



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

---

Facultad de Ciencias  
Grado en Física

Trabajo de fin de grado

**Pinzas ópticas**

**Optical Tweezers**

Alumna:  
Marina Benito Luengo

Tutor:  
Íñigo Sola Larrañaga



D. Íñigo J. Sola Larrañaga, profesor del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Salamanca, autoriza la presentación del trabajo de Fin de Grado de Física titulado “Pinzas ópticas”, realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup>. Marina Benito Luengo.

En Salamanca, a 6 de julio de 2021

Fdo.: Íñigo J. Sola Larrañaga



## Resumen

En el presente trabajo se ha llevado a cabo una investigación bibliográfica acerca del funcionamiento y los principios físicos que operan en la utilización de las pinzas ópticas. Además, se ha elaborado una descripción introductoria sobre algunas de sus principales aplicaciones en el ámbito de la biología celular, señalando las características que hacen de este método una herramienta adecuada para el estudio de estructuras orgánicas de pequeño tamaño, así como sus principales limitaciones.

A modo de introducción hemos realizado un rápido repaso acerca de la historia de los principios físicos involucrados en el funcionamiento de las pinzas ópticas, señalando los principales avances que permitieron su desarrollo.

Tras explicar el concepto de las pinzas ópticas, hemos descrito el primer experimento realizado con este utensilio para alterar el movimiento de diversas partículas microscópicas y se ha llevado a cabo un análisis general de las fuerzas involucradas en dicho proceso.

Seguidamente, se ha caracterizado con un poco más de profundidad el fundamento y los principios físicos que intervienen cuando un haz láser enfocado atrapa una partícula. Tras dilucidar cuáles son las principales magnitudes que es necesario calcular para emplear las pinzas ópticas, hemos distinguido tres regímenes distintos que nos permiten modelizar el proceso y llevar a cabo los cálculos de forma aproximada.

Para estudiar partículas mucho menores que la longitud de onda del láser que constituye la pinza óptica, se ha descrito el régimen de Rayleigh o aproximación bipolar. A continuación, para el estudio de partículas de tamaño mucho mayor que la longitud de onda del láser, se ha detallado el régimen de Mie o aproximación de óptica geométrica. Para terminar, enfocado al estudio de partículas de dimensiones del orden de la longitud de onda del láser, hemos analizado el régimen intermedio, haciendo especial hincapié en el cálculo de la matriz de transmisión del sistema.

Tras exponer las fórmulas necesarias para la utilización de las pinzas ópticas, se ha descrito su montaje de forma general, señalando los principales dispositivos implicados en su construcción.

Posteriormente, hemos introducido los principales logros y limitaciones de las pinzas ópticas en el estudio de moléculas orgánicas. Tras indicar los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el estudio de organismos vivos, se ha expuesto el primer experimento de manipulación de material orgánico realizado con las pinzas ópticas.

Más adelante, hemos señalado de forma introductoria algunas de las aplica-

ciones que actualmente tiene la manipulación óptica en el ámbito de la biología celular. Se ha hecho hincapié en tres de los usos más vanguardistas: la manipulación de moléculas de ADN, el estudio de motores moleculares y distintos usos en biología vegetal, como el estudio de las interacciones del citoesqueleto y el análisis de las dinámicas de secreción.

Hemos indicado algunos de los descubrimientos más importantes realizados gracias a las pinzas ópticas en cada uno de esos ámbitos, describiendo de forma general los experimentos que han dado lugar a esos avances y su importancia para la biología.

Finalmente, hemos elaborado un apartado para las conclusiones donde señalamos los puntos más importantes tratados en el trabajo y un pequeño comentario acerca del futuro de las pinzas ópticas.

## **Abstract**

In the present work, we have carried out a bibliographic investigation about the operation and physical principles involved in the use of optical tweezers. In addition, we have presented an introductory description about some of its main applications in the field of cell biology, pointing out the characteristics that make this method an adequate tool for studying small organic structures, as well as its main limitations.

As an introduction, we have carried out a quick review of the history of the physical principles involved in the operation of optical tweezers, pointing out the main advances that allowed their development.

After explaining the concept of optical tweezers, we have described the first experiment made using this tool to alter the movement of various microscopic particles and then we have explained a general analysis of the forces involved in this process.

Next, the physical principles involved when a focused laser beam catches a particle have been characterized in a little more depth. After elucidating the main magnitudes that are needed in the use of optical tweezers, we have described the three different regimes that allow us to model the process and carry out the approximate calculations.

To study particles much smaller than the wavelength of the laser that constitutes the optical trap, the Rayleigh regime or bipolar approach has been described. Next, for the study of particles of size much larger than the wavelength of the laser, the Mie regime or geometric optics approximation has been detailed. Finally, focused on the study of particles of dimensions on the order of the laser wavelength, we have analyzed the intermediate regime, placing special emphasis on the calculation of the transmission matrix of the system.

After exposing the necessary formulas for the use of optical tweezers, their assembly has been described in a general way, pointing out the main devices involved in their construction.

Subsequently, we have introduced the main achievements and limitations of optical tweezers in the study of organic molecules. After indicating the main aspects that must be taken into account in the study of living organisms, we have exposed the first experiment of manipulation of organic material with optical tweezers.

Later on, we have introduced some of the applications of optical manipulation in the field of cell biology. Three of the most avant-garde uses have been emphasized: the manipulation of DNA molecules, the study of molecular motors and different uses in plant biology, such as the study of cytoskeletal interactions and the analysis of secretion dynamics.

We have listed some of the most important discoveries made by optical tweezers in each of these areas, outlining the experiments that have led to these advances and their importance to biology.

Finally, we have prepared a section for the conclusions where we point out the most important aspects covered in the work and a small comment about the future of optical tweezers.

## **Palabras clave**

Pinzas ópticas, manipulación láser, manipulación óptica, haz láser enfocado, régimen de Mie, régimen de Rayleigh, régimen intermedio, matriz de transmisión, bioaplicaciones de las pinzas ópticas, motores moleculares, biología vegetal, interacciones del citoesqueleto, dinámicas de secreción

## **Keywords**

Optical tweezers, laser manipulation, optical manipulation, focused laser beam, Mie regime, Rayleigh regime, intermediate regime, transmission matrix, bioapplications of optical tweezers, molecular motors, plant biology, cytoskeletal interactions, secretion dynamics.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
1.1. Motivación . . . . .	9
1.2. Un poco de historia . . . . .	9
<b>2. Principios de las pinzas ópticas</b>	<b>11</b>
<b>3. Transporte de energía y momento por la luz</b>	<b>12</b>
<b>4. Régimenes</b>	<b>14</b>
4.1. Régimen de Rayleigh . . . . .	15
4.2. Régimen de Mie . . . . .	16
4.3. Régimen intermedio . . . . .	18
<b>5. Consideraciones de diseño</b>	<b>20</b>
<b>6. Las pinzas ópticas en biología</b>	<b>21</b>
6.1. Bio-aplicaciones . . . . .	22
6.1.1. Manipulación de moléculas de ADN . . . . .	23
6.1.2. Motores moleculares . . . . .	25
6.1.3. Manipulación láser en biología vegetal . . . . .	26
<b>7. Conclusiones</b>	<b>29</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>32</b>



# 1. Introducción

## 1.1. Motivación

Debido a sus numerosas aplicaciones, las pinzas ópticas se han consolidado como uno de los instrumentos más importantes para la investigación de células y organismos vivos. Sus características no invasivas, así como la facilidad que ofrecen para manipular estructuras microscópicas, hacen de ellas una herramienta muy atractiva muy apropiada para ser estudiada.

## 1.2. Un poco de historia

La presión de radiación es una de las formas más intuitivas que posee una onda electromagnética para generar una fuerza: la luz incidente en una superficie produce una fuerza en esa superficie [1].

Ya en la primera parte del siglo XVII, el astrónomo alemán Johannes Kepler postuló que la cola que poseen los cometas era inducida por la presión de radiación provocada por los rayos solares [2]. Siglos más tarde, el célebre científico J. C. Maxwell predijo, en su teoría del electromagnetismo, que el momento que porta un haz luminoso es proporcional a su intensidad, y éste puede ser transferido a los objetos sobre los que incide [3]. Años después, Henry Poynting demostró la existencia de una ley general para describir el comportamiento de la presión de radiación, y la fuerza que ésta ejerce sobre los objetos a lo largo de la dirección de propagación del haz luminoso [4].

Sin embargo, no fue hasta principios del siglo XX, con el desarrollo de instrumentos de medida más precisos, cuando se obtuvo la primera evidencia empírica de la existencia de la presión de radiación. Este hecho sucedió en una serie de experimentos llevados a cabo por Nichols y Hull [5] e independientemente, por Lebedev [6]. Observaron que cuando se dirige un haz luminoso a un soporte en suspensión, éste sufre un ligero movimiento causado por la presión que ejerce la luz. No obstante, esta fuerza es muy pequeña: miliwatios de potencia (que corresponden a una luz muy intensa) focalizados sobre un objeto producen una fuerza con magnitud de unos cuantos piconewtons ( $pN = 10^{-12}N$ ) [7].

