1064nm$, debido a que esta longitud de onda resulta ser inocuo para este tipo de muestra. La célula utilizada se encontraba suspendida en agua destilada y fue atrapada con una potencia de $25mW$. El gameto fue atrapado y arrastrado por efecto de presión de radiación del haz contra el fondo de la muestra. Esta aplicación podría utilizarse en procesos de inseminación artificial debido a que el método es no invasivo [1,14].

En la ciencia física, La capacidad única que tienen las pinzas ópticas para organizar la materia de una forma no invasiva ha dado una gran actividad en el campo de la mecánica estadística, como ejemplo de ello son las primeras mediciones directas de las interacciones macromoleculares en solución llevando al descubrimiento de atracciones anómalas entre partículas coloidales de igual carga o las interacciones coloidales oscilatorias mediadas por la entropía de las entidades más pequeñas de la solución [1,15].

Una problemática que se ha encontrado para el confinamiento es que aunque las pinzas ópticas son capaces de atrapar una partícula en suspensión en un punto, no es del todo verdad

que dicha partícula deje de moverse por completo. Para empezar, la partícula sigue teniendo un movimiento Browniano, inherente a toda partícula sumergida en un fluido, que hace que la partícula se mueva de su punto de equilibrio sin alejarse del mismo debido a las fuerzas recuperadoras. Un ejemplo de esto es en el caso de las células, estas no presentan simetría esférica, es decir, no son homogéneas debido a que en su interior contienen orgánulos y un núcleo. En el caso de células grandes, puede ocurrir que una pinza atrape el núcleo o la membrana, lo que ocasionaría que la célula se reoriente a mitad de un análisis, esto ocasionaría que se estuviera obteniendo resultados incoherentes [16].

1.2 Objetivo general

Implementar la técnica de pinzas ópticas para atrapar partículas micrométricas de látex y bacterias lácticas.

1.3 Objetivos particulares

- Comprender el funcionamiento de un microscopio compuesto óptico.
- Implementar un microscopio compuesto óptico.
- Comprender el concepto de presión de radiación y pinzas ópticas.
- Realizar un arreglo experimental de pinzas ópticas.
- Utilizar el arreglo de pinzas ópticas para atrapar partículas de látex y bacterias lácticas.

1.4 Estructura

Esta tesis esta compuesta de cinco capítulos:

- En el primer capítulo se da una breve introducción, antecedentes, los objetivo generales y los objetivos principales sobre pinzas ópticas.
- El segundo capítulo redactamos la teoría necesaria para entender y comprender el funcionamiento de pinzas ópticas.
- El tercer capítulo describe los materiales que utilizaremos como son las partículas de látex y el crecimiento de las bacterias de *L. lactis* y *L. casei Shirota®*.
- El cuarto capítulo contiene los resultados obtenidos durante la implementación de la técnica de pinzas ópticas.
- En el quinto capítulo se dan las conclusiones obtenidas.

CAPITULO 2

TEORÍA

Las pinzas ópticas son dispositivos que mediante un haz láser perfectamente enfocado dentro de un microscopio permite atrapar y mover objetos que van desde centenas de nanómetros a unas centenas de micrómetros sin tocar físicamente dichos objetos, de esta manera, se pueden hacer pruebas no destructivas del comportamiento de partículas o bacterias individuales. Para entender cómo funciona las Pinzas ópticas, se dará en este capítulo una breve descripción de los principales fenómenos que intervienen en el confinamiento de una partícula, así como la descripción de los sistemas ópticos necesarios en la implementación de la Pinzas ópticas.

2.1 Lentes simples

Una lente es una placa de vidrio cuyas caras son por lo general esféricas y casi paralelas en el centro. Se dice que una lente es un dispositivo refractor, que al colocarla en un medio (generalmente aire) provoca una discontinuidad en este medio y reconfigura la distribución de la energía emitida proveniente de una fuente puntual de luz.

Las lentes pueden clasificarse en *lentes delgadas* y *lentes gruesas*, ya sea que su espesor sea despreciable (en el caso de una lente delgada) o no sea despreciable (en el caso de una lente gruesa).

El eje óptico es una línea imaginaria que pasa a través de una lente por su centro, de forma general, el eje óptico es el eje de simetría de cualquier lente. Una característica importante de las lentes es un punto llamado *foco* que se localiza sobre el eje óptico. La distancia focal de una lente delgada es la separación que hay entre el centro de la lente y el foco.

La potencia P de una lente se define como el recíproco de la distancia focal f :

$$P = \frac{1}{f}, \quad (2.1)$$

donde f está dado en metros y P en m^{-1} o bien en dioptrías.

Existen principalmente dos tipos de lentes:

- Lentes convergentes (o lentes positivas). En estas lentes, los rayos que provienen de una fuente puntual ubicada en el infinito viajan paralelos al eje óptico de la lente y al incidir sobre ella, convergen al otro lado en el foco de la lente, como se muestra en la figura 2.1.

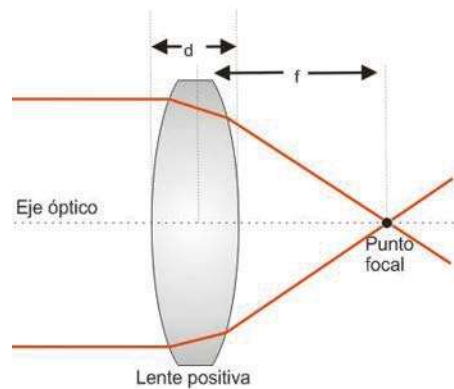


Figura 2.1. Una lente positiva converge la luz que la atraviesa en un punto f situado a la distancia focal de la lente, llamada punto focal.

- Lentes divergentes (o lentes negativas). Los rayos paralelos al eje óptico que inciden sobre una lente divergente, divergen al otro lado de ellas como si estos rayos procedieran de un punto f conocido como punto focal, como se muestra en la figura 2.2.

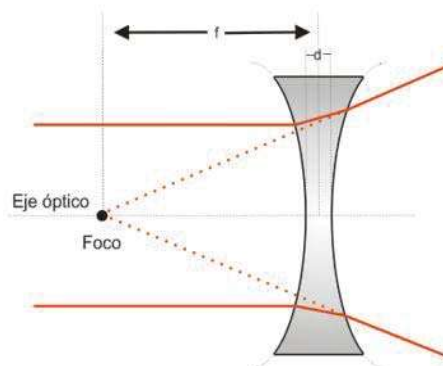


Figura 2.2. Una lente negativa, diverge la luz que pasa por ella. Este análisis se muestra por trazos de rayos.

Se pueden tener lentes con una combinación de superficies tal como se muestra en la figura 2.3. Sin embargo mantienen las mismas características ya mencionadas.

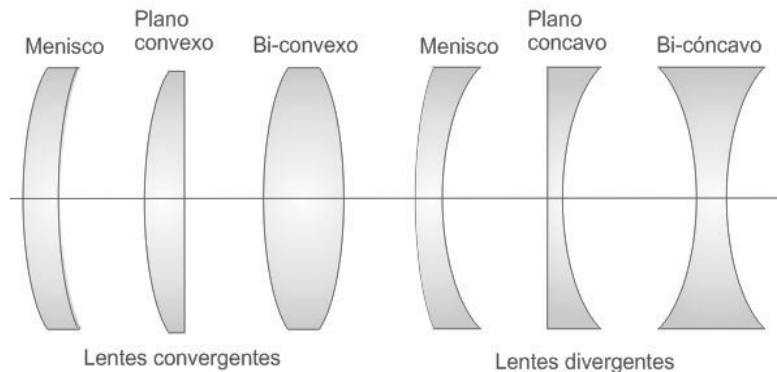


Figura 2.3. Algunos tipos de lentes delgadas.

Las lentes son utilizadas principalmente para formar imágenes de objetos, esto se puede hacer mediante los siguientes procedimientos.

2.1.1. Formación de imágenes con lentes positivas.

Si colocamos un objeto a una distancia x mayor a la distancia focal f de la lente convergente y lo iluminamos con luz (proveniente de alguna fuente), podemos notar claramente que del otro lado de la lente se formará una imagen real invertida, como se muestra en la figura 2.4. Si el objeto se coloca a una distancia $x < f$ se formará una imagen virtual^[17,18] del mismo lado que se encuentra el objeto. Esta imagen virtual no puede formarse o visualizarse sobre una pantalla como se haría con una imagen real.

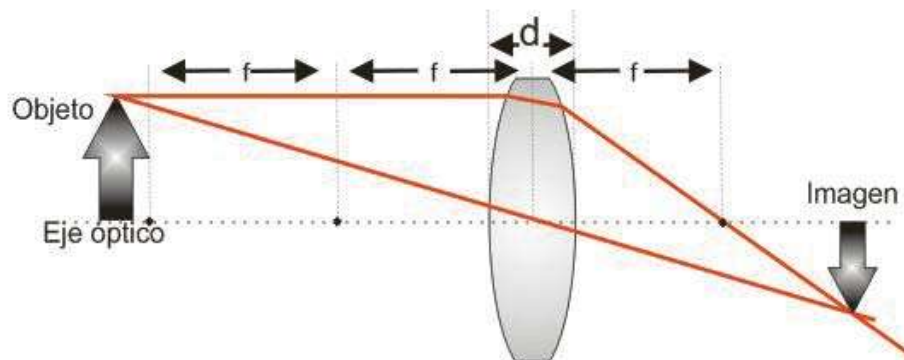


Figura 2.4. Análisis con trazos de rayos de un objeto que se coloca de un lado de una lente positiva y al incidirle luz al objeto forma del otro lado de la lente una imagen real invertida.

2.1.2. Formación de imágenes con lentes negativas.

Si colocamos un objeto en una posición $x > f$ de la lente divergente y lo iluminamos con luz de alguna fuente formaremos una imagen virtual, como se aprecia en la figura 2.5. Se puede observar que la imagen que se forma es virtual (está del mismo lado que el objeto), es de menor tamaño y está en el mismo sentido que el objeto, es decir, esta imagen no se invierte como en el caso de las lentes positivas.

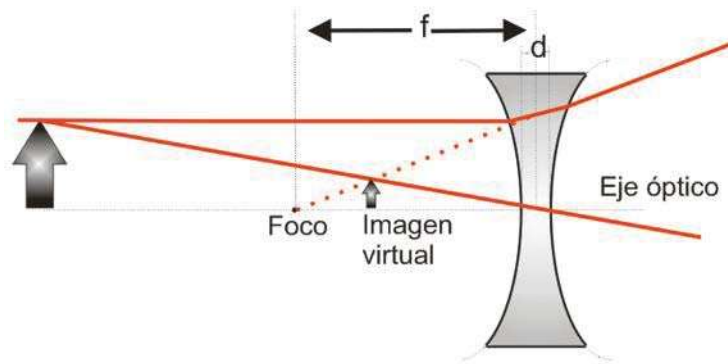


Figura 2.5. Análisis con trazos de rayos de un objeto que se coloca de un lado de una lente negativa que es iluminado con luz procedente de una fuente puntual y forma una imagen virtual del mismo lado donde se colocó el objeto.

2.1.3. Poder de amplificación de una lente simple.

Como puede verse de las figura 2.4 y 2.5, el tamaño de la imagen es diferente para cada caso, esto es así porque cada lente tiene un poder de amplificación distinto que depende de la distancia focal y las posiciones del objeto y su imagen respecto de la lente. Para determinar el poder de amplificación de una lente primero se debe conocer la posición en donde se forma la imagen de un objeto. Para ello usamos el diagrama de una lente positiva con un análisis completo de trazos de rayos como el que se muestra en la figura 2.6.

