

Pinças Óticas na UFRJ

Nathan Bessa Viana

Convite

Alguns dos leitores que se interessaram pelo título deste artigo possivelmente já ouviram antes o termo "pinça ótica". Outros podem simplesmente ter ficado curiosos o suficiente para irem um pouco além do título procurando compreender o significado dessa combinação curiosa de palavras. Espero que ao final desta leitura ambos se sintam motivados, e também convidados, a fazer uma visita ao Laboratório de Pinças Óticas (LPO), situado no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Lá eles encontrarão uma pinça ótica em plena atividade e poderão ter um contato mais íntimo com ela, se desejarem. O LPO funciona como a porta de entrada para um universo onde biólogos, físicos, matemáticos e engenheiros convivem com os mesmos problemas e tentam resolvê-los buscando as contribuições de diferentes pontos de vista e procurando estabelecer uma linguagem comum. Você pode imaginar a fascinante gama de possibilidades que aparece nesse ambiente multidisciplinar, que acredito ser o principal edifício que estamos construindo. Glioblastomas, astrócitos, otólitos, contraste interferencial, transformada de Fourier, módulo de Young e uma miríade de outros termos (ou instrumentos) compõem a orquestra que tentamos afinar. Espero que possamos nos encontrar em breve...

Um Pouco de História

Os primeiros trabalhos sobre aprisionamento ótico surgiram por volta de 1969, nos laboratórios Bell nos Estados Unidos. O pioneiro no assunto, considerado o pai dessa área é Arthur Ashkin. Após resultados preliminares sobre o uso de lasers para prender objetos, ele e colaboradores propuseram que resultado semelhante poderia ser obtido com átomos [1]. Esse passou a ser o principal alvo de seus trabalhos. Contudo, os progressos no laboratório quase nunca acontecem como se espera. Eles foram levados a desenvolver primeiramente a técnica de aprisionamento ótico de partículas esféricas com diâmetro na faixa de micron e sub-micron. Nas palavras do próprio Ashkin [2]:

“Although the optical tweezers trap was originally designed as an atom trap and was used in the first optical atom trapping experiment, that experiment did not represent the first use of tweezers. During the atom trapping experiment, at a time of temporary difficulty, it was decided to try the tweezers trap on simpler Rayleigh dipole particles such as submicron silica spheres.”

Essa parada estratégica nos estudos com armadilhas de átomos levou ao desenvolvimento de técnicas de micro-manipulação usando luz, hoje popularmente conhecidas como pinças óticas (PO). Desde sua origem a pinça ótica despertou grande interesse principalmente entre os biólogos. Isto porque ela permite a manipulação de objetos micrométricos, inclusive células vivas, e também aplicação e medição de forças na escala de pN (10^{-12} N), escala de força de muitos eventos celulares. Um enorme leque de possibilidades foi então aberto e experimentos envolvendo simples manipulação ou medidas precisas de força na escala celular passaram a ser realizados utilizando a PO.

Pinças Óticas

Para construção de uma PO são necessários basicamente três equipamentos. Um microscópio, ou mais especificamente, uma objetiva de microscópio de grande aumento e grande abertura numérica [3] e um laser com potência da ordem de décimos de watt montados sobre uma mesa estabilizada para filtrar as vibrações mecânicas do ambiente. Na Figura 1 mostramos uma representação esquemática da PO.

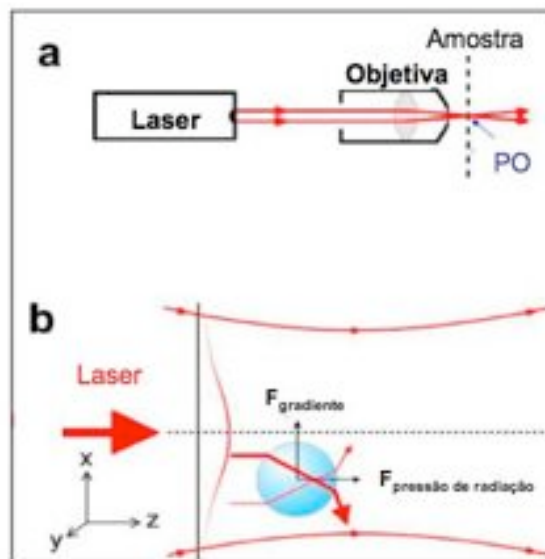


Figura 1: Representação esquemática de uma PO. **a)** Equipamentos utilizados para a construção de uma PO. **b)** Forças óticas atuando numa micro-esfera dielétrica, na região próxima ao foco da objetiva.

