

MANIPULACIÓN DE OBJETOS MICROMÉTRICOS POR MEDIO DE PINZAS ÓPTICAS

Tesis de Grado para optar al título de Magíster en Ciencias – Física

Ing. Fís. Nelson Alonso Correa Rojas

**Director:
Dr.rer.nat. Román Castañeda Sepúlveda
Profesor Titular – Escuela de Física**



Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín

Facultad de Ciencias

Escuela de Física

Programa de Maestría en Ciencias – Física.

Medellín, Marzo de 2012

A Dios, mi familia y mis amigos.

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo de la Dirección de Laboratorios y la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, a la Alcaldía de Medellín a través del programa Mujeres Jóvenes Talento de la Secretaría de las Mujeres, del cual María Isabel Álvarez Castaño fue reconocida en la categoría Ciencia y Tecnología; a Colciencias con el programa Jóvenes Investigadores, y a la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República. También se contó con el invaluable apoyo científico del Centro de Óptica y Fotónica de la Universidad de Concepción, Chile, a través del Profesor Carlos Saavedra; del Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics; de la profesora Halina Rubinsztein-Dunlop , Head of School, Director, Centre for Biophotonics & Laser Science, The University of Queensland, y del Profesor Jean-Pierre Galaup de la Universidad de París-Sud 11, Francia.

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Introducción	2
4. Física de las pinzas ópticas.....	6
4.1. Introducción	6
4.2. Régimen de Rayleigh	8
4.3. Régimen de Mie	17
4.4. Aplicabilidad, restricciones y teoría generalizada	25
5. Fuerzas y elasticidad de las pinzas ópticas.....	28
5.1. Introducción.....	28
5.2. Marco teórico.....	30
5.3. Materiales y métodos	33
5.4. Resultados.....	38
6. Transferencia de momentum angular	44
6.1. Introducción	44
6.2. Marco teórico.....	46
6.3. Materiales y métodos	49
6.4. Resultados.....	55
7. Conclusiones.....	63
8. Referencias	65

1. RESUMEN

Este trabajo presenta los principios teóricos básicos para entender y modelar las fuerzas y fenómenos presentes en un pinza óptica. Además, se muestran las principales y más útiles técnicas experimentales para la calibración de la elasticidad y cuantificación de las fuerzas de una pinza óptica. Por último, se presentan varios métodos para la ejecución y medida de torque a partículas atrapadas a través de la transferencia de momentum angular, de espín y orbital, entre la luz y la materia. Los resultados logrados y las aplicaciones introducidas demuestran la obtención de un sistema de pinzas ópticas de altas prestaciones, capaz de manipular traslacional y rotacionalmente partículas micrométricas, y además la cuantificación de las fuerzas y torques ejercidos, de forma no invasiva ni destructiva. El sistema desarrollado es pionero en nuestro país y brinda un campo muy amplio de investigación y desarrollo.

2. ABSTRACT

This work presents the basic theoretical principles to understand and model the forces and phenomena occurring in an optical tweezer. Additionally, shows the main and most useful experimental techniques for the calibration of the elasticity and quantification of the forces in an optical trap. Several methods are presented are presented for execution and measurement of torque on trapped particles through the transfer of angular momentum, spin and orbital, between light and matter. The results achieved and applications introduced demonstrate that a high profile system was obtained, which is capable of handling translation and rotation of micro-particles, and also, the quantification of the forces and torques exerted on a non-invasive or destructive way. The developed system is a pioneer in our country and provides a wide field of research and development.

3. INTRODUCCIÓN

Desde las observaciones de las colas de cometas hechas por Kepler en el siglo XVII se insinuó la posibilidad de que la luz pudiera ejercer algún tipo de fuerza mecánica sobre cuerpos materiales. Sin embargo, no fue sino hasta la formulación electromagnética de Maxwell que se tuvo una idea clara y un soporte teórico de la presión de radiación. Posteriormente, y a pesar de las primeras observaciones experimentales de las fuerzas de presión de radiación (Nichols and Hull, 1903a, 1903b), decayó el interés en el área debido a las muy bajas magnitudes de las fuerzas, que no superaban ni a la fuerza gravitacional ni a la de fricción, lo que dificultaba significativamente su medición y manipulación, es decir, las hacía tecnológicamente inútiles.

No obstante, luego de la invención del láser, Arthur Ashkin, Steven Chu y sus colaboradores, aprovecharon precisamente las fuerzas débiles, producidas por un haz láser ligeramente enfocado, para impulsar microesferas dieléctricas en un medio acuoso, también atraparlas completamente usando dos haces enfrentados (Ashkin, 1970). Estos experimentos demostraron, por primera vez, que la presión de radiación es idónea para la manipulación de objetos microscópicos, e incluso sugirieron la posibilidad experimental de atrapar átomos individualmente.

Luego de varios trabajos del grupo de Ashkin dedicados a la levitación de partículas (Ashkin and Dziedzic, 1975)(Ashkin and Dziedzic, 1980), a la observación y análisis de dispersión (Ashkin and Dziedzic, 1980)(Ashkin and Dziedzic, 1981) y al atrapamiento de partículas utilizando haces alternados (Ashkin, 1984; Ashkin and Dziedzic, 1985), en 1986 se logra el primer confinamiento óptico de micropartículas con un único haz fuertemente enfocado por medio de un objetivo de microscopio de inmersión (Ashkin et al., 1986). A partir de este momento, y vistas las capacidades de atrapar y manipular micropartículas, así como ejercer y medir fuerzas del orden de los piconewton, las pinzas ópticas se convierten en el centro de atención de muchos campos de investigación, principalmente en las ciencias biológicas, los sistemas coloidales, la micro y nanoreología, la nanotecnología, y la óptica y la física teórica para estudiar fenómenos nunca antes observados, en los límites contrarios de la física estadística y la mecánica cuántica. Por ejemplo, Kuo (Kuo, 2001) así como Lang y Block (Lang and Block, 2003) recogen cientos de referencias de trabajos sobre mediciones de fuerzas en biología y sistemas coloidales.

Aunque todavía no se tiene una idea completa de todos los fenómenos involucrados, una pinza óptica se basa en la utilización de la fuerza debida a la presión de radiación que ejerce un haz de luz fuertemente enfocado para confinar partículas en la escala micro y nanométrica. Esto se logra generalmente mediante la utilización de un objetivo de microscopio de alta apertura numérica, que

concentra un haz láser. Dependiendo de la relación entre la longitud de onda de la luz de atrapamiento y el tamaño de la partícula atrapada existen dos acercamientos teóricos para entender las fuerzas ópticas. Por una parte, cuando las partículas son mucho más pequeñas que la longitud de onda se aplica la teoría de esparcimiento de Rayleigh, de modo que éstas son tratadas como dipolos eléctricos puntuales (Harada and Asakura, 1996). En contraste, cuando la partícula es al menos un orden de magnitud más grande que la longitud de onda, los objetos atrapados pueden modelarse como pequeñas lentes que refractan los rayos de luz, redireccionando el momentum de los fotones incidentes (Grier, 2003). De esta forma las herramientas de la óptica geométrica son empleadas en el que se denomina régimen de Mie (Ashkin, 1998). Para el caso intermedio, y el caso general, es necesario un modelo que tenga en cuenta todos los aspectos electromagnéticos involucrados en la interacción entre la partícula y la luz de atrapamiento. En este caso se utiliza la teoría generalizada de Lorentz – Mie, acompañada usualmente por herramientas de cálculo y métodos numéricos dada su complejidad.

Las fuerzas resultantes que provocan el atrapamiento usualmente se clasifican en dos clases: una fuerza de gradiente, proporcional al gradiente de la intensidad, que impulsa a la partícula hacia la zona de mayor intensidad en el centro del punto focal; y una fuerza de *scattering* o dispersión, que impulsa la partícula lejos del foco en la dirección de propagación. La estabilidad de la trampa óptica recae en el dominio de la fuerza de gradiente sobre la fuerza de *scattering*, y se logra cuando el haz diverge rápidamente del foco.

Una vez la partícula ha sido atrapada, es posible manipular su ubicación dentro de la muestra cambiando la inclinación o la divergencia del haz que ingresa al objetivo, o moviendo la muestra misma respecto al punto focal por medio de microposicionamiento mecánico. El paso siguiente es proceder a medir la magnitud de la fuerza que ejerce la pinza óptica sobre la partícula atrapada, lo cual permite obtener un instrumento calibrado para la ejecución y medición de fuerzas en los sistemas que se deseen intervenir.

Aunque una pinza óptica que se puede desplazar por la muestra y arrastrar partículas es un sofisticado instrumento actuador y transductor, su utilidad es limitada debido a que sólo ofrece un punto de sujeción. Para superar esta restricción y potenciar aún más las aplicaciones del confinamiento óptico, se introducen las pinzas ópticas múltiples. Éstas se pueden lograr por varios métodos, a saber:

- Ingresar dos haces independientes al objetivo de microscopio, cada uno de los cuales forma una pinza manipulable individualmente, en puntos diferentes. Sin embargo, este sistema puede llegar a ser demasiado aparatoso.

- Programar un barrido de la pinza por la muestra, manteniéndola cortos instantes en puntos definidos que señalan la ubicación de cada una de las trampas. Este procedimiento se conoce como *scanned optical tweezers* o *laser-scanning micromanipulation* (Sasaki et al., 1991). Sin embargo, para que sea exitoso, se debe garantizar que i) el tiempo de permanencia de la pinza en cada punto sea suficientemente largo, de manera que las partículas que se han desplazado a la deriva puedan ser reposicionadas, y ii) que el tiempo del ciclo de barrido sea lo suficientemente corto para evitar que las partículas se escapen, por acción del movimiento browniano, antes de que vuelva el haz a sujetarlas. Además de su complejidad, este tipo de pinzas ópticas está restringido a trabajar en el plano focal; no obstante, pueden ser muy útiles para formar arreglos planos de partículas coloidales (Grier, 2003), para probar nuevas ideas en mecánica estadística (Faucheux et al., 1995) y medir interacciones macromoleculares (Verma et al., 1998).
- Manipular el frente de onda que ingresa al objetivo, empleando un modulador espacial de luz en el que se proyectan hologramas generados por computador, para lograr trampas en el número, ubicación y morfología deseada (Dufresne, 1998; Reichert et al., 1999; Liesener et al., 2000; Dufresne et al., 2001; Curtis et al., 2002). Esta es actualmente la forma más eficiente, versátil y robusta de hacer pinzas ópticas múltiples, y la que utilizó en el presente trabajo.

Además del transporte y la transferencia de momentum lineal de la luz, la transferencia de momentum angular a partículas ha sido muy intensamente investigada en los últimos años (Parkin et al., 2007). La habilidad para ejercer torque óptico, con el que pueda manipularse rotacionalmente micropartículas, revela un campo más amplio de aplicaciones, gracias a que se gana total control tridimensional del objeto atrapado. La rotación permite la orientación controlada de especímenes, el estudio de propiedades de biomoléculas y la conducción de micromáquinas como microbombas para análisis de flujos microscópicos, entre otras aplicaciones.

El torque óptico siempre resulta de la conservación del momentum angular cuando éste se transfiere del haz a la partícula. Así, la rotación se produce cuando el haz incidente lleva momentum angular, o cuando no lo lleva pero le es inducido por la partícula. La naturaleza del momentum angular que lleva la luz, es decir, si es orbital, de *espín* o ambos, define los mecanismos por los cuales se logra la rotación de las partículas según sus características (v.gr. morfología, anisotropías, tamaño, asimetrías y absorción). El momentum angular de *espín* está relacionado con la polarización circular de la luz, mientras que el orbital está relacionado con una estructura circular de la distribución de la energía en el haz, como ocurre por ejemplo en los haces tipo Laguerre - Gauss o modos helicoidales (Allen et al., 1992; Simpson et al., 1996).

Sin embargo, existen otras formas de rotar partículas. Por ejemplo, dos pinzas ópticas que sujetan una micropartícula alargada por sus extremos, pueden hacerla girar sin que intervenga el estado de polarización de la luz (Bingelyte et al., 2003). Alternativamente, pueden utilizarse distribuciones no circulares de intensidad, en las cuales las partículas alargadas se confinan bajo el principio básico de la fuerza de gradiente. Un método más complejo emplea botellas de luz para manipular espacialmente partículas (Arlt and Padgett, 2000).

En resumen, un sistema de pinzas ópticas es un instrumento actuador y sensor en la escala micro y nanométrica, que se fundamenta en el transporte de los momentos lineal y angular de la luz para la captura, traslación y rotación de partículas. Explotar todas las capacidades de este sistema requiere caracterizar las fuerzas y torques ópticos que ejerce, así como garantizar la movilidad controlada de los especímenes.

Este trabajo tiene como principal objetivo caracterización y cuantificación de fuerzas y torques ejercidos en un sistema de pinzas ópticas, de tal manera que obtenga un equipo con las características necesarias para su inserción inmediata en las áreas de investigación actuales y futuras en nuestra Sede. Al ser una herramienta ampliamente reconocida internacionalmente por sus bondades, la apropiación de esta tecnología resulta de gran importancia e interés para nuestra comunidad científica.

En primer lugar se exponen los aspectos teóricos más relevantes para hacerse a una idea clara de los fenómenos presentes durante el proceso de atrapamiento. Se detallan las aproximaciones de Rayleigh y de Mie, que son muy útiles dadas sus herramientas matemáticas simples, y se introduce la teoría generalizada mostrando los principales trabajos al respecto. En segundo lugar se presenta la teoría, montaje experimental y resultados para el proceso de calibración de las fuerzas por los dos métodos más comunes, con el detalle y rigurosidad necesarios para obtener una herramienta de alta precisión y versatilidad. Finalmente, medidas de transferencia de momentum angular, torque y algunas aplicaciones completan el trabajo, mostrando la teoría básica y montajes experimentales requeridos.

Como resultado de este trabajo se obtuvo por primera vez en Colombia un sistema de pinzas ópticas con las más altas prestaciones para la manipulación de objetos micrométricos que queda al servicio de la comunidad científica y académica local. La calidad de los equipos implementados y los resultados experimentales demuestran que el sistema desarrollado es de primer nivel.

4. FÍSICA DE LAS PINZAS ÓPTICAS

4.1. INTRODUCCIÓN

Las fuerzas responsables del atrapamiento en una pinza óptica se pueden entender en términos del cambio temporal del flujo de momentum del haz incidente, que es resultado de la transferencia de dicho momentum a la partícula atrapada (Nieminen, Knöner, et al., 2007). Debe tenerse en cuenta que la magnitud del momentum que porta un fotón en un rayo de luz que se propaga en un medio de índice de refracción n , aplicando la Ley de Planck y la Ley de Einstein, está dada por (Ashkin, 2006):

$$p = \hbar k = \frac{h}{\lambda} = \frac{nh\nu}{c} = \frac{nE}{c} \quad (1)$$

Donde $\hbar = h/2\pi$ con h la constante de Planck, $k = 2\pi/\lambda$ es la magnitud del vector de onda, donde λ es la longitud de onda de la luz en el medio de propagación, $\nu = c/\lambda$ es la frecuencia de la luz, con c la velocidad de la luz en el vacío respectivamente y $E = h\nu$ es la energía del fotón. Considerando entonces el flujo de energía de un rayo, podemos tener el flujo de momentum:

$$\phi_p = \frac{nP}{c} \quad (2)$$

con P la potencia o flujo de energía.

Las fuerzas generadas por el intercambio de momentum se pueden descomponer en una componente axial, en la dirección de propagación, y otra transversal o radial, ortogonal a la dirección de propagación. A grandes rasgos, la componente axial se relaciona con la divergencia o convergencia del haz, de modo que a mayor convergencia o divergencia, menor el flujo de momentum; mientras que la componente radial se relaciona con la dirección global del haz, es decir, si el haz es desviado en cierta dirección, gana momentum transversal en esa misma dirección, y la partícula sufre una fuerza reactiva en la dirección opuesta.