Usando el convenio de signos que rigen a las lentes, tenemos que las distancias transversales por encima del eje óptico (y_o) se toman como cantidades positivas y las distancias transversales que están por debajo del eje óptico (y_i) se toman como cantidades negativa. De la figura 2.6 se puede ver que $y_o > 0$ e $y_i < 0$, esto quiere decir que las imágenes están invertidas. Obsérvese que los triángulos AOF_i y $P_2P_1F_i$ son similares, por lo tanto

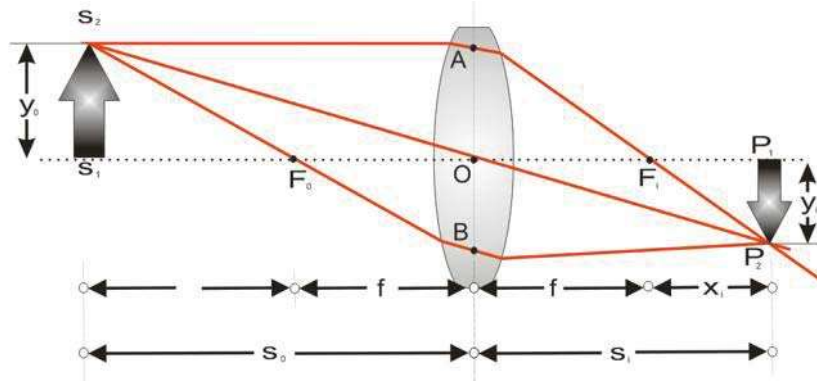


Figura 2.6. Análisis más completo de una lente utilizando trazos de rayos.

$$\frac{y_0}{|y_i|} = \frac{f}{(s_i - f)}, \quad (2.2)$$

donde S_0 y S_i son las distancias al objeto y f es la distancia focal. De igual manera, tenemos que los triángulos S_2S_1O y P_2P_1O son similares, por lo tanto

$$\frac{y_0}{|y_i|} = \frac{s_0}{s_i}, \quad (2.3)$$

sustituyendo la ecuación (2.2) en la ecuación (2.3) tenemos

$$\frac{s_0}{s_i} = \frac{f}{(s_i - f)}, \quad (2.4)$$

o bien

$$s_0(s_i - f) = fs_i \Rightarrow s_0s_i = fs_i + s_0f \therefore s_0s_i = f(s_i + s_0), \quad (2.5)$$

finalmente obtenemos la ecuación que rige el comportamiento de las lentes positivas y negativas, conocida como la ecuación de Gauss o del constructor de lentes

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s_0} + \frac{1}{s_i}. \quad (2.6)$$

De igual manera tenemos que los triángulos $S_2S_1F_0$ y BOF_0 son iguales, lo que quiere decir que

$$\frac{f}{s_0 - f} = \frac{|y_i|}{y_0}, \quad (2.7)$$

sustituyendo la ecuación (2.2) en la ecuación (2.7) tenemos que

$$\frac{f}{(s_0 - f)} = \frac{(s_i - f)}{f} \Rightarrow f^2 = (s_i - f)(s_0 - f) \therefore s_0 s_i = f(s_0 + s_i), \quad (2.8)$$

pero de la figura 2.6 tenemos que $s_0 = x_0 + f$ y $s_i = f + x_i$, por lo tanto, la ecuación (2.8) se puede escribir como

$$(x_0 + f)(f + x_i) = f(x_0 + f + f + x_i), \quad (2.9)$$

o bien

$$x_0 x_i = f^2. \quad (2.10)$$

Además la relación de las dimensiones transversales de la imagen final formada por cualquier sistema óptico con la dimensión correspondiente del objeto se define como el aumento lateral o transversal M_T ; es decir

$$M_T = \frac{y_i}{y_0}, \quad (2.11)$$

o bien, de la ecuación (2.6) y (2.7) tenemos

$$M_T = -\frac{s_i}{s_0}, \quad (2.12)$$

sustituyendo los valores $s_0 = x_0 + f$ y $s_i = f + x_i$ tenemos que

$$M_T = -\frac{f + x_i}{x_0 + f}, \quad (2.13)$$

otra manera de escribir la ecuación (2.13) es la siguiente

$$M_T = -\frac{f + x_i}{x_0 + f} \frac{x_0}{x_0} = -\frac{(fx_0 + x_0 x_i)}{x_0(x_0 + f)}, \quad (2.14)$$

utilizando la ecuación (2.10) tenemos que

$$M_T = -\frac{(fx_0 + f^2)}{x_0(x_0 + f)} = -\frac{f(x_0 + f)}{x_0(x_0 + f)} = -\frac{f}{x_0}, \quad (2.15)$$

o bien, la ecuación (2.13) le aplicamos algebra y obtenemos

$$M_T = -\frac{f + x_i}{x_0 + f} \frac{x_i}{x_i} = -\frac{x_i(f + x_i)}{x_i(x_0 + f)} = -\frac{x_i(f + x_i)}{(x_i x_0 + x_i f)}, \quad (2.16)$$

de igual manera, se utilizan $s_0 = x_0 + f$ y $s_i = f + x_i$, para obtener que

$$M_T = -\frac{x_i(f + x_i)}{f(f + x_i)} = -\frac{x_i}{f}, \quad (2.17)$$

lo que quiere decir que el poder de amplificación esta dado por

$$M_T = -\frac{x_i}{f} = -\frac{f}{x_0}. \quad (2.18)$$

2.2 La lupa

Una lupa es una lente positiva que amplifica la imagen de pequeños objetos cercanos, ubicados dentro de la distancia focal de la lente. El diámetro angular aparente de un objeto es el factor que determina el diámetro de la imagen sobre la retina del ojo, el cual será tanto mayor cuanto más cerca este el objeto de la lupa.

Sin embargo, existe un límite más allá del cual no se puede reducir la distancia entre el objeto y el ojo, debido a que el ojo no puede enfocar objetos muy cercanos. Esta distancia mínima es variable según el individuo, siendo su edad un factor muy importante, pero, a fin de tener una referencia constante, se ha escogido una distancia promedio de $25.4cm$, llamada distancia mínima de visión distinta.

2.3 Objetivo de microscopio

El objetivo de microscopio es un sistema de lentes que forma una imagen real, invertida y generalmente aumentada de un objeto cercano.

La amplificación del objetivo de un microscopio es directamente proporcional a la distancia que existe entre el objetivo y la imagen (L') e inversamente proporcional a su distancia focal efectiva F . La longitud del tubo de un microscopio (l) está limitada por lo general a $160mm$, así que la amplificación aumentará sólo al disminuir F .

En particular, existen dos tipos de objetivos de microscopios; los de observación en seco y los de inmersión. En el primer caso, el aumento varía de $4x$ a $45x$ y se logra con el índice de refracción del aire (de ahí el nombre "en seco", por el aire) para que la imagen se forme nítidamente, pero en el segundo caso, al incrementar el aumento (las lentes de

inmersión tienen aumentos de 90x o 100x) es necesario aumentar el índice de refracción entre la muestra y la lente para lograr la imagen, para esto se utilizan aceites de cedro o sintético y la lente se "sumerge" en ellos de ahí el nombre de "inmersión".

En general, existen cuatro tipos básicos de objetivos según su poder amplificador. Para bajas ampliaciones el diseño es un doblete simple o un par de dobletes formando el sistema de Lister, como se muestra en la figura 2.7(a) y (b).

Para ampliaciones intermedias se añade al frente del doblete una lente plano-convexa gruesa a fin de disminuir la distancia focal del objetivo. En esta forma se obtiene el diseño de Amici mostrado en la figura 2.7(c).

Para altas ampliaciones es necesario disminuir aún más la distancia focal del objetivo sin introducir aberraciones. Esto se logra añadiendo al frente del objetivo un sistema de dos lentes al que se acostumbra llamar *duplex frontal*, obteniendo así el llamado objetivo sumergible o de inmersión, mostrado en la figura 2.7(d).

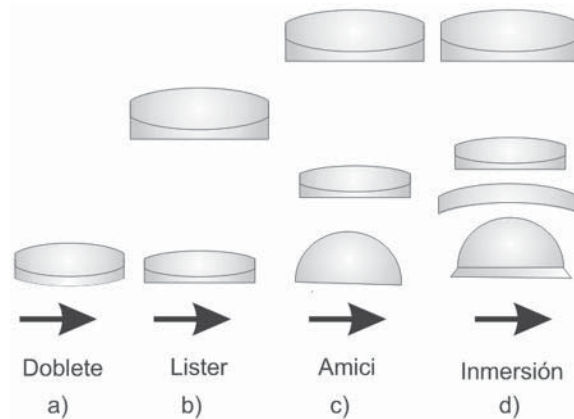


Figura 2.7. Algunos diseños de objetivos de microscopio

Una característica importante en los objetivos de microscopio es la apertura numérica NA que se define de la siguiente forma:

$$NA = N \sin \theta, \quad (2.19)$$

donde N es el índice de refracción del medio que rodea al objeto, (por lo general aire) y θ el semidiámetro angular del objetivo, visto desde el objeto. Esta cantidad es sumamente importante porque permite evaluar el poder resolutor del objetivo [17].

Es común en óptica usar los objetivos de microscopio para expandir un haz de luz de un láser. Para ello se coloca el objetivo de microscopio en una montura de precisión y se hace pasar a través de éste un haz de luz como se muestra en la figura 2.8(a). El patrón de luz que se forma en una pantalla está dado por la función de Airy [19] y se muestra en la figura 2.8(b). Este patrón de luz se produce debido a la difracción de la luz provocada por la apertura circular [20] del objetivo de microscopio. Es importante para los fines de este trabajo conocer el diámetro central d del punto brillante que se conoce como orden cero de difracción (ver figura 2.8(b))

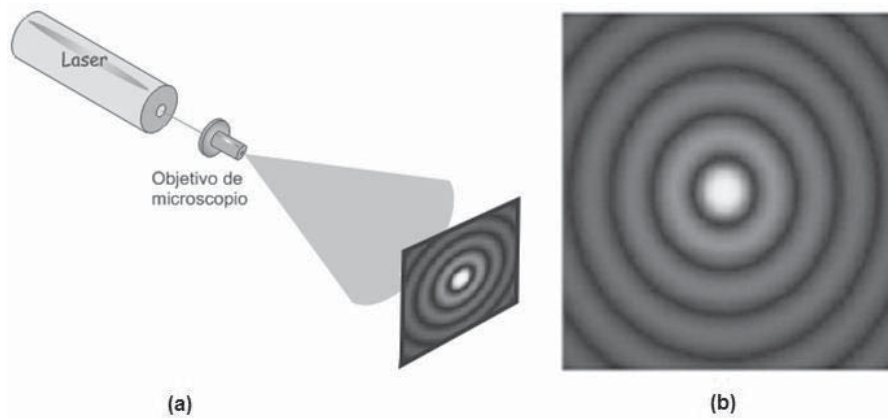


Figura 2.8. En el inciso (a) se muestra la manera de expandir un haz láser y en el inciso (b) se muestra el patrón que se obtiene al expandir un haz láser.

El diámetro d se puede calcular utilizando la ecuación siguiente [21]

$$d = 2.44\lambda f / \#, \quad (2.20)$$

donde $f / \#$ (o *número f*) está relacionado con la apertura numérica del objetivo de microscopio dada por la ecuación (2.21) y λ es la longitud de onda de la luz.

$$f / \# = \frac{1}{2NA}. \quad (2.21)$$

Relacionando las ecuaciones (2.20) y (2.21) se obtiene el diámetro del punto brillante dado por:

$$d = 1.22 \frac{\lambda}{NA}. \quad (2.22)$$

Si se emplea un láser de He-Ne cuya longitud de onda para el color rojo es de 632.8nm de longitud de onda, se puede calcular el tamaño del disco central si se conoce la apertura numérica (NA) del objetivo de microscopio. En la Tabla 2.1 se presentan las características de varios objetivos de microscopios comerciales y se presenta también el tamaño del orden cero de difracción.

Tabla 2.1. Características principales de los objetivos de microscopio con acromatismo normal.

Amplificación	Distancia focal en mm	N.A.	Diámetro d
1x	73.5	0.05	15440.32 nm
2.5x	43.1	0.07	11028.8 nm
3x	40	0.08	9650.2 nm
4x	30.8	0.12	6433.467 nm
5x	27	0.12	6433.467 nm
6.3x	22.5	0.20	3860.08 nm
10x	16	0.25	3088.064 nm
16x	10.8	0.32	2412.55 nm
20x	8	0.50	1544.032 nm
25x	7.2	0.50	1544.032 nm
40x	4.6	0.65	1187.717 nm
43x	4	0.65	1187.717 nm
63x	3.1	0.85	908.2541 nm
100x	1.8	1.25	617.6128 nm

2.4 Oculares de microscopios

Se llama ocular al sistema por donde el observador ve la imagen que forma el objetivo de microscopio y está formado por una lente positiva y la lente de campo. La lente de campo es una lente convergente cuya posición ideal esta sobre el plano de la imagen real que se desea observar, sin embargo, en la práctica no es así, debido a que cualquier burbuja o polvo sobre la lente de campo se observaría de forma muy clara sobre la imagen. Debido a esto es preferible desplazar la lente de campo un poco hacia un lado u otro de la imagen. De esta manera se obtienen los diseños de oculares más sencillos que se verán en seguida.

