

# ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

## FACULTAD DE CIENCIAS

### “IMPLEMENTACIÓN Y PRUEBA DE UNA PINZA ÓPTICA PARA CAPTURA Y MANIPULACIÓN DE MICROPARTÍCULAS”

TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICA

#### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

EUGENIA ELIZABETH SAMANIEGO ONOFRE  
[eugenia.samaniego@epn.edu.ec](mailto:eugenia.samaniego@epn.edu.ec)

DIRECTOR: ESTEBAN FELIPE IRRIBARRA CAZAR, Ph.D.  
[esteban.irribarra@epn.edu.ec](mailto:esteban.irribarra@epn.edu.ec)

CODIRECTOR: CÉSAR AUGUSTO COSTA VERA, Ph.D.  
[cesar.costa@epn.edu.ec](mailto:cesar.costa@epn.edu.ec)

Quito, Julio 2020

## **DECLARACIÓN**

Yo Eugenia Elizabeth Samaniego Onofre, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual, correspondientes a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

---

Eugenia Elizabeth Samaniego Onofre

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por EUGENIA ELIZABETH SAMANIEGO ONOFRE, bajo mi supervisión.

---

Dr. Esteban Iribarra

Director

---

Dr. César Augusto Costa Vera

Codirector

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional a lo largo de estos años. A mi mamá Carmen, por su infinito amor y consuelo al secar mis lágrimas en esta travesía y nunca permitir que me rinda. A mis hermanos Manuel y Julio por ser como mis padres desde el día en que nací.

A mi director de tesis, el Dr. Esteban Iribarra y sobre todo a mi codirector el Dr. César Costa Vera, por su guía, consejos y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Kimani Toussaint, de la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign por ponerme en contacto con el Dr. Qing Ding, a quien también agradezco por sus valiosos consejos en el inicio de este trabajo.

Al Dr. Giovanni Volpe, de la Universidad de Gothenburg, Suecia por sus recomendaciones y por proveerme de las herramientas necesarias para el desarrollo de esta tesis.

A mis profesores de la Escuela Politécnica Nacional y amigos del Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy Group (MSOS) por haberme compartido sus conocimientos y brindado su ayuda en todo este proceso, especialmente a Víctor Santos, Juan Molina, Ernesto Camacho, Jessica Cuesta.

A mis amigas Paola, Daniela y principalmente a May por tantos años de amistad en los que hemos compartido tantos momentos.

## **DEDICATORIA**

Especialmente a mi mamá que ha sido verdadero ejemplo de mujer, madre y profesional. Por ser el pilar más fuerte que ha sacado adelante a su familia.

A mis hermanos Manuel y Julio por su cuidado y cariño.

A mis sobrinitas Antonella, Damara, Samantha y Kamila, a quienes amo mucho y siempre alentaré a que logren cada meta que se propongan.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
ÍNDICE DE TABLAS .....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	12
2.1 Aproximación de óptica geométrica.....	12
2.1.1 Rayos ópticos .....	13
2.1.2 Fuerzas ópticas.....	15
2.1.2.1 Fuerza de dispersión .....	18
2.1.2.2 Fuerza de gradiente .....	18
2.1.3 Pinzas ópticas.....	19
2.2 Adquisición de datos y calibración de pinza óptica.....	20
2.2.1 Microscopía de video digital (DVM).....	22
2.2.2 Análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD).....	24
2.2.3 Análisis de función de autocorrelación (ACF) .....	25
3. METODOLOGÍA .....	27
3.1 Montaje de la pinza óptica.....	27
3.1.1 Elementos.....	28
3.1.2 Construcción de la pinza óptica .....	31
3.1.3 Alineación del haz del láser .....	35
3.2 Preparación de muestras .....	36
3.3 Algoritmo para pinzas ópticas .....	38
3.3.1 Algoritmo para adquisición y preprocesamiento de videos .....	39
3.3.2 Algoritmo para microscopía de video digital (DVM) .....	43
3.3.3 Algoritmo para análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD) .....	46
3.3.4 Algoritmo para análisis de función de autocorrelación (ACF) ...	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
4.1. Prueba de Captura.....	48

4.2. Prueba de Manipulación.....	51
4.3. Estimación de Costos.....	54
5. CONCLUSIONES .....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	67
Anexo 1 .....	67
Código para el preprocesamiento de los registros en video .....	67
Anexo 2 .....	68
Código para el cálculo de la trayectoria de la partícula atrapada con el método de microscopía de video digital DVM .....	68
Anexo 3 .....	69
Código para el cálculo de la rigidez de la pinza mediante el análisis de desplazamiento cuadrático medio MSD.....	69
Código para el cálculo de la rigidez de la pinza mediante el análisis de función de autocorrelación ACF .....	70
Anexo 4 .....	71
Cálculo de errores de $kx$ para cada muestra en los métodos MSD y ACF en la prueba de captura .....	71
Anexo 5 .....	76
Cálculo de la velocidad de las partículas por acción de la pinza óptica en la prueba de manipulación .....	76
Anexo 6 .....	76
Manual de uso de pinza óptica .....	76

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Ecuaciones de Fresnel para luz polarizada tipo s y p [1].	14
Tabla 3.1 Elementos usados en la sección a) del sistema de pinza óptica: Sistema de Expansión Láser	28
Tabla 3.2 Elementos usados en la sección b) del sistema de pinza óptica: Sistema de Enfoque y Observación	29
Tabla 3.3 Propiedades de la cámara monocromática CMOS DMM 37UX273-ML [37]	41
Tabla 4.1 Valores de $kx$ obtenidos con los métodos MSD y ACF para una muestra en agua desionizada	48
Tabla 4.2 Valores de $kx$ obtenidos con los métodos MSD y ACF para una muestra en solución de NaCl	49
Tabla 4.3 Referencia de elementos usados en sistemas de pinza óptica de la EPN, INAOE y MIT	55
Tabla 4.4 Lista de precios de los elementos detallados para pinza óptica de la EPN	56
Tabla 4.5 Lista de precios de los elementos detallados para pinza óptica del INAOE	57
Tabla 4.6 Lista de precios de los elementos detallados para pinza óptica del MIT	58



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Reflexión y transmisión de un rayo de luz en una interfaz plana. (a) Rayo polarizado tipo-s. (b) Rayo polarizado tipo-p (Tomado de [1]).	13
Figura 2.2 Múltiple dispersión de un rayo de luz en una esfera dieléctrica en el plano de incidencia (Tomado de [1]).	17
Figura 2.3 Acción de la fuerza de gradiente sobre una micro esfera dieléctrica (A) Rayos ópticos de un haz de luz difractados dentro de la esfera. (B) Cambio de momento en la esfera.	19
Figura 2.4 Cuadro de técnicas para adquisición de datos y calibración de pinzas ópticas.	21
Figura 2.5 MSD de una partícula de poliestireno (radio=1.03 $\mu\text{m}$ ) atrapada a diferentes valores de potencia de haz láser (2.3, 6.0, 10.8 mW) (Tomado de [1]).	24
Figura 2.6 ACF de una partícula de poliestireno (radio=1.03 $\mu\text{m}$ ) atrapada a diferentes valores de potencia de haz láser (2.3, 6.0, 10.8 mW) (Tomado de [1]).	26
Figura 3.1 Esquema de pinza óptica invertida (a) sistema de expansión, (b) sistema de enfoque y observación.	31
Figura 3.2 Sistema de pinza óptica implementada en el Laboratorio de Espectroscopía Óptica de la EPN (a) sistema de expansión, (b) sistema de enfoque y observación.	33
Figura 3.3 Sección (b) de enfoque y observación del sistema de pinza óptica.	34
Figura 3.4 Punto de impacto del láser en el centro de la placa de alineación del sistema de pinza óptica (Ver Tabla 3.1 elemento 12). La placa se sostiene de las barras estructurales.	36
Figura 3.5 Solución de micropartículas de poliestireno a) solución madre, b) soluciones diluidas de la solución madre.	37
Figura 3.6 Flujograma del archivo de programa creado para el cálculo de la rigidez de la pinza óptica implementada.	39
Figura 3.7 Ejemplos de imágenes tomadas en la adquisición de videos a) imagen de fondo, b) imagen de referencia.	40
Figura 3.8 Flujograma del pre procesamiento de los archivos de video.	42
Figura 3.9 Flujograma del Tracking del DVM.	44
Figura 3.10 Flujograma del Tracing del DVM.	45
Figura 3.11 Flujograma para la creación del archivo con la información obtenida en Tracing.	45
Figura 3.12 Flujograma del análisis MSD.	46
Figura 3.13 Flujograma del análisis ACF.	47
Figura 4.1 Curvas de ajuste de los métodos MSD (izquierda) y ACF (derecha) para la muestra en agua desionizada. Se observa que las partículas alcanzan el régimen de largo tiempo rápidamente luego del primer ms.	48
Figura 4.2 Curvas de ajuste de los métodos MSD (izquierda) y ACF (derecha) para la muestra en solución de NaCl. Las partículas alcanzan aparentemente más rápidamente el régimen de límite en esta solución. También, el grado de fluctuación alrededor del valor asintótico es menor que la Figura 4.1.	49

Figura 4.3 Sistema de referencia de partículas fijas tomado para indicar el desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en agua desionizada, atrapada con la pinza óptica .....	52
Figura 4.4 Sistema de referencia de partículas fijas tomado para indicar el desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en solución de NaCl, atrapada con la pinza óptica.....	52
Figura 4.5 Desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en agua desionizada, atrapada con la pinza óptica.....	53
Figura 4.6 Desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en solución de NaCl, atrapada con la pinza óptica.....	53
Figura 4.7 Pinza óptica del INAOE usada para la medición de la constante elástica $k$ en un sistema de pinzas ópticas usando el método de densidad espectral de potencia (Tomado de [4]). .....	59
Figura 4.8 Pinza óptica del MIT usada para medir el movimiento browniano de una microesfera de sílice atrapada en solución acuosa (Tomado de [45])......	59

# RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Espectroscopía Óptica y Espectrometría de Masas del Departamento de Física de la Escuela Politécnica Nacional. La motivación de este proyecto fue diseñar e implementar, por primera vez en el Ecuador, un sistema de pinza óptica de costo competitivo en relación a otros sistemas ópticos de gran complejidad que existen en la actualidad.

El sistema de pinza óptica ensamblado está formado por dos secciones: sistema de expansión láser y sistema de enfoque y observación. En este diseño se empleó un láser de 658 nm de longitud de onda para trabajar en regímenes de luz visible o infrarrojo que permiten atrapar objetos a escalas micrométricas. Esto se hace para cumplir la condición de confinamiento de una trampa óptica, en la que el radio de las partículas debe ser mucho mayor a la longitud de onda del láser usado ( $R \gg \lambda$ ). Además, al trabajar en este rango de luz se minimizan las posibilidades de dañar muestras biológicas.

De igual forma, se usó una cámara con sensor CMOS (tecnología de semiconductor complementario de óxido metálico) para registrar en video la captura y manipulación de micropartículas de poliestireno. Esta elección se realizó para aplicar el método de microscopía de video digital (DVM) en el seguimiento de la posición de las partículas atrapadas manteniendo un diseño de bajo costo.

Se demostró con éxito la captura y manipulación de micropartículas de poliestireno y se caracterizó la funcionalidad del sistema estimando la rigidez con la que la pinza atrapa y mueve partículas. Para el cálculo de este parámetro físico se usaron técnicas de calibración pasivas para pinzas ópticas. Entre dichas técnicas, debido a que requieren menor cantidad de datos de entrada, se utilizaron: el análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD) y el análisis de función de autocorrelación (ACF). Para el sistema probado se encontraron rigideces de 105,708 y 85,918 fN/nm para partículas en agua y en solución salina, respectivamente. La

diferencia se puede atribuir a diferentes viscosidades de las soluciones empleadas. Esos valores están en buen acuerdo con otros reportados en la literatura.

## **ABSTRACT**

This research work was developed in the Laboratory of Optical Spectroscopy and Mass Spectrometry of the Physics Department of the National Polytechnic School. The motivation of this project was to design and implement, for the first time in Ecuador, a competitively priced optical tweezers system in relation to other highly complex optical systems that currently exist.

The assembled optical tweezers system consists of two sections: laser expansion system and focus and observation system. In this design, a 658nm wavelength laser was used to work in visible or infrared light regimes that allow objects to be trapped at micrometer scales. This is done to meet the confinement condition of an optical trap, in which the radius of the particles must be much greater than the wavelength of the laser used ( $R \gg \lambda$ ). Furthermore, working in this light range minimizes the chances of damaging biological samples.

Similarly, a camera with a CMOS sensor (complementary metal oxide semiconductor technology) was used to record the capture and manipulation of polystyrene microparticles on video. This choice was made to apply the digital video microscopy (DVM) method in tracking the position of the trapped particles while maintaining a low-cost design.

The capture and manipulation of polystyrene microparticles was successfully demonstrated and the functionality of the system was characterized by estimating the stiffness with which the clamp catches and moves particles. Passive calibration techniques for optical tweezers were used to calculate this physical parameter. Among these techniques, because they require less input data, the following were used: the analysis of the root mean square displacement (MSD) and the analysis of the autocorrelation function (ACF). For the tested system, stiffnesses of 105,708 and 85,918 fN / nm were found for particles in water and in saline, respectively. The

difference can be attributed to different viscosities of the solutions used. Those values are in good agreement with others reported in the literature.

# 1. INTRODUCCIÓN

En ciencias y disciplinas como la Física, Química, Biología Molecular, Biotecnología, entre otras, es tradicional caracterizar los sistemas que contienen un gran número de partículas estadísticamente, con énfasis en el promedio y las medidas de dispersión. Este tipo de caracterización no permite conocer a profundidad el funcionamiento de cada partícula, las interacciones que se puedan establecer entre ellas, o simplemente, su comportamiento al desviarlas de su trayectoria establecida. Por lo tanto, utilizar métodos que permitan abordar el estudio individual de partículas es actualmente de gran interés.

La luz tiene capacidad de ejercer fuerzas mecánicas sobre objetos materiales, como lo descubrió Johannes Kepler desde 1619 [1], [2]. Estas fuerzas son extremadamente pequeñas y solamente gracias a la invención del láser se ha podido concentrar suficiente potencia óptica en un área muy pequeña para que sean evidentes en el mundo microscópico [1]. Para aprovechar esta particularidad de la luz en el estudio de sistemas microscópicos se han desarrollado diversas técnicas de manipulación óptica.

La pinza óptica fue introducida en 1970 por Arthur Ashkin (premio Nobel de Física 2018) [3] como una herramienta no invasiva para la captura, control y estudio de micro y nano partículas individuales. En su primer experimento con dos haces de luz, Ashkin encontró que además de la presión de radiación para acelerar las partículas en la dirección de propagación del láser, se ejercía una fuerza que atraía a las partículas hacia la parte más intensa del haz de luz [3], [4]. Años más tarde, Ashkin y sus colaboradores desarrollaron una pinza óptica más estable con un solo haz de luz [5].

Con esta técnica desarrollada por Ashkin es posible aplicar y medir fuerzas en el rango de los picoNewton (pN) sobre partículas o muestras biológicas [6], [7]. Además, se utiliza para la medición de desplazamientos en el orden de los nanómetros. Así mismo, es posible estudiar el funcionamiento de motores celulares y las propiedades físicas de cadenas de ADN [8], [9]. De manera general, las

distintas configuraciones han posibilitado un amplio rango de aplicaciones entre las cuales se tiene: el estudio de propiedades individuales de virus, bacterias [10], [11], manipulación y control de átomos, coloides, la construcción de nano-estructuras [12], la fertilización in-vitro sin contacto directo con la muestra, análisis de movilidad de espermatozoides, entre otras [7], [13].

En la actualidad, existen muchos sistemas de pinza óptica de gran complejidad y costo [14]. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es implementar un sistema de pinza óptica utilizando elementos comunes y de bajo costo de un laboratorio de óptica. Cabe mencionar que este sistema es el primero que se ha introducido en el Ecuador. Este desarrollo permitirá realizar investigaciones futuras acerca de las fuerzas de interacción entre la luz y otros tipos de sistemas de partículas.

El presente trabajo de investigación se comprende de dos partes: 1) montaje y prueba de un sistema de pinza óptica y, 2) adquisición de datos y calibración de la pinza. En la primera parte, se implementó el sistema utilizando elementos ópticos provistos por el laboratorio de Espectroscopía Óptica y Espectrometría de Masas de la EPN. Dicho sistema tiene las dos secciones ópticas siguientes: A) sistema de expansión láser y B) sistema de enfoque y observación. La función de la sección A es alinear, colimar y expandir el haz del láser aproximadamente 4 veces para obtener un haz con tamaño adecuado para sobrellenar la abertura posterior de un objetivo de microscopio. En la sección B se implementó un sistema de microscopio de enfoque invertido basado en un objetivo con alta apertura numérica. Este microscopio se combina con un sistema de observación usando un divisor de haz, un filtro, un lente y una cámara CMOS. Gracias a la alta velocidad de registro de esta cámara se pueden tener varias funciones como control de luminosidad, corrector de contraste, o un conversor analógico-digital.

Una vez montado el sistema se realizaron pruebas para su funcionamiento con micropartículas de poliestireno. Estas pruebas consistieron en obtener registros de video de la captura y manipulación de las partículas con el láser enfocado en una muestra líquida delimitada entre dos placas de vidrio. En los videos obtenidos se pudo seguir la posición de las partículas fotograma por fotograma. Esta técnica se

conoce como microscopía de video digital (DVM). Una vez conocida la trayectoria de una partícula atrapada se obtuvo el valor aproximado de la rigidez (elástica) de la trampa ( $k$ ), mediante el análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD). Para controlar la calidad de los datos obtenidos se usó el análisis de función de autocorrelación (ACF). Para estos cálculos se usaron librerías para pinzas ópticas de uso gratuito desarrolladas en MatLab (OTS) [1].

Este documento está organizado de la forma que se describe a continuación.

En el capítulo 2 se desarrolla el fundamento teórico, enfatizando rayos y fuerzas ópticas. Se hace especial énfasis en las fuerzas de dispersión y de gradiente que en conjunto permiten explicar la física de la pinza óptica. También, se discuten las técnicas de adquisición de datos y calibración de pinza óptica escogidas para nuestro sistema.

En el capítulo 3 se describe la metodología empleada para el montaje paso a paso de la pinza óptica, los elementos usados, la calibración del sistema y la preparación de muestras. También, se explica el preprocesamiento que se realizó a los registros en video obtenidos, necesario para permitir el análisis con el software para DVM, MSD y ACF.

Finalmente, la presentación de los resultados obtenidos se realiza en la sección de Resultados y Discusión, capítulo 4. En este capítulo se muestra el análisis y modelación necesario para determinar la rigidez aproximada que tiene la pinza óptica para atrapar las partículas, en función de la potencia del haz láser enfocado. Para esto se analiza en detalle la manipulación de una partícula capturada al desplazarla de un punto a otro contra el fondo del medio y de otras partículas presentes no atrapadas que sirven de testigo.



## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

El objetivo principal de este trabajo es diseñar, montar y probar una pinza óptica determinando las condiciones óptimas de captura y manipulación de micropartículas. Para comprender la física detrás de la pinza óptica es necesario introducir los conceptos de rayos ópticos, fuerzas ópticas de dispersión y de gradiente. También, es necesario conocer detalladamente las técnicas de adquisición de datos y de calibración que se aplican para trabajar con dichas pinzas

### 2.1 Aproximación de óptica geométrica

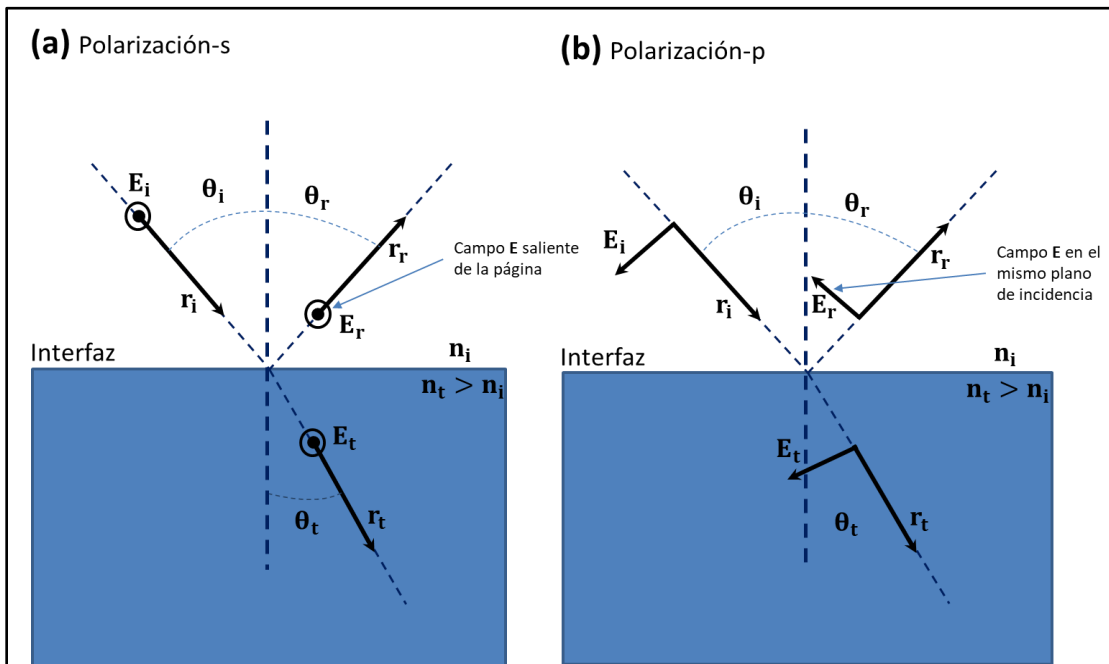
Generalmente, las fuerzas de captura óptica de partículas se entienden con el uso de aproximaciones adecuadas. El rango de validez de estas aproximaciones depende usualmente del tamaño de la partícula a atrapar. Si el tamaño de la partícula es mucho mayor a la longitud de onda de la luz entonces se habla de una aproximación de óptica geométrica (*GO*-de Geometrical Optics) [15]; si es mucho menor, se usa una aproximación dipolo o de Rayleigh (*DA*-de Dipole Approximation) [5]. Por otro lado, si el tamaño de la partícula es comparable con la longitud de onda de la luz es necesario un modelado ondulatorio completo de la interacción luz-partícula para el cálculo de las fuerzas de captura [16]. En la generalidad de los casos, cuando se manipulan objetos complejos como partículas no esféricas o no homogéneas, se deben usar cálculos electromagnéticos complejos para tener predicciones precisas [17].

Cuando se trabaja con las aproximaciones *GO* y *DA* se pueden realizar simplificaciones considerables en el cálculo de la fuerza ejercida por las pinzas. Como se indicó en el párrafo anterior, la aproximación *GO* es válida cuando  $R \gg \lambda$ , donde  $R$  es el radio de la partícula y  $\lambda$  la longitud de onda del haz láser, y su precisión aumenta a medida que crece el parámetro de tamaño  $R$ . En consecuencia, esta aproximación es útil para partículas grandes y en esta, se considera al rayo láser como una colección de rayos de luz [15]. La aproximación *DA* se cumple cuando  $R \ll \lambda$ , y en este caso, la partícula se aproxima como un dipolo eléctrico oscilante y los campos electromagnéticos se consideran homogéneos dentro de la partícula [5].

En este trabajo se emplearon micropartículas de poliestireno de radio  $R=1.3 \mu\text{m}$ , y un láser en el espectro visible con  $\lambda=658 \text{ nm}$ . De acuerdo con lo explicado, podemos entonces usar la aproximación GO.

## 2.1.1 Rayos ópticos

En la óptica geométrica, si un rayo de luz incide sobre una superficie plana que separa dos medios con índices de refracción diferentes, entonces parte del rayo se refleja y parte se transmite, como se muestra en la Figura 2.1 [18].



**Figura 2.1** Reflexión y transmisión de un rayo de luz en una interfaz plana. (a) Rayo polarizado tipo-s. (b) Rayo polarizado tipo-p (Tomado de [1]).

Consideraremos que  $r_i$  es el rayo incidente,  $r_r$  es el rayo reflejado,  $r_t$  es el rayo transmitido,  $n_i$  es el índice de refracción del medio en donde se propaga  $r_i$ ,  $n_t$  es el índice del medio de transmisión. También,  $\theta_i$  es el ángulo de incidencia formado entre  $r_i$  y la línea normal a la superficie  $n$  y  $\theta_r$  el ángulo de reflexión, medido de la misma forma. Es importante recalcar que los rayos  $r_r$  y  $r_t$  están en el mismo plano de incidencia que además contiene a  $r_i$  y  $n$  [18].

La Ley de la Reflexión en óptica establece que:

$$\theta_i = \theta_r \quad (2.1)$$

Aplicando la Ley de Snell, ecuación 2.2,

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t \quad (2.2)$$

podemos obtener el ángulo de transmisión  $\theta_t$ .

Por el principio de conservación de energía se tiene que la potencia del rayo incidente  $P_i$  será igual a la suma de la potencia de los rayos reflejado  $P_r$  y transmitido  $P_t$  (ecuación 2.3). Para calcular la relación entre la potencia de estos rayos se pueden utilizar las leyes de Maxwell y las relaciones de continuidad a través de una interfase de las componentes tangenciales de los campos eléctricos y magnéticos [19].

$$P_i = P_r + P_t \quad (2.3)$$

Las ecuaciones de Fresnel expresan los coeficientes de reflexión y transmisión como función de la polarización del rayo incidente [19]. Se diferencian dos tipos de polarizaciones, polarización tipo s y tipo p. La polarización tipo s corresponde a la luz cuyo vector de campo eléctrico es normal al plano de incidencia, Figura 2.1a. La polarización tipo p es la luz cuyo vector de campo eléctrico está incluido en el plano de incidencia, Figura 2.1b [1]. Los coeficientes de reflexión y transmisión por cada tipo de polarización se pueden ver en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Ecuaciones de Fresnel para luz polarizada tipo s y p [1].

	<b>Luz polarizada tipo-s</b>	<b>Luz polarizada tipo-p</b>
<b>Coefficiente de reflexión de intensidad</b>	$R_s = \left  \frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \right ^2 \quad (2.4)$	$R_p = \left  \frac{n_i \cos \theta_t - n_t \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \right ^2 \quad (2.5)$
<b>Coefficiente de transmisión de intensidad</b>	$T_s = \frac{4n_i n_t \cos \theta_i \cos \theta_t}{ n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t ^2} \quad (2.6)$	$T_p = \frac{4n_i n_t \cos \theta_i \cos \theta_t}{ n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i ^2} \quad (2.7)$

Al sumar las ecuaciones 2.4 con 2.6 y 2.5 con 2.7, se obtiene 1, lo que es una constatación de la conservación de energía que se había mencionado (ecuación 2.3) [19]. Si se tiene luz no polarizada o polarizada circularmente se puede usar el promedio de los coeficientes, tanto para reflexión como para transmisión [18].

Es importante notar que si la luz pasa de un medio con un índice de refracción más bajo a un medio con un índice más alto, siempre habrá transmisión [18]. Esto es especialmente relevante en una pinza óptica, por ejemplo, en la captura óptica de una partícula de poliestireno cuando el haz láser se transmite del medio externo a la parte interior de la partícula [3]. Generalmente, las partículas de poliestireno con un índice de refracción de  $n_p = 1.59$  [20] están dispersas en agua,  $n_m = 1.33$ .

## 2.1.2 Fuerzas ópticas

De la mecánica cuántica sabemos que un fotón o cuanto de luz, con longitud de onda  $\lambda_o$ , tiene una energía igual a:

$$E = \frac{hc}{\lambda_o} \quad (2.8)$$

Donde  $h$  es la constante de Planck y  $c$  la velocidad de la luz en el vacío [21].

También se conoce que el vector de momento,  $p$ , de dicho fotón en el vacío se determina de la siguiente manera:

$$\mathbf{p} = \frac{h}{\lambda_o} \hat{\mathbf{u}} \quad (2.9)$$

Donde  $\hat{\mathbf{u}}$  es el vector unitario que indica la dirección de propagación del fotón. Esta dirección coincide en nuestro caso con el rayo óptico.

Cuando el fotón es dispersado a consecuencia de un choque elástico con un objeto su energía se conserva, pero su momento cambia de dirección, lo que produce una fuerza de retroceso actuante sobre el objeto [22]. Suponiendo que el fotón choca con incidencia normal sobre una superficie plana totalmente reflectante, el cambio de momento del fotón será en  $-2\mathbf{p}$  [18].

Si un rayo de luz se define como un conjunto de fotones viajando en la misma dirección, entonces para un rayo de luz con potencia  $P$  tendremos  $N = \frac{P}{E}$  fotones por segundo. Por tanto, para un rayo de luz cuyos fotones chocan con la superficie plana tendremos una fuerza o un cambio total de momento por unidad de tiempo igual a  $-2N\mathbf{p}$  y por sustitución con (2.8) y (2.9), el cambio será  $-2\frac{P}{c}\hat{\mathbf{u}}$  [18]. Finalmente, por

la Ley de reacción de Newton, tenemos que la fuerza de retroceso que experimenta la superficie reflectante es:

$$\mathbf{F}_{reflexión} = \frac{2P}{c} \hat{\mathbf{u}} \quad (2.10)$$

De esta forma se evidencia que la fuerza óptica máxima que puede generar un rayo de luz es proporcional a su potencia  $P$  [23]. Así, por ejemplo, para el caso de un rayo láser con una potencia  $P = 1mW$  se puede tener una fuerza óptica máxima de 7 pN. Esta es comparable con fuerzas capaces de mover micro objetos, como las fuerzas generadas por motores moleculares o las de movimiento Browniano [8].

