

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIÓLOGO

Implementación de un sistema de pinzas ópticas para manipulación de organismos biológicos.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA	:	Ríos González Rebeca del Carmen.

DIRECTOR : Sánchez Juárez Aramis Azuri. PhD.

LOJA – ECUADOR 2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <u>http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es</u>

Loja, mayo del 2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D. Aramis Azuri Sánchez Juárez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración

El presente trabajo de titulación: "Implementación de un sistema de pinzas ópticas para manipular microorganismos" realizado por Rebeca del Carmen Ríos González, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, mayo de 2018.

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

"Yo Rebeca del Carmen Ríos González, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: "Implementación de un sistema de pinzas ópticas para manipulación de organismos biológicos", de la Titulación de Biología, siendo. Aramis Azuri Sánchez Juárez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

f).....

Autor : Rebeca del Carmen Ríos González

Cédula: 1105906976

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios, por ser mi centro y fortaleza.

A mis padres, Fausto y Carmen por brindarme su amor, apoyarme y guiarme en cada etapa de mi vida y gracias a su esfuerzo, enseñanzas y buen ejemplo he podido cumplir con esta meta.

A mis hermanos, Israel, Isaac, Ruth, Aarón, Mateo, Rosita, Sofía, Matías, Ezequiel y Ángeles por los consejos, alegría e inspiración que han sido para mí durante toda mi carrera, a mi tía Katy y a mi tía Rosita que me han brindado su apoyo incondicional.

Rebeca del Carmen Ríos González

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por la perseverancia que me ha dado, por no dejarme desfallecer, por los padres, hermanos y amigos que ha puesto en mi camino, para que yo pueda desarrollar y terminar satisfactoriamente este trabajo.

A mi director de tesis Dr. Aramis Sánchez que ha compartido sus conocimientos y ha guiado mi trabajo con paciencia y así he podido culminar con éxito.

A todos los profesores que impartieron sus conocimientos y contribuyeron a mi formación como profesional.

A compañeros y amigos que han estado presentes de una u otra forma en todos los años de carrera.

Rebeca del Carmen Ríos González

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arreglo experimental de pinzas ópticas	5
Figura 2. Esquema experimental de sistema de pinzas ópticas lineal	6
Figura 3. Sistema de pinzas ópticas básicas.	7
Figura 4. Diseño experimental pinzas ópticas	7
Figura 5. Montaje experimental	8
Figura 6. Diseño del arreglo experimental	8
Figura 7. Configuración de un sistema de pinzas ópticas doble laser	9
Figura 8. Configuración del sistema de pinzas ópticas	9
Figura 9. Esquema experimental	10
Figura 10. Espectro de luz natural	12
Figura 11.Espectro de Bombilla eléctrica	12
Figura 12. Espectro de luz Fluorescente	13
Figura 13. Espectro de luz LED	13
Figura 14. Espectro de luz láser	14
Figura 15. Refracción y Reflexión	. 15
Figura 16. Láser	18
Figura 17. Espejo dicroico	18
Figura 18. Soporte para lente de observación	19
Figura 19. Lente de observación	19
Figura 20. Objetivo de microscopio.	19
Figura 21. Platina	20
Figura 22. Fuente de luz.	20
Figura 23. Cámara CCD	20
Figura 24. PC	21
Figura 25. Diseño experimental	22
Figura 26. Partículas de polietileno.	23

Figura 27. Espectro del láser	24
Figura 28. Experimento del láser para medir el diámetro del cabello	25
Figura 29. Fuente de microorganismos	26
Figura 30. Luz láser	27
Figura 31. Perfil gaussiano del laser	27
Figura 32. Potenciómetro óptico	28
Figura 33. Espectro electromagnético del láser.	28
Figura 34. Sistema de pinzas ópticas	30
Figura 35. En la foto b) podemos observar el momento inicial, en la foto c) es el momento	o en
el que ya se soltó la micro-esfera y en la foto d) observamos la distancia que recorrió la mi	icro-
esfera	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rangos de frecuencia y longitud de onda aproximados de la luz de sus	diferentes
colores en el vacío	11
Tabla 2. Tipo de láser, partícula, tamaño de partícula	17

Tabla de Contenido	
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4.1 Área de estudio	5
4.1.2 Sistemas de pinzas ópticas	5
4.1.3 Principio de funcionamiento de las pinzas ópticas	11
4.1.4 Tipos de luz:	11
4.1.5 Elementos ópticos:	14
4.1.6 Física de las pinzas ópticas	15
4.1.7 Fuerza Óptica	15
4.2 Metodología (por objetivos)	17
4.2.1 Reporte técnico preliminar (Objetivo 1)	17
4.2.2 Diseño del sistema de pinzas ópticas (Objetivo 2)	
4.2.3 Adecuación y descripción del arreglo de pinzas ópticas. (Objetivo 2)	21
4.2.4 Construcción del sistema de pinzas ópticas (Objetivo 2)	22
4.2.5 Calibración del sistema (Objetivo 3)	22
4.2.6 Determinar la potencia del láser para mover partículas de polietileno (Objet	tivo 3)
	23
4.2.7 Determinar la potencia del láser para mover microorganismos (Objetivo 3).	26
4.2.8 Reporte técnico (Objetivo 3)	26
4.3 Análisis de datos	27

4.3.1 Análisis del laser	27
4.3.2 Análisis del atrapamiento	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Análisis del movimiento de la partícula	31
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	37
8. BIBLIOGRÁFÍA	
9. ANEXOS	42
MANUAL DEL SISTEMA DE PINZAS ÓPTICAS	43

RESUMEN

Las pinzas ópticas son herramientas que pueden o no estar asociados a un sistema de microscopio, el éxito de su función se debe a la alineación de un conjunto de elementos, estos sistemas se usan en diversos campos de estudio para atrapar objetos o microorganismos a micro escalas. En biología estos sistemas de pinzas ópticas son útiles ya que nos permiten manipular in vivo microorganismos. Las pinzas ópticas nos permiten "capturarlas" sin causarles daño y sin tener contacto mecánico con estos objetos o microorganismos para poder caracterizarlos. En este trabajo implementamos un sistema de pinzas ópticas y comprobamos su efectividad realizando varios ensayos atrapando micro-partículas y microorganismos. Las resultados fueron un sistema de pinzas ópticas se dio a través de la identificación de elementos que se requieren y la utilización de los elementos disponibles en el laboratorio. Los resultados fueron un sistema de pinzas ópticas funcional con el que se logró manipular micro-partículas y microorganismos del orden de 8µm.

Palabras clave: Pinzas ópticas, captura de microorganismos, captura de objetos.

ABSTRACT

The optical tweezers are tools that may or may not be associated with a microscope system, the success of its function is due to the alignment of a set of elements, and these systems are used in various fields of study to trap objects or microorganisms. In biology these systems of optical tweezers are useful since they allow us to manipulate microorganisms in vivo. The optical tweezers allow us to "capture" them without causing them harm and without having contact with these objects or microorganisms since it is not an invasive method, and it allows us to capture one or more microorganisms in order to characterize them. In this work we implement a system of optical tweezers and we check its effectiveness by performing several tests trapping micro-particles and microorganisms. The implementation of this system of optical tweezers occurred through the identification of elements that are required and the use of the elements available in the laboratory. The results were a functional optical tweezers system with which it was possible to manipulate micro-particles and microorganisms of the order of 8µm.