El ocular de Huygens es sin duda el más popular, se emplea casi siempre en los microscopios y algunas veces en telescopios. La imagen real se forma sobre un diafragma colocado entre las dos lentes, como se muestra en la figura 2.9(a). La coma, el astigmatismo y la curvatura de campo se minimizan dentro de lo posible escogiendo la relación de las distancias focales de las dos lentes, la cual está dada de forma aproximada por

$$\frac{f_1}{f_2} = 2. \quad (2.23)$$

Es muy importante que la aberración cromática lateral se corrija en los oculares, lo cual se puede lograr si el promedio de las distancias focales es igual a la separación que hay entre las lentes. Por desgracia esto provocaría la presencia de otras aberraciones igualmente importantes, pero un balance aceptable se obtiene si las lentes se separan una distancia igual a la distancia focal f_1 de la lente de campo. Es interesante darse cuenta que entonces la distancia focal efectiva de la combinación es igual a la separación entre las lentes.

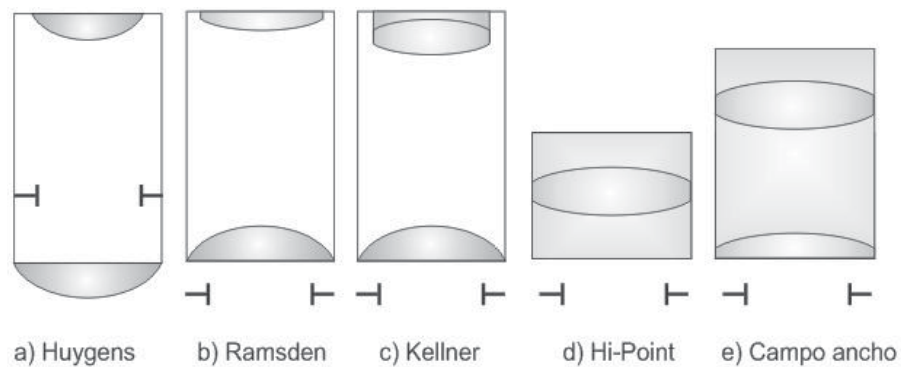


Figura 2.9. Algunos diseños de oculares de microscopio

A diferencia del ocular de Huygens, el ocular de Ramsden, que se muestra en la figura 2.9(b), examina una imagen real situada fuera del sistema. Debido a esto es con frecuencia utilizado en telescopios, sobre todo cuando se desea usar un micrómetro en el plano de la imagen a fin de hacer mediciones. Este ocular está formado por dos lentes plano convexas idénticas, con su cara plana hacia afuera del sistema. Están separadas por una distancia ligeramente inferior a la distancia focal de las componentes, lo que le da una mejor corrección de la aberración cromática lateral que la del ocular de Huygens, pero a cambio de ello surgen otras aberraciones aun mayores.

Tanto el ocular Huygens como el de Ramsden tienen aberraciones residuales importantes, pero esto se puede mejorar si en el ocular de Ramsden se emplea un doblete en lugar de una de las lentes simples. Así se obtiene el llamado *ocular de Kellner* que se muestra en la figura 2.9(c).

Otros oculares comunes en microscopios son el *Hi-Point*, que se caracteriza por tener la pupila de salida a una distancia grande del ocular, y el de *campo ancho*, que tiene el campo corregido más amplio de todos.

2.5 El microscopio compuesto

El microscopio compuesto representa un paso más allá de la lupa simple proporcionando un mayor aumento angular (mayor de $30\times$ aproximadamente) de objetos *cercanos*. Su invención, que pudo haber ocurrido hace mucho tiempo (en 1590), se atribuye generalmente a un fabricante de anteojos holandés Zacharias Janssen de Middleburg. Galileo tiene el segundo lugar por haber anunciado la investigación de un microscopio compuesto en 1610. En la figura 2.10 se ilustra una versión simple, de un microscopio de laboratorio.

El funcionamiento de un microscopio es muy sencillo; el objetivo forma una imagen real de un objeto cercano y el ocular que funciona como una lupa, aumenta la imagen obtenida por el objetivo de microscopio. Entonces la potencia de aumento del sistema completo es el producto del aumento del objetivo, M_{To} y el aumento del ocular M_{Ae} , es decir

$$MP = M_{To} M_{Ae}, \quad (2.24)$$

donde $M_{To} = -L / f_0$ y $M_{Ae} = -d' / f_e$.

En la figura 2.10 se muestra la distancia L conocida como longitud del tubo y se ha estandarizado con un valor $L=160\text{ mm}$. Además, otra constante importante es la distancia mínima de visión del ojo humano d' que se considera como 10 pulgadas o 254 mm ^[17]. Considerando estos valores en la ecuación (2.24), se tiene el poder de amplificación del microscopio tal como se muestra en la ecuación (2.25).

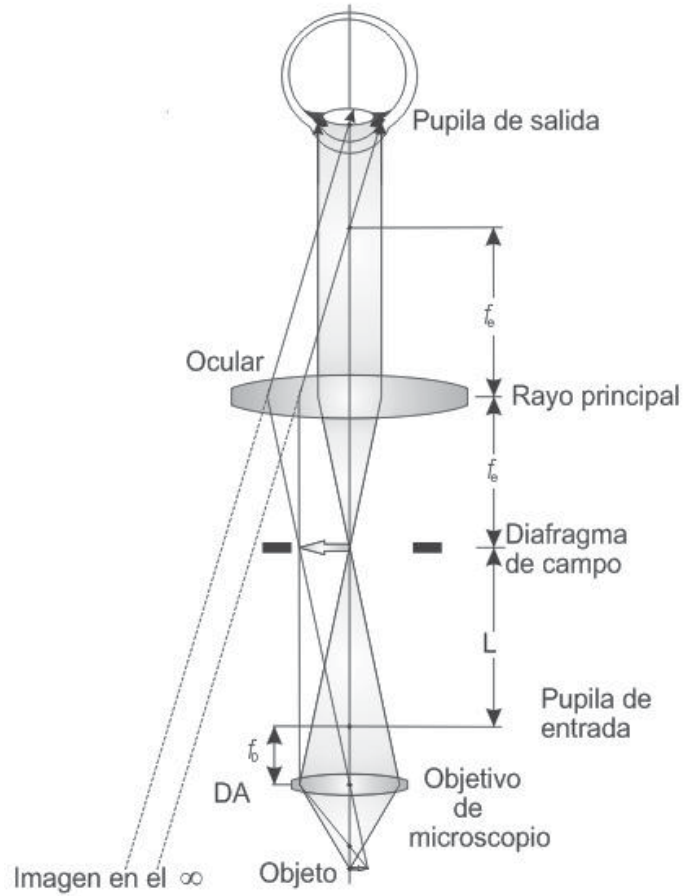


Figura 2.10. Primeros diseños de un microscopio compuesto.

$$MP = \left(-\frac{160}{f_o} \right) \left(\frac{254}{f_e} \right). \quad (2.25)$$

Es fácil notar que $MP < 0$ indicando que la imagen que se forma está invertida respecto de la orientación del objeto. Por ejemplo, un objetivo de microscopio con una distancia focal f_o de $32mm$ llevará la marca $5\times$ para indicar una potencia de 5, combinado con un ocular $10\times$ ($f_e = 254mm$) formarán un microscopio con MP igual a $50\times$.

Una propiedad importante de los objetivos es que normalmente invierten la imagen en todo sentido (de derecha a izquierda y de arriba abajo) y como el ocular no puede reinvertirla, nosotros la observamos completamente al revés. Esto no es un problema porque en células no tiene sentido definir que es arriba-abajo o izquierda-derecha. Pero conviene

tenerlo en cuenta porque cuando movemos la muestra, la imagen se desplaza ante nuestros ojos en sentido contrario a lo que esperaríamos.

El objeto más pequeño que podemos ver con un microscopio compuesto tiene un tamaño aproximado de $500nm$. Esto equivale a 200 veces más pequeñas que el ancho de un cabello. Las bacterias tienen un tamaño de aproximadamente $1000nm$. La razón por la cual no podemos ver cosas más pequeñas es porque estos microscopios usan luz visible que se encuentra en el rango de $500-800nm$. Para ver cosas más pequeñas se requiere un microscopio con una fuente de iluminación distinta a la luz visible, por ejemplo, los microscopios electrónicos que usan un flujo de electrones o los microscopios de fuerza atómica.

Cuando se observa a través del microscopio algunas partículas inmersas en un líquido se observa un movimiento aleatorio de ellas. Esto se explica en la siguiente sección.

2.6 Movimiento Browniano

El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio que se observa en algunas partículas microscópicas que se hallan en un medio fluido (por ejemplo polen en una gota de agua). Recibe su nombre en honor al escocés Robert Brown biólogo y botánico quien observó este fenómeno en 1827. Él observó que pequeñas partículas de polen se desplazaban en movimientos aleatorios sin razón aparente. En 1785, el mismo fenómeno había sido descrito por Jan Ingenhousz sobre partículas de carbón en alcohol.



Figura 2.11. *Movimiento Browniano.*

El movimiento aleatorio de estas partículas se debe a que su superficie es bombardeada incesantemente por las moléculas (átomos) del fluido sometido a una agitación térmica. Sustentando así la teoría de Einstein sobre la existencia de los átomos.

Este bombardeo a escala atómica no es siempre completamente uniforme y sufre variaciones estadísticas importantes. Así la presión ejercida sobre los lados de la partícula puede variar ligeramente con el tiempo provocando el movimiento observado, ver figura 2.11.

La descripción matemática del fenómeno fue elaborada por Albert Einstein y constituye el primero de sus artículos del "*Annus Mirabilis*" (año maravilloso en latín) de 1905. La teoría de Einstein demostraba la teoría atómica, todavía en disputa a principios del siglo XX, e iniciaba el campo de la física estadística.

Este movimiento Browniano es aleatorio y siempre está presente cuando se observan partículas o bacterias a través del microscopio. Sin embargo, existe una técnica que permite reducir este movimiento para facilitar el análisis del espécimen; esto se puede hacer con el uso de un microscopio modificado al que se le introducen dispositivos ópticos que permitan el uso de un láser. Esta técnica ha sido reportada por Ashkin [2] y se le ha dado el nombre de pinzas ópticas.

2.7 Pinzas ópticas

Dentro del marco de la mecánica cuántica, y gracias al trabajo de Einstein y Planck, se pudo demostrar que la luz también se comporta como un flujo de corpúsculo llamados fotones, que al igual que las partículas materiales, ejercen presión sobre los objetos, e incluso, transferir momento (Hecht, 2000). Sin embargo, debido a que el orden de estas fuerzas es de algunos piconewtons hubo que esperar hasta 1986 para que el científico estadounidense A. Ashkin de los laboratorios Bell describiera experimentalmente el uso de un haz láser para atrapar y manipular micro partículas dieléctricas [22]. Este fue el primer trabajo publicado relacionado con las pinzas ópticas.

Las pinzas ópticas son dispositivos que mediante un haz láser perfectamente enfocado dentro de un microscopio permite atrapar y mover objetos que van desde centenas de nanómetros a unas centenas de micrómetros sin tocar físicamente dichos objetos, de esta manera, se pueden hacer pruebas no destructivas del comportamiento de partículas o bacterias individuales. Este confinamiento es posible ejerciendo fuerzas sobre las partículas debido a la presión que la luz ejerce sobre ellas. Esta presión se le ha dado el nombre de presión de radiación y las fuerzas que se generan van desde centenas de piconewton a unos nanonewton.

El arreglo experimental para pinzas ópticas es básicamente un haz láser que incide en un microscopio compuesto el cual tiene la finalidad de enfocar fuertemente el haz láser en el punto focal y llevar a cabo el atrapamiento óptico, tal como se muestra en la figura 2.12.

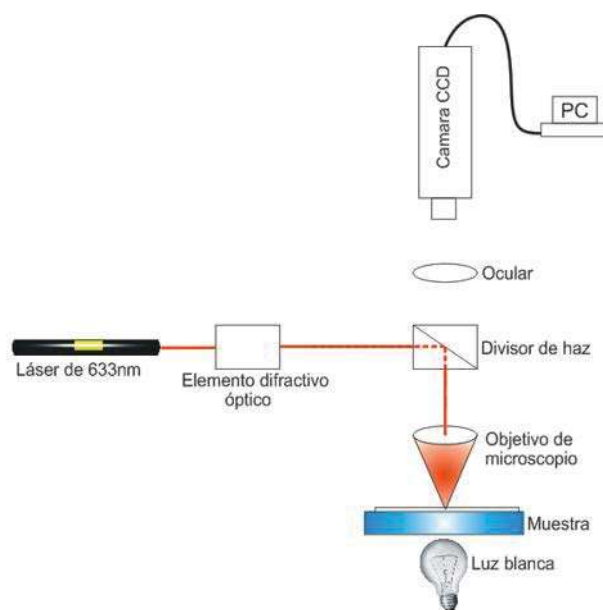


Figura 2.12. Diseño experimental para las pinzas ópticas.