La forma más simple de hacerse una idea del comportamiento de las fuerzas en un sistema de pinzas ópticas es asumiendo que la partícula atrapada funciona como una pequeña lente positiva de baja potencia óptica como se muestra en la Figura 4.1 (Nieminen, Knöner, et al., 2007). Si la partícula está centrada en el foco, los rayos de luz pasarán por su centro sin ser desviados y no

sufrirá fuerza; será un estado de equilibrio. Si la partícula está antes del foco, aumenta la convergencia del haz y por lo tanto disminuye su flujo de momentum. Tal disminución corresponde a un incremento del momentum de la partícula, equivalente a la acción de una fuerza en la dirección de propagación, que la empuja hacia el foco. Cuando la partícula está después del foco, disminuye la divergencia del haz aumentando su flujo de momentum. Dicho aumento corresponde ahora a un incremento del momentum de la partícula, equivalente a la acción de una fuerza que la lleva al foco. Si la partícula se encuentra desplazada lateralmente con respecto al foco, el haz es desviado y ganará momentum en la dirección de desvío. Por lo tanto, la partícula sufrirá una fuerza en la dirección opuesta que la dirige al foco. En resumen, tanto las fuerzas axiales, como las transversales operan como fuerzas restauradoras.

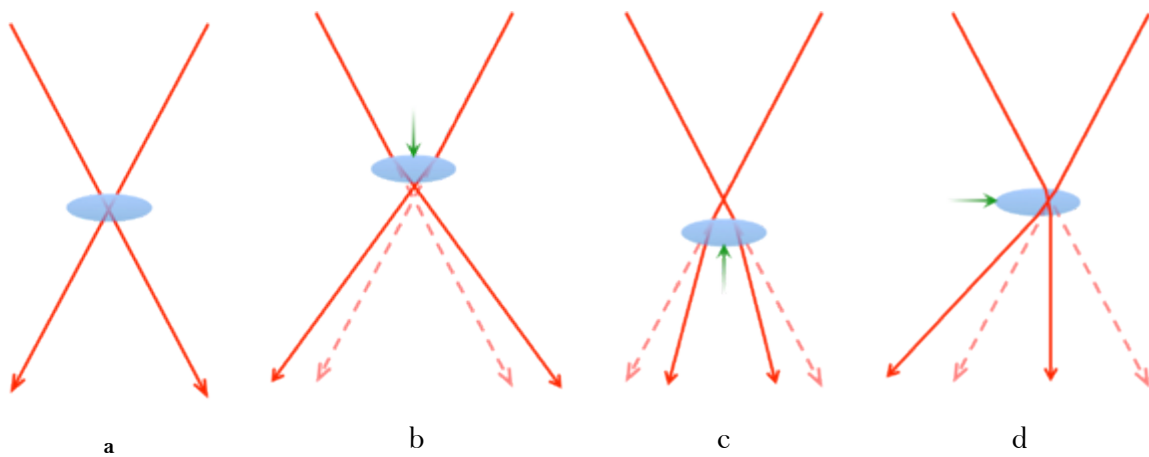


Figura 4.1. Modelo simplificado de las fuerzas en una pinza óptica asumiendo que la partícula atrapada se comporta como una pequeña lente. (a) la partícula está centrada en el foco: los rayos de luz pasan por su centro sin ser desviados, de tal forma que la partícula no sufre ninguna fuerza. En los casos en los que la partícula está alejada del foco, situaciones (b) a (d), los cambios en la divergencia o dirección del haz provocan la aparición de fuerzas restauradoras que empujan la partícula hacia al foco.

Es importante tener en cuenta que este modelo es una ligera aproximación con cierta cercanía cualitativa al fenómeno de atrapamiento de partículas por un haz luminoso. De hecho, son muy pocas las partículas que, en la práctica, se comportan como una pequeña lente. Además, el modelo no tiene en cuenta la reflexión de algunos rayos que desplaza el punto de equilibrio de la partícula ligeramente fuera del foco, en la dirección de propagación.

Aunque en realidad los fenómenos fundamentales son los mismos, convencionalmente se han dividido las fuerzas en una pinza óptica en dos clases:

- Fuerza de *scattering*, ligada a fenómenos de esparcimiento, la cual es proporcional a la intensidad del campo y es aplicada en dirección de la propagación de la luz.

- Fuerza de gradiente, llamada así por su dependencia con el gradiente espacial de la intensidad de la luz, el cual le da su dirección.

Una formalización más rigurosa de las fuerzas ópticas de confinamiento se logra a partir de algunas consideraciones. Cuando el diámetro de la partícula atrapada es mucho mayor que la longitud de onda del haz, se cumplen las condiciones de la Solución de Mie (o *scattering* de Mie), la cual se basa en la óptica geométrica para cuantificar las fuerzas. En este contexto, las desviaciones de los rayos de luz debidos a reflexiones y refracciones dan origen a cambios en el flujo de momentum de la luz, los cuales se manifiestan en fuerzas sobre la partícula que obedecen los principios de conservación y las leyes de Newton para la fuerzas (Neuman and Block, 2004). Este modelo se encuentra muy bien descrito y desarrollado en los trabajos de Ashkin (Ashkin, 1998) y Wright *et ál.* (Wright et al., 1993, 1994), y en primera instancia por Roosen e Imbert (Roosen and Imbert, 1976).

Por otra parte, cuando la partícula es mucho más pequeña que la longitud de onda, debe aplicarse la teoría de esparcimiento de Rayleigh se cumple, y la partícula se puede tratar como un dipolo puntual. La relación entre el tamaño de la partícula y la longitud de onda permite considerar que el campo instantáneo es homogéneo dentro de toda la partícula y por lo tanto se pueden aplicar las ecuaciones de la electrostática. Como el campo eléctrico oscila armónicamente en el tiempo, el dipolo puntual inducido sigue sincrónicamente el campo, y por lo tanto la partícula se comporta como un dipolo puntual oscilante, ubicado en el centro de la partícula, que radia ondas secundarias en todas las direcciones (Harada and Asakura, 1996). En este marco, las dos componentes de las fuerzas están claramente diferenciadas: la fuerza de *scattering* es debida a la absorción y reemisión de la luz por el dipolo, mientras la fuerza de gradiente resulta de la interacción del dipolo inducido con la distribución espacial del campo eléctrico.

Cuando el tamaño de la partícula se encuentra en el llamado régimen intermedio, no se pueden aplicar el modelo geométrico ni la teoría de esparcimiento de Rayleigh. Es necesaria una formulación general de la electrodinámica como la Teoría Generalizada de Lorentz – Mie, que es válida para todos los tamaños de partícula, pero que implica una gran cantidad de cálculos con importante complejidad.

4.2. RÉGIMEN DE RAYLEIGH

Como se dijo anteriormente, en la situación en la que la partícula atrapada tiene unas dimensiones mucho menores que la longitud de onda, el campo instantáneo dentro de su extensión se puede considerar homogéneo. De esta manera las ecuaciones de la electrostática se pueden emplear para

las fuerzas sobre la partícula, que se trata como un dipolo puntual inducido ubicado en su centro. Asimismo, la fuerza que sufre puede ser descompuesta en dos componentes: la fuerza de *scattering* y la fuerza de gradiente, que están asociadas con el cambio de momentum de la onda electromagnética debido al esparcimiento causado por el dipolo y a la fuerza de Lorentz que actúa sobre el dipolo inducido, respectivamente (Harada and Asakura, 1996).

Con un sistema de coordenadas cartesianas (x,y,z) , Figura 4.2, con origen en el centro de la cintura del haz, que tiene radio w_0 , y el haz propagándose en la dirección del eje z positivo, en un campo eléctrico instantáneo $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ en el punto $\mathbf{r}=(x,y,z)$, el momento de dipolo $\mathbf{d}(\mathbf{r},t)$ para una partícula de radio a está dado por:

$$\mathbf{d}(\mathbf{r},t) = 4\pi n_m^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \mathbf{E}(\mathbf{r},t) \quad (3)$$

donde $m = n_p/n_m$ es la relación entre el índice de refracción de la partícula n_p y el índice de refracción del medio n_m , en el cual está sumergida.

Asumiendo que el material es no absorbente, se puede tener que el dipolo puntual inducido está en fase con el campo eléctrico y oscila sincrónicamente con éste, radiando ondas secundarias en todas las direcciones, cambiando tanto la magnitud como la dirección de la onda electromagnética, y generando una transferencia de momentum cuya fuerza de *scattering* asociada se aplica sobre la partícula. Esta fuerza de *scattering* es:

$$\mathbf{F}_s(\mathbf{r}) = \frac{n_m \sigma_{pr} \langle \mathbf{S}(\mathbf{r},t) \rangle_T}{c} = \frac{n_m \sigma_{pr} I(\mathbf{r})}{c} \hat{z} \quad (4)$$

donde σ_{pr} es la sección transversal de la presión de radiación, $\langle \mathbf{S}(\mathbf{r},t) \rangle_T$ es el promedio temporal del vector de Poynting orientado en la dirección de propagación del haz \hat{z} , $I(\mathbf{r})$ es la intensidad del haz y c es la velocidad de la luz en el vacío.

Como la partícula es suficientemente pequeña, esparce la luz de forma isotrópica y la sección transversal de la presión de radiación es igual a la sección transversal de *scattering*, que es igual a:

$$\sigma_s = \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (5)$$

De acuerdo con la ecuación (4), la fuerza de *scattering* es proporcional a la intensidad de la luz y está orientada en la dirección de su propagación. La fuerte dependencia con el radio de la partícula

hace que la fuerza de scattering se pueda balancear solo en los casos en los que realmente la partícula sea pequeña.

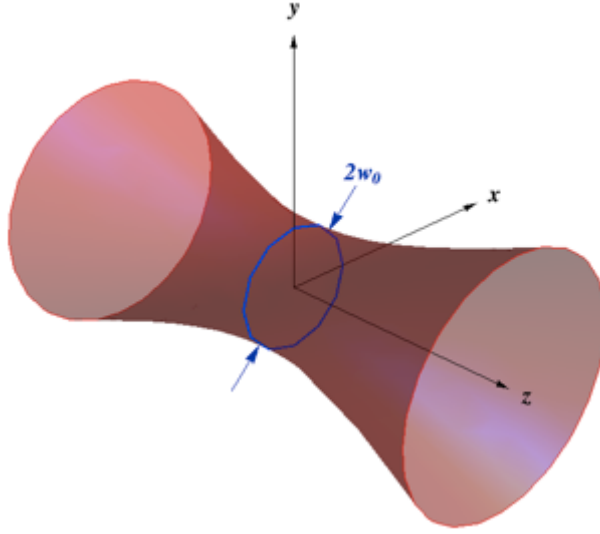


Figura 4.2. Geometría para el cálculo de la fuerza en el régimen de Rayleigh. Los ejes cartesianos tienen su origen en el centro de la cintura del haz, cuyo radio es w_0 . El haz se propaga de la dirección del eje z positivo.

Por otro lado, la fuerza de gradiente es el resultado de la interacción del dipolo eléctrico con el campo electromagnético inhomogéneo. La fuerza de Lorentz sobre un monopolo de carga q que se mueve con una velocidad $d\mathbf{r}/dt$ en presencia de un campo eléctrico $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ y uno magnético $\mathbf{B}(\mathbf{r},t)$ es de la forma:

$$\mathbf{F}(\mathbf{r},t) = q \left(\mathbf{E}(\mathbf{r},t) + \frac{d\mathbf{r}}{dt} \times \mathbf{B}(\mathbf{r},t) \right) \quad (6)$$

Ahora, la fuerza neta instantánea sobre el dipolo, cuyas cargas se encuentran en las posiciones \mathbf{r}_1 y \mathbf{r}_2 , se pueden escribir igualmente en términos de la fuerza de Lorentz, de la forma (Sehgal, 2010):

$$\mathbf{F}_{net}(\mathbf{r},t) = q \left(\mathbf{E}(\mathbf{r}_1,t) - \mathbf{E}(\mathbf{r}_2,t) + \frac{d(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)}{dt} \times \mathbf{B}(\mathbf{r},t) \right) \quad (7)$$

El campo eléctrico $\mathbf{E}(\mathbf{r}_1,t)$ y $\mathbf{E}(\mathbf{r}_2,t)$ se relacionan de la siguiente forma:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}_2,t) = \mathbf{E}(\mathbf{r}_1,t) + ((\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1) \cdot \nabla) \mathbf{E}(\mathbf{r},t) \quad (8)$$

Además, tomando el momento de dipolo eléctrico $\mathbf{d} = q(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)$, la ecuación (7) la podemos escribir como:

$$\mathbf{F}_{net}(\mathbf{r}, t) = (\mathbf{d} \cdot \nabla) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) + \frac{d\mathbf{d}}{dt} \times \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) \quad (9)$$

Si la magnitud del campo eléctrico es apropiada, el comportamiento de la partícula dieléctrica será lineal, es decir, el momento de dipolo eléctrico es proporcional al campo eléctrico aplicado, $\mathbf{d} = \alpha \mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$, con α la polarizabilidad de la partícula. Además, usando la identidad vectorial, aplicada al campo eléctrico:

$$\nabla \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t) = 2(\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \cdot \nabla) \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) + 2\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \times (\nabla \times \mathbf{E}(\mathbf{r}, t)) \quad (10)$$

y aplicando la Ley de Faraday, La ecuación (9) se convierte en

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{net}(\mathbf{r}, t) &= \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t) + \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \times \frac{d}{dt} \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) + \frac{d}{dt} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \times \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) \right) \\ \mathbf{F}_{net}(\mathbf{r}, t) &= \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t) + \frac{d}{dt} (\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) \times \mathbf{B}(\mathbf{r}, t)) \right) \\ \mathbf{F}_{net}(\mathbf{r}, t) &= \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t) + \frac{d}{dt} \mathbf{S}(\mathbf{r}, t) \right) \end{aligned} \quad (11)$$

Si la potencia del láser de atrapamiento es constante, el último término de la ecuación anterior, que es el cambio temporal del vector de Poynting, es nulo. Además, la fuerza neta en estado estacionario es el promedio temporal de la fuerza en la ecuación anterior, que tomando el nombre de fuerza de gradiente, se escribe entonces

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla \langle \mathbf{E}^2(\mathbf{r}, t) \rangle_T \right) \\ \mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla |E(\mathbf{r})|^2 \right) \\ \mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla I(\mathbf{r}) \right) \end{aligned} \quad (12)$$

Con $I(\mathbf{r})$ la intensidad del haz. Se puede ver claramente que la fuerza en la ecuación (12) es proporcional al gradiente de intensidad, y por lo tanto tiene tres componentes rectangulares que están dirigidos hacia la región de mayor incremento de intensidad del haz.

Una forma más robusta a la presentada anteriormente según Sehgal (Sehgal, 2010) es la presentada anteriormente por Harada & Asakura. Cuya geometría se muestra en la Figura 4.2. A

partir del momento de dipolo en la ecuación (3), y de la energía en un campo aplicado, la fuerza de gradiente instantánea está definida como:

$$\begin{aligned}\mathbf{F}_G(\mathbf{r},t) &= (\mathbf{d}(\mathbf{r},t) \cdot \nabla) \mathbf{E}(\mathbf{r},t) \\ \mathbf{F}_G(\mathbf{r},t) &= 4\pi n_m^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \frac{1}{2} \nabla \mathbf{E}^2(\mathbf{r},t)\end{aligned}\quad (13)$$

Donde se ha aplicado la identidad vectorial (10) de forma análoga al caso anterior. Del mismo modo, para el caso estacionario, la fuerza de sobre la partícula gradiente es el promedio temporal de la ecuación (13):

$$\begin{aligned}\mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= \langle \mathbf{F}_G(\mathbf{r},t) \rangle_T \\ \mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= 4\pi n_m^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \frac{1}{2} \nabla \langle \mathbf{E}^2(\mathbf{r},t) \rangle_T \\ \mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= \pi n_m^2 \epsilon_0 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla |E(\mathbf{r})|^2 \\ \mathbf{F}_G(\mathbf{r}) &= \frac{2\pi n_m a^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I(\mathbf{r})\end{aligned}\quad (14)$$

Es importante notar que esta fuerza es, además, proporcional al volumen de la partícula, es decir, que depende de forma más moderada del tamaño de la misma, comparada con la fuerza de *scattering*.

Adicionalmente, Harada & Asakura consideran el haz con la forma de un haz gaussiano en la aproximación del orden cero, con el campo eléctrico linealmente polarizado paralelo al eje x y propagándose en dirección del eje z positivo, cuya intensidad está dada por:

$$I(\mathbf{r}) = \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1 + 4\tilde{z}^2} \exp \left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1 + 4\tilde{z}^2} \right] \quad (15)$$

donde P es la potencia del haz, según $P = \pi w_0^2 n_m \epsilon_0 c E_0^2 / 4$, con E_0 la intensidad del campo eléctrico en el centro de la cintura del haz, cuya cintura tiene radio w_0 . Las coordenadas \tilde{x} , \tilde{y} y \tilde{z} , son coordenadas espaciales normalizadas, definidas por $(\tilde{x}, \tilde{y}, \tilde{z}) = (x/w_0, y/w_0, z/kw_0^2)$, en donde $k = 2\pi/\lambda$ es la magnitud del vector de onda en el medio.

