



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

CARACTERIZACIÓN DE TRAMPAS ÓPTICAS UTILIZANDO VIDEO
MICROSCOPIA DIGITAL DE ALTA VELOCIDAD

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA)

PRESENTA:
CÉSAR DANIEL GONZÁLEZ VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. PEDRO QUINTO SU
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

COMITÉ TUTOR:

DR. ALFRED BARRY U'REN CORTÉS
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

DRA. ROCÍO JÁUREGUI RENAUD
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JULIO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

La investigación que concluyó en la redacción de esta tesis fue posible gracias al Dr. Pedro Quinto Su. Le agradezco su apoyo y enseñanzas. También quisiera agradecer a los integrantes de mi comité tutor, el Dr. Alfred Barry U'Ren Cortés y la Dra. Rocío Jáuregui Renaud. Agradezco el apoyo recibido por parte del Proyecto CONACyT CB 253706 el cual fue muy importante para la conclusión de esta investigación. Además, Sr. José Rangel Gutiérrez del departamento de maquinado del ICN por la fabricación de las piezas necesarias para el arreglo experimental. Igualmente, quisiera mencionar la ayuda brindada por el M. en C. Manuel Aguilar Franco del Laboratorio Central de Microscopía.

Índice general

Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
1. Introducción	1
2. Descripción Teórica	5
2.1. Física de la trampa óptica.	5
2.2. Movimiento browniano libre	10
2.3. Movimiento browniano en un potencial cuadrático	13
2.4. Correcciones hidrodinámicas	14
3. Arreglo experimental	17
3.1. Calibración espacial	18
4. Microscopía Digital	21
4.1. Algoritmo de detección	21
4.2. Análisis del ruido	25
4.2.1. 10k cuadros por segundo	27
4.2.2. 100k cuadros por segundo	28
4.2.3. 300k cuadros por segundo	29
4.2.4. 500k cuadros por segundo	30
4.3. Límite de resolución del algoritmo	30
5. Caracterización	33
5.1. Estadística de Boltzmann	33
5.2. Teorema de equipartición	36
5.3. Función de densidad espectral de potencia	36
6. Resultados	41
6.1. Estadística de Boltzmann	41
6.1.1. 10k cuadros por segundo	42
6.1.2. 100k cuadros por segundo	43
6.1.3. 300k cuadros por segundo	44
6.1.4. 500k cuadros por segundo	45
6.1.5. Rigidez	46
6.2. Equipartición	48
6.3. Densidad espectral de potencia	49
6.3.1. 10k cuadros por segundo	49

6.3.2.	100k cuadros por segundo	50
6.3.3.	300k cuadros por segundo	51
6.3.4.	500k cuadros por segundo	52
6.3.5.	Rigidez y frecuencia límite	53
7.	Discusión	55
8.	Conclusiones	65
	Bibliografía	67

Índice de figuras

2.1. Apertura numérica	5
2.2. Interacción entre un rayo y la partícula en el régimen geométrico.	7
2.3. Eficiencias de un solo rayo	8
2.4. Fuerzas verticales	9
2.5. Fuerzas horizontales	10
2.6. Espectro de potencias teórico de una partícula libre	13
2.7. Espectro de potencias teórico de una partícula atrapada	15
3.1. Arreglo experimental	17
3.2. Calibración espacial	18
3.3. Calibración espacial	19
4.1. Imagen inicial	21
4.2. Procesamiento de imágenes	23
4.3. Imagen procesada	23
4.4. Posición detectada	24
4.5. Consistencia en la detección	24
4.6. Trayectorias	25
4.7. Ventanas para análisis de ruido	26
4.8. Imagen a 10k cuadros por segundo	27
4.9. Imágenes a 100k cuadros por segundo	28
4.10. Imágenes a 300k cuadros por segundo	29
4.11. Imágenes a 500k cuadros por segundo	30
5.1. Histograma del desplazamiento observado de una partícula atrapada	34
5.2. Potencial producido por la trampa	35
5.3. Promedio de la densidad espectral	38
5.4. Límite de resolución	39
6.1. Estadística a 10k cps	42
6.2. Estadística a 100k cps	43
6.3. Estadística a 300k cps	44
6.4. Estadística a 500k cps	45
6.5. Densidad espectral a 10k cps	49
6.6. Densidad espectral a 100k cps	50
6.7. Densidad espectral a 300k cps	51
6.8. Densidad espectral a 500k cps	52
7.1. Comparación con Florin	55