La imagen a la salida del microscopio se recupera utilizando una cámara CCD, la cual está conectada directamente a una computadora que tiene la función de guardar los datos adquiridos.

Como puede verse en la figura 2.12, el haz del láser se introduce al microscopio por medio de un divisor de haz colocado entre el ocular y el objetivo de microscopio. Las

partículas o bacterias a analizar se colocan sobre la platina del microscopio. El elemento difractivo de la figura 2.12 tiene la función de modificar la fase del haz del láser para que permita generar diferentes tipos de haces como se mencionará en la sección 2.9.

El haz del láser incide directamente sobre las partículas bajo estudio a través del objetivo del microscopio y como se mencionó en la sección 2.3 este haz forma un patrón de difracción. El punto más angosto de este haz enfocado, conocido como la cintura del haz, contiene un gradiente de campo eléctrico muy fuerte que atrae a las partículas dieléctricas hacia el centro del haz. Se dice que esta interacción de la luz con las partículas es debido a la fuerza de gradiente. Además, existe otra fuerza que interactúa con las partículas y que se explica utilizando el concepto de la luz como partícula, es decir, como fotones. En este caso, cada fotón ejerce una fuerza sobre las partículas dieléctricas que se encuentren en su camino. Esta fuerza es conocida como la fuerza de Esparcimiento y su resultado es el de la partícula siendo desplazada ligeramente hacia abajo de la posición exacta de la cintura del haz, como se muestra en la figura 2.13.

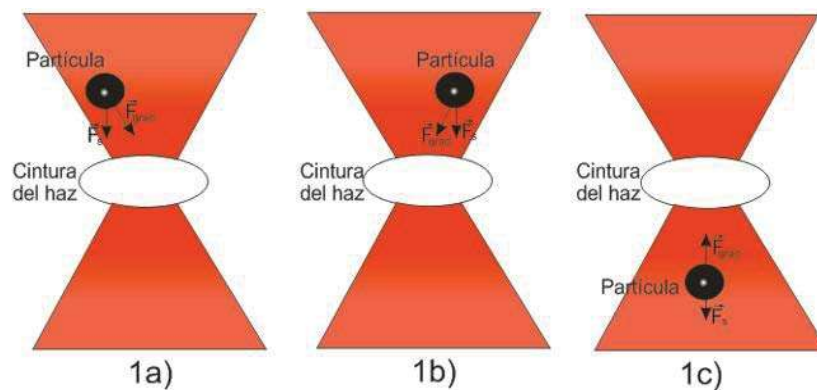


Figura 2.13. En 1a) y 1b) se observa una partícula que entra en el haz y es fuertemente empujada a la cintura del haz por dos fuerzas: La fuerza del gradiente F_g y la fuerza de Esparcimiento F_s . 1c) La fuerza del gradiente va en la dirección opuesta a la fuerza de Esparcimiento.

En el régimen de los rayos ópticos, se puede descomponer el haz de luz en rayos individuales, cada uno con apropiada intensidad y dirección que se propagan en línea recta en un medio de índice de refracción uniforme. En esta aproximación, tanto la longitud de onda como los efectos de difracción pueden ser despreciados. De acuerdo a este modelo, la operación básica de las pinzas ópticas puede ser explicada por la transferencia de momento

lineal [23] asociada con el cambio de trayectoria de los rayos en una interfaz dieléctrica ya sea por reflexión o por transmisión y por la tercera ley de Newton [24].

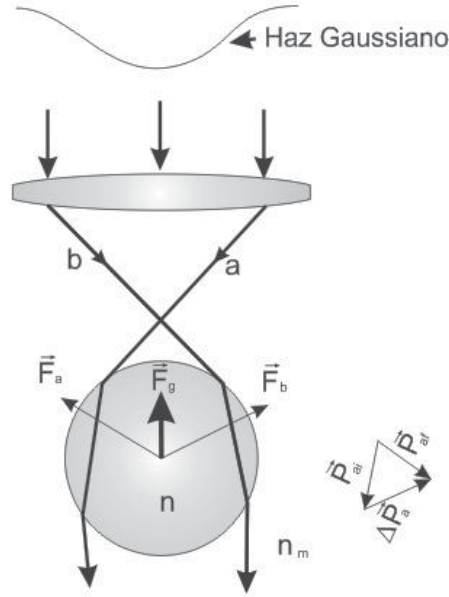


Figura 2.14. Análisis con trazos de rayos las fuerzas de atrapamiento axial de una partícula debido a la incidencia de un haz Gaussiano fuertemente enfocado.

Para entender este fenómeno, consideremos un haz con perfil de intensidad Gaussiano (ver sección 2.9.1) fuertemente enfocado por una lente. Justo abajo del foco (o cintura del haz) colocamos una partícula transparente de alto índice de refracción (n) mayor al medio n_m , como se muestra en la figura 2.14.

Consideremos únicamente el rayo a con momento lineal $\vec{P}_{ai}$ que incide sobre la esfera y sufre un cambio en su momento debido a la refracción. Este rayo emerge finalmente de la esfera con momento $\vec{P}_{af}$, por lo que de un análisis de momento obtenemos el cambio total de su momento $\Delta \vec{P}_a$. Por conservación del momento lineal, ocurre entonces una transferencia de momento de la luz a la partícula, y en consecuencia, la partícula experimenta una fuerza de reacción, $\vec{F}_a$, en sentido opuesto a $\Delta \vec{P}_a$ (recuérdese que $\vec{F} = d\vec{P} / dt$). De manera similar la partícula experimenta una fuerza $\vec{F}_b$ debida al cambio de momento del rayo b (ver figura 2.14).

Finalmente, sobre la partícula se ejerce la fuerza $\vec{F}_g$ que es la suma de las fuerzas $\vec{F}_a$ y $\vec{F}_b$ tal como se muestra en la figura 2.14. Esta fuerza $\vec{F}_g$ apunta en dirección contraria a la propagación de la luz, permitiendo que la partícula se mueva hacia la cintura del haz.

De acuerdo a la teoría electromagnética, también se puede entender el atrapamiento de las partículas usando el concepto de presión de radiación como a continuación se detalla.

2.8 Presión de radiación

Consideremos una onda electromagnética cuyos campos eléctrico y magnético están dados por:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t), \quad (2.26)$$

y

$$\vec{B} = \vec{B}_0 \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t). \quad (2.27)$$

Maxwell demostró que la **presión de radiación**, $\mathcal{S}$, equivale a la densidad de energía, u , de la onda electromagnética que reside tanto en el campo eléctrico $\vec{E}$ como en el campo magnético $\vec{B}$.

Se demuestra que la densidad de energía de la onda electromagnética es compartida por igual por ambos campos [17], es decir:

$$\mathcal{S} = u = u_E + u_B, \quad (2.28)$$

donde u_E y u_B son las densidades de energía del campo eléctrico y magnético respectivamente y están dadas por

$$u_E = \frac{\epsilon_0}{2} E^2, \quad (2.29)$$

y

$$u_B = \frac{1}{2\mu_0} B^2, \quad (2.30)$$

donde ε_0 es la permitividad eléctrica y μ_0 es la permeabilidad magnética en el vacío. Sustituyendo las ecuaciones (2.29) y (2.30) en la (2.28) podemos escribir la presión de radiación como

$$\mathcal{P} = \frac{\varepsilon_0}{2} E^2 + \frac{1}{2\mu_0} B^2, \quad (2.31)$$

pero como $E = cB$ y $c = 1/\sqrt{\mu_0\varepsilon_0}$, tenemos que

$$\mathcal{P} = \frac{\varepsilon_0}{2} c^2 B^2 + \frac{1}{2\mu_0} B^2 \Rightarrow \mathcal{P} = \frac{\varepsilon_0}{2} \frac{1}{\mu_0\varepsilon_0} B^2 + \frac{1}{2\mu_0} B^2 \therefore \mathcal{P} = \frac{1}{\mu_0} B^2, \quad (2.32)$$

o bien

$$\mathcal{P} = \frac{1}{c\mu_0} EB, \quad (2.33)$$

pero la magnitud del vector de Poynting, S , está dada por

$$S = \frac{1}{\mu_0} EB, \quad (2.34)$$

donde E y B dependen del tiempo (ver ecuaciones (2.26) y (2.27)) por lo que la presión de radiación se puede escribir como

$$\mathcal{P}(t) = \frac{S(t)}{c}. \quad (2.35)$$

Debido a que los campos eléctrico y magnético oscilan muy rápido es conveniente usar la presión de radiación media, es decir:

$$\langle \mathcal{P}(t) \rangle_T = \frac{\langle S(t) \rangle_T}{c} = \frac{I}{c}, \quad (2.36)$$

expresada en Newton por metros cuadrado.

Ahora bien, supongamos que un haz de luz ilumina una superficie perfectamente reflectora sumergida en el vacío. El rayo de luz que incide con una velocidad $+c$, se reflejará con la misma velocidad pero está dirigida en sentido contrario, por lo tanto, se puede decir que el haz reflejado viaja con una velocidad $-c$ respecto del haz incidente. Esto equivale a dos veces el cambio de momento y por lo tanto

$$\langle \mathcal{P}(t) \rangle_T = 2 \frac{\langle S(t) \rangle_T}{c} = 2 \frac{I}{c}. \quad (2.37)$$

La ecuación (2.37) representa la presión de radiación que sufre una partícula al ser iluminada por un haz proveniente de un láser, por ejemplo, para un láser de 17 mW de intensidad, la presión de radiación que puede ejercer sobre una partícula es de $5.6 \times 10^{-11} \text{ N/m}^2$.

Como se mencionó anteriormente, el haz que incide sobre las partículas tiene un perfil Gaussiano en intensidad. En la sección siguiente se menciona de manera general los diferentes tipos de haces que se pueden usar en pinzas ópticas, empezando por el haz Gaussiano.

2.9 Tipos de haces

Debido a la naturaleza ondulatoria de la luz, ésta puede ser confinada espacial y angularmente; las ondas planas y esféricas representan los dos casos de confinamiento. Para entender este concepto, es necesario recordar que un rayo de luz es la normal al frente de onda.

En una onda plana, los rayos son paralelos a la dirección de propagación de la onda, así que no se expanden angularmente, pero la energía se extiende en todo el espacio. La onda esférica, por otro lado, se origina en una fuente puntual y su frente de onda se diverge en todas direcciones, es decir, se extiende angularmente.

Las ondas de luz, cuyos rayos forman un pequeño ángulo con el eje de propagación z se llaman ondas paraxiales cuya amplitud compleja debe satisfacer la ecuación paraxial de Helmholtz [20,25]. Las soluciones de ésta ecuación son los llamados haces Gaussianos, haces Hermite- Gauss y la superposición de estos también es solución a la ecuación paraxial de Helmholtz y son conocidos como haces Laguerre-Gauss y haces Bessel. En las siguientes secciones se describe brevemente cada uno de estos haces.

Sea la función que describe una onda monocromática dada por

$$\vec{U}(\vec{r}, t) = \vec{A}(\vec{r}) \cos(2\pi\nu t + \phi(\vec{r})), \quad (2.38)$$

donde $\vec{A}(\vec{r})$ y $\phi(\vec{r})$ son las amplitud y fase respectivamente de la onda en la posición $\vec{r}$ y ν es la frecuencia. Esta ecuación se puede escribir en notación compleja mediante:

$$\vec{U}(\vec{r}, t) = \text{Re}[\vec{A}(\vec{r})e^{-i2\pi\nu t}], \quad (2.39)$$

donde Re indica la parte real de la ecuación (2.39) y $\vec{A}(\vec{r})$ es la función compleja de posición llamada fasor representada por

$$\vec{A}(\vec{r}) = A(\vec{r})e^{-i\phi(\vec{r})}. \quad (2.40)$$

Si la ecuación $U(\vec{r}, t)$ ecuación (2.38) representa una onda, entonces debe satisfacer la ecuación de onda [17]

$$\nabla^2 u - \frac{1}{c} \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = 0, \quad (2.41)$$

sustituyendo la ecuación (2.39) en la ecuación de onda (ecuación (2.41)), la amplitud $A(\vec{r})$ debe satisfacer la ecuación de Helmholtz dada por

$$\nabla_r^2 A + 2jk \frac{\partial A}{\partial z} = 0, \quad (2.42)$$

donde $k = 2\pi / \lambda$.