En general, cuando un rayo no incide sobre una superficie plana o no lo hace bajo incidencia normal, se tendrá tanto reflexión como transmisión. Para este caso, conociendo la dirección  $\hat{\mathbf{r}}_i$  y la potencia  $P_i$  del rayo incidente, es recomendable seguir las ecuaciones indicadas en la sección 2.1.1 hasta obtener la potencia del rayo reflejado  $P_r$  y transmitido  $P_t$ , así como, sus respectivas direcciones  $\hat{\mathbf{r}}_r, \hat{\mathbf{r}}_t$  [19]. Entonces, la fuerza asociada a la reflexión y transmisión del rayo incidente en un punto determinado se expresa de la siguiente manera:

$$\mathbf{F}_{rayo,0} = \frac{n_i P_i}{c} \hat{\mathbf{r}}_i - \frac{n_i P_r}{c} \hat{\mathbf{r}}_r - \frac{n_t P_t}{c} \hat{\mathbf{r}}_t \quad (2.11)$$

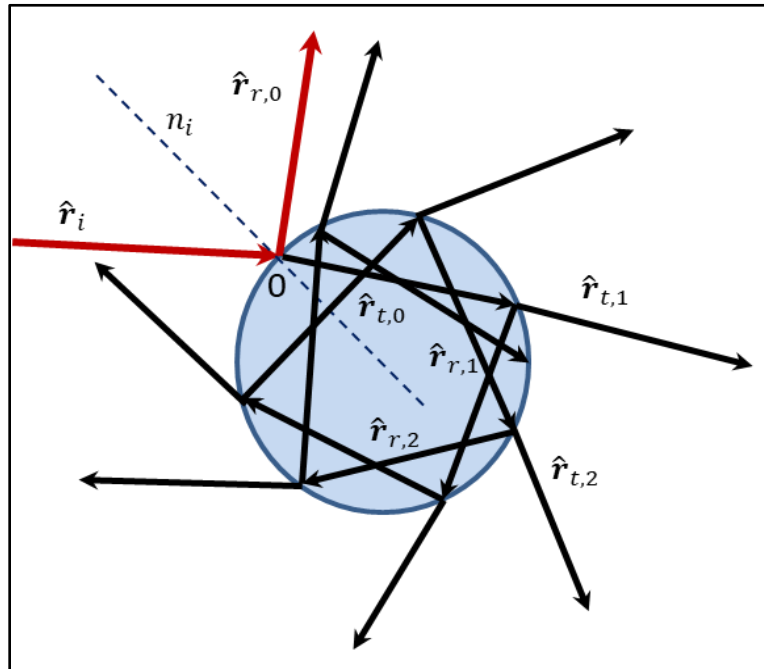
Donde  $n_i$  es el índice de refracción del medio incidente y  $n_t$  es el índice del medio de transmisión. Para la ecuación 2.11 se considera el momento de luz de Minkowski para un medio material, el cual toma en cuenta el índice de refracción del medio [24].

Si ahora un rayo de luz con potencia  $P_i$  golpea una partícula esférica microscópica con ángulo de incidencia  $\theta_i$  en un punto determinado (punto 0), dicho rayo puede traspasar toda la esfera hasta alcanzar la superficie opuesta, donde se volverá a transmitir y a reflejar. El rayo reflejado internamente nuevamente podrá sufrir otro evento de dispersión cuando golpee otro punto de la partícula. Bajo las condiciones adecuadas, este proceso se repetirá  $n$  veces hasta que el rayo de luz salga completamente de la partícula luego de las múltiples dispersiones (Figura 2.2). De

esta manera, la fuerza total sobre la partícula viene dada por la suma de las fuerzas generadas en cada punto de dispersión dentro de la partícula, como se puede ver en la ecuación (2.12) [19].

$$\mathbf{F}_{rayo} = \frac{n_i P_i}{c} \hat{\mathbf{r}}_i - \frac{n_i P_r}{c} \hat{\mathbf{r}}_{r,0} - \sum_{n=1}^{+\infty} \frac{n_i P_{t,n}}{c} \hat{\mathbf{r}}_{t,n} \quad (2.12)$$

Donde  $\hat{\mathbf{r}}_i$ ,  $\hat{\mathbf{r}}_{r,n}$ ,  $\hat{\mathbf{r}}_{t,n}$  son los vectores unitarios del rayo incidente y de los n rayos reflejados y transmitidos, respectivamente.



**Figura 2.2** Múltiple dispersión de un rayo de luz en una esfera dieléctrica en el plano de incidencia (Tomado de [1]).

De forma general, de acuerdo con la teoría electromagnética de la luz [25], se considera que la fuerza  $\mathbf{F}_{rayo}$  se puede dividir en la fuerza de dispersión  $\mathbf{F}_{rayo,d}$  y la fuerza de gradiente  $\mathbf{F}_{rayo,g}$ , (ecuación 2.13) [15]. Estas fuerzas se describen a continuación.

$$\mathbf{F}_{rayo} = \mathbf{F}_{rayo,d} + \mathbf{F}_{rayo,g} \quad (2.13)$$

### 2.1.2.1 Fuerza de dispersión

La fuerza de dispersión  $F_{rayo,d}$  se relaciona con fenómenos de esparcimiento. Dicha fuerza es proporcional al campo eléctrico y se aplica en la dirección de propagación del haz de luz incidente  $\hat{r}_i$ , como muestra la ecuación 2.14 [26].

$$\mathbf{F}_{rayo,d} = F_{rayo,d} \hat{r}_i \quad (2.14)$$

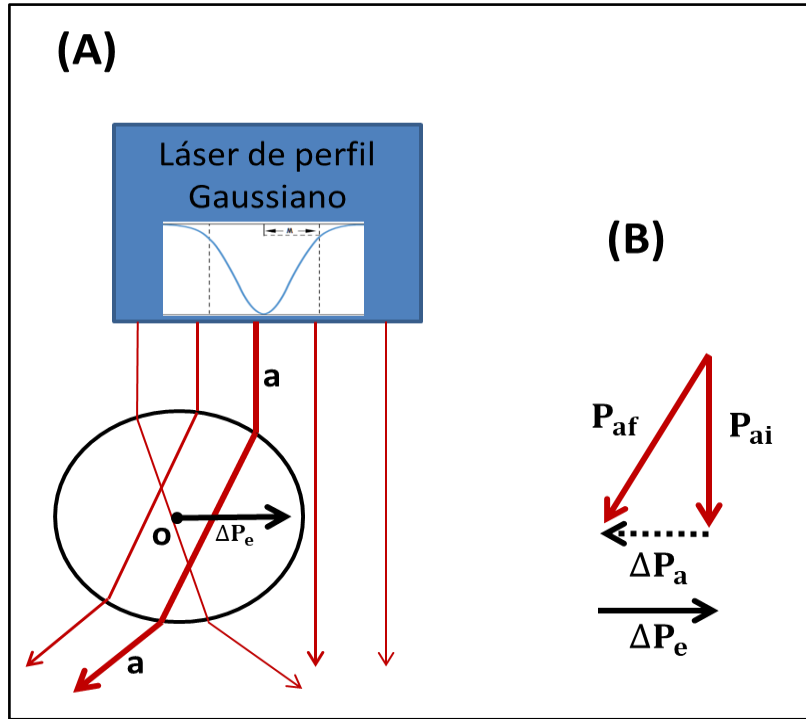
Dentro de las características de una pinza óptica de alta calidad, se requiere que  $F_{rayo,d}$  sea más baja que la fuerza  $F_{rayo,g}$  para que el sistema acelere y capture una microesfera [27].

### 2.1.2.2 Fuerza de gradiente

La fuerza de gradiente  $F_{rayo,g}$  depende del gradiente espacial de la intensidad de la luz. La dirección de esta fuerza es la que va a lo largo del gradiente de intensidad y perpendicular al haz de luz  $\hat{r}_i$ , como muestra la ecuación 2.15 [26].

$$\mathbf{F}_{rayo,g} = F_{rayo,g} \hat{r}_i \quad (2.15)$$

Para entender mejor esta fuerza se puede ver la Figura 2.3(A), donde un rayo de luz con longitud de onda mucho menor al tamaño de la partícula (aproximación GO) tiene intensidad variable en el plano transversal. Este puede ser el caso de un haz láser de perfil gaussiano, por ejemplo. La refracción de este haz producirá un cambio de momento que debe ser equilibrado por un cambio de momento en la esfera. Este cambio de momento será la fuerza  $F_{rayo,g}$  (Figura 2.3(B)). Bajo estas condiciones, un haz con este perfil Gaussiano sería capaz de atrapar una microesfera en su punto de máxima intensidad [27].



**Figura 2.3** Acción de la fuerza de gradiente sobre una micro esfera dieléctrica (A) Rayos ópticos de un haz de luz difractados dentro de la esfera. (B) Cambio de momento en la esfera.

### 2.1.3 Pinzas ópticas

El haz láser paraxial que ingresa al objetivo de la pinza óptica se puede ver como un conjunto de  $m$  rayos paralelos al eje  $z$ . Dichos rayos convergen en el punto focal del lente del objetivo e interactúan con las esferas dieléctricas cercanas a este punto [19]. La fuerza óptica resultante de cada rayo se calcula con la ecuación 2.12, y la fuerza total de la pinza óptica según la aproximación GO,  $\mathbf{F}_{GO}$ , será igual a la suma de las fuerzas de los  $m$  rayos (ecuación 2.16) [19].

$$\mathbf{F}_{GO} = \sum_m \mathbf{F}_{rayo}^{(m)} = \sum_m \left[ \frac{n_i P_i^{(m)}}{c} \hat{\mathbf{r}}_i^{(m)} - \frac{n_i P_r^{(m)}}{c} \hat{\mathbf{r}}_{r,0}^{(m)} - \sum_{n=1}^{+\infty} \frac{n_i P_{t,n}^{(m)}}{c} \hat{\mathbf{r}}_{t,n}^{(m)} \right] \quad (2.16)$$

Una vez atrapada la partícula, ésta intentará desplazarse de su posición de captura por acción de la fuerza de dispersión [26] y eventualmente por colisiones Brownianas, relacionadas con la temperatura del medio [28]. Bajo esas condiciones, la partícula experimentará una fuerza restauradora que la mantiene en posición. Esta fuerza es proporcional a sus pequeños desplazamientos (ecuación 2.17).

$$\mathbf{F}_{GO,i} \approx -k_i \Delta x_i \quad (2.17)$$



Donde  $k_i$  es la constante de resorte o de rigidez de la pinza en el eje  $i$ ,  $\Delta x_i$  es el desplazamiento correspondiente de la partícula e  $i$  hace referencia a los tres ejes  $i = x, y, z$ .

Este análisis se efectúa suponiendo que el haz está polarizado circularmente y, por tanto,  $k_x = k_y$ , en el plano perpendicular al eje óptico, ya que las fuerzas ópticas son rotacionalmente simétricas alrededor del eje. Por otro lado,  $k_z$  será más pequeño en la dirección axial [15]. Si el haz no está polarizado circularmente, las fuerzas ópticas serían asimétricas y para este caso se deben tomar en cuenta otro tipo de aproximaciones [19].

En conclusión, relacionando las ecuaciones 2.16 y 2.17 se obtiene que la constante resultante de rigidez de la pinza,  $k_i$ , es proporcional a la potencia del haz incidente,  $P_i$  [1].

Si se consideran muchos fotones incidiendo a diferentes ángulos sobre la micro esfera, entonces se puede despreciar, para el cálculo final, el efecto de los impulsos que genera el haz de luz dentro de la esfera en sus múltiples colisiones [24]. La ecuación final de interés es:

$$-k_i \Delta x_i = \sum_m \left[ \frac{n_i P_i^{(m)}}{c} \hat{r}_i^{(m)} \right] \quad (2.18)$$

## 2.2 Adquisición de datos y calibración de pinza óptica

Para evaluar la fuerza que la pinza óptica ejerce sobre una micropartícula capturada es necesario rastrear el movimiento de la misma. Existen al momento dos técnicas para rastrear la posición de la partícula atrapada, la microscopía de video digital (DVM) y la interferometría [29]. La técnica DVM permite rastrear la posición con resolución nanométrica y tiempos de milisegundos, mientras que con la de interferometría se obtienen mediciones de fracción de nanómetro y con una temporalidad de decenas de nanosegundos [29]. El segundo método presenta complicaciones técnicas importantes. Después de conocer la trayectoria de la

partícula atrapada ópticamente, con cualquiera de las estas dos técnicas, se puede calcular el valor de la rigidez de la pinza ( $k$ ) usando una técnica de calibración activa o pasiva. Un resumen de todas las técnicas existentes para adquisición de datos y calibración de pinzas ópticas se pueden observar en la Figura 2.4. La descripción de todas estas opciones cae fuera del alcance del presente trabajo y solamente nos limitaremos a explicar los métodos que se utilizaron, esto es, la técnica DVM para seguir las trayectorias, y las técnicas MSD y ACF para la calibración.

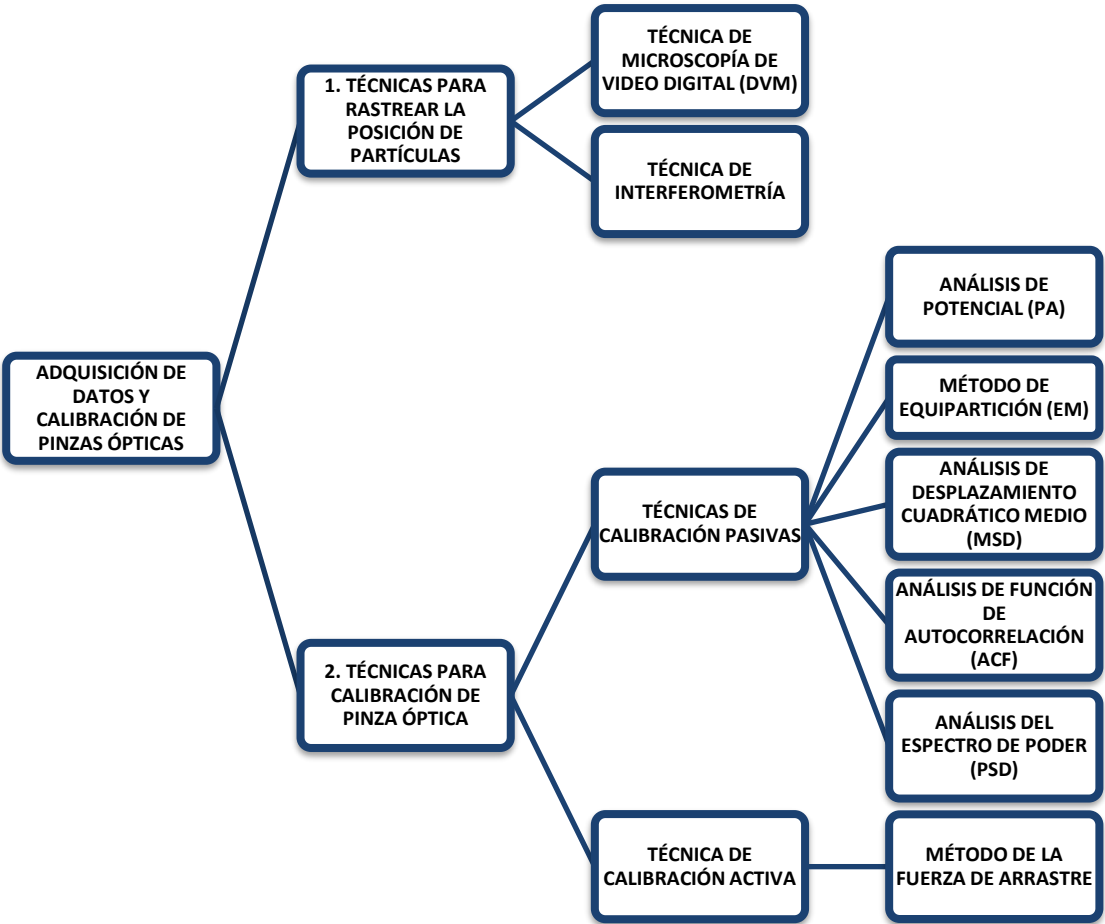


Figura 2.4 Cuadro de técnicas para adquisición de datos y calibración de pinzas ópticas.

De acuerdo a las características de la pinza óptica que se ha implementado se decidió que para el rastreo de la posición de partículas se use la técnica DVM. Cabe mencionar que la técnica DVM puede ser sustituida por la técnica de interferometría [1], [29], si se realizan en el futuro cambios al montaje experimental que se detalla

en la sección 3.1. Allí, el cambio más significativo es reemplazar el sensor de CMOS a un fotodiodo detector.

Para la técnica de calibración de pinza óptica se siguió principalmente la técnica de calibración pasiva MSD. La técnica ACF [30], [31] se tomó en cuenta para control de calidad de los datos experimentales obtenidos, ya que requiere de una menor cantidad de datos de entrada que otras técnicas.

A continuación, se explica en detalle las técnicas DVM, MSD y ACF elegidas para validar el funcionamiento de la pinza óptica implementada.

## **2.2.1 Microscopía de video digital (DVM)**

La técnica DVM permite medir directamente el movimiento de una partícula browniana. El método consiste en grabar un video de la partícula con una cámara digital (suficientemente rápida) y luego seguir o rastrear su posición fotograma por fotograma. Un fotograma es una imagen digital entendida como una matriz bidimensional de píxeles y corresponde a cada una de las imágenes adquiridas por la cámara para construir el video. Esta técnica se caracteriza por un número de fotogramas por segundo (frames per second-fps), el número de bits de la codificación del video (esto es la resolución numérica de la intensidad), y el campo de visión (en mm x mm o en píxeles) que entrega la cámara.

Para el caso de videos tomados en escala de grises, la intensidad de cada pixel de un fotograma se asocia con un número entre 0 (negro) y  $2N-1$  (blanco), donde  $N$  es el número de bits de la codificación del video [1]. Para una DVM precisa es recomendable que  $N$  sea 10, 12 o 16 bits [32]. Estos números corresponden a 512, 2048 o 65536 valores posibles en la escala de la intensidad. Mientras más alto este número, mejor es la resolución numérica que se puede obtener y menor el error relativo. Por ejemplo, si  $N=8$  bits en una imagen en escala de grises, cada pixel adquiere una intensidad  $I_t(m_x, m_y)$ , donde  $t$  representa el tiempo de adquisición, la coordenada entera  $m_x = 1, \dots, M_x$  es el índice de la fila de píxeles y  $m_y = 1, \dots, M_y$  es el índice de la columna de píxeles. Cada valor de intensidad en cada pixel puede

tomar un valor en una secuencia entre 0 y 255 [33], donde 0 corresponde a la oscuridad y 255 a la intensidad máxima registrada.

En el caso de los videos a color se almacena más de un valor en cada pixel. Las cámaras digitales en su mayoría siguen el modelo de color RGB, por lo que incluyen tres valores de tonalidad por pixel, rojo, verde y azul [1].

Dentro de la técnica DVM se puede proceder de dos maneras diferentes, una de ellas, la más simple y que se ha aplicado en este trabajo para rastrear las posiciones de las partículas, es con el uso de un umbral [32]. Como a cada pixel de un fotograma se le asocia un valor de intensidad, si el valor en un pixel que corresponde a la partícula es mayor que el del fondo, es posible fijar un valor de umbral  $N^{th}$ , igual o mayor al del fondo. De esta manera, se puede convertir la imagen de la escala de grises a una de blanco y negro (esto es, un bit) asociando los pixeles con valor de intensidad menor a  $N^{th}$  con el color negro y los pixeles con valor mayor (o igual) a  $N^{th}$ , con el blanco, como se indica en la ecuación 2.19 [32].

$$I_t^{th}(m_x, m_y) = \begin{cases} 0 & I_t(m_x, m_y) < N^{th} \\ 255 & I_t(m_x, m_y) \geq N^{th} \end{cases} \quad (2.19)$$

Después de la operación de umbral, se puede aplicar algunos filtros morfológicos para eliminar algunas causas comunes de ruido [34]. Finalmente, las posiciones de las partículas se obtienen siguiendo los centroides de las regiones blancas que potencialmente corresponden a una partícula [32], dichas posiciones servirán para construir la trayectoria de la partícula.

La forma más avanzada de detección en DVM se conoce como detección de puntos característicos y utiliza el principio de que los perfiles de intensidad de partículas, en cada fotograma, son gaussianos de primera aproximación. Es decir, la posición estimada de la partícula se obtiene encontrando el pixel con máxima intensidad local en cada fotograma del registro en video [33].

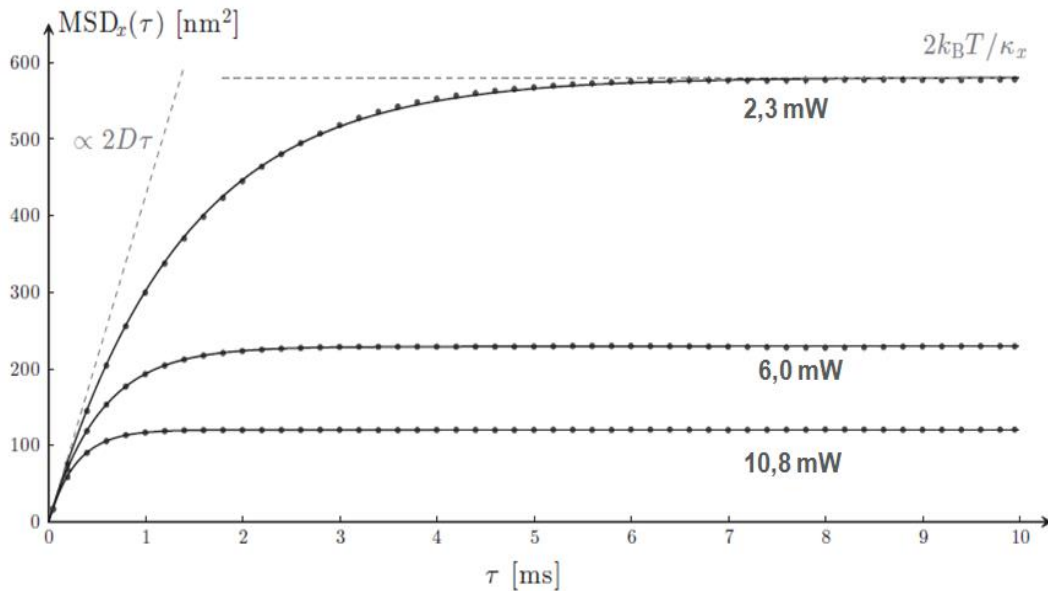
## 2.2.2 Análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD)

El análisis MSD para una partícula atrapada ópticamente consiste en cuantificar como se mueve dicha partícula desde su posición inicial ( $\tau = 0$ ) hasta un tiempo  $\tau$ . El MSD teórico se satura a un valor constante para tiempos suficientemente largos, y sigue la ecuación (2.20) para la dirección  $x$  [35].

$$MSD_x(\tau) = \overline{[x(t + \tau) - x(t)]^2} = 2 \frac{k_B T}{k_x} \left[ 1 - e^{-\frac{|\tau|}{\tau_{ot,x}}} \right] \quad (2.20)$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura en la que se encuentra el sistema,  $k_x$  es la rigidez de la trampa en la dirección  $x$ ,  $\tau_{ot,x}$  se conoce como el tiempo característico de la pinza en la dirección de  $x$ .

El  $MSD_x(\tau)$  presentará un crecimiento lineal a escalas de tiempo cortas ( $\tau \ll \tau_{ot,x}$ ) debido al comportamiento de propagación libre de la partícula, mientras que a tiempo largos ( $\tau \gg \tau_{ot,x}$ ) tiende a un valor constante debido al confinamiento de la trampa. Cuanto más fuerte es la pinza óptica más rápido se alcanza la meseta, es decir, es menor el valor de la constante (Figura 2.5) [35].



**Figura 2.5** MSD de una partícula de poliestireno (radio=1.03  $\mu\text{m}$ ) atrapada a diferentes valores de potencia de haz láser (2.3, 6.0, 10.8 mW) (Tomado de [1]).

Experimentalmente, para calcular el MSD se necesita adquirir una serie temporal de posiciones de las partículas correlacionadas en  $N$  intervalos de tiempo regulares. Con esta trayectoria descrita en intervalos de tiempo discretos ( $\tau_k = k \Delta t$ ) se calcula el MSD con la ecuación (2.21) [1].

$$MSD_{x,k} = \frac{1}{N-k} \sum_{j=1}^{N-k} [x_{j+k} - x_j]^2 \quad (2.21)$$

El MSD experimental de la ecuación 2.21 se puede ajustar al MSD teórico dado por la ecuación 2.20 por el método de mínimos cuadrados para determinar el  $k_x^{(ex)}$  experimental [35].

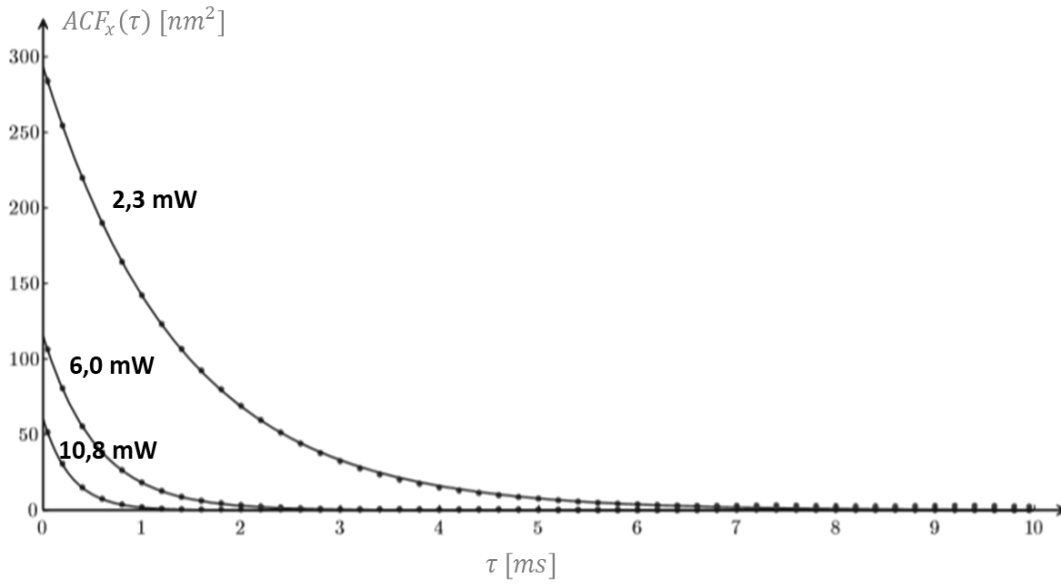
### 2.2.3 Análisis de función de autocorrelación (ACF)

El análisis ACF proporcionará una medida del tiempo que le toma a una partícula olvidar su posición inicial o anterior. Con esto se puede caracterizar como la partícula cae en la pinza óptica a medida que avanza el tiempo. La posición de ACF viene dada por la ecuación (2.22) [30]:

$$ACF_x(\tau) = \frac{k_B T}{k_x} e^{-\frac{|\tau|}{\tau_{ot,x}}} \quad (2.22)$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura en la que se encuentra el sistema,  $k_x$  es la rigidez de la pinza en la dirección  $x$ ,  $\tau_{ot,x}$  es el tiempo característico de la pinza en la dirección de  $x$ .

El  $ACF_x(\tau)$  decaerá más rápido cuanto más fuerte sea la pinza óptica o dicho de otra forma cuanto mayor sea el valor de la potencia del haz láser enfocado [30]. Dicho comportamiento se puede evidenciar en la Figura 2.6



**Figura 2.6** ACF de una partícula de poliestireno (radio=1.03  $\mu\text{m}$ ) atrapada a diferentes valores de potencia de haz láser (2.3, 6.0, 10.8 mW) (Tomado de [1]).

Experimentalmente, al igual que para el método MSD, se adquiere una serie temporal de posiciones correlacionadas a intervalos de tiempo iguales [1]. Es decir, que el factor de ACF se puede calcular con la trayectoria obtenida en DVM a intervalos de tiempo discretos siguiendo la ecuación (2.23).

$$ACF_{x,k} = \frac{1}{N-k} \sum_{j=1}^{N-k} x_{j+k} x_j \quad (2.23)$$

Consecuentemente, y de la misma forma descrita, el ACF experimental de la ecuación 2.23 se ajusta con el método de mínimos cuadrados al ACF teórico de la ecuación 2.22 para obtener el valor estimado de  $k_x^{(ex)}$  experimental.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Montaje de la pinza óptica

Como se explicó, el sistema de pinza óptica ensamblado está conformado por dos secciones: el sistema de colimación y expansión láser, y sistema de enfoque y observación.

Para la primera parte, se utilizó un láser de  $\lambda = 658 \text{ nm}$ , que por pertenecer al rango visible presenta un mínimo de absorción al momento de interactuar con muestras biológicas, reduciendo las posibilidades de dañar la muestra. La colimación consiste en controlar la divergencia del haz y lograr que no se desenfoque o se ensanche en ningún punto de la trayectoria. El expansor permitió aumentar el tamaño de la sección de dicho haz.

En la segunda sección se implementó un sistema de microscopía de enfoque invertido, basado en un objetivo de microscopio de alta apertura numérica (N.A), x100 (Modelo CCIS Plan Phase objective EC-H PL Ph100X/1.25/S-Oil, Motic, San Antonio) combinado con un sistema de observación usando una cámara CMOS. También se implementó una platina en el punto de imagen del objetivo de microscopio para posicionar la muestra, de tal forma que dicha superficie tenga libertad de movimiento en los tres ejes X, Y, Z. El movimiento se realiza de forma manual, aunque podría motorizarse adecuadamente en el futuro.

El haz láser se colima, expande y se dirige al objetivo. Este lo enfoca en la muestra entre dos placas de vidrio (portaobjetos y cubreobjetos). La intensidad del haz se regula por medio de un filtro de densidad óptica continuo. La intensidad se midió a la entrada al sistema y a la salida del objetivo con un medidor de potencia luminosa Modelo PM100D-Compact Power and Energy Meter Console, Digital 4" LCD (Thorlabs Inc., NJ).










Para las imágenes de las partículas se utilizó una cámara CMOS DMM 37UX273-ML (The Imaging Source, Charlotte)




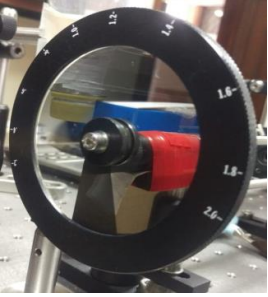


### 3.1.1 Elementos





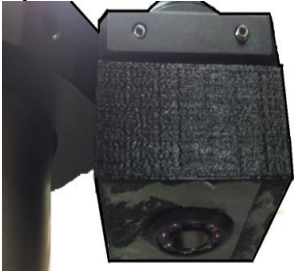
Los elementos usados en el montaje experimental de la pinza óptica se resumen en la Tabla 3.1 y Tabla 3.2, para cada parte respectivamente. Los elementos estructurales y ópticos se obtuvieron de Thorlabs Inc. Algunas partes estructurales se diseñaron en casa y se construyeron por impresión 3D a partir del material PLA (*Poly-Lactic Acid*).