La ecuación (15) resulta de la aproximación paraxial de un haz gaussiano escalar, el cual es muy diferente a un haz fuertemente enfocado, ya que en este último ningún componente

electromagnético puede ser despreciado. Por tal motivo, Harada & Asakura introducen el parámetro adimensional

$$s = \frac{\lambda}{2\pi w_0} \quad (16)$$

que permite estimar la precisión de la aproximación paraxial en situaciones específicas. En efecto, estos autores muestran que tal descripción, en términos de las componente eléctricas y magnéticas solamente, es válida para los casos en que $\lambda \ll w_0$, es decir, $s \ll 1$, y demostraron que, bajo estas condiciones, la aproximación de orden cero tiene errores de 0.817% para $s=0.02$ ($w_0 \approx 8\lambda$), y de $\sim 4.37\%$ para $s=0.1$ ($w_0 \approx 1.6\lambda$).

Reemplazando la ecuación (15) en la ecuación (4) para la fuerza de *scattering*, se obtiene:

$$\mathbf{F}_s(\mathbf{r}) = \frac{128\pi^5 n_m a^6}{3c\lambda^4} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2 \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{1}{1+4\tilde{z}^2} \exp\left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1+4\tilde{z}^2} \right] \hat{z} \quad (17)$$

Para la fuerza de gradiente, se tienen las tres componentes cartesianas de la fuerza:

$$\mathbf{F}_{G,x}(\mathbf{r}) = -\frac{2\pi n_m a^3}{c} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2 \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{4\tilde{x}}{w_0(1+4\tilde{z}^2)^2} \exp\left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1+4\tilde{z}^2} \right] \hat{x} \quad (18)$$

$$\mathbf{F}_{G,y}(\mathbf{r}) = -\frac{2\pi n_m a^3}{c} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2 \left(\frac{2P}{\pi w_0^2} \right) \frac{4\tilde{y}}{w_0(1+4\tilde{z}^2)^2} \exp\left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1+4\tilde{z}^2} \right] \hat{y} \quad (19)$$

$$\mathbf{F}_{G,z}(\mathbf{r}) = -\frac{2\pi n_m a^3}{c} \left(\frac{m^2-1}{m^2+2} \right)^2 \left(\frac{8P\tilde{z}}{\pi^2 w_0^4 (1+4\tilde{z}^2)^2} \right) \left(1 - \frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1+4\tilde{z}^2} \right) \exp\left[-\frac{2(\tilde{x}^2 + \tilde{y}^2)}{1+4\tilde{z}^2} \right] \hat{z} \quad (20)$$

La fuerza total que sufre una partícula atrapada en una pinza óptica, en el régimen de Rayleigh, es la suma de las componentes en las ecuaciones (17) a (20). Además, se puede ver claramente que la fuerza tiene simetría de revolución respecto al eje z , lo cual es de esperar dado el perfil de intensidad, y al hecho de que para $m > 1$ están dirigidas hacia el centro de la cintura del haz. Por otra parte, las componentes transversales $\mathbf{F}_{G,x}$ y $\mathbf{F}_{G,y}$ tienen sus máximos en $(x,y,z) = (\pm w_0/2, 0, 0)$ y $(x,y,z) = (0, \pm w_0/2, 0)$ respectivamente, mientras que $\mathbf{F}_{G,z}$, la componente longitudinal en $(x,y,z) = (0, 0, \pm kw_0/2\sqrt{3})$.

En la Figura 4.3 se muestran los perfiles de las componentes x y z de la fuerza de gradiente. Las curvas fueron hechas tomando $w_0 = 1.5\lambda$, con una partícula de sílice de radio $a \cong 0.03\lambda$, índice de refracción $n_p = 1.45599$, y sumergida en un medio de índice $n_m = 1.332$. Con estas condiciones, el parámetro $s = 0.08$, y por lo tanto, se puede trabajar bajo las aproximaciones planteadas.

En la Figura 4.3 se puede ver que la morfología de la fuerza de gradiente sigue los cambios en la intensidad y presenta sus máximos en donde los cambios espaciales de la intensidad son más rápidos. Igualmente tiene un comportamiento típico de una fuerza restauradora que empuja la partícula atrapada hacia el punto de mayor intensidad. Se destaca además, que las curvas cruzan por el origen y determinan allí un punto de estabilidad. Por otro lado, la Figura 4.4 muestra la fuerza de *scattering* comparada con la componente longitudinal de la fuerza de gradiente. La fuerza de *scattering* se encarga de acelerar la partícula en la dirección de propagación, y debe ser superada por la fuerza de gradiente para que sea posible el confinamiento óptico. Se puede ver que, efectivamente para este caso, la magnitud de la fuerza de gradiente es mayor y permite retener la partícula.

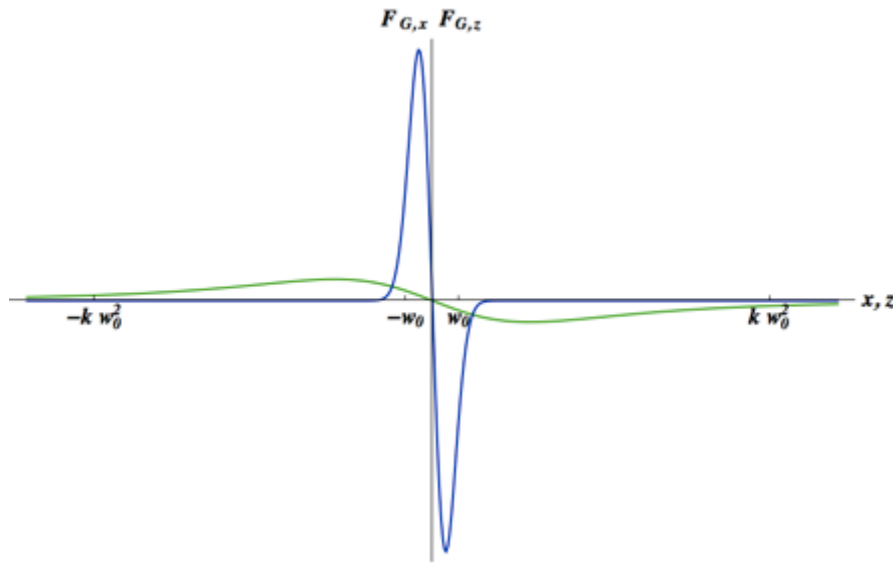


Figura 4.3. Perfiles de las componentes x (Azul) y z (Verde) de la fuerza de gradiente. Las dos curvas pasan por el origen, lo que significa que la fuerza de gradiente genera un punto de estabilidad en el máximo de intensidad y actúa como una fuerza restauradora para partículas cercanas a éste.

La relación de magnitudes entre las dos clases de fuerza no solo especifica la estabilidad de la pinza óptica y, sino que además determina el punto de estabilidad a lo largo del eje de propagación. La Figura 4.5 muestra la componente longitudinal de la fuerza total a lo largo del eje de propagación; en ella se puede ver que la curva ya no pasa por el origen sino que está ligeramente desplazada en

el sentido de la propagación. Esto quiere decir que la fuerza de *scattering* traslada el punto de equilibrio de la pinza hasta el punto en donde es equilibrada por la fuerza de gradiente. Se puede ver además que la simetría respecto al origen de la fuerza de gradiente está rota y que el movimiento de la partícula es ahora notablemente más restringido en dirección contrapropagante.

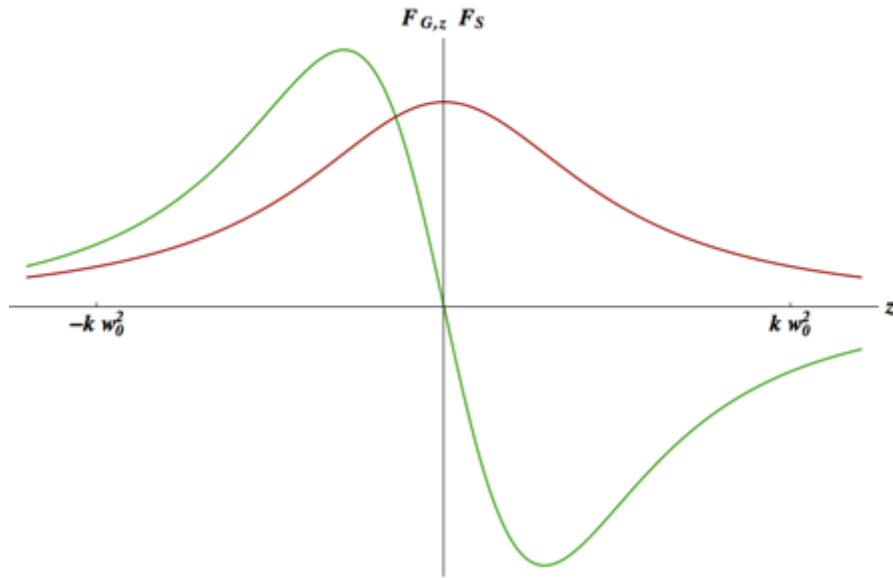


Figura 4.4. Componente longitudinal de la fuerza de gradiente (verde) y la fuerza de *scattering* (rojo) a lo largo del eje z . El hecho de que la fuerza de gradiente sea de mayor magnitud a la fuerza de *scattering* hace posible el atrapamiento en la pinza.

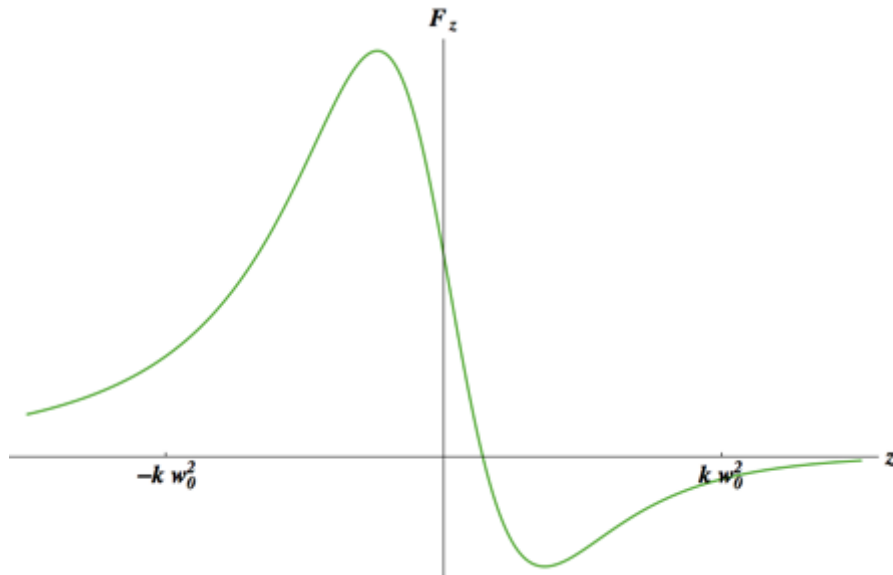
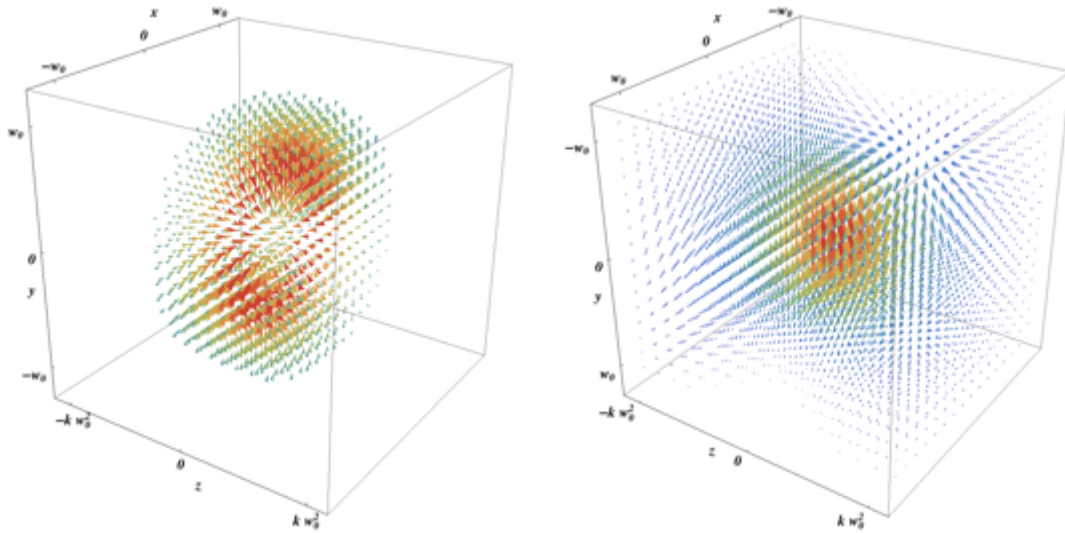


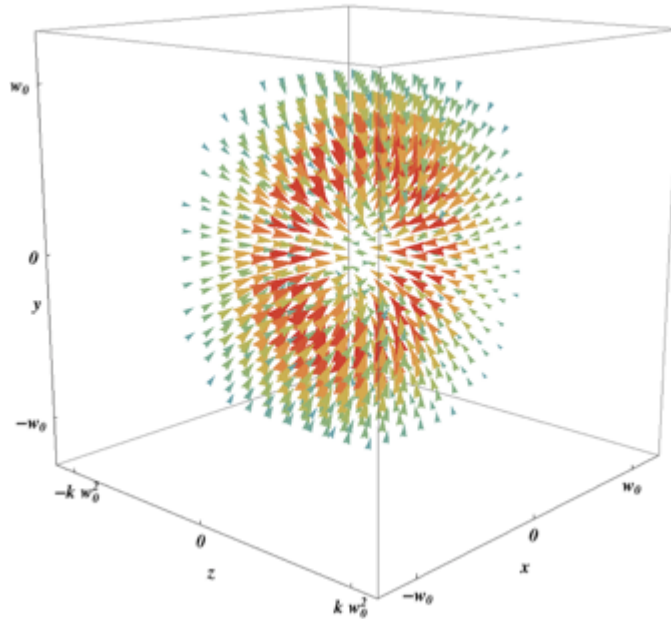
Figura 4.5. Componente longitudinal de la fuerza total a lo largo del eje z . Se puede ver que el punto de estabilidad está ligeramente desplazado del origen por acción de la fuerza de scattering y que ahora son notoriamente mayores las fuerzas en la dirección de propagación.

El campo de fuerzas generado por la fuerza de gradiente, la fuerza de *scattering* y la fuerza total se muestran en la Figura 4.6, calculados en *Mathematica*. Cada una de las flechas simboliza la fuerza que sufriría una partícula si estuviera en esa posición. El color y tamaño de cada flecha es indicativo de la magnitud de la fuerza. Se puede observar que el campo de fuerzas de gradiente está monótonamente dirigido hacia el origen, mientras las fuerzas de *scattering* se dirigen en el sentido de la propagación (Eje z).



a) Campo de fuerzas de gradiente.

b) Campo de fuerzas de *scattering*.



c) Campo de fuerzas total.

Figura 4.6. Campo de fuerzas de gradiente, de *scattering* y total. Cada flecha simboliza la fuerza que sufriría una partícula en un punto particular.

La Figura 4.7 muestra los campo de fuerza total en los planos xz y xy , superpuestos con el perfil de intensidad en los mismos.

