

Optical tweezers implementation for a single-cell study of Diatoms:

Exploration of trapping performance and the photonic properties of frustules



Autor: Raymundo Vazquez Martinez

Asesor: Dr. Remigio Cabrera Trujillo



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

19 de mayo de 2025

Introducción

La presión de radiación



La radiación electromagnética ejerce fuerza sobre los objetos materiales debido al intercambio de momento.

Introducción

Resumen cronológico.



- ▶ Siglo XVI: Idea de la presión de radiación para explicar la orientación de los cometas (Kepler, 1619).
- ▶ 1860s: Teoría electromagnética de Maxwell, primer sustento teórico para la presión de radiación (Maxwell, 1865).
- ▶ 1880 - 1900s: Primeras mediciones experimentales de la presión de radiación (Lebedev, 1883; Nichols et al., 1901).
- ▶ 1960: Invención del láser (Maiman, 1960).
- ▶ 1970s: Primeros experimentos de Ashkin con partículas sintéticas (Ashkin, 1970).
- ▶ 1986: Invención de las pinzas ópticas y ejecución lumínica de bacterias (Ashkin, 1986).
- ▶ 2018: Premio Nobel de Física para Arthur Ashkin por su trabajo con las pinzas ópticas.

Introducción

La presión de radiación



- ▶ Siglo XVI: Idea de la presión de radiación de Kepler para explicar la orientación de los cometas.
- ▶ 1860s: Teoría electromagnética de Maxwell, primer sustento teórico para la presión de radiación.
- ▶ 1900s: Mediciones de la presión de radiación, Albert Michelson y Francis Pease realizaron la primera medición directa.
- ▶ 1960: Invención del láser por Theodore Maiman.
- ▶ 1970s: Primeros experimentos de Ashkin con partículas sintéticas.
- ▶ 1986: Invención de las pinzas ópticas y ejecución lumínica de bacterias.
- ▶ 2018: Premio Nobel de Física para Arthur Ashkin por su trabajo con las pinzas ópticas.

Marco teórico

Diatomeas



Las diatomeas son organismos unicelulares que se encuentran en la mayoría de los cuerpos de agua en la tierra.

Marco teórico

Diatomeas



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1: Se han encontrado diatomeas en lagos (a) y mares (b), en cuerpos de agua efímeros como tierra húmeda (c) e incluso en núcleos de hielo en la Antártica (d).

Fuente de la figura (d): Kelly (2019)

Marco teórico

Diatomeas



Propiedades ecologicas de las diatomeas:

- ▶ Organismos unicelulares fotosintéticos.
- ▶ Grandes contribuyentes de oxígeno (20 – 25 % del global).
- ▶ Gran variedad de especies: más de 100,000 especies identificadas.
- ▶ Valiosos indicadores históricos (debido a su acumulación).
- ▶ Indicadores ambientales (debido a su variedad).
- ▶ Parte esencial de la cadena alimenticia acuática.

Marco teórico

Diatomeas



Las frústulas son un caparazón de sílice que aparece en la etapa de crecimiento del alga y establece una clasificación binaria dada por la simetría de las frústulas.

Marco teórico

Diatomeas

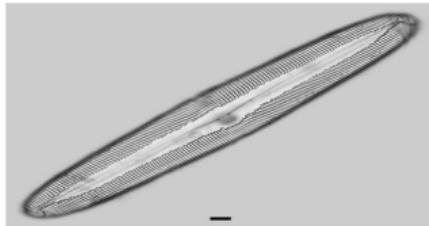
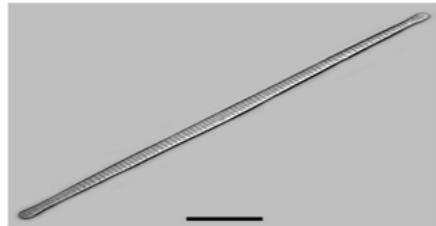
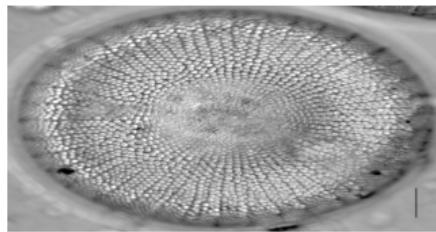
(a) *Pinnularia dariana*(b) *Fragilaria synegrotesca*(c) *Cyclotella meneghiniana*(d) *Stephanodiscus reimeri*

Figura 2: Ejemplos de diatomeas con simetrías bilateral y central. (a-b) Especies con simetría bilateral (diatomea pennada). (c-d) Especies con simetría central (diatomea céntrica).