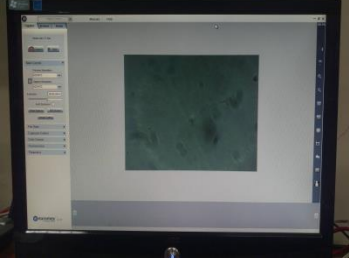

**Tabla 3.1** Elementos usados en la sección a) del sistema de pinza óptica: Sistema de Expansión Láser

<p>(1)</p>  <p>Láser rojo <math>\lambda=658</math> nm, P~68 mW (x1)</p>	<p>(2)</p>  <p>Lente plano convexo F=10cm (x1) [36]</p>	<p>(3)</p>  <p>Montaje de espejo cinemático de ángulo recto (x2) [36]</p>
<p>(4)</p>  <p>Espejos plateados planos circulares (x2) [36]</p>	<p>(5)</p>  <p>Tubo de lente (x2) [36]</p>	<p>(6)</p>  <p>Porta postes (x3) [36]</p>
<p>(7)</p>  <p>Base de montaje con tornillos hexagonales (x3) [36]</p>	<p>(8)</p>  <p>Postes (x3) [36]</p>	<p>(9)</p>  <p>Placa de rosca porta lentes (x2) [36]</p>

<p>(10)</p>  <p>Varillas de montaje (x4) [36]</p>	<p>(11)</p>  <p>Acoplador de tubo de lente (x2) [36]</p>	<p>(12)</p>  <p>Placa de alineación del sistema (x1) [36]</p>
<p>(13)</p>  <p>Filtro de densidad óptica (x1)</p>		

**Tabla 3.2** Elementos usados en la sección b) del sistema de pinza óptica: Sistema de Enfoque y Observación

<p>(14)</p>  <p>Cámara monocromática CMOS DMM 37UX273-ML (x1) [37]</p>	<p>(15)</p>  <p>Lente plano convexo F=4,5cm (x1) [36]</p>	<p>(16)</p>  <p>Filtro pasa altos de &gt;750 nm (x1) [36]</p>
<p>(17)</p>  <p>Divisor de Haz CM1-BS013 de 400-700 nm 50:50 (x1) [36]</p>	<p>(18)</p>  <p>Objetivo de microscopio 100X - N.A 1.25 oil (x1) [38]</p>	<p>(19)</p>  <p>Fuente de iluminación lámpara IR (x1) (elaboración propia)</p>

<p><b>(20)</b></p>  <p>Placa de rosca porta lentes, filtros (x4) [36]</p>	<p><b>(21)</b></p>  <p>Abrazaderas de poste deslizables (x3) [36]</p>	<p><b>(22)</b></p>  <p>Poste amortiguado (x1) [36]</p>
<p><b>(23)</b></p>  <p>Plataforma de traslación manual para cada eje (x3) [36]</p>	<p><b>(24)</b></p>  <p>Soporte de ángulo recto (x1) [36]</p>	<p><b>(25)</b></p>  <p>Base de montaje para plataformas de traslación (x1) [36]</p>
<p><b>(26)</b></p>  <p>Platina para colocación de muestras (x1)</p>	<p><b>(27)</b></p>  <p>Postes y cruces para montura de platina (~5 ó 6) [36]</p>	<p><b>(28)</b></p>  <p>Ordenador con software IC Capture 2.4 para conexión con cámara (x1) [36]</p>
<p><b>(29)</b></p>  <p>Varillas pequeñas de montaje (x8) [36]</p>		

### 3.1.2 Construcción de la pinza óptica

Inicialmente, fue importante considerar la ubicación de la pinza óptica debido a que de ello depende la estabilidad del sistema y la calidad de los resultados obtenidos. Para experimentos que no requieren una estabilidad o reproducibilidad muy alta, como la captura y desplazamiento de partículas, basta con montar el sistema en una mesa óptica estándar. Si los experimentos son más complejos, como los que requieren medir o ejercer fuerzas, es necesario elegir un laboratorio cerrado, aislado acústicamente, con temperatura y humedad estabilizadas, mesa óptica con un sistema de aislamiento de vibración, entre otras consideraciones. Esto último estuvo disponible en nuestro Laboratorio.

Para la construcción de una pinza óptica simple es suficiente un solo haz láser altamente enfocado de potencia  $\geq 1\text{mW}$ . Para conseguirlo se acopló un haz láser al microscopio óptico invertido de elaboración propia. El esquema que se muestra en la Figura 3.1 es una descripción general del sistema más óptimo de pinzas ópticas que se ha logrado ensamblar después de una serie de pruebas. Este esquema muestra las dos secciones indicadas de la pinza.

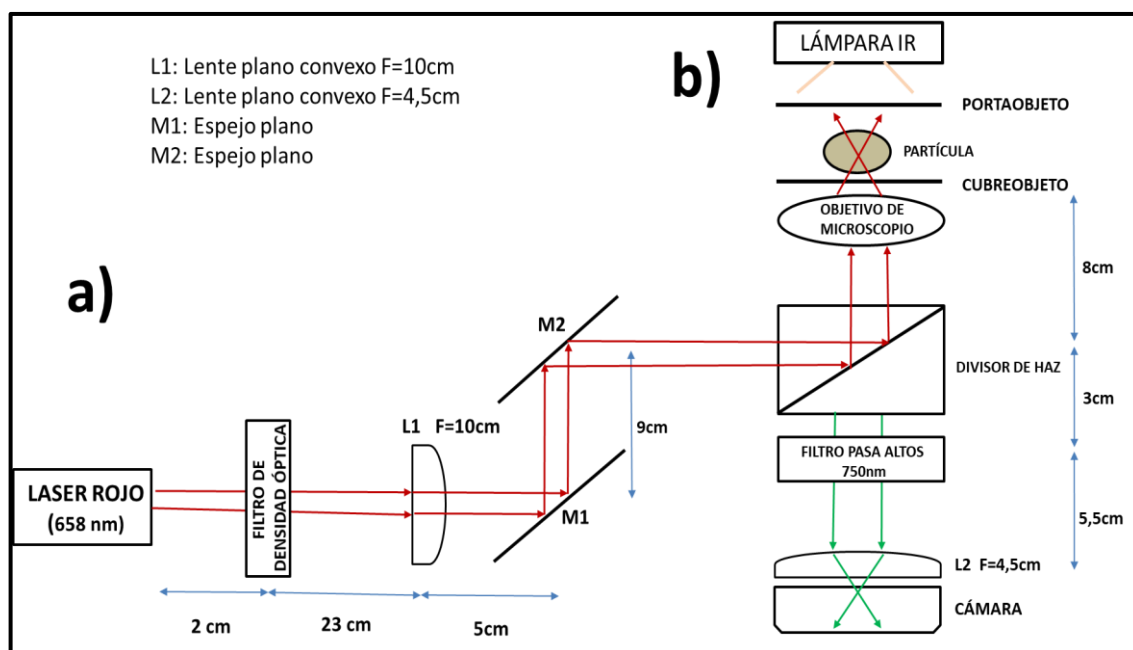
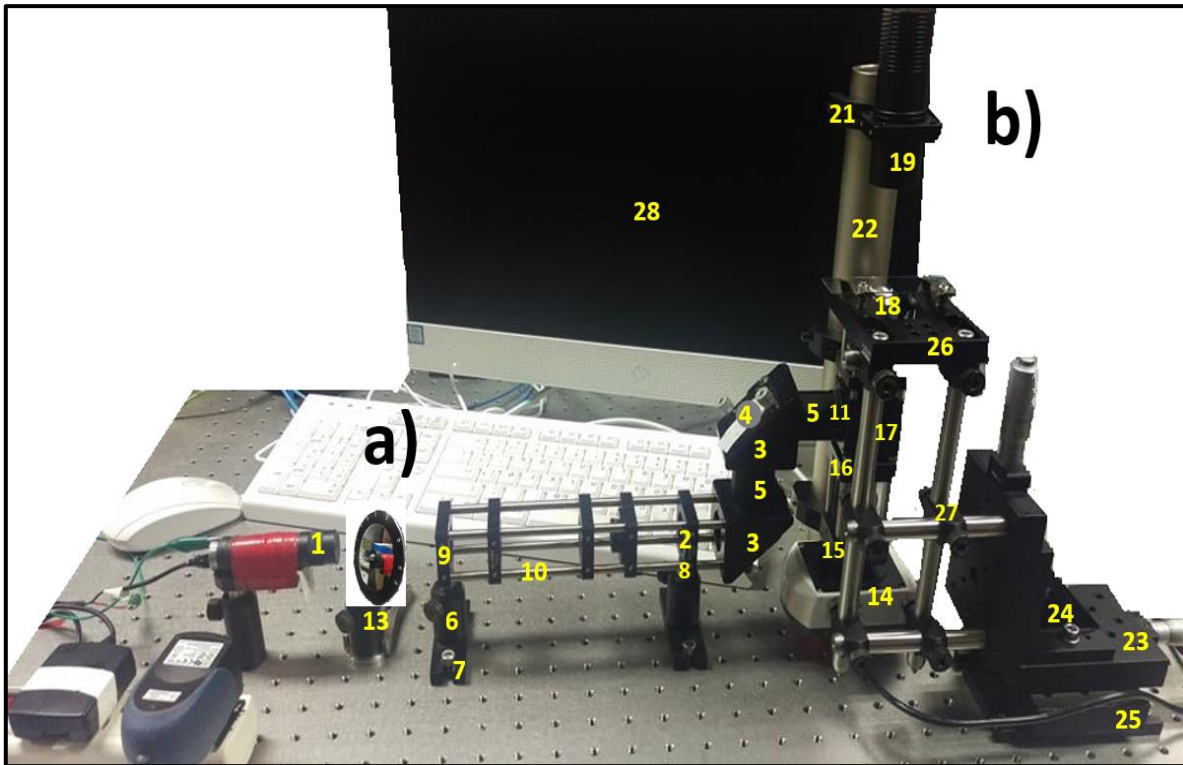


Figura 3.1 Esquema de pinza óptica invertida (a) sistema de expansión, (b) sistema de enfoque y observación

Se procede entonces a detallar todos los aspectos y consideraciones del ensamblaje de las piezas ópticas por sección.

*Colimación y expansión del haz:*

1. Los elementos usados en esta sección se instalan como se indica en la parte (a) de la Figura 3.2.
2. Teniendo la opción de trabajar con un láser rojo, uno verde y uno IR para minimizar cualquier daño de la muestra, se decidió utilizar el láser rojo de  $\lambda=658$  nm y  $P_0\sim 68$  mW (Ver Tabla 3.1 elemento 1) puesto que el divisor de haz (Ver Tabla 3.2 elemento 17) usado en la sección (b) solo admite haces de luz en la región visible es decir entre 400-700 nm, lo que descarta la opción del láser IR. Además, el láser rojo es buena elección porque presenta mayor potencia y mejor colimación que el láser verde.
3. Se colocó el puntero láser a la distancia máxima de 25 cm de la lente L1 que permitía la mesa óptica (Figura 3.1a) debido a que posiciones más alejadas del montaje del sistema favorecen a la colimación del haz. Se determinó empíricamente que ésta era la distancia más conveniente para la colimación de nuestro láser.
4. Generalmente, el uso de varios elementos ópticos, como lentes y espejos, para expandir y alinear el láser pueden producir grandes pérdidas de potencia del haz. Con el objetivo de disminuir estas pérdidas se comprobó que basta con emplear un solo lente plano convexo (Ver Tabla 3.1 elemento 2) antes del primer espejo M1 (Figura 3.1), para colimar el láser eficientemente.
5. Se colocó un filtro de densidad óptica (Ver Tabla 3.1 elemento 13) delante del puntero láser para poder regular la potencia que llega al sistema y controlar dicho parámetro al momento de tomar los archivos de video.
6. Se dispuso los espejos plateados planos (Ver Tabla 3.1 elemento 4) de forma paralela, es decir, creando un periscopio. Esta configuración guía el haz a través del divisor de haz y consecuentemente al objetivo modificando adecuadamente su trayectoria.



**Figura 3.2** Sistema de pinza óptica implementada en el Laboratorio de Espectroscopía Óptica de la EPN (a) sistema de expansión, (b) sistema de enfoque y observación

*Enfoque, observación y registro:*

1. Los elementos usados en esta sección se instalan como se indica en la parte (b) de la Figura 3.2. o Figura 3.3.
2. Se implementó el sistema de enfoque y observación de la pinza óptica de forma invertida como se observa en la Figura 3.3. Se eligió este diseño por su estabilidad y por favorecer el enfoque de la muestra, ya que a consecuencia de la gravedad las partículas tienden a acumularse cerca de la superficie del cubreobjetos, facilitando el enfoque del haz.
3. Se usó un objetivo de microscopio de alta apertura numérica para obtener un punto focal más estrecho que permita atrapar partículas en dos dimensiones. La tercera dimensión se limita con las dos plaquitas de vidrio.
4. Fue necesario implementar un filtro pasa altos de  $\lambda > 750 \text{ nm}$  (Ver Tabla 3.2 elemento 16) para eliminar por completo el haz del láser ( $\sim 650 \text{ nm}$ ) en la imagen que se registra en video. Esto es importante realizar debido a que el haz del



láser en la imagen es detrimental para el software de análisis y además satura la cámara con su gran intensidad. Con el haz presente el paquete de análisis no puede identificar la partícula atrapada ni registrar su trayectoria para el cálculo de la rigidez de la pinza.

5. Se colocó un lente plano convexo de  $F=4,5$  cm (Ver Tabla 3.2 elemento 15) delante de la cámara CMOS y a 5,5 cm del filtro pasa altos (Figura 3.1b) para hacer coincidir el plano focal del sistema de observación con el plano focal del láser. Cuando se ajusta correctamente este lente se consigue una observación ideal del punto focal del láser y de las micropartículas de muestra atrapadas.
6. Para la iluminación de la muestra se decidió usar una lámpara de luz IR (Ver Tabla 3.2 elemento 19) en lugar de una de luz blanca, ya que al usar el filtro pasa altos de 750 nm para eliminar el haz del láser, también se filtra la luz blanca (400-700nm) que se usaba en el diseño estándar para iluminar y observar la muestra.



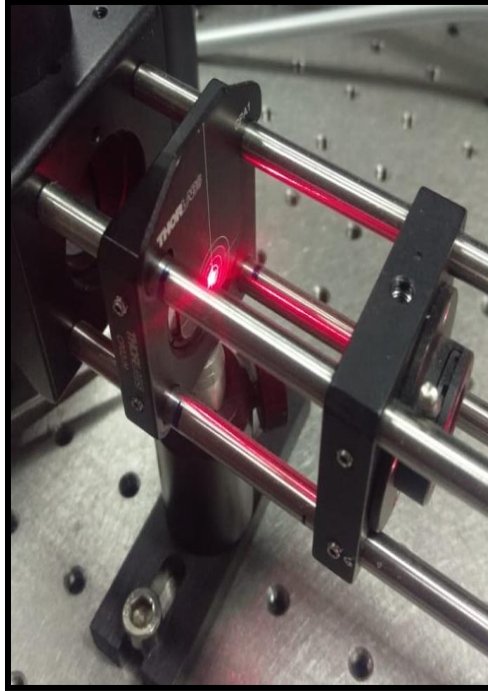
Figura 3.3 Sección (b) de enfoque y observación del sistema de pinza óptica

### 3.1.3 Alineación del haz del láser

Después de implementado el sistema de la pinza óptica se procedió a ponerlo en funcionamiento alineando el láser. En este procedimiento se tomó en cuenta los siguientes aspectos:

- En la sección de expansión láser se ajustó manualmente tanto la altura como la inclinación del láser de tal manera que el haz permanezca en el centro de la placa de alineación del sistema (Ver Tabla 3.1 elemento 12), a lo largo de la estructura con las varillas de montaje (Ver Tabla 3.1 elemento 10). Esto se observa en la Figura 3.4.
- Cuando el láser llega al sistema de periscopio conformado por los espejos M1 y M2 (Figura 3.1a) fue necesario retirar momentáneamente el espejo M2 de su soporte para poder observar en el techo el haz láser. Ajustando el espejo M1 se logró obtener un punto visible, de unos pocos milímetros de diámetro y dirigido verticalmente hacia arriba. Además, esto permitió comprobar la calidad de la colimación del haz al reducir la divergencia normal del láser.
- Posteriormente, se retiró la cubierta del lado izquierdo del divisor de haz y se verificó que el rayo salga por el centro de la abertura en el divisor del haz para mantener la alineación en la sección de enfoque del sistema de pinza óptica, Figura 3.3.
- Ajustando los tornillos de fijación de los espejos M1 y M2 (Figura 3.1a) se pudo dirigir el haz láser eficientemente sobre la entrada del objetivo de microscopio, de tal forma que el haz láser expandido y colimado cubra toda la lente de entrada al objetivo de microscopio.
- Se midió la potencia del haz láser en el plano focal del objetivo de microscopio para verificar que sea  $\geq 1\text{mW}$  ya que siempre se producen pérdidas de potencia en el camino óptico. Se logró tener una potencia de mínimo 2,5 mW y máximo 18 mW, suficiente para generar la trampa óptica.





**Figura 3.4** Punto de impacto del láser en el centro de la placa de alineación del sistema de pinza óptica (Ver Tabla 3.1 elemento 12). La placa se sostiene de las barras estructurales.

### 3.2 Preparación de muestras

Se trabajó con micropartículas de poliestireno de  $2.6 \mu\text{m}$  en una solución acuosa (Spherotech Inc., Illinois, Figura 3.5a). Esta solución es inicialmente de alta concentración con un número determinado de partículas por ml ( $n_\rho$ ) que se puede calcular con la expresión siguiente.

$$n_\rho = \frac{w * 10^{12}}{\frac{4}{3} \pi a^3 \rho} \quad (3.1)$$

Donde:  $w$  es la concentración de partículas ( $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ),  $a$  es el radio de la partícula ( $\mu\text{m}$ ),  $\rho$  es la densidad del material de partículas ( $\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ ).

Para nuestro caso tenemos que:

$$w = 50 \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)$$

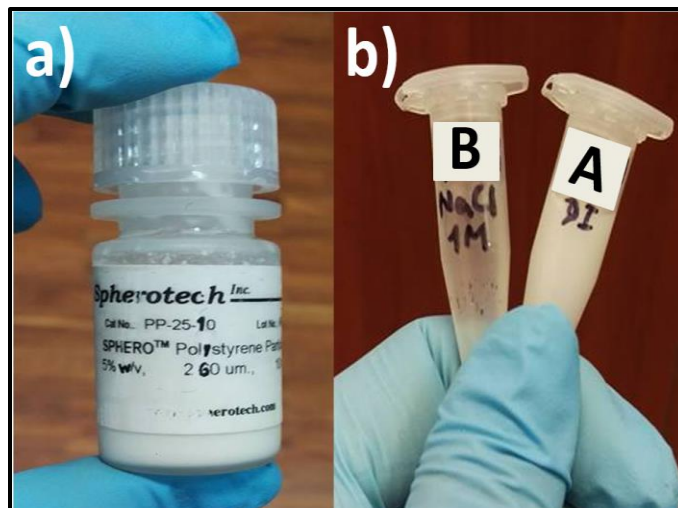
$$a = 1,3 \mu\text{m}$$

$$\rho = 1,05 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

Y de acuerdo a la ecuación (3.1) antes descrita, nuestra solución madre tiene una concentración de  $5,174 \times 10^{12}$  partículas por ml. Esta concentración es

excesivamente alta de forma directa y produce un conjunto extremadamente denso de partículas entre las placas de vidrio. Se decidió preparar dos tipos de soluciones diluidas de partículas, Figura 3.5b:

- SOLUCIÓN A, dilución 1000 a 1 en agua desionizada. Con 5  $\mu$ l de solución madre de partículas en 1 ml de agua desionizada.
- SOLUCIÓN B, dilución 1000 a 1 en agua desionizada. Con 5  $\mu$ l de solución madre de partículas en 1 ml de solución salina acuosa, concentración de NaCl 1 M.



**Figura 3.5** Solución de micropartículas de poliestireno a) solución madre, b) soluciones diluidas de la solución madre

La preparación de una muestra de partículas en agua desionizada (solución A) para ser utilizada en la pinza óptica se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomó una gota ( $\sim 5\mu$ l) de la solución A, que previamente fue agitada ya que las partículas tienden a precipitarse, y se colocó sobre un portaobjetos.
2. Posteriormente a eso, se colocó un cubreobjetos delgado sobre la gota y se presionó de tal forma que se obtuvo una capa delgada del líquido para que la luz del láser pase sin obstáculos y se eliminen las burbujas de aire tanto como fuere posible. NOTA: se usó cubreobjetos delgados (#1,5 y #2) [1] para que el objetivo pueda enfocar correctamente la imagen de la muestra.

3. El portaobjetos se colocó en la platina de muestra con el cubreobjetos hacia abajo, hacia el objetivo de microscopio. Posteriormente, la muestra se deslizó ligeramente hacia abajo con ayuda de las plataformas de traslación (Ver Tabla 3.2 elemento 23) para tener el punto focal del objetivo dentro de la gota y observar claramente las partículas suspendidas.

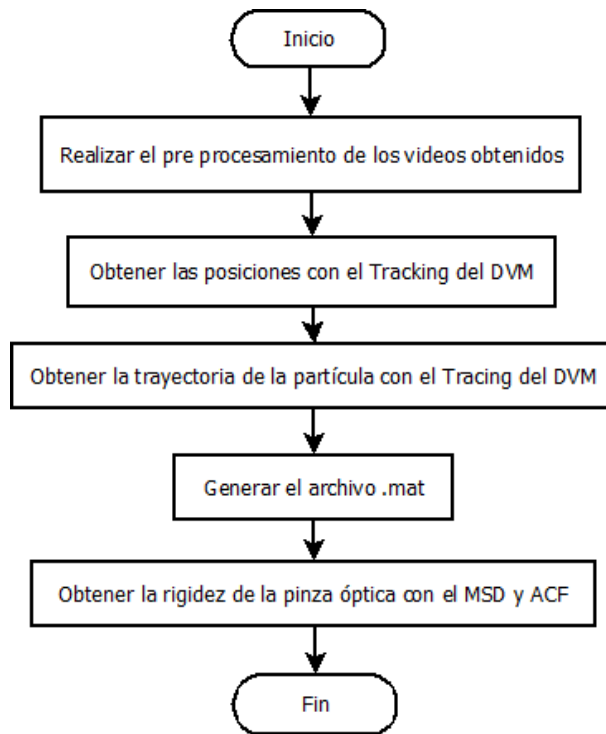
Para la preparación de una muestra de partículas en solución de NaCl (solución B) se procedió de igual manera que en los numerales 1 y 2 de partículas en agua. La solución se dejó reposar durante 5 a 10 minutos con el cubreobjetos hacia abajo para que las partículas disminuyan su velocidad, de forma previa al numeral 3 anteriormente mencionado para probar las capacidades de la pinza al momento de desplazar partículas. Las partículas en esta solución tienden a bajar su velocidad de desplazamiento y adherirse a la superficie del cubreobjetos en un periodo de tiempo más corto en virtud de que la solución de NaCl protege la carga superficial intrínseca del poliestireno que normalmente repele las partículas de la superficie de vidrio [39].

Para validar el sistema de pinza óptica se obtuvieron registros en video realizando dos tipos de pruebas, captura y manipulación, usando las muestras preparadas anteriormente. Algunos videos solo indican la captura de las partículas y otros la manipulación que consiste en desplazar las partículas atrapadas de un punto a otro a lo largo del plano X-Y.

### **3.3 Algoritmo para pinzas ópticas**

Se usó el software de pinzas ópticas (OTS) desarrollado en el entorno de programación MATLAB, el cual contiene herramientas que facilitaron el cálculo aproximado de la rigidez ( $k$ ) de la pinza implementada [40]. Para el presente trabajo se requirió utilizar el archivo OTS.m para cargar los paquetes del software. Luego se usaron los archivos dvmtest.m, calmsd.m y calacf.m, modificados adecuadamente, para realizar la técnica DVM, el análisis MSD y ACF respectivamente [40].

Se desarrolló un solo archivo de programa que contiene tanto el preprocesamiento de los registros en video adquiridos como los archivos correspondientes del funcionamiento de la pinza óptica. El flujograma del algoritmo correspondiente se puede ver en la Figura 3.6.



**Figura 3.6** Flujograma del archivo de programa creado para el cálculo de la rigidez de la pinza óptica implementada

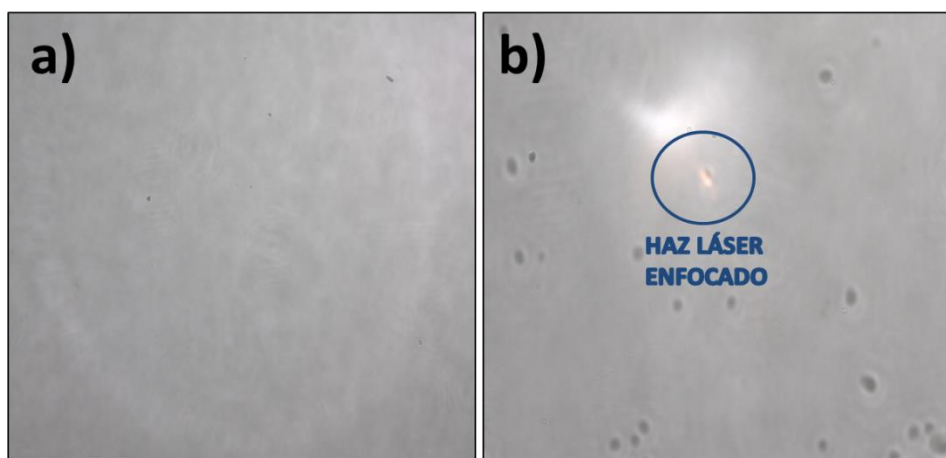
### 3.3.1 Algoritmo para adquisición y preprocesamiento de videos

Para la adquisición de los registros en video se debió seguir el siguiente procedimiento:

1. Se adquirió una imagen de fondo como se puede observar en la Figura 3.7a. Dicha imagen se obtuvo en el instante en que la lámpara de iluminación IR estaba encendida, el puntero láser apagado y sin porta objetos en la platina de muestra.

2. Posteriormente, se obtuvo una imagen de referencia como se observa en la Figura 3.7b. Para esta adquisición se colocó un portaobjetos en la platina, se encendió la lámpara IR junto con el láser y además fue necesario cambiar momentáneamente el filtro pasa altos de 750 nm por uno de 700 nm para permitir que se observe el haz láser enfocado. La finalidad de obtener esta imagen fue poder reconocer la zona de interés donde la partícula es atrapada. Esto no es posible sin una imagen del punto de impacto láser en la muestra.
3. La muestra preparada se colocó en la platina como se indicó en la sección 3.2 y se procedió a tomar los registros en video con el software propio de la cámara CMOS (Tabla 3.3).
4. De acuerdo a las especificaciones de la cámara usada en la pinza (Tabla 3.3), se obtiene videos con una velocidad de 238 fotogramas por segundo. Se realizaron registros en video con velocidad de 110 fps y aproximadamente 30 min de duración. Esto permitió tener ~198000 imágenes individuales. Fue importante tomar en cuenta este parámetro ya que, al procesar el video con las herramientas indicadas, es necesario tener  $\gg 1000$  posiciones de la partícula para el cálculo de MSD y ACF.

Una vez obtenidos los registros en video de las diferentes muestras preparadas se analizaron en el programa elaborado.



**Figura 3.7** Ejemplos de imágenes tomadas en la adquisición de videos a) imagen de fondo, b) imagen de referencia

**Tabla 3.3** Propiedades de la cámara monocromática CMOS DMM 37UX273-ML [37]

<b>Software</b>	IC Capture 2.4	<b>Tamaño del pixel</b>	3.45 $\mu\text{m}$
<b>Sensor</b>	1/2.9-inch Sony CMOS Pregius IMX273LLR-C	<b>Montura de lente</b>	M12x0.5
<b>Pixeles</b>	1,6 Mp	<b>Rango dinámico</b>	10 bits
<b>Resolución máxima</b>	1440x1080 pixeles	<b>Conexión a PC</b>	USB 3.1 gen1
<b>Velocidad de visualización (frames por segundo)</b>	~238 fps	<b>Voltaje de alimentación</b>	4.75 VDC to 5.25 VDC

El preprocesamiento de los videos consistió básicamente en, primero, extraer los fotogramas individuales a partir de los videos, y luego, obtener una imagen de referencia de las coordenadas de la región de interés (área del haz láser). Las equivalentes regiones se seleccionaron de la imagen de fondo y los fotogramas. Posteriormente, se realizó un filtrado de ruido en el dominio de la imagen, luego de sustraer la imagen de fondo de todos los fotogramas. Finalmente, la secuencia de imágenes procesadas se almacenó en un archivo de tipo mapa de bits sin pérdidas (lossless) conocido como TIFF por sus siglas en inglés (Tagged Image File Format).

El algoritmo usado para el preprocesamiento se indica en la Figura 3.8. y su respectivo código se encuentra en el Anexo 1.