Key words: Optical tweezers, capture of microorganisms, capture of objects

INTRODUCCIÓN

La biología como ciencia experimental, hace uso de herramientas que le permiten desarrollarse expandiendo así sus horizontes, el desarrollo de estas herramientas ha sido impulsado en si gracias al conocimiento y técnicas basados tanto en biología como en otras áreas de estudio. Las pinzas ópticas, son una herramienta relativamente nueva que ha permitido un gran desarrollo en diversos campos de estudio e investigación (Camacho, 2014), el fenómeno que dio inicio para comenzar la indagación y posterior desarrollo de las pinzas ópticas, fue observado en 1970 (Ashkin, 1970) y se fue afinando hasta que a finales de la década de 1980, se comenzó a utilizar en biología para el atrapamiento de virus y bacterias (Ashkin y Dziedzic, 1987) y durante la década de 1990 se investigó la mecánica celular (Alvarez, 2012).

La luz es usada de forma natural por los seres vivos, en los años 60 surge el láser y con éste varias aplicaciones científicas, hoy en día es común el uso de luz láser en cualquier laboratorio científico o tecnológico. El uso del láser como una fuente de luz con un perfil de intensidad Gaussiano se le pueden agregar características adicionales a las del láser común, parámetros suficientes para añadir aplicaciones a las ondas electromagnéticas, para la manipulación de partículas de escala micrométrica, esto se debe a que durante la interacción de la luz con los objetos sucede una transferencia de energía que permite mover partículas, moléculas, átomos y bacterias a esta escala (Rodríguez, Sanchez y Martínez, 2009).

Existen cuatro parámetros que se debe tomar en cuenta, el perfil espacial, la longitud de onda, potencia y el astigmatismo del haz. El perfil espacial y el astigmatismo del haz tienen que ver con la calidad del objetivo del microscopio, su capacidad de enfocar el haz de luz. La potencia tiene que ver con la profundidad de la manipulación óptica, hay que tener en cuenta que mientras más se sube la potencia del láser puede llegar a dañar el material (Neuman y Block, 2004)

La longitud de onda depende del material al que se lo va a aplicar, para manipular objetos inertes como bolitas de poliestireno se puede usar láseres con mayor longitud de onda y potencia, mientras que para manipular organismos biológicos debido a su absorción de luz es mejor utilizar láseres con potencias en 10 y 100 mW (Svoboda y Block, 1994).

El sistema de pinzas ópticas es una herramienta que consiste en utilizar un láser focalizado de onda continua (Greulich *et al.*, 2000). Se utiliza como método de micro-manipulación la luz, ésta presión de luz interactúa con los organismos u objetos en un medio dieléctrico que pueden estar en agua o aire, las pinzas ópticas permiten atrapar y manipular con gran

exactitud sin tener contacto mecánico con ellos. El rango de tamaño para manipulación de organismos y objetos va de nanómetros a micrómetros (Moreno, 2003; Volke, Ricárdez y Ramos, 2007; Ricardez, E. Orozco y Hernández, 2008; Rodríguez, Sanchez y Martínez, 2009; Juan, Righini y Quidant, 2011; Rodríguez-Sevilla *et al.*, 2016).

Los sistemas de pinzas ópticas están compuestos básicamente con piezas como: Fuente de luz, base de posicionamiento, objetivo de microscopio, Divisor de haz, cámara CCD, lentes y láser (Hou y Cheng, 2012).

El objetivo de microscopio, es el elemento que está más cerca de la muestra y está compuesto por lentes que absorben la luz que proviene de la muestra, el objetivo de microscopio cumple con formar una imagen con la luz que pasa por el objetivo y crear la trampa óptica (Rodríguez Vázquez, Ruiz y Huelva, 2005). La imagen que se obtiene del objetivo de microscopio es el efecto de la distribución de la intensidad de la luz, la radiación que se refleja ayuda directamente a la formación de la imagen muestra (Murphy, 2001).

Para nuestro sistema de pinzas ópticas hemos utilizado la menor cantidad de elementos posibles, por lo tanto se ha reducido el costo del equipo, cabe mencionar que esto no afecta la confiabilidad y funcionalidad del sistema. Éste sistema está constituido por, láser, lente de observación, platina, fuente de luz, objetivo de microscopio, espejo dicroico, cámara CCD, PC.

El objetivo general de este proyecto de investigación es implementar un sistema de pinzas ópticas para manipular microorganismos, lo cual es fundamental en el estudio a nivel celular en el área biológica.

- Determinar un sistema de pinzas ópticas adecuado para aplicaciones biológicas.
- Construir un sistema de pinzas ópticas funcional.
- Calibrar y caracterizar sistema de pinzas ópticas mediante ensayos de manipulación de organismos biológicos.

Es posible llevar a cabo estos objetivos específicos construyendo un sistema de pinzas ópticas de bajo costo, el que puede ser utilizado con diferentes longitudes de onda para manipular y atrapar organismos. Así se podrían realizar a nivel experimental los proyectos que requieran de esta técnica de manipulación de organismos en la universidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el presente trabajo de investigación, se han planteado objetivos que han sido llevados a cabo de la siguiente manera.

4.1 Área de estudio

Primero se realiza un análisis de los sistemas de pinzas ópticas que han sido aprovechados por el área biológica como una herramienta útil para medir las colas de las bacterias, fuerzas ejercidas por un motor de proteínas y estiramiento de moléculas de ADN principalmente, las pinzas ópticas han sido usadas también para atrapar bacterias y manipular células individuales (Molloy y Padgett, 2002).

A continuación presentamos los sistemas de pinzas ópticos empezando con el más básico y aumentando la complejidad, al hablar de complejidad nos referimos al número de elementos ópticos utilizados, ya que mayor número de elementos ópticos implica un incremento significativo en la dificultad de alineación que aún con la infraestructura adecuada es complicada.



4.1.2 Sistemas de pinzas ópticas

Figura 1. Arreglo experimental de pinzas ópticas Fuente: (Volke, Ricárdez y Ramos, 2007). Elaboración: (Volke, Ricárdez y Ramos, 2007). Este sistema de pinzas óptico simple fue presentado por Volke, Ricárdez y Ramos, 2007.Este sistema cuenta con 10 elementos ópticos, tomando en cuenta las dos fuentes de luz.



Figura 2. Esquema experimental de sistema de pinzas ópticas lineal

Fuente: (Onetto y Crescitelli, 2014). Elaboración: (Onetto y Crescitelli, 2014).

Este sistema lineal de pinzas óptico fue desarrollado en el año 2014 por Onetto y Cresitelli en un estudio de movimiento browniano. Este sistema un poco más sencillo cuenta con 7 elementos ópticos, facilitando la alineación que depende de mantener centrado el haz láser en el eje óptico debido a su configuración lineal.



Figura 3. Sistema de pinzas ópticas básicas. Fuente: (Ricardez, E. Orozco y Hernández, 2008). Elaboración: (Ricardez, E. Orozco y Hernández, 2008)

Este es un sistema de pinzas ópticas básico para micro manipulación realizado en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México en el año 2008 por Ricardez, E. Orozco y Hernández.

Este sistema tiene 10 elementos ópticos, con la diferencia de que incluye un divisor de haz.