7.2.	Comparación con Yale	56
7.3.	Comparación con Ghislain	57
7.4.	Comparación con Huisstede	58
7.5.	Comparación con Tolic	59
7.6.	Comparación con Li	60
7.7.	Comparación con Gibson	61
7.8.	Comparación con Keen	62
7.9.	Comparación con Otto	62

Índice de tablas

4.1. Ruido a 10k	27
4.2. Ruido a 100k	28
4.3. Ruido a 300k	29
4.4. Ruido a 500k	30
4.5. Límite de resolución del algoritmo	31
6.1. Caracterización por estadística de Boltzmann	46
6.2. Caracterización por teorema de equipartición	48
6.3. Caracterización por densidad espectral	53
7.1. Límites de resolución	64

1. Introducción

Las trampas ópticas pueden utilizarse para atrapar objetos microscópicos, desde partículas de algunas micras de diámetro hasta partículas con un tamaño nanométrico. Cuando se enfoca un láser en una región cercana a un objeto, se ejercen fuerzas que al equilibrarse producen un potencial aproximadamente cuadrático. El objeto sobre el que incide el láser queda atrapado y mientras su desplazamiento sea pequeño, actúa en él una fuerza de restitución proporcional a su distancia del punto de enfoque. Al observar el comportamiento del objeto atrapado es posible obtener información sobre el sistema en el que se encuentra. En estudios biológicos se utilizan para medir las propiedades de proteínas y células. En el área de la dinámica de soluciones, las trampas ópticas se utilizan para medir las fuerzas de interacción entre partículas, las propiedades del medio y el comportamiento de objetos suspendidos.

A. Ashkin reportó por primera vez la manipulación de objetos microscópicos utilizando presión de radiación en 1970 [1]. En su trabajo, se enfocó un láser en modo TEM_{00} (perfil gaussiano) sobre esferas de látex de $2.68\mu m$ de diámetro suspendidas en agua. Las esferas fueron simultáneamente atrapadas cerca del eje del haz y empujadas en la dirección de propagación. Su movimiento fue observado utilizando un microscopio. Además, se logró una verdadera trampa estática utilizando dos haces propagándose en sentidos opuestos y enfocados en el mismo punto.

Ashkin y su equipo lograron años después la primera trampa estática de un solo haz [4], actualmente llamada simplemente pinza óptica o trampa óptica. Utilizando un solo haz enfocado, construyeron una trampa estable capaz de atrapar objetos con tamaños desde 25 nm hasta $10\mu m$. La clave para la estabilidad de este arreglo es que el láser sea enfocado por un objetivo de microscopio con apertura numérica grande ($NA > 0.9$). Este diseño es la base para las trampas que se usan actualmente.

Las trampas ópticas se han aplicado en diversas áreas científicas, como la biología, la medicina y la ciencia de los materiales. Se ha demostrado que es posible utilizar esta tecnología para manipular organismos vivos. Utilizando un láser infrarrojo, es posible atrapar y manipular células, virus y macromoléculas sin dañarlos. Virus del mosaico del tabaco y *E. Coli* fueron atrapados y manipulados por Ashkin y Dziedzic sin producirles daño aparente [3]. Además, se encontró que la levadura es capaz de reproducirse en trampas infrarrojas y que glóbulos rojos humanos y organelos dentro de células pueden manipularse sin daño visible [5]. Desde entonces, las trampas ópticas se han utilizado para medir

las características de sistemas biológicos. Por ejemplo, la elasticidad de células de epitelio pulmonar humano [30], la capacidad de elongación de los glóbulos rojos humanos, la fuerza que ejerce la molécula de kinesina [21] y la fuerza de doblamiento de distintas proteínas [19].

También son muy utilizadas para el estudio de suspensiones y coloides. Una trampa puede utilizarse como un microscopio de fuerza. Si se conoce la rigidez de la fuerza de restitución, se puede inferir la fuerza externa que actúa sobre la partícula atrapada midiendo su desplazamiento desde el centro de la trampa [14]. Se ha medido la fuerza ejercida entre partículas en un cristal líquido [31] y las fuerzas de interacción entre partículas en un coloide [23]. Trampas oscilantes se han utilizado para estudiar las fuerzas hidrodinámicas sobre una partícula que se mueve cerca de una superficie [16].

