Utilização de pinças óticas para a manipulação de partículas

SANDRA M. RODRIGUES - Nº 201404983

FIS4016 - Técnicas Laboratoriais Avançadas II Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Neste trabalho é realizado um pequeno estudo sobre a manipulação ótica através de pinças óticas. Os princípios físicos são apresentados, e o setup experimental utilizado esquematizado de forma bastante simples. O *trapping* de uma levedura de cerca de 5 μ m de diâmetro foi realizado com sucesso. Através do estudo da trajetória da partícula foram determinadas as forças de *trapping* ao longo do tempo, tendo sido obtidos valores máximos de -4,908 pN e -9,817 pN para as direções x e y, respetivamente.

1. INTRODUÇÃO

A luz é uma ferramenta muito poderosa, e com inúmeras aplicações. Sendo capaz de controlar a posição e orientação de alguns objetos de determinadas dimensões, desde que configurada e focada de forma favorável, o interesse no seu uso para manipular partículas tem vindo a crescer nas últimas décadas.

O *trapping* ótico foi pela primeira vez reportado em 1970, por Arthur Ashkin [1]. No artigo, Ashkin descreve o aprisionamento de partículas de dimensões micrométricas entre dois feixes idênticos, que se propagavam em direções opostas. Mais tarde, em 1986, o mesmo autor demonstra o mesmo efeito [2], desta vez usando apenas um único feixe focado - as pinças óticas. Desde então, as técnicas de *trapping* evoluiram bastante, e são atualmente aplicadas nas mais variadas áreas, com especial importância na saúde e na biomédica, onde já foram usadas para manipular vírus, bactérias, células vivas, e até ADN.

Grande parte da investigação desenvolvida nestas áreas envolve a manipulação de células e dos seus constituintes, sendo que muitas vezes essa manipulação resulta na destruição dos mesmos, devido às limitações dos métodos empregados. A grande vantagem das pinças óticas, e o que as torna numa técnica tão apreciada na investigação em saúde, é o facto de elas representarem uma forma segura e de confiança de manipular partículas, sem que seja necessária a existência de um contacto mecânico.

A maior parte dos *setups* utilizados para conseguir um *trapping* ótico estável são muito caros e, por isso, díficeis de ter disponíveis no nosso laboratório. Este trabalho baseia-se então num *setup* bastante semelhante ao apresentado em [3], com o qual uma levedura foi aprisionada. Todo o processo e teoria que o fundamenta serão expostos ao longo das próximas secções.

2. TEORIA BÁSICA DAS PINÇAS ÓTICAS

As pinças óticas fazem uso de um feixe de luz altamente focado. Na análise de um processo de trapping é necessário atender à razão entre o raio da partícula e o comprimento de onda da luz incidente, uma vez que dependendo desse valor, podemos estar perante diferentes regimes de trapping [4].

Regime de Rayleigh (r« λ) Quando o raio da partícula é bastante inferior ao comprimento de onda da luz incidente, estamos perante o regime de Rayleigh. A partícula é considerada como um dipolo magnético induzido, no qual se podem distinguir dois tipos de forças: a força de gradiente, e a força de *scattering*. A **força de gradiente** é produzida pelo gradiente da intensidade do campo elétrico, e é responsável por atrair a partícula para a região de maior intensidade. A **força de scattering** é produzida pelos fotões que atingem a partícula ao longo da sua direção de propagação, e é ela que arrasta a partícula para uma posição de equilíbrio, ligeiramente abaixo do máximo de intensidade. É a combinação entre estas duas forças que garante um *trapping* estável.



Fig. 1. Esquema básico de uma pinça ótica: a luz que entra na lente de um microscópio é focada numa cintura de feixe limitado por difração, criando assim um gradiente tridimensional capaz de arrastar a partícula fora da região de *trapping* para dentro dela. [4]

Regime de Mie (r» λ) Este regime corresponde a uma situação em que o raio da partícula é muito superior ao comprimento de onda da radiação. Neste caso, o problema encontra-se dentro do limite da ótica geométrica, e as forças surgem da soma das compenentes refletidas e refratadas dos raios.