En mayo de 1960, T. H. Mainman de la Huges Aircraft Company construyó el primer láser usando un cristal de rubí [8, 9]. Este dispositivo permite focalizar un haz de luz coherente de alta intensidad, proporcionando, de este modo, una excelente herramienta para el estudio de la presión de radiación.

Un pionero en el estudio de estas fuerzas ópticas inducidas por láser fue Arthur Ashkin de los Laboratorios Bell, que demostró a partir de una serie de

experiencias que estas fuerzas pueden emplearse para alterar el movimiento de partículas microscópicas, desde átomos y moléculas, hasta virus y bacterias [10, 11, 12, 13]. De este modo, Ashkin efectuó la primera observación de lo que hoy en día se conoce como *pinzas ópticas*: un instrumento basado en un haz de luz enfocado capaz de sostener y mover partículas microscópicas en tres dimensiones.

En sus experimentos, Ashkin y sus colaboradores consiguieron evitar el principal problema que históricamente había interferido en el estudio de la presión de radiación: las perturbaciones causadas por las fuerzas térmicas inducidas por el láser. Utilizando un láser lo suficientemente potente y partículas relativamente transparentes lograron evitar los efectos radiométricos.

Para llevar a cabo este propósito colocaron esferas de látex transparentes en un medio acuoso [10]. Al enfocar un láser de argón en una célula de vidrio que contenía las partículas observaron que al focalizar una sola esfera, ésta era instantáneamente atraída hacia el centro del haz y acelerada en la dirección de la luz hasta golpear la superficie del cristal. Podemos entender este fenómeno de la forma siguiente: la partícula con un alto índice de refracción ( $n_p$ ), situada fuera del eje del haz, estaba inmersa en agua que posee un índice menor ( $n_m$ ) ( $n_p > n_m$ ). Considerando un par de rayos simétricamente situados en torno al eje de la esfera, podemos observar que el rayo  $a$  sufre una reflexión de Fresnell y una refracción en las caras de entrada y salida de la esfera, dando como resultado dos fuerzas causadas por la reflexión, y otras dos provocadas por la refracción. La fuerza total, obtenida a partir de la suma de las fuerzas descritas anteriormente, tendrá una componente que apunte hacia la región de mayor intensidad del haz (fuerza de gradiente), y otra que apunte hacia adelante (fuerza de dispersión).

Como el haz que emite el láser tiene un perfil gaussiano, el rayo  $b$  sufrirá de forma similar reflexiones y refracciones, dando como resultado una fuerza neta que apunte hacia el exterior de la región de máxima intensidad, de módulo menor que la del rayo  $a$ .

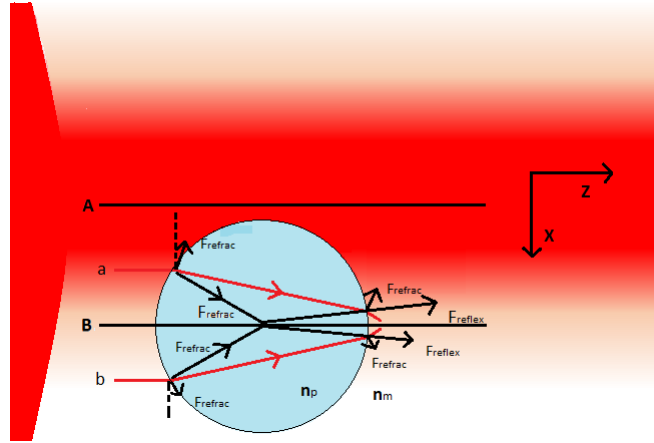


Figura 1: Esfera dieléctrica situada fuera del eje del láser A, con un par de rayos simétricos a y b. Las fuerzas provocadas por el rayo A están representadas para  $n_p > n_m$ . La esfera experimenta un movimiento en sentido positivo del eje z y negativo del eje x.

## 2. Principios de las pinzas ópticas

Una pinza óptica está formada por un láser enfocado en un punto con una lente objetivo de gran apertura numérica (NA). Éste cumple el doble propósito de enfocar el haz de luz y de producir una imagen del objeto atrapado en el interior del láser. Además, podemos controlar la posición del haz usando diferentes espejos para fabricar gran variedad de montajes más complejos [14].

Al focalizar fuertemente el láser se crea un gradiente importante de irradiancia, no solo transversalmente, sino también en dirección longitudinal, siendo éste especialmente importante en la zona del foco. Por tanto, una partícula que se encuentre en el trayecto recorrido por éste experimentará una fuerza como resultado de la transferencia del momento de los fotones que forman el haz luminoso. Podemos descomponer dicha fuerza en dos componentes: fuerza de dispersión, que actúa en la dirección de propagación de la luz incidente; y fuerza de gradiente, en la dirección espacial del gradiente del campo inducido por el láser [15].

Podemos concebir la fuerza de dispersión como el resultado del flujo de fotones que 'empuja' en el sentido de su propagación. La luz incidente llega a las partículas que se encuentran bajo la influencia del láser desde una sola zona, pero éstas pueden ser dispersadas en distintas direcciones. Asimismo, una porción de la luz incidente será absorbida por las partículas. El resultado de este proceso es la transferencia de momento de los fotones a las partículas, siendo la

fuerza de dispersión proporcional a la intensidad óptica [16].

Por otra parte, la fuerza de gradiente podemos entenderla como la fuerza que experimenta un dipolo situado bajo la influencia de un campo eléctrico inhomogéneo en la dirección del gradiente del campo [17]. En una pinza óptica, el láser, al actuar sobre las partículas dieléctricas induce en éstas dipolos oscilantes. La interacción de estos dipolos con el campo electromagnético produce una fuerza sobre ellos que los atrapa dentro de la pinza óptica [18].

Así pues, para construir una pinza óptica con un solo haz, las componentes vectoriales de las fuerzas de difusión y de gradiente de la presión de radiación tendrán que estar configuradas para crear un punto de equilibrio estable, donde la componente axial de la fuerza de gradiente, que atrae a la partícula hacia la región focal, sea mayor que la componente de la fuerza de dispersión que empuja la partícula hacia adelante [19].

Para conseguir este propósito es necesario el uso de una lente objetivo de alta NA, con el fin de lograr que el gradiente que crea el láser sea muy abrupto, ya que cuanto más elevada sea la apertura de la lente, menor será el tamaño del punto focal y mayor la fuerza de gradiente [7]. En estas condiciones, el punto de equilibrio se sitúa entre la partícula y el punto focal.

### 3. Transporte de energía y momento por la luz

Consideremos el caso de una esfera que se encuentra bajo la acción de un campo electromagnético. En esta situación, según el Teorema de Poynting, el trabajo realizado sobre la esfera por el campo es igual a la disminución de energía almacenada en éste menos el flujo que fluye fuera de la superficie esférica [20]. Siendo la cantidad de energía que atraviesa la esfera por unidad de tiempo y de área el vector de Poynting:

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu}(\vec{E} \times \vec{B}) \quad (1)$$

Asumiendo el caso de campos estáticos, podemos calcular la fuerza que experimenta la esfera integrando el producto entre el vector unitario normal a la superficie ( $\hat{n}$ ) y el tensor de tensiones de Maxwell que representa la fuerza por unidad de área (o tensión) actuando sobre una superficie  $\vec{T}$ , sobre el área que encierra la partícula [21]:

$$\vec{F} = \oint_S \vec{T} \hat{n} ds \quad (2)$$

En presencia de materia, un sistema electromagnético puede dividirse en dos subsistemas: uno electromagnético y otro mecánico. En estas condiciones, el momento electromagnético no se conserva, como tampoco lo hace el momentomecánico, sino que la cantidad conservada corresponde al momento total del sistema [22]. Este hecho ha provocado la existencia de cierta controversia para definir la parte del tensor que caracteriza el aporte electromagnético (campos E y B) y la parte que depende de las características materiales del sistema (densidades P y M)[23], ya que éstas pueden variar dependiendo del contexto. Aparentemente, y a pesar de la discusión al respecto [24], la forma más apropiada de representar el tensor de tensiones de Maxwell para el caso de condiciones estáticas es la de Minkowski:

$$T_{ij} = \frac{1}{4\pi} \left[ \epsilon E_i E_j + B_i B_j - \frac{1}{2} (\epsilon E_i E_i + B B_i B_i) \delta \right] \quad (3)$$

Dado que la fuerza es la tasa de cambio de momento, de forma similar al teorema de Poynting para la energía, podemos establecer una ley que describa la conservación del momento: la variación de momento total es igual a la cantidad de momento que fluye a través de la superficie de la partícula menos el momento almacenado en el campo electromagnético [20], siendo  $\bar{p}$  la densidad de momento acumulada en los campos:

$$\bar{p} = \epsilon \mu \bar{S} \quad (4)$$

Tomando el radio de la corteza esférica de la partícula como mucho mayor que la longitud de onda de la luz incidente, tenemos la posibilidad de utilizar la aproximación de ondas planas para caracterizar el flujo de energía y el de momento a través del cálculo de la potencia absorbida y de la fuerza que sufre la partícula [25]:

$$P_{abs} = - \int r^2 S_r d\Omega \quad (5)$$

$$\bar{F} = - \int r^2 \bar{S} d\Omega \quad (6)$$

donde  $S_r$  es la componente radial del vector de Poynting y  $d\Omega$  el diferencial de ángulo sólido.