Figura 4. Diseño experimental pinzas ópticas

Fuente: (Galarza Cuadros, Ortiz y Amat, 2012)

Elaboración: (Galarza Cuadros, Ortiz y Amat, 2012)

Este sistema de pinzas ópticas fue desarrollado por Galarza Cuadros, Ortiz y Amat en un proyecto de cálculo diferencial en la ESPOL en el año 2012. Este sistema cuenta con 15 elementos ópticos, incluyendo las fuentes y los detectores.



Figura 5. Montaje experimental

Fuente: (Alvarez, 2012) Elaboración: (Alvarez, 2012)

Este es un montaje experimental de pinzas ópticas holográficas para manipulación de microsistemas que fue desarrollado por Álvarez en el año 2012, en la Universidad de Colombia, Medellín (Alvarez, 2012). Este es un sistema de pinzas ópticas más avanzado, cuenta con 10 elementos ópticos y una placa holográfica para formar las pinzas ópticas.



Figura 6. Diseño del arreglo experimental

Fuente: (Padilla, 2009) Elaboración: (Padilla, 2009)

Este arreglo experimental se realizó por Padilla en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, en México en el año 2009. Este sistema también tiene 10 elementos ópticos,

entre ellos se encuentran espejos de oro para la perfecta reflexión de la luz infrarroja.



Figura 7. Configuración de un sistema de pinzas ópticas doble laser

Fuente: (Smith, Cui y Bustamante, 2003)

Elaboración: (Smith, Cui y Bustamante, 2003)

Este sistema de pinzas ópticas fue descrito en el año 2003 por Smith, Cui y Bustamente. Este sistema es uno muy complejo con alrededor de 30 elementos, la dificultad de



Figura 8. Configuración del sistema de pinzas ópticas

Fuente: (Jun *et al.*, 2014) Elaboración: (Jun *et al.*, 2014)

Este es un sistema de pinzas ópticas que cuenta con un medidor de la fuerza ejercida que fue realizado por Jun y colaboradores en el año 2014. Este sistema tiene alrededor de 20 elementos, algunos de ellos muy especializados y alta dificultad de alineación.



Figura 9. Esquema experimental

Fuente: (Kong *et al.*, 2011) Elaboración: (Kong *et al.*, 2011)

Este esquema experimental se desarrolló en el Departamento de Biología Molecular, Microbiana y Estructural, Universidad de Connecticut Health Center, Connecticut, Estados Unidos por (Kong *et al.*, 2011). Finalmente un sistema de pinzas ópticas extremadamente complejo, que si bien permite medir y controlar algunos parámetros, es muy complejo su ensamblaje.

Después de revisar los sistemas de pinzas ópticos se puede concluir que existen sistemas básicos hasta muy complejos y que depende de la aplicación ya que hay aplicaciones en las que se requieren sistemas para atrapar más de una partícula, medir la fuerza con la que se mueven o que utilizan sensores de movimiento y calidad que se requiera. Las pinzas ópticas tienen ventajas como la precisión para capturar micro-esferas y micro-organismos con características similares, en los sistemas que usan luz infrarroja tienen además la ventaja de no ser agresivo con el material biológico ya que la luz puede entrar a la célula sin romper la membrana, otra de las ventajas es que con la longitud de onda adecuada podemos manipular células de forma individual. Las desventajas son que si se usa luz visible puede causar daños irreversibles a la célula debido a la longitud de onda que se utilice ya que esta es absorbida por el material biológico.

Se decidió implementar un sistema de pinzas ópticas lineal ya que son los elementos disponibles en el laboratorio y la facilidad para alinear es un elemento primordial, donde es importante mencionar que los láseres disponibles en el laboratorio son en el rango visible, rojo, verde y azul. La longitud de onda idónea para manipulación de microorganismos es el de la luz infrarroja debido a que los organismos biológicos en ese espectro absorben mínimamente la luz, sin embargo utilizaremos el rojo por su disponibilidad en el laboratorio.

4.1.3 Principio de funcionamiento de las pinzas ópticas

Luz: La luz está constituida por ondas electromagnéticas, en las que están los fotones al azar y causan muchas colisiones, es debido al choque de los fotones con la materia que se produce la energía que hace visibles las cosas, esta se propaga a través de fotones. La frecuencia en la banda estrecha de la luz que es visible para nuestros ojos va de $3,84 \times 10^{14}$ hasta $9,69 \times 10^{14}$ Hz (Hecht, 2002).

 Tabla 1. Rangos de frecuencia y longitud de onda aproximados de la luz de sus diferentes colores

 en el vacío

Color	λ_0 (nm)	v(THz)*
Rojo	780-622	384-482
Naranja	622-597	482-503
Amarillo	597-577	503-520
Verde	577-492	520-610
Azul	492-455	610-659
violeta	455-390	659-769
*1 Terahertzio (THz) = 10^{12} Hz, 1 nanómetro (nm) = 10^{-9} m.		

Fuente: (Hecht, 2002).

Elaborado: (Hecht, 2002).

4.1.4 Tipos de luz:

Luz natural: La luz natural tiene como fuente principal la energía del sol, su espectro es de colores y contiene más radiación. Además de los colores que podemos ver, existen otros que son invisibles para el ojo humano (González Cabrera, 1996).



Elaborado: (Gliessman, 2002).

Luz artificial: La luz artificial es elaborada por el hombre, provee la luz que viene de la energía de otra fuente y que es posible controlar la cantidad, potencia y longitud de onda según sea la necesidad, su espectro es menos diverso que el de la luz natural. Entre las principales fuentes de luz artificial están la bombilla incandescente, la lámpara ahorradora o fluorescente, los diodos emisores de luz o LEDs y el más importante por su aplicación tecnológica la Luz Amplificada por Emisión Estimulada de Radiación (LASER)



Figura 11. Espectro de Bombilla eléctrica de resistencia

Fuente: (Burns y Escalona y García, 2003).

Elaboración: (Burns y Escalona y García, 2003).



Figura 12. Espectro de luz de lámpara Fluorescente

Fuente: (Malacara, 2015) Elaboración: (Malacara, 2015)



Figura 13. Espectro de luz LED

Fuente: (Malacara, 2015) Elaboración: (Malacara, 2015)



Figura 14. Espectro de luz láser

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Al igual que se desarrolló la electrónica para el control del flujo de electrones en los circuitos y aplicaciones tecnológicas, existen la Óptica que incluye el uso de elementos que permiten el control del flujo de fotones.

4.1.5 Elementos ópticos:

Espejo dicroico: El vidrio de base de los espejos dicroicos está revestido con una película que se usa para dividir la luz (se refleja un rango de longitudes de onda), que puede seleccionar reflejar luz roja, verde o azul según sea la película de la que está revestido el vidrio, ya que según la película puede hacer que cualquiera de estas luces se refleje y deje pasar las demás (Rodríguez Vázquez, Ruiz y Huelva, 2005).

Espejo: Es una superficie de vidrio, en la que se refleja la luz y se forma la imagen, ésta imagen tiene la misma forma y el mismo tamaño del objeto real (Pérez Porto, 2017).