Podemos ainda identificar um terceiro regime intermédio, no qual as dimensões da partícula têm aproximadamente as mesmas dimensões do comprimento de onda ($r\approx\lambda$). Neste caso



Fig. 2. Representação geométrica das forças que atuam no processo de trapping. (a) Forças que atuam numa partícula localizada no eixo, abaixo do ponto focal. (b)Forças que atuam numa partícula localizada no eixo, acima do ponto focal. (c) Forças que atuam numa partícula localizada fora do eixo. [6]

nenhum dos tratamentos acima referidos é válido, sendo necessário um tratamento mais completo. O tratamento teórico a este regime não será abordado no relatório. Existem no entanto ferramentas computacionais para o tratar, mais informação pode ser consultada em [5].

Do ponto de vista da ótica geométrica as forças que atuam na partícula podem ser vistas tais como representadas na figura 2, onde são apresentados três casos, que diferem entre si pela posição da partícula relativamente ao foco do feixe. A natureza destas forças é descrita pela terceira lei de Newton. A mudança de momento do feixe causada por uma reflexão, ou refração, corresponde a uma mudança de momento igual, e de direção oposta, na esfera.

Na figura 2 (a), a partícula encontra-se no eixo ótico, abaixo do ponto focal. Neste caso, os raios refletidos A" e B" são responsáveis pela força de scattering, através das alterações de momento representadas pelas forças F'_A e F''_B . Já os raios refratados, A' e B', dão origem às forças F'_A e F'_B , que resultam na força de gradiente. A resultante destas forças origina um movimento restaurador da partícula em direção ao foco.

Um outro caso é o da figura 2 (b), onde a partícula se encontra, mais uma vez, no eixo, mas desta vez, acima do ponto focal. Pela transferência de momentos dos raios A' e B', a partícula é redirecionada para baixo. Neste caso, tanto a força de *scattering*, como a de gradiente têm a mesma direção, contribuindo ambas para redirecionar a partícula em direção ao foco.

A figura 2 (c) corresponde a uma situação onde a partícula se encontra fora do eixo. Neste caso podemos considerar dois feixes de diferentes intensidades a incidir sobre ela. Na figura: $I_B > I_A$. Como a força na partícula é proporcional à intensidade do feixe, a partícula será conduzida até ao centro da distribuição de luz Gaussiana.

A. Cálculo das Forças de Trapping

De forma a garantir uma análise mais quantitativa da experiência do *trapping*, é importante conhecer a magnitude da força ótica aplicada, ou pelo menos, da sua ordem de grandeza. Será, por isso, aplicado o método de *drag force*, tal como apresentado em [<mark>6</mark>].

A força ótica total a atuar sobre a partícula é dada pela soma da força inercial com o termo de arrasto (*drag*):

$$F_{opt} = F + F_{drag} = m \frac{\delta^2 s}{\delta t^2} + \beta \frac{\delta s}{\delta t}$$
(1)

onde m é a massa da partícula, s(t) a sua trajetória, e β o coeficiente de arrasto do meio devido à viscosidade.

Considerando que a partícula se encontra perto de uma fronteira da *câmara de trapping*, que se encontra neste caso delimitada por uma lamela de vidro, o coeficiente de arrasto é dado por:

$$\beta = 6\pi\xi\eta r \tag{2}$$

onde ξ representa uma correção, cujo valor irá depender da dimensão da partícula em causa (r), e da distância do centro da partícula à superfície da *câmara de trapping* (h). Esta correção pode ser calculada através da seguinte expressão, obtida em [6]:

$$\xi = \frac{1}{1 - \frac{9}{19}(\frac{r}{h}) + \frac{1}{8}(\frac{r}{h})^3 - \frac{45}{256}(\frac{r}{h})^4 - \frac{1}{16}(\frac{r}{h})^5}$$
(3)

A determinação desta correção deve ser calculada em função das condições experimentais em que o trabalho for realizado. A viscosidade do meio, η , no caso da água, é de $8.9x10^{-4}Pa$.