Ao passar pela lente as direções dos raios de luz que compõem o feixe são alteradas de modo que todos os raios convergem para o foco da mesma. A interação de cada raio com um objeto dielétrico não absorvente qualquer, na Figura 1 uma micro-esfera com diâmetro na escala de micron, pode ser descrita pelo aparecimento de duas forças óticas, a pressão de radiação e a força de gradiente. Essas forças correspondem à força devido à reflexão e à refração da luz no objeto, respectivamente, quando consideramos objetos grandes comparados com o comprimento de onda da luz. A pressão de radiação empurra a esfera na direção de propagação do feixe e a força de gradiente a mantém próxima ao foco da objetiva. Se na competição entre as duas a força de gradiente vence uma PO é obtida.

No Filme 1 apresentamos imagens de uma micro-esfera de poliestireno com cerca de 4 microns de diâmetro sendo capturada pela pinça. Nós usamos um microscópio Nikon Eclipse TE300 para construir a pinça ótica. Isso porque podemos aproveitar todas as facilidades que ele oferece para produção de boas imagens em grande aumento (no Filme 1 o aumento usado foi de 100X). Esse microscópio é invertido, o que significa que o que observamos é equivalente ao fundo de uma piscina de vidro, que corresponde à nossa amostra. Imagine que o teto da sala onde você se encontra é o fundo de vidro de uma piscina e direcione sua visão a ele. Você vê nesse caso uma imagem semelhante à que é mostrada no Filme 1. O laser está chegando focalizado numa região de cerca de $0.01 \mu\text{m}^2$, cerca de 1000 vezes menor que a área da bolinha observada, no centro da tela. Propositadamente excluímos a imagem do laser do campo de visão. Observe que num determinado momento uma das bolinhas da tela fica parada enquanto as outras se movem. Ela está presa pela PO e estamos deslocando toda a “piscina” para um lado e para outro. No lugar da bolinha poderíamos manipular células, bactérias e protozoários, sem matá-los, onde se percebe a possibilidade de aplicações em biologia celular.

A força com a qual cada objeto pode ser manipulado depende da potência do laser usado. Quanto maior a potência maior a força. Cuidados devem no entanto ser tomados quando a potência utilizada for muito grande. Apesar do laser que usamos, um Nd-YAG (1064 nm) ser pouco absorvido pela água, potências muito altas podem provocar aquecimento da amostra.

Além da manipulação simples de objetos micrométricos a PO também pode ser usada como um sensor de força na escala de pN. Para você ter uma idéia, 1 pN é o peso de uma partícula com um milionésimo da massa de um grão de areia. Tamanha sensibilidade é também um limitante para a pinça ótica. Forças maiores que 500 pN não podem ser aplicadas sem o comprometimento da integridade da amostra por

aquecimento. Para medidas de força nessa escala (nano Newton, 10^{-9} N) o instrumento mais adequado é o microscópio de força atômica.

O LPO da UFRJ

A COPEA (Coordenação de Programas de Estudos Avançados) da UFRJ foi criada em 1994, tendo como objetivo fomentar e desenvolver pesquisas em áreas interdisciplinares de fronteira. Procurando uma área de pesquisa adequada para um laboratório próprio da COPEA, ocorreu a Moyses Nussenzweig, coordenador científico da COPEA, criar um laboratório de pinças óticas. Seu relacionamento com Arthur Ashkin, o inventor das pinças, datava da observação experimental por Ashkin das ressonâncias no espalhamento Mie, e já assistira a uma apresentação de Ashkin sobre as pinças pouco tempo depois da primeira demonstração de seu funcionamento.

Tratava-se de uma área ideal para o propósito, por diversas razões: exigia uma colaboração estreita entre físicos e biólogos; tinha uma excelente relação custo-benefício, pois um investimento relativamente baixo dava acesso a uma área de fronteira recém-estabelecida e altamente promissora; a UFRJ e outras instituições do Rio de Janeiro dispunham da competência necessária em física e biologia para tal.

Nussenzweig divulgou a idéia entre físicos e biólogos. Ela despertou o interesse de Roberto Lent, que se dispôs a oferecer espaço físico para o futuro laboratório no Departamento de Anatomia do ICB/UFRJ, aceitando a proposta inovadora da COPEA de que não pertenceria a nenhum departamento. O Instituto de Física concordou com o local da instalação, dada a necessidade de disponibilizar células vivas para utilização no laboratório.