Fuentes de las figuras: (a) Pedreira, 2012, (b-c) Diatoms of North America, 2023, (d) Microscopy anatomy Olympus, 2022

Marco teórico

Diatomeas

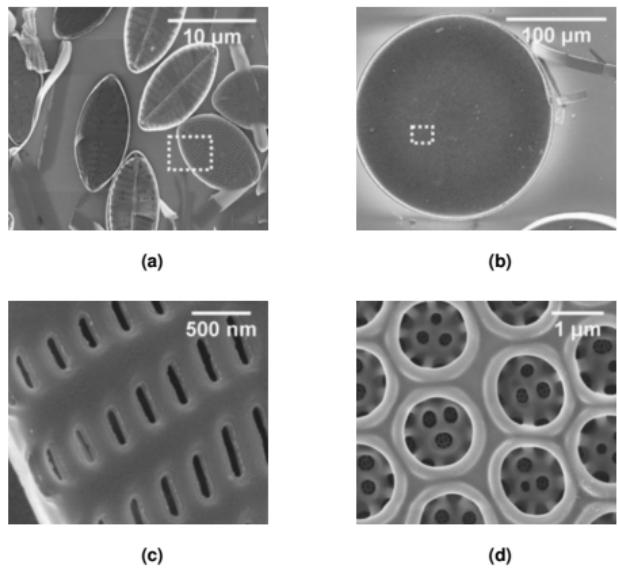


Figura 3: Imágenes de microscopio electrónico de barrido (MEB) de **(a,c)** - *Navicula perminuta*, **(b,d)** *Coscinodiscus wailesii*. Los rectángulos punteados en **(a-b)** corresponden a las áreas magnificadas en **(c-d)** que exhibe la arquitectura del frústulo.

Fuente de las figuras **(a-d)**: Aguirre et al. (2018)

Marco teórico

Diatomeas



Propiedades de las frustulas:

- ▶ Las frústulas tienen patrones intrínsecos de poros y rendijas en toda su estructura.
- ▶ Frústulo sintetizado a partir de ácido monosilícico.
- ▶ El frústulo proporciona potencial protección UV.
- ▶ El frústulo proporciona protección mecánica.
- ▶ El frústulo exhibe estructuras similares a bandas fotónicas prohibidas.
- ▶ Aplicaciones potenciales en la mejora de células solares.
- ▶ Categorizadas por la simetría del frústulo (céntricas y pennadas).

Marco teórico

Microscopio invertido

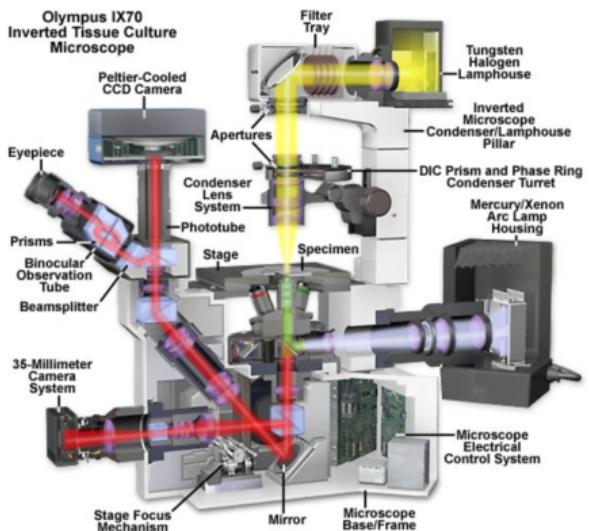


Figura 4: Componentes de un microscopio invertido (microscopio Olympus IX70).

Fuente de la figura: Fester et al., 2023

Marco teórico

Pinzas ópticas



Las pinzas ópticas son dispositivos que permiten la manipulación sin contacto de objetos con tamaños que varían desde la escala atómica hasta la micrométrica.

Pinzas ópticas

- ▶ Consisten en un haz láser altamente enfocado.
- ▶ Comúnmente, las pinzas ópticas se generan al enfocar el haz del láser sobrellenando una lente objetivo con un alto número de apertura numérica.

Marco teórico

Un modelo simple.

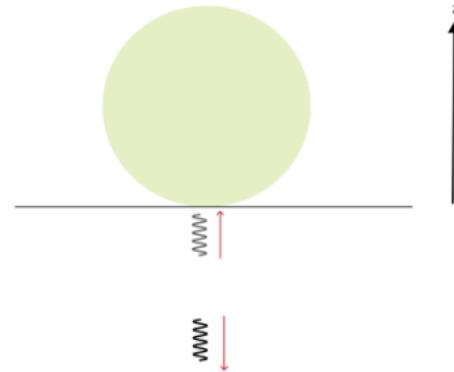


Figura 5: Un fotón con momento $\vec{p} = \frac{\hbar}{\lambda} \hat{z}$ incide perpendicularmente en una partícula que funciona como un espejo perfecto.

Marco teórico

Regímenes teóricos.



El régimen teórico para aproximar el estudio de las fuerzas ópticas en las pinzas ópticas es determinado por (Jones et al., 2015)

$$\xi = \frac{2\pi a n_i}{\lambda_0} \quad (1)$$

donde,

- ▶ ξ se define como el parámetro de tamaño de la partícula.
- ▶ a es un parámetro característico del tamaño de la partícula.
- ▶ λ_0 representa la longitud de onda de la fuente de luz en el vacío, y
- ▶ n_i es el índice de refracción del medio circundante.