Atendendo ao número de Reynolds, parâmetro que caracteriza o tipo de fluxo: $Re = \frac{2rv\rho}{\eta}$, espera-se que a força inercial seja desprezável (Re da ordem de 10⁻⁵). A força ótica será então dada por:

$$F_{opt} = F_{drag} = 6\pi\xi\eta r v \tag{4}$$

3. SECÇÃO EXPERIMENTAL

O setup utilizado para a realização do trabalho encontra-se representado na figura 3. O feixe laser, de 532 nm, incide num polarizador, que permite controlar a intensidade do mesmo de forma a garantir o *trapping* mais estável possível. O feixe é depois refletido em três espelhos até incidir numa lente, cuja



Fig. 3. Esquema do *setup* utilizado na realização do trabalho.

distância focal é de 10 cm. Após nova reflexão, o feixe volta a incidir numa lente, desta feita, de 20 cm, de onde sai colimado.

Esta região do *setup* com duas lentes de diferentes distâncias focais funciona como um expansor de feixe. O diâmetro do feixe alarga e, depois de ser refletido, incide na segunda lente, de maior distância focal, de onde sai colimado. Esta situação encontra-se representada esquematicamente na figura 4.



Fig. 4. Expansão do feixe com duas lentes.

Após a expansão o feixe incide num espelho dicróico, onde é refletido para cima, em direção à amostra. O LED que se encontra sobre o carruagem que suporta a amostra é responsável pela iluminação da mesma, de forma a que a imagem possa ser recolhida pela câmara, depois de atravessar uma última lente, e um filtro. O filtro é opcional, sendo necessário para filtrar o comprimento de onda do laser, de forma a facilitar a visualização das partículas.



Fig. 5. Preparação da amostra para observação.

Uma vez alinhado o *setup*, é necessário preparar a amostra. Para isso coloca-se uma quantidade muito reduzida de fermento num frasco de vidro já com água e agita-se muito bem. Numa lâmina de vidro deposita-se uma gota do preparado entre duas lamelas, colocando-se uma terceira por cima, tal como esquematizado na figura 5. Esta proteção é necessária devido à distância de trabalho da objetiva, que é inferior à altura da lâmina de vidro. Estando a trabalhar com uma objetiva de imersão, é necessária a utilização de um líquido/ óleo de imersão, responsável pelo *index matching* com o vidro, evitando assim o desvio do feixe para fora da objetiva.

Por fim, coloca-se o preparado no suporte móvel da objetiva, invertido relativamente à orientação apresentada na figura 5, e procura-se ajustar a intensidade do feixe e a posição da amostra, de forma a obter *trapping*.

4. RESULTADOS

Conseguido o *trapping* de uma das partículas presentes na solução foram recolhidas imagens vídeo do mesmo. A potência ótica à saída da objetiva foi medida, tendo sido obtido o valor de 26,50 mW.

Alguns dos frames relativos ao *trapping* encontram-se representados na figura 6. A levedura encontra-se, em todos os frames, rodeada por um círculo vermelho, para facilitar a sua identificação. Devido à forma como as imagens foram recolhidas, é notória uma variação da iluminação da imagem, que dificulta a identificação da partícula em alguns dos frames. Ainda assim é possível acompanhar a partícula na sua trajetória em direção ao foco do feixe, i.e., o ponto brilhante, rodeado por algumas franjas, bem visível na imagem.

Verifica-se, de facto, que quando a partícula se encontra suficientemente perto do feixe para sentir a sua influência, as forças que sobre ela atuam fazem com que ela seja arrastada até ao foco. Uma vez garantido o *trapping*, para testar a sua estabilidade, a lâmina foi movida em relação ao feixe, de forma a confirmar se a levedura se iria manter presa no foco, o que se confirmou.

A. Determinação das Forças de Trapping

Através das imagens recolhidas foi possível traçar a trajetória da partícula com recurso ao software *ImageJ*. Por motivos de simplicidade o foco do feixe laser, correspondente ao ponto mais brilhante nas imagens da figura 6, foi tomado como a origem do referencial.

Nos gráficos das figuras 7 e 8 estão representados os caminhos percorridos pela partícula nas direções correspondentes aos eixos x e y, respetivamente.