Aunque podemos utilizar estas fórmulas para calcular las cantidades de mayor interés que necesitamos para describir los fenómenos ocurridos en la utilización de las pinzas ópticas, en la práctica no son muy útiles ya que necesitamos conocer el valor del campo eléctrico y magnético para calcular el vector de Poynting. Con el objetivo de resolver este problema, podemos aplicar distintas aproximaciones y clasificar nuestro sistema en diferentes regímenes.

## 4. Régimenes

Como hemos visto anteriormente, las pinzas ópticas son el resultado de la presión de radiación que se manifiesta en la presencia de una fuerza que experimentan las partículas ubicadas dentro de la pinza. Tradicionalmente las fuerzas ópticas han sido estudiadas mediante el uso de distintas aproximaciones según el tamaño de las partículas. Basándonos en este criterio, podemos establecer tres regímenes [19]:

- *Régimen de Mie o aproximación de óptica geométrica*: la longitud de onda del láser es significativamente más pequeña que el tamaño de la partícula ( $\lambda \ll r$ ).

- *Régimen de Rayleigh o aproximación dipolar*: cuando la longitud de onda del láser es mucho mayor que la partícula ( $\lambda \gg r$ ).

- *Régimen intermedio*: cuando las dimensiones de la partícula son comparables a la longitud de onda del haz ( $\lambda \sim r$ ). En este contexto, necesitamos hacer un desarrollo completo de la teoría electromagnética, lo que para la mayoría de las ocasiones es extremadamente complejo. Para resolver este problema se han desarrollado diversos métodos computacionales entre los que destaca el modelo de cálculo de la matriz de transmisión [26].

Para determinar el rango de validez de estas aproximaciones podemos clasificarlas de acuerdo al siguiente parámetro:

$$x = K_m a = \frac{2\pi n_m a}{\lambda_0} \quad (7)$$

donde  $k_m = \frac{2\pi n_m}{\lambda_0}$  es el número de onda en el medio que rodea la partícula  $a$  el radio de la partícula,  $\lambda_0$  la longitud de onda del láser en el vacío y  $n_m$  el índice de refracción del medio que los rodea [27].

Por un lado, cuando  $k_m a \gg 1$  podemos usar la aproximación de óptica geométrica o la aproximación de rayos, ya que el tamaño de la partícula es mucho mayor que la longitud de onda del láser. Cuanto más grande sea  $x$ , más exacto será el resultado obtenido por esta aproximación.

Por otra parte, si  $k_m a \sim 1$  el tamaño de la partícula es comparable al de la longitud de onda, por lo que tendremos que utilizar modelos computacionales propios del régimen intermedio.

Finalmente, nos encontraremos en el régimen de Rayleigh cuando  $k_m a \ll 1$ . En estas circunstancias podemos considerar la partícula como un dipolo en cuyo interior los campos electromagnéticos son uniformes. Para ello, debemos

imponer la siguiente condición:

$$\left| \frac{n_p}{n_m} \right| k_m a \ll 1 \quad (8)$$

donde  $n_p$  es el índice de refracción de la partícula.

#### 4.1. Régimen de Rayleigh

Para estudiar la aproximación de Rayleigh podemos considerar el caso de un dipolo inducido en una esfera que se encuentra bajo la influencia de un campo eléctrico variable en el tiempo.

Calculando el momento dipolar de la partícula llegamos a la siguiente expresión [28]:

$$d(\bar{r}, t) = 4\pi\epsilon_0\alpha\bar{E}(\bar{r}, t) \quad (9)$$

siendo

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (10)$$

la polarizabilidad del dipolo y  $m$  el índice de refracción relativo de la partícula  $m = \frac{n_p}{n_m}$ , con respecto al del medio en que se encuentra.

La fuerza de gradiente que experimenta el dipolo es [29]:

$$\bar{F}_{grad} = \pi\epsilon_0\alpha\nabla|\bar{E}(\bar{r})|^2 \quad (11)$$

que en términos de la irradiancia  $\bar{I} = \langle \bar{S}(\bar{r}, t)_T \rangle$ , magnitud que podemos medir en el laboratorio, resulta:

$$\bar{F}_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m}\nabla\bar{I}(\bar{r}) \quad (12)$$

En el caso de un campo estático, la fuerza de gradiente es la fuerza total. Sin embargo, en nuestro caso actúa una fuerza adicional sobre el dipolo, ya que la variación del campo con el tiempo genera un campo magnético y corrientes de polarización en el interior del dipolo debido al cambio del momento dipolar [30].

Esta fuerza es la fuerza de dispersión y podemos calcularla como [29]:

$$\bar{F}_{scat} = \frac{n_m\sigma}{c}\bar{I}(\bar{r}) \quad (13)$$

donde

$$\sigma = \frac{8}{3}\pi (krn)^4 r^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (14)$$

es la sección transversal de Rayleigh y  $k = \frac{2\pi n_m}{\lambda}$  el número de onda de la luz incidente.

Comparando ambas fuerzas podemos apreciar que mientras la fuerza de dispersión es proporcional a  $\langle r^6 \rangle$ , la expresión de la fuerza de gradiente posee un factor  $\langle r^3 \rangle$ . Como hemos citado anteriormente, para conseguir una pinza óptica necesitamos que la fuerza de gradiente domine sobre la de dispersión, lo que podemos conseguir, además de aumentando el NA de la lente, disminuyendo el tamaño de la partícula.

## 4.2. Régimen de Mie

Cuando sobre una esfera transparente incide un flujo de fotones podemos distinguir tres procesos básicos: la difracción que tiene lugar en los bordes de la partícula que se comportan como si fueran un disco opaco, la refracción a través de la lente espesa que constituye la esfera, y la reflexión en todo su contorno. Roosen y sus colaboradores efectuaron el cálculo de las fuerzas implicadas en este proceso, despreciando la difracción, ya que para el caso de esferas de gran tamaño la contribución de esta última es insignificante [31, 32].

Por tanto, sin tener en cuenta el fenómeno de difracción, parte de los fotones que llegan a la esfera van a ser refractados, desviándose de la dirección inicial e incidiendo de nuevo sobre la cara opuesta del interior de la esfera; y parte de ellos serán reflejados. En la cara interna de la esfera, a su vez, el haz de fotones va a sufrir nuevas reflexiones y refracciones, y así sucesivamente [33].

Podemos expresar la fuerza en términos de la potencia del haz incidente, y como por conservación de la energía la potencia incidente es igual a la suma de la potencia transmitida más la potencia reflejada, la fuerza total será la fuerza incidente menos la suma de las fuerzas generadas por reflexión y por transmisión, por lo que llegamos a la siguiente expresión [34]:

$$\bar{F} = \frac{n_m P_i}{c} \hat{u}_i - \frac{n_m P_r}{c} \hat{u}_r - \frac{n_m P_t}{c} \hat{u}_t \quad (15)$$

donde  $P_i, P_r$  y  $P_t$  representan la potencia incidente, reflejada y transmitida, respectivamente; y  $\hat{u}_i, \hat{u}_r$  y  $\hat{u}_t$  los vectores unitarios que apuntan en la dirección del rayo incidente, reflejado y transmitido.

Teniendo en cuenta que la potencia  $P_i$  del rayo incidente se reduce a  $PT^2 R^q$  después de sufrir  $q$  reflexiones, siendo  $R$  y  $T$  los coeficientes de reflexión y de



transmisión de Fresnell, Ashkin derivó las expresiones de las componentes transversal ( $\hat{i}$ ) y longitudinal ( $\hat{k}$ ) de la fuerza, lo que corresponden a la fuerza de gradiente y de dispersión [35]:

$$\bar{F}_{grad} = \frac{n_m P_i}{c} Q_{grad} \hat{i} \quad (16)$$

$$\bar{F}_{dis} = \frac{n_m P_i}{c} Q_{dis} \hat{k} \quad (17)$$

definiendo  $Q_{grad}$  y  $Q_{dis}$  como los parámetros de eficiencia de la transmisión de momento del haz a la partícula:

$$Q_{grad} = R \sin(2\theta) - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\phi) + R \sin(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\phi)} \quad (18)$$

$$Q_{dis} = 1 + R \cos(2\theta) - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2\phi) + R \cos(2\theta)]}{1 + R^2 + 2R \cos(2\phi)} \quad (19)$$

donde  $\theta$  y  $\phi$  son los ángulos de incidencia y de refracción.

En términos de la eficiencia total  $Q = \sqrt{Q_{grad}^2 + Q_{dis}^2}$ , la fuerza total será:

$$F = \frac{Q n_m P_i}{c} \quad (20)$$

En la figura 2 están representadas las eficiencias en función del ángulo del rayo incidente. Podemos ver que para ángulos menores de  $70^\circ$ , la fuerza de gradiente domina sobre la de dispersión ( $Q_{grad} > Q_{dis}$ ), pero a medida que el ángulo de incidencia aumenta, la fuerza de dispersión se vuelve más significativa. En láseres no enfocados o enfocados con una lente de NA muy baja, el ángulo que forma el rayo incidente tendrá un valor grande (por encima de  $70^\circ$ ) por lo que, a partir de las observaciones anteriores, podemos deducir que la fuerza de dispersión dominará sobre la de gradiente y la partícula será empujada en la dirección del haz. Sin embargo, para lentes con una alta apertura los rayos llegarán a la partícula con un ángulo de incidencia menor. En esta situación, la fuerza de gradiente será mayor que la de dispersión y aparecerá un punto de equilibrio cerca de la focal de la lente.