Marco teórico

Pinzas ópticas



- ▶ Si $\xi \gg 1$, el régimen de la óptica geométrica es una buena aproximación.
- ▶ Si $\xi \ll 1$, un tratamiento desde el punto de vista electromagnético (Rayleigh) es adecuado, considerando a la partícula atrapada como un dipolo eléctrico inducido oscilante.
- ▶ Si $\xi \sim 1$, el régimen intermedio de la teoría generalizada de Lorenz-Mie es más adecuado para describir las fuerzas en las pinzas ópticas.

En el caso de una partícula esférica de 10 micrómetros de radio en agua, siendo expuesta a un láser de 532 nm de longitud de onda, se tiene $\xi = 157,08 \gg 1$.

Marco teórico

Pinzas ópticas

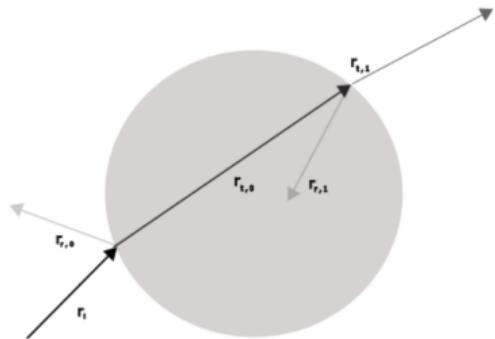


Figura 6: Un rayo incidente r_i incide sobre la superficie de una esfera. De esta interacción de dispersión, tendremos un componente transmitido y uno reflejado ($r_{r,0}$ y $r_{t,0}$) del rayo de luz. El rayo transmitido $r_{t,0}$ sufrirá otro proceso de dispersión, produciendo un nuevo par de haces de rayos ($r_{t,1}$ y $r_{r,1}$); el proceso de dispersión dentro de la esfera continuará hasta que toda la luz haya escapado de la esfera. Virtualmente toda la luz ha escapado de la esfera en menos de 10 eventos de dispersión.



Marco teórico

Pinzas ópticas

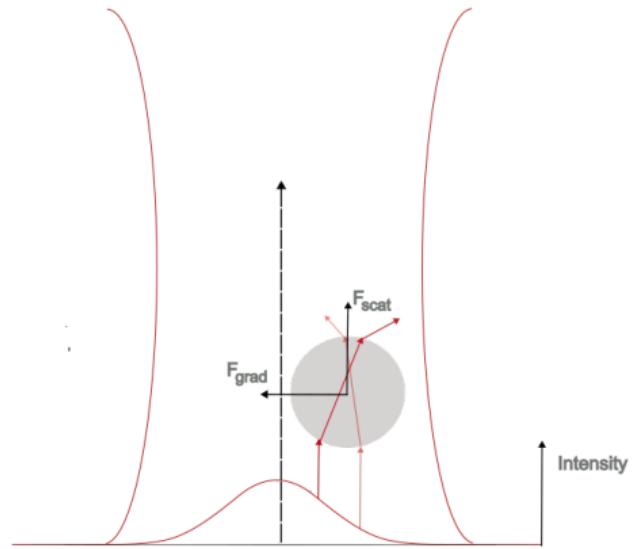


Figura 7: Una partícula esférica sometida a un haz láser gaussiano. La esfera está fuera del eje de simetría del haz láser. Por lo tanto, la fuerza producida por el rayo de la izquierda será más fuerte que la del rayo de la derecha debido a un mayor número de fotones (mayor intensidad láser) para el primero. La figura muestra las fuerzas que actúan sobre la esfera debido al haz láser F_{grad} y F_{scat} .



Marco teórico

Fuerza del primer evento de dispersión.

Para un rayo incidente como el mostrado en la Figura 6, en su primer proceso de dispersión se tiene

$$\mathbf{F}_{\text{ray},0} = \frac{n_i P_i}{c} \hat{\mathbf{r}}_i - \frac{n_i P_r}{c} \hat{\mathbf{r}}_r - \frac{n_t P_t}{c} \hat{\mathbf{r}}_t, \quad (2)$$

- ▶ P_r , P_t , y P_i son las potencias del componente reflejado, transmitido e incidente del proceso de dispersión,
- ▶ n_i y n_t denotan los índices de refracción del medio, y la partícula respectivamente.
- ▶ Aquí, $\hat{\mathbf{r}}_i$, $\hat{\mathbf{r}}_r$, y $\hat{\mathbf{r}}_t$ son los vectores unitarios que representan la dirección de los componentes incidente, reflejado y transmitido para el primer proceso de dispersión del rayo de luz incidente en la esfera.

Marco teórico

El proceso asintótico por rayo.



De manera teórica para este rayo incidente, se tendrán infinitos procesos de dispersión,

$$\mathbf{F}_{\text{ray}} = \frac{n_i P_i}{c} \hat{\mathbf{r}}_i - \frac{n_i P_r}{c} \hat{\mathbf{r}}_{r,0} - \sum_{n=1}^{+\infty} \frac{n_i P_{t,n}}{c} \hat{\mathbf{r}}_{t,n}, \quad (3)$$

En principio se tendría que calcular la suma infinita para encontrar la fuerza exacta, sin embargo la contribución más grande proviene de los dos primeros procesos y virtualmente la potencia se vuelve cero después de las 10 iteraciones del proceso.