Lentes.- Los lentes son artefactos de refracción, que dan forma a la distribución de la energía emitida, las lentes funcionan en la superficie depende del uso que se le dé, puede ser de aumento o para hacer que el eje óptico de cada lente coincida con el rayo de luz central del sistema (colimar) (Hecht, 2002)

4.1.6 Física de las pinzas ópticas



Figura 15. Refracción y Reflexión

Fuente: (Shaevitz, 2006) Elaboración: (Shaevitz, 2006)

En las pinzas ópticas se da un atrapamiento de objetos o células mediante procesos que pueden ser explicados de la siguiente manera, en el gráfico de la izquierda se muestra la interacción de un objeto con la luz láser, una parte de la luz es reflejada y otra transmitida, la luz se desvía o refracta, existe también una mínima cantidad de luz que es absorbida pero esta luz transfiere momento a la partícula, esto quiere decir que la partícula siente una fuerza producida por la luz que la está incidiendo (Shaevitz, 2006). Si la partícula está en los alrededores de la cintura del haz, la interacción con los fotones y la transferencia de momentos, hacen que la partícula se posicione siempre en la cintura y no en otro lado.

4.1.7 Fuerza Óptica

La fuerza es generada por la reflexión de la luz que cambia el curso lineal de los fotones y esta fuerza es la que actúa sobre la partícula. La técnica de manipular objetos micrométricos con luz, conocida como pinzas ópticas, fue un hito en diversas áreas de investigación ya que se puede tener una excelente precisión para su manipulación, logrando así aplicaciones tales

como la manipulación de ADN para cortarlo o para transportarlo utilizando una partícula que esté unida al ADN (Wang *et al.*, 1997).

La teoría electromagnética muestra que la luz puede manipular objetos. Se puede hacer un estimado de la fuerza F resultante que tiene que ver con la velocidad de la luz *v* en el medio en el que viaja. Para un único rayo de luz con una potencia P dada se sostiene que:

$$F \alpha \frac{p}{v} 4.1$$

Para evaluar la magnitud de la fuerza que la luz realiza se debe tener en cuenta un haz de luz que da sobre un espejo. Cada fotón poseerá entonces un momento asociado dado como:

$$\bar{p} = h\bar{k}$$
 4.2

Donde h es la constante de plank y \overline{k} es el vector de onda asociado a la luz. Al reflejarse la luz con el espejo se le transfiere un momento

$$\Delta \bar{p} = 2h\bar{k}$$
 4.3

Si se escribe el módulo del momento en función de la energía de la onda se tiene:

$$|\Delta \bar{p}| = 2h \ \frac{w}{v} = 2\frac{E}{v} \ 4.4$$

Procediendo con respecto al tiempo se haya la siguiente expresión para la fuerza, donde la fuerza es mayor a la que en realidad está conteniendo a la partícula ya que no despreciamos los valores debidos a la inclinación de los rayos

$$F = 2\frac{P}{v} 4.5$$
$$F = 2\frac{39.9}{2.26 \times 10^8} = 3.53 \times 10^{-10} \text{N}$$

Donde v es la velocidad de la luz en el medio, para calcular se toma la fórmula $n = \frac{c}{v}$, n es el índice de refracción y c es la velocidad de la luz en el vacío, entonces:

1.
$$v = \frac{c}{n} 4.6$$

 $v = \frac{3x10^8 m/s}{1.33} = 2.26 x10^8 m/s$

En ensayos de pinzas ópticas las potencias utilizadas son en general de pocos mili watts, con lo cual la ecuación anterior predice una fuerza del orden de 10^{-10} N. Esta fuerza no puede

explicar el aislamiento óptico de una partícula porque su efecto sería un desplazamiento en la dirección incidente del rayo de luz.

4.2 Metodología (por objetivos)

4.2.1 Reporte técnico preliminar (Objetivo 1)

Se realizó la revisión de la literatura de los principios básicos de óptica y la física involucrada. Se revisó la bibliografía sobre los sistemas de pinzas ópticas desarrollados en la actualidad, capacidad de los sistemas, los componentes de las diversas versiones de sistemas ópticos desarrollados y selección de un sistema de pinzas ópticas para adecuarlo a la infraestructura con la que cuenta la UTPL. Luego se procedió a realizar una comparativa de las características y elementos que debe tener nuestro sistema de pinzas ópticas.

Tipo de láser	Tipo de partícula	Tamaño de partícula	Autor
No reporta	Partículas de Poliestireno	5,3 μm	Onetto & Crescitelli 2014
Láser de Argón (514 nm)	Micro esferas de sílice	5 µm	Ricardez, E. Orozco, et al. 2008
Láser infrarrojo(1064 nm)	Especímenes biológicos	No reporta	Galarza Cuadros et al. 2012
Láser de luz roja (671 nm)	Partículas de Poliestireno	5 µm	Alvarez 2012
Láser infrarrojo(1064 nm)	Partículas de vidrio	3 µm	Padilla 2009
Láser infrarrojo (835 nm)	Partículas de Poliestireno	0,27 -20 μm	Smith et al. 2003
Láser infrarrojo (980 nm)	Células	No reporta	Jun et al. 2014

Tabla 2. Tipo de láser, partícula, tamaño de partícula.

Fuente: Autor

Elaborado: Autor.

4.2.2 Diseño del sistema de pinzas ópticas (Objetivo 2)

De acuerdo a la información técnica investigada los sistemas de atrapamiento óptico coinciden en varios elementos, según esto se propuso y realizó el diseño de un sistema de pinzas ópticas con específico interés en aplicaciones biológicas. Luego se localizó, reunió y compró el material para la construcción del sistema de pinzas ópticas, con los siguientes elementos procedimos a realizar el diseño experimental de nuestro sistema se pinzas ópticas:



Figura 16. Láser.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

El láser para este proyecto fue seleccionado en base a que se trabajará con organismos biológicos, éste es un diodo láser de luz roja con una longitud de onda de 658 nm de buena calidad porque el spot no es ovalado y el perfil es gaussiano, y que posee un perfil gaussiano que fue determinado por análisis de intensidad de imagen con el software libre *ImageJ*.



Figura 17. Espejo dicroico.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

Nosotros usamos un espejo dicroico que refleja la banda de color rojo, por lo que sirve de espejo para nuestra fuente de luz láser.



Figura 18. Soporte para lente de observación

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

Nos ayuda a colocar la lente de observación a una distancia correcta para realizar las capturas con la cámara.



Figura 19. Lente de observación.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

El lente de observación que incluye el microscopio nos permite obtener las imágenes para su digitalización por CCD.



Figura 20. Objetivo de microscopio.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

El objetivo que se ha seleccionado para este trabajo es el 100x debido al tamaño de las muestras que se pretenden manipular, para ello se puede realizar en aire o aceite de inmersión si se dispone para mejorar el enfoque del láser.



Figura 21. Platina

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

La platina de movimiento XY la utilizamos para colocar la muestra y tener la libertad de moverla y observar de forma estable.



Figura 22. Fuente de luz.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

La fuente de luz nos permite observar de mejor manera la muestra y la luz no es reflejada por el espejo dicroico.



Figura 23. Cámara CCD.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

A partir de la cámara CCD. Obtenemos la imagen en la computadora.