2.9.1 Haces Gaussianos

Realizando los cálculos necesarios [25] se puede demostrar que una de las posibles soluciones a la ecuación de onda está dada por

$$U(\vec{r}) = A_0 \frac{W_0}{W^2(z)} e^{-\frac{\rho^2}{W^2(z)}} e^{-jkz - jk\frac{\rho^2}{2R(z)} + j\xi(z)}, \quad (2.43)$$

donde $\rho^2 = x^2 + y^2$, $R(z)$, $W(z)$, $\xi(z)$ y W_0 están dados por:

$$W(z) = W_0 \left[1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (2.44)$$

$$R(z) = z \left[1 + \left(\frac{z_0}{z} \right)^2 \right], \quad (2.45)$$

$$\xi(z) = \tan^{-1} \frac{z}{z_0}, \quad (2.46)$$

$$W_0 = \left(\frac{\lambda z_0}{\pi} \right)^{1/2}. \quad (2.47)$$

La ecuación (2.43) representa a los haces Gaussianos y se muestra gráficamente en la figura 2.15

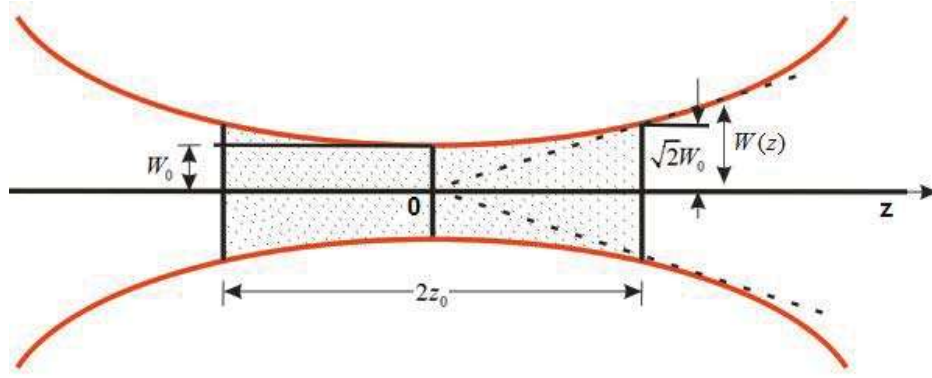


Figura 2.15. Perfil del haz Gaussiano donde se muestran los parámetros de este haz.

De la figura 2.15 se puede observar que $W(z)$ es el ancho del haz, W_0 es conocido como cintura del haz. La función $R(z)$ proporciona el radio de curvatura del frente de onda y $\xi(z)$ es el retraso de la fase.

La intensidad óptica, $I(\vec{r}) = |U(\vec{r})|^2$, es función de las distancias radial ρ y axial z , de esta forma la intensidad para el haz Gaussiano está dada por

$$I(\rho, z) = I_0 \left[\frac{W_0}{W^2(z)} \right]^2 e^{\left[-\frac{2\rho^2}{W^2(z)} \right]}, \quad (2.48)$$

donde $I_0 = |A_0|^2$. En cada valor de z , la intensidad es una función Gaussiana de la distancia radial ρ . Esta es la razón por lo que el haz es llamado haz Gaussiano. Esta función tiene un máximo de intensidad en $\rho=0$ (en el eje óptico) y decae conforme se incrementa ρ . La

función $W(z)$ de la distribución Gaussiana incrementa con la distancia axial z . En la figura 2.16 (a) se muestra una gráfica del perfil de la intensidad del haz Gaussiano y en la figura 2.16 (b) se muestra una fotografía frontal del haz.

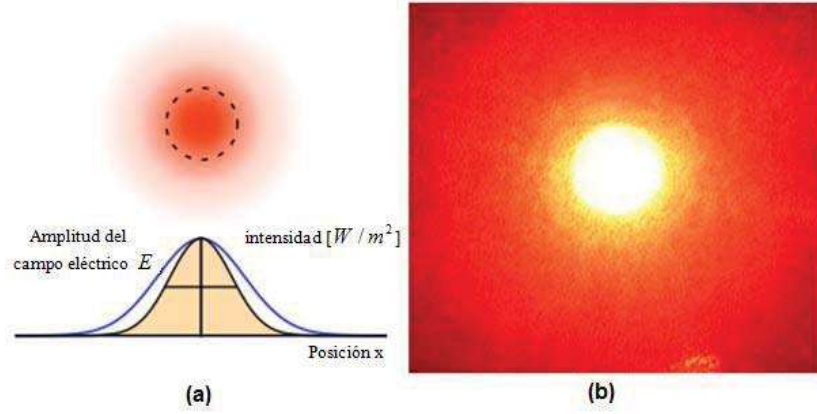


Figura 2.16. En esta figura se muestra la luz de un puntero láser de 630 nm.

2.9.2 Haces Hermitiano-Gaussianos

Los haces Gaussianos no son la única solución de la ecuación paraxial de Helmholtz (ecuación (2.42)). Existen otros haces que no tienen distribuciones de intensidad Gaussiana y son soluciones también a la ecuación (2.42) y son conocidos como haces Hermitiano-Gaussianos^[25]. La ecuación de estos haces está dada por:

$$U_{l,m}(x, y, z) = A_{l,m} \left[\frac{W_0}{W(z)} \right] G_l \left[\frac{\sqrt{2}x}{W(z)} \right] G_m \left[\frac{\sqrt{2}y}{W(z)} \right] e^{-jkz - jk \frac{x^2 + y^2}{2R(z)} + j(l+m+1)\xi(z)}, \quad (2.49)$$

donde $m, l = 0, 1, 2, \dots$, la ecuación

$$G_l(u) = H_l(u) e^{-\frac{u^2}{2}}, \quad (2.50)$$

es conocida como función Hermitiana-Gaussiana de orden uno y $A_{l,m}$ es una constante. W_0 y $W(z)$ fueron definidas en la sección anterior. La función $H_l(u)$ son los polinomios de Hermite^[19,25,26].

La intensidad óptica para un haz Hertiano-Gaussiano de orden (l, m) es

$$I_{l,m}(x, y, z) = |A_{l,m}|^2 \left[\frac{W_0}{W(z)} \right]^2 G_l^2 \left[\frac{\sqrt{2}x}{W(z)} \right] G_m^2 \left[\frac{\sqrt{2}y}{W(z)} \right], \quad (2.51)$$

La figura 2.18 ilustra la intensidad normalizada transversal a una distancia $u = \sqrt{2}x/W(z)$ y $v = \sqrt{2}y/W(z)$ para varios valores de l y m .

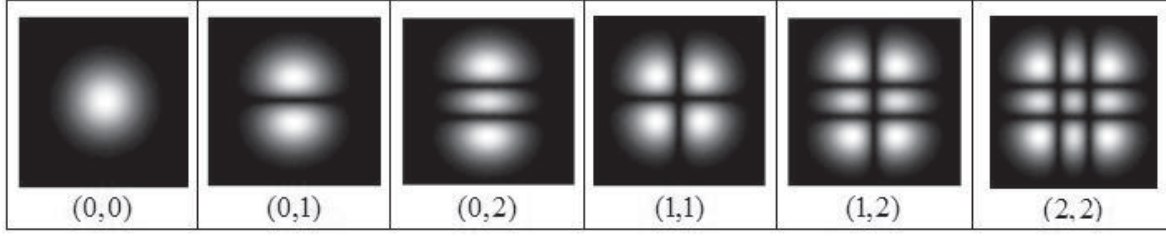


Figura 2.17. Diferentes ordenes de los haces Hermite-Gaussianos.

2.9.3 Haces Laguerre-Gaussianos

Los haces Hermite-Gauss forman un conjunto completo de soluciones a la ecuación paraxial de Helmholtz. Otras soluciones son la superposición de estos haces, sin embargo, no son las únicas. Existe otro conjunto de soluciones conocidas como haces Laguerre-Gauss y pueden ser obtenidas escribiendo la ecuación paraxial de Helmholtz en coordenadas cilíndricas (ρ, ϕ, z) y separando las variables respecto de ρ y ϕ en lugar de x y y . Los haces Laguerre-Gaussianos de bajo orden son conocidos como haces Gaussianos.

2.9.3.1 Haces Bessel

En los procesos de solución de la ecuación de onda, se pueden encontrar haces de luz con frente de onda plano, cuya distribución de intensidad no sea uniforme en el plano transversal a la dirección de propagación del haz (plano xy). Estos haces son conocidos como haces Bessel y están dados por:

$$U(r) = A_0 J_0(k_{T\rho}) e^{-j\beta z}, \quad (2.52)$$

donde A_0 es una constante y J_0 es la función Bessel de primer tipo de orden cero^[19,25,26].

Puede verse que la ecuación (2.52) es una onda plana cuya intensidad tiene simetría radial independiente de z y está dada por

$$I(\rho, \phi, z) = |A_0|^2 J_0^2(k_{T\rho}). \quad (2.53)$$

Este haz es llamado haz Bessel. En la figura 2.18 se muestra el perfil de intensidad de este tipo de haces.

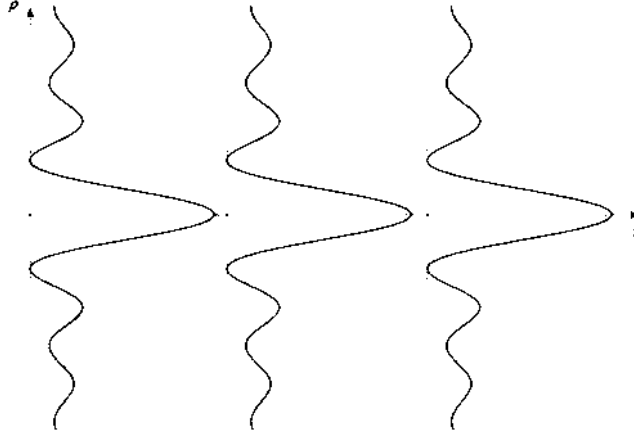


Figura 2.18. Densidad de distribución de un haz Bessel en el plano transversal independiente de z ; el haz no diverge.

Considerando que la intensidad del haz Gaussiano disminuye exponencialmente respecto de la función $\exp[-2\rho^2 / W^2(z)]$, la intensidad del haz Bessel es proporcional a $J_0^2(k_{T\rho}) \approx (2 / \pi k_{T\rho}) \cos^2(k_{T\rho} - \pi / 4)$ y esta función oscila lentamente decreciendo su magnitud tal como se muestra en la figura 2.19.

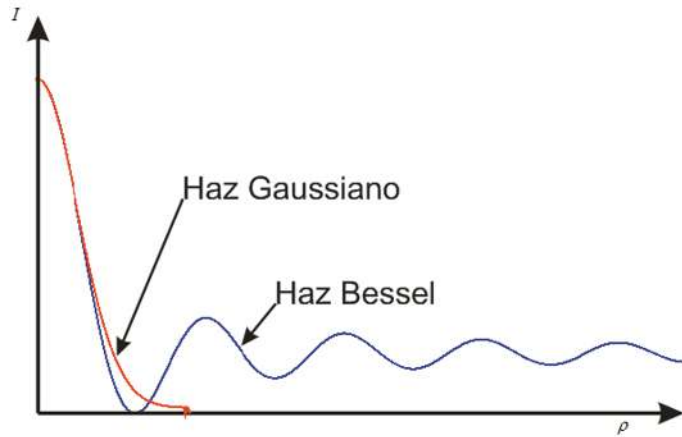


Figura 2.19. En esta figura se muestra la comparación de las intensidades de distribuciones radiales de un haz Gaussiano y un haz Bessel (se seleccionan los parámetros tal que las intensidades máximas y anchuras de $1/e^2$ sean idénticas en ambos casos).

Este tipo de haces Bessel es importante en el atrapamiento de objetos o partículas usando pinzas ópticas debido a la distribución de irradiancia que muestra. Sin embargo, para los propósitos de esta tesis no se construyeron este tipo de haces debido a su complejidad tanto teórica como experimental y únicamente se emplearon haces Gaussianos.

CAPITULO 3

MATERIALES

En este capítulo se presenta una descripción del material que se utilizó para la demostración de las pinzas ópticas desarrolladas en este trabajo de tesis. Como materiales de muestra se han escogido muestras orgánicas e inorgánicas. El primer material seleccionado fue una suspensión de partículas de látex que nos permitió acondicionar la técnica para la implementación con dos tipos de bacterias: La bacteria de *L. lactis* y *L. casei Shirota*®, estas bacterias son de fácil adquisición y se utilizaron debido al potencial de la técnica en el área de biotecnología.