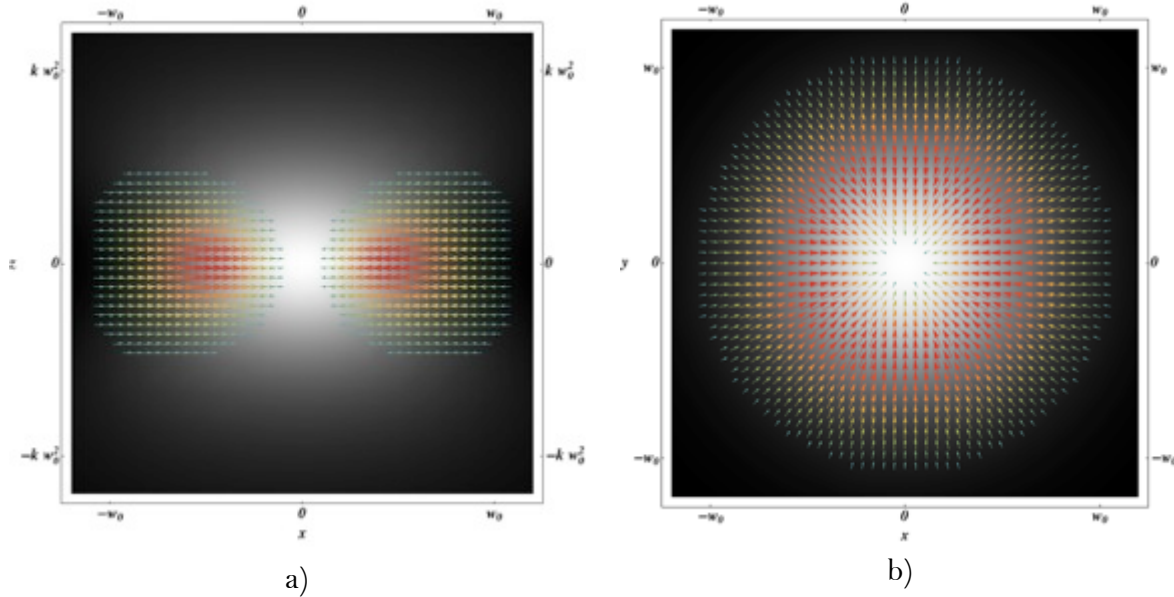


Figura 4.7. Perfiles de intensidad en los planos xz (a) y xy (b) con sus correspondientes campos de fuerzas.

4.3. RÉGIMEN DE MIE

La óptica geométrica ha mostrado ser una herramienta muy útil en la estimación de fuerzas en una pinza óptica desde los trabajos de Ashkin (Ashkin, 1998) y Wright *et ál.* (Wright et al., 1993, 1994), y Roosen e Imbert (Roosen and Imbert, 1976), como se comentó anteriormente. A partir de fundamentos y ecuaciones sencillas se pueden tener muy buenas aproximaciones bajo la condición de que la partícula sea al menos un orden de magnitud más grande que la longitud de onda.

La geometría de este análisis es la misma presentada por Ashkin, y se muestra en la Figura 4.8. Un rayo de potencia P , que viaja paralelo al eje z en un medio de índice de refracción n_m , incide sobre una esfera dieléctrica de índice n_p a un ángulo θ respecto a la normal de la superficie de la partícula en el punto de incidencia. Se puede asociar entonces a cada rayo un flujo de momentum como el de la ecuación (2), y así, la fuerza total sobre la esfera es la suma de las contribuciones debidas a los cambios en el flujo de momentum de los rayos al ser reflejados y refractados.

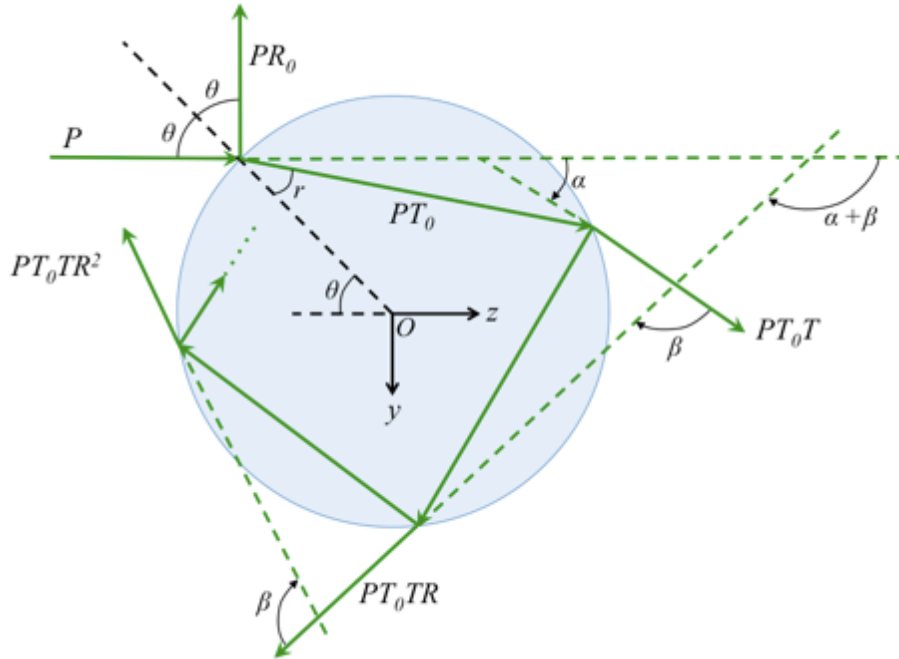


Figura 4.8. Diagrama para el cálculo de fuerzas sobre una partícula esférica dieléctrica a través de óptica geométrica. Por cada rayo de potencia P que incide sobre la partícula, es reflejado un rayo de potencia PR_0 , mientras se refracta uno de potencia PT_0 que da origen a una serie infinita de rayos emergentes.

Parte de la potencia del rayo incidente es reflejada en el rayo PR_0 , mientras que el resto se transmite en el rayo PT_0 , donde R_0 y T_0 son los coeficientes de reflexión y transmisión de Fresnel a un ángulo θ para el caso de incidencia desde el medio hacia el interior de la partícula. Ahora, a partir de ese primer rayo refractado hacia el interior de la partícula se genera una serie infinita de rayos emergentes; el primer rayo emergente tiene una potencia PT_0T , el segundo PT_0TR , el tercero PT_0TR^2 , y de esta forma sucesivamente, donde T y R son los coeficientes de Fresnel para el caso de incidencia desde en interior de la partícula hacia el medio, cuyo ángulo de incidencia es r como se muestra en la Figura 4.9. En esta figura se puede ver que el triángulo que se forma entre el punto de entrada del rayo, el centro de la partícula y el punto de salida, siempre es isósceles, y por lo tanto el ángulo de refracción al ingresar el rayo es el ángulo de incidencia al salir. Entonces, para los siguientes rayos reflejados internamente, el ángulo de incidencia hacia el medio siempre será r .

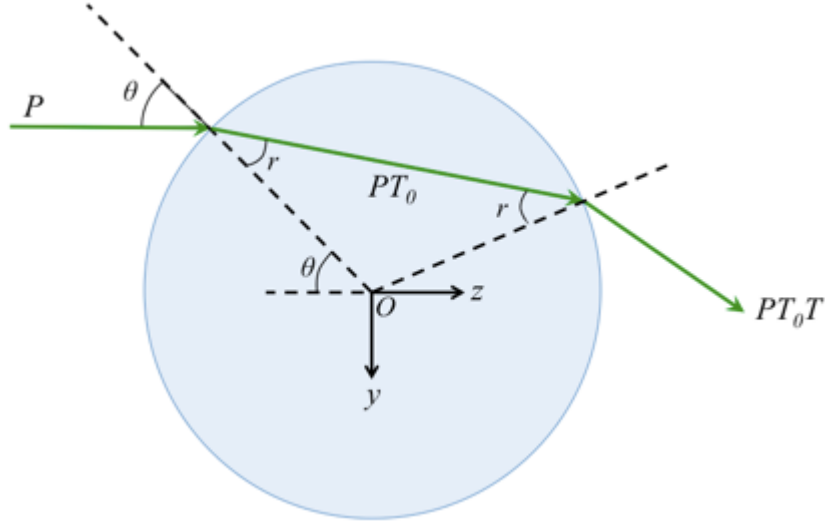


Figura 4.9. Diagrama de los ángulos de los rayos al ingresar y salir de la partícula. El triángulo que se forma entre el punto de ingreso del rayo, el centro de la partícula y el punto de salida del rayo, siempre es isósceles.

El cálculo de la fuerza producida por un rayo de luz se hace a partir del análisis de los cambios en dirección y potencia que sufre al incidir en sobre la partícula, lo cual corresponde al cambio en el flujo del momentum asociado al rayo. Luego, se descompone la fuerza en dos componentes ortogonales: Una componente longitudinal en la dirección del eje z positivo, denominada fuerza de *scattering*, y a otra transversal, en la dirección del eje y positivo que será la fuerza de gradiente. Dadas las condiciones de simetría, se tiene en cuenta que la componente x de la fuerza es idéntica a la componente en y .

Así, la fuerza de scattering se define como:

$$F_s = \Delta\phi_{p,z} = \frac{n_m \Delta P_z}{c} \quad (21)$$

donde en subíndice indica la dirección sobre la que se toman los cambios.

De la Figura 4.8 se tiene que la componente longitudinal del primer rayo reflejado tiene una potencia de $PR_0 \cos[\pi + 2\theta]$, mientras que el primer rayo transmitido, que hace un ángulo α respecto al incidente, tiene una potencia de $PT_0T \cos[\alpha]$. Ahora, el segundo rayo emergente hace un ángulo $\alpha + \beta$, mientras que el del tercero es $\alpha + 2\beta$. De esta forma, el rayo n emergente hará un ángulo $\alpha + n\beta$, con $n = 0, 1, 2, 3, \dots$, respecto al incidente y tendrá una potencia:

$$PT_0TR^n \cos[\alpha + n\beta] \quad \text{con} \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (22)$$

Con esto, podemos reescribir la ecuación (21) en la forma:

$$\begin{aligned}
F_S &= \frac{n_m P}{c} - \left\{ \frac{n_m P}{c} R_0 \cos[\pi + 2\theta] + \frac{n_m P}{c} \sum_{n=0}^{\infty} T_0 T R^n \cos[\alpha + n\beta] \right\} \\
F_S &= \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R_0 \cos[\pi + 2\theta] + T_0 T \sum_{n=0}^{\infty} R^n \cos[\alpha + n\beta] \right\}
\end{aligned} \tag{23}$$

Para la componente transversal, de forma análoga se tiene:

$$\begin{aligned}
F_G &= 0 - \left\{ \frac{n_m P}{c} R_0 \sen[\pi + 2\theta] + \frac{n_m P}{c} \sum_{n=0}^{\infty} T_0 T R^n \sen[\alpha + n\beta] \right\} \\
F_G &= \frac{n_m P}{c} \left\{ R_0 \sen[2\theta] - T_0 T \sum_{n=0}^{\infty} R^n \sen[\alpha + n\beta] \right\}
\end{aligned} \tag{24}$$

La suma de todas las fuerzas se puede calcular considerando la fuerza total en el plano complejo en la forma $F_T = F_S + iF_G$ (Roosen and Imbert, 1976; Ashkin, 1998). De esta forma

$$\begin{aligned}
F_T &= \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R_0 \cos[2\theta] - T_0 T \sum_{n=0}^{\infty} R^n \cos[\alpha + n\beta] + iR_0 \sen[2\theta] - iT_0 T \sum_{n=0}^{\infty} R^n \sen[\alpha + n\beta] \right\} \\
F_T &= \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R_0 \cos[2\theta] + iR_0 \sen[2\theta] - T_0 T \sum_{n=0}^{\infty} R^n \exp[i(\alpha + n\beta)] \right\}
\end{aligned} \tag{25}$$

Teniendo en cuenta que $0 < R \leq 1$, el último término de la ecuación anterior es una serie geométrica que se puede escribir como:

$$\sum_{n=0}^{\infty} R^n \exp[i(\alpha + n\beta)] = -\frac{\exp[i\alpha]}{R \exp[i\beta] - 1} \tag{26}$$

Reemplazando en la ecuación (25), racionalizando y organizando los términos se obtiene:

$$F_T = \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R_0 \cos[2\theta] + iR_0 \sen[2\theta] - T_0 T \frac{\exp[i\alpha](1 - R \exp[-i\beta])}{1 + R^2 - 2R \cos[\beta]} \right\} \tag{27}$$

De la geometría en la Figura 4.8 y aplicando la Ley de Snell se tienen las siguientes relaciones:

$$\alpha = 2\theta - 2r \quad \wedge \quad \beta = \pi - 2r \tag{28}$$

donde

$$r = \sen^{-1} \left[\frac{n_m}{n_p} \sen[\theta] \right] \tag{29}$$

De esta forma, reemplazando y separando de nuevo las partes real e imaginarias, se tienen las componentes longitudinal y transversal de la fuerza en función del ángulo θ .

$$\mathbf{F}_S(\theta) = \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R_0 \cos[2\theta] - T_0 T \frac{\cos[2\theta - 2r] + R \cos[2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos[2r]} \right\} \hat{z} \quad (30)$$

$$\mathbf{F}_{G,y}(\theta) = \frac{n_m P}{c} \left\{ R_0 \sin[2\theta] - T_0 T \frac{\sin[2\theta - 2r] + R \sin[2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos[2r]} \right\} \hat{y} \quad (31)$$

Es importante destacar que las ecuaciones anteriores están en función de los coeficientes de Fresnel, los cuales se definen para estados de polarización lineal particulares. Por lo tanto, dada la geometría de la partícula, la fuerza ejercida sobre ella por un haz linealmente polarizado y axialmente simétrico es independiente de la orientación del plano de polarización. Se escoge entonces, por conveniencia que la luz de atrapamiento esté circularmente polarizada con la mitad de la potencia en cada componente de polarización lineal, lo que justifica considerar el promedio de reflectancia y transmitancia, definidos como (Roosen and Imbert, 1976):

$$R = \frac{R_{\parallel} + R_{\perp}}{2} \quad \wedge \quad T = \frac{T_{\parallel} + T_{\perp}}{2} \quad (32)$$

en donde R_{\parallel} y T_{\parallel} , R_{\perp} y T_{\perp} son los coeficientes de intensidad de Fresnel de reflexión y transmisión para el campo eléctrico TE y TM.

Una forma alternativa es la que utilizan Ashkin y Roosen, al tomar el promedio de las fuerzas calculadas para cada estado de polarización, de la siguiente forma:

$$F = \frac{F_{\parallel} + F_{\perp}}{2} \quad (33)$$

Se introduce ahora la magnitud adimensional Q , que se relaciona con la fuerza de la siguiente forma:

$$Q = \frac{F}{(n_m P/c)} \quad (34)$$

Teniendo en cuenta que $n_m P/c$ es el momentum incidente por segundo de la luz de atrapamiento en el medio de índice de refracción n_m , la magnitud el parámetro Q cuantifica cuan eficiente es la transferencia de momentum entre la luz incidente y la partícula. En la Figura 4.10 se muestran las gráficas de Q_S , Q_G y la suma $Q_S + Q_G$ para una esfera de sílice sumergida en agua. Los signos de

las curvas están asociadas a las direcciones de las fuerzas, lo que permite apreciar la naturaleza restauradora de la fuerza de gradiente en particular. Por otra parte, los valores de la fuerza de *scattering* siempre son positivos, mostrando que siempre está dirigida en la dirección de propagación.

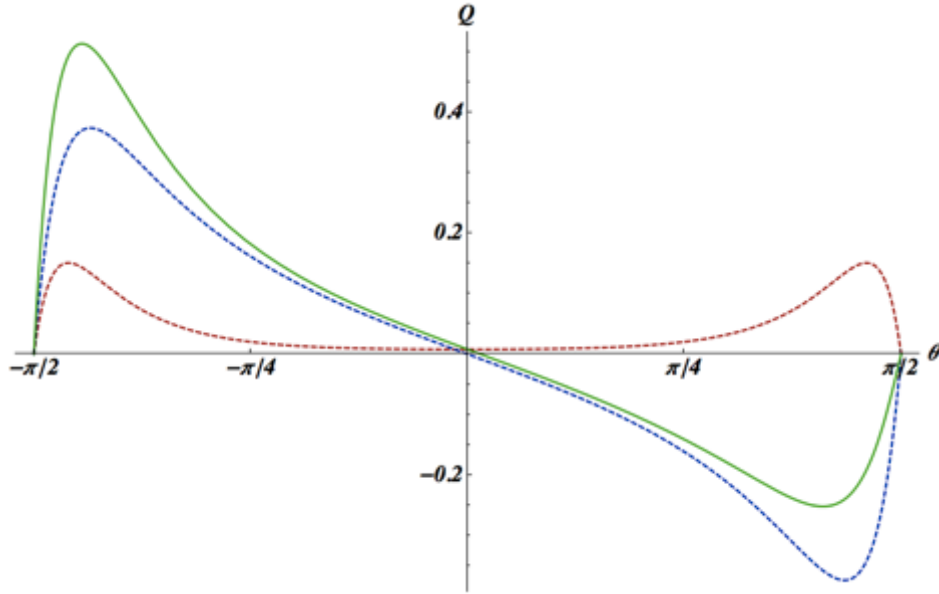


Figura 4.10. Gráfica de Q para la fuerza de scattering (rojo), la de gradiente (azul) y la suma de ambas (verde continua), para una esfera de sílice sumergida en agua.