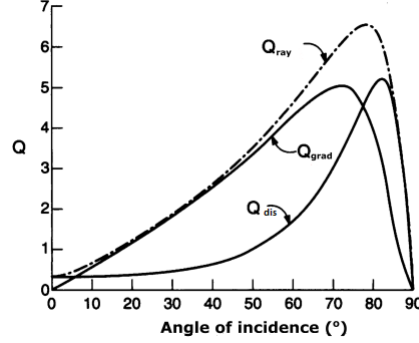


Figura 2: Representación de las eficiencias en función del ángulo del rayo incidente para luz circularmente polarizada incidiendo sobre una esfera con índice de refracción  $n_p = 1,6$  inmersa en agua  $n_m = 1,33$  [36].

### 4.3. Régimen intermedio

Si el tamaño de la partícula y la longitud de onda de las pinzas ópticas es comparable, lo que sucede para la mayoría de las aplicaciones biológicas, nos encontramos en la denominada región de resonancia [37]. En esta situación, los efectos de difracción no son despreciables y tendremos que hacer un desarrollo completo de la teoría electromagnética.

En la práctica este procedimiento es muy complejo, ya que para calcular, por ejemplo, el tensor de tensiones de Maxwell habría que derivar seis componentes del campo electromagnético,  $E_i$  y  $B_i$ . Un desarrollo teórico de este método ha sido llevado a cabo por Barton y sus colaboradores [38] que han calculado la corrección a quinto orden de las componentes del campo.

Sin embargo, si modelizamos el proceso tratando con esferas isotrópicas y homogéneas, para el caso de ondas planas podemos resolver el problema de forma analítica mediante un proceso relativamente simple, empleando la teoría de Lorentz-Mie[39].

Desde el marco de esta teoría, los campos incidentes y dispersados se representan como la suma de vectores de las funciones de onda esféricas [40]:

$$\vec{E}_{inc} = \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [c_{1lm}^+ \bar{M}_{lm}^+ + c_{2lm}^+ \bar{N}_{lm}^+] \quad (21)$$

$$\vec{H}_{inc} = -i\sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [c_{1lm}^+ \bar{N}_{lm}^+ + c_{2lm}^+ \bar{M}_{lm}^+] \quad (22)$$

$$\bar{E}_{dis} = \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [c_{1lm}^- \bar{M}_{lm}^- + c_{2lm}^- \bar{N}_{lm}^-] \quad (23)$$

$$\bar{H}_{dis} = -i \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [c_{1lm}^- \bar{N}_{lm}^- + c_{2lm}^- \bar{M}_{lm}^-] \quad (24)$$

donde  $\bar{M}^+$ ,  $\bar{M}^-$ ,  $\bar{N}^+$  y  $\bar{N}^-$  son los vectores ortogonales que satisfacen la ecuación de onda [28],  $l$  es el número cuántico orbital,  $m$  es el número cuántico magnético,  $c_{1lm}^+$ ,  $c_{2lm}^+$ ,  $c_{2lm}^+$  y  $c_{2lm}^-$  son los coeficientes que representan las amplitudes de los campos incidente y dispersado y  $\epsilon$  y  $\mu$  indican la permeabilidad eléctrica y magnética del medio respectivamente.

Debido a que las funciones de onda son ortogonales, existe una relación lineal entre la amplitud de la onda incidente y la de la transmitida [27]:

$$c_{1lm}^- = c_{1l}^+ c_{1lm}^+ \quad (25)$$

$$c_{2lm}^- = c_{2l}^+ c_{2lm}^+ \quad (26)$$

podemos denominar  $c_{1l}^+$  y  $c_{2l}^+$  los coeficientes de dispersión de Mie.

Utilizando las propiedades de los vectores de onda de las funciones esféricas es sencillo calcular la fuerza y la potencia absorbida integrando el vector de Poynting sobre la superficie que envuelve la partícula, través de las expresiones (5) y (6) descritas anteriormente.

Sin embargo, como hemos señalado previamente esta solución es válida realizando una serie de aproximaciones. Para el caso de una partícula más general, las ecuaciones (25) y (26) quedarían como:

$$c_{1l'm'}^- = \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \bar{A}_{l'm'lm} c_{1lm}^+ + \bar{B}_{l'm'lm} c_{2lm}^+ \quad (27)$$

$$c_{2l'm'}^- = \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \bar{C}_{l'm'lm} c_{1lm}^+ + \bar{B}_{l'm'lm} c_{2lm}^+ \quad (28)$$

Escribiendo la expresión anterior de forma más compacta [26]:

$$\mathbf{c}_1^+ = \mathbf{T} \mathbf{c}_1^- \quad (29)$$

donde  $\mathbf{T}$  es la matriz de dispersión que describe la onda dispersada en términos de la incidente y  $\mathbf{c}_1^+$  y  $\mathbf{c}_1^-$  son los coeficientes que representan la amplitud de las ondas incidente y dispersada.

La ventaja de utilizar la matriz de dispersión es que ésta es independiente de las condiciones de iluminación del sistema. Debido a esta característica, este método es muy eficiente a la hora de modelizar el funcionamiento de las pinzas ópticas, ya que podemos calcular las propiedades de dispersión de una partícula (reflejadas en la matriz de dispersión) sin tener en cuenta la luz que estemos utilizando [41].

## 5. Consideraciones de diseño

En la figura 3 podemos ver un diagrama esquemático del montaje de las pinzas ópticas. Se trata de una representación simplificada de diseños que han sido utilizados para manipular pequeñas esferas de látex y células en el laboratorio [42].

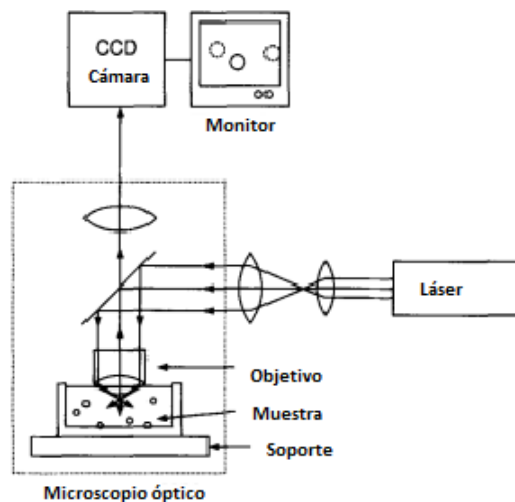


Figura 3: Montaje experimental básico de las pinzas ópticas utilizando un láser [43].

Esta simplificación consta de un láser, un microscopio, un sistema de monitorización y algunas lentes y otros elementos ópticos necesarios. El haz continuo del láser pasa a través del microscopio óptico y es reflejado hacia abajo por un espejo dicróico, que solo refleja una determinada longitud de onda. Antes de entrar en el microscopio el diámetro del láser pasa por un expansor de haz formado por dos lentes convergentes, con el fin de focalizar el haz en un punto tan pequeño como sea posible [43]. El haz, tras pasar por el expansor y después de ser reflejado, es enfocado por la lentes que forman el objetivo del microscopio

de alta (NA). Como hemos señalado anteriormente, este es un requisito imprescindible para que la pinza óptica sea estable, ya que la fuerza de gradiente, que depende de la apertura numérica del objetivo, tiene que ser mayor que la fuerza de dispersión. Una apertura adecuada típicamente varía entre 1,2 y 1,4 [44]. Basándonos en el experimento de Ashkin con dipolos esféricos, podemos comprobar que, para un láser de  $NA = 1.25$  enfocando una esfera de vidrio con índice de refracción  $n=1,6$  inmersa en agua de  $n=1,33$ , se obtiene un índice de incidencia  $\theta = 70^\circ$  [35]. Además, para visualizar la imagen de forma continua es recomendable utilizar un monitor con cámara CCD con alta sensibilidad a los estímulos lumínicos [45].

Bajo estas condiciones, la elección del láser es de vital importancia y dependerá del objeto que queramos estudiar. En el marco del examen de muestras biológicas es necesario disminuir la posibilidad de provocar daño causado por altos niveles de potencia, por lo que normalmente se emplean láseres infrarrojos. Esto es debido a que la luz visible es absorbida en gran medida por pigmentos de origen natural presentes en los organismos biológicos, mientras que la luz con longitud de onda correspondiente al infrarrojo lejano es absorbida por el agua [46].

Por este motivo, la mayoría de las muestras biológicas, aunque no todas, son casi totalmente transparentes en la región del infrarrojo cercano, entre 700 nm y 1300 nm. Algunos ejemplos de láseres que emiten en este espectro con potencia suficiente para atrapar y manipular células o componentes biológicos son el láser de  $Nd : YAG$  (granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio) cuya emisión es de 1064 nm [47], el láser de  $Nd : YLF$  (floruro de itrio de litio dopado con neodimio) con una longitud de onda de 1047 nm [48], el láser de  $Ti : Al_2O_3$  (cristal de zafiro dopado con titanio) sintonizable entre 695 nm y 1100 nm [49], y gran variedad de láseres diodo que emiten entre 700 nm y 1300 nm.