3.1 Partículas de látex

La muestra de partículas de látex fue hecha con una suspensión proporcionada por el laboratorio de Polímeros del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). El tamaño de la partícula utilizada es de 936nm de diámetro caracterizada por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) como se observa en la figura 3.1 y con una polidispersidad al 10% a una concentración del 2% de sólidos en agua [27]. Como se puede ver en la figura 3.1 éstas partículas presentan simetría esférica cuya forma, en este caso, es adecuada para la manipulación óptima con las pinzas ópticas.

El uso de las partículas de látex permitió adquirir experiencia en el manejo de las pinzas ópticas para posteriormente utilizar las bacterias de *L. lactis* cuya forma es también esférica y por último las bacterias *L. casei Shirota*® que tienen forma cilíndrica.

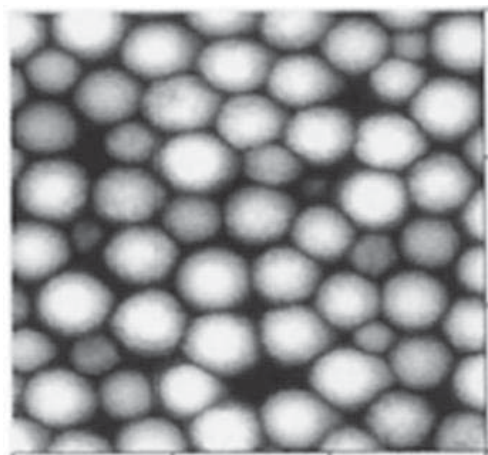


Figura 3.1. Imagen de AFM ($4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$) de las partículas de látex de 936 nm de diámetro con una polidispersidad del 10%.

3.1.1 Preparación de las partículas de poliestireno

Debido a que la suspensión de partículas inicial tiene una concentración relativamente alta del 2% de sólidos y que esto impide la observación por el microscopio compuesto, es necesario diluir la muestra hasta obtener una suspensión con una concentración baja permitiendo la observación de las partículas en forma separada y el confinamiento de una sola partícula. La muestra que se utilizó tuvo una concentración de 0.0125% de sólidos en agua desionizada. En la figura 3.2 se observa una fotografía de la muestra inicial de partículas de látex de 936 nm y la muestra diluida al 0.0125% de concentración.



Figura 3.2. Fotografía de las muestra inicial y diluída al 0.0125% de partículas de látex de 936 nm .

3.2 Bacterias de *Lactococcus lactis*

La bacteria de *L. lactis* UQ2 es un microorganismo mesófilo (temperatura óptima de crecimiento entre 20°C y 45°C), capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad; de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas

conocidas en forma genérica como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina. Ambos factores, acidez y bacteriocinas, son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos. *L. lactis* son bacterias cuya morfología esférica se denomina “cocos” que se agrupan en pares y en cadenas cortas, presentan un tamaño que van desde 0,5 a 1,5 μm de diámetro [28-30]. En la figura 3.3 se presentan dos imágenes por microscopía de barrido electrónico de la bacteria de *Lactococcus lactis* tomadas del Departamento de Biotecnología de UW- Madison [31]. En estas imágenes se observa la forma esférica de la bacteria y el tamaño aproximado de 0.5 μm .

La bacteria de *L. lactis* UQ2 fue proporcionada y activada en el laboratorio de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) bajo la asesoría de la Dra. Blanca Estela García Almendárez. Esta bacteria también fue activada siguiendo la metodología de la Dra. García [32] en la FCFM-UMSNH. Antes de la activación, la bacteria se encuentra en estado latente en forma de cepa (pequeño grupo de bacterias) adheridas a una superficie esférica de 2 mm de diámetro a -70°C .

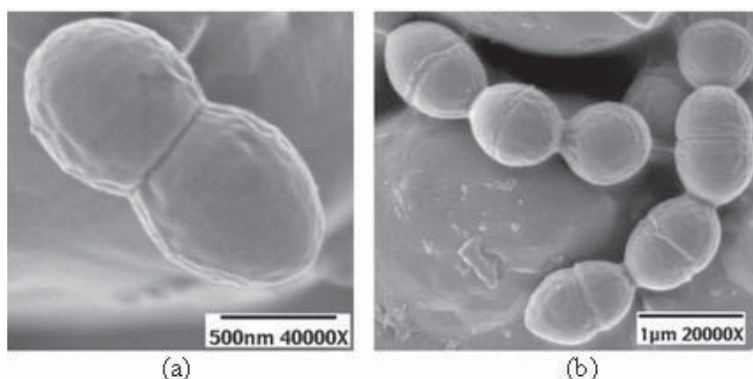


Figura 3.3. (a) Imagen de la bacteria de *L. lactis* agrupada de dos en dos y (b) formando cadenas cortas, esta imagen fue tomada del Departamento de Biotecnología de UW-Madison.

3.3 Bacteria de *Lactobacillus casei* Shirota®

La bacteria de *L. casei* Shirota® es un microorganismo anaeróbico, es decir que puede vivir sin aire y que se encuentra en el intestino así como en la boca del ser humano. Se trata de una bacteria productora del ácido láctico que se emplea en la elaboración de alimentos probióticos (contienen microorganismos vivos que ejercen importantes efectos fisiológicos si se ingieren en cantidades adecuadas). Esta especie particular de lactobacilo se ha comprobado que es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura, siendo

además un complemento al crecimiento de la *acidophilus*, un productor de la enzima amilasa (una enzima digestiva de carbohidratos en la saliva y en el jugo pancreático de mamíferos). Se sabe que mejora la digestión, la tolerancia a la leche y evita la diarrea [33]. Por esta razón se emplea en la elaboración de diversos alimentos funcionales.

En la figura 3.4 se observa una imagen de microscopía de barrido electrónico tomada del grupo de microbiología de alimentos del Instituto de Ciencias y Tecnología de la Unión Norteamericana [34]. De la imagen se puede estimar el tamaño promedio de la bacteria que es de $0.5\mu\text{m}$ de diámetro y $1.5\mu\text{m}$ de largo.

La bacteria de *L. casei Shirota*® fue aislada y cultivada en 1930 por el Dr. Minoru Shirota en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Imperial de Kioto (Japón). Este microorganismo fue aislado a partir del tracto intestinal de un infante y fue sometido a pruebas de resistencia contra jugos gástricos y secreciones biliares, de tal forma que la bacteria de *L. casei Shirota*® es capaz de alcanzar viva el intestino delgado después de haber sido ingerida. Actualmente estas bacterias se encuentran en leche fermentada en forma comercial.

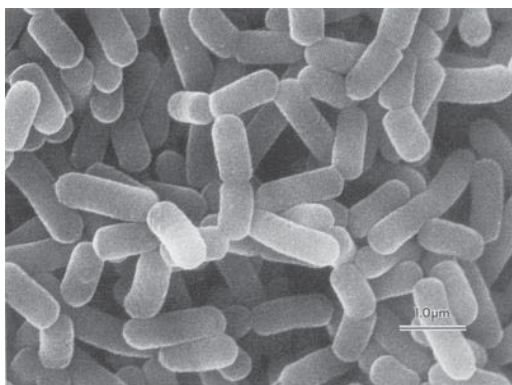


Figura 3.4. Imagen por microscopía electrónica de la bacteria *L.casei Shirota*® obtenida del Instituto de Ciencias y tecnología del grupo de microbiología de alimentos de la Unión Norteamericana. El tamaño de la bacteria es de 0.5 micras de diámetro y 1.5 micras de largo.

3.4 Preparación de muestras Biológicas

Tanto para la bacteria de *L. lactis* y *L. casei Shirota*® es necesario la preparación del material, la esterilización del sistema, el proceso de activación, preparación y dilución de la muestra. A continuación se describe cada etapa:

3.4.1 Preparación de químicos y materiales de laboratorio

En esta primera etapa se preparan todos los materiales necesarios para la activación de las bacterias. Las bacterias utilizadas en esta tesis, se depositaron en un cultivo nutritivo MRS para que obtengan los nutrientes necesarios posteriormente se retira la bacteria del medio de cultivo MRS y se depositan en solución salina para utilizar una dilución de esta solución y observarlas por el microscopio compuesto.

- a) El medio de cultivo o caldo MRS se prepara tomando 55g de MRS (*DifcoTM Lactobacini MRS Broth*) por cada litro de agua destilada, debiendo conservar su pH de 6.5 ± 0.2 .
- b) La solución salina o cloruro de sodio (NaCl) se prepara a una concentración de 0.85% por cada 99.15% de agua destilada.
- c) El medio de cultivo en agar o gelatina MRS se prepara agregando 64 gr de agar MRS (*DifcoTM Lactobacini MRS agar*) en 1 L de agua destilada, debiendo conservar su pH de 6.5 ± 0.2 . Se deja reposar 5 min y se mezcla calentando a ebullición durante 1 o 2 mins. Se esteriliza y se deposita en cajas petri.

Para llevar a cabo el proceso de esterilización de los químicos anteriormente preparados y los materiales a usar, se utiliza un Autoclave eléctrica (Kitlab de 22L) que es un instrumento para esterilización por medio de alta presión del vapor. Se esteriliza por 1 hora a 121°C.

3.5. Activación de las Bacterias

Es necesario tener un ambiente estéril para evitar contaminación por lo que es indispensable trabajar en una campana de flujo laminar para manipular el material y reactivos químicos. Para activar la bacteria de *L. lactis*, primero se deposita la cepa en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo MRS previamente esterilizado y se deposita en una incubadora a 32°C por 24 horas. En cuanto a la bacteria de *L. casei Shirota®*, ésta se obtiene centrifugando a 10000 rpm la muestra láctica fermentada para separar las bacterias del líquido láctico. Se elimina el líquido y se deposita en el mismo tubo de ensayo la solución salina (NaCl) agitando manualmente para separar las bacterias adheridas al tubo. Se toman 100 µl de la solución

para depositarla en una caja petri con agar RMS. Finalmente se deja incubar las cajas a 32°C por 24 horas. Este proceso es esencial para contar con material durante 20 días de almacenamiento.

3.5.1 Recuperación de Bacterias

Para recuperar las bacterias es necesario separarlas del medio de cultivo (MRS), esto se logra utilizando una centrifuga a 10000 revoluciones por minutos dándole un tiempo de 5 minutos, al término de este lapso se retira el medio y se vierte en los tubos de ensayo la solución salina (NaCl) y posteriormente incubarlas por 2.5 horas más.

Una vez terminado este proceso se diluyen las bacterias a una concentración del 0.0125% de sólido para su observación. El proceso de preparación de las muestras biológicas se sintetiza en el diagrama mostrado en la figura 3.5.



Figura 3.2. Proceso de recuperación de las bacterias.

CAPÍTULO 4

DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados más relevantes de los experimentos que se realizaron con la implementación de la técnica de pinzas ópticas y se detalla el arreglo experimental empleado. Se describen los pasos realizados para el confinamiento de partículas de látex, bacterias de *L. lactis* y *L. casei Shirota*®. Finalmente se muestra una aplicación con pinzas ópticas donde se manipulan las partículas para ordenarlas en cualquier forma deseada.

4.1 Diseño experimental

El arreglo experimental de pinzas ópticas que se utilizó se basa en el esquema de la figura 2.12 de la sección 2.7; como se describió previamente, las pinzas ópticas se componen de un haz laser He-Ne con longitud de onda $\lambda=632.8\text{ nm}$ y 17 mW de potencia que incide en un microscopio compuesto, la imagen es capturada con una cámara CCD y visualizada en una PC. Considerando las pérdidas por las múltiples reflexiones en los elementos del microscopio se estima que la potencia que incide en la muestra es 6.93 mW . Esta potencia se puede disminuir de forma conveniente si se rota un polarizador lineal frente al laser. De acuerdo a la tabla 2.1, la cintura del haz es de 617.6128 nm . El microscopio es iluminado con una fuente de luz blanca de 100 mW .

En la figura 4.1 se muestra la fotografía del arreglo experimental de pinzas ópticas que se implementó en el laboratorio de Holografía de la FCFM-UMSNH.