Figura 24. PC. Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

4.2.3 Adecuación y descripción del arreglo de pinzas ópticas. (Objetivo 2)

Se utilizó el sistema de microscopio para la adecuación del sistema de pinzas ópticas ya que posee la fuente de luz, platina y objetivo de microscopio, estos elementos nos permitieron obtener la imagen, adicionalmente, el láser, espejo dicroico, soporte, lente de observación y la cámara CCD, debido a que usamos como parte del sistema de pinzas, el microscopio, esto no significa que se desarme el microscopio sino que se le dará dos usos, podrá ser usado como el microscopio cuando se le necesite así y como pinza óptica cuando se lo requiera sin afectar ninguna de sus funciones como microscopio. Después de conseguir los elementos para el sistema de pinzas ópticas, procedimos a construir el sistema de pinzas ópticas por partes y se va comprobando la funcionalidad.

Éste diseño se realizó mediante software gráfico y está respaldado por datos técnicos, así como un análisis de la dinámica del sistema.

4.2.4 Construcción del sistema de pinzas ópticas (Objetivo 2)



Figura 25. Diseño experimental.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Para la construcción del sistema de pinzas ópticas, se procedió a la implementación experimental del material seleccionado anteriormente y se realizó el montaje, este montaje estuvo sujeto a pruebas ópticas y pruebas de atrapamiento óptico y funcionamiento mediante el uso de cámaras y muestras controladas.

4.2.5 Calibración del sistema (Objetivo 3)

Se realizaron las pruebas de calibración del sistema para hacerlo manejable. Para calibrar el sistema se controló la potencia óptica, en el laboratorio disponemos de láseres de color verde, azul y rojo. Los mismos que al usarlos nos dio como resultado que el láser de luz verde no poseía un perfil gaussiano definido es decir la luz enfocada era ovalada por lo que no se puede utilizar para el sistema de pinzas ópticas, así mismo se descartó el uso del láser de luz azul

por la potencia y enfocado quemó el material expuesto al láser. El láser de luz roja si fue posible utilizarlo y atrapar las micro-partículas ya que posee las características necesarias, pero en una exposición prolongada si calentó el material expuesto.

Probamos también los objetivos de microscopio 40x pero era muy poco aumento para nuestras muestras, así que usamos el de 100x que nos sirvió para lograr manipular las micro-partículas y microorganismos.

El material que se utilice también tiene que ver, ya que nosotros probamos con vidrio pulverizado sin embargo no logramos capturar debido a la irregularidad de las partículas, a diferencia de las partículas de polietileno, las cuales si pudimos capturar por su forma más simétrica. La fuente de luz que está en el sistema de microscopio utilizado fue de mucha ayuda para tener una buena observación de micro-partículas y microorganismos.

4.2.6 Determinar la potencia del láser para mover partículas de polietileno (Objetivo 3)

 Obtuvimos las partículas de polietileno, a través de aislar de la pasta dental mediante lavado que se realizó poniendo en un vaso de precipitado pasta dental con agua destilada y se llevó a la plancha a 50°C, se agito para que se diluya y se separó las partículas con una pipeta y se las colocó en otro vaso de precipitado



Figura 26. Partículas de polietileno.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

 Una vez aisladas las partículas figura 26 de la pasta procedimos a colocar las partículas de polietileno en un medio líquido, que era agua destilada en el porta objetos.

- Se realizaron varias pruebas con un láser rojo (658nm) de potencia baja (24mw) y no funcionó, luego utilizamos otro láser rojo (658nm) con una potencia mayor 42mW y funcionó, permitiéndonos atrapar y mover las partículas de polietileno con la pinza óptica antes implementada.
- Hicimos un experimento con el cual obtuvimos el diámetro de un cabello para determinar el tamaño de las partículas atrapadas por comparación.
- Espectro electromagnético del láser usado para el experimento, figura 27.



Figura 27. Espectro del láser.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.



Figura 28. Experimento del láser para medir el diámetro del cabello.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

Para tener una estimación del tamaño de la micro esfera atrapada, observamos un cabello en el microscopio y procedimos a medir el diámetro del cabello mediante un experimento que consistió en utilizar un láser rojo con una longitud de onda de 670 nm, mediante difracción de luz que tiene con el cabello, este proyecta un patrón de difracción que está relacionado con el grosor del cabello (Figura 28). Este patrón se forma por la interferencia de las ondas, que son menos intensas al alejarse del centro y están separadas por huecos vacíos que corresponden a los máximos y mínimos de la difracción de luz. Para calcular utilizamos la fórmula:

$$e = \lambda \frac{L}{a} 4.7$$

Donde λ es la longitud de onda, L es la distancia desde donde es proyectado el láser que es 1.009m y "a" es la distancia del centro del patrón al centro del siguiente punto brillante a=0.011m.

4.2.7 Determinar la potencia del láser para mover microorganismos (Objetivo 3)

 Obtuvimos los microorganismos del agua de las flores que se dejó sin cambiar por varios días



Figura 29. Fuente de microorganismos.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

- Una vez que han pasado los días y los microorganismos se ha multiplicado procedimos colocar una gota del agua que contiene los microorganismos en un porta objetos, que se llevó a observar en el sistema de pinzas ópticas implementado.
- Se realizaron varias pruebas con un láser de luz roja (658nm) de 24mW de potencia, esta es una potencia baja y no funcionó, luego utilizamos otro láser de luz roja (658nm) de 42mW de potencia y funcionó permitiéndonos atrapar los microorganismos con la pinza óptica antes implementada.
- Utilizamos el experimento del cabello figura 28. para determinar el tamaño de los microorganismos atrapados, usamos esto para tener una referencia que se pueda comparar y es fácil determinar el grosor del cabello.

4.2.8 Reporte técnico (Objetivo 3)

Se elaboró un reporte técnico del sistema y se elaboró un manual de operación con muestra de funcionamiento, en el cual se encuentra el detalle de los elementos que usamos y la forma de ir armando el sistema de pinzas ópticas y su manera de utilización (ver ANEXO 1.)

4.3 Análisis de datos

4.3.1 Análisis del laser

- Perfil del haz

Es importante determinar el perfil del láser para ver que la distribución de la luz que sea focalizada de forma coherente y ordenada. Para determinar que el perfil del láser que utilizamos es gaussiano, usamos el programa ImageJ.



Figura 30. Luz láser.

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.



Figura 31. Perfil gaussiano del laser

Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

- Potencia

• Para determinar la potencia usamos el potenciómetro óptico



Figura 32. Potenciómetro óptico

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

- Espectro electromagnético del láser



Figura 33. Espectro electromagnético del láser.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

- Divergencia

Para medir la divergencia del haz utilizamos la siguiente fórmula.

Divergencia = $2 \arctan(\frac{Df-Di}{2l})$ 6.8

Divergencia = $2 \arctan(\frac{Df-Di}{2l}) = \left(\frac{0.5-0.8}{2(4.68)}\right) = 3.68^{\circ}$

4.3.2 Análisis del atrapamiento

Después de los experimentos y varios ensayos realizados con las micro-partículas de polietileno y microorganismos en el sistema de pinzas ópticas podemos decir que los siguientes, son los parámetros que permiten hacer atrapamiento óptico:

- Potencia de atrapamiento/captura

42mW

- Tamaño de partículas/microorganismos

8,21 um

- Objetivo de microscopio

100x

RESULTADOS

Como resultados tenemos el sistema de pinzas ópticas figura 34. Que hemos construido, en el que realizamos ensayos para atrapar objetos (partículas de polietileno presentes en la pasta dental) y microorganismos.