Uma vez que o movimento Browniano de uma partícula num fluído é descrito pela equação de Langevin [7], foi realizado um ajuste a uma equação de Langevin a ambas as curvas, com recurso ao software de análise $Origin^{TM}$. A partir desse ajuste a velocidade da partícula em cada ponto é calculada através da derivada da trajetória, e a força pode então ser determinada através da equação 4. De notar, que antes do cálculo da força é necessário determinar o valor de ξ . Uma vez que a *câmara de trapping* foi criada com recurso a várias lamelas, e atendendo a que a espessura média de cada uma delas é de cerca de 0.13 mm, se considerarmos que a partícula de $r = 2.5 \mu m$ está em contacto com o fundo da câmara, obtemos um $\frac{r}{h} \approx 0,01923$, que resulta num fator de correção de $\xi \approx 1,0109$.

Os gráficos das figuras 9 e 10 representam a força de *trapping* que é exercida na partícula ao longo do tempo. Comparando a forma do gráfico da força, com a do das trajetórias é fácil perceber que a força de *trapping* é máxima na altura em que a partícula se encontra a ser arrastada, i.e., a zona de pico do gráfico da força, e a zona de declive acentuado no gráfico da trajetória. Foram obtidos valores máximos de força ótica de -4,908 pN e -9,817 pN para a direção x e y, respetivamente. Valores que parecem indicar uma maior facilidade de aprisionar a partícula, ou de a fazer mover na direção do eixo dos y, o que de facto



Fig. 6. Frames do vídeo recolhido durante a realização do trabalho. Ordenados da esquerda para a direita, de cima para baixo.



Fig. 7. Trajetória da partícula segundo a direção x, e respetivo ajuste de Langevin.



Fig. 8. Trajetória da partícula segundo a direção *y*, e respetivo ajuste de Langevin.



Fig. 9. Força de *trapping* a atuar na levedura na direção x.



Fig. 10. Força de *trapping* a atuar na levedura na direção y.

pareceu verificar-se durante a realização do trabalho. Contudo, seriam necessários mais dados para poder de facto afirmar com seguranca que isso se verifica sempre.

À medida que a partícula se aproxima do foco, observa-se uma diminuição da força que sobre ela é aplicada até atingir um patamar nulo, ou seja, o equilíbrio. Tal como explicado em secções anteriores as forças que atuam sobre a partícula têm tendência a arrastá-la em direção ao foco, local onde todas as forças se cancelam umas às outras, e a partícula encontra uma posição de equilíbrio. Podendo este, no entanto, ser perturbado a qualquer instante pela deslocação do feixe.

5. CONCLUSÃO

A manipulação ótica é de facto uma ferramenta importante, que permite estudar as características das partículas. Ao longo do trabalho realizou-se um pequeno estudo sobre a física que sustenta o fenómeno de *trapping*, que permitiu compreender todos os resultados obtidos aquando da observação do fenómeno. Foram estudadas as trajetórias da partícula ao longo das direções x e y, bem como a resultante das forças nessa direção ao longo do tempo, tendo sido obtidos valores máximos de força de -4,908 pN e -9,817 pN em x e em y, respetivamente. Por fim, confirmouse que de facto o ponto de trapping corresponde a um ponto de equilibrio, no qual todas as forças se anulam.

REFERÊNCIAS

- 1. Ashkin, A. Accelaration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 156-159.
- Ashkin, Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters* 1986, *Vol. 11 No. 5*, 288-290.
- P. Smith, S.; R. Bhalotra, S.; L. Brody, A.; L. Brown, B.; K. Boyda, E.; Prentiss, M. Inexpensive optical tweezers for undergraduate laboratories *Am. J. Phys.* 1999, *67*, 26-35.
- 4. Zhang, H.; Liu, K.K., Optical tweezers for single cells . J. R. Soc. Interface 2008, 5, 671-690.
- Nieminen, T. A.; Loke, V. L. Y.; Stilgoe, A. B.; Knoner, G.; Branczyk, A. M.; Heckenberg, N. R.; RubinszteinDunlop, H., Optical tweezers computational toolbox. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 2007, *9*, 196-203.
- 6. R. Ribeiro. Optical Fiber tools for single cell trapping and manipulation *Doctoral Thesis- University of Porto* **2017**.
- Ray, D. S. Notes on Brownian motion and related phenomena. Department of Physical Chemistry, Indian Association for the Cultivation of Science 2008