Lent também convidou Vivaldo Moura Neto a ingressar no Departamento e orientar no futuro laboratório a área de biologia celular, principal aplicação das pinças óticas. Marcos Farina, com sua formação de físico, domínio das microscopias ótica e eletrônica, e interesse em aplicações das pinças, logo passou a participar no projeto.

Com o apoio de Luiz Pinguelli Rosa, coordenador executivo da COPEA, e do reitor Nelson Maculan, foram importados o laser de Nd-YAG e a bancada ótica, elementos essenciais da montagem. A escolha de outro elemento essencial, o microscópio ótico, obedeceu ao critério de maximizar sua versatilidade em termos de diferentes técnicas de observação, permitindo, entre outras, a utilização simultânea de fluorescência e do laser, na configuração mais favorável para utilização como pinça ótica.

Robert Simmons, cujo laboratório de pinças óticas no King's College de Londres tinha sido pioneiro em aplicações fundamentais das pinças, foi convidado pela COPEA como palestrante em 1997 e trouxe importantes contribuições ao projeto do novo laboratório.

No Instituto de Física, participaram da instalação do laser os professores Ricardo Barthem e Cláudio Lenz Cesar. Devido ao atraso no processo de aquisição do microscópio durante o mandato seguinte na reitoria, as pesquisas iniciais concentraram-se na teoria das pinças óticas, visando a desenvolver um método de calibração absoluta. A teoria foi desenvolvida por Paulo Américo Maia Neto e Moyses Nussenzweig, tendo sido objeto da tese de doutoramento de Alexander Mazolli, orientado de Paulo Américo Maia Neto.

Em 1999, a FUJB (Fundação Universitária José Bonifácio) concedeu um auxílio à COPEA que permitiu importar o microscópio Nikon Eclipse TE-300 e acessórios para a montagem da pinça. Na etapa final de montagem do sistema, também colaborou Carlos Lenz Cesar, do Instituto de Física da UNICAMP. Finalmente, o LPO ficou disponível para uso em 2002 (Figuras 2 e 3).

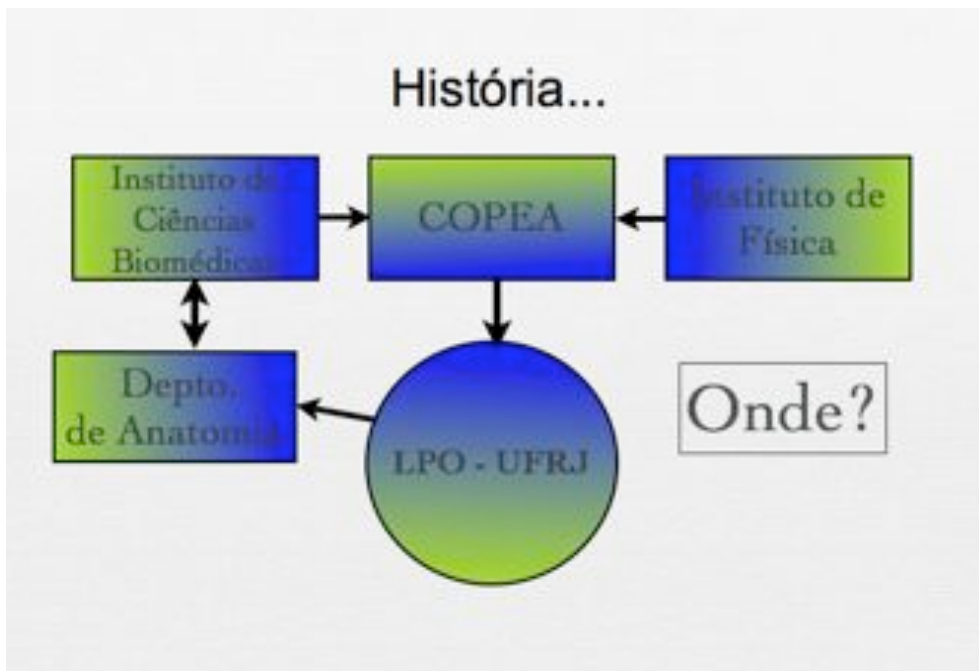


Figura 2 – LPO: o começo.

No final de 2003 juntei-me ao grupo do LPO, à época como pós-doutorando financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O projeto aprovado envolvia o desenvolvimento de atividades referentes à calibração da pinça ótica, testes da teoria desenvolvida no Instituto de Física da UFRJ, e início dos projetos em biologia celular. Além disso, avanços técnicos e melhoria da infra-estrutura do laboratório também eram objetivos desse projeto.