Marco teórico

La fuerza total



La fuerza total debido al la radiacion electromagnetica, considerando "todos"los rayos del haz laser.

$$\mathbf{F}_{\text{total}} = \sum_m \mathbf{F}_{\text{ray}}^{(m)} = \sum_m \left[\frac{n_i P_i^{(m)}}{c} \hat{\mathbf{r}}_i^{(m)} - \frac{n_i P_r^{(m)}}{c} \hat{\mathbf{r}}_{r,0}^{(m)} - \sum_{n=1}^{+\infty} \frac{n_i P_{t,n}^{(m)}}{c} \hat{\mathbf{r}}_{t,n}^{(m)} \right]. \quad (4)$$

Marco teórico

Pinzas ópticas

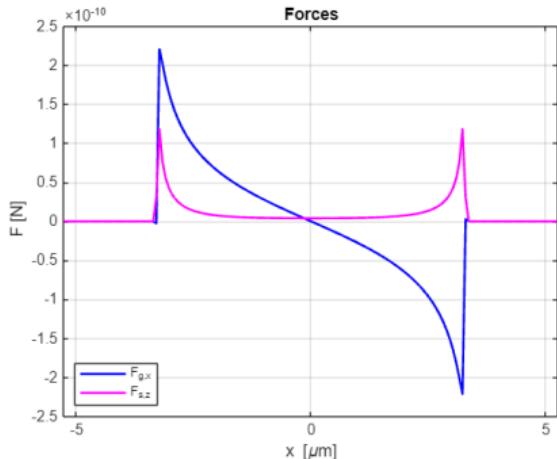


Figura 8: Fuerzas ópticas F_g y F_s (fuerza de gradiente y fuerza de dispersión respectivamente) sobre una partícula esférica de SiO_2 de $6.59\mu m$ producidas por un haz láser enfocado con una potencia establecida en $120mW$. Las fuerzas ópticas se calculan en función de la posición a lo largo del eje transversal x del centro de masa de la partícula atrapada utilizando el software OTGO (Callegari et al. (2015)). El foco del haz láser en el software se considera obtenido sobrelleñando un objetivo de microscopio con apertura numérica 1.0 y aumento de 60X.

Marco teórico

Microfluidicos



Un dispositivo microfluídico es un sistema diseñado para manipular y manejar pequeñas cantidades de fluidos a escala de micrómetros.

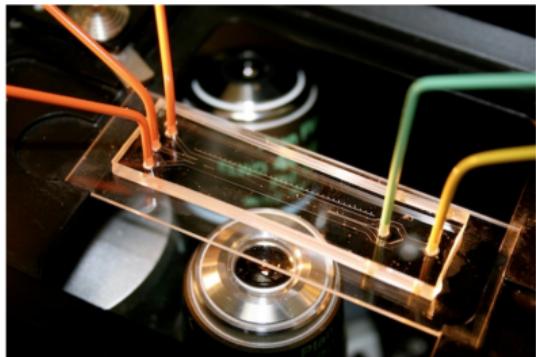


Figura 9: Un dispositivo microfluídico colocado en la platina de un microscopio invertido. Esta configuración permite el seguimiento visual de los fenómenos que ocurren en los microcanales.

Fuente de la figura: Wanucha (2012)

Marco teórico

Microfluidicos: Un diseño simple.

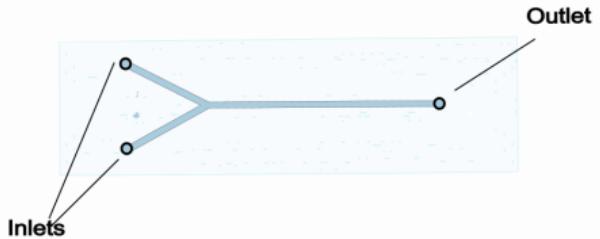


Figura 10: Un diseño tipo Y de dispositivo microfluídico. Con dos entradas y una salida, este diseño es útil para aplicaciones de mezcla de microfluidos.

Marco teórico

Microfluidicos: propiedades



Propiedades de los microfluidicos

- ▶ Capacidad para manejar y manipular pequeñas cantidades de fluidos a escala de micrómetros o inferior.
- ▶ Red de microcanales interconectados.
- ▶ Control preciso del flujo del líquido.
- ▶ Permite un entorno estable para experimentos donde se requiere regulación estricta de temperatura, presión y concentraciones químicas.
- ▶ Proporciona un flujo continuo de fluido y recarga en caso de evaporación o intercambio de fluidos.
- ▶ Fabricación con diversos materiales (silicio, vidrio, PDMS, metales), ofreciendo diversas propiedades físicas.
- ▶ Variedad de diseños para la red de canales.
- ▶ Bajo consumo de muestra.