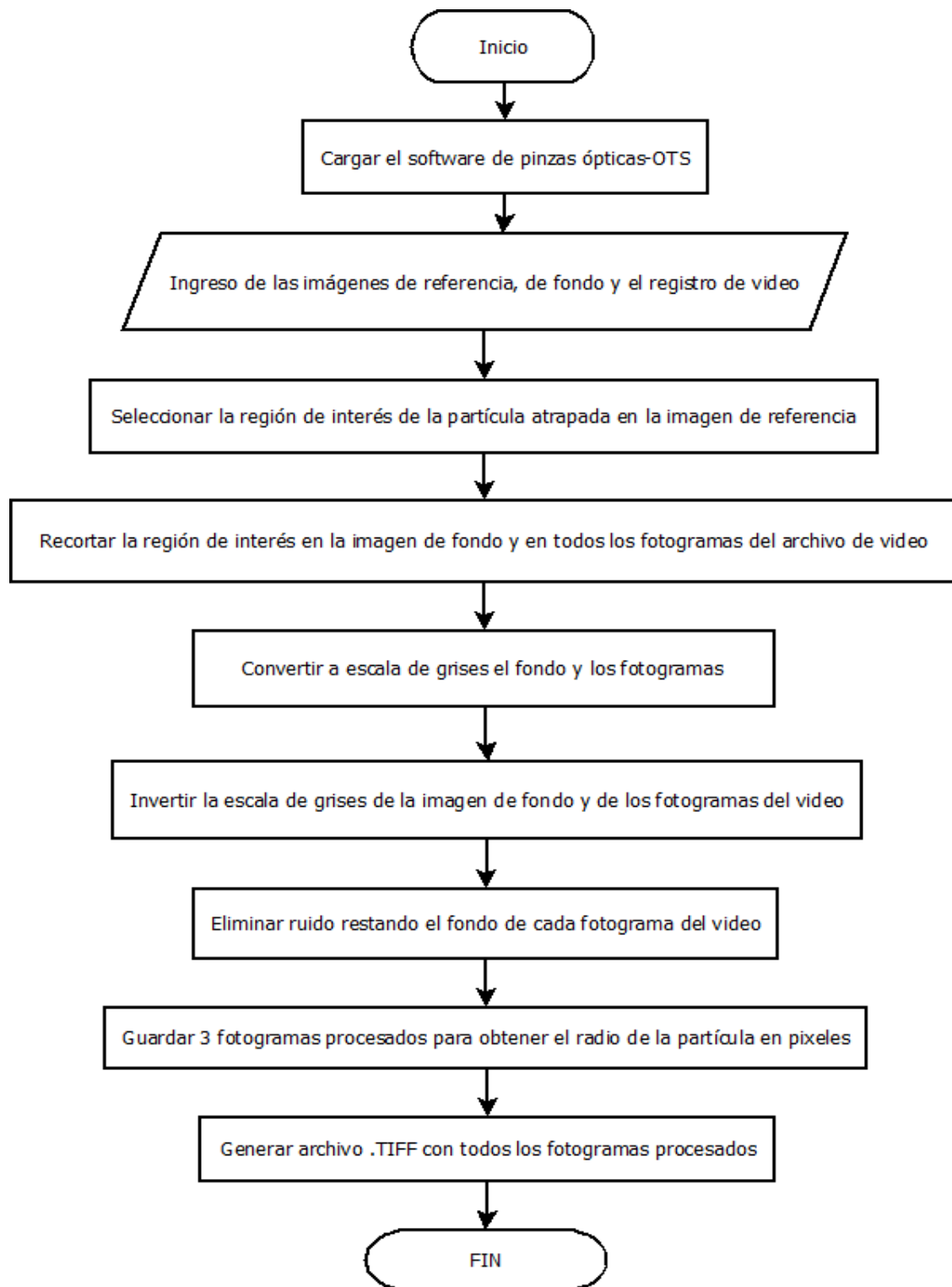


Figura 3.8 Flujograma del pre procesamiento de los archivos de video

### 3.3.2 Algoritmo para microscopía de video digital (DVM)

El software usado para aplicar la técnica DVM en los registros de video obtenidos se encarga de asociar un valor de intensidad a cada pixel de un fotograma. A continuación, este valor se convierte en binario reemplazando un valor de blanco (1) o negro (0) de tal manera que el programa pueda reconocer las regiones con pixeles blancos como correspondientes a las partículas.

El proceso de DVM se divide en dos subprocesos: el primero se encarga de localizar las partículas y calcula y guarda las posiciones de los centroides de las regiones blancas. Este proceso se denota como *tracking*. El segundo proceso usa las posiciones guardadas para obtener la trayectoria que la partícula ha seguido, y se conoce como *tracing*.

Finalmente, se elaboró un archivo que contiene la trayectoria de la partícula atrapada, descrita por sus coordenadas  $X$  e  $Y$  en cada  $t_i$ , el radio de la partícula, la temperatura ambiente y la viscosidad del medio en el que se encuentra la partícula. Para la viscosidad se usaron los valores tabulados de las soluciones correspondientes.

Los algoritmos usados para el método de microscopía de video digital (DVM) se indican en las Figura 3.9, Figura 3.10 y Figura 3.11. El código respectivo se encuentra en el Anexo 2.



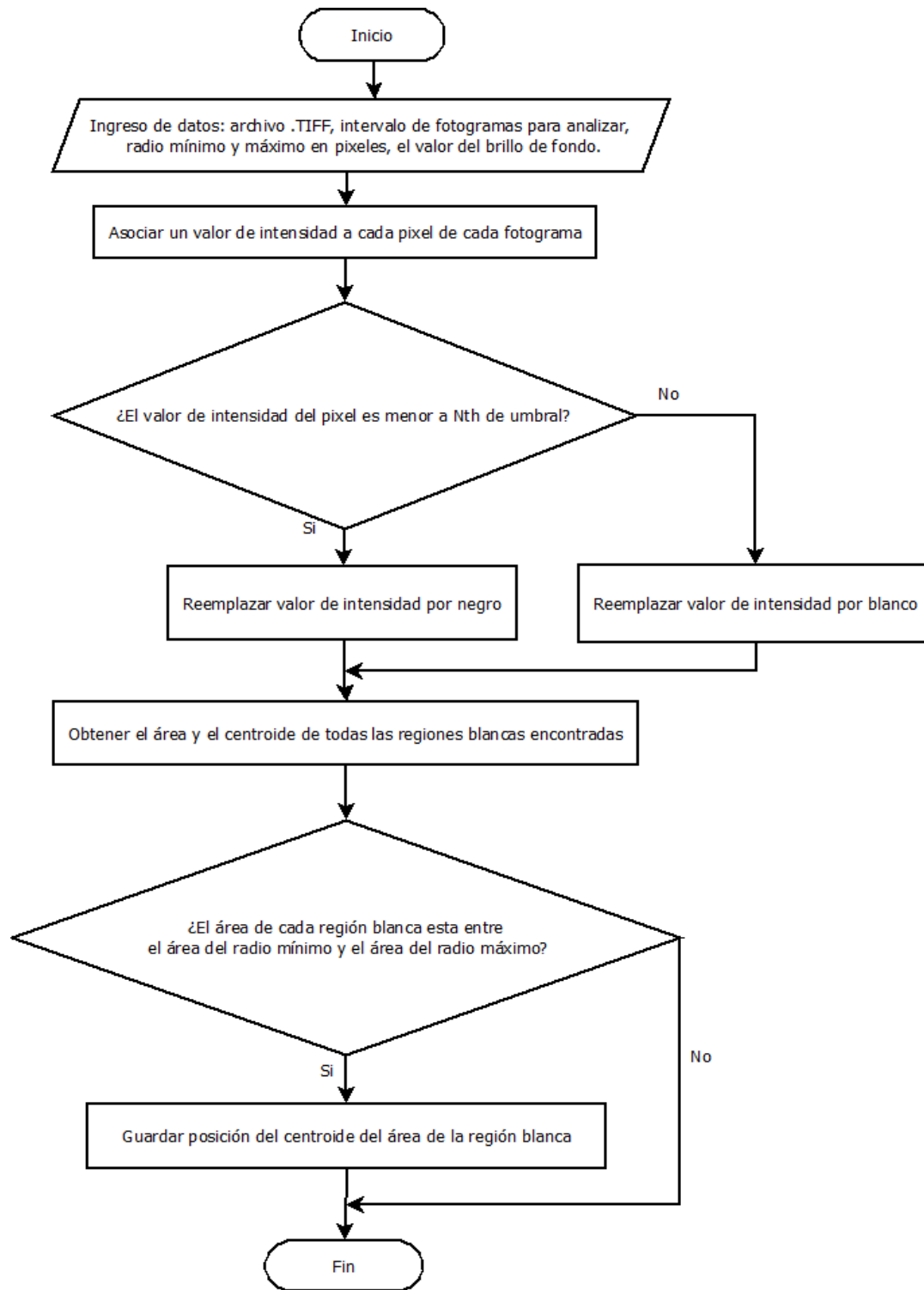


Figura 3.9 Flujograma del Tracking del DVM

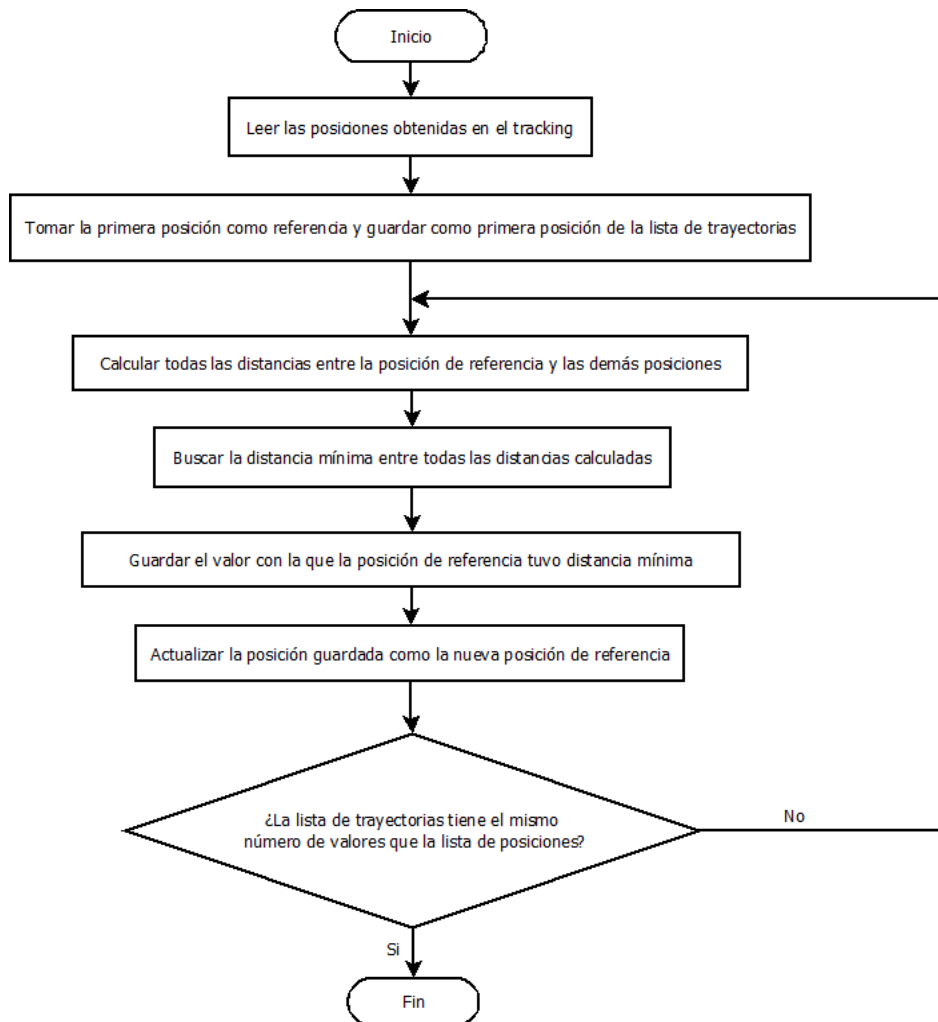


Figura 3.10 Flujograma del Tracing del DVM

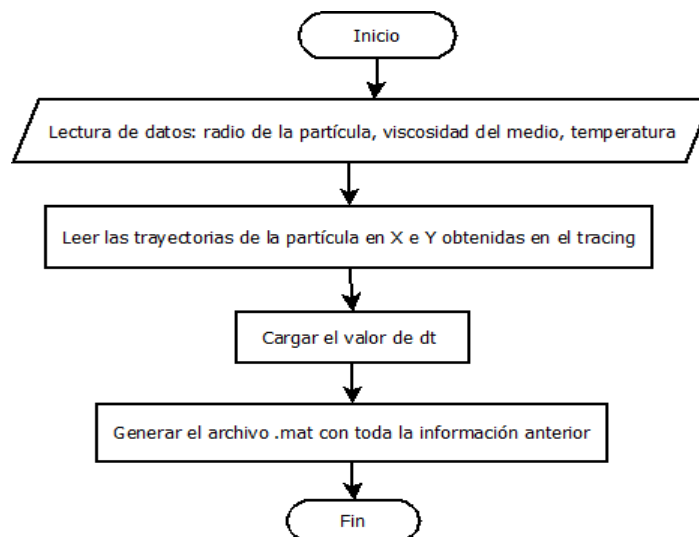


Figura 3.11 Flujograma para la creación del archivo con la información obtenida en Tracing

### 3.3.3 Algoritmo para análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD)

El software utilizado para el análisis MSD calcula la rigidez de la pinza óptica,  $k_x$ , siguiendo una serie temporal de las posiciones de la partícula atrapada. Dicha serie se ajusta a la función teórica de MSD que en el valor constante donde se satura la función permite obtener el  $k_x$  a partir de los datos experimentales.

El algoritmo usado para el análisis de desplazamiento cuadrado medio se indica en la Figura 3.12 y su respectivo código se encuentra en el [Anexo 3](#).

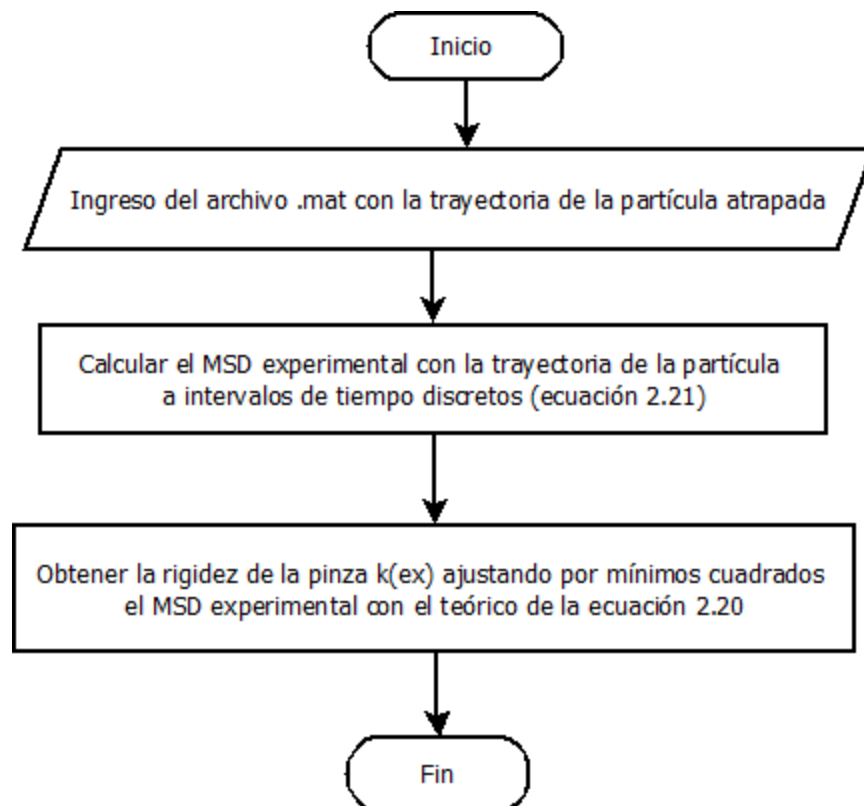


Figura 3.12 Flujograma del análisis MSD

### 3.3.4 Algoritmo para análisis de función de autocorrelación (ACF)

El software utilizado para el análisis ACF calcula la rigidez de la pinza óptica,  $k_x$ , siguiendo una serie temporal de las posiciones de la partícula atrapada, así como el método MSD, pero con la serie que se indicó en la ecuación (2.23). Dicha serie se ajusta a la función teórica de ACF (ecuación 2.22).

El algoritmo usado para el análisis de desplazamiento cuadrado medio se indica en la Figura 3.13 y su respectivo código se encuentra en el [Anexo 3](#).

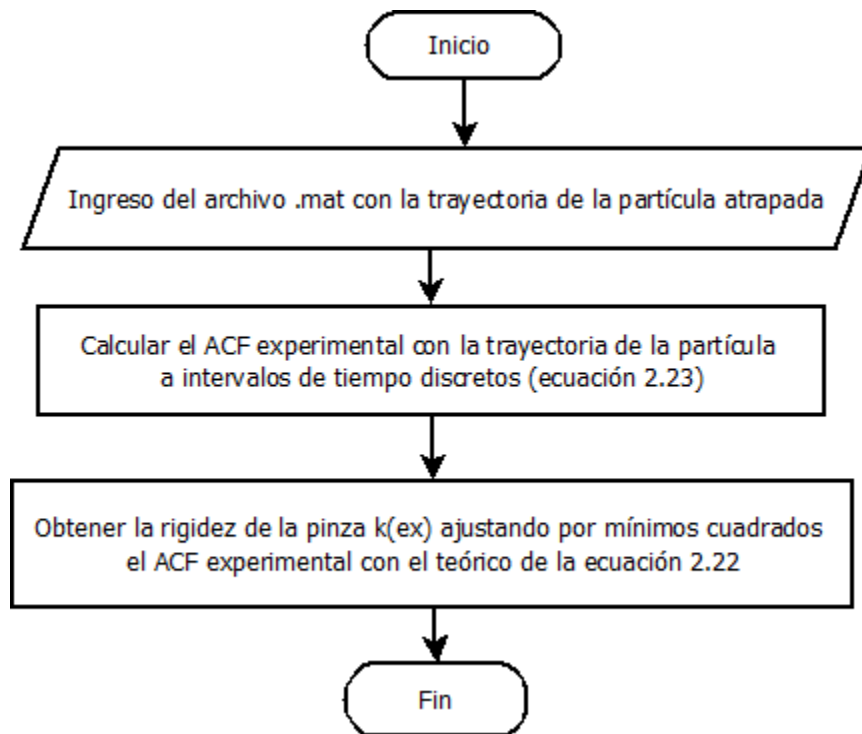


Figura 3.13 Flujograma del análisis ACF

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para validar el sistema de pinza óptica implementado se realizaron dos tipos de pruebas: captura y manipulación de partículas de poliestireno, cuyos resultados de manera individual se presentan a continuación.

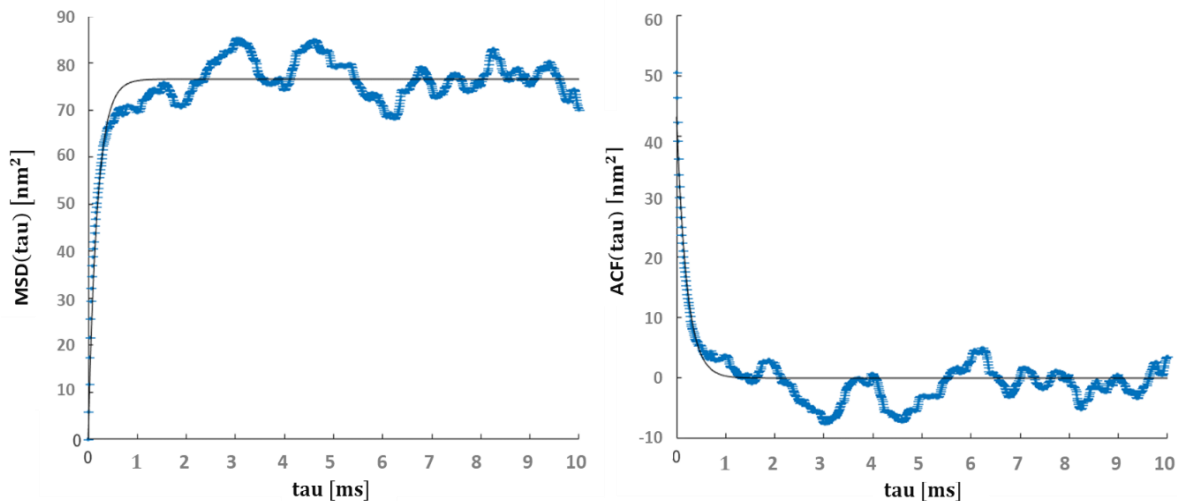
### 4.1. Prueba de Captura

A continuación, se muestra el valor de rigidez de la pinza óptica,  $k_x$ , obtenido con cada método de calibración de pinza. Donde  $\tau_{uc}$  es el tiempo característico de la pinza óptica en la dirección  $x$ . Los registros obtenidos para cada tipo de muestra se adquirieron con la máxima potencia de láser de 17,7 mW.

*Muestra de partículas en agua desionizada DI (Solución A)*

**Tabla 4.1** Valores de  $k_x$  obtenidos con los métodos MSD y ACF para una muestra en agua desionizada

MSD	ACF
$\tau_{uc} : 0.00018422 \text{ s}$	$\tau_{uc} : 0.00020801 \text{ s}$
<b><math>k_x : 105.7084 \pm 17.1 \text{ fN/nm}</math></b>	<b><math>k_x : 93.618 \pm 15.1 \text{ fN/nm}</math></b>

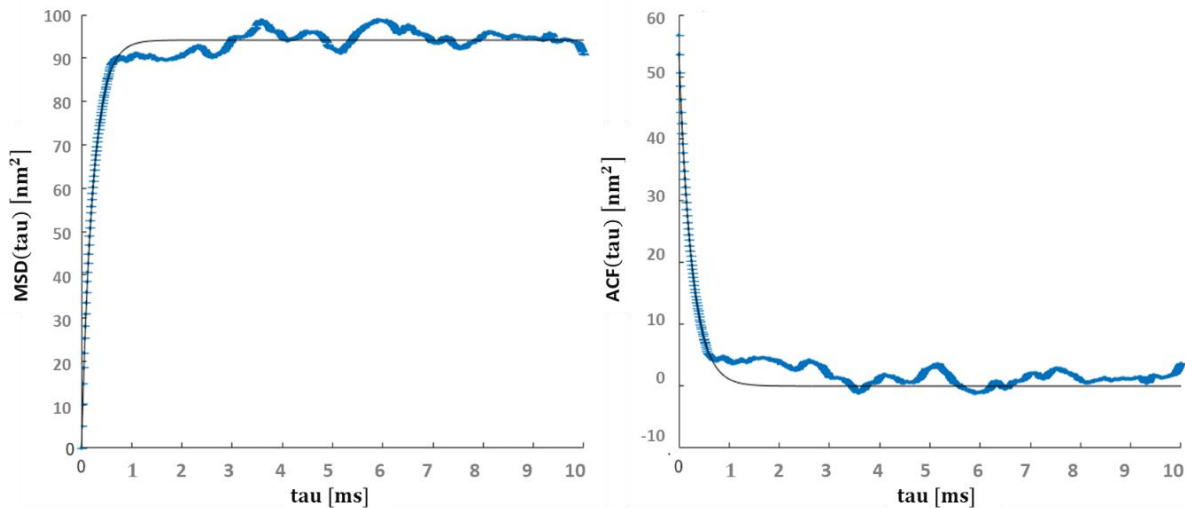


**Figura 4.1** Curvas de ajuste de los métodos MSD (izquierda) y ACF (derecha) para la muestra en agua desionizada. Se observa que las partículas alcanzan el régimen de largo tiempo rápidamente luego del primer ms

Muestra de partículas en solución de NaCl 1 M (Solución B)

**Tabla 4.2** Valores de  $k_x$  obtenidos con los métodos MSD y ACF para una muestra en solución de NaCl

MSD	ACF
tauc : 0.00022665 s	tauc : 0.00025947 s
<b>kx : 85.9189 +/- 11.2 fN/nm</b>	<b>kx : 75.0492 +/- 9.75 fN/nm</b>



**Figura 4.2** Curvas de ajuste de los métodos MSD (izquierda) y ACF (derecha) para la muestra en solución de NaCl. Las partículas alcanzan aparentemente más rápidamente el régimen de límite en esta solución. También, el grado de fluctuación alrededor del valor asintótico es menor que la Figura 4.1

Respecto a estos resultados obtenidos se pueden hacer las siguientes observaciones:

Los valores de  $k_x$  obtenidos con los métodos MSD y ACF para la muestra con agua desionizada y en la muestra con solución de NaCl difieren entre el 11% y 12%, sin embargo, si se toma en cuenta la precisión de la medida se puede ver que estos se superponen. Este es un resultado positivo ya que indica que dos métodos diferentes arrojan valores cercanos de la rigidez de la pinza.

La discrepancia entre los valores de  $k_x$  encontrados se puede explicar por la rapidez de adquisición de imágenes que introduce errores de promediación (durante el tiempo de adquisición de cada fotograma). Estos errores se propagan de manera

diferente en las dos técnicas porque siguen series temporales distintas (ecuaciones 2.21 y 2.23). Con esto en mente, en el montaje experimental se decidió usar una cámara con sensor CMOS en lugar de una con sensor CCD para tener mayor velocidad. Dicho sensor si bien es más rápido tiene una relación señal/ruido y una calidad de imagen más baja [1] pudiendo ser ésta una de las razones de que las posiciones obtenidas con el método DVM no sean tan precisas. Esto introduce un error de precisión en la determinación de la posición en cada caso. Estas fuentes de error se consideraron en el cálculo de la propagación de errores que realizamos para obtener el error del valor de  $k_x$ . Esto se discute luego en este documento.

En el 2015, J. Philip et al. [1] determinaron el valor de  $k_x$  para una muestra de partículas de poliestireno ( $2.06\mu\text{m}$ ) en agua a valores de potencia de láser ( $P$ ) de hasta 10 mW. Haciendo uso de estos datos como referencia y como  $k_x$  es lineal con  $P$ , se realizó una estimación con el ajuste de [1] para determinar qué valor de  $k_x$  se obtendría en sus condiciones para partículas en agua a una potencia de 17,7 mW. El valor que se estimó fue de  $k_x^{[1]} = 105,314 \frac{\text{fN}}{\text{nm}}$  y este concuerda razonablemente bien con el valor de  $k_x = 105,708 \frac{\text{fN}}{\text{nm}}$  obtenido en el presente trabajo para la muestra equivalente con el método MSD.

Haciendo referencia al método MSD es posible notar que el valor de  $k_x$  obtenido para la muestra de partículas en solución de NaCl ( $85.9189 \text{ fN/nm}$ ) es menor al valor de  $k_x$  de la muestra de partículas en agua desionizada ( $105.7084 \text{ fN/nm}$ ) aun cuando ambas muestras fueron atrapadas con una potencia de 17,7 mW. En este caso, presumiblemente el valor de la rigidez de la pinza varía debido a que la adición de sales (NaCl) cambia la viscosidad del líquido en donde se encuentran suspendidas las partículas de poliestireno y por tanto cambiarán las propiedades de interacción de las partículas con el líquido y hasta con otras partículas en el medio debido a las cargas presentes. Estas cargas van a modificar la carga efectiva de las partículas de poliestireno en el líquido y consecuentemente las interacciones electrostáticas y la capa de hidratación de la partícula [39]. Este resultado es

relevante porque se debe tomar en cuenta que la rigidez de la pinza no solo dependerá del láser sino del sistema láser-solvente-partícula.

Los errores del valor  $k_x$  obtenidos en los métodos MSD y ACF para cada tipo de muestra se los obtuvo aplicando la teoría de propagación de errores [41]. Esto debido a que existen varias fuentes de error que contribuyen al valor de  $k_x$  experimental. Este valor se aproxima pero no es igual al valor teórico calculado, como se puede ver en la diferencia de curvas experimental y teórica de la Figura 4.1 y Figura 4.2. Los cálculos correspondientes de los errores se pueden visualizar en el Anexo 4.

Cabe mencionar que debido a la emergencia sanitaria por la pandemia del covid-19 no se pudo obtener más videos de captura de partículas de larga duración a diferentes valores de potencia. Sin embargo, para los fines de este trabajo los videos adquiridos son suficientes.

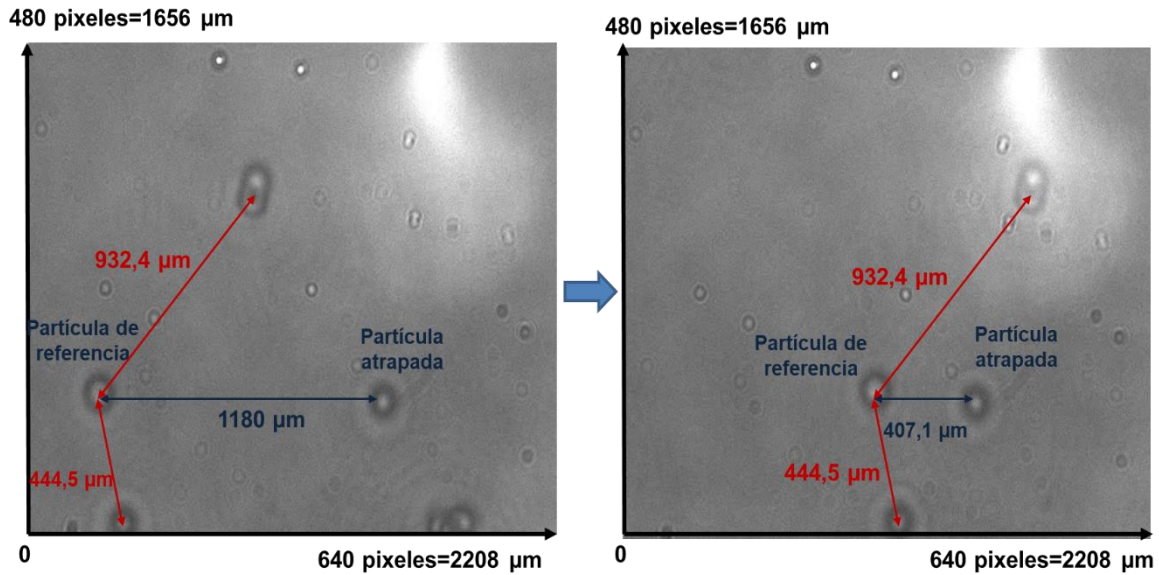
## **4.2. Prueba de Manipulación**

Para determinar los valores presentados en esta sección, se obtuvo individualmente los fotogramas de los videos y a continuación, se introdujo una escala de distancia usando el tamaño conocido de las esferas de poliestireno y la resolución conocida de la cámara CMOS (Ver Tabla 3.3). En estos casos, la resolución de los fotogramas fue de 640x480 pixeles y cada Pixel mide 3,45  $\mu\text{m}$ . Con esto se hizo el escalamiento correspondiente con la conversión de Pixel a  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente, se amplió la región de interés para mejor apreciación del desplazamiento de las partículas por acción de la pinza óptica (Cálculos en Anexo 5). Sin embargo, las mediciones presentan un error superior a los casos anteriores debido a la reducida resolución de las imágenes obtenidas con el sensor CMOS para estos resultados, en comparación con los resultados de las pruebas de captura.