A filosofia de trabalho envolvia a preparação do laboratório para que ele se tornasse uma ferramenta a mais no arsenal dos biólogos para a investigação de seus problemas de interesse. Com esse intuito, a pinça ótica foi mantida funcional e foi desenvolvida, em colaboração com o engenheiro Marcos Antônio de Figueiredo Mendes, uma câmara de atmosfera de CO₂ controlada, acoplada ao microscópio (Figura 3).

Esse sistema permite que células sejam observadas em condições de cultura e vem sendo amplamente usado por professores do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da UFRJ.

Em 2005, o LPO foi incluído em dois projetos de Institutos do Milênio aprovados pelo CNPq: O Instituto do Milênio de Nanotecnologia e o Instituto do Milênio de Avanço Global e Integrado da Matemática Brasileira. Em 2006, foi contemplado pela FAPERJ com um auxílio dentro do programa de Laboratórios Multiusuários do Estado do Rio de Janeiro.

Atualmente, dois alunos de doutorado do programa de pós-graduação do IF da UFRJ, Paula Monteiro e Rafael Dutra, e um aluno de doutorado do programa de pós-graduação em Ciências Morfológicas (PCM), Bruno Pontes, realizam atividades no laboratório. O grupo se reúne às quintas-feiras, no horário de 9:00 horas discutindo artigos recentes da literatura de pinças óticas e biologia celular, bem como os trabalhos desenvolvidos no laboratório. Além disso, colaborações com outros grupos, dentro do país (Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; Instituto de Microbiologia Paulo Góes, UFRJ) e fora do país (Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, NY) também impulsionam as atividades do LPO.



Figura 3 – LPO (COPEA).

Aplicações da PO no LPO

Entre as aplicações da PO que estão sendo desenvolvidas no LPO destacamos:

- 1) Teste da teoria de aprisionamento ótico [4, 5] desenvolvida pelo grupo de físicos teóricos do LPO, professores do Instituto de Física da UFRJ. Medimos a constante de força da PO para micro-esferas de poliestireno com diferentes valores de raios e comparamos os resultados com os valores previstos pela teoria [3, 6] (Figura 4). A constante de força de uma PO é o parâmetro que relaciona deslocamentos da micro-esfera presa na PO com a força ótica atuando sobre ela, como num sistema massa-mola de uma balança de molas de um feirante.

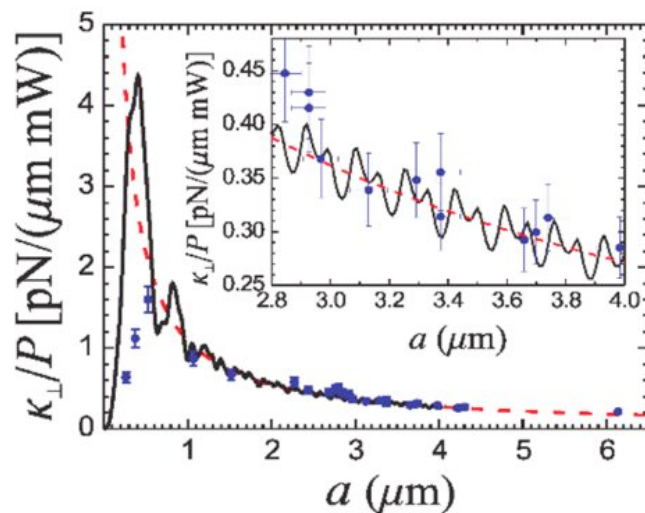


Figura 4 - Constante de força da pinça ótica para diferentes micro-esferas de poliestireno.

- 2) Medida de propriedades elásticas de membrana e citoesqueleto celulares de Glioblastomas, Astrócitos, Fibroblastos e Neurônios [7], projeto de doutorado do aluno Bruno Pontes. Na Figura 5 mostramos uma representação esquemática do experimento que realizamos com as células. Através de medidas de Força X deformação (Figura 6) das células determinamos propriedades elásticas de suas membranas e citoesqueletos.

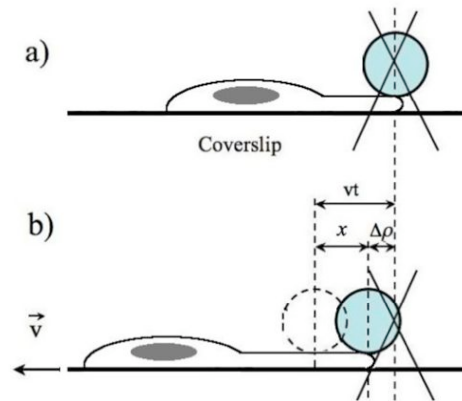


Figura 5 – Representação esquemática dos experimentos que realizamos com as células para determinação de suas propriedades elásticas.