La elección más común para estudiar compuestos biológicos es el láser de  $Nd : YAG$ , ya que asegura el menor coeficiente de absorción posible minimizando el daño del espécimen (a veces referido como opticutition) [50].

## 6. Las pinzas ópticas en biología

En las últimas tres décadas, la posibilidad de manipular biomoléculas a través de la óptica ha estimulado la llegada de una nueva era de investigación médica y biofísica [51]. Las pinzas ópticas han permitido experimentos para atrapar, clasificar y explorar células, así como distinguir la estructura dinámica de proteínas y ácidos nucleicos a nivel molecular. La mejora continua de la pinzas ópticas impulsa el desarrollo de nuevas aplicaciones de forma ininterrum-

vida. Sin embargo, existen algunos inconvenientes a tener en cuenta.

La limitación más básica para aplicar las pinzas ópticas en la biología celular está relacionada con las características ópticas de las células y partículas: un elemento citoplasmático apenas visible será probablemente difícil de manipular, necesitando altos niveles de potencia a fin de realizar este objetivo [52]. Además, para no dañar la muestra, la partícula de interés debe estar separada del resto de estructuras. Afortunadamente, debido al pequeño diámetro del láser de las pinzas ópticas (en torno a  $1\ \mu\text{m}$ ) una separación de  $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ , suficiente para manipular estructuras subcelulares, será adecuada.

Como hemos mencionado anteriormente, el aumento de la potencia eleva el riesgo de provocar daños térmicos en las células. Algunas células como levaduras pueden ser manipuladas con menos de  $5\ \text{mW}$  y crecer sin daño aparente con niveles más altos (alrededor de  $80\ \text{mW}$ ) [19]. Sin embargo, se observan daños de irradiación en la mayoría de los organismos al ser sometidos a luz de más de  $250\ \text{mW}$  [52]. Por este motivo y según lo expuesto anteriormente, la elección del láser adquiere especial importancia.

## 6.1. Bio-aplicaciones

Aunque originalmente las pinzas ópticas fueron diseñadas para manipular átomos, con motivo de las dificultades que presentó en el primer experimento donde se llevó a cabo [53], Ashkin y sus colaboradores decidieron probar la pinzas ópticas en esferas submicrónicas [54], ya que éstas podían tratarse como dipolos más simples. Al probar la eficacia de este método para manipular partículas desarrollaron diversos experimentos para estudiar el virus del tabaco [19], puesto que por su estructura se podía tratar como una proteína con forma alargada fácilmente orientable.

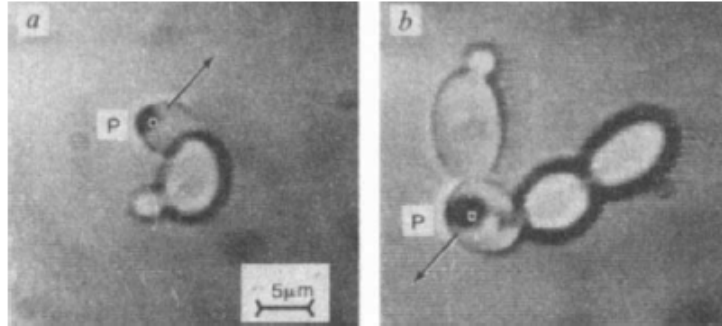


Figura 4: División de células de levadura observada por Ashkin mientras empleaba un láser infrarrojo [13]. Un grupo de dos células se divide en cuatro células y posteriormente en seis como se muestra en las imágenes a y b

Las primeras pruebas con organismos vivos surgieron a partir de una contaminación bacteriana de las muestras de tabaco, y a partir de ellas observaron la muerte térmica de organismos vivos por un exceso de energía suministrada por el láser de argón de 514 nm. Cambiando el láser por uno infrarrojo lograron manipular bacterias de *Escherichia coli* sin ocasionarles daños apreciables [13]. Este hecho, supuso una revolución en el análisis de organismos vivos a partir de la utilización de este método no invasivo.

Actualmente, las pinzas ópticas tienen gran variedad de usos, ya que la magnitud de las fuerzas que producen es adecuada para mover células, doblar elementos del citoesqueleto, modificar membranas polipeptídicas, estudiar el movimiento de motores biológicos como la miosina o la kinesina, modificar enlaces macromoleculares como los complejos ligando-receptor [55], transformar la estructura de moléculas de ADN [56], caracterizar la fuerza de transporte de orgánulos celulares [57] o estudiar el movimiento de los husos mitóticos [58].

A continuación, debido a la gran complejidad y extensión de su gran variedad de aplicaciones, vamos a desarrollar algunas de las más importantes referidas al tratamiento del ADN molecular, el estudio de motores moleculares y de la biología vegetal.

### 6.1.1. Manipulación de moléculas de ADN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una macromolécula formada por segmentos llamados genes, responsables de la transmisión hereditaria. Éstos están compuestos por nucleótidos y contienen la información necesaria para construir otros componentes de la células, como proteínas y moléculas de ARN. En los

organismos vivo, el ADN suele existir como dos cadenas que se enroscan sobre sí mismas formando una estructura de doble hélice [59].

El uso de las pinzas láser ha proporcionado valiosa información para determinar la fuerzas que mantienen la molécula de ADN en una configuración enrollada al azar. Las pinzas ópticas también han tenido éxito en los numerosos estudios de la interacción ADN-proteína, transcripción génica y degradación enzimática [60].

Utilizando la microscopía de video-fluorescencia, una técnica que permite realizar el seguimiento de partículas microscópicas marcadas con sustancias fluorescentes, en diversos estudios se ha podido observar la relajación de la estructura molecular del ADN [61, 62]. Al insertar marcadores fluorescentes en las partículas de ADN y tras atrapar los extremos de las cadenas moleculares, se ha logrado examinar la extensión de las cadenas de ácido desoxirribonucleico.

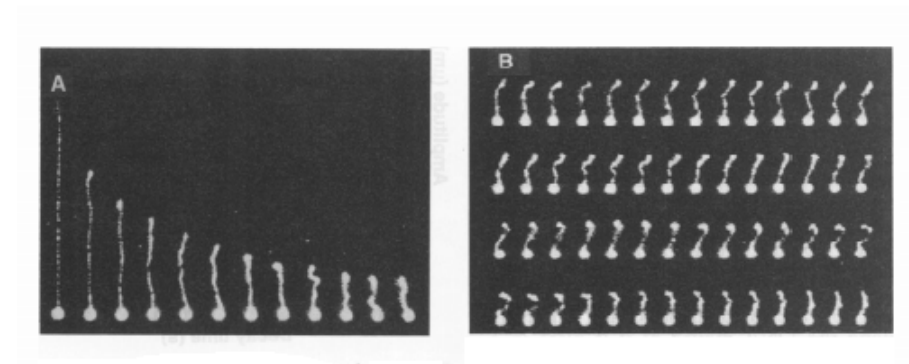


Figura 5: Relajación de una molécula única de ADN [61]. En la imagen a, inicialmente el ADN está estirado en toda su longitud y observamos un rápido retroceso inicial. Posteriormente, en la figura b se muestra la dinámica interna durante la relajación del polímero.

Por otra parte, aprovechando la sensibilidad de femtonewtons de las mediciones con pinzas ópticas se han llevado a cabo diversas experiencias para determinar las fluctuaciones térmicas del ADN, y resolver así cuestiones sobre la hidrodinámica interna del polímero y la anisotropía en los tiempos de relajación molecular, explicando de esta forma su comportamiento no lineal [63].

Los resultados de estos estudios han proporcionado datos de gran importancia a la hora de dilucidar la estructura interna de la molécula de ADN, así como las fuerzas que intervienen en el estiramiento de las cadenas en los diversos procesos celulares.



Adicionalmente, los micro-haces de láser o pinzas ópticas están surgiendo como una herramienta para el examen de los mecanismos de auto-reparación de las moléculas de ADN, presentándose como instrumentos de gran utilidad para el estudio del envejecimiento celular provocado por fallos en estos mecanismos [64]. Estas herramientas permiten inducir daño en fragmentos preseleccionados de ADN, simulando así los efectos provocados por otras técnicas más costosas, complejas y limitadas como la irradiación con partículas radiactivas o con iones o partículas alpha de diferentes energías.

Otra de las aplicaciones importantes de las pinzas ópticas en este ámbito se ha desarrollado en el marco de investigación de la bioquímica, en el límite de la biología mono-molecular. Como ejemplo, podemos citar la experiencia llevada a cabo por Yin y sus colaboradores para determinar la fuerza ejercida por una molécula de la enzima de ARN polimerasa durante la transcripción genética [65]. En este análisis utilizaron una molécula de ARN polimerasa de *Escherichia coli* para producir la transcripción de una secuencia de ADN que había sido capturada previamente por una pinza óptica. Con los resultados de estas mediciones se pudo concluir que las fuerzas implicadas en este proceso son sustancialmente mayores que las que actúan en la movilización de los motores citoesqueléticos de actina y miosina (encargados de la contracción y relajación muscular). Además, suministraron información importante de la eficiencia con la que la energía química es transformada en energía mecánica durante la transcripción.