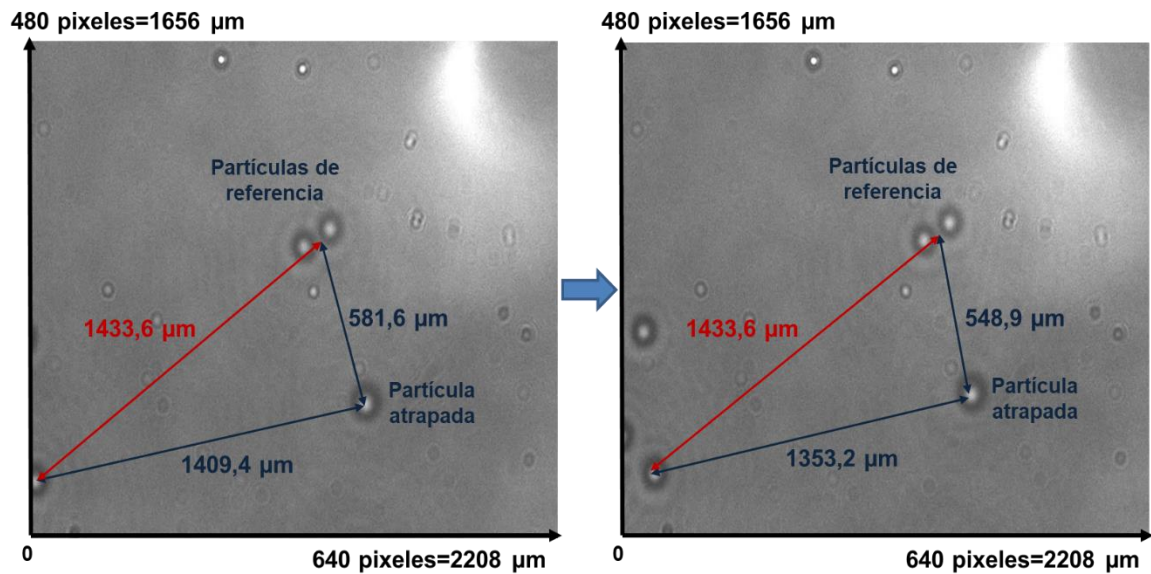
El método antes indicado para evidenciar el desplazamiento de una partícula de poliestireno por acción de la pinza óptica se aplicó con la confiabilidad de que las partículas tomadas como referencia estaban fijas al momento de obtener la muestra. Para corroborar esta información se presenta a continuación en la Figura 4.3 y



Figura 4.4 que la distancia entre partículas de referencia se mantiene constante a medida que la partícula capturada se desplaza en el plano X-Y indicándonos que en efecto las partículas tomadas como referencia se encontraban fijas.



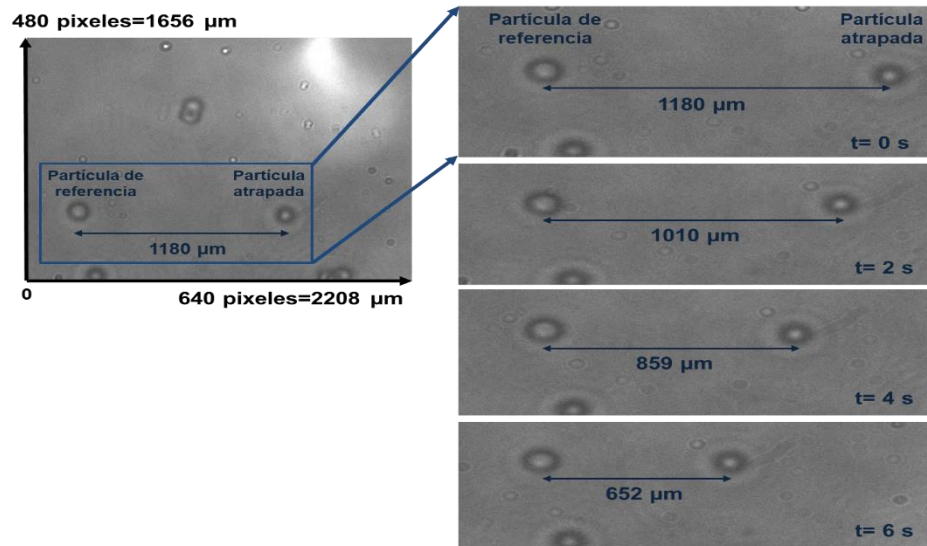
**Figura 4.3** Sistema de referencia de partículas fijas tomado para indicar el desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en agua desionizada, atrapada con la pinza óptica



**Figura 4.4** Sistema de referencia de partículas fijas tomado para indicar el desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en solución de NaCl, atrapada con la pinza óptica

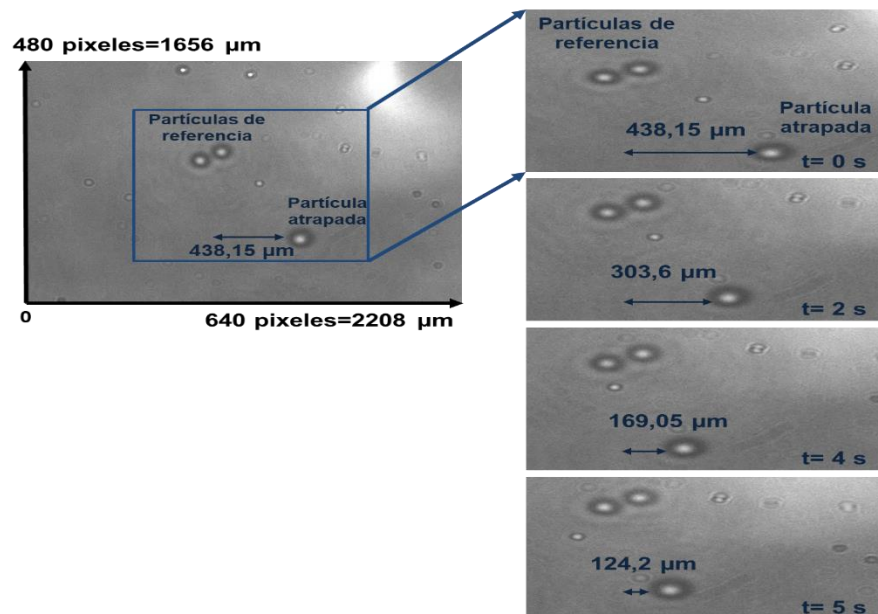
A continuación, se muestra mediante una secuencia de imágenes el desplazamiento a lo largo del plano X-Y de una partícula atrapada con la pinza óptica a la máxima potencia de 17,7 mW, respecto a una partícula de referencia que se encontraba fija.

*Muestra de partículas en agua desionizada DI (Solución A)*



**Figura 4.5** Desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en agua desionizada, atrapada con la pinza óptica

*Muestra de partículas en solución de NaCl 1 M (Solución B)*



**Figura 4.6** Desplazamiento de derecha a izquierda de una partícula de poliestireno en solución de NaCl, atrapada con la pinza óptica

Respecto a estos resultados se puede comentar lo siguiente:

Con el análisis en la Figura 4.5 se observa que la partícula en agua desionizada se arrastra con una rapidez promedio de  $90,19 \pm 8,4 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  por acción de la pinza óptica. De igual manera, la Figura 4.6 muestra que la partícula en una solución de NaCl se mueve en promedio  $60,72 \pm 12,84 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$  por acción de la pinza óptica.

Según la evidencia, la velocidad de desplazamiento es marginalmente mayor en agua desionizada que en NaCl. Esto es consistente con la discusión anterior y esta diferencia se atribuye tentativamente a que la partícula en solución de NaCl presenta mayor ‘fricción’ debido a que su viscosidad dinámica es  $\eta_{\text{NaCl}}^{20^\circ\text{C}} = 1,092 \text{ [mPa} \cdot \text{s]}$  [42] considerablemente mayor a la del agua desionizada  $\eta_{\text{agua}}^{20^\circ\text{C}} = 0,952 \text{ [mPa} \cdot \text{s]}$  [43]. También, se consideró atribuir esta diferencia de velocidad a las cargas eléctricas que se han añadido en el líquido y a su diferente esfera de hidratación. La cantidad de sales añadida, 1 M, es significativa.

### 4.3. Estimación de Costos

Bajo el mismo fundamento teórico se pueden construir diferentes modelos de pinzas ópticas de acuerdo a las necesidades de la investigación en la que se aplica. Es por eso que generalmente la construcción de una pinza óptica se la realiza adquiriendo todos los elementos en diferentes casas comerciales. Al momento, entre los distribuidores más conocidos de elementos ópticos se encuentra la distribuidora Thorlabs [44], que cuenta con un kit de pinza óptica que puede ser modificado ya que no es obligación adquirir todos los elementos del kit, todo dependerá de la finalidad requerida.

Se realizó una comparación entre la pinza óptica implementada en este proyecto y dos pinzas ópticas construidas en otros centros de investigación. Se tomó como referencia la pinza óptica del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) Figura 4.7 [4] y la pinza óptica del departamento de Física del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) Figura 4.8 [45]. Se compararon las tres pinzas

ópticas en cuanto a los elementos constitutivos más importantes de cada sección, como se muestra en la Tabla 4.3. También, se elaboró una lista de precios de los elementos detallados para cada pinza óptica, Tabla 4.4, Tabla 4.5 y Tabla 4.6. Cabe mencionar que en los elementos adicionales de montura se asumió el mismo valor para todas las pinzas ya que en las referencias tomadas no se detallan las características de los elementos usados, sin embargo, esta consideración es adecuada ya que los elementos utilizados para el montaje son generalmente los mismos en todas las pinzas.

**Tabla 4.3** Referencia de elementos usados en sistemas de pinza óptica de la EPN, INAOE y MIT

	<b>Pinza óptica EPN</b>	<b>Pinza óptica INAOE</b>	<b>Pinza óptica MIT</b>
<b>Fuente de láser</b>	-Láser rojo $\lambda=658$ nm, P~68 mW con su fuente de alimentación cargador AC	-Láser de Nd:YAG con longitud de onda $\lambda=1064$ nm.	-Un láser de diodo intenso de 330 mW que produce luz coherente de 975 nm (infrarrojo) empaquetado con una fibra óptica integrada.
<b>Sección de expansión láser</b>	-Lente plano convexo F=10cm (x1) -Espejos plateados planos circulares (x2) -Elementos adicionales de montura	-Dos espejos plateados planos -Un espejo dicróico (SM2-47950 de Edmund) -Elementos adicionales de montura	-Un microposicionador FiberPort -Dos lentes planos convexos -Un espejo giratorio de 45 grados -Tres espejos plateados planos -Elementos adicionales de montura
<b>Sección de microscopía y observación</b>	-Cámara monocromática CMOS DMM 37UX273-ML (x1) - Filtro pasa altos de >750 nm (x1) -Objetivo de microscopio 100X - N.A 1.25 oil (x1) - Fuente de iluminación para muestra lámpara IR (x1) -Lente plano convexo F=4,5cm (x1) -Divisor de Haz CM1-BS013 de 400-700 nm 50:50 (x1) -Elementos adicionales de montura	-Una cámara CCD -Una lámpara de LED's para iluminar muestra -Un objetivo de microscopio 100X con apertura numérica 1.25 -Un condensador de 25.4 mm de diámetro y distancia focal f= 50 mm (LA1131-B de Thorlabs). -Un dicróico (SM2-47950 de Edmund) -Un lente de 25.4 mm de diámetro y distancia focal f1=100 mm (LA1509-B de Thorlabs) -Un detector de cuadrante PSD (Position Sensitive Detector) de 2 dimensiones (HAMAMATSU S5990-01) -Tarjeta de adquisición de datos SCB-68 -Elementos adicionales de montura y sistema eléctrico.	-Una cámara CCD. -Un LED blanco para iluminar muestra. -Un objetivo de inmersión en aceite Nikon 100X (CDI4390) -Un objetivo Nikon (CDI4391) -Dos filtros dicróicos Edmund -Un fotodetector de cuadrante (QPD) -Un filtro de densidad neutra -Tarjeta de adquisición de datos USB-622 -Elementos adicionales de montura y sistema eléctrico.

**Tabla 4.4** Lista de precios de los elementos detallados para pinza óptica de la EPN

	<b>Descripcion</b>	<b>Costo</b>
<b>FUENTE DE LASER</b>	642 nm, 80 mW, Ø5.6 mm, A Pin Code, Laser Diode	\$208,85
	Laser Diode Socket for Ø5.6 mm Laser, 3 Pin	\$5,95
	Collimation Tube with Optic for Ø5.6 and Ø9 mm Laser Diodes, f = 4.51 mm, NA = 0.55, AR Coated: 650 - 1050 nm	\$134,18
	Fuente de Alimentación AC	\$5,00
		<b>\$353,98</b>
<b>EXPANSION LASER</b>	Plano-Convex Lens, Ø1", f = 100 mm, AR Coating: 350 - 700 nm	\$33,55
	Ø1" Protected Silver Mirror	\$107,16
		<b>\$140,71</b>
<b>MICROSCOPIA Y OBSERVACION</b>	Imaging Source DMM 37UX273-ML USB 3.1 Monochrome Board Camera	\$369,00
	Longpass Filter, Cut-On Wavelength: 750 nm	\$80,52
	Objetivo p/contraste de fase CCIS EC-H PL Ph100X, AN 1,25	\$338,00
	Fuente de iluminación para muestra lámpara IR	\$13,49
	Lente plano convexo F=4,5cm	\$36,18
	Divisor de Haz CM1-BS013 de 400-700 nm 50:50 (x1)	\$229,41
		<b>\$1.066,60</b>
<b>ELEMENTOS ADICIONALES DE MONTURA</b>	Right-Angle Kinematic Mirror Mount	\$294,58
	Lens Tube, 1.00"	\$29,36
	Ø1/2" Optical Post	\$16,74
	Ø1/2" Post Holder	\$25,56
	BA1/M - Mounting Base	\$17,31
	SM1-Threaded 30 mm Cage Plate	\$29,95
	Cage Assembly Rod, 10" Long, Ø6 mm	\$52,32
	Lens Tube Flexure Sleeve Coupler, 1.0" Long	\$73,58
	Cage Alignment Plate with Ø0.9 mm Hole	\$13,52
	30 mm Cage Cube-Mounted Non-Polarizing Beamsplitter, 400 - 700 nm, M4 Tap	\$296,50
	SM1-Threaded 30 mm Cage Plate	\$119,80
	Slip-On Post Clamps	\$101,49
	Dynamically Damped Post	\$219,67
	Translation Stage with 1/4"-170 Adjuster	\$710,40
	Right-Angle Bracket	\$54,65
	Base Plate for MT Series Translation Stages	\$25,10
	Cage Assembly Rod, 3" Long	\$54,40
	platina sujetadora	\$576,29
	tornillos y extras	\$150,00
		<b>\$2.861,22</b>
<b>TOTAL</b>		<b>\$4.422,51</b>

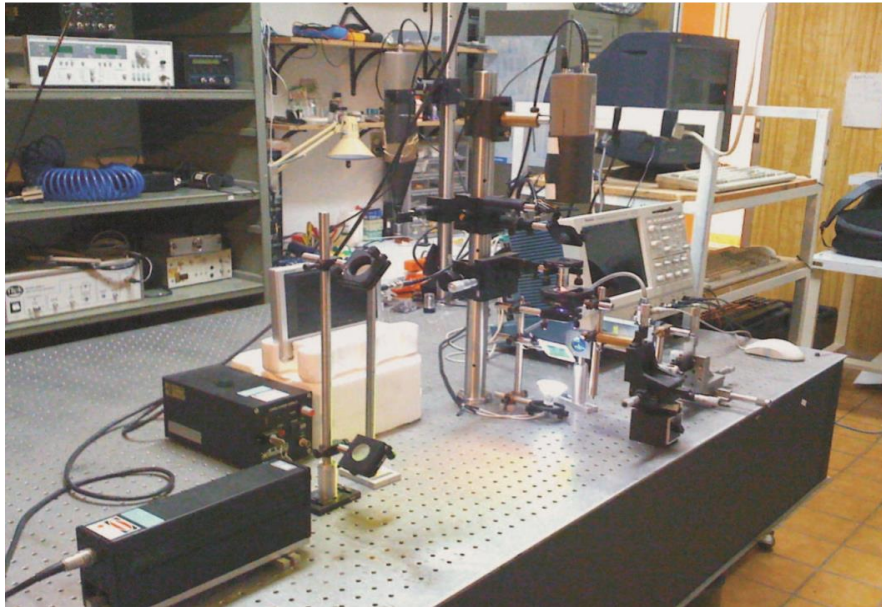
**Tabla 4.5** Lista de precios de los elementos detallados para pinza óptica del INAOE

	<b>Descripcion</b>	<b>Costo</b>
<b>FUENTE DE LASER</b>	Láser de Nd:YAG con longitud de onda $\lambda=1064$ nm	\$1.100,00
		<b>\$1.100,00</b>
<b>EXPANSION LASER</b>	Ø1" Protected Silver Mirror	\$107,16
	Un espejo dicroico (SM2-47950 de Edmund)	\$120,00
		<b>\$227,16</b>
<b>MICROSCOPIA Y OBSERVACION</b>	camara ccd	\$406,20
	Longpass Filter, Cut-On Wavelength: 750 nm	\$80,52
	Cold White LED Array Light Source	\$351,52
	Objetivo p/contraste de fase CCIS EC-H PL Ph100X, AN 1,25	\$338,00
	Plano-Convex Lens, Ø1", f = 50 mm	\$22,92
	Un espejo dicroico (SM2-47950 de Edmund)	\$120,00
	LA1509-B	\$21,75
	HAMAMATSU S5990-01	\$200,00
	SCB68	\$351,87
		<b>\$1.892,78</b>
<b>ELEMENTOS ADICIONALES DE MONTURA</b>	Right-Angle Kinematic Mirror Mount	\$294,58
	Lens Tube, 1.00"	\$29,36
	Ø1/2" Optical Post	\$16,74
	Ø1/2" Post Holder	\$25,56
	BA1/M - Mounting Base	\$17,31
	SM1-Threaded 30 mm Cage Plate	\$29,95
	Cage Assembly Rod, 10" Long, Ø6 mm	\$52,32
	Lens Tube Flexure Sleeve Coupler, 1.0" Long	\$73,58
	Cage Alignment Plate with Ø0.9 mm Hole	\$13,52
	30 mm Cage Cube-Mounted Non-Polarizing Beamsplitter, 400 - 700 nm, M4 Tap	\$296,50
	SM1-Threaded 30 mm Cage Plate	\$119,80
	Slip-On Post Clamps	\$101,49
	Dynamically Damped Post	\$219,67
	Translation Stage with 1/4"-170 Adjuster	\$710,40
	Right-Angle Bracket	\$54,65
	Base Plate for MT Series Translation Stages	\$25,10
	Cage Assembly Rod, 3" Long	\$54,40
	platina sujetadora	\$576,29
	tornillos y extras	\$150,00
		<b>\$2.861,22</b>
<b>TOTAL</b>		<b>\$6.081,16</b>

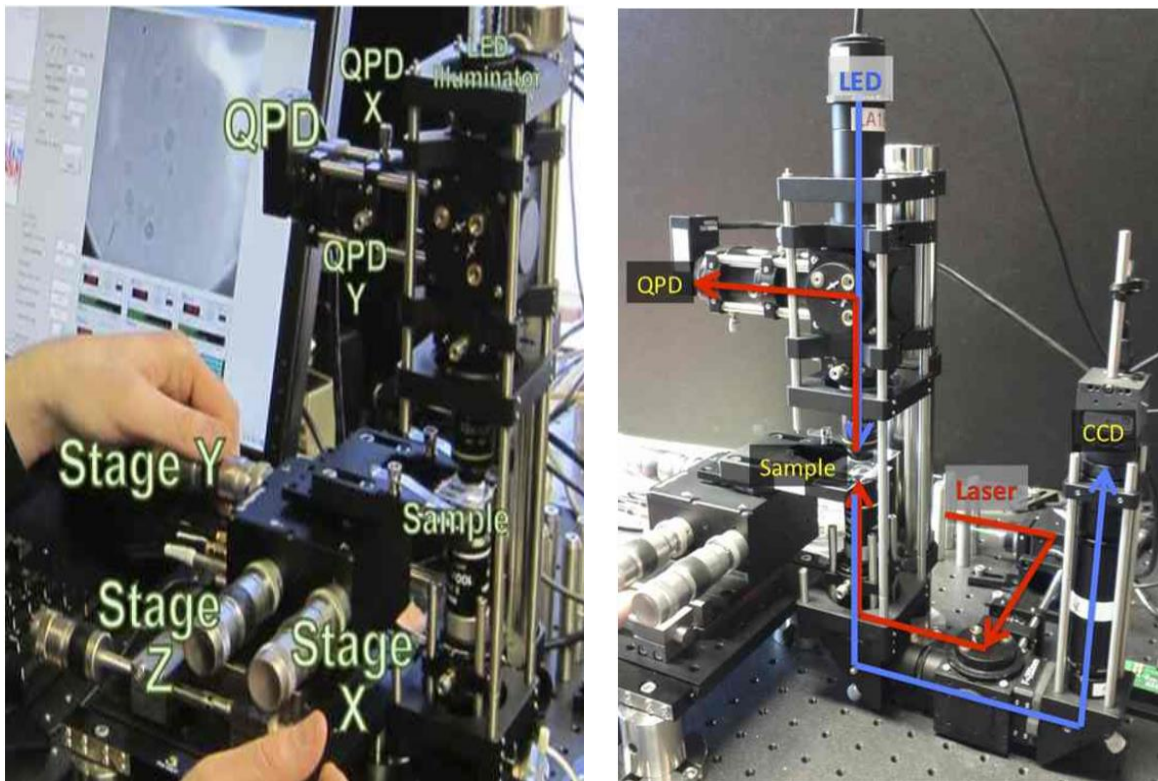
**Tabla 4.6** Lista de precios de los elementos detallados para pinza óptica del MIT

	<b>Descripcion</b>	<b>Costo</b>
<b>FUENTE DE LASER</b>	Un láser de diodo intenso de 330 mW que produce luz coherente de 975 nm (infrarrojo) empaquetado con una fibra óptica integrada	\$990,00
		<b>\$990,00</b>
<b>EXPANSION LASER</b>	Un microposicionador FiberPort	\$626,12
	Plano-Convex Lens, Ø1", f = 100 mm, AR Coating: 350 - 700 nm	\$67,10
	DC Motorized Ultra-Stable Kinematic Ø1" Mirror Mount	\$1.422,67
	Ø1" Protected Silver Mirror	\$160,74
		<b>\$2.276,63</b>
<b>MICROSCOPIA Y OBSERVACION</b>	camara ccd	\$406,20
	Cold White LED Array Light Source	\$351,52
	Objetivo p/contraste de fase CCIS EC-H PL Ph100X, AN 1,25	\$676,00
	Un espejo dicroico (SM2-47950 de Edmund)	\$240,00
	HAMAMATSU S5990-01	\$200,00
	neutral density filter	\$110,16
	DAQ	\$425,00
	actuador piezoelectrico	\$795,69
	<b>\$3.204,57</b>	
<b>ELEMENTOS ADICIONALES DE MONTURA</b>	Right-Angle Kinematic Mirror Mount	\$294,58
	Lens Tube, 1.00"	\$29,36
	Ø1/2" Optical Post	\$16,74
	Ø1/2" Post Holder	\$25,56
	BA1/M - Mounting Base	\$17,31
	SM1-Threaded 30 mm Cage Plate	\$29,95
	Cage Assembly Rod, 10" Long, Ø6 mm	\$52,32
	Lens Tube Flexure Sleeve Coupler, 1.0" Long	\$73,58
	Cage Alignment Plate with Ø0.9 mm Hole	\$13,52
	30 mm Cage Cube-Mounted Non-Polarizing Beamsplitter, 400 - 700 nm, M4 Tap	\$296,50
	SM1-Threaded 30 mm Cage Plate	\$119,80
	Slip-On Post Clamps	\$101,49
	Dynamically Damped Post	\$219,67
	Translation Stage with 1/4"-170 Adjuster	\$710,40
	Right-Angle Bracket	\$54,65
	Base Plate for MT Series Translation Stages	\$25,10
	Cage Assembly Rod, 3" Long	\$54,40
	platina sujetadora	\$576,29
	tornillos y extras	\$150,00
		<b>\$2.861,22</b>
<b>TOTAL</b>		<b>\$9.332,42</b>





**Figura 4.7** Pinza óptica del INAOE usada para la medición de la constante elástica  $k$  en un sistema de pinzas ópticas usando el método de densidad espectral de potencia (Tomado de [4]).



**Figura 4.8** Pinza óptica del MIT usada para medir el movimiento browniano de una microesfera de sílice atrapada en solución acuosa (Tomado de [45]).



Los costos antes detallados son aproximados tomando en cuenta que en las pinzas referenciadas no se detallan con precisión los elementos usados en sus sistemas. Sin embargo, es evidente que el costo de la pinza óptica implementada en la EPN es relativamente más bajo a los costos de las pinzas del INAOE y MIT. Además, al revisar los elementos usados en las tres pinzas se pudo constatar que el sistema de pinza óptica de la EPN se puede reajustar con mayor facilidad a cualquier cambio de elementos a diferencia de las otras pinzas que presentan mayor complejidad al combinar más cantidad de elementos ópticos y electrónicos.

Finalmente, cabe indicar que no se puede comparar entre las tres pinzas ópticas aspectos físicos más específicos ya que como se indicó anteriormente fueron construidas bajo otras condiciones y se han aplicado en ensayos distintos a los realizados en este proyecto.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en “Discussions on Nano and Mesoscopic Optics DINAMO 2019” organizado por la Universidad San Francisco de Quito del 22 al 26 de abril del 2019.

## 5. CONCLUSIONES

Se implementó exitosamente un sistema de pinza óptica usando elementos del Laboratorio de Espectroscopía Óptica y Espectrometría de Masas de la Escuela Politécnica Nacional tal como se indica en la sección 3.1 y Figura 3.2 del presente trabajo. El sistema de pinza óptica que se implementó en este proyecto es capaz de capturar y manipular micropartículas. Esta herramienta es de costo competitivo al usar elementos comunes de un laboratorio de óptica y software de acceso libre. Se emplearon elementos de bajo costo, como por ejemplo una cámara con sensor CMOS, para reducir considerablemente el costo final del sistema. El costo comercial de otros sistemas de pinzas ópticas con elementos más sofisticados puede oscilar entre \$6000 a \$10000, mientras que el sistema implementado en este proyecto tiene un costo aproximado de \$4500.

Se determinaron las condiciones óptimas para el funcionamiento de la pinza después de varios ensayos sistemáticos. Las principales condiciones establecidas fueron: obtener un láser colimado y alineado en todo su camino óptico, usar la menor cantidad de elementos ópticos posibles para evitar tener pérdidas de potencia innecesarias, obtener una potencia de láser  $\geq 1$  mW en el plano focal del objetivo de microscopio. Además, se determinó que la configuración de microscopio invertido era la más adecuada para los propósitos de este trabajo.

Se demostró el funcionamiento de la pinza óptica a partir de los registros en video tomados sobre muestras de micropartículas de poliestireno. Se evidenció la captura y manipulación de las partículas al desplazarlas de una posición a otra en el plano de muestra.

Se determinó que la máxima rigidez que la pinza óptica puede alcanzar para capturar partículas es de  $105,7084 \frac{\text{fN}}{\text{nm}}$  para una muestra en agua y de  $85,918 \frac{\text{fN}}{\text{nm}}$  para una muestra en solución de NaCl a una potencia máxima del haz láser de 17,7 mW. Las diferencias se han atribuido a los efectos de la diferente viscosidad y la cantidad de cargas presentes en la solución salina. Estos resultados, han permitido determinar que la rigidez de la pinza no solo depende de la potencia del láser

utilizado, sino de la presencia o no de sales disueltas en el solvente, y posiblemente de otros factores del mismo; esto es, del sistema completo. Esta influencia del solvente en la captura de partículas abre las puertas para realizar a futuro estudios específicos novedosos de las interacciones en diferentes sistemas láser-solvente-partícula.

Los métodos numéricos usados para cuantificar las propiedades del sistema se basaron en los métodos de desplazamiento cuadrático medio (MSD) y de función de autocorrelación (ACF). Estos métodos entregaron resultados adecuados y en razonable acuerdo con valores reportados en la literatura.

Se elaboró un manual de uso de la pinza óptica anexo al final de este trabajo. Este manual detalla los elementos utilizados, los pasos a seguir para realizar el montaje, las indicaciones para alinear el sistema y el procedimiento para ponerlo en uso.

En definitiva, el sistema de pinza óptica implementado por primera vez en el Ecuador se encuentra funcional y puede ser usado con otro tipo de muestras en nuevas investigaciones.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Philip, M. Onofrio y G. Volpe, *Optical Tweezers Principles and Applications*, Reino Unido : Cambridge University Press, 2015.
- [2] J. Kepler, *De Cometis libelli tres*, 1619.
- [3] A. Ashkin, «Acceleration and trapping of particles by radiation pressure,» *Physical review letters*, vol. 24, nº 4, pp. 156-159, 1970.
- [4] J. Padilla, *Medición de la constante elástica k en un sistema de pinzas ópticas usando el método de densidad espectral de potencia*, Tonantzintla, Puebla: INAOE, 2009.
- [5] A. Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm y S. Chu, «Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles,» *Optics letters*, vol. 11, nº 5, pp. 288-290, 1986.
- [6] R. Agayan, F. Gittes, R. Kopelman y C. Schmidt, «Optical trapping near resonance absorption,» *Applied optics* , vol. 41, nº 12, pp. 2318-2327, 2002.
- [7] I. RICARDEZ V., E. E. OROZCO G. y J. A. HERNÁNDEZ N., «Optical Tweezers, An Effective Tool For Micromanipulation,» *FARAUTE Ciens. y Tec.*, vol. 3, nº 1, pp. 25-30, 2008.
- [8] S. Torres, *Atrapamiento y manipulación óptica para aplicaciones biológicas*, Tonantzintla, Puebla: INAOE, 2016.
- [9] C. Bustamante, J. Marko, E. Siggia y S. Smith, «Entropic Elasticity of Lambda-Phage DNA,» *Science* , vol. 265, pp. 1599-1600, 1994.
- [10] A. Ashkin y J. Dziedzic, «Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria,» *Science* , vol. 235, pp. 1517-1520, 1987.
- [11] D. Appleyard, K. Y. Vandermeulen, H. Lee y M. J. Lang, «Optical trapping for undergraduates,» *American Journal of Physics*, vol. 75, nº 1, pp. 5-14, 2007.
- [12] D. G. Grier, «A revolution in optical manipulation,» *Nature* , vol. 424, pp. 810-816, 2003.
- [13] J. M. Nascimento, E. L. Botvinick, L. Z. Shi, B. Durrant y M. W. Berns, «Analysis of sperm motility using optical tweezers,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 11, nº 4, pp. 1-8, 2006.