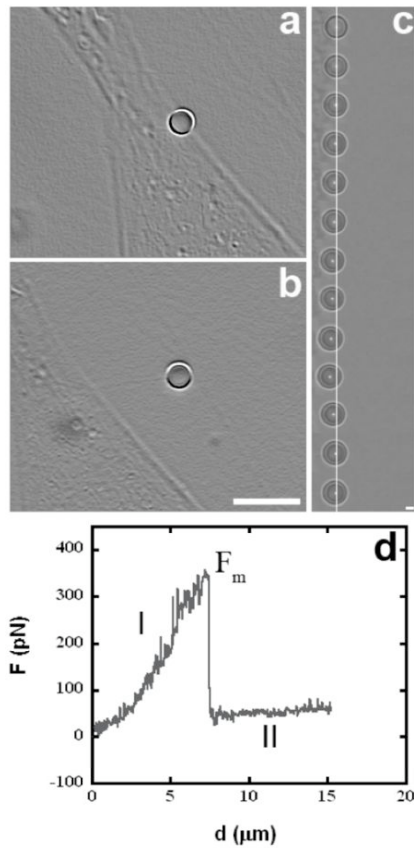


Figura 6 – **a)** Imagem de uma micro-esfera de poliestireno de $3 \mu\text{m}$ de diâmetro no início do experimento. **b)** Imagem da micro-esfera ligada a um filamento de membrana (amarra) que foi extraído da célula, barra de escala igual a $10 \mu\text{m}$. **c)** Seqüência de imagens representativas de todo o experimento. **d)** Curva de força de todo o processo para a extração de uma amarra.

- 3) Medida de viscosidade de soluções de polissacarídeos. Utilizamos a pinça ótica para avaliarmos viscosidades de soluções de polissacarídeos como ferramenta de caracterização das propriedades físicas das mesmas. Esse método foi utilizado no estudo da formação da cápsula do fungo *Cryptococcus neoformans* [8, 9] e na interação de um alginato da alga *Padina gymnospora* [10] com um composto fenólico também produzido por ela.
- 4) Além de análises quantitativas de forças e deslocamentos e a caracterização de propriedades físicas de amostras biológicas, usamos a infra-estrutura do laboratório na filmagem de células em filmes de “time-lapsing” para caracterização do comportamento celular em cultura. No Filme 2 mostramos células da linhagem U87, uma linhagem de glioblastoma humano, em 12 horas de cultura, observadas em contraste de fase e aumento de 10X. Inicialmente, logo após soltas da garrafa de cultura, as células estão na forma esférica, ao cabo de 12 horas elas já estão todas aderidas, podemos ver inclusive divisões celulares. O filme está acelerado, o intervalo entre uma imagem e outra corresponde a um tempo real de 2 minutos.

Considerações Finais

Espero que esta pequena conversa tenha despertado em você o interesse pelos assuntos nos quais o LPO está se envolvendo. O laboratório está de portas abertas para visitantes interessados em conhecer um pouco mais a fundo os nossos projetos, ou apenas curiosos em conhecer um pouco melhor o universo que o envolve. Aguardamos sua visita na sala F1-021 do bloco F do Centro de Ciências da Saúde – UFRJ, no departamento de Anatomia. Até lá...

Referências

- [1] A. Ashkin, *Physical Review Letters*, **24**, 156 (1970).
- [2] A. Ashkin, *Proceedings of the National Academy of Science- USA*, **94**, 4853 (1997).
- [3] N. B. Viana *et al.*, *Applied Physics Letters*, **88**, 131110 (2006).
- [4] P. A. Maia Neto *et al.*, *Europhysics Letters*, **50**(5), 702 (2000).
- [5] A. Mazolli *et al.*, *Proceedings of Royal Society of London. Mathematical and Physical Sciences*, **459**, 3021 (2003).
- [6] N. B. Viana *et al.*, *Physical Review E*, **75**, 021914 (2007).
- [7] B. Pontes *et al.*, *European Biophysics Journal*, **37**(2), 121 (2008).
- [8] L. Nimrichter *et al.*, *Eukaryotic Cell*, **6**(8), 1400 (2007).
- [9] S. Frases *et al.*, *Eukaryotic Cell*, **7**(2), 319 (2008).
- [10] L. T. Salgado *et al.*, *Journal of Phycology*, no prelo.