### 6.1.2. Motores moleculares

Los motores moleculares son las estructuras responsables de la mayoría de formas de movimiento que encontramos en el mundo celular. Se conocen tres tipos de motores citoplasmáticos: miosinas, estructuras encargadas del movimiento de las actinas, y kinesinas y dineinas, que median el transporte celular mediante microtúbulos [66]. Todas ellas operan transformando energía química en mecánica a través de la hidrólisis del ATP.

Las pinzas ópticas han sido ampliamente utilizadas para caracterizar el movimiento de proteínas motoras, siendo la kinesina una de las más estudiadas. Uno de los esquemas más utilizados experimentalmente para estudiar esta molécula consiste en unir la proteína motora a una cuenta atrapada dentro de la pinza óptica, tal y como se muestra en la figura 6.

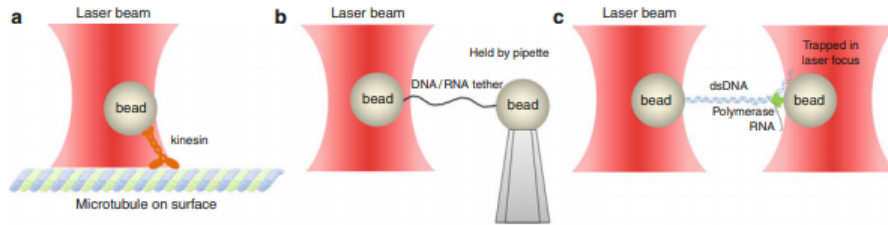


Figura 6: Esquema de una molécula aislada durante los experimentos con pinzas ópticas [67].

Utilizando este método, Svoboda y sus colaboradores lograron medir la longitud de los pasos con los que se desplaza la kinesina cuando lleva a cabo la hidrólisis del ATP [68]. Estos resultados ayudaron a probar la hipótesis de que esta molécula se mueve mediante 'pasos' regulares, lo que implica la distinción en la molécula de dos partes bien diferenciadas. Por un lado, podemos identificar uno de sus extremos como cabeza, que es la parte que transporta la carga, y el otro, se correspondería con los 'pies', dos porciones que se alternan en su movimiento dando lugar a una especie de caminata [69].

Empleando el mismo diseño experimental y aprovechando la capacidad que tienen las pinzas ópticas de medir la fuerza opuesta al movimiento necesaria que es preciso aplicar para causar la detención de la kinesina, Visscher y su equipo lograron estimar la fuerza de parada de esta molécula [70]. Esta experiencia resolvió cuestiones importantes relativas a la concentración del ATP y su descomposición para la obtención de energía mecánica.

Asimismo, podemos citar otros estudios similares realizadas con moléculas de miosina que han permitido medir, de igual modo, tanto la longitud de los pasos que realiza este compuesto, como la magnitud de las fuerzas implicadas en la realización del movimiento [71].

### 6.1.3. Manipulación láser en biología vegetal

Las pinzas láser son una excelente herramienta para el estudio de células vegetales en virtud de sus características ópticas. Debido a que la mayoría de estas células son transparentes, podemos emplear esta herramienta para manipular estructuras subcelulares como mitocondrias y cloroplastos, que son los orgánulos encargados de realizar la respiración celular y la fotosíntesis respectivamente. Además de estas estructuras, las células vegetales contienen otros orgánulos móviles, que pueden ser extraídos de forma muy controlada mediante el uso de las pinzas ópticas [72].

Otra de sus más importantes aplicaciones consiste en la microinyección de genes por láser, que ha sido utilizada para añadir genes exteriores en células individuales, ya que por sus características, al tratarse de un método no invasivo, no ocasiona daños dentro de la célula. Diversos estudios han aprovechado este método para analizar la expresión de los genes en distintos orgánulos. Entre ellos cabe destacar la experiencia llevada a cabo por Weber y sus colaboradores para analizar los mecanismos de regulación genética en los cloroplastos [73]. Este estudio ha conseguido dilucidar cuestiones bioquímicas relativas a al ordenamiento génico mediante la introducción de ADN y la observación de los genes físicamente modificados.

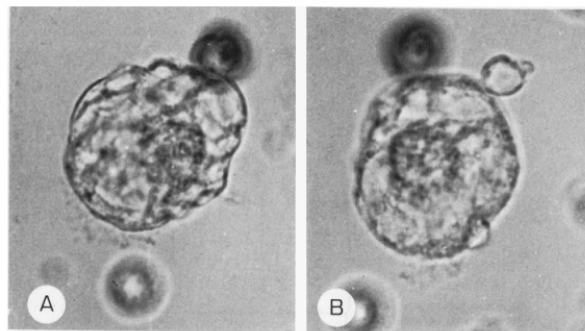


Figura 7: Creación de una apertura temporal en la pared y en la membrana de una célula vegetal mediante un pulso láser [73].

En los últimos años, gracias a su combinación de técnicas de microscopía avanzada, se han consolidado las pinzas ópticas como una excelente herramienta para el estudio de la dinámica citoplasmática y de la secreción de sustancias intercelulares, ya que son un utensilio ideal para examinar las fuerzas que rigen la organización intercelular [74]. En base a esto, podemos destacar dos líneas principales de investigación:

**- Estudio de las interacciones del citoesqueleto:**

Grabski y sus colaboradores emplearon un haz láser enfocado para medir la tensión y la elasticidad del citoesqueleto en las células vivas de diversas plantas [75]. Además, estudiaron el efecto sobre las fuerzas intercelulares que tenían la adición de diferentes sustancias marcadoras como iones de calcio o variaciones de pH, llegando a la conclusión de que estos procesos tenían funciones reguladoras para controlar la tensión y la organización del citoesqueleto.

Van Der Honing y su equipo emplearon células de tabaco para caracterizar los parámetros implicados en el movimiento de filamentos de actina durante cambios en la organización citoplasmática, para determinar así, si la rigidez es una propiedad del citoplasma general relacionada con los filamentos de actina

[76]. Los resultados mostraron que la rigidez del citoplasma está negativamente relacionada con su deformabilidad y la actina juega un papel muy importante en este proceso.

Siguiendo la misma línea de investigación del posicionamiento de los orgánulos citoplasmáticos, Ketelaar y sus colaboradores señalaron la importancia de la localización del núcleo en determinadas células epidérmicas que se encuentran formando los pelos absorbentes de las raíces de las plantas, mostrando de nuevo el rol esencial de la actina en el proceso de crecimiento de las células pilosas [77].

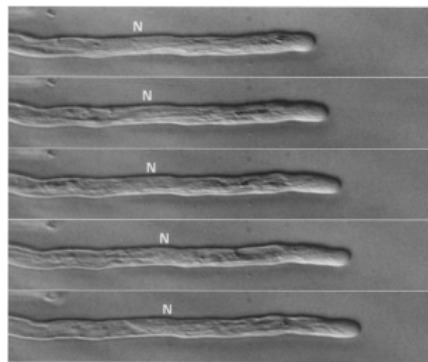


Figura 8: Muestra de las fotografías tomadas por Ketelaar de una célula pilosa donde está indicado su núcleo (N) [77].

#### - Análisis de las dinámicas de secreción:

Además, como hemos expuesto anteriormente, otro de los logros de las pinzas ópticas en el ámbito de la biología vegetal ha sido la aclaración de los mecanismos de secreción entre las membranas biológicas y orgánulos del citoesqueleto.

En las células eucariotas el transporte de lípidos y sustancias de secreción se realiza desde membranas biogénicas hacia otras membranas de la célula. Las membranas biogénicas son aquellas que tienen la capacidad de síntesis lipídica y se identifican con el retículo endoplasmático en células eucariotas. En el proceso de transporte podemos distinguir dos medios principales: su translación a través de vesículas, y el transporte entre zonas cercanas entre membranas [78].

Con el uso de las pinzas ópticas para manipular una planta llamada *Arabidopsis thaliana*, Andersson y su equipo demostró por primera vez que existe una asociación en los lugares de contacto entre membranas, revelando la existencia de fuerzas entre el retículo endoplasmático y los cloroplastos [79].