- [14] Anónimo, «Block lab at Stanford University,» Block lab at Stanford University, 18 Marzo 2019. [En línea]. Available: [https://blocklab.stanford.edu/optical\\_tweezers.html](https://blocklab.stanford.edu/optical_tweezers.html). [Último acceso: 05 Noviembre 2019].
- [15] A. Ashkin, «Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere,» *Biophysical Journal*, vol. 61, pp. 569-582, 1992.
- [16] C. F. Bohren y D. R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, New York: Wiley, 1998.
- [17] C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc y G. Grynberg, *Photons and Atoms: Introduction to Quantum Electrodynamics*, New York: Wiley, 1995.
- [18] E. Hecht, *Optics*, San Francisco : Addison Wesley, 2002.
- [19] Y. Chang, L. Hsu y S. Chi, «Optical trapping of a spherically symmetric sphere in the,» *APPLIED OPTICS*, vol. 45, n° 16, pp. 3885-3892, 2006.
- [20] Spherotech, «Characteristics of Polystyrene Particles-Spherotech,» Spherotech, 2019. [En línea]. Available: <https://www.spherotech.com/particle.html>. [Último acceso: 12 Noviembre 2019].
- [21] A. C. Philips, *Introduction to Quantum Mechanics*, Mánchester: Wiley, 2003.
- [22] R. Eisberg y R. Resnick, *Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei and Particles*, Santa Barbara : University of California, 1974.
- [23] A. Ashkin y J. M. Dziedzic, «Radiation Pressure on a Free Liquid Surface,» *Physical Review Letters* , vol. 30, n° 4, pp. 139-142, 1972.
- [24] S. Barnett, «Resolution of the Abraham-Minkowski Dilemma,» *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, vol. PRL 104, n° 7, p. 070401(4), 2010.
- [25] J. D. Jackson, *Classical electrodynamics*, New York : Wiley , 1999.
- [26] N. Correa, *MANIPULACIÓN DE OBJETOS MICROMÉTRICOS POR*, Medellín: Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, 2012.
- [27] N. Wilke, «Pinzas ópticas y su aplicación en biología,» Universidad Nacional de Cordoba-Facultad de Ciencias Químicas, Córdoba , 2013.
- [28] D. L. Ermak y J. A. McCammon, «Brownian dynamics with hydrodynamic interactions,» *J. Chem. Phys.*, vol. 69, pp. 1352-1360, 1978.

- [29] G. Volpe, G. Kozyreff y D. Petrov, «Backscattering position detection for photonic force microscopy,» *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, vol. 102, nº 084701, pp. 1-12, 2007.
- [30] F. Simon, Tolić-Nørrelykke, E. Schäffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher y e. al., «Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal,» *American Institute of Physics*, vol. 77, nº 103101, pp. 1-11, 2006.
- [31] K. Berg-Sørensen y H. Flyvbjerg, «Power spectrum analysis for optical tweezers,» *AIP Publishing LLC*, vol. 75, nº 3, pp. 594-612, 2004.
- [32] J. C. CROCKER y D. G. GRIER, «Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies,» *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vol. 179, nº 0217, p. 298–310, 1996.
- [33] I. Sbalzarini y P. Koumoutsakos, «Feature point tracking and trajectory analysis,» *Journal of Structural Biology*, vol. 151, p. 182–195, 2005.
- [34] F. Czerwinski, A. C. Richardson y L. B. Oddershede, «Quantifying Noise in Optical Tweezers,» *OPTICS EXPRESS*, vol. 17, nº 15, pp. 13255-13269, 2009.
- [35] G. Volpe y G. Volpe, «Simulation of a Brownian particle in an optical trap,» *Am. J. Phys.*, vol. 81, nº 3, pp. 224-230, 2013.
- [36] Thorlabs, «Portable Optical Tweezers-User Guide,» New Jersey, 2016.
- [37] T. I. Source, «TheImagingSource Technology Based on Standards,» 1990. [En línea]. Available: <https://www.theimagingsource.com/products/board-cameras/usb-3.1-monochrome/dmm37ux273ml/>. [Último acceso: 18 Febrero 2020].
- [38] TecnoEdu, «TecnoEdu - Tecnología Educativa s.a.,» [En línea]. Available: <https://tecnoedu.com/Microscopios/1101001706511.php>. [Último acceso: 5 Diciembre 2019].
- [39] L. R. Tsurata y A. M. Carmona-Ribeiro, «Counterion Effects on Colloid Stability of Cationic Vesicles and Bilayer-Covered Polystyrene Microspheres,» *J. Phys. Chem*, vol. 100, nº 17, pp. 7130-7134, 1996.
- [40] J. Philip, M. Onofrio y G. Volpe, «Optical Tweezers: Principles and Applications,» Diciembre 2015. [En línea]. Available: <http://opticaltweezers.org/>. [Último acceso: 5 Febrero 2020].
- [41] LibreTexts, «Propagation of Error,» 5 Junio 2019. [En línea]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Module](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Module)

s\_(Analytical\_Chemistry)/Quantifying\_Nature/Significant\_Digits/Propagation\_of\_Error. [Último acceso: 9 Abril 2020].

- [42] H. Ozbek, «VISCOSITY OF AQUEOUS SODIUM CHLORIDE SOLUTIONS FROM 0 - 150oC,» 10 Septiembre 2010. [En línea]. Available: <https://escholarship.org/uc/item/3jp6n2bf>. [Último acceso: 12 Mayo 2020].
- [43] Laboteca, «Agua Desionizada,» Laboteca corporation, [En línea]. Available: <https://www.laboteca.com.mx/products/agua-desionizada>. [Último acceso: 12 Mayo 2020].
- [44] ThorLabs, «Portable Optical Tweezers Educational Kit: ThorLabs,» 10 Febrero 2014. [En línea]. Available: [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=6966](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=6966). [Último acceso: 10 Julio 2020].
- [45] MIT, «Optical Trapping,» 11 Agosto 2017. [En línea]. Available: <http://web.mit.edu/8.13/www/JLExperiments/JLExp51.pdf>. [Último acceso: 10 Julio 2020].

# ANEXOS

## Anexo 1

### Código para el preprocesamiento de los registros en video

```
%% Inicializacion del codigo
clear all;
close all;
clc;
OTS;
clc;
% Corte de las imagenes
archivo_referencia=input('Ingrese el nombre de la imagen de referencia
(.bmp): ','s');
ref = imread(archivo_referencia); %Lectura de la imagen
[J1, rect] = imcrop(ref); %Seleccion de la region de interes
close('all'); %Cierra la ventana de corte
ref_cortada = imcrop(ref,rect); %Corte de la imagen
% Creacion del archivo TIFF
archivo_video=input('Ingrese el nombre del video (.avi): ','s');
video=VideoReader(archivo_video); %Lectura del video
archivo_background=input('Ingrese el nombre de la imagen de fondo(.bmp):
','s');
back=imread(archivo_background);
back_cortado = imcrop(back,rect);
for img = 1:1:(video.Duration*video.FrameRate)
    b = read(video,img);
    b2=imcrop(b,rect);
    gris = rgb2gray(b2); % Convert to gray level
    gris2=imcomplement(gris);
    fondo2=imcomplement(back_cortado);
    diferencia_imagen = gris2 - uint8(fondo2);
    if img == 1
        imwrite(diferencia_imagen, 'corte.TIFF');
    else
        imwrite(diferencia_imagen, 'corte.TIFF', 'writemode', 'append');
    end
    aux=round(video.NumberOfFrames/4);
    if img == aux
        imwrite(diferencia_imagen, 'imagen1.bmp');
    end
    if img == (2*aux)
        imwrite(diferencia_imagen, 'imagen2.bmp');
    end
    if img == (3*aux)
        imwrite(diferencia_imagen, 'imagen3.bmp');
    end
end
end
```



## Anexo 2

### Código para el cálculo de la trayectoria de la partícula atrapada con el método de microscopía de video digital DVM

```
%% Ingreso de los valores que pueden ser modificados
archivo_tiff='corte.TIFF';
fps=round(video.FrameRate);
frames=video.Duration*video.FrameRate;
portion=input('Ingrese el intervalo de frames para analizar: ');
radio_min=input('Ingrese el radio mínimo de la partícula (pixeles): ');
radio_max=input('Ingrese el radio máximo de la partícula (pixeles): ');
Thresh=input('Ingrese el valor del brillo de fondo: ');

% Microscopía de Video Digital-DVM
fr = fps; %frames/segundo ver en propiedades-detalles del video
video2 = VideoFileTif(fr, 'FileName', archivo_tiff); % Load video file
dvm = DVM2DThreshold(video2); % Create DVM

% Tracking
dvm = dvm.tracking('verbose', true, ...
    'displayon', true, ...
    'FramesToTrack', 65591, ... %Colocar al numero de frames del archivo
    .tif que esta leyendo-frames
    'VideoPortion', portion, ... %cambiar intervalos de frames como tengo
    menos frames poner menos intervalos va de 10 en 10 'color', 3, ...
    'MinParticleRadius', radio_min, ... % poner en pixeles MANUAL -3
    'MaxParticleRadius', radio_max, ... % poner en pixeles MANUAL -12
    'PositiveMask', true, ... %positive (true,default) or negative
    (false) mask
    'Threshold', Thresh, ... %brillo de fondo (default=124 no sirve toma
    solo el láser)
    'ErodeRadius', 11, ... %diameter = 2*erodeRadius + 1(en pixeles)
    size of the structure element for erosion-2
    'DilateRadius', 11); %diameter = 2*dilateRadius + 1(en pixeles)
    size of the structure element for dilation-2

% Tracing
dvm = dvm.tracing('verbose', true, ...
    'displayon', true, ... %Whether to display figure [default = false]
    'MaxDistance', 5, ... %Maximum distance between objects in
    consecutive frames [default = 5 pixels]
    'MaxHiatus', 1); %Maximum number of frames that can be
    skipped [default = 1 frame]

% Lectura y formato de los resultados
load('Resultados.mat');
close(3)
% Para las posiciones en X
aux_pos_x = {Trace(1).X}.'; %Trace(1).X toma los datos de la primera fila
de X
tam = size(aux_pos_x);
for aux=1:1:tam(1)
    if aux == 1
        a_x=(cell2mat(aux_pos_x(aux))).';
    else
        b_x=(cell2mat(aux_pos_x(aux))).';
    end
end
```

```

        a_x=[a_x;b_x];
    end
end
Vx = a_x;
% Para las posiciones en Y
aux_pos_y = {Trace(1).Y}.';
tam = size(aux_pos_y);
for aux=1:1:tam(1)
    if aux == 1
        a_y=(cell2mat(aux_pos_y(aux))).';
    else
        b_y=(cell2mat(aux_pos_y(aux))).';
        a_y=[a_y;b_y];
    end
end
end
Vy = a_y;

% Crear el archivo para el calculo de la fuerza
clc;
a_aux=input('Ingrese el radio de la particula atrapada (micrometros): ');
a=(a_aux)*(10^-06);
dt=1*(10^-5);
eta=input('Ingrese el valor de la viscosidad del medio (kg/ms) (#*(10^-
#)): ');
T=input('Ingrese el valor de la temperatura ambiente (°K): ');
save Datos a dt eta T Vx Vy; %%%Guarda datos en archivo Datos.mat
clc

```

## Anexo 3

### Código para el cálculo de la rigidez de la pinza mediante el análisis de desplazamiento cuadrático medio MSD

```

%% Calibración utilizando el método de desplazamiento cuadrado medio-MSD
clc;
load('Datos.mat');
% Normalizacion de las señales
Vx = Vx - repmat(mean(Vx),size(Vx,1),1);
% Potencial de calibracion
Sx = 100e-9; %Factor de conversión de unidades de longitud-INGRESO MANUAL
otc_msd = OTCalibMSD(Vx,Sx,dt,a,eta,T);
otc_msd = otc_msd.calibrate( ...
    'taumax', 0.01, ... %
    'verbose',true, ...
    'displayon',false ...
);
otc_msd = otc_msd.set_au2m(otc_msd.Sx_fit);
otc_msd = otc_msd.calibrate( ...
    'taumax', 0.01, ...
    'verbose',true, ...
    'displayon',true ...
);

```

## Código para el cálculo de la rigidez de la pinza mediante el análisis de función de autocorrelación ACF

```
%% Initialization of the workspace
clear all;
close all;
clc;

%% Load data file
load('Datos.mat');

%% Normalize signals
Vx = Vx - repmat(mean(Vx),size(Vx,1),1);

%% Calibration Potential
Sx = 100e-9;
otc_acf = OTCalibACF(Vx,Sx,dt,a,eta,T);
otc_acf = otc_acf.calibrate( ...
    'threshold', 0.1, ...
    'taumax', 0.01, ...
    'verbose', true, ...
    'displayon', false ...
);
otc_acf = otc_acf.set_au2m(otc_acf.Sx_fit);
otc_acf = otc_acf.calibrate( ...
    'threshold', 0.1, ...
    'taumax', 0.01, ...
    'verbose', true, ...
    'displayon', true ...
);
```

## Anexo 4

Cálculo de errores de  $k_x$  para cada muestra en los métodos MSD y ACF en la prueba de captura

### PROPAGACIÓN DE ERRORES-MSD

Según el método de Desplazamiento Cuadrado Medio-MSD el valor de  $k_x$  se puede obtener de la siguiente función:

$$MSD_x(\tau) = 2 \frac{k_B T}{k_x} \left[ 1 - e^{-\frac{|\tau|}{\tau_{ot,x}}} \right] \quad (1)$$

Donde:  $\tau_{ot,x} = \frac{\gamma}{k_x}$  y  $\gamma = 6\pi\eta a$

Experimentalmente, se usa la siguiente serie temporal para obtener valores de MSD a tiempos discretos ( $\tau_k = k \Delta t$ ).

$$MSD_{x,k} = \frac{1}{N-k} \sum_{j=1}^{N-k} [x_{j+k} - x_j]^2 \quad (2)$$

- ✓ Se entiende que los valores de  $MSD_{x,k}$  calculados con las posiciones en (2) guardan la incertidumbre en la determinación de la posición.

Aplicando la teoría de Propagación de errores en (1)

- ✓ Tomando en cuenta que (1) a  $\tau \gg \tau_{ot,x}$  se estabiliza a un valor constante.

Entonces:

$$MSD = 2 \frac{k_B T}{k_x}$$

$$k_x = \frac{2k_B T}{MSD} \quad (3)$$

$$\frac{dk_x}{dMSD} = \frac{-2k_B T}{MSD^2} \quad (4)$$

Sea la formula exacta para propagación de errores:

$$\sigma_x^2 = \left( \frac{\delta x}{\delta a} \right)^2 \sigma_a^2 + \left( \frac{\delta x}{\delta b} \right)^2 \sigma_b^2 + \left( \frac{\delta x}{\delta c} \right)^2 \sigma_c^2$$

Para nuestro caso  $\sigma_{k_x}^2 = \left( \frac{dk_x}{dMSD} \right)^2 \sigma_{MSD}^2$  y como (3) es una división, conduce a una desviación estándar relativa, entonces:

$$\frac{\sigma_{k_x}^2}{k_x^2} = \frac{1}{k_x^2} \left( \frac{dk_x}{dMSD} \right)^2 \sigma_{MSD}^2$$

Usando (3) y (4)

$$\left( \frac{\sigma_{k_x}}{k_x} \right)^2 = \left( \frac{MSD}{2k_B T} \right)^2 \left( \frac{2k_B T}{MSD^2} \right)^2 \sigma_{MSD}^2$$

$$\frac{\sigma_{k_x}}{k_x} = \frac{\sigma_{MSD}}{MSD} \quad (5)$$

- ✓ Entonces, convolucionando todos los errores en la determinación de la posición: error de MSD ( $\sigma_{MSD}$ ), error en el tiempo ( $\sigma_r$ ) y error en la medición del diámetro ( $\sigma_D$ ) de la partícula, tendremos un solo error  $\sigma_T$  que puede ser sustituido en lugar de  $\sigma_{MSD}$  en la ecuación (5), es decir:

$$\sigma_T = \sqrt{\sigma_{MSD}^2 + \sigma_r^2 + \sigma_D^2} \quad (6)$$

$$\langle P \rangle_T = \frac{\langle MSD \rangle + \langle r \rangle + \langle D \rangle}{3} \quad (7)$$

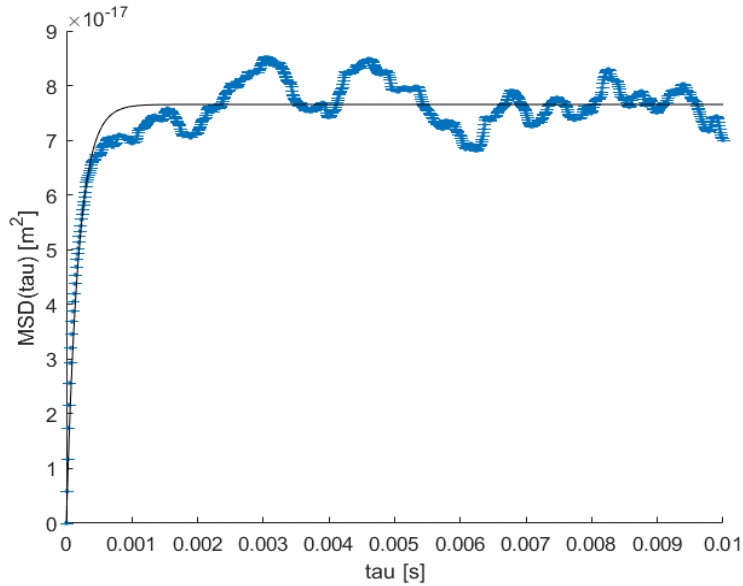
Donde usando (5), (6) y (7) para cada muestra tenemos:

$(m^2)$	Muestra en agua	Muestra en NaCl
$\langle MSD \rangle$	7,65E-17	9,42E-17
$\sigma_{MSD}$	1,33E-35	3,43E-36
$\langle r \rangle$	4,33E-08	5,42E-08
$\sigma_r$	1,04E-09	1,62E-09
$\langle D \rangle$	1,56E-08	2,05E-08
$\sigma_D$	3,00E-09	2,81E-09
$\langle P \rangle_T$	1,96E-08	2,49E-08
$\sigma_T$	3,17E-09	3,24E-09
$k_x$ (fN/nm)	105,7084	85,9189
$\sigma_{k_x}$ (fN/nm)	1,71E+01	1,12E+01
$k_x \pm \sigma_{k_x}$	<b>105,7084 ± 17,1 fN/nm</b>	<b>85,9189 ± 11,2 fN/nm</b>

Simplificando:

$\sigma_{MSD}$  = error obtenido entre curvas experimental y teórica (FIG 4.1)

$\langle MSD \rangle$  = valor medio de MSD donde (1) se estabiliza a una cte



**FIG 4.1** Curvas de ajuste del método MSD

## PROPAGACIÓN DE ERRORES-ACF

Según el método de Función de Autocorrelación-ACF el valor de  $k_x$  se puede obtener de la siguiente función:

$$ACF_x(\tau) = \frac{k_B T}{k_x} e^{-\frac{|\tau|}{\tau_{ot,x}}} \quad (8)$$

Donde:  $\tau_{ot,x} = \frac{\gamma}{k_x}$  y  $\gamma = 6\pi\eta a$

Experimentalmente, se usa la siguiente serie temporal para obtener valores de ACF a tiempos discretos ( $\tau_k = k \Delta t$ ).

$$ACF_{x,k} = \frac{1}{N-k} \sum_{j=1}^{N-k} x_{j+k} x_j \quad (9)$$

- ✓ Se entiende que los valores de  $ACF_{x,k}$  calculados con las posiciones en (9) guardan la incertidumbre en la determinación de la posición.

Aplicando la teoría de Propagación de errores en (8)

- ✓ Tomando en cuenta que para (8) a  $\tau = 0$  el exponencial es igual a 1.

Entonces:

$$ACF = \frac{k_B T}{k_x}$$

$$k_x = \frac{k_B T}{ACF} \quad (10)$$

$$\frac{dk_x}{dACF} = \frac{-k_B T}{ACF^2} \quad (11)$$

Sea la formula exacta para propagación de errores:

$$\sigma_x^2 = \left(\frac{\delta x}{\delta a}\right)^2 \sigma_a^2 + \left(\frac{\delta x}{\delta b}\right)^2 \sigma_b^2 + \left(\frac{\delta x}{\delta c}\right)^2 \sigma_c^2$$

Para nuestro caso  $\sigma_{k_x}^2 = \left(\frac{dk_x}{dACF}\right)^2 \sigma_{ACF}^2$  y como (10) es una división conduce a una desviación estándar relativa, entonces:

$$\frac{\sigma_{k_x}^2}{k_x^2} = \frac{1}{k_x^2} \left(\frac{dk_x}{dACF}\right)^2 \sigma_{ACF}^2$$

Usando (10) y (11)

$$\left(\frac{\sigma_{k_x}}{k_x}\right)^2 = \left(\frac{ACF}{k_B T}\right)^2 \left(\frac{k_B T}{ACF^2}\right)^2 \sigma_{ACF}^2$$

$$\frac{\sigma_{k_x}}{k_x} = \frac{\sigma_{ACF}}{ACF} \quad (12)$$

- ✓ Entonces, convolucionando todos los errores en la determinación de la posición: error de ACF ( $\sigma_{ACF}$ ), error en el tiempo ( $\sigma_r$ ) y error en la medición del diámetro ( $\sigma_D$ ) de la partícula, tendremos un solo error  $\sigma_T$  que puede ser sustituido en lugar de  $\sigma_{ACF}$  en la ecuación (12), es decir:

$$\sigma_T = \sqrt{\sigma_{ACF}^2 + \sigma_r^2 + \sigma_D^2} \quad (13)$$

$$\langle P \rangle_T = \frac{\langle ACF \rangle + \langle r \rangle + \langle D \rangle}{3} \quad (14)$$

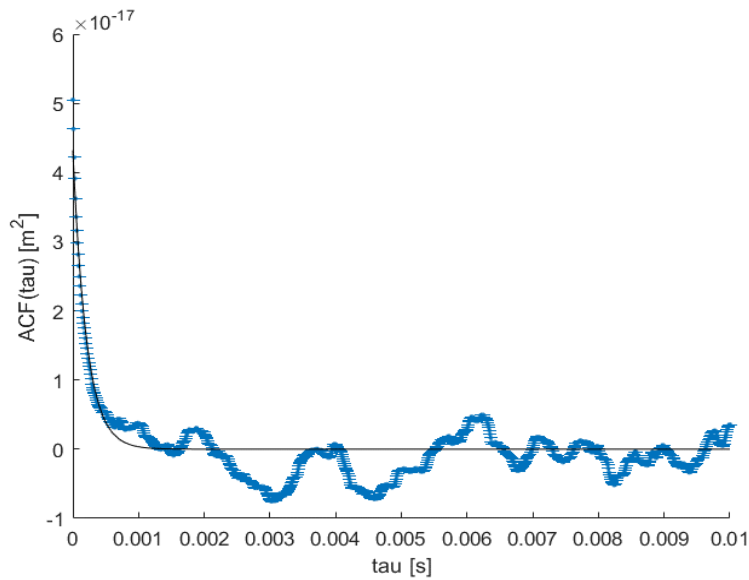
Donde usando (12), (13) y (14) para cada muestra tenemos:

$(m^2)$	Muestra en agua	Muestra en NaCl
$\langle ACF \rangle$	4,32E-17	5,39E-17
$\sigma_{ACF}$	8,94E-36	4,42E-36
$\langle r \rangle$	4,33E-08	5,42E-08
$\sigma_T$	1,04E-09	1,62E-09
$\langle D \rangle$	1,56E-08	2,05E-08
$\sigma_D$	3,00E-09	2,81E-09
$\langle P \rangle_T$	1,96E-08	2,49E-08
$\sigma_T$	3,17E-09	3,24E-09
$k_x$ (fN/nm)	93,618	75,0492
$\sigma_{k_x}$ (fN/nm)	1,51E+01	9,75E+00
$k_x \pm \sigma_{k_x}$	<b>93,618 ± 15,1 fN/nm</b>	<b>75,0492 ± 9,75 fN/nm</b>

Simplificando:

$\sigma_{ACF}$  = error obtenido entre curvas experimental y teórica (FIG 4.2)

$\langle ACF \rangle$  = valor medio de ACF donde (1) se estabiliza a una cte



**FIG 4.2** Curvas de ajuste del método ACF



## Anexo 5

### Cálculo de la velocidad de las partículas por acción de la pinza óptica en la prueba de manipulación

Tomando en cuenta que los videos se grabaron con una velocidad de 110 frames/segundo se midió el desplazamiento que tiene la partícula en cada segundo,  $x_i$ , en los frames originales del video (usando el software ImageJ), para obtener la velocidad de las partículas atrapadas con su respectivo error (ecuación 5.1).

$$\Delta x = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - \langle x \rangle)^2}{n(n-1)}} \quad (5.1)$$

Las medidas y los cálculos se indican en las siguientes tablas para cada muestra.

**Tabla 5.1** Desplazamientos por segundo de partículas de poliestireno en agua desionizada

t (s)	xi (pixeles/s)	xi (µm/s)
Segundo 1	20	69
Segundo 2	32	110,4
Segundo 3	15	51,75
Segundo 4	28	96,6
Segundo 5	27	93,15
Segundo 6	33	113,85
Segundo 7	28	96,6
<b>valor medio <math>\langle x \rangle</math></b>	26,1428571	<b>90,1928571</b>
<b>error cuadrático <math>\Delta x</math></b>	+/- 2,4	<b>+/- 8,4</b>

**Tabla 5.2** Desplazamientos por segundo de partículas de poliestireno en solución de NaCl

t (s)	xi (pixeles/s)	xi (µm/s)
Segundo 1	11	37,95
Segundo 2	30	103,5
Segundo 3	18	62,1
Segundo 4	20	69
Segundo 5	9	31,05
<b>valor medio <math>\langle x \rangle</math></b>	17,6	<b>60,72</b>
<b>error cuadrático <math>\Delta x</math></b>	+/- 3,7	<b>+/- 12,8</b>

## Anexo 6

### Manual de uso de pinza óptica

# **Escuela Politécnica Nacional**

## **Facultad de Ciencias**

### **Carrera de Física**

### **Departamento de Física**

**Eugenia Elizabeth Samaniego Onofre**

## **Manual de Uso de la Pinza Óptica del Laboratorio de Espectroscopía Óptica y Espectrometría de Masas**

**Dr. César Costa Vera Ph.D.**

**Jefe del Laboratorio de Espectroscopía  
Lider del Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy Group (MSOS)**



# Contenido

1.	Introducción.....	2
2.	Descripción general del sistema .....	2
3.	Alineación del haz láser .....	4
4.	Preparación de muestras .....	5
5.	Adquisición de datos .....	6
6.	Análisis de los datos.....	8
7.	ANEXOS .....	15
Anexo 1 .....		15
Código completo para el cálculo de la rigidez de la pinza óptica por los métodos MSD y ACF .....		15
Anexo 2 .....		19
Código modificado del archivo OTCalibMSD.m para el método MSD.....		19
Anexo 3 .....		23
Código modificado del archivo OTCalibACF.m para el método ACF .....		23

# 1. Introducción

El presente manual de uso de la pinza óptica del Laboratorio de Espectroscopía Óptica y Espectrometría de Masas de la EPN contiene información importante que debe ser leída con anticipación antes de poner en funcionamiento dicha herramienta.

Este manual es útil para futuras aplicaciones, se recomienda conservarlo.