Consideremos ahora algunas situaciones de particular interés. Supongamos que el centro de la esfera está desplazado una distancia S respecto al foco de atrapamiento a lo largo del eje z , como se muestra en la Figura 4.11. El objetivo tiene una apertura de entrada con un radio de $a_{\text{máx}}$ y una distancia focal f , y la esfera tiene un radio ρ . Un rayo particular, que ingresa al objetivo a una distancia a del eje z incide sobre la partícula haciendo un ángulo θ respecto a la normal de la superficie, y a un ángulo ϕ respecto al eje z . El plano de incidencia contiene al eje z y forma un ángulo β respecto al plano yz . Un rayo que ingrese a una distancia $a_{\text{máx}}$, formará un ángulo $\phi_{\text{máx}}$. Las fuerzas de gradiente y de scattering generadas por ese rayo particular se muestra también en la Figura 4.11. La simetría de la partícula y la simetría axial del haz de atrapamiento permiten inferir que para este caso las componentes transversales diametralmente opuestas de las fuerzas se cancelan una a la otra, y por lo tanto solo habrá componente longitudinal. De esta forma:

$$\begin{aligned} Q_{S,z} &= Q_S \cos[\phi] \\ Q_{G,z} &= -Q_G \text{sen}[\phi] \end{aligned} \quad (35)$$

Del triángulo que se forma entre el centro de la esfera, el punto de incidencia del rayo y el punto de intersección de la proyección del rayo con el eje z, se tiene la siguiente relación:

$$\rho \operatorname{sen}[\theta] = S \operatorname{sen}[\phi] \quad (36)$$

Además, de la geometría y la apertura numérica:

$$\tan[\phi] = \frac{a}{f} \quad \wedge \quad NA = n_m \operatorname{sen}[\phi_{\text{máx}}] \quad (37)$$

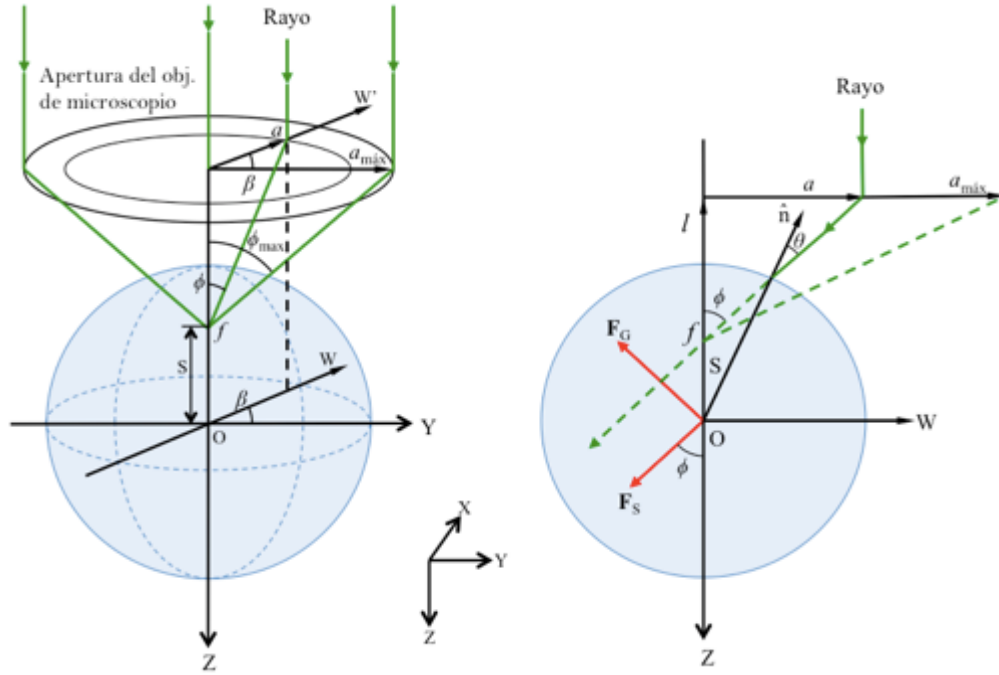


Figura 4.11. Geometría para el caso en que la partícula está desplazada longitudinalmente respecto al foco. La imagen de la derecha corresponde al corte en el plano de incidencia.

De esta forma, utilizando las ecuaciones (36) y (37) se obtiene θ y se pueden calcular Q_S y Q_G para un rayo. Para todo el haz, el procedimiento consiste en integrar para todos los valores de a y del ángulo β .

$$\begin{aligned} Q_{S,z} &= \frac{2\pi}{\pi a_{\text{máx}}^2} \int_0^{a_{\text{máx}}} Q_S \cos[\phi] a da \\ Q_{G,z} &= -\frac{2\pi}{\pi a_{\text{máx}}^2} \int_0^{a_{\text{máx}}} Q_G \operatorname{sen}[\phi] a da \end{aligned} \quad (38)$$

en donde

$$\theta = \text{sen}^{-1} \left[\frac{S}{R} \text{sen} \left[\tan^{-1} \left[\frac{a}{f} \right] \right] \right] \quad (39)$$

Para el caso en que el centro de la partícula se encuentra desplazado transversalmente sobre el eje y una distancia S' , Ashkin toma en cuenta que para este caso se deben considerar las contribuciones de cada estado de polarización de manera separada. Además, los cálculos de las diferentes fuerzas y componentes pierden la simetría entre los cuadrantes y es necesario atender muy detalladamente los signos y orientaciones de los ángulos implicados. Sin embargo, se pueden tener expresiones menos detalladas, que pueden ser útiles, como las reportadas por Sun Wei y colaboradores (Wei et al., 2000). Según la Figura 4.12, un rayo particular ingresa al objetivo a una distancia a del eje de la lente e incide sobre la esfera en el punto V sobre el plano de incidencia $AWW'f$, que es el plano de incidencia, formando un ángulo α respecto a la línea fW' . Las componentes de las fuerzas están contenidas en el plano fVO , el cual contiene el rayo incidente y el vector normal. El rayo incidente y el eje y forman un ángulo γ .

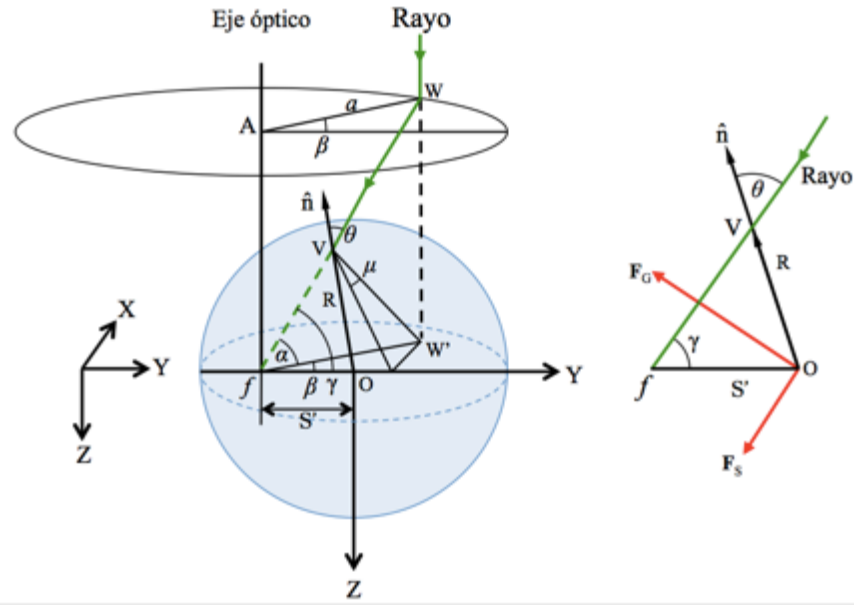


Figura 4.12. Geometría para el caso en que el foco está desplazado una distancia S' del centro de la esfera a lo largo del eje y .

De la geometría se obtienen además las siguientes relaciones para los ángulos de interés y para el cálculo de las fuerzas:

$$\begin{aligned} \tan[\alpha] &= l/a \\ \rho \text{sen}[\theta] &= S' \text{sen}[\gamma] \\ \cos[\gamma] &= \cos[\alpha] \cos[\beta] \end{aligned} \quad (40)$$

Con estas relaciones, se calculan entonces las contribuciones de todos los rayos a partir de las siguientes integrales:

$$Q_{S,z} = \frac{2}{\pi a_{\text{máx}}^2} \int_{\beta=0}^{\pi} \int_{a=0}^{a_{\text{máx}}} (Q_S \text{sen}[\alpha]) a da d\beta \quad (4.1)$$

$$Q_{G,z} = \frac{2}{\pi a_{\text{máx}}^2} \int_{\beta=0}^{\pi} \int_{a=0}^{a_{\text{máx}}} Q_G \left(-\frac{\text{sen}[\alpha]}{\tan[\gamma]} \right) a da d\beta \quad (4.2)$$

$$Q_{S,y} = \frac{2}{\pi a_{\text{máx}}^2} \int_{\beta=0}^{\pi} \int_{a=0}^{a_{\text{máx}}} Q_S (-\cos[\alpha] \cos[\beta]) a da d\beta \quad (4.3)$$

$$Q_{G,y} = \frac{2}{\pi a_{\text{máx}}^2} \int_{\beta=0}^{\pi} \int_{a=0}^{a_{\text{máx}}} Q_G (-\text{sen}[\gamma]) a da d\beta \quad (4.4)$$

Es importante recordar que las ecuaciones anteriores permiten calcular las componentes de las diferentes fuerzas, pero no tienen en cuenta los efectos de polarización.

El caso generalizado cuando el foco del haz se encuentra en cualquier punto del espacio se infiere de forma similar, dando origen a ecuaciones aún más complejas, pero con la misma forma de cálculo.

4.4. APLICABILIDAD, RESTRICCIONES Y TEORÍA GENERALIZADA

La validez de las aproximaciones geométricas y de Rayleigh está limitada a casos límite, pero han demostrado ser muy útiles en sus rangos. En el caso del modelo de óptica geométrica, su aplicabilidad se reduce a casos en los que el tamaño mínimo de la partícula sea al menos de 10λ , o más estrictamente unos 20λ . Además, la fenomenología no queda satisfactoriamente descrita por solamente los fenómenos de reflexión y refracción de rayos de luz. Por otra parte, es claro que en el foco de un haz fuertemente concentrado, la óptica geométrica colapsa y sería imposible considerar partículas en la escala del segmento focal real. Sin embargo, se ha mostrado la utilidad del modelo geométrico para el cálculo de fuerzas en los casos donde es aplicable, con muy buen acuerdo con medidas experimentales (Wright et al., 1994)(Wright et al., 1993)(Gauthier and Wallace, 1995)(Kawauchi et al., 2007), con la considerable ventaja de la simplicidad de los cálculos y la formulación teórica.

El marco conceptual del esparcimiento de Rayleigh permite tener una noción más cercana a la realidad respecto a la verdadera naturaleza de los fenómenos tras las fuerzas en las pinzas ópticas.

Harada y Asakura mostraron (Harada and Asakura, 1996), sin embargo, que la validez de la aproximación se limita para los casos en los que el radio de la partícula sea menor a $\lambda/20$. Para radios mayores, la fuerza de *scattering* difiere fuertemente comparado con cálculos exactos hechos con la teoría generalizada de Lorentz – Mie. A pesar de esto, la fuerza de gradiente presenta un muy buen comportamiento, extendiendo su rango de validez al llamado régimen intermedio, hasta llegar a dimensiones comparables con la sección focal, a partir de las cuales pierde su validez debido a que desaparece la dependencia con el volumen de la esfera en la teoría generalizada. Es decir, la aplicabilidad de la aproximación de Rayleigh para la fuerza de gradiente está limitada por el tamaño del spot en el foco respecto al tamaño de la partícula. Solo cuando la partícula es de un tamaño menor que el spot del foco se puede aplicar la suposición de que el campo eléctrico dentro de la partícula es homogéneo, lo que permite reducir el modelo a un dipolo puntual en el sentido de la electrostática. Esta limitación se puede superar aplicando la aproximación de Rayleigh – Debye para el momento de dipolo de una partícula dieléctrica de tamaño finito.

A pesar de la utilidad que puedan tener las aproximaciones presentadas, la gran mayoría de los casos de interés recae en el régimen intermedio. De esta forma, si se requiere tener un modelo que abarque todo los rangos de trabajo, se requiere utilizar la teoría exacta electromagnética, que tenga en cuenta que en los haces fuertemente concentrados la cintura del haz tiene un tamaño límite y las componentes electromagnéticas axiales no se pueden despreciar. Además, fenómenos resonantes e interferométricos son muy notorios cuando la partícula es comparable con la longitud de onda, sin contar posibles efectos no lineales debidos a las altas concentraciones de luz.

Se han realizado varios trabajos utilizando diferentes estrategias de cálculo, métodos numéricos y computacionales. Mazolli *et ál.* derivan una representación de las fuerzas en pinzas ópticas sobre una esfera dieléctrica con una serie explícita de ondas parciales (Mazolli et al., 2003). Ganic *et ál.* mostraron un cálculo exacto a partir de la teoría vectorial de difracción (Ganic et al., 2004). El equipo de Rubinsztein-Dunlop ha desarrollado herramientas computacionales utilizando la teoría generalizada Lorentz – Mie y con el método de la matriz-T (Nieminen, Rubinsztein-Dunlop, Heckenberg, et al., 2001; Nieminen, Knöner, et al., 2007; Nieminen, Loke, et al., 2007) que incluso puede calcular para partículas no esféricas (Nieminen, Rubinsztein-Dunlop, and Heckenberg, 2001). También hay trabajos para pinzas ópticas con campos electromagnéticos arbitrarios (Rohrbach and Stelzer, 2001), para partículas muy generales (Bonessi et al., 2007) e incluso estados de polarización radiales (Kawauchi et al., 2007).

Sin embargo, a pesar de que se pueden tener cálculos teóricos de mucha calidad, la cantidad de factores experimentales como las fuerzas térmicas, las hidrodinámicas, cambios locales en la composición de la muestra, y la calidad y el buen uso que se haga de los equipos de atrapamiento y

medición, marcan muy fuertemente cada experimento y limitan la aplicabilidad de las teorías de atrapamiento a condiciones muy restringidas. En la práctica resulta más útil tener una primera idea aproximada de las características de la pinza e implementar un sistema de caracterización y control que permita tener versatilidad en las medidas y aplicaciones de fuerza para una gama amplia de muestras y condiciones de trabajo.

5. FUERZAS Y ELASTICIDAD DE LAS PINZAS ÓPTICAS

5.1. INTRODUCCIÓN

Las pinzas ópticas han sido empleadas en una gran variedad de aplicaciones dentro de la biología (Ashkin and Dziedzic, 1987; Svoboda and Block, 1994; Oddershede et al., 2000; Kuo, 2001; Zhang and Liu, 2008), la física y química molecular (Lang et al., 2002; Grier, 2003; Kitamura and Kitagawa, 2003; Moffitt et al., 2008), la física atómica (Chu et al., 1986) y los coloides (Grier, 1997; Verma et al., 1998; Daria et al., 2003; Smalyukh et al., 2005), entre otras. Su capacidad de trasladar partículas en el volumen de la muestra, con resoluciones en la escala nanométrica, fue la primera en explotarse, gracias a la posibilidad de inmersión no invasiva ni destructiva de las pinzas en ambientes hostiles para cualquier otra técnica. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de las pinzas ópticas como herramienta transductora de fuerzas, en la escala de los piconewtons, la convierten en una técnica prácticamente imprescindible para diversas áreas del conocimiento.

Como se mostró en el capítulo anterior, se han establecido relaciones teóricas para determinar la fuerza en una pinza óptica con cierta aproximación. Debe tenerse en cuenta, no obstante, el papel definitivo de las condiciones experimentales particulares y las cualidades específicas de la muestra cuando se requiere medir o ejercer fuerzas. Son estas circunstancias las que hacen necesaria la calibración de la fuerza de la trampa óptica, bajo condiciones específicas de trabajo y para cada muestra particular.

Se han utilizado varios métodos para medir la fuerza de una pinza óptica (Capitanio et al., 2002; Williams, 2002; Neuman and Block, 2004). Una técnica común utiliza el arrastre viscoso de Stokes para una partícula esférica que se mueve a una velocidad o aceleración conocida en un medio particular (Felgner et al., 1995). Esta estrategia permite medir la fuerza bajo condiciones no necesariamente iguales a las de una muestra biológica, por ejemplo. Además, este método no permite tener conocimiento o control continuo de la fuerza cuando se está haciendo uso de ella, ni permite prever cambios en las condiciones de la muestra que afectan la magnitud o característica de la fuerza.