Figura 34. Sistema de pinzas ópticas.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

El sistema que se muestra en la figura 34. está configurado por una cámara CCD que se sostiene con una montura y se encuentra ubicada sobre el espejo dicroico que está encima del lente de observación y que lo usamos para que no permita que pasen reflejos de luz hacia la cámara y proyecte una imagen clara en la PC, además posee un láser de luz roja que tiene una longitud de onda de 658nm, se encuentra montado sobre la entrada del microscopio a los objetivos, el objetivo de microscopio que usamos es de aumento 100x por el tamaño de las muestras que se manipularon, se alineó con un espejo dicroico para reflejar la luz roja hacia el objetivo de microscopio y permite alinear el láser para que llegue a la muestra bien alineado y así poder manipular la muestra que debe estar en la platina del microscopio, en un portaobjetos, así mismo la fuente de luz está debajo y sirve para que podamos observar de mejor manera la muestra.

Para calcular el tamaño de la partícula atrapada utilizamos el ensayo del diámetro del cabello con la siguiente fórmula:

$$e = \lambda \frac{L}{a}$$

$$e = (654.30 \times 10^{-9}) \frac{4.41m}{0.056m}$$

$$e = (6.5430 \times 10^{-7}).78,75 m$$

$$e = 5.1526 \times 10^{-5}m$$

$$e = 51.52 \ \mu m$$

5.1 Análisis del movimiento de la partícula.

El video del que obtuvimos las imágenes que se presentan en la foto 2. es el momento que grabamos de cuando y como fue que se capturó una macropartícula de polietileno de 8, 2 µm, lo que sucede en el video es que luego de capturar la macropartícula la movimos, recorrimos una distancia y al alcanzar cierta aceleración anuló la fuerza con la que fue atrapada la micropartícula y se suelta, con los siguientes cálculos queremos saber la velocidad que alcanza la

micro-esfera, la aceleración y la fuerza que se necesita para sacar a la micro esfera de la trampa óptica.





Figura 35. En la foto b) podemos observar el momento inicial, en la foto c) es el momento en el que ya se soltó la micro-esfera y en la foto d) observamos la distancia que recorrió la micro-esfera. Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

En este experimento atrapamos la micro-esfera y calculamos la velocidad que alcanza la esfera después de que se soltó y a lo largo de una distancia conocida, lo hicimos mediante la estimación aproximada de la distancia que recorrió en el lapso de tiempo del suceso utilizando la fórmula de v= d/t, siendo: d= 5.1 diámetros que se refiere a que en esa distancia entrarían 5,1 micro-esferas, el valor 5.1 diámetros es la distancia que recorrió la micro-esfera por 8.2 um que es el tamaño de la micro-esfera atrapada. Y medimos el tiempo mediante fotogramas con duración de 1/29s, el tiempo total nos da t= 6 fotogramas*1/29s los fotogramas tiempo que tardó la esfera en recorrer la distancia de 5.1 diámetros después de soltarse y el 1/29, porque existieron 29 fotogramas por segundo, entonces:

$$vf = d/t 7.1$$

 $vf = 75.58 \times 10^{-6} m/20.68 \times 10^{-2} s$
 $vf = 3.6547 \times 10^{-4} m/s$

Al obtener la velocidad promedio $vf = 8.65x10^{-6} m/s$, la aproximamos a la velocidad final y procedimos a calcular la aceleración necesaria y la fuerza que se necesita para sacar la partícula de la pinza.

$$a = \frac{Vf - Vi}{t} 5.2$$
$$a = \frac{3.6547 \times 10^{-4} - 0}{20.68 \times 10^{-2}}$$
$$a = 1.7673 \times 10^{-3}$$

Para calcular una fuerza estimada también necesitamos la masa de la micro-esfera para ello procedemos primero a calcular primero el volumen de la esfera con la siguiente fórmula:

$$v = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 5.3$$
$$v = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (5.05x10^{-6})^3$$
$$v = 5.3946x10^{-16} m^3$$

Para obtener la masa de la esfera multiplicamos el volumen por la densidad del polietileno que es el material del que están hechas las micro-esferas es de 925000 g/ m^3 Entonces:

$$m = v. 5.4$$

 $m = 5.3946 \times 10^{-16} m^3.925000 \text{ g/m}^3$
 $m = 4.99 \times 10^{-10} \text{ gr}$

Convertimos la masa a kilogramos y nos queda 4.99 $\square 10^{-13}$ kg, con estos datos ya podemos aplicar la fórmula para encontrar la fuerza que se necesita para que se salga la micro-esfera de la pinza óptica:

F = m. 7.5 $F = 4.99x 10^{-13} \cdot 1,7673 \times 10^{-3}$ $F = 8.8188 \times 10^{-16} N$

Hay que tener en cuenta que nosotros no tuvimos detector de cuadrante que sirve para saber si la pinza óptica está alineada después de que el láser pasa por el objetivo de microscopio, esto nos dificulta mucho la parte experimental.

5.2 Captura de microorganismos

La captura de microorganismos se realizó de forma exitosa en la pinza óptica implementada, con un láser de luz roja (658nm) de 42mW de potencia, el tamaño de los microorganismos capturados es del orden de 8µm, los microorganismos fueron obtenidos de agua de flores que se dejó sin cambiar por varios días porque fue la manera más fácil en la que podemos obtenerlos.

DISCUSIÓN

En base a la revisión bibliográfica sobre sistemas de pinzas ópticas, encontramos los elementos básicos de los que tienen estar constituidos (Maragò *et al.*, 2013), los principales elementos son fuente de luz, platina, objetivo de microscopio, láser y cámara CCD. Existen diferentes diseños que han sido desarrollados por (Volke, Ricárdez y Ramos, 2007; Ricardez, E. Orozco y Hernández, 2008; Padilla, 2009; Alvarez, 2012; Galarza Cuadros, Ortiz y Amat, 2012) desde los más básicos a más complejos, de estos modelos nos basamos principalmente en el modelo lineal de (Onetto y Crescitelli, 2014). Con los materiales que estaban disponibles en el laboratorio y el análisis de los diseños, tuvimos la facultad para implementar el sistema de pinzas ópticas.

Una vez construido completamente el sistema se pudo evidenciar su funcionalidad al realizar varios ensayos para atrapar objetos y microorganismos y estos fueran positivos.

Al realizar los ensayos con micro-partículas de polietileno en el sistema de pinzas ópticas desarrollado se pudo atrapar y manipular micro-esferas del orden de 8 µm, a diferencia de otros estudios que reportan atrapar micro esferas de poliestireno de 0,27 a 20 µm (Smith, Cui y Bustamante, 2003), micro-esferas de sílice de 5 µm (Ricardez, E. E. Orozco y Hernández, 2008) y partículas de vidrio de 3um (Padilla, 2009), se usó micro-partículas de polietileno por la disponibilidad y recursos para conseguirlas, estas diferencias pueden deberse al índice de refracción de las partículas, a la calidad del láser y la longitud de onda del mismo.