	<b>ADVERTENCIA</b>	
<p>El láser usado en esta herramienta es de clase 3B y emite luz a una potencia de 68 mW, el cual puede causar daños en los ojos si se observa directamente. Se recomienda el uso de gafas de seguridad especialmente al momento de alinear el láser.</p>		

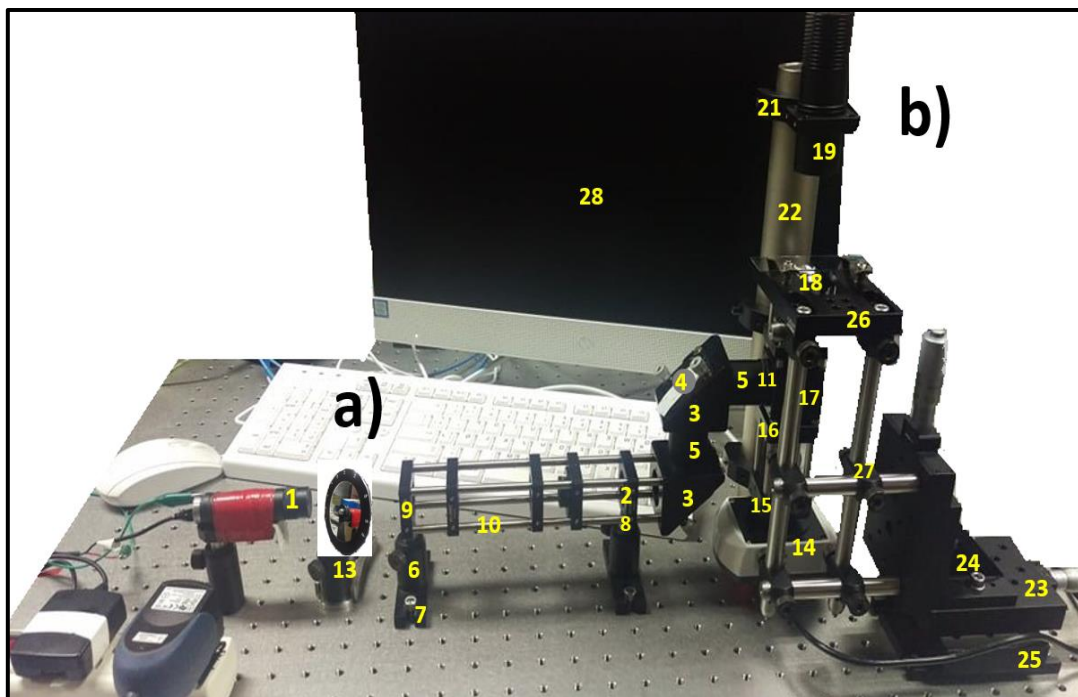
## 2. Descripción general del sistema

El sistema de pinza óptica está formado por los siguientes elementos:

1. Láser rojo  $\lambda = 658 \text{ nm}$ ,  $P \sim 68 \text{ mW}$  (x1)
2. Lente plano convexo  $F = 10 \text{ cm}$  (x1)
3. Montaje de espejo cinemático de ángulo recto (x2)
4. Espejo plano plateado circular (x2)
5. Tubo de lente (x2)
6. Porta postes (x3)
7. Base de montaje con tornillos hexagonales (x3)
8. Postes (x3)
9. Placa de rosca porta lentes (x2)
10. Varillas de montaje (x4)
11. Acoplador de tubo de lente (x2)
12. Placa de alineación del sistema (x1)
13. Filtro de densidad óptica (x1)
14. Cámara monocromática CMOS DMM 37UX273-ML (x1)
15. Lente plano convexo  $F = 4,5 \text{ cm}$  (x1)

16. Filtro pasa altos de  $>750$  nm (x1)
17. Divisor de haz CM1-BS013 de 400-700 nm 50:50 (x1)
18. Objetivo de microscopio 100X - N.A. 1.25 oil (x1)
19. Fuente de iluminación, lámpara IR (x1)
20. Placa de rosca para porta lentes y filtros (x4)
21. Abrazaderas de poste deslizables (x3)
22. Poste amortiguado (x1)
23. Plataforma de traslación manual para cada eje (x3)
24. Soporte de ángulo recto (x1)
25. Base de montaje para plataformas de traslación (x1)
26. Platina para colocación de muestras (x1)
27. Postes y cruces para montura de platina (x5 ó 6)
28. Ordenador con software IC Capture 2.4 para conexión con cámara (x1)
29. Varillas pequeñas de montaje (x8)

Dichos elementos se ensamblaron como se indica en la **Figura 1**.



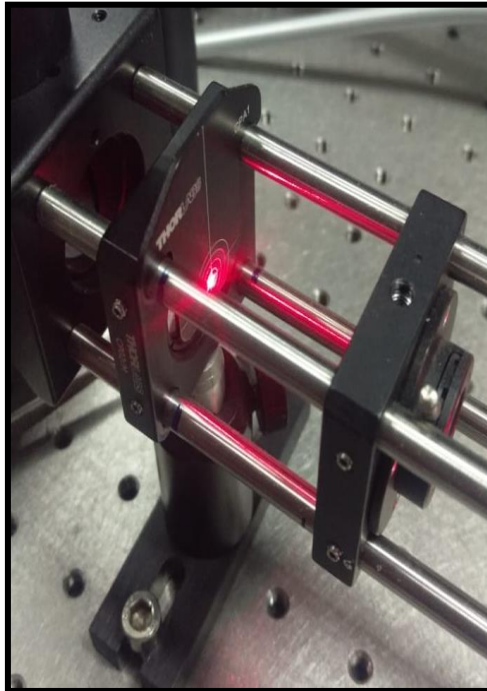
**Figura 1.** Sistema de pinza óptica implementada en el Laboratorio de Espectroscopía Óptica de la EPN  
(a) sistema de expansión, (b) sistema de enfoque y observación

Se debe verificar que, al conectar a la corriente eléctrica, el láser (elemento 1), la lámpara de iluminación IR (elemento 19) y la cámara CMOS (elemento 14) se enciendan correctamente.

### 3. Alineación del haz láser

Los pasos para alinear el haz láser del sistema de pinza óptica son los siguientes:

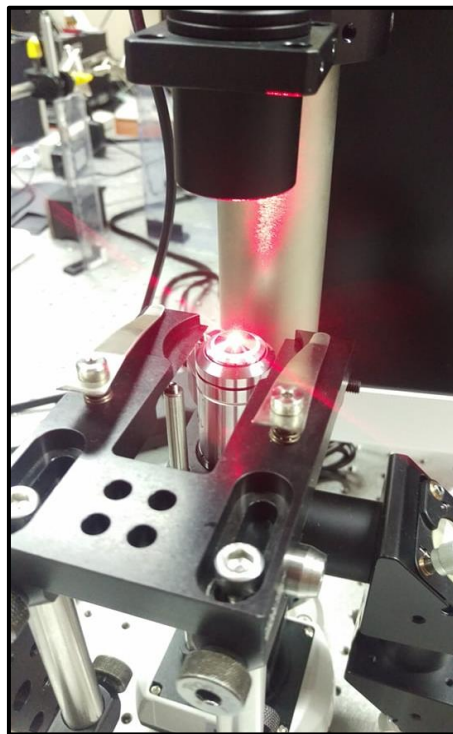
1. Se debe ajustar manualmente la altura y la inclinación del láser (elemento 1), de tal manera que el haz permanezca en el centro de la placa de alineación del sistema (elemento 12) a lo largo de la estructura con las varillas de montaje (elemento 10), tal como se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Punto de impacto del láser en el centro de la placa de alineación del sistema de pinza óptica (elemento 12). La placa se sostiene de las varillas estructurales.

2. Cuando el láser llega al sistema de periscopio conformado por los espejos planos plateados (elemento 4) es necesario retirar momentáneamente el espejo de la parte superior del periscopio para observar en el techo el haz láser. Se debe ajustar el espejo de la parte inferior del periscopio con los tornillos de fijación para obtener un punto visible, de unos pocos milímetros de diámetro y dirigido verticalmente hacia arriba.
3. Se debe retirar la cubierta del divisor de haz (elemento 17) que se ubica al lado opuesto del periscopio para verificar que el rayo salga por el centro de la abertura en el divisor del haz para mantener la alineación.

4. Ajustando los tornillos de fijación de los espejos del periscopio se debe dirigir el haz láser sobre la entrada del objetivo de microscopio (elemento 18), de tal forma que el haz láser expandido y colimado cubra toda la lente del objetivo.
5. Una vez que se haya conseguido que el haz láser salga verticalmente por el objetivo de microscopio hacia la platina de muestra (elemento 26), ver **Figura 3**, debe medir la potencia del haz en el plano focal del objetivo para verificar que tenga una potencia  $\geq 1\text{mW}$ . De no cumplirse esta condición se deberá volver al paso 1 para verificar que todo esté funcionando correctamente y de ser el caso ajustar los elementos a conveniencia para conseguir la potencia del láser deseado.



**Figura 3.** Haz láser saliendo verticalmente por el objetivo de microscopio hacia la platina de muestra

## 4. Preparación de muestras

De manera general, el objeto de estudio (partículas, células, etc.) deberá encontrarse en una solución, de tal manera que podamos tomar una pequeña cantidad de la misma y colocarla en un portaobjetos. Se recomienda que las

muestras se preparen antes de cada experimento para evitar la evaporación del solvente.

1. Se toma una gota (~5µl) de la solución y se coloca sobre un portaobjetos.
2. Inmediatamente al paso anterior, se coloca un cubreobjetos delgado sobre la gota y se presiona de tal forma que se obtenga una capa delgada del líquido para que el láser pase sin obstáculos y se eliminen burbujas de aire. Se pueden usar cubreobjetos delgados de numeración 0, 1.5 ó 2 para mejor enfoque de la muestra.
3. El portaobjetos se debe colocar en la platina de muestra con el cubreobjetos hacia abajo, hacia el objetivo de microscopio. Para enfocar la muestra se debe deslizar la platina verticalmente hacia abajo con ayuda de las plataformas de traslación (elemento 23).

## 5. Adquisición de datos

La presente pinza óptica usa la técnica de microscopía de video digital (DVM) para el rastreo de la posición de los objetos capturados o desplazados por acción de la pinza, es decir, con la cámara CMOS y su respectivo software (elemento 14 y 28) se podrá obtener imágenes y videos de la captura y manipulación con la pinza.

Los pasos para la adquisición de datos son los siguientes:

1. Después de conectar la cámara CMOS con el ordenador usando un cable USB tipo C se procede a abrir el acceso directo en el escritorio (**Figura 4**) y seleccionar el dispositivo conectado.

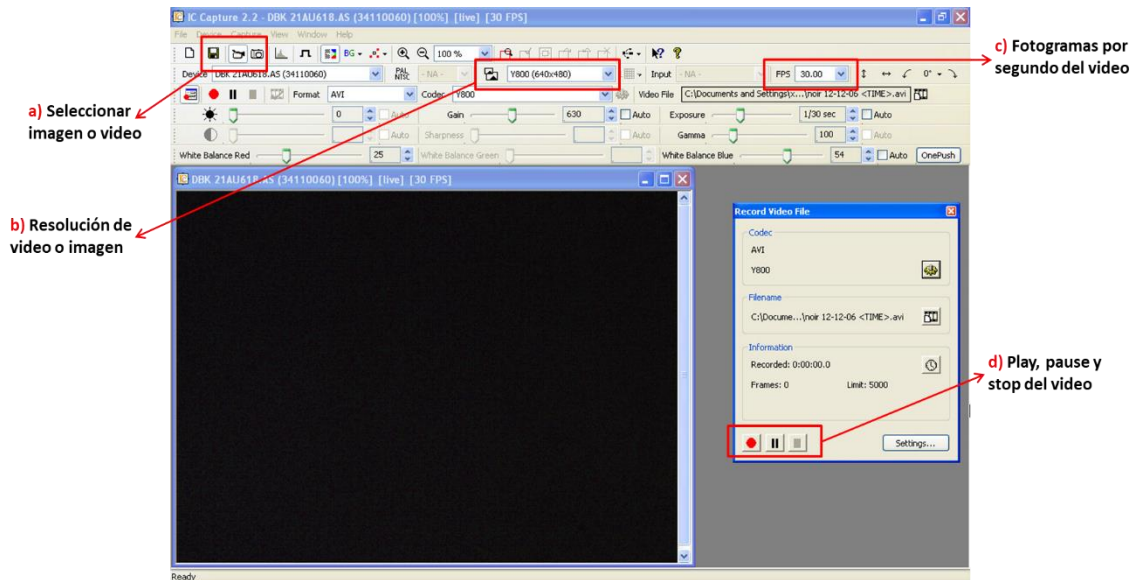


**Figura 4.** Imagen del acceso directo del software IC Capture 2.4 para la cámara CMOS

2. Inmediatamente se visualizará los ajustes del software en donde podrá seleccionar imagen o video (**Figura 5a**).

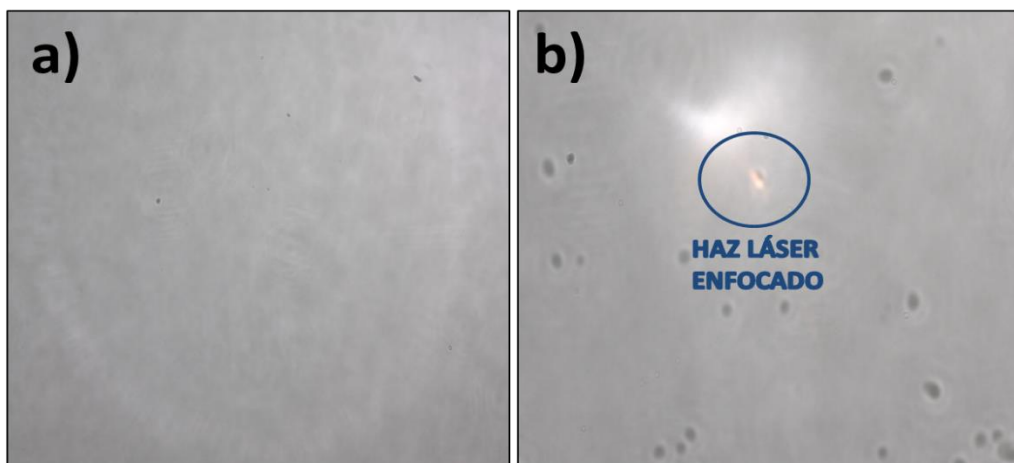


**IMPORTANTE:** Antes de comenzar con el registro de su experimento asegúrese de configurar la resolución de las imágenes en la pestaña que se indica en la **Figura 5b**, así como, el número de fotogramas por segundo que desea obtener en su video (**Figura 5c**). Se recomienda colocar la resolución máxima de 110 FPS. Porque esto influye directamente en la cantidad de posiciones que se pueden obtener del objeto capturado.



**Figura 5.** Pantalla principal del software IC Capture 2.4 para el manejo de la pinza óptica

3. Es necesario que por cada registro en video que vaya a realizar primero se obtengan dos imágenes, una de fondo y otra de referencia, para su posterior análisis.
  - La imagen de fondo debe ser adquirida cuando la lámpara de iluminación IR esté encendida, el láser apagado y sin portaobjetos en la platina de muestra (**Figura 6a**).
  - La imagen de referencia se debe adquirir cuando la lámpara de iluminación IR y el láser estén encendidos y con un portaobjetos en la platina de muestra. Además, es necesario cambiar momentáneamente el filtro pasa altos de 750 nm por uno de 700 nm para observar el haz láser enfocado (**Figura 6b**).
4. Se procede a grabar los videos de su experimento con las pestañas que se indican en la **Figura 5d**.



**Figura 6.** Ejemplos de imágenes tomadas en la adquisición de videos a) imagen de fondo, b) imagen de referencia

## 6. Análisis de los datos

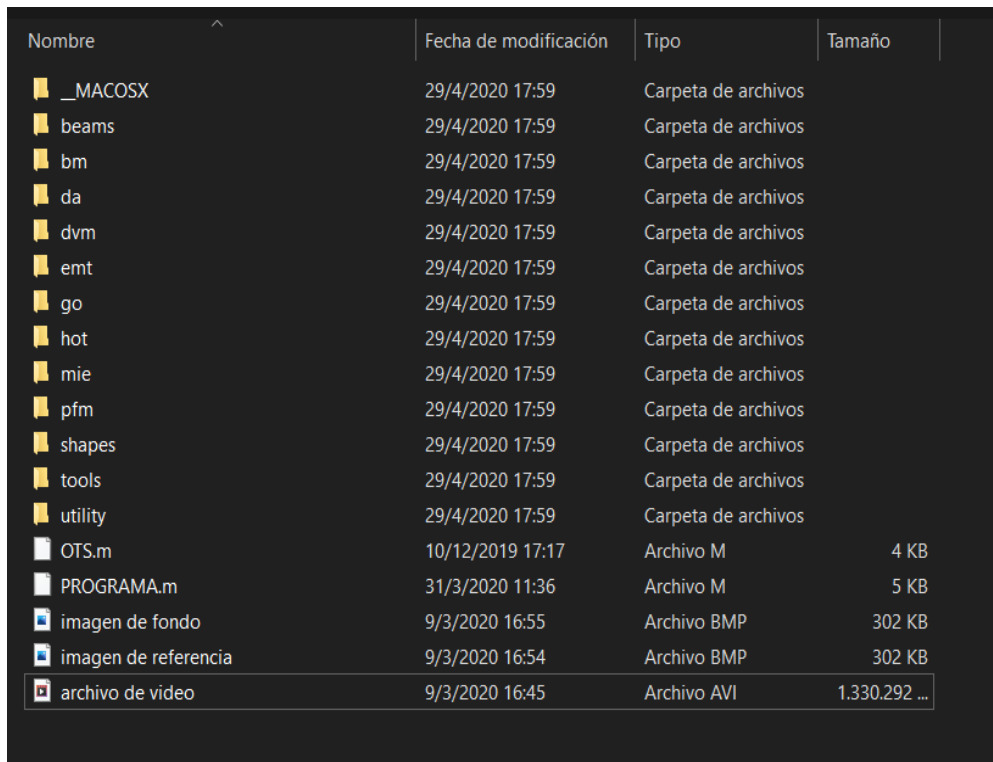
Si su investigación requiere hacer análisis adicionales a la obtención de la rigidez de la pinza al momento de capturar o desplazar objetos, podrá hacer uso de las librerías gratuitas para pinzas ópticas que se han desarrollado en MatLab (<http://opticaltweezers.org/software/>) y realizar los cambios que usted considere pertinentes.

A continuación, se detallan los pasos a seguir para analizar los registros en video adquiridos de sus experimentos y obtener la rigidez de la pinza óptica al momento de capturar o desplazar objetos usando los métodos de análisis de desplazamiento cuadrático medio (MSD) y la función de autocorrelación (ACF):

1. Se deberá ubicar en la misma localización en la PC, los registros de video, las imágenes de referencia, las imágenes de fondo, la librería gratuita para pinzas ópticas (OTS) descargada de <http://opticaltweezers.org/software/> y el archivo de programa creado por el usuario (Ver NOTA) para que no exista conflictos del workspace en la ejecución del programa (Ver ejemplo en **Figura 7**).

NOTA: El usuario deberá crear un archivo .m (Ejemplo: PROGRAMA.m) que contendrá el código del Anexo 1 de este manual. Dicho código obtiene el valor de la rigidez de la pinza.

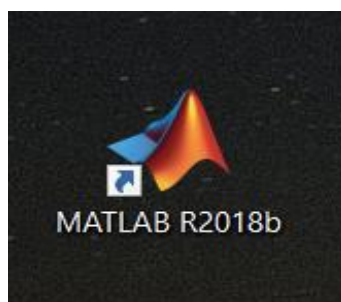
2. Para obtener la rigidez de la pinza óptica usando los métodos MSD y ACF es necesario que el usuario cree un archivo OTCalibMSD.m y un archivo OTCalibACF.m con los códigos del Anexo 2 y Anexo 3 de este manual respectivamente. Dichos archivos deberán ser ubicados en la carpeta pfm para reemplazar a los archivos originales de las librerías para pinzas ópticas descargadas



Nombre	Fecha de modificación	Tipo	Tamaño
_MACOSX	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
beams	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
bm	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
da	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
dvm	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
emt	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
go	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
hot	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
mie	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
pfm	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
shapes	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
tools	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
utility	29/4/2020 17:59	Carpeta de archivos	
OTS.m	10/12/2019 17:17	Archivo M	4 KB
PROGRAMA.m	31/3/2020 11:36	Archivo M	5 KB
imagen de fondo	9/3/2020 16:55	Archivo BMP	302 KB
imagen de referencia	9/3/2020 16:54	Archivo BMP	302 KB
archivo de video	9/3/2020 16:45	Archivo AVI	1.330.292 ...

**Figura 7.** Ejemplo de localización de todos los archivos necesarios para el análisis de los registros en video obtenidos

3. Una vez que se tiene todos los archivos necesarios en la misma localización se procede a abrir el acceso directo en el escritorio del software MatLab (versión R2018b) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Imagen del acceso directo del software MatLab versión R2018b

4. En la pantalla principal de MatLab se procede a abrir la localización de los archivos y consecuentemente el archivo PROGRAMA.m que se creó con el Anexo 1 (Figura 9).

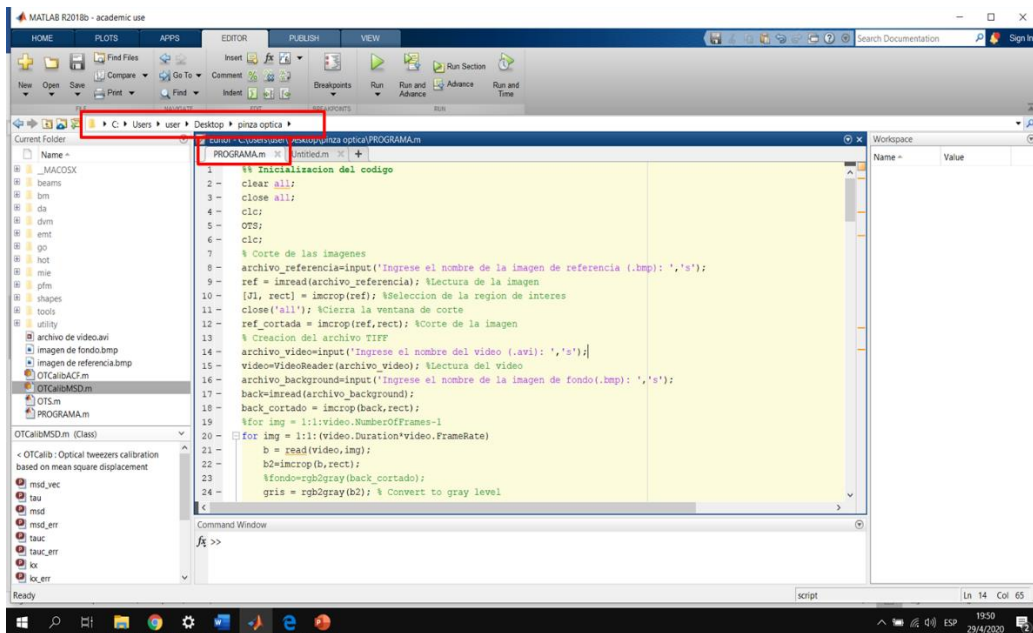


Figura 9. Pantalla de Matlab con el archivo de programa que contiene el código del Anexo 1

5. Se procede a ejecutar el archivo de programa PROGRAMA.m haciendo click en la pestaña Run (Figura 10).

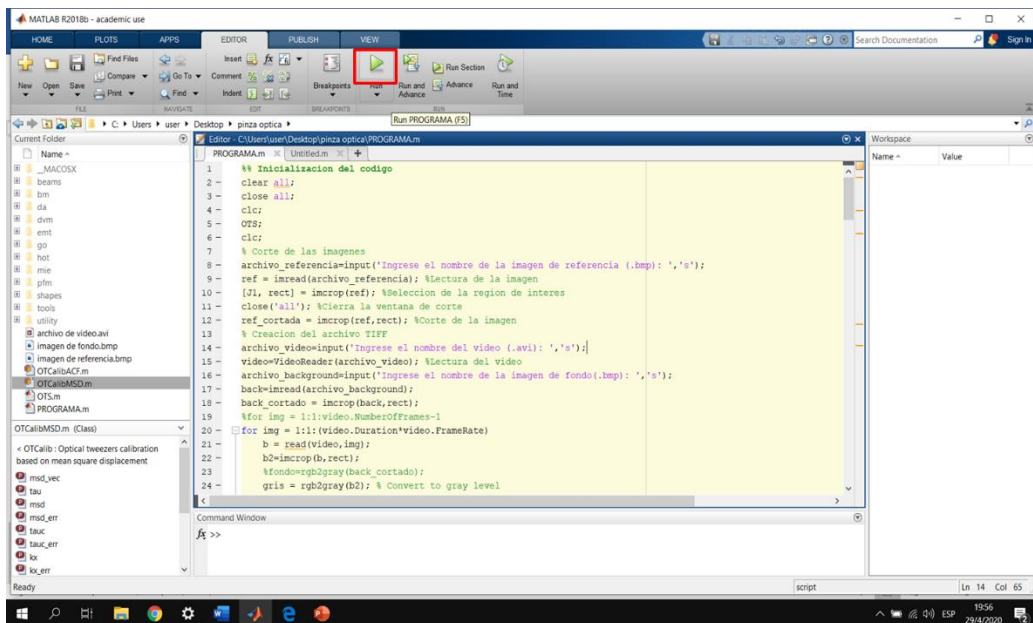
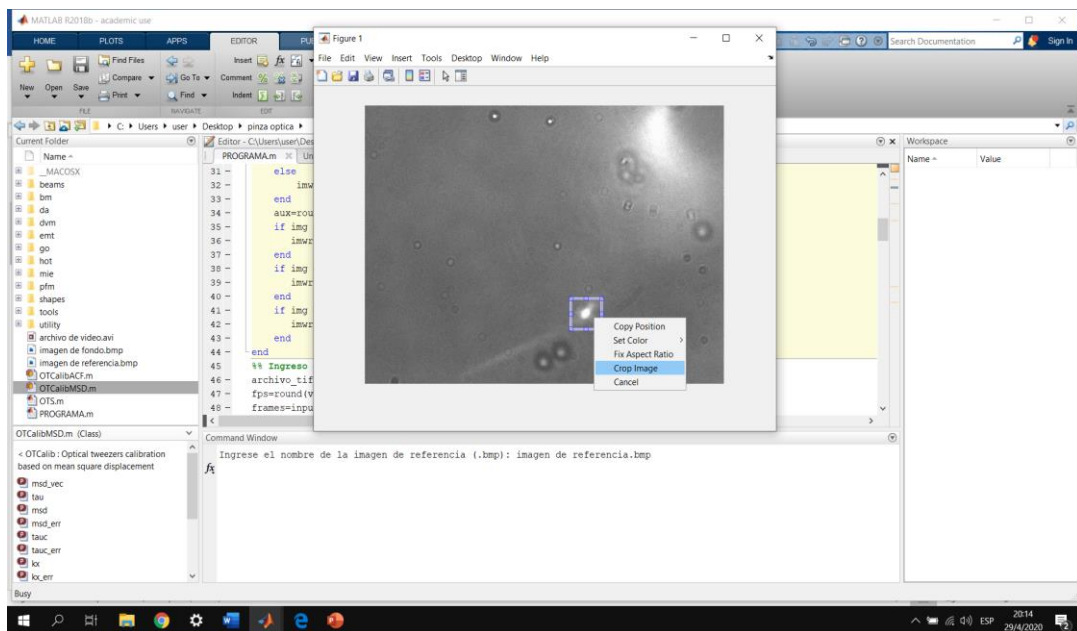


Figura 10. Pestaña para ejecutar el archivo de programa (seleccionada en recuadro rojo)

6. Una vez que se haya ejecutado el código, en el workspace de MatLab se irá desplegando una serie de requerimientos que deberá ingresar. Estos requerimientos son:

- a. Se deberá ingresar el nombre de la imagen de referencia con su extensión .bmp. Inmediatamente se abrirá una ventana con la imagen de referencia en donde podrá seleccionar la región de interés. Luego se hace click derecho y se selecciona la opción "Crop Image" (**Figura 11**).



**Figura 11.** Imagen de referencia abierta para seleccionar la región de interés donde se encuentra el láser

- b. Luego tendrá que ingresar el nombre del archivo de video con extensión .avi (**Figura 12**).
- c. Después deberá ingresar el nombre de la imagen de fondo con extensión .bmp (**Figura 12**).

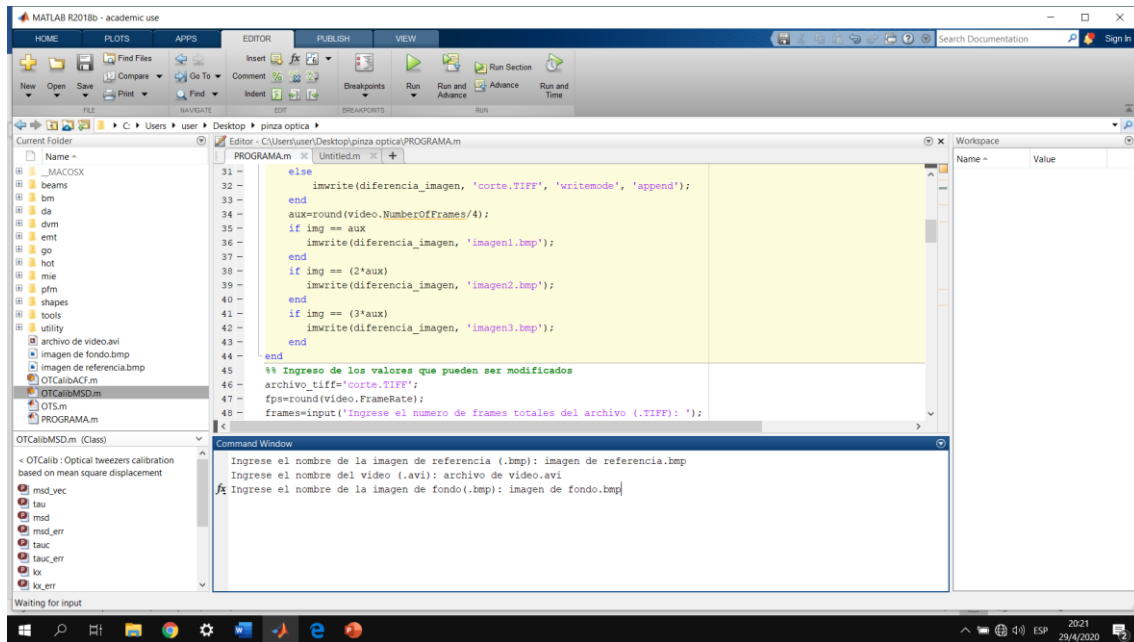


Figura 12. Ingreso de los nombres del archivo de video y de la imagen de fondo

- d. Después de que MatLab ha terminado de generar el archivo .TIFF el programa le pedirá que ingrese el número total de imágenes procesadas que tiene el archivo .TIFF (**Figura 13**).
- e. Después le pedirá que ingrese el intervalo de frames para analizar, el cual puede ser mínimo 2 y máximo el número de imágenes del archivo .TIFF (**Figura 13**).
- f. Antes de ingresar el radio mínimo y máximo del objeto capturado que el programa le pide (**Figura 13**) deberá tomar las 3 imágenes procesadas que se guardaron en la localización de los archivos para medir el radio del objeto y de acuerdo a eso crear un intervalo adecuado de radio mínimo y radio máximo para ingresar. Se sugiere usar el software ImageJ en el cual debe abrir una de las 3 imágenes guardadas y con la herramienta “Straight” selecciona el radio en la imagen, después con la configuración Ctrl+M aparecerá en una nueva ventana la medida en pixeles (**Figura 14**).
- g. Luego el programa le pedirá que ingrese el valor del brillo de fondo el cual usted debe ingresar de acuerdo a la calidad de imágenes generadas en el archivo .TIFF. Se recomienda ingresar valores pequeños (**Figura 13**).