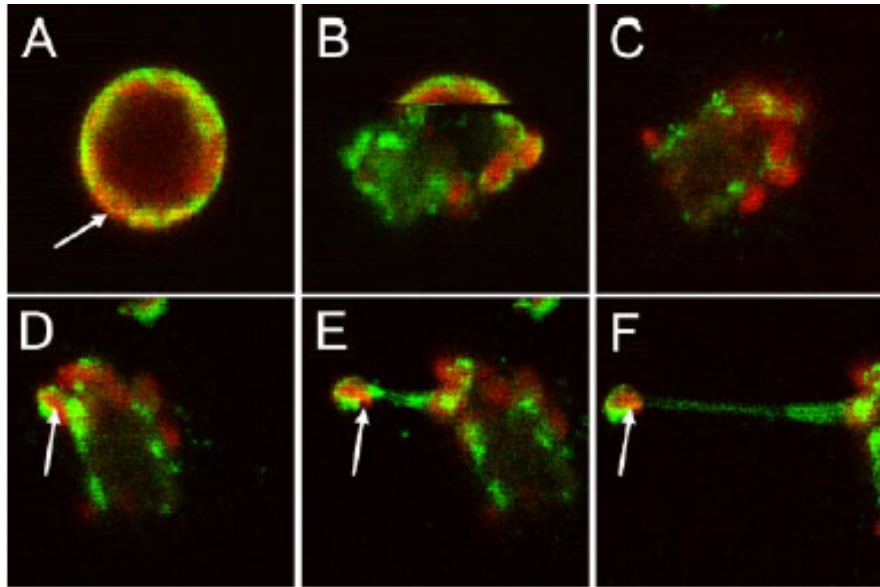


Figura 9: Fragmentación óptica de una célula sin pared vegetal de *Arabidopsis* y liberación de sus cloroplastos [79].

## 7. Conclusiones

En este trabajo se ha efectuado una revisión bibliográfica del estado del arte de las pinzas ópticas, señalando el fundamento físico de su funcionamiento, las distintas aproximaciones que se pueden llevar a cabo en el estudio de las fuerzas ópticas implicadas y algunas de sus principales aplicaciones biológicas.

En la primera parte del trabajo hemos abordado la historia y el concepto de las pinzas ópticas. Hemos indicado cuáles fueron los principales avances que le permitieron a Ashkin y a su equipo construir las primeras pinzas ópticas y alterar el movimiento de diversas partículas microscópicas.

A continuación, hemos descrito los principios físicos que explican el funcionamiento de las pinzas ópticas, realizando un análisis de la energía y el momento transportado por la luz. Como para calcular las magnitudes de interés, tales como la fuerza que sufre una partícula o la presión absorbida en las experiencias con pinzas ópticas, en la mayoría de los casos, es necesario modelizar el problema, seguidamente hemos descrito las distintas aproximaciones que podemos llevar a cabo en el estudio de dichas magnitudes.

Se ha llevado a cabo una distinción de tres regímenes: el régimen de Rayleigh, empleado para el estudio partículas mucho menores que la longitud de onda del láser utilizado; el régimen de Mie, descrito para analizar corpúsculos mucho mayores que la longitud de onda del láser; y el régimen intermedio, donde hemos destacado el método de cálculo de la matriz de dispersión para examen de partículas con un tamaño del orden de la longitud de onda del láser. Una vez descritos los principios físicos y los métodos de cálculo de las magnitudes implicadas en la aplicación de las pinzas ópticas, se ha realizado una descripción general del montaje de estos dispositivos y se han enumerado los principales láseres destinados para su construcción.

Para terminar, hemos comentado los principales logros y las limitaciones más importantes que ofrecen las pinzas ópticas para el estudio de moléculas biológicas. Tras describir el primer experimento de manipulación de material orgánico realizado por Ashkin con este utensilio, se han enumerado y descrito algunas de las aplicaciones más actuales en el ámbito de la biología celular, como la manipulación de moléculas de ADN, el estudio de motores moleculares o distintos usos en biología vegetal, como el estudio de las interacciones del citoesqueleto o de las dinámicas de secreción celular.

Como conclusión, podríamos destacar que, debido a su gran cantidad de aplicaciones biológicas y su carácter no invasivo, las pinzas ópticas se han consolidado como uno de los métodos más importantes en la investigación celular. La mejora continua de este método y el desarrollo de nuevos ámbitos de aplicación convierten a este tipo de manipulación óptica en una de las herramientas más prometedoras con un amplísimo recorrido por delante.

## Conclusions

In this paper we carried out a bibliographic review of the optical tweezers' operation, pointing out the physical basics of its operation, the different approaches that can be carried out in the study of the optical forces involved and some of its main biological applications.

In the first part of our work, we described the history and concept of optical tweezers. We pointed out which were the main advances that allowed Ashkin and his team to build the first optical tweezers and alter the motion of some microscopic particles.

In the following, we explained the physical principles involved in the operation of optical tweezers, performing and analysis the energy and momentum carried by light. As to calculate the magnitudes of interest, such as the force suffered by a particle or the pressure absorbed in the experiences with optical

tweezers, in most cases, it is necessary to model the problem, we have described the different approaches that we can carry out in the study of these magnitudes.

Next, We made a distinction of three regimes: the Rayleigh regime, used for the study of particles much smaller than the length of wave of the laser used; the Mie regime, described to analyze corpuscles much greater than the wavelength of the laser; and the intermediate regime, where we highlighted the method of calculating the dispersion matrix for examination of particles with a size on the order of the laser wavelength. Once we explained the physical principles and methods involved in the application of optical tweezers, we made a description of the general assembly of these devices and we listed the lasers usually used in its construction.

Finally, we have discussed the main achievements and the most important limitations of optical tweezers for the study of biological molecules. After describing the first experiment with organic material made by Ashkin with this device, we pointed out some of the the most current applications in the field of cell biology, such as manipulation of DNA molecules, the study of molecular motors or different uses in plant biology, such as the study of cytoskeletal interactions or of cell secretion dynamics.

In close, we could highlight that, due to its large number of biological applications and their non-invasive nature, optical forces have become one of the most important methods in cell research. The continuous improvement of this method and the development of new fields of application make this type of optical manipulation one of the most encouraging tools.

## 8. Referencias

- [1] McGloin D. y Reid J., (2010). Forty Years of Optical Manipulation, *Opt. Photon. News* 21(3), 20-26 (2010).
- [2] Kepler J., (1619). *De Cometis libelli tres*.
- [3] Maxwell J. C., (1873). *A treatise of electricity and magnetism*, Clarendon Press.
- [4] Poynting J. H. y Strutt J. W., (1997). On the transfer of energy in the electromagnetic field, *Phil. Trans. R. Soc.* 175343–361
- [5] Nichols, E. F. y Hull, G. F., (1901). A Preliminary Communication on the Pressure of Heat and Light Radiation, *Physical Review (Series I)*, 13(5), 307–320.
- [6] Lebedew P., (1901). Untersuchungen über die Druckkräfte des Lichtes, *Annalen Der Physik*, 311(11), 433–458.
- [7] Svoboda, K. y Block S. M., (1994). Biological Applications of Optical Forces, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23(1), 247–285.
- [8] Mainman T. H., (1960). Stimulated Optical Radiation in Ruby, *Nature*, 187(4736), 493–494.
- [9] Hernández L., (2011). A medio siglo de la construcción del primer láser, *Revista cubana de física*, 28(1), 73-76.
- [10] Ashkin A., (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, *Physical Review Letters*, 24(4), 156-159.
- [11] Ashkin A., (2000). History of Optical Trapping and Manipulation of Small Neutral particles, Atoms, and Molecules, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 6(6), 841-856.
- [12] Ashkin A., Dziedzic J. M., Bjorkholm J. E. y Chu S., (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Optics letters*, 11(5), 288-290.
- [13] Ashkin A., Dziedzic J. M. y Yamane T., (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams, *Nature*, 330(6150), 769–771.



- [14] Jones P. H., Maragò O. M. y Volpe G., (2015). *Optical Tweezers: Principles and Applications*, Cambridge University Press.
- [15] Zhang, H. y Liu, K. K., (2008). Optical tweezers for single cells, *Journal of The Royal Society Interface*, 5 (24), 671–690
- [16] Sepúlveda K. V., Vargas I. R. y García R. R., (2007). Pinzas ópticas: las delicadas manos de la luz, *Ciencia*, 58(4), 18-25.
- [17] Jackson J. D., (1962). *Classical Electrodynamics*, John Wiley & Sons Ltd.
- [18] Neuman, K. C. y Block S. M.,(2004). Optical trapping, *The Review of scientific instruments*, 75 (9), 2787-2809.
- [19] Ashkin A. y Dziedzic J., (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria, *Science*, 235 (4795), 1517–1520.
- [20] Griffiths D. J., (2015). *Introduction to Electrodynamics*, Pearson, 345-356.
- [21] Barton J. P., Alexander D. R. y Schaub, S. A., (1989). Theoretical determination of net radiation force and torque for a spherical particle illuminated by a focused laser beam, *Journal of Applied Physics*, 66(10), 4594–4602
- [22] Griffiths D. J., (2012). Resource Letter EM-1: Electromagnetic Momentum, *American Journal of Physics*, 80(1), 7–18.
- [23] McDonald K. T., (2017). Bibliography on the Abraham-Minkowski Debate, *Princeton University Press*.
- [24] Medina R. y Stephany J., (2017). The energy-momentum tensor of electromagnetic fields in matter, *ArXiv e-prints*.
- [25] Nieminen T. A., Knöner G., Heckenberg N. R. y Rubinsztein-Dunlop H. (2007). Physics of Optical Tweezers, *Laser Manipulation of Cells and Tissues*, 207–236.
- [26] Waterman P. C., (1971). Symmetry, Unitarity, and Geometry in Electromagnetic Scattering, *Physical Review D*, 3(4), 825–839.
- [27] Polimeno P., Rosalba S., Boschi, C., Iati M. y Marago O. M., (2019). Optical forces in the T-matrix formalism, *Atti della Accademia Peloritana dei Pericolanti*.