En los ensayos que se hizo para el atrapamiento de microorganismos, ignoramos si se les causo algún tipo de daño ya que el láser que usamos es luz visible, según la literatura revisada, se reportan daños a material biológico cuando la longitud de onda es menor a 782nm (Domínguez Vargas, 2007), para organismos biológicos es usualmente utilizado un láser (Nd:YAG) (Neuman y Nagy, 2008), ya que las muestras biológicas presentan un mínimo de absorción en la región de 750nm-1200nm del espectro electromagnético (IR) (Arias-González, 2010; Torres Hurtado, 2016; Wilke, 2016), no obstante usamos la luz visible (rojo, 658nm) ya que era el láser que tuvimos disponible en el laboratorio.

Durante la calibración se descartó el láser de luz verde ya que no poseía un perfil gaussiano y el láser de luz azul ya que quemó los materiales que estuvieron expuestos debido a su longitud de onda, el láser rojo cumplió con los parámetros necesarios (Neuman y Nagy, 2008). Se estableció un protocolo para el sistema de pinzas ópticas detallando los parámetros que posee el láser, los procesos que se debe ir comprobando y la manera en la que fue implementado, así mismo la forma para exponer las muestras de objetos u microorganismos al sistema de pinzas ópticas implementado. Con este arreglo de pinzas ópticas considero que se puede usar sin causar ningún tipo de daño en objetos como partículas de poli-estireno, polietileno, biopolímeros sin embargo también se puede usar para manipular organismos biológicos sin certeza de que se les cause daño o no.

Al usar láseres de menor potencia, no fue posible la captura de objetos ni microorganismos, esto se debe al tamaño de las partículas, la principal dificultad para armar el arreglo fue la disponibilidad de elementos y el alineamiento de los mismos.

Este estudio de implementación de un sistema de pinzas ópticas ha sido realizado por primera vez en la Universidad Técnica Particular de Loja y de acuerdo a la bibliografía revisada y a nivel nacional existen muy pocos estudios relacionados con este tema.

CONCLUSIONES

Se implementó el sistema de pinzas ópticas para manipular objetos y microorganismos, durante la implementación del sistema utilizamos la menor cantidad de elementos posibles y disponibles en el laboratorio, el sistema de pinzas es funcional, pero para obtener mejores resultados en la captura y manipulación de microorganismos se debería usar laser infrarrojo y otros elementos.

El objetivo de microscopio óptimo fue el 100x debido al tamaño de las micro-partículas y microorganismos.

Se logró mover y atrapar micro-esferas del orden de 8 µm

Se logró atrapar microorganismos del mismo orden de magnitud

El sistema de microscopio utilizado como parte la pinza óptica, se puede usar para sus funciones normales sin que afecte al sistema de pinzas ópticas.

El sistema de pinzas ópticas podría ser mejorado reemplazando el soporte del lente de observación, asegurando de mejor manera la cámara y el láser y para el atrapamiento de microorganismos, cambiando el tipo de láser de luz visible a infrarrojo, ya que es preferible para la integridad de los organismos biológicos.

Se podría utilizar este sistema en estudios de las propiedades de visco-elasticidad de biopolímeros.

Para la manipulación de organismos vivos en biología, y si quisiéramos hacer clasificación y aislamiento individual de células, estiramiento de una sola hebra de ADN en biología celular y molecular y biotecnología se requiere reemplazar el láser por un láser profesional.

En investigaciones básicas de óptica.

BIBLIOGRÁFÍA

Alvarez, M. (2012) Implementación de pinzas ópticas holográficas para manipulación de microsistemas. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN.

Arias-González, R. (2010) «Manipulación láser de células, orgánulos y biomoléculas», *Real Sociedad Española de física*, 24-4, pp. 45-58. Disponible en: http://www.rsef.org.

Ashkin, A. (1970) «Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure», *Physical Review Letters*, 24(4), pp. 156-159. doi: 10.1103/PhysRevLett.24.156.

Ashkin, A. y Dziedzic, J. (1987) «Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria», *Science*, 235(4795), pp. 1517-1520. doi: 10.1126/science.3547653.

Burns, R. A. y Escalona y García, H. J. (2003) *Fundamentos de química*. Pearson. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=9K5qtyKHoUwC&dq=espectro+de+bombilla+electrica &hl=es&source=gbs_navlinks_s.

Camacho, A. (2014) «Momento: Revista de Física», *MOMENTO*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Fisica, 0(49E), pp. 75-85. doi: 2500-8013.

Domínguez Vargas, D. A. (2007) *Medición y comparación de fuerzas de confinamiento mediante haces tipo Gaussiano y Bessel en un sistema de asimiento óptico*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Galarza Cuadros, J., Ortiz, K. y Amat, A. (2012) *Pinzas ópticas, Calculo Diferencial.* Guayaquil. Disponible en: http://blog.espol.edu.ec/juangalarza/files/2012/11/LA-PINZA-OPTICA.pdf.

Gliessman, S. R. (2002) Agroecologia: processos ecológicos en agricultura sostenible. CATIE. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=rnqan8BOVNAC&dq=luz+natural+espectro&hl=es&so urce=gbs_navlinks_s.

González Cabrera, V. M. (1996) Física fundamental. Editado por Editorial Progreso. Progreso.Disponibleen:https://books.google.com.ec/books?id=_NG9v8h7-LIC&dq=luz+natural+espectro&hl=es&source=gbs_navlinks_s.

Greulich, K. O. *et al.* (2000) «Micromanipulation by laser microbeam and optical tweezers: from plant cells to single molecules», *Journal of Microscopy*. Blackwell Science Ltd, 198(3), pp. 182-187. doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00698.x.

Hecht, E. (2002) Optics. 4 Edition. Editado por A. Black. San Francisco.

Hou, X. y Cheng, W. (2012) «Optical Tweezers».

Juan, M. L., Righini, M. y Quidant, R. (2011) «Plasmon nano-optical tweezers», *Nature Photonics*, 5(6), pp. 349-356. doi: 10.1038/nphoton.2011.56.

Jun, Y. *et al.* (2014) «Calibration of Optical Tweezers for In Vivo Force Measurements: How do Different Approaches Compare?», *Biophysical Journal.* The Biophysical Society, 107(6), pp. 1474-1484. doi: 10.1016/j.bpj.2014.07.033.

Kong, L. *et al.* (2011) «Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers», *Nature Protocols*. Nature Research, 6(5), pp. 625-639. doi: 10.1038/nprot.2011.307.

Malacara, D. (2015) *Óptica básica*. Editado por Fondo de Cultura Economica. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=TqASDQAAQBAJ&dq=espectro+luz+led&hl=es&sour ce=gbs_navlinks_s.

Maragò, O. M. *et al.* (2013) «Optical trapping and manipulation of nanostructures», *Nature Nanotechnology*, 8(11), pp. 807-819. doi: 10.1038/nnano.2013.208.

Molloy, J. E. y Padgett, M. J. (2002) «Lights, action: optical tweezers», Contemporar y Physics,43,pp.241-258.Disponiblehttp://people.physics.illinois.edu/selvin/prs/498ibr/tweezers.pdf.

Moreno, F. (2003) Aplicaciones de la microscopía de fuerzas al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales. Universidad Autónoma de Madrid.

Murphy, D. B. (2001) Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. Wiley-Liss.

Neuman, K. C. y Block, S. M. (2004) «Optical trapping», *Review of Scientific Instruments*. American Institute of PhysicsAIP, 75(9), pp. 2787-2809. doi: 10.1063/1.1785844.