Marco teórico

La fuerza de Stokes



Para una partícula esférica de radio r que se mueve con una velocidad \mathbf{v} en un fluido de viscosidad dinámica μ , la fuerza de arrastre \mathbf{F}_d es (Pau et al., 1990):

$$\mathbf{F}_d = 6\pi\mu r\mathbf{v}. \quad (5)$$

métodos experimentales

Arreglo experimental

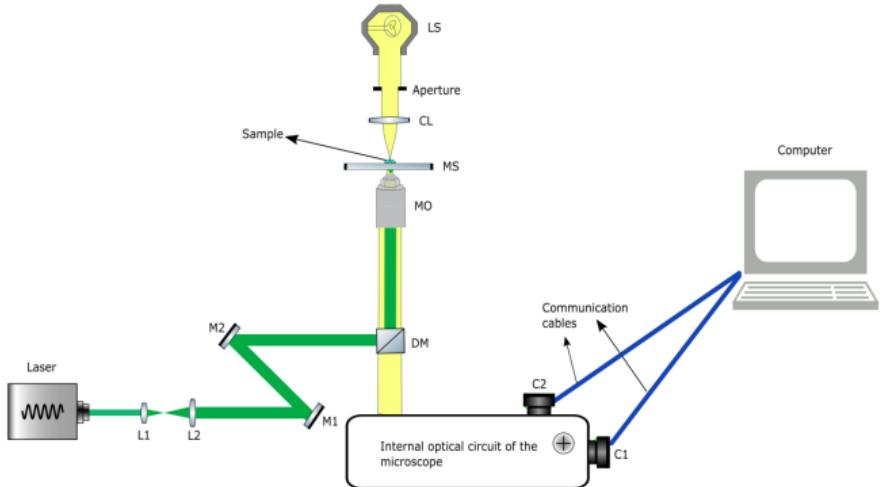


Figura 11: Configuración estándar para pinzas ópticas. Un dispositivo láser facilita la radiación para producir la trampa óptica. L_1 y L_2 son dos lentes positivas. Estas lentes se colocan a una distancia $f_1 + f_2$ entre sí, expandiendo el haz láser para sobrellenar la apertura trasera del objetivo del microscopio (MO). M_1 y M_2 son espejos para alinear el haz láser. La luz láser es reflejada hacia la apertura trasera del objetivo del microscopio (MO) por un espejo dicroíco (DM).

Métodos experimentales

Específicos



métodos experimentales

Muestras



- ▶ Las partículas de SiO_2 artificiales utilizadas ($24,82\mu m$, $19,98\mu m$, $6,59\mu m$, y $4,27\mu m$) estaban contenidas en una suspensión acuosa con concentración de $2,5 \% w/v$.
- ▶ Solución acuosa de células de levadura al $2 \% p/v$ (peso/volumen).
- ▶ Las especies de diatomeas utilizadas son *Nitzschia sp*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Navicula Sp. 12* y *Marine pennada*.

métodos experimentales

Muestras



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 12: Especies de diatomeas estudiadas en este trabajo, fotografiadas con el objetivo de microscopio de inmersión en agua. (a) Multitud de *Nitzschia* sp. (b) muestra de la especie de diatomea *Phaeodactylum tricornutum*. (c) muestra de la especie de diatomea *Thalassiosira pseudonana*. (d) Diatomea *Navicula* Sp. 12. (e) Diatomea *Pennada marina*



métodos experimentales

preparación de muestras

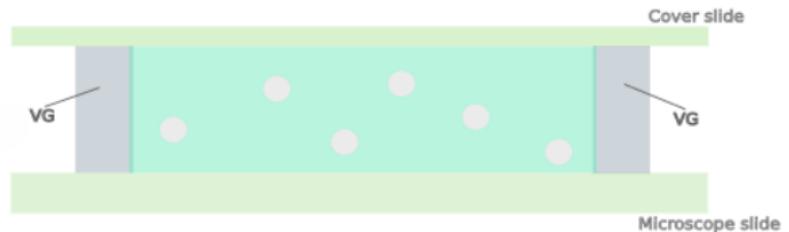


Figura 13: Preparación de la muestra. Una barrera de grasa de vacío (VG) contiene las suspensiones acuosas con las partículas a ser atrapadas entre el cubreobjetos y el portaobjetos.

métodos experimentales

Microfluidicos

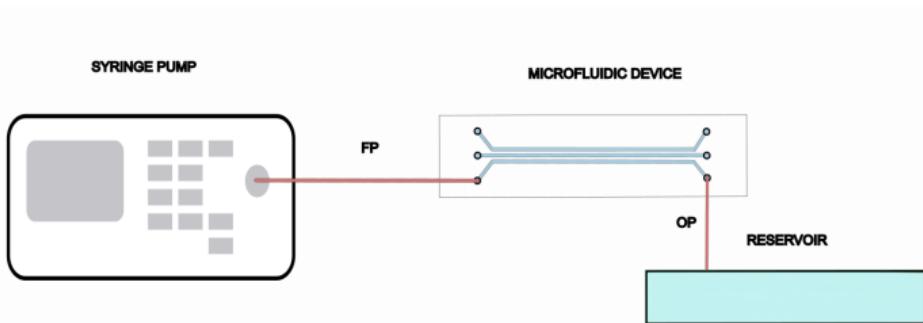


Figura 14: Esquema del sistema microfluídico. La bomba de jeringa controla la velocidad de flujo de la solución que entra al canal a través del tubo de alimentación (FP) integrado en la entrada del canal. Una vez que el fluido alcanza la salida del canal, un tubo de salida (OP) dirige la solución efluente a un reservorio.