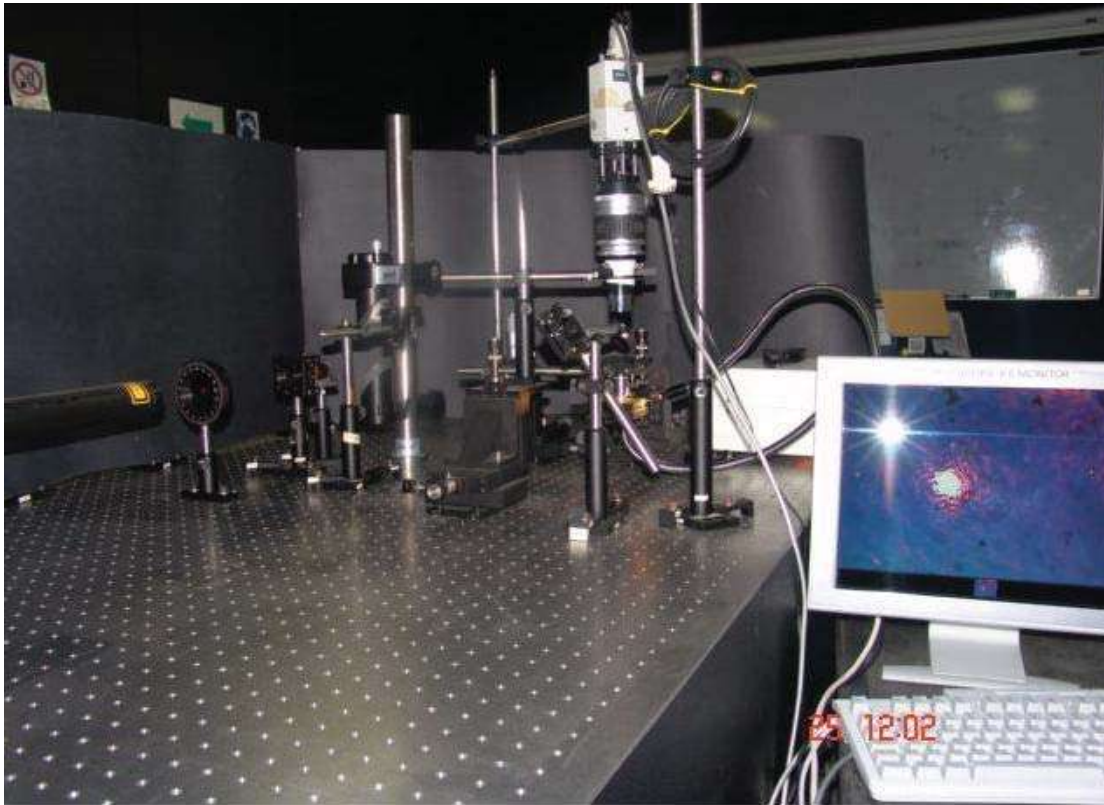


Figura 4.1. Fotografía del diseño óptico de las pinzas ópticas.

Después de haber analizado las pérdidas de los sistemas ópticos que son de utilidad para la implementación de la técnica de pinzas ópticas concluimos que la potencia que estaremos utilizando para realizar el confinamiento óptico es de 3.465 mW y de acuerdo a la tabla 2.1, la cintura del haz es de 617.6128 nm

4.2 Desarrollo experimental

Una vez montado el arreglo experimental de las pinzas ópticas se coloca una muestra con los especímenes que se desean atrapar en la platina del microscopio compuesto; posteriormente se obstruye el haz láser para enfocar la muestra utilizando únicamente el microscopio y una vez enfocada la muestra se deja pasar el haz del láser y se enfoca la cintura del haz en el mismo punto focal para realizar el atrapamiento óptico.

En esta tesis, se realizaron atrapamientos de partículas de látex y de bacterias de *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* y a continuación se describe el procedimiento para cada uno de estos casos.

4.2.1 Atrapamiento de partículas de látex

Para realizar el atrapamiento óptico se utiliza una dilución del 0.0125% de concentración de partículas de látex de 936nm de diámetro, y se enfoca con el microscopio tal como se muestra en la figura 4.2.

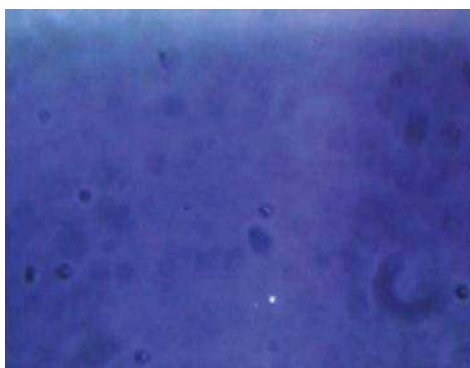


Figura. 4.2. Fotografía de las partículas de látex vistas a través del microscopio compuesto. Las partículas de látex son los círculos pequeños de color oscuro.

Posteriormente se deja pasar el haz de luz y se desplaza la platina del microscopio para colocar la cintura del haz a un lado de la partícula de látex deseada (ver figura 4.3(a)) y así observar como la presión de radiación del haz atrae a la partícula de látex y la ubica en la cintura del haz (ver figura 4.3(b)) logrando el atrapamiento óptico de la partícula.

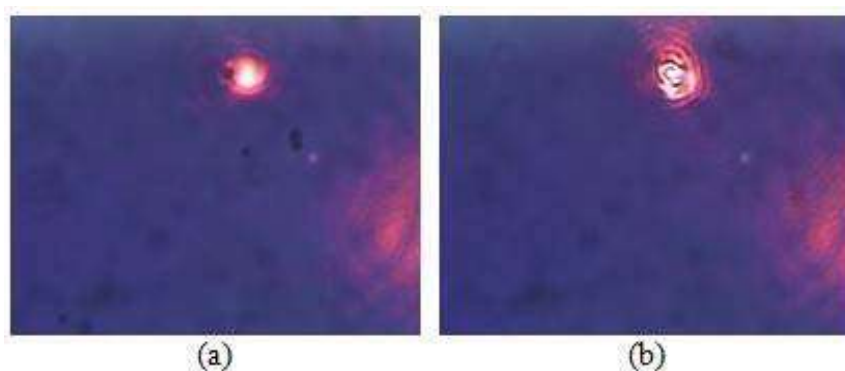


Figura 4.3. Atrapamiento de una partícula de látex.

Una vez confinada una partícula de látex desplazamos la platina del microscopio para moverla de un lugar a otro. Para comprobar dicho desplazamiento, observemos la figura 4.4, donde se aprecia un grupo de partículas encerradas en un círculo azul que se utilizan como punto de referencia (ver figura 4.4(a)). En las figuras 4.4(b) y 4.4(c) se muestra que la posición de la partícula atrapada ha cambiado respecto de las partículas de referencia, esto es debido a que la platina se fue moviendo lentamente.

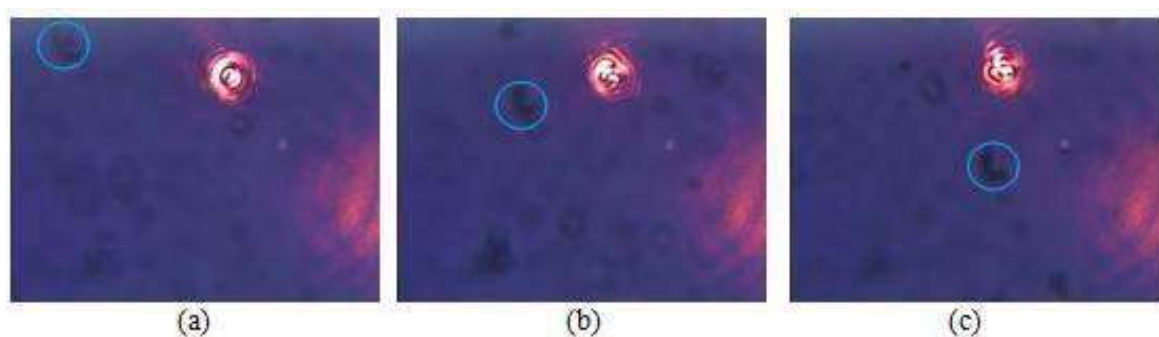


Figura 4.4. Diferentes posiciones del desplazamiento de las partículas después de haber utilizado la técnica de pinzas ópticas.

Una posible aplicación de la pinzas ópticas es la fabricación de micro estructuras con las partículas atrapadas. En este caso, usamos las partículas de látex para formar la letra “O” sobre el portaobjetos que las contiene. A continuación presentamos los resultados.

Para fijar las partículas de látex primero se atrapa una partícula y se desplaza a un lugar específico

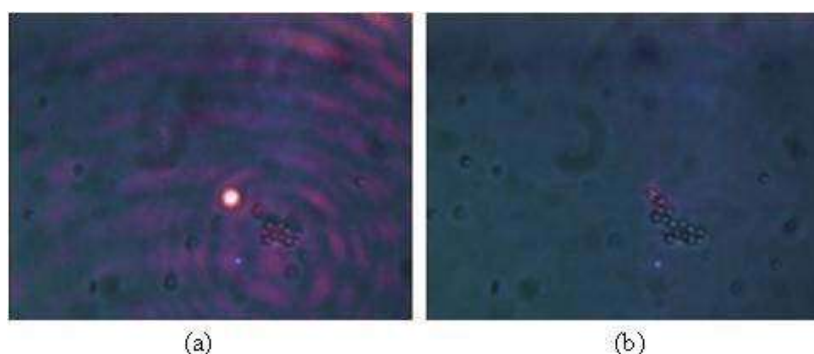


Figura 4.5. Partículas fijadas utilizando la presión de radiación.

Posteriormente se incrementa la potencia del láser girando el polarizador a 0° respecto de la horizontal (obteniéndose una potencia máxima de 6.93 mW) durante un tiempo

suficiente para poder fijar las partículas en un lugar específico; en este caso, se observó que 10 minutos aproximadamente fue el tiempo suficiente para que las partículas se quedaran fijas en el portaobjetos, (ver figura 4.5(a) y (b)).

Se repite el proceso de desplazamiento y fijación de las partículas confinadas hasta crear una letra “O” (ver figura 4.6).

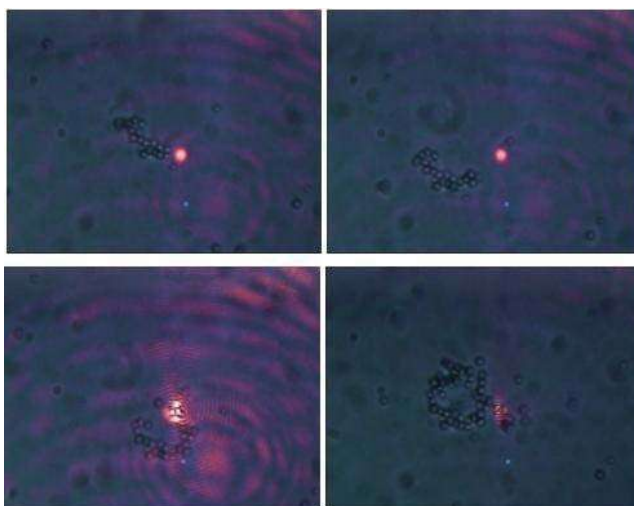


Figura 4.6. Formación de la letra O. Utilizando la técnica de pinzas ópticas.

Se utiliza la técnica de pinzas ópticas (anteriormente descrita para partículas de látex) para atrapar muestras biológicas como por ejemplo, la bacteria de *L. casei Shirota*® y *L. lactis*. Dicho procedimiento se detalla a continuación.

4.2.2 Atrapamiento de la bacteria de *Lactobacillus casei*

Para llevar acabo el atrapamiento óptico de la bacteria de *L. casei Shirota*®, se tomó una dilución de la bacteria a una concentración del 0.0125% de sólido (ver capítulo 3, sección 3.5.4) y se realiza el mismo procedimiento que se explicó en la sección 4.3.2. Primero se coloca la concentración de la bacteria de *L. casei Shirota*® en la platina del microscopio compuesto y se lleva a cabo el confinamiento de la bacteria colocando la cintura del haz cerca de la bacteria como de muestra en la figura 4.7(a), en la figura 4.7(b) se observa como la bacteria es atraída a la cintura del haz y en la figura 4.7(c) se observa como la bacteria es confinada en la cintura del haz disminuyendo así su movimiento Browniano.

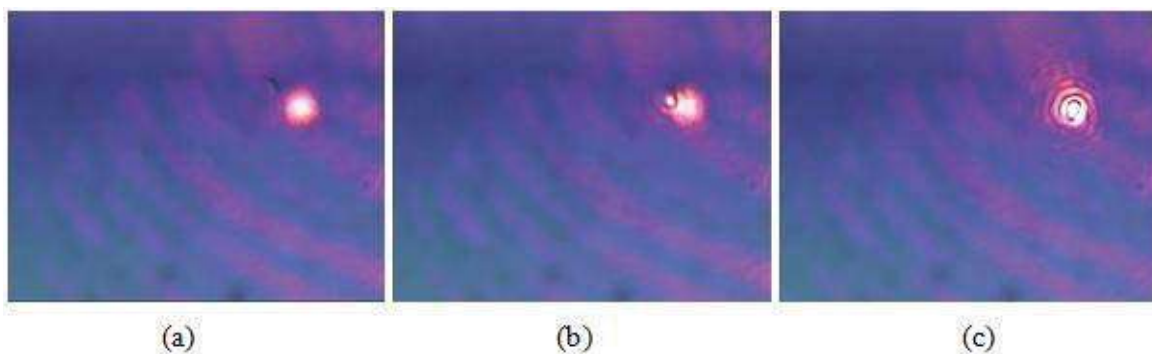


Figura 4.7. Atrapamiento de una bacteria de *Lactobacillus casei*.