Resulta más conveniente explotar el hecho de que en la región cercana al punto de equilibrio de la trampa, la interacción entre la partícula y la pinza es aproximadamente de la forma de un potencial armónico (Bartlett and Henderson, 2002; Ashkin, 2006; Deng et al., 2007), con un coeficiente que

relaciona linealmente el desplazamiento relativo con la fuerza, llamado constante de elasticidad o rigidez de la pinza. Así, determinando la elasticidad de la trampa y acoplando un sistema que identifique la posición de la partícula respecto a su posición de equilibrio, se puede realizar una medida de la fuerza que se está aplicando, con la ventaja de que puede calibrarse cada vez que se necesite e incluso sobre la misma muestra.

Existen varios métodos para la detección de la posición de la partícula. En primer lugar, acoplando una cámara de alta velocidad para capturar la imagen de la muestra en el microscopio, y aplicando algoritmos de seguimiento de objetos, se ha demostrado que se puede determinar la posición de la partícula atrapada con una precisión de 10 nm y un ancho de banda de unos pocos kilohertzios, a una tasa de adquisición de imágenes de 2KHz (Keen et al., 2007). Esta técnica ofrece la ventaja de poder medir simultáneamente la posición de varias partículas atrapadas en pinzas múltiples, pero está limitada en resolución y ancho de banda respecto a otros métodos y necesita gran capacidad de memoria de cálculo o almacenamiento, o alternativamente, la utilización de una cámara inteligente capaz de realizar el seguimiento de las partículas de forma autónoma, de manera que informe sólo sobre las coordenadas de las posiciones.

Otra técnica para la medida de la posición utiliza interferómetro diferencial basado en un microscopio de contraste de interferencia diferencial modificado. Esta técnica es teóricamente independiente de la posición de la partícula en el plano de la muestra, y puede lograr alta sensibilidad (Denk and Webb, 1990). En el procedimiento, se divide la luz de atrapamiento, polarizada linealmente, en haces con estados de polarización ortogonales, desplazados físicamente uno del otro, mediante un prisma de wollastonita. Dichos haces se recombinan por medio de otro prisma de wollastonita, luego de pasar por la muestra, y el estado de polarización resultante es medido en un polarímetro, consistente en una lámina retardadora seguida de un divisor de haz polarizado y de sensores que determinan la intensidad de los dos haces salientes del divisor de haz. La señal diferencial y normalizada, obtenida de las lecturas de los sensores, da razón del estado de polarización mencionado. Así, una partícula centrada en la trampa genera un desfase igual en los dos haces, induciendo un estado de polarización lineal en la luz recombinada. Cuando la partícula se desplaza fuera de la posición de equilibrio, introduce un desfase relativo entre los dos haces, y la luz en el polarímetro será ligeramente elíptica. Se calibra entonces la elipticidad de la luz con el desplazamiento de la partícula una distancia conocida sobre la muestra (Capitanio et al., 2002; Neuman and Block, 2004).

Por otra parte, la detección con un sensor de cuadratura de la interferencia entre la luz que pasa por la muestra y la que es dispersada por la partícula atrapada, permite tener una señal de la posición respecto al punto de equilibrio de la trampa, cuando el detector se pone en un plano

conjugado al plano focal trasero del condensador a lo largo del eje óptico. De esta forma, es posible tener resoluciones espaciales nanométricas y frecuencias de muestreo superiores a los 100KHz. Además, el procesamiento de los datos puede ser hecho de forma automática por software y hardware especializado.

Otra ventaja de uso del sensor de cuadratura para la detección de la posición de la partícula atrapada en la pinza, es que éste no es sensible a la ubicación de la trampa y la partícula dentro del plano de la muestra. Además, la geometría de la partícula no afecta la medida y ésta puede ser hecha en tiempo real bajo condiciones de turbulencia o inhomogeneidades, bajo las cuales los otros métodos no pueden trabajar. Igualmente, la detección con sensor de cuadratura es simple y económica de implementar.

Una vez se obtiene la señal de la posición de la partícula dentro de la pinza, se analiza su espectro de potencia o se aplica el teorema de equipartición, como se mostrará más adelante, para determinar la elasticidad o rigidez de la pinza.

5.2. MARCO TEÓRICO

Como se dijo anteriormente, el análisis del movimiento browniano de la partícula atrapada en una pinza óptica, bajo un potencial armónico, arroja información acerca de la rigidez de la trampa, útil para determinar su calibración. Con tal fin, se utiliza la teoría de Einstein – Ornstein – Uhlenbeck para el movimiento browniano, que describe el movimiento de una partícula en un potencial armónico de acuerdo a la siguiente ecuación de Langevin, unidimensional por simplicidad, para la trayectoria de la partícula $x(t)$ (Berg-Sørensen and Flyvbjerg, 2004; Deng et al., 2007):

$$m\ddot{x}(t) + \gamma_0\dot{x}(t) + \kappa x(t) = \sqrt{2k_B T \gamma_0} \eta(t) \quad (1)$$

donde el término $\kappa x(t)$ corresponde a la fuerza armónica hookeana de la trampa, con κ como el coeficiente de elasticidad o rigidez de la pinza. La fuerza debida a la fricción viscosa corresponde al término $\gamma_0\dot{x}(t)$, con el coeficiente de fricción o arrastre γ_0 definido según la Ley de Stokes para una partícula de radio a que se encuentra muy lejos de cualquier superficie, sumergida en un fluido con densidad ρ y viscosidad cinemática ν , por medio de la siguiente relación:

$$\gamma_0 = 6\pi\rho\nu a \quad (2)$$

El miembro derecho de la ecuación (1) representa un proceso aleatorio gaussiano que da cuenta de las fuerzas brownianas a una temperatura absoluta T , y con una energía térmica $k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann, y se cumplen las siguientes relaciones para todo t y t' :

$$\langle \eta(t) \rangle = 0; \quad \langle \eta(t)\eta(t') \rangle = \delta(t-t') \quad (3)$$

Por último, el primer término de la ecuación (1) corresponde al término inercial, donde m es la masa aparente de la esfera. Este término se puede despreciar puesto que el tiempo característico de pérdida de energía cinética por fricción, $t_{inerc} = m/\gamma_0$, es de al menos tres órdenes de magnitud menor que el tiempo mínimo que se puede resolver con la tarjeta de adquisición, a una frecuencia máxima de muestreo de 44kHz. Por otra parte, cabe reconocer que tanto la masa aparente como el coeficiente de fricción son dependientes de la frecuencia, pero a bajas frecuencias de oscilación de la partícula, el coeficiente de fricción no varía apreciablemente, además de que el término inercial puede ignorarse (Berg-Sørensen and Flyvbjerg, 2004; Deng et al., 2007). Con base en este análisis, e introduciendo la frecuencia de corte $f_c = \kappa/(2\pi\gamma_0)$ y la ecuación de Einstein para el coeficiente de atenuación $D = k_B T/\gamma_0$, la ecuación (1) se escribe entonces:

$$\dot{x}(t) + 2\pi f_c x(t) = (2D)^{1/2} \eta(t) \quad (4)$$

Si se registra el movimiento de la partícula durante un periodo de tiempo T_m , la transformada de Fourier para $x(t)$ y $\eta(t)$ toman las formas:

$$\tilde{x}_k = \int_{-T_m/2}^{T_m/2} x(t) e^{i2\pi f_k t} dt, f_k = k/T_m, \text{ con } k \text{ entero} \quad (5)$$

Con lo que se puede obtener, a partir de la ecuación (4), la siguiente relación:

$$\tilde{x}_k = \frac{(2D)^{1/2} \tilde{\eta}_k}{2\pi(f_c - if_k)} \quad (6)$$

Además, a partir de las ecuaciones (3), Berg-Sørensen & Flyvbjerg mostraron que el valor experimental del espectro de potencia es de la forma:

$$P_k^{(ex)} \equiv \frac{|\tilde{x}_k|^2}{T_m} = \frac{D}{2\pi^2 T_m} \frac{|\tilde{\eta}_k|^2}{f_c^2 + f_k^2} \quad (7)$$

Cuyo valor esperado, pada $k > 0$ es una lorentziana.

$$P_k \equiv \langle P_k^{(ex)} \rangle = \frac{D}{2\pi^2(f_c^2 + f_k^2)} \quad (8)$$

De esta forma, a partir del ajuste a una función lorentziana del espectro de potencia de la posición de la partícula en la trampa, se obtiene f_c y se calcula la rigidez.

Para la aplicación de la ecuación lorentziana es conveniente definir un rango de frecuencias que no incluyan efectos de ruido de baja frecuencia fruto del muestreo finito, algunas vibraciones mecánicas y la luz que no es afectada por la partícula. Además, para frecuencias altas, el ajuste lorentziano solo es válido para frecuencias tales que $f^2 \ll f_{\text{Nyq}}^2$, donde f_{Nyq} es la frecuencia de Nyquist. Igualmente, los detectores tienen un comportamiento intrínseco de filtros paso bajo, y la teoría de movimiento browniano de Einstein – Ornstein – Uhlenbeck utilizada es una aproximación de bajas frecuencias. Es por esto, que se selecciona una banda de frecuencias conveniente, que contenga la frecuencia de corte, para realizar el ajuste cumpliendo los criterios anteriores.

Por otra parte, como se ha mostrado, la partícula atrapada en la trampa experimenta un potencial armónico en cercanías de su punto de equilibrio. Igualmente, debido a la naturaleza del movimiento, la distribución de posiciones de la partícula en la pinza se describe por la estadística de Boltzmann en un potencial armónico (Oddershede et al., 2000):

$$p(x) \propto \exp[-x^2/2\sigma_x^2] \quad (9)$$

De esta forma, ajustando el histograma de las posiciones o analizando estadísticamente el registro de las posiciones tomadas en el sensor de cuadratura, se aplica el teorema de equipartición, con el cual se tiene la siguiente relación:

$$\sigma_x^2 = \langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{\kappa} \quad (10)$$

Este método tiene la ventaja de que con tan solo estimar la varianza de la posición, se puede obtener la rigidez de la pinza. Además, este teorema no depende explícitamente del arrastre viscoso de la partícula, y por lo tanto no es necesario conocer su forma ni posición respecto a las superficies, y tampoco es necesario conocer la viscosidad del medio.

La forma del pozo de potencial axial se puede obtener por inversión de la ecuación (9):

$$U(x) = -k_B T \ln[p(x)] \quad (11)$$

Es muy importante notar que el método que usa el teorema de equipartición requiere que el sensor de cuadratura esté calibrado. Es decir, se deben relacionar la señal registrada en unidades arbitrarias de voltaje con unidades físicas de posición. El escalamiento de unidades en el caso de el espectro de potencia no afecta la frecuencia de corte, y por lo tanto no es necesario. Sin embargo, del ajuste a la función lorentziana se obtiene un valor experimental en unidades arbitrarias para el coeficiente de difusión D , que al compararse con el teórico, permite establecer el factor de escala. Con este factor se ajustan las unidades y escala de la señal de posición se puede obtener la rigidez por el método del teorema de equipartición como una medida de comparación.

Aunque se ha mostrado que este método de calibración de la señal del sensor de cuadratura es muy precisa (Berg-Sørensen and Flyvbjerg, 2004), el hecho de que el coeficiente de difusión sea función del arrastre, hace que sea muy sensible a variaciones en la viscosidad que son resultado de la presencia de sustancias diferentes al medio predominante. El método es muy efectivo cuando se tiene total certeza de la composición y viscosidad del medio, o del efecto en la misma por diferentes concentraciones de sustancias agregadas.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

El método de detección que se empleará utiliza un fotodetector de cuadratura (FDC). La señal proviene de un sistema de pinzas ópticas basado en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-U con un objetivo Nikon CFI Apo TIRF 100x con 1.49 de apertura numérica inmerso en aceite, al cual ingresa la luz de atrapamiento por el puerto de fluorescencia. Dicha luz proviene de un láser de estado sólido AZURE-L671III con una longitud de onda de 671nm y una potencia nominal a la salida de 300 mW, controlada mediante combinaciones de filtros de densidad neutra. El montaje experimental, que se muestra esquemáticamente en la Figura 5.1, permite trabajar utilizando un sistema de pinzas ópticas básico y también un sistema de pinzas ópticas holográfico con el cual se puede tener atrapamiento múltiple y dinámico a través del uso de un modulador espacial de luz controlado a través de LabVIEW. El modulador utilizado es Holoeye LC-R 720, el cual es de cristal líquido en fase nemática de alineación helicoidal, por lo cual es necesario un cuidadoso análisis y preparación de los estados polarimétricos del haz, de tal forma que sea posible desacoplar la modulación de amplitud con la modulación de fase, y esta última sea aprovechable. El acondicionamiento y optimización del modulador para trabajar en modo de fase pura fue desarrollado por María Isabel Álvarez Castaño en su tesis de Maestría en Ciencias – Física.

En el montaje de la izquierda en la Figura 5.1 se muestra un sistema de pinzas ópticas básicas. El láser es expandido por las lentes L1 y L2 que forman un sistema telescópico. El espejo E1 es un

espejo fijo que dirige el haz hacia el espejo E2, que puede girar sobre sí mismo. Las lentes L3 y L4 forman un sistema confocal que hace que el plano del espejo E2 sea ópticamente conjugado con el plano de la apertura de entrada del objetivo de microscopio. De esta forma, una inclinación del espejo provoca una inclinación del haz a la entrada del microscopio, lo que produce una traslación del punto focal sobre el plano imagen. La relación de focos de las lentes L3 y L4 magnifican el haz para que llene completamente la entrada del objetivo de microscopio. El espejo E3 dirige adecuadamente el haz hacia el interior del microscopio invertido a través del puerto de fluorescencia.

El sistema de pinzas ópticas holográficas que se muestra en la parte derecha de la Figura 5.1, utiliza el despliegue de hologramas de fase generados por computador sobre el modulador espacial de luz para generar múltiples trampas y manipularlas dinámicamente a través del computador. Para pasar del sistema básico al holográfico basta con reemplazar el espejo E2 en el montaje, por el modulador, y acondicionar el estado de polarización de la luz incidente sobre el modulador utilizando láminas retardadoras y de cuarto y media onda, en la Figura 3.1, $\lambda/4$ y $\lambda/2$ respectivamente. Además, debido a que el modulador tiene un comportamiento intrínseco de retardador, se requiere la utilización de una lámina de cuarto de onda ($\lambda/4$) y un polarizador lineal (P) para filtrar estados de polarización no deseados. La geometría del recorrido de la luz fue diseñada para tener el mínimo ángulo de incidencia posible sobre la superficie del modulador.

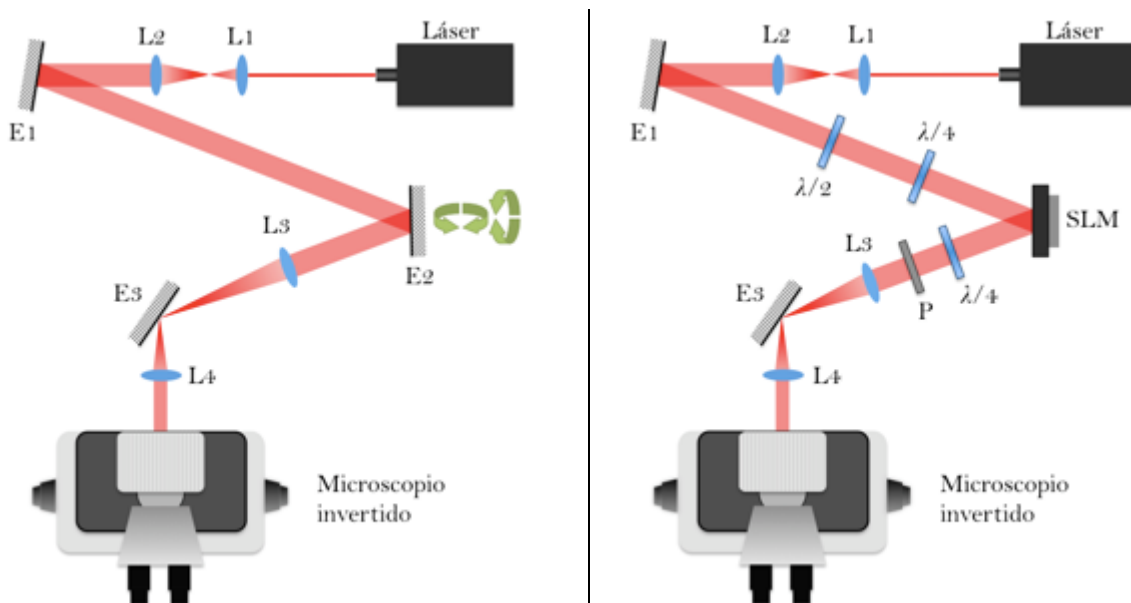


Figura 5.1. Esquema de los montajes de pinzas ópticas (izq.) y pinzas ópticas holográficas (der.) que se desarrollaron para la manipulación de partículas micrométricas y la caracterización de las fuerzas de atrapamiento.