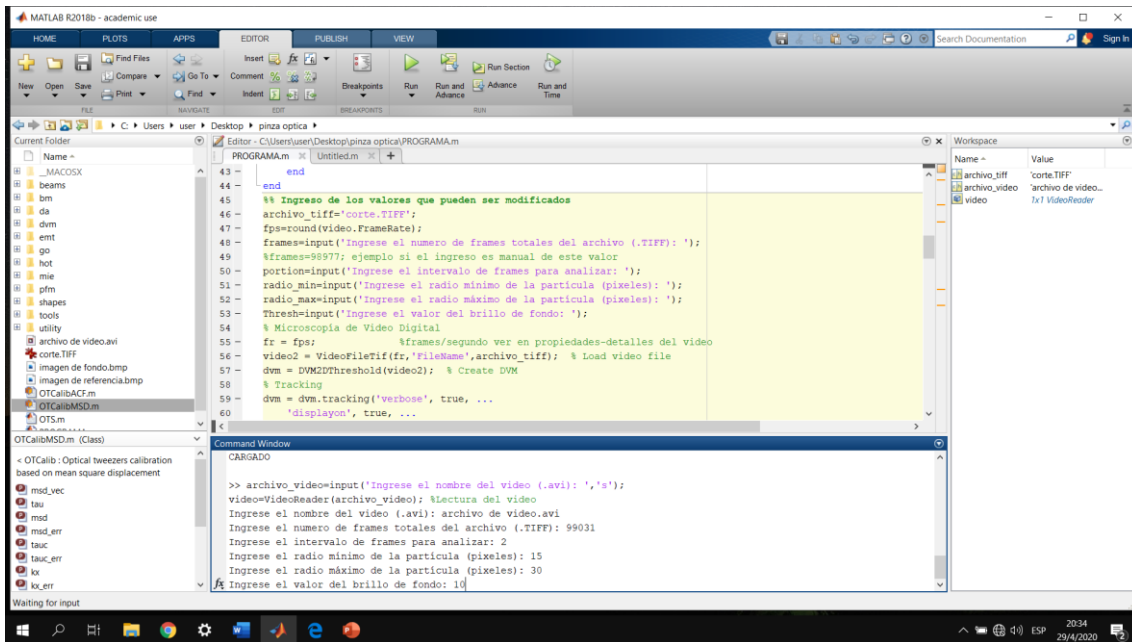


Figura 13. Ingreso de los datos para analizar el archivo .TIFF

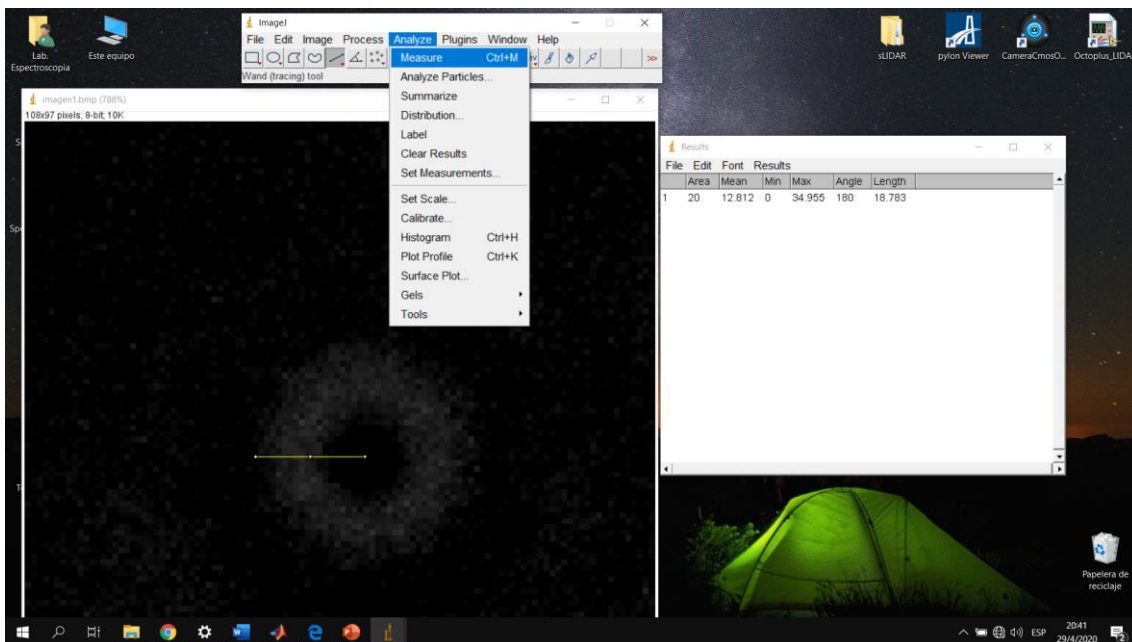
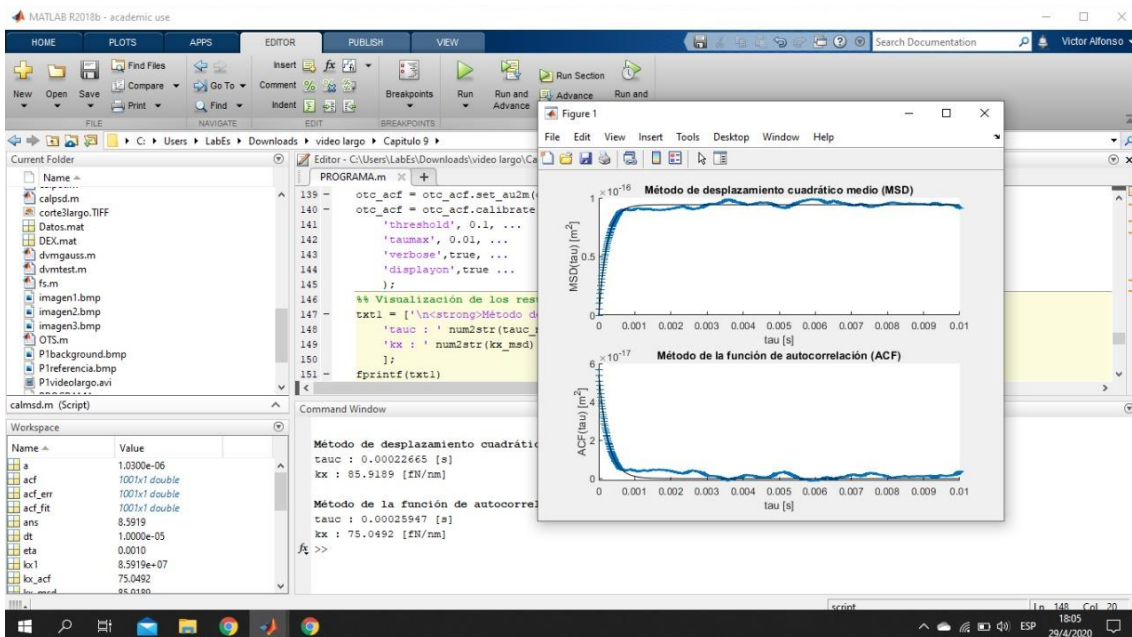


Figura 14. Software ImageJ con una imagen del archivo .TIFF para medir el radio aproximado del objeto capturado en pixeles

- h. Después de que el programa termine de realizar el Tracking y Tracing para obtener la trayectoria del objeto se le pedirá que ingrese el radio de la partícula en micrómetros, el valor de la viscosidad del medio en kg/ms el cual deberá ser ingresado con la notación  $\#(10^{-\#})$ , la temperatura ambiente en grados Kelvin.

7. Finalmente, se imprimirá los tiempos característicos de la pinza óptica ( $\tau_{auc}$ ) y el valor de la rigidez de la pinza ( $k_x$ ) para cada método MSD y ACF. Además de las curvas de ajuste de cada método (**Figura 15**).



**Figura 15.** Presentación de resultados obtenidos de la rigidez de la pinza y las curvas de ajuste de los métodos MSD y ACF

NOTA: Los códigos proporcionados están sujetos a modificaciones de acuerdo a la necesidad del usuario.



# 7. ANEXOS

## Anexo 1

### Código completo para el cálculo de la rigidez de la pinza óptica por los métodos MSD y ACF

```
% Inicializacion del codigo
clear all;
close all;
clc;
OTS;
clc;
% Corte de las imagenes
archivo_referencia=input('Ingrese el nombre de la imagen de
referencia (.bmp): ','s');
ref = imread(archivo_referencia); %Lectura de la imagen
[J1, rect] = imcrop(ref); %Seleccion de la region de
interes
close('all'); %Cierra la ventana de corte
ref_cortada = imcrop(ref,rect); %Corte de la imagen
% Creacion del archivo TIFF
archivo_video=input('Ingrese el nombre del video (.avi):
','s');
video=VideoReader(archivo_video); %Lectura del video
archivo_background=input('Ingrese el nombre de la imagen de
fondo(.bmp): ','s');
back=imread(archivo_background);
back_cortado = imcrop(back,rect);
%for img = 1:1:video.NumberOfFrames-1
for img = 1:1:(video.Duration*video.FrameRate)
    b = read(video,img);
    b2=imcrop(b,rect);
    %fondo=rgb2gray(back_cortado);
    gris = rgb2gray(b2); % Convert to gray level
    gris2=imcomplement(gris);
    fondo2=imcomplement(back_cortado);
    diferencia_imagen = gris2 - uint8(fondo2);
    %diferencia_imagen = gris - uint8(back_cortado);
    if img == 1
        imwrite(diferencia_imagen, 'corte.TIFF');
    else
        imwrite(diferencia_imagen, 'corte.TIFF',
'writemode', 'append');
    end
    aux=round(video.NumberOfFrames/4);
    if img == aux
        imwrite(diferencia_imagen, 'imagen1.bmp');
    end
    if img == (2*aux)
```

```

        imwrite(diferencia_imagen, 'imagen2.bmp');
    end
    if img == (3*aux)
        imwrite(diferencia_imagen, 'imagen3.bmp');
    end
end
%% Ingreso de los valores que pueden ser modificados
archivo_tiff='corte.TIFF';
fps=round(video.FrameRate);
frames=input('Ingrese el numero de frames totales del
archivo (.TIFF): ');
%frames=98977; ejemplo si el ingreso es manual de este
valor
portion=input('Ingrese el intervalo de frames para
analizar: ');
radio_min=input('Ingrese el radio mínimo de la partícula
(pixeles): ');
radio_max=input('Ingrese el radio máximo de la partícula
(pixeles): ');
Thresh=input('Ingrese el valor del brillo de fondo: ');
% Microscopía de Video Digital
fr = fps;          %frames/segundo ver en propiedades-
detalles del video
video2 = VideoFileTif(fr,'FileName',archivo_tiff); % Load
video file
dvm = DVM2DThreshold(video2); % Create DVM
% Tracking
dvm = dvm.tracking('verbose', true, ...
    'displayon', true, ...
    'FramesToTrack', frames, ... %Cambiar al numero de
frames del archivo .tif que esta leyendo
    'VideoPortion', portion, ... %cambiar intervalos de
frames como tengo menos frames poner menos intervalos va de
10 en 10 %'color', 3, ...
    'MinParticleRadius', radio_min, ... % poner en pixeles
MANUAL -3
    'MaxParticleRadius', radio_max, ... % poner en pixeles
MANUAL -12
    'PositiveMask', true, ... %positive (true, default) or
negative (false) mask
    'Threshold', Thresh, ... %brillo de fondo
(default=124 no sirve toma solo el láser)
    'ErodeRadius', 11, ... %diameter = 2*erodeRadius + 1
(en pixeles) size of the structure element for erosion-2
    'DilateRadius', 11); %diameter = 2*dilateRadius + 1
(en pixeles) size of the structure element for dilation-2
% Tracing
dvm = dvm.tracing('verbose', true, ...
    'displayon', true, ... %Whether to display figure
[default = false]

```

```

    'MaxDistance', 5, ...    %Maximum distance between
objects in consecutive frames [default = 5 pixels]
    'MaxHiatus', 1);        %Maximum number of frames that
can be skipped [default = 1 frame]
%% Lectura y formato de los resultados
load('Resultados.mat');
close(3)
% Para las posiciones en X
aux_pos_x = {Trace.X}.';
tam = size(aux_pos_x);
for aux=1:1:tam(1)
    if aux == 1
        a_x=(cell2mat(aux_pos_x(aux))).';
    else
        b_x=(cell2mat(aux_pos_x(aux))).';
        a_x=[a_x;b_x];
    end
end
Vx = a_x;
% Para las posiciones en Y
aux_pos_y = {Trace.Y}.';
tam = size(aux_pos_y);
for aux=1:1:tam(1)
    if aux == 1
        a_y=(cell2mat(aux_pos_y(aux))).';
    else
        b_y=(cell2mat(aux_pos_y(aux))).';
        a_y=[a_y;b_y];
    end
end
Vy = a_y;
% Crear el archivo para el calculo de la fuerza
a_aux=input('Ingrese el radio de la particula atrapada
(micrometros): ');
a=(a_aux)*(10^-06);
% Falta dt!!!!!!
dt=1*(10^-5);
eta=input('Ingrese el valor de la viscosidad del medio
(kg/ms) (#*(10^-#)): ');
T=input('Ingrese el valor de la temperatura ambiente (°K):
');
save Datos a dt eta T Vx Vy;
%% Calibración utilizando el método de desplazamiento
cuadratico medio-MSD
load('Datos.mat');
% Normalizacion de las señales
Vx = Vx - repmat(mean(Vx),size(Vx,1),1);
% Potencial de calibracion
Sx = 100e-9; %Factor de conversión de unidades de longitud

% Ejecución del método MSD

```

```

otc_msd = OTCalibMSD(Vx,Sx,dt,a,eta,T);
otc_msd = otc_msd.calibrate( ...
    'taumax', 0.01, ... %
    'verbose',true, ...
    'displayon',false ...
);
otc_msd = otc_msd.set_au2m(otc_msd.Sx_fit);
otc_msd = otc_msd.calibrate( ...
    'taumax', 0.01, ...
    'verbose',true, ...
    'displayon',true ...
);
%% Calibración utilizando el método de la función de
autocorrelación-ACF
% Ejecución del método ACF
otc_acf = OTCalibACF(Vx,Sx,dt,a,eta,T);
otc_acf = otc_acf.calibrate( ...
    'threshold', 0.1, ...
    'taumax', 0.01, ...
    'verbose',true, ...
    'displayon',false ...
);
otc_acf = otc_acf.set_au2m(otc_acf.Sx_fit);
otc_acf = otc_acf.calibrate( ...
    'threshold', 0.1, ...
    'taumax', 0.01, ...
    'verbose',true, ...
    'displayon',true ...
);
%% Visualización de los resultados obtenidos
txt1 = ['\n<strong>Método de desplazamiento cuadrático
medio (MSD) </strong>\n' ...
    'tauc : ' num2str(tauc_msd) ' [s]\n' ...
    'kx : ' num2str(kx_msd) ' [fN/nm]\n' ...
];
fprintf(txt1)
txt2 = ['\n<strong>Método de la función de autocorrelación
(ACF) </strong>\n' ...
    'tauc : ' num2str(tauc_acf) ' [s]\n' ...
    'kx : ' num2str(kx_acf) ' [fN/nm]\n' ...
];
fprintf(txt2)
figure()
subplot(2,1,1);
title('Método de desplazamiento cuadrático medio (MSD)')
hold on
errorbar(tau_msd,msd,msd_err,'.')
plot(tau_msd,msd_fit,'k')
hold off
xlim([0 max(tau_msd)])
xlabel('tau [s]')

```

```

ylabel('MSD(tau) [m^2]')
subplot(2,1,2);
title('Método de la función de autocorrelación (ACF)')
hold on
errorbar(tau_acf,acf,acf_err,'.')
plot(tau_acf,acf_fit,'k')
hold off
xlim([0 max(tau_acf)])
xlabel('tau [s]')
ylabel('ACF(tau) [m^2]')

```

## Anexo 2

### Código modificado del archivo OTCalibMSD.m para el método MSD

```

classdef OTCalibMSD < OTCalib
    % OTCalibMSD < OTCalib : Optical tweezers calibration
    based on mean square displacement
    % Optical tweezers calibration procedure based on
    mean square displacement.
    %
    % OTCalibMSD properties:
    % x_sig - 1D trajectory [a.u.] < OTCalib
    % Sx - conversion factor [m/a.u.] < OTCalib
    % t_sig - dt or sample times [s] < OTCalib
    % R - particle radius [m] < OTCalib
    % eta - medium viscosity [kg/(s m)] < OTCalib
    % T - temperature [K] < OTCalib
    % msd_vec - MSD vector
    % tau - delay times
    % msd - MSD
    % msd_err - MSD error
    % tauc - Characteristic time [s]
    % tauc_err - Characteristic time error [s]
    % kx - Stiffness [N/m]
    % kx_err - Stiffness error [N/m]
    % D_fit - Fitted diffusion constant [m^2/s]
    % Sx_fit - Fitted conversion factor [m/a.u.]
    % msd_fit - Fitted MSD
    %
    % OTCalibMSD methods:
    % OTCalibMSD - constructor
    % kBT - thermal energy [J] < OTCalib
    % D - diffusion constant [m^2/s] <
OTCalib
    % gamma - friction coefficient [Kg/s] <
OTCalib
    % samples - number of samples < OTCalib

```

```

% windows - numebr of windows < OTCalib
% x - trajectory [m] < OTCalib
% t - sample time [s] < OTCalib
% au2m - conversion factor [m/a.u.] <
OTCalib
% plottraj - plot trajectory < OTCalib
% calibrate - performs calibration < OTCalib
% forcalibrate - performs calibration
% printcalib - prints calibration
% plotcalib - plots calibration
%
% See also OTCalib, OTCalibPotential,
OTCalibEquipartition, OTCalibACF, OTCalibPSD.

% Author: Giovanni Volpe
% Revision: 1.0.0
% Date: 2015/01/01

properties
msd_vec % MSD vector
tau % delay times
msd % MSD
msd_err % MSD error
tauc % Characteristic time [s]
tauc_err % Characteristic time error [s]
kx % Stifness [N/m]
kx_err % Stifness error [N/m]
D_fit % Fitted diffusion constant [m^2/s]
Sx_fit % Fitted conversion factor [m/a.u.]
msd_fit % Fitted MSD
end
methods
function obj = OTCalibMSD(x_sig,Sx,dt,R,eta,T)
% OTCALIBMSD(X,Sx,T,R,ETA,T) constructs an
optical tweezers
% calibration with a signal X, a conversion
factor Sx,
% a series of sample times T for a particle
of radius R in a
% fluid of viscosity ETA and at absolute
temperature T.
%
% See also OTCalibMSD.

Check.samesize('dt must be the time step',dt,1)

obj = obj@OTCalib(x_sig,Sx,dt,R,eta,T);
end
function otc = forcalibrate(otc,varargin)
% FORCALIBRATE Calibration
%
```

```

        % OTC = FORCALIBRATE(OTC) calibrates OTC with
standard parameters.
        %
        % OTC =
FORCECALIBRATE(OTC, 'PropertyName', PropertyValue) permits
        % to set the value of PropertyName to
PropertyValue.
        % Admissible Properties are:
        % TauMax - Maximum delay to be
calculated (default = +Inf)
        %
        % See also OTCalibMSD.

        % Autocorrelation function
[otc.msd,otc.tau,otc.msd_err,otc.msd_vec] =
msd(otc.t_sig,otc.x,varargin{:});

        % Fitting
g = @(a, b, x) a*(1-exp(-x/b));

D_fit_0 = otc.msd(2)/(otc.t_sig);
kx_0 = 2*otc.kBT/otc.msd(end);
tauc_0 = otc.gamma/kx_0;
fitresult =
fit(otc.tau,otc.msd*1e+18,fittype(g), 'StartPoint',[2*D_fit_
0*tauc_0*1e+18 tauc_0], 'Lower',[0,0], 'Upper',[Inf,Inf]);

a = fitresult.a*1e-18;
b = fitresult.b;
otc.msd_fit = g(a,b,otc.tau);

otc.tauc = b;
otc.kx = otc.gamma/otc.tauc;

otc.D_fit = a/(2*otc.tauc);
otc.Sx_fit = otc.Sx*sqrt(otc.D/otc.D_fit);

        % Errors
for n = 1:1:otc.windows()
    fitresult =
fit(otc.tau,otc.msd_vec(:,n)*1e+18,fittype(g), 'StartPoint',
[2*otc.D_fit*otc.tauc*1e+18
otc.tauc], 'Lower',[0,0], 'Upper',[Inf,Inf]);
    b = fitresult.b;
    tauc_vec(n) = b;
    kx_vec(n) = otc.gamma/tauc_vec(n);
end
otc.tauc_err = std(tauc_vec);
otc.kx_err = std(kx_vec);

end

```

```

function printcalib(otc)
    % PRINTCALIB Prints calibration results
    %
    % PRINTCALIB(OTC) prints the calibration
results.
    %
    % See also OTCalibMSD.

%         txt = ['\n<strong>Mean square displacement
analysis </strong>\n' ...
%             int2str(otc.windows()) ' signals with '
int2str(otc.samples()) ' samples each\n' ...
%             '\n' ...
%             'tauc : ' num2str(otc.tauc) ' +/- '
num2str(otc.tauc_err) ' s\n' ...
%             'kx : ' num2str(otc.kx*1e+6) ' +/- '
num2str(otc.kx_err*1e+6) ' fN/nm\n' ...
%             '\n' ...
%             '[' num2str(otc.au2m()*1e+9) ' nm/a.u.
vs. fitted ' num2str(otc.Sx_fit*1e+9) ' nm/a.u.]\n' ...
%             '\n'
%         ];
%         fprintf(txt)
% Modificación
vector2=otc.tauc;
vector3=otc.kx*1e+6;
assignin('base','tauc_msd',vector2);
assignin('base','kx_msd',vector3);
end
function fig = plotcalib(otc,figt)
    % PLOTALIB Plot calibration results
    %
    % FIG = PLOTALIB(OTC) plots the calibration
results and
    %     returns an hndle of the figure.
    %
    % FIG = PLOTALIB(OTC,FIG) plots in figure FIG.
    %
    % See also OTCalibMSD.

%         if nargin>1
%             figt = figure(figt);
%             clf
%         else
%             figt = figure();
%         end

%         hold on
%         errorbar(otc.tau,otc.msd,otc.msd_err,'.')
%         plot(otc.tau,otc.msd_fit,'k')
%         hold off

```



```

%           xlim([0 max(otc.tau)])
%           xlabel('tau [s]')
%           ylabel('MSD(tau) [m^2]')

% Output if needed
%           if nargout>0
%               fig = figt;
%           end
% Modificación
vector2=otc.msdfit;
vector3=otc.tau;
vector4=otc.msdf;
vector5=otc.msdf_err;
assignin('base','msdfit',vector2);
assignin('base','tau_msdf',vector3);
assignin('base','msdf',vector4);
assignin('base','msdf_err',vector5);
end
end
end
end

```

## Anexo 3

### Código modificado del archivo OTCalibACF.m para el método ACF

```

classdef OTCalibACF < OTCalib
% OTCalibACF < OTCalib : Optical tweezers calibration
based on autocorrelation
% Optical tweezers calibration procedure based on
autocorrelation function.
%
% OTCalibACF properties:
% x_sig - 1D trajectory [a.u.] < OTCalib
% Sx - conversion factor [m/a.u.] < OTCalib
% t_sig - dt or sample times [s] < OTCalib
% R - particle radius [m] < OTCalib
% eta - medium viscosity [kg/(s m)] < OTCalib
% T - temperature [K] < OTCalib
% acf_vec - ACF vector
% tau - delay times
% acf - ACF
% acf_err - ACF error
% tauc - Characteristic time [s]
% tauc_err - Characteristic time error [s]
% kx - Stiffness [N/m]
% kx_err - Stiffness error [N/m]
% D_fit - Fitted diffusion constant [m^2/s]
% Sx_fit - Fitted conversion factor [m/a.u.]

```

```

%   acf_fit -   Fitted ACF
%
%   OTCalibACF methods:
%   OTCalibACF   -   constructor
%   kBT          -   thermal energy [J] < OTCalib
%   D            -   diffusion constant [m^2/s] <
OTCalib
%   gamma        -   friction coefficient [Kg/s] <
OTCalib
%   samples      -   number of samples < OTCalib
%   windows      -   numebr of windows < OTCalib
%   x            -   trajectory [m] < OTCalib
%   t            -   sample time [s] < OTCalib
%   au2m         -   conversion factor [m/a.u.] <
OTCalib
%   plottraj     -   plot trajectory < OTCalib
%   calibrate    -   performs calibration < OTCalib
%   forcalibrate -   performs calibration
%   printcalib   -   prints calibration
%   plotcalib    -   plots calibration
%
%   See also OTCalib, OTCalibPotential,
OTCalibEquipartition, OTCalibMSD, OTCalibPSD.

```

```

%   Author: Giovanni Volpe
%   Revision: 1.0.0
%   Date: 2015/01/01

```

#### properties

```

acf_vec % ACF vector
tau     % delay times
acf     % ACF
acf_err % ACF error
tauc    % Characteristic time [s]
tauc_err % Characteristic time error [s]
kx      % Stifness [N/m]
kx_err  % Stifness error [N/m]
D_fit   % Fitted diffusion constant [m^2/s]
Sx_fit  % Fitted conversion factor [m/a.u.]
acf_fit % Fitted ACF

```

end

#### methods

```

function obj = OTCalibACF(x_sig,Sx,dt,R,eta,T)
%   OTCALIBACF(X,Sx,T,R,ETA,T) constructs an
optical tweezers
%   calibration with a signal X, a conversion
factor Sx,
%   a series of sample times T for a particle
of radius R in a
%   fluid of viscosity ETA and at absolute
temperature T.

```

```

%
% See also OTCalibACF.

Check.samesize('dt must be the time step',dt,1)

obj = obj@OTCalib(x_sig,Sx,dt,R,eta,T);
end
function otc = forcalibrate(otc,varargin)
% FORCALIBRATE Calibration
%
% OTC = FORCALIBRATE(OTC) calibrates OTC with
standard parameters.
%
% OTC =
FORCALIBRATE(OTC,'PropertyName',PropertyValue) permits
% to set the value of PropertyName to
PropertyValue.
% Admissible Properties are:
% Threshold - fitting threshold
(default = 0.01)
% TauMax - Maximum delay to be
calculated (default = +Inf)
%
% See also OTCalibACF.

% Fitting threshold [default = 0.01]
threshold = 0.01;
for n = 1:2:length(varargin)
    if strcmpi(varargin{n},'threshold')
        threshold = varargin{n+1};
    end
end

% Autocorrelation function
[otc.acf,otc.tau,otc.acf_err,otc.acf_vec] =
acf(otc.t_sig,otc.x,varargin{:});

% Fitting
ind = find(otc.acf>max(otc.acf)*threshold);
fitresult =
fit(otc.tau(ind),otc.acf(ind),'exp1');

a = fitresult.a;
b = fitresult.b;
otc.acf_fit = a*exp(b*otc.tau);

otc.tauc = -b^-1;
otc.kx = otc.gamma/otc.tauc;

otc.D_fit = a/otc.tauc;
otc.Sx_fit = otc.Sx*sqrt(otc.D/otc.D_fit);

```

```

% Errors

% ci = confint(fitresult,.682)
% sda = (ci(2,1)-ci(1,1))/2
% sdb = (ci(2,2)-ci(1,2))/2
%
% otc.tauc_err = abs(sdb/b)*otc.tauc;
% otc.kx_err = abs(sdb/b)*otc.kx;

for n = 1:1:otc.windows()
    fitresult =
fit(otc.tau(ind),otc.acf_vec(ind,n),'exp1');
    b = fitresult.b;
    tauc_vec(n) = -b^-1;
    kx_vec(n) = otc.gamma/tauc_vec(n);
end
otc.tauc_err = std(tauc_vec);
otc.kx_err = std(kx_vec);

end
function printcalib(otc)
% PRINTCALIB Prints calibration results
%
% PRINTCALIB(OTC) prints the calibration
results.
%
% See also OTCalibACF.

%          txt = ['\n<strong>Autocorrelation analysis
</strong>\n' ...
%          int2str(otc.windows()) ' signals with '
int2str(otc.samples()) ' samples each\n' ...
%          '\n' ...
%          'tauc : ' num2str(otc.tauc) ' +/- '
num2str(otc.tauc_err) ' s\n' ...
%          'kx : ' num2str(otc.kx*1e+6) ' +/- '
num2str(otc.kx_err*1e+6) ' fN/nm\n' ...
%          '\n' ...
%          '[' num2str(otc.au2m()*1e+9) ' nm/a.u.
vs. fitted ' num2str(otc.Sx_fit*1e+9) ' nm/a.u.]\n' ...
%          '\n'
%          ];
%          fprintf(txt)
% Modificación
vector2=otc.tauc;
vector3=otc.kx*1e+6;
assignin('base','tauc_acf',vector2);
assignin('base','kx_acf',vector3);
end
function fig = plotcalib(otc,figt)

```

```

% PLOTALIB Plot calibration results
%
% FIG = PLOTALIB(OTC) plots the calibration
results and
% returns an handle of the figure.
%
% FIG = PLOTALIB(OTC,FIG) plots in figure FIG.
%
% See also OTCalibACF.

%
% if nargin>1
%     figt = figure(figt);
%     clf
% else
%     figt = figure();
% end

%
% hold on
% errorbar(otc.tau,otc.acf,otc.acf_err,'.')
% plot(otc.tau,otc.acf_fit,'k')
% hold off
% xlim([0 max(otc.tau)])
% xlabel('tau [s]')
% ylabel('ACF(tau) [m^2]')
%
% % Output if needed
% if nargout>0
%     fig = figt;
% end
%
% Modificación
vector2=otc.acf_fit;
vector3=otc.tau;
vector4=otc.acf;
vector5=otc.acf_err;
assignin('base','acf_fit',vector2);
assignin('base','tau_acf',vector3);
assignin('base','acf',vector4);
assignin('base','acf_err',vector5)

end
end
end

```