Para verificar que efectivamente tenemos atrapamiento óptico, desplazamos la bacteria de *L. casei* Shiota® confinada de un lugar a otro utilizando únicamente el haz láser, para ello se toma una bacteria como punto de referencia y la encerramos en un círculo azul como se muestra en la figura 4.8.



Figura 4.8. Ubicación de una bacteria como punto de referencia.

Una vez teniendo una bacteria fija como punto de referencia se procede a desplazar la bacteria confinada ligeramente respecto a nuestro punto de referencia como se muestra en la figura 4.9(a), (b) y (c).

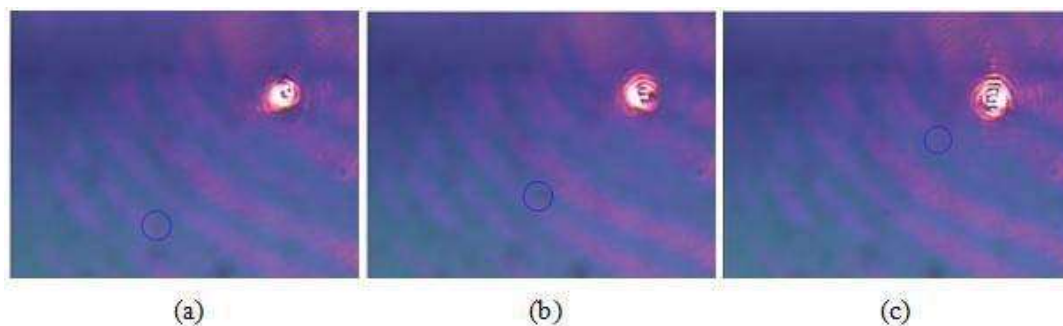


Figura 4.9. Diferentes posiciones del desplazamiento de las partículas, después de haber utilizado la técnica de pinzas ópticas (ver película en la pagina www.fismat.umich.mx/optica).

Después de haber comprobado que también podíamos atrapar y desplazar la bacteria de *L. casei* Shirota® utilizando la técnica de pinzas ópticas se procede a intentar fijar las bacterias en un lugar específico como se hizo con las partículas de látex anteriormente descrita. Sin embargo no se logró fijar la bacteria de *L. casei* Shirota®, siendo una posible causa su estructura en forma de bacilo, es decir, en forma de bastoncillo y al aumentar la intensidad del láser esta bacteria presentaba un movimiento rotatorio debido a la intensidad de la presión de radiación provocada por la longitud de onda del haz, por lo que lo único que logramos realizar con la técnica de pinzas ópticas fue desplazar esta bacteria de un lugar a otro, como se puede observar en la figura 4.10.

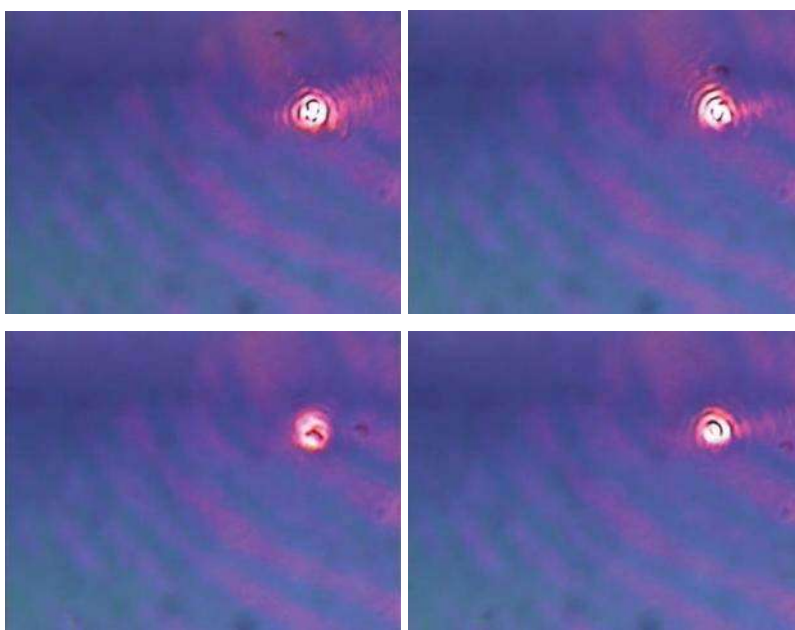


Figura 4.10. Diferentes posiciones del desplazamiento de las bacterias de *L. casei* Shirota® utilizando la técnica de pinzas ópticas.

Para comprobar que la estructura (en forma de bastoncillo) de la bacteria de *L. casei* Shirota® era la que nos impedía fijarlas en un lugar específico se utilizó la bacteria de *L. lactis*, debido a que su estructura es en forma de cocos, es decir, es de forma esférica y los resultados se muestran en la siguiente sección.

4.2.3 Atrapamiento de la bacteria de *Lactococcus lactis*

Para llevar a cabo el atrapamiento óptico de la bacteria de *L. lactis* se tomó una dilución de esta bacteria a una concentración del 0.0125% de sólido (ver capítulo 3, sección 3.5.4), procediendo primero a colocar la concentración de la bacteria de *L. lactis* en la platina del

microscopio compuesto de la misma manera como se realizó con la bacteria de *L. casei* Shirota® logrando así atrapar y desplazar la bacteria de *L. lactis* de un lugar a otro, pero se observó que aunque la estructura de esta bacteria era en forma de cocos nos fue imposible fijarlas, con lo que podemos decir, que la técnica de Pinzas ópticas no es la adecuada para manipular muestras biológicas, por lo que se deja como un trabajo a futuro utilizar pinzas ópticas holográficas.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se estudió el funcionamiento de los diferentes elementos ópticos como el objetivo de microscopio de inversión de 100x; el ocular de microscopio de 10x y el poder de amplificación de una lente con la finalidad de implementar un microscopio compuesto con una amplificación de 1000x para observar las muestras orgánicas e inorgánicas.

Se estudió el concepto de presión de radiación como fuerza por unidad de área que actúa sobre una partícula y para el confinamiento dentro de un haz de luz se analizó los conceptos de fuerza gradiente y de esparcimiento.

Se implementó la técnica de Pinzas Ópticas a partir de la implementación de un microscopio compuesto al cual mediante un divisor de haz se le introduce un haz láser de $632.8nm$ de longitud de onda.

Utilizando la técnica de Pinzas Ópticas se logró atrapar una partícula de látex de $936nm$ de diámetro usando únicamente la presión de radiación del haz láser logrando disminuir su movimiento Browniano, también se logró desplazar la partícula de látex confinada de un lugar a otro usando únicamente el haz láser. Finalmente, incrementando la intensidad del haz láser se logran fijar las partículas de látex sobre una placa de vidrio (porta objeto) formando letras, esto se hizo con la finalidad ilustrar la posibilidad de la formación de objetos periódicos.

Se realizó el mismo procedimiento para confinar, desplazar y fijar muestras biológicas, utilizando las bacterias de *L. casei Shirota*® y *L. lactis*, para ello fue necesario primero implementar la técnica de activación, recuperación y dilución de las bacterias. Se logró confinar y desplazar por tiempos cortos a ambas bacterias demostrando la aplicabilidad de la técnica para muestras biológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. G. Grier, *Department of Physics, James Franck Institute and Institute for Biophysical Dynamics, The University of Chicago*, 5640 S. Ellis Avenue, Chicago, IL 60637, USA.
- [2] A. Ashkin, *Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure*, Phys. Rev. Lett. 24, 156-159, (1970).
- [3] A. Ashkin, et al Science vol. 235, iss. 4795, pp. 1517" (1987).
- [4] Hill, Murray wrote the book on atom trapping, Interview conducted for internal newsletter at Bell Labs. Contains confirmation of Ashkin as the inventor of optical trapping and provides information on the 1997 Nobel Prize in Physics. Retrieved June 25, (2005).
- [5] S. Chu, *Conversations with History: An Interview with*, Institute of International Studies, UC Berkeley. Last accessed on September 2, 2006.
- [6] A. Ashkin, *History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules*. IEEE J. Sel. Top. Quantum Elec. 6, 841–856 (2000).
- [7] K. Svoboda, P. P. Mitra & Block, *Fluctuation analysis of motor protein movement and single enzyme-kinetics*, Proc. Natl Acad. Sci. 91, 11782–11786 (1994).
- [8] C. Bustamante, S. B. Smith, J. Liphardt & D. Smith, *Single-molecule studies of DNA mechanics*. Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 279–285 (2000).
- [9] M. W. Berns, Tadir, Y., Liang, H. & Tromberg, B. *Láser scissors and tweezers*. Methods Cell Biol. 55, 71–98 (1998).
- [10] Wright, G., Tucker, M. J., Morton, P. C., Sweitzer-Yoder, C. L. & Smith, S. E. *Micromanipulation in assisted reproduction*, Curr. Opin. Obstet. Gyn. 10, 221–226 (1998).
- [11] M. P. Macdonald, G. C. Spalding, K Dholakia, *Microfluidic sorting in an optical lattice.*, Nature; 421: 421-424, (2003).
- [12] B. A. Koss, D. G. Grier, *Optical Peristalsis*.
- [13] Jr. R. W. Applegate,. et al, *Optics Express*, vol. 12, iss. 19, pp. 4390 (2004).
- [14] I. RICARDEZ, E. EBER, G. OROZCO, J. A. HERNÁNDEZ, *Pinzas Ópticas, una herramienta eficaz para micromanipulación*, ISSN 1698-7418, Depósito Legal PP200402CA1617 (2008).

- [15] J. C. Crocker, D. G. Grier, *When like charges attract: The effects of geometrical confinement on long-range colloidal interactions*. *Phys. Rev. Lett.* **77**, 1897–1900 (1996).
- [16] A. E. Fernández, D. Petrov, *Sistema de trampa de fibra óptica para espectroscopia Raman*, DFEN.
- [17] E. Hecht, *Óptica*, tercera edición, copyright (1998).
- [18] D. Malacara, *Óptica Básica*, primera edición (1989).
- [19] G. B. Arfken, H. J. Webwer, *Mathematical Methods for physicists*, sixth edition, copyright (2005).
- [20] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, Copyright (1968).
- [21] Catalogo de Melles Griot
- [22] Ashkin *et al.*, 1986.
- [23] R. Resnick, D. Halliday, K. S. Krane, *Física vol. 1 y 2*, quinta edición, copyright (1992).
- [24] Ashkin *et al.*, 1986; Ashkin, 1992.
- [25] B. E. A. Saleh, M. Carl Teich, fundamentals of photonics.
- [26] M. L. Boas, *Mathematical Methods in the Physical Sciences*.
- [27] M. Peña-Gomar, Ma. L. González-González, A. García-Valenzuela, J. Antó-Roca and E. Pérez, *Monitoring particle adsorption by laser reflectometry near the critical angle*, *Appl. Opt.*, Vol. 43, No. 32, 5963-5970 (2004).
- [28] E. Davidson, D. Hoover, *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. In: *Lactic Acid Bacteria*. Salminen S.; Von Wright A (Eds.) Academic Press, San Diego, California. 96-114 pp. (1993).
- [29] W. S. Kim, R. J. May, N. W. Dunn, *The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of Lactococcus lactis subsp, lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(4): 449-453 (1997).
- [30] A. Mäyrä-Mäkinen, M. Bigret, *Industrial use and production of lactic acid bacteria. Chapter 2*. In: *Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, San Diego, California. 65-95 pp. (1993).
- [31] <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/LactococcusHome.html>, L-lactis01.tif, L-lactis02.tif.

- [32] B. E. G. Almendárez, K. O. Issac, C. Scott, I. G. Legarreta and C. Regalado, *Effect of Lactococcus lactis UQ2 and its bacteriocin on Listeria monocytogenes biofilms*, Food Control, Volume 19, Issue 7, Pages 670-680 (2008).
- [33] E. Isolauri, *A Human Lactobacillus Strain (Lactobacillus Casei sp strain GG) Promotes Recovery From Acute Diarrhea in Children*, Vol. 88 No. 1, pp. 90-97 (1991).
- [34] M. Shirota, *Lactobacillus casei Shirota*, (2000).