Resultados

Manipulacion de partículas de silica.



Figura 15: Atrapamiento de partículas de SiO_2 de $24,82\mu m$. La trampa se produjo con el objetivo de inmersión en agua (MO) y un expansor de haz de 5x (potencia láser establecida en 96 mW).

Resultados

Atrapamiento de células de levadura.

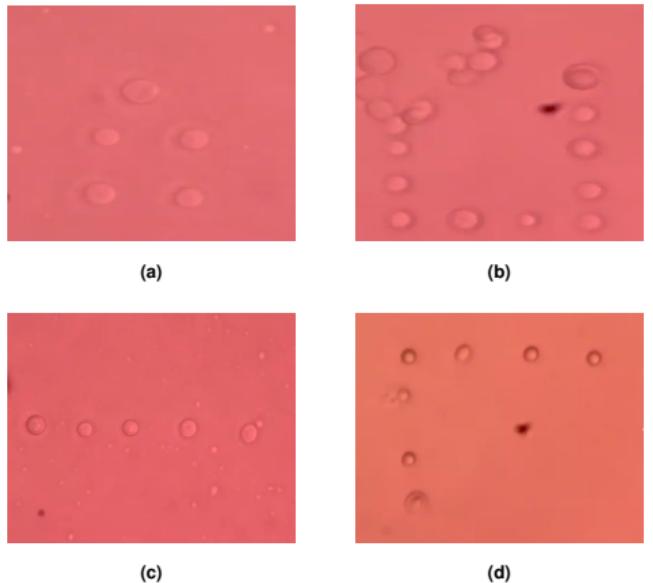
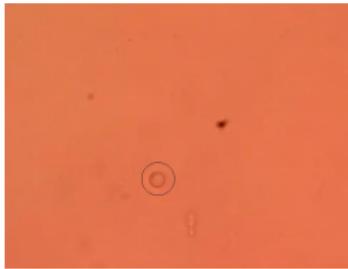


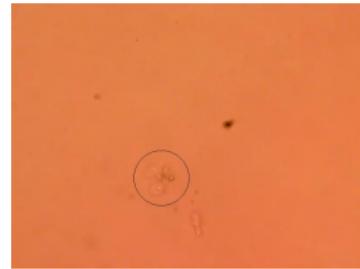
Figura 16: Atrapamiento de partículas de SiO_2 de $4.27 \mu m$. Potencia láser incidente establecida en $53 mW$ llegando a la apertura trasera del objetivo de microscopio de inmersión en agua con un expulsor de haz de $10x$. (a-d) La partícula atrapada (círculo rojo) permanece estacionaria, mientras que las circundantes son movidas con el joystick del controlador del stage.

Resultados

Opticucion de celula de levadura.



(a) Trapped yeast cell with 14 mW



(b) Opticuted yeast cell with 695 mW

Figura 17: Opticucion (dead by light) of a yeast cell with a 10x beam expander, and the water immersion microscope objective.

Resultados

Atrapamiento de diatomeas pennada

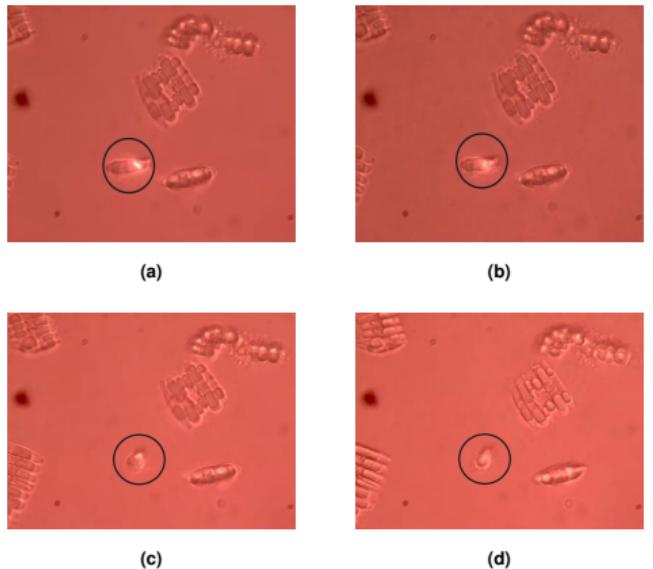


Figura 18: Manipulación de *Nitzschia Sp.1* (pennada) con el objetivo de inmersión en agua (MO) y un expansor de haz de 10x. La potencia láser se estableció en 25 mW. (a-d) Cuadros del video grabado al someter la diatomea al haz láser: (a) Primero, la partícula se encuentra sobre la superficie del portaobjetos con el láser apagado. (b-c) Cuando se enciende el láser, la diatomea comienza a moverse hacia su posición de atrapamiento dentro de las pinzas ópticas (subfigura (d)) debido a la fuerza de gradiente.