- [28] Stratton J. A., (1941). *Electromagnetic Theory*, McGraw Hill Book Company, 205-207, 392-395.
- [29] Harada Y. y Asakura T., (1996). Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime, *Optics Communications*, 124(5-6), 529–541.
- [30] Nieminen T. A., Stilgoe A. B., Heckenberg N. R. y Rubinsztein-Dunlop H. H., (2010). Approximate and exact modeling of optical trapping, *Optical Trapping and Optical Micromanipulation VII*.
- [31] Roosen G. y Imbert C., (1976). Optical levitation by means of two horizontal laser beams: A theoretical and experimental study, *Physics Letters A*, 59(1), 6–8.
- [32] Roosen G., (1979). The optical levitation of spheres, *Canadian Journal of Physics*, 57(9), 1260-1279.
- [33] Gauthier R. C. y Wallace S., (1995). Optical levitation of spheres: analytical development and numerical computations of the force equations, *Journal of the Optical Society of America B*, 12(9), 1680.
- [34] Callegari A., Mijalkov M., Gököz A. B. y Volpe G., (2015). Computational toolbox for optical tweezers in geometrical optics, *Journal of the Optical Society of America B*, 32(5), B11.
- [35] Ashkin A., (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime, *Biophysical Journal*, 61(2), 569–582.
- [36] Bouloumis T. D. y Nic Chormaic S., (2020). From Far-Field to Near-Field Micro- and Nanoparticle Optical Trapping, *Applied Sciences*, 10(4), 1375.
- [37] Agayan R. R., Gittes F., Kopelman R. y Schmidt C. F., (2002). Optical trapping near resonance absorption, *Applied Optics*, 41(12), 2318.
- [38] Barton J. P. y Alexander D. R., (1989). Fifth-order corrected electromagnetic field components for a fundamental Gaussian beam, *Journal of Applied Physics*, 66(7), 2800–2802.
- [39] Lock J. A. y Gouesbet G., (2009). Generalized Lorenz–Mie theory and applications, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 110(11), 800–807.
- [40] Farsund Ø. y Felderhof B. U., (1996). Force, torque, and absorbed energy for a body of arbitrary shape and constitution in an electromagnetic radiation field, *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, 227(1-2), 108–130.

- [41] Nieminen T. A., du Preez-Wilkinson N., Stilgoe A. B., Loke V. L. Y., Bui A. A. M. y Rubinsztein-Dunlop H., (2014). Optical tweezers: Theory and modelling, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, *146*, 59–80.
- [42] Sato S., Ogawa Y., Ohyumi M., Shibata H., y Inaba H., (1991). Optical trapping of small particles using a 13- $\mu\text{m}$  compact InGaAsP diode laser, *Optics Letters*, *16* (5), 282-284.
- [43] Sato S., y Inaba, H., (1996). Optical trapping and manipulation of microscopic particles and biological cells by laser beams, *Optical and Quantum Electronics*, *28*(1), 1–16.
- [44] Neuman K. C., y Block S. M., (2004). Optical trapping, *Review of Scientific Instruments*, *75* (9), 2787–2809.
- [45] Balijepalli A., Lebrun T. W., Gorman J. J. y Gupta S. K., (2008). Methods to directly measure the trapping potential in optical tweezers, *Optical Trapping and Optical Micromanipulation V*, *7038*(1).
- [46] Block S. M.. *Cells: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volume II, Section 7: Construction of Optical Tweezers.
- [47] Geusic J. E., Marcos H. M. y Van Uitert L. G., (1964). Laser oscillations in Nd-doped yttrium aluminium, yttrium galium and gadolinium garnets, *Applied Physics Letters*, *4* (10), 182-184.
- [48] Malcolm G. P. y Ferguson A. I., (1991). Self-mode locking of a diode-pumped Nd:YLF laser, *Optics Letters*, *16* (24), 1967.
- [49] Roth P. W., Maclean A. J., Burns D., y Kemp, A. J., (2009). Directly diode-laser-pumped Ti:sapphire laser, *Optics Letters*, *34* (21), 3334.
- [50] Schneckenburger H., Hendinger A., Sailer R., Gschwend M. H., Strauss W. S., Bauer M. y Schutze K., (2000). Cell viability in optical tweezers: high power red laser diode versus Nd:YAG laser, *Journal of Biomedical Optics*, *5* (1), 40.
- [51] Choudhary D., Mossa A., Jadhav M. y Cecconi, C., (2019). Bio-Molecular Applications of Recent Developments in Optical Tweezers, *Biomolecules*, *9*(1), 23.
- [52] Kuo S. C. y Sheetz, M., (1992). Optical tweezers in cell biology, *Trends in Cell Biology*, *2*(4), 116–118.
- [53] Chu S., Bjorkholm J. E., Ashkin A. y Cable A., (1986). Experimental Observation of Optically Trapped Atoms, *Physical Review Letters*, *57*(3),

314–317.

[54] Ashkin A., (1997). Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(10), 4853–4860.

[55] Block S. M., (1992). Making light work with optical tweezers, *Nature*, *360*(6403), 493–495.

[56] Bockelmann U., Thomen P., Essevaz-Roulet B., Viasnoff V. y Heslot F., (2002). Unzipping DNA with Optical Tweezers: High Sequence Sensitivity and Force Flips, *Biophysical Journal*, *82*(3), 1537–1553.

[57] Ashkin A., Schütze K., Dziedzic J. M., Euteneuer U. y Schliwa M., (1990). Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap, *Nature*, *348*(6299), 346–348.

[58] Berns M. W., Wright W. H., Tromberg B. J., Profeta G. A., Andrews J. J. y Walter R. J., (1989). Use of a laser-induced optical force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(12), 4539–4543.

[59] Alcalá A. M., (2019). *Genética de la emoción: el origen de la enfermedad*, Ediciones B.

[60] Prasad P., (2003). *Introduction to biophotonics*, Wiley-Interscience, 502–506.

[61] Perkins T., Quake S. D. y Chu S. (1994). Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy, *Science*, *264*(5160), 822–826.

[62] Perkins T., Smith D., Larson R. y Chu, S. (1995). Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow, *Science*, *268*(5207), 83–87.

[63] Meiners J. C. y Quake S. R., (2000). Femtonewton Force Spectroscopy of Single Extended DNA Molecules, *Physical Review Letters*, *84*(21), 5014–5017.

[64] Grigaravicius P., Monajembashi S., Pilarczyk G., Rapp A. y Greulich K. O., (2007). Laser microbeams and optical tweezers to study DNA repair and ageing, *Optical Trapping and Optical Micromanipulation IV*, 6644.

[65] Yin H. Wang M. D., Svoboda K., Landick R., Block S. M. y Gelles J., (1995). Transcription Against an Applied Force, *Science*, *270*(5242), 1653–1657.

[66] Schliwa M. y Woehlke G., (2003). Molecular motors, *Nature*, *422*(6933), 759–765.

- [67] Hou X. y Cheng W., (2013). *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, 1800-1807.
- [68] Svoboda K., Schmidt C. F., Schnapp B. J. y Block S. M., (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, *365*(6448), 721–727.
- [69] Arizmendi C. M., (2016). Motores moleculares, *Núcleos*, *3*, 29-34.
- [70] Visscher K., Schnitzer M. J. y Block S. M., (1999). Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp, *Nature*, *400*(6740), 184–189.
- [71] Finer J. T., Simmons R. M. y Spudich J. A., (1994). Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps, *Nature*, *368*(6467), 113–119.
- [72] Greulich, K. O., (1997). *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine*, Birkhauser.
- [73] Weber G., Monajembashi S., Otto K. G., y Wolfram J., (1991). Genetic changes induced in higher plants by a UV laser microbeam, *Israel Journal of Botany*, *40*(2), 115-122.
- [74] Hawes C., Osterrieder A., Sparkes I. y Ketelaar T., (2010). Optical tweezers for the micromanipulation of plant cytoplasm and organelles, *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(6), 731–735.
- [75] Grabski S., Guang X., Holland J. y Schindler M., (1994). Lipids trigger changes in the elasticity of the cytoskeleton in plant cells: a cell optical displacement assay for live cell measurements, *The Journal of Cell Biology*, *26*(3), 713-726.
- [76] Van Der Honing H., De Ruijter N., Emons A. y Ketelaar T., (2009). Actin and myosin regulate cytoplasm stiffness in plant cells: a study using optical tweezers, *New Phytologist*, *185*(1), 90–102.
- [77] Ketelaar T., Faivre-Moskalenko C., Esseling J., de Ruijter N., Grierson C., Dogterom M. y Emons A., (2002). Positioning of nuclei in Arabidopsis root hairs: an actin-regulated process of tip growth, *Plant Cell*, *14*(11), 2941-2955.
- [78] Holthuis J. C. y Levine T., (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(3), 209–220.
- [79] Andersson M., Goksör M. y Sandelius A., (2006). Optical Manipulation Reveals Strong Attracting Forces at Membrane Contact Sites between Endo-

plasmic Reticulum and Chloroplasts, *Journal of Biological Chemistry*, 282(2),  
1170-1174.