Neuman, K. C. y Nagy, A. (2008) «Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy», *Nature Methods*, 5(6), pp. 491-505. doi: 10.1038/nmeth.1218.

Onetto, M. y Crescitelli, M. (2014) *Estudio del movimiento Browniano y captura de partículas utilizando pinzas ópticas*. Balseiro-Argentina. Disponible en: https://www.dropbox.com/home/documentos?preview=3_Pinzas_Opticas_Crescitelli-Onetto.pdf.

Padilla, J. P. (2009) Tesis Maestria. Pdf. Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.

Pérez Porto, J. (2017) Definición de espejo. Disponible en: https://definicion.de/espejo/.

Ricardez, I., Orozco, E. E. y Hernández, J. A. (2008) «PINZAS ÓPTICAS, UNA HERRAMIENTA EFICAZ PARA MICROMANIPULACIÓN Optical Tweezers, An Effective Tool For Micromanipulation».

Ricardez, I., Orozco, E. y Hernández, J. (2008) «PINZAS ÓPTICAS, UNA HERRAMIENTA EFICAZ PARA MICROMANIPULACIÓN», *FARAUTE*, 3, pp. 25-30. Disponible en: http://servicio.bc.uc.edu.ve/facyt/v3n1/3-1-3.pdf.

Rodríguez-Sevilla, P. *et al.* (2016) «Determining the 3D orientation of optically trapped upconverting nanorods by in situ single-particle polarized spectroscopy», *Nanoscale*, 8(1), pp. 300-308. doi: 10.1039/C5NR06419H.

Rodríguez, G., Sanchez, F. y Martínez, S. (2009) «Ingeniería de haces láser »:, XII(44), pp. 16-23.

Rodríguez Vázquez, P., Ruiz, A. y Huelva, T. (2005) «La televisión: ¿caja tonta o caja mágica? Television: silly box or magical box?», *Redalyc.org*, (25), pp. 1-10. Disponible en: http://www.redalyc.org/pdf/158/15825183.pdf.

Shaevitz, J. W. (2006) A Practical Guide to Optical Trapping. University of Washington.

Smith, S., Cui, Y. y Bustamante, C. (2003) «[7] Optical-Trap Force Transducer That Operates by Direct Measurement of Light Momentum», en *BIOPHOTONICS*. Elsevier Science (USA), pp. 134-162.

Svoboda, K. y Block, S. M. (1994) «BIOLOGICAL APPLICATIONS OF OPTICAL FORCES», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Stmct*, 23, pp. 247-85.

Torres Hurtado, S. A. (2016) ATRAPAMIENTO Y MANIPULACIÓN ÓPTICA PARA APLICACIONES BIOLÓGICAS. Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica. Disponible https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1009/325/1/TorresHuSA.pdf.

Volke, K., Ricárdez, I. y Ramos, R. (2007) «Pinzas ópticas: las delicadas manos de la luz», *Revista Ciencia*, p. 25.

Wang, M. et al. (1997) «Stretching DNA with Optical Tweezers», Biophysical Journal, 72, pp.1335-1346.Disponibleen:http://wanglab.lassp.cornell.edu/wp-

content/uploads/2014/05/1997_BJ_72-1335_Wang-et-al.pdf.

Wilke, N. (2016) «Pinzas ópticas y su aplicación en biología (Optical Tweezers applied to biology)», *Luminotecnia*.

ANEXOS

MANUAL DEL SISTEMA DE PINZAS ÓPTICAS

CONTENIDO

- I. APLICACIONES DEL INSTRUMENTO
- II. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS
- III. MANUAL DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE PINZAS ÓPTICAS
- IV. DIAGRAMA PRINCIPAL
- V. PARA PREPARAR LA MUESTRA

INSTRUCCIONES DE OPERACIÓN

APLICACIONES DEL INSTRUMENTO

Este sistema de pinzas ópticas puede ser usado para manipular micro esferas o micro organismos y se le puede dar una serie de aplicaciones en varias áreas según sea el interés para el que se ha adquirido, puede ser utilizado en Universidades e Instituciones científicas.

Este sistema de pinzas ópticas ha sido desarrollado por el Departamento de Ciencias Naturales y Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL. Tiene como objetivo realizar el atrapamiento de micro-esferas y micro-organismos a través del sistema de pinzas ópticas implementado.

En este manual se encontrará información sobre los elementos básicos que debe tener, implementación de los elementos y manejo del sistema de pinzas ópticas.

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS

Laser: rojo Perfil del haz: Gaussiano Potencia sin espejo dicroico: 100mW Potencia con espejo dicroico: 42mW Longitud de onda: 658 nm o mayor

MANUAL DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE PINZAS ÓPTICAS

IMPLEMENTACIÓN DE LOS ELEMENTOS

Este sistema consta de varios elementos alineados, para su correcto funcionamiento, como el sistema que realizamos es lineal, en orden los elementos básicos de los que está compuesto son:



Figura: 1. Cámara CCD.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.



Figura: 2. Lente de observación. Fuente: Autor. Elaboración: Autor.



Figura: 3. Láser.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.



Figura: 4. Espejo dicroico. Fuente: Autor. Elaboración: Autor.



Figura: 5. Sistema de microscopio. Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.



Figura: 6. PC. Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

Implementación y manejo del sistema de pinzas ópticas.

Reunir todos los elementos necesarios para empezar la implementación.

Comprobar la funcionalidad de cada uno de los elementos.

Después de haber escogido el láser que se vaya a usar, se debe caracterizar, ver el perfil que tiene que debe ser gaussiano, la potencia y longitud de onda.

Luego se debe ir alineando los elementos en el sistema de microscopio de la manera más adecuada e ir comprobando su eficacia.

Es importante tener en cuenta la distancia que se coloca la cámara CCD del lente de observación para obtener una buena imagen de los objetos u organismos en la PC, que previamente debe haberse instalado el software de la cámara que se vaya a utilizar.

Para el funcionamiento correcto del atrapamiento que se da en el sistema, el láser debe estar perfectamente centrado y alineado con el objetivo de microscopio. Para darse cuenta de que el láser ya está alineado se puede colocar un cuadro de cartulina negra en la platina y observar si el rayo de luz roja que está entrando por el objetivo de microscopio está centrada o si se tiene que adecuar de una forma diferente.

Se puede poner una señal en el centro de la cartulina donde esté el lente del objetivo del microscopio y debe quedar en láser en el centro como se observa en la figura 7.a y si queda como la figura 7.b o 7.c se debe mover el láser hasta centrar.



Figura: 7. Fuente: Autor. Elaboración: Autor.

DIAGRAMA PRINCIPAL



Figura: 8. Diagrama del sistema de pinzas ópticas.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

PARA PREPARAR LA MUESTRA.

En un portaobjetos colocamos cinta aislante que previo le hemos hecho un agujero en forma de circunferencia con una perforadora. Figura 9.

En el agujero colocamos una pequeña muestra con una gota de agua destilada y la cubrimos con un cubreobjetos, se forma como una rendija y en la que la muestra está en un medio acuoso y puede ser manipulada.

Procedemos a realizar el atrapamiento con el láser y a observar el proceso mediante la cámara CCD en la PC.



Figura: 9. Ubicación de la muestra.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.