Resultados

Atrapamiento de diatomeas pennada

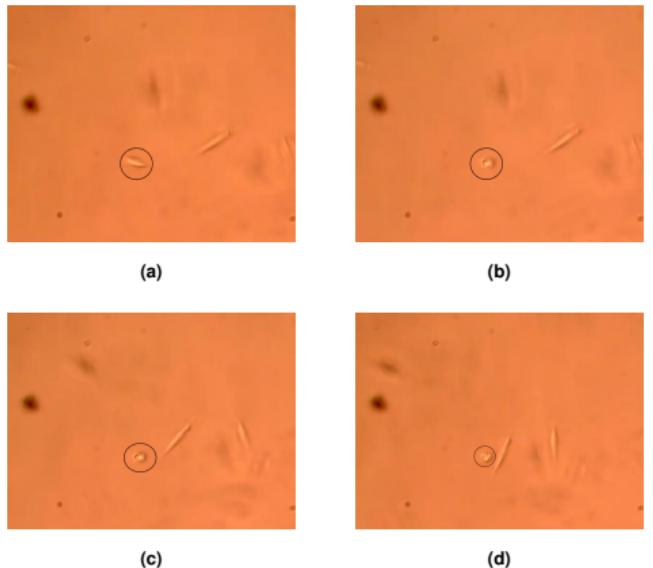


Figura 19: Manipulación de *Nitzschia Sp.1* (pennada) con el objetivo de inmersión en agua (MO) y un expulsor de haz de 10x. La potencia láser se estableció en 25 mW. (a-d) Cuadros del video grabado al someter la diatomea al haz láser: (a) Primero, la partícula se encuentra sobre la superficie del portaobjetos con el láser apagado. (b-c) Cuando se enciende el láser, la diatomea comienza a moverse hacia su posición de atrapamiento dentro de las pinzas ópticas (subfigura (d)) debido a la fuerza de gradiente.



Resultados

Atrapamiento de diatomeas pennada



(a)



(b)



(c)

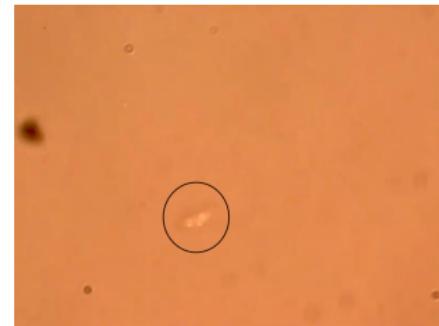
Figura 20: Atrapamiento de *Marine pennata* (pennada) con el objetivo de inmersión en aceite (MO) y un expansor de haz de 2x. La potencia láser se estableció en 232 mW. (a-c) Cuadros ordenados cronológicamente del video grabado del atrapamiento de la diatomea pennada mencionada. (a) La diatomea comienza estando sobre la superficie del portaobjetos cuando el láser está apagado. (b-c) Cuando se enciende el láser, la diatomea se mueve hacia su posición de atrapamiento dentro de las pinzas ópticas debido a la fuerza de gradiente.

Resultados

Atrapamiento de diatomeas pennada



(a)



(b)



(c)

Figura 21: Atrapamiento de *Navicula Sp. 12* con el objetivo de inmersión en agua (MO) (pennada) y un expensor de haz de 10x. La potencia láser se estableció en 31 mW. (a-c) Cuadros ordenados cronológicamente del video grabado del atrapamiento de la diatomea *Navicula Sp. 12*. (a) La diatomea comienza estando sobre la superficie del portaobjetos cuando el láser está apagado. (b-c) Cuando se enciende el láser, la diatomea se mueve hacia su posición de atrapamiento dentro de las pinzas ópticas debido a la fuerza de gradiente.

Resultados

Atrapamiento de diatomea céntrica

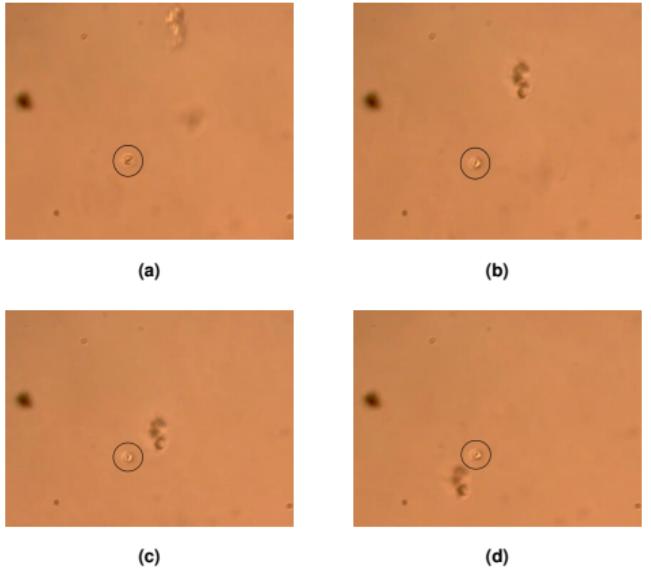
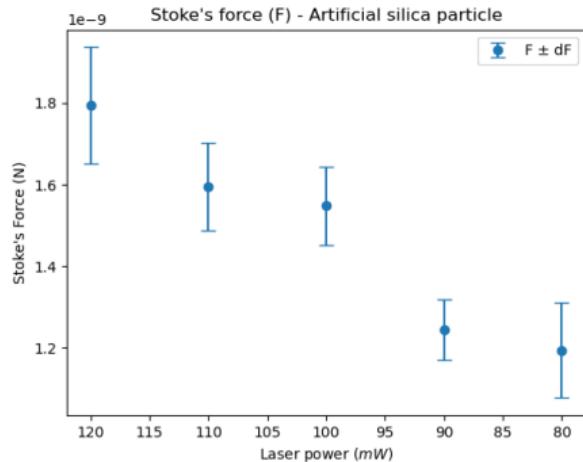