La Figura 5.2 muestra el recorrido del haz de atrapamiento en el microscopio, al que ingresa por el puerto de epifluorescencia y es dirigido por un espejo dicroico (ED1) hacia el objetivo, que concentra la luz sobre el plano de la muestra. La luz que atraviesa la muestra es colectada por la lente condensadora C, de la iluminación, para ser llevada hacia el sensor de cuadratura por medio de un segundo espejo dicroico ED2 y la lente L. Este espejo dicroico permite el paso de la luz de iluminación de la muestra, proveniente de una lámpara convencional, al tiempo que refleja el haz laser de atrapamiento, que incide a 45° sobre su superficie. La imagen de la muestra es registrada por una cámara CCD en uno de los puertos propios del microscopio.

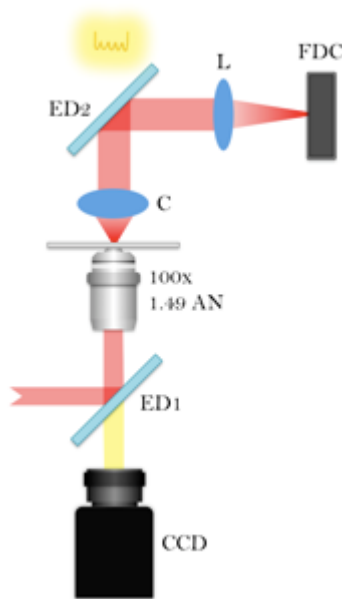


Figura 5.2. Esquema del paso de la luz de atrapamiento dentro del microscopio y el arreglo para medir la posición de la partícula dentro de la trampa.

El sensor de cuadratura usado fue el PDQ80A - Quadrant Detector Sensor Head de THORLABS, cuya señales de posición (x, y) se adquieren por medio la tarjeta de adquisición National Instruments NI USB-6009 y aplicativos de la plataforma LabVIEW. Simultáneamente, se calcularon los espectros de potencia de cada señal cada dos segundos, cubriendo 10.000 muestras a una tasa de muestreo de 5KHz. Se tomaron diez series de datos consecutivas, que equivalen a tomas de veinte segundos cada una. Los datos colectados se procesaron estadísticamente y se analizaron con aplicativos de la plataforma Mathematica, orientados al estudio del movimiento browniano con base en el espectro de potencia y el teorema de equipartición. Adicionalmente, se tomaron señales de ruido de oscuridad y de la señal con el láser encendido pero sin partícula atrapada, para dar cuenta de otros factores de ruido adicionales. La calibración se realizó para los ejes transversales (x, y) , puesto que son de mayor utilidad práctica.

Las partículas de prueba fueron microesferas de poliestireno, sílica y látex, suspendidas en agua. Se utilizó un portamuestras ibidi μ -Slide I^{0.4} Luer, con un microcanal plano, para depositar las suspensiones de partículas. La temperatura de la muestra fue constantemente monitoreada por medio de una termocupla que estaba en contacto con la muestra, y la temperatura del recinto del laboratorio se mantenía constante por medio de un sistema de aire acondicionado. En cada medición se controlaron los valores y la estabilidad de las temperaturas ambiental y de la muestra, asegurando niveles adecuados. Con la muestra estable, el cubículo cerrado y sin corrientes de aire, se realizaron las medidas controlando remotamente el computador y el programa de LabVIEW a través de internet. Las Figura 5.3 y la Figura 5.4 muestran fotografías del montaje experimental desarrollado.

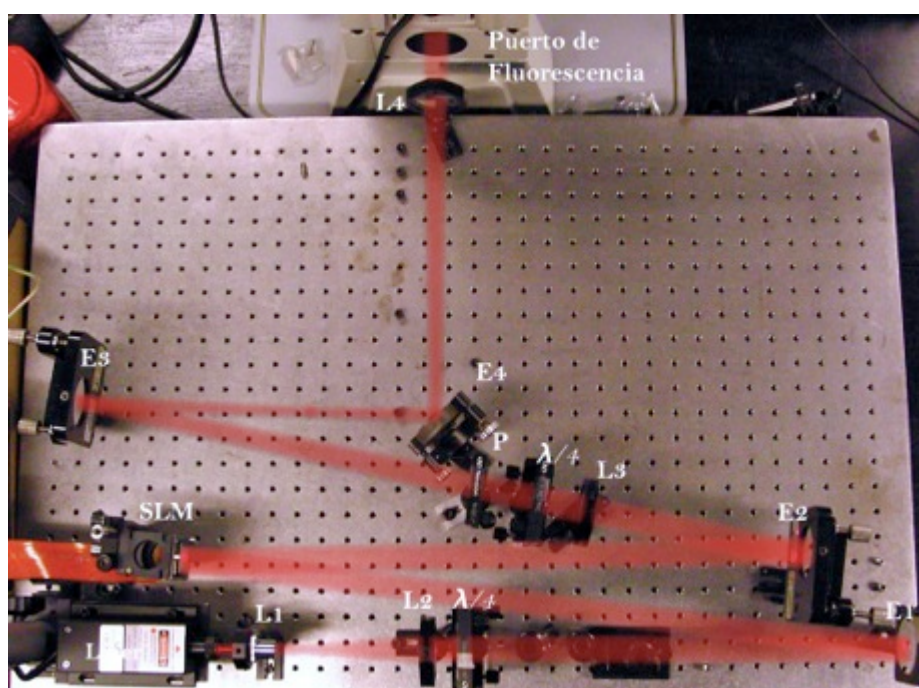


Figura 5.3. Montaje experimental completo para pinzas ópticas holográficas. El sistema de pinzas ópticas básicas no requiere el SLM, el cual es reemplazado por un espejo. Las láminas de retardo y el polarizador P son retirados. La trayectoria del haz de luz fue diseñada para minimizar el ángulo de incidencia sobre el modulador. Las tres bases extras en la parte inferior de la imagen son para los filtros de densidad neutra.

El programa de adquisición para la calibración fue desarrollado en LabVIEW 9. Éste registra las dos señales de voltaje de los ejes (x , y) del sensor de cuadratura, calcula y despliega sus espectros de potencia e histogramas, y muestra la imagen continua de la partícula atrapada en el microscopio. Los datos de las señales de voltaje y el espectro de potencia se almacenan en archivos de datos independientes en el formato LabVIEW measurement file .lvm, el cual es compatible con

los programas de hojas de cálculo, procesamiento de texto plano o programas de cálculo. En este caso fueron convertidas a formato .txt e importadas en Mathematica.

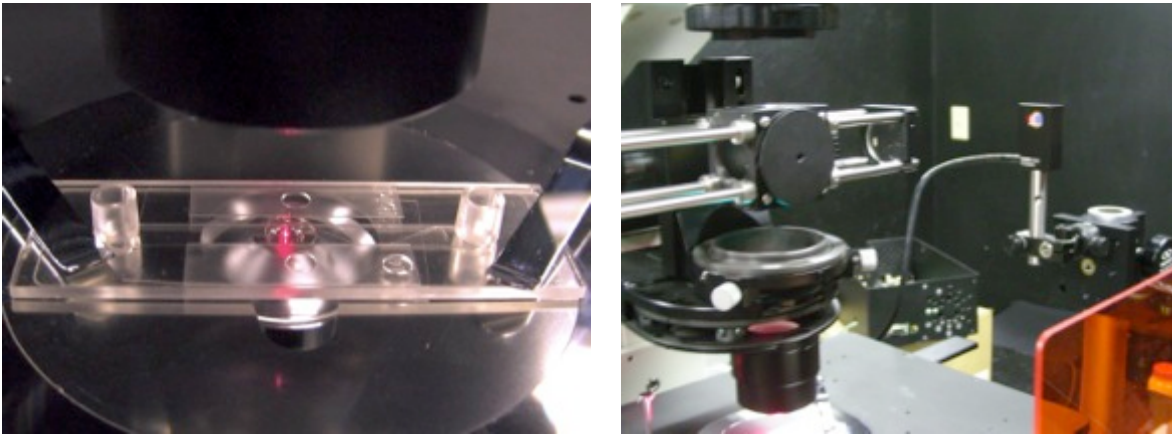


Figura 5.4. Detalles de la disposición de la muestra (izq.) y arreglo para el fotodetector de cuadratura.

La capacidad de ver en tiempo real el histograma y el espectro de potencia es muy importante pues permite detectar señales anómalas en el espectro de potencia que deforman o alteran la lorentziana, ver que efectivamente la partícula se está moviendo siguiendo un proceso gaussiano en el histograma, y ver el estado de la partícula atrapada y su entorno en la imagen. De esta forma se pueden reconocer y suprimir fuentes de ruido y establecer condiciones óptimas para la medición. La Figura 5.5 muestra la interfaz del programa durante el proceso de medida.

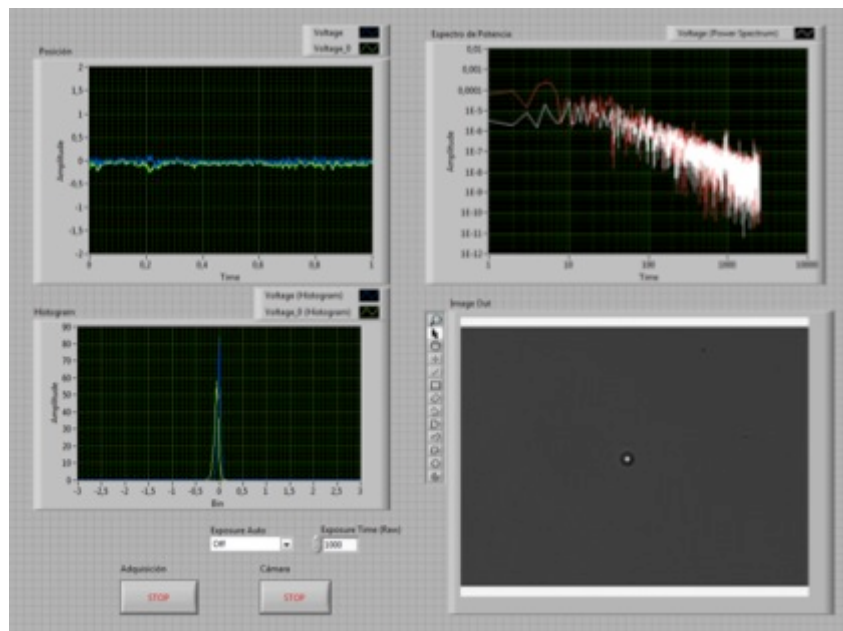


Figura 5.5. Interfaz del programa de adquisición de señales para la calibración de las fuerzas en un sistema de pinzas ópticas. En la parte superior están las gráficas de las señales y los espectros de potencia. En la parte inferior está el histograma y la imagen de la partícula en el microscopio.

5.4. RESULTADOS

Con el sistema desarrollado se pueden manipular partículas micrométricas traslacionalmente, en sentidos transversal y longitudinal, en el volumen de la muestra. También, se pueden realizar arreglos arbitrarios de partículas como se puede ver en la Figura 5.6.

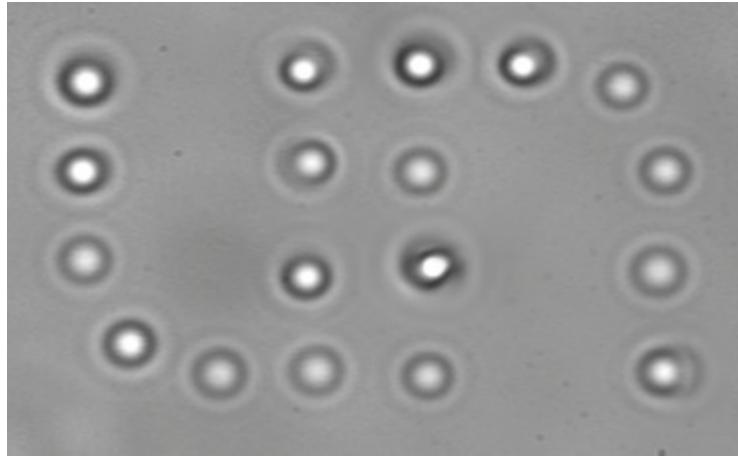


Figura 5.6. Logo de la Universidad Nacional de Colombia hecho con microesferas de sílice de $1\mu\text{m}$ de diámetro, suspendidas en agua. Cada punto del logo representa una pinza óptica independiente, generada holográficamente por medio del modulador espacial de luz.

En el modo de sistema de pinzas ópticas simples, se calculó la rigidez de las trampas para microesferas de látex de $1\mu\text{m}$ de diámetro (Merck Estapor) suspendidas en agua a 23°C , con varias potencias. Las combinaciones de filtros de densidad neutra determinaron fracciones conocidas de la potencia máxima. En la Tabla 5.1 se muestran las combinaciones utilizadas junto con el porcentaje de transmisión de cada una respecto a la potencia máxima del láser. Aunque dos combinaciones dan la misma potencia, se utilizaron para comparar.

Tabla 5.1. Combinaciones de filtros de densidad neutra utilizados para obtener varias potencias en la pinza, y su correspondiente porcentaje de transmisión.

Filtros	% de potencia
ND8+ND2	6.25
ND8+ND4	3.125
ND8+ND4+ND2	1.15625
ND8+ND8	1.15625
ND8+ND2+ND8	0.78125

Como lo mostraron Berg-Sørensen & Flyvbjerg (Berg-Sørensen and Flyvbjerg, 2004), para potencias altas, el método del espectro de potencia no puede ser utilizado debido a que no se ajusta a ninguna lorentziana, por lo tanto, se trabaja reduciendo fuertemente la potencia, se grafican los resultados y se espera que la dependencia de la rigidez de la pinza con la potencia sea lineal. De

esta forma se obtiene la rigidez para la potencia máxima y para otras fracciones conocidas, sin medir la potencia real en el foco. Para cada una de las combinaciones de filtros se registraron cuatro señales, a saber:

- Espectro de potencia de la señal de la partícula
- Espectro de potencia del ruido de oscuridad
- Espectro de potencia del ruido con las mismas condiciones de atrapamiento, pero sin partícula atrapada.
- Registro directo del voltaje del fotodetector de cuadratura para cada una de las coordenadas.

Los dos espectros de potencia de ruido dan cuenta de buena parte de las fuentes de ruido, siendo más completo el segundo de ellos, es decir, el espectro con el láser encendido. Adicionalmente, cada una de las señales de espectro de potencia es el resultado de un promedio sobre diez tomas. La Figura 5.7 muestra un ejemplo de estas cuatro señales adquiridas para el caso de una potencia al 3.125%.