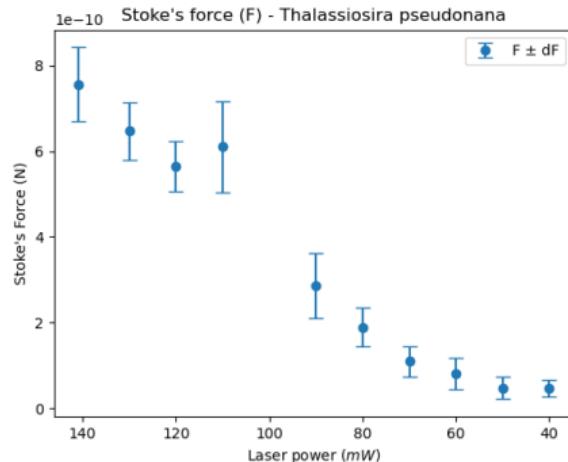
Figura 22: Atrapamiento de *Thalassiosira pseudonana* (céntrica) con el objetivo de inmersión en agua (MO) y un expansor de haz de 10x. La potencia láser se estableció en 11 mW. (a-d) Cuadros del video grabado al someter la diatomea al haz láser: La partícula atrapada permanece inmóvil debido a la acción de la fuerza de gradiente, mientras que las partículas circundantes cambiaron su posición relativa.

Results

Cálculo de fuerza gradiente



(a) Optical tweezers performance for the spherical $6.59 \mu m SiO_2$ particles.



(b) Optical tweezers performance for the *Thalassiosira pseudonana* diatom.

Figura 23: Fuerza de arrastre necesaria para superar la fuerza de gradiente de las pinzas ópticas para (a) partículas esféricas artificiales de sílice y (b) la diatomea *Thalassiosira pseudonana*. El eje vertical representa la fuerza de Stokes para las diferentes potencias láser en el eje horizontal.

Conclusiones



► Primera parte – Manipulación de partículas artificiales:

- ▶ Se usaron partículas de sílice esféricas ($4.25 \mu\text{m}$ y $4.27 \mu\text{m}$) para manipulación 3D.
- ▶ Partículas más grandes ($19.98 \mu\text{m}$ y $24.82 \mu\text{m}$) solo pudieron manipularse en 2D.

Conclusiones



► Segunda parte – Aplicación a organismos biológicos:

- ▶ Manipulación 3D de células de levadura, formando patrones sobre el portaobjetos.
- ▶ Se observó muerte celular inducida por luz (*opticution*).
- ▶ Manipulación de especies de diatomeas: *Nitzchia sp.1*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Navicula Sp.12*, *Marine pennada* y *Thalassiosira pseudonana*.

► Uso de dispositivos microfluídicos:

- ▶ Medición de la velocidad del fluido necesaria para liberar partículas atrapadas.
- ▶ Cálculo de la fuerza de gradiente a partir de la fuerza de Stokes.

Conclusiones



Sobre la fuerza de Stokes y la diferencia entre la fuerza experimental y la teórica.

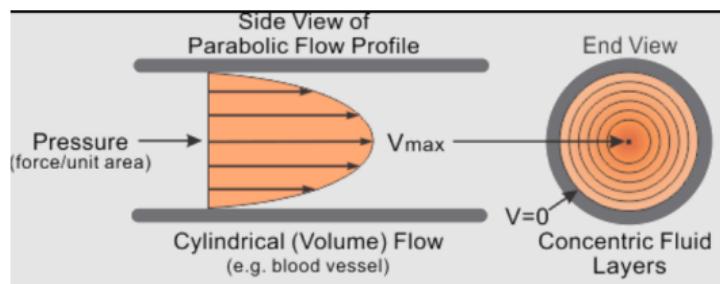


Figura 24: Perfil de velocidad de un fluido

Conclusiones



► Perspectivas futuras:

- ▶ Estudios detallados de células individuales de diatomeas.
- ▶ Comparaciones con distintas longitudes de onda y aumentos.
- ▶ Estudio de reproducción al cambiar el medio durante el atrapamiento.
- ▶ Estudios espectroscópicos del frústulo para analizar su protección frente a luz UV.