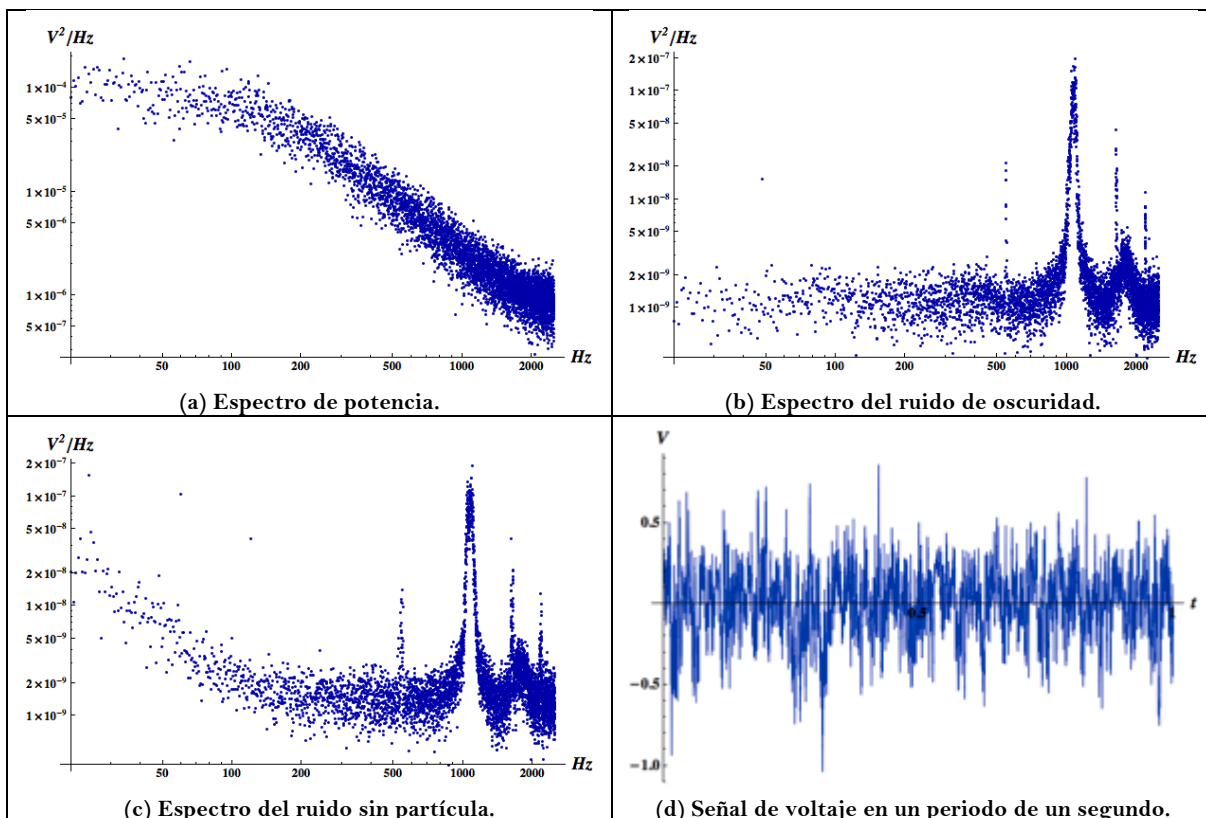


Figura 5.7. Señales adquiridas para una partícula de látex de $1\mu\text{m}$ de diámetro para el caso en que se utiliza un 3.125% de la potencia total del láser de atrapamiento. Las gráficas (a) a (c) corresponden a espectros de potencia de la señal del fotodetector de cuadratura, la señal de interés y las señales de ruido, mientras la gráfica (d) corresponde a una fracción de la señal misma en un periodo de un segundo.

En la Figura 5.7 se puede ver que el espectro del ruido con iluminación y sin partícula, no solo contiene el ruido eléctrico que tiene el espectro de ruido de oscuridad, sino que también contiene una notoria carga de bajas frecuencias que son producidas mecánicamente y por la luz que pasa a través de la muestra sin ser desviada. Así mismo, los picos debido al ruido de 60Hz y sus armónicos se encuentran mayormente discriminados. Sin embargo, ninguna de las señales de ruido logra tener un aporte a la señal total de más del 10%.

Para realizar el ajuste se toma el espectro de potencia al cual se le ha retirado el ruido y se hace una compresión de los datos dividiendo el espectro en bloques de 25Hz, que corresponden a 50 datos consecutivos, que se promedian y se aparean con la frecuencia central del bloque. Esto da como resultado una nube de puntos mucho más reducida, que además garantiza la independencia estadística de los datos y favorece el ajuste (Berg-Sørensen and Flyvbjerg, 2004). Igualmente, el espectro se reduce para un rango de frecuencias entre los 25Hz y 1KHz. La Figura 5.8 muestra el resultado final con la curva de ajuste.

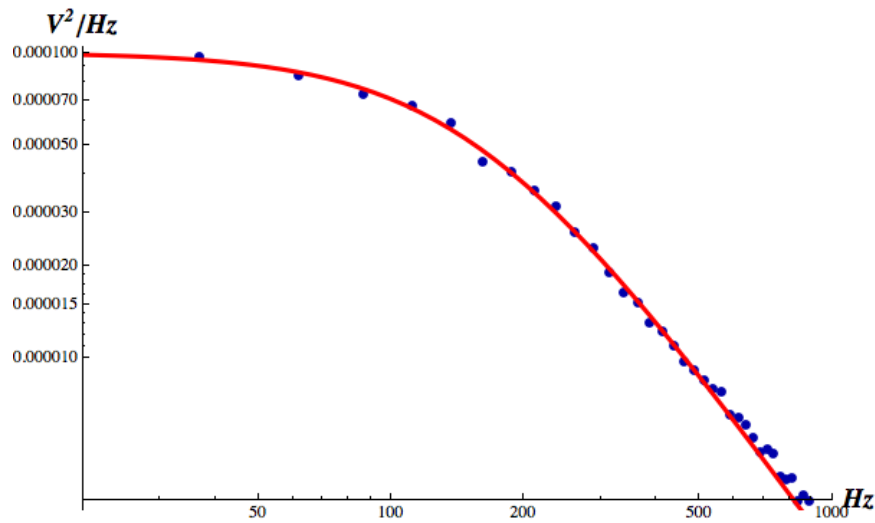


Figura 5.8. Espectro de potencia con reducción de ruido y compresión de datos, junto con la curva lorentziana de mejor ajuste, para una microesfera de látex de $1\mu\text{m}$ de diámetro suspendida en agua a 23°C . En este caso, tiene una frecuencia de corte de 154.49Hz , para una rigidez de $16.654\text{ pN}/\mu\text{m}$. El factor de escala obtenido es de $7.10703 \times 10^{-8}\text{ m/V}$.

Del ajuste se toman los datos de la frecuencia de corte para el cálculo de la rigidez, y el coeficiente de difusión D experimental que se utiliza para determinar el factor de escala para calibrar los valores de voltaje en unidades físicas de distancia, a través de la comparación con el coeficiente de difusión teórico. Una vez se tiene el factor de escala, se calcula la rigidez utilizando el teorema de equipartición. Los resultados para las 5 combinaciones de filtros y las dos técnicas de medida se

muestran en la Tabla 5.2, tanto para x como para y , en donde se discriminan por el método utilizado: κ_I , la constante hallada por el método del ajuste lorentziano; κ_{II} , la constante por el método del Teorema de Equipartición.

La Figura 5.9 muestra la grafica de los resultados y el ajuste a una recta para los dos métodos, en donde se tomó el valor promedio de la constante de elasticidad para las dos combinaciones de igual potencia. Nótese que, cómo se esperaba, la rigidez de la pinza es efectivamente proporcional a la potencia. Además, es muy clara la fuerte asimetría entre las direcciones x y y de los valores de la constante de elasticidad. Esto es debido a los efectos de la polarización: como el láser de atrapamiento estaba linealmente polarizado, la intensidad del campo eléctrico no era igual a lo largo de dichos ejes. Esta asimetría se puede reducir utilizando láser circular o elípticamente polarizado (Rohrbach, 2005).

Tabla 5.2. Valores de la constante de elasticidad en una pinza óptica para varios valores de porcentuales de potencia respecto a la máxima, en donde κ_I y κ_{II} son las constantes obtenidas por el método espectral y por el teorema de equipartición, respectivamente; mientras que κ_M es la constante promedio entre las dos técnicas.

%Potencia	κ_I [pN/ μ m]		κ_{II} [pN/ μ m]		κ_M [pN/ μ m]	
	X	Y	X	Y	X	Y
6.25	34.3607	7.28241	34.9552	6.29962	34.658	6.79102
3.125	16.654	3.83641	16.4909	2.75136	16.5725	3.29389
1.15625	9.35638	2.9063	9.33728	1.79479	9.34683	2.35055
1.15625	9.50006	4.30274	9.25733	2.62047	9.3787	3.46161
0.78125	4.16563	0.722086	4.04544	1.01099	4.10554	0.866538

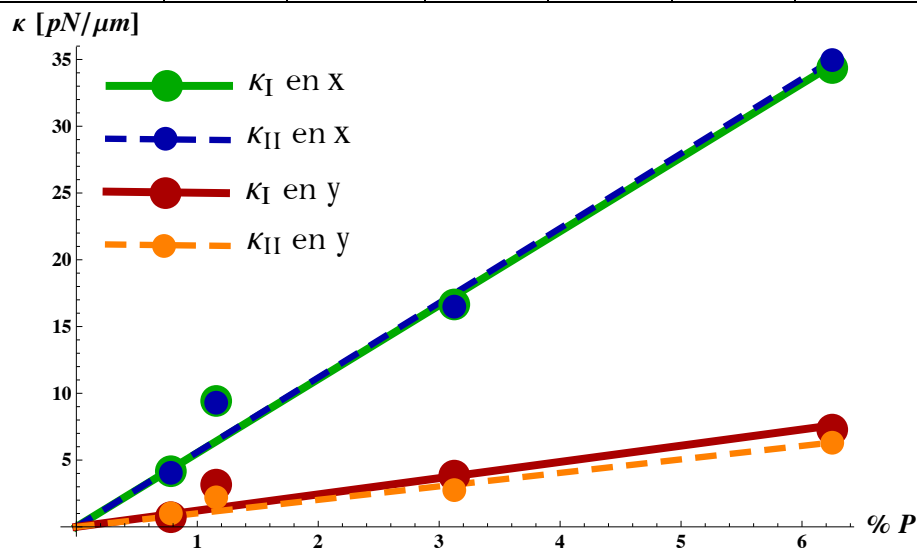


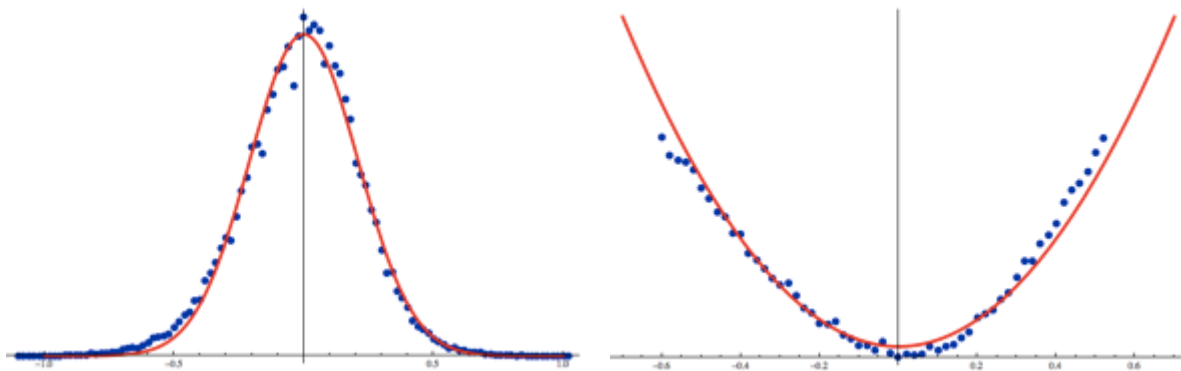
Figura 5.9. Gráfica de los valores de la rigidez de una pinza óptica, obtenidos por los dos métodos, para una microesfera de látex de 1μ m de diámetro suspendida en agua a 23°C , contra diferentes valores porcentuales de potencia respecto a la potencia máxima del láser. Igualmente se muestran las rectas de mejor ajuste, con intersección en el origen.

Las ecuaciones de ajuste, llevadas a pasar por el origen, se muestran a continuación, donde (%P) es el porcentaje de potencia respecto a la potencia máxima del láser de atrapamiento:

$5.53327(\%P)$	$R^2 = 0.993$	Espectro de potencia en x	
$5.59158(\%P)$	$R^2 = 0.976$	Equipartición en x	(12)
$1.21562(\%P)$	$R^2 = 0.959$	Espectro de potencia en y	
$1.01059(\%P)$	$R^2 = 0.976$	Equipartición en y	

Así, para este caso se tendría una rigidez máxima de alrededor de 556 pN/ μm en la dirección x , y una rigidez de alrededor de 110 pN/ μm para y , utilizando el 100% de la potencia del láser.

Se verificó además que el movimiento de la partícula dentro de la pinza fuera efectivamente un proceso gaussiano, y que el pozo de potencial fuera armónico. La Figura 5.10 muestra el histograma del registro de la posición de la partícula durante un periodo de 20 segundos, en unidades arbitrarias, para el caso de un porcentaje de potencia del 3.125%. Igualmente se muestra el pozo de potencial correspondiente. En ambas gráficas se superponen las curvas de mejor ajuste; gaussiana para el histograma y cuadrática para el pozo de potencial.



a. Histograma y ajuste gaussiano.

b. Pozo de potencial y ajuste cuadrático.

Figura 5.10. (a) Histograma de la posición, en unidades arbitrarias, de una microesfera de látex de $1\mu\text{m}$ de diámetro suspendida en agua a 23°C . La línea continua es el ajuste a una función gaussiana. (b) Pozo de potencial correspondiente y ajuste a curva cuadrática.

La verificación de la morfología de la distribución de posiciones y el pozo de potencial es muy importante pues son las premisas sobre las cuales se fundamentó todo el análisis para determinar la rigidez de la pinza. Para todos los casos medidos, todos los procesos fueron verificados y encajaron sin problema con la distribución gaussiana y el pozo armónico.

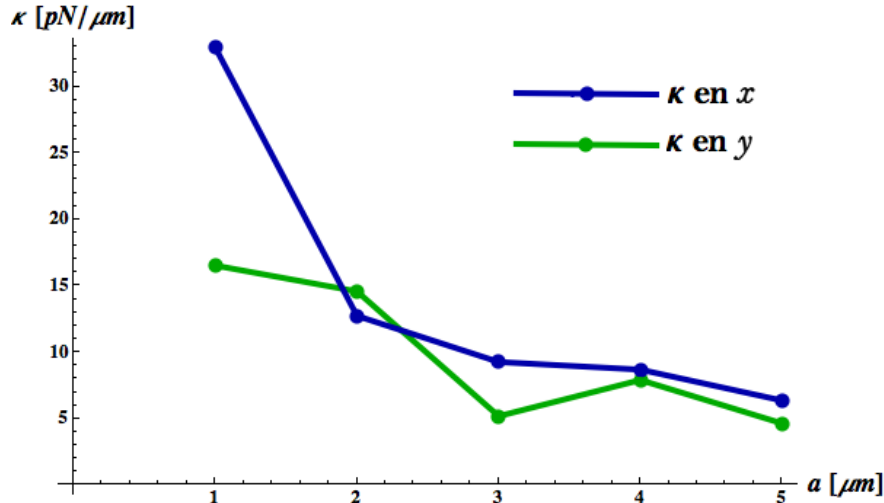


Figura 5.11. Constante de rigidez de la pinza óptica para microesferas de poliestireno de varios diámetros, suspendidas en agua a 24°C. Se utilizó una potencia constante en el foco, equivalente al 3.125% de la potencia producida por el láser.

La dependencia de la constante de elasticidad de la pinza óptica con el diámetro de la partícula atrapada se estudió utilizando microesferas de poliestireno de 1 μm a 5 μm de diámetro, con una temperatura de la muestra constante en 24°C y utilizando el 3.125% de la potencia del láser. La Figura 5.11 muestra la gráfica donde se encuentra que la elasticidad transversal decae con el diámetro de la partícula, lo cual corresponde con las predicciones teóricas de un decaimiento monótono con pequeñas oscilaciones para partículas más grandes que el segmento focal (Neto and Nussenzveig, 1999; Mazolli et al., 2003; Rohrbach, 2005; Viana et al., 2007). También son claros los efectos de la polarización lineal en la asimetría de las constantes de rigidez para las dos direcciones transversales.

Se tiene entonces un sistema de pinzas ópticas dotado con los equipos y programas de adquisición y cálculo necesarios para caracterizar y medir las fuerzas que ejerce, bajo diferentes condiciones de potencia del láser de atrapamiento, tamaño y material de la partícula atrapada. Los dos métodos utilizados se pueden aplicar en tiempo real en condiciones de trabajo, lo que permite la adopción de la técnica para una gama muy amplia de aplicaciones.

Los efectos del estado de polarización del haz de atrapamiento son muy notables para los valores de rigidez cuando se encuentra linealmente polarizado. Sin embargo, si esto resulta inconveniente, se puede reducir utilizando un haz circularmente polarizado. Adicionalmente, las variaciones temporales en la potencia del láser tienen un papel muy fuerte en las medidas de rigidez y fuerza. Se requiere un láser muy estable en potencia o un monitoreo constante de tal forma que se puedan compensar los efectos indeseados.