La manipulación óptica también puede ser usada para formar estructuras microscópicas. Es posible utilizar trampas holográficas para formar un arreglo de esferas de sílice en agua para luego agregar NaCl a la solución. La presencia de sal permite que las esferas se acerquen y se unan por interacción electrostática. De este modo se obtiene una estructura de sílice que permanece aún después de apagar la trampa [11]. Esta formación de estructuras puede utilizarse para construir patrones de esferas sobre los que se deposita silicio para formar cristales fotónicos [6]. Además, es posible manipular cilindros metálicos microscópicos para ensamblarlos en estructuras con posible aplicación a la electrónica miniaturizada [26].

La detección de una partícula atrapada se realiza comúnmente utilizando un Dispositivo Sensible a la Posición (*PSD* por sus siglas en inglés) o un Fotodetector de Cuadrantes (*QPD* por sus siglas en inglés). Ambas clases de detectores funcionan de manera similar, produciendo una corriente proporcional a la luz incidente. Un PSD tiene un solo fotodiodo cuadrado o rectangular, mientras que un QPD consiste de cuatro fotodiodos distribuidos cuadrantes. Cualquiera que sea el tipo de fotodetector, su función es captar un láser y producir una corriente que se interpreta como la posición del objeto atrapado. El láser detectado puede ser el mismo que se utiliza para formar la trampa o un segundo láser, independiente que sirve únicamente para rastrear su posición. Utilizando un fotodetector, es posible alcanzar una resolución temporal del movimiento en el orden de las decenas de kHz [17]. Cuando es necesario rastrear más de una partícula, se debe utilizar un fotodetector por cada una de ellas. Una consecuencia de esto es que solo es posible conocer la posición relativa respecto al equilibrio de cada una y no la distancia entre ellas. Si se utiliza un solo detector, el campo de visión es muy reducido y es posible que dos partículas juntas no se distingan independientemente [22].

En cambio, en esta investigación se ha utilizado una cámara con sensor CMOS de ultra alta velocidad para tomar videos del movimiento de la partícula. La posición del objeto a estudiar no se registra como una corriente en un fotodetector sino como una imagen digital en donde la partícula se distingue claramente como un objeto esférico brillante. Esto permite visualizar la muestra en tiempo real. La posición instantánea de la partícula se calcula automáticamente mediante un algoritmo que encuentra el centro del objeto brillante. La concatenación de todas las posiciones calculadas forma la trayectoria de la partícula. Una ventaja de este tipo de rastreo es que permite distinguir claramente entre varias partículas atrapadas. Al usar una cámara para estudiar partículas atrapadas, es posible obtener una imagen clara del sistema estudiado y conocer la posición de varios objetos a la vez. La trayectoria que sigue una partícula se analiza para obtener información del sistema. Con ella se calcula la rigidez de una trampa en un proceso llamado *caracterización*. La rigidez de una trampa es la constante de proporcionalidad entre el desplazamiento desde la región de enfoque y la fuerza de restitución. Conocerla es indispensable para utilizar el instrumento.

En esta investigación, se utilizan videos de alta velocidad para caracterizar la rigidez de tres trampas ópticas. También se analiza la capacidad de resolución temporal y espacial que tiene una cámara de alta velocidad al rastrear partículas atrapadas. Para lograr esto, se ha analizado la trayectoria de una partícula y su correspondiente función de densidad espectral bajo distintas condiciones de iluminación y velocidades de obtención de video. Se cuantifica el efecto que las condiciones de iluminación tienen en la capacidad de resolución temporal.

El capítulo II es una descripción teórica de una trampa óptica. En este capítulo se explica el proceso de captura de una partícula y las características físicas de su movimiento. En el capítulo III se describe el arreglo experimental. El capítulo IV trata sobre el proceso de preparación de imágenes. Además, se describe el algoritmo para detectar automáticamente una partícula y se cuantifica el ruido presente en las imágenes. En el capítulo V se explica el proceso de caracterización de la trampa óptica. En el capítulo VI se presentan los resultados de la caracterización. Estos resultados muestran el efecto de la iluminación y la velocidad de video en la caracterización de las trampas. En el capítulo VII, se hace una comparación entre los resultados obtenidos y los presentados por investigaciones similares. Por último, en el capítulo VIII se presentan las conclusiones de esta investigación.

2. Descripción Teórica

2.1 Física de la trampa óptica.

Una trampa óptica se crea al enfocar un láser utilizando un objetivo de microscopio de apertura numérica grande. La apertura numérica (NA) de un objetivo cuantifica el ángulo máximo que hace un haz enfocado con la normal de la muestra (fig. 2.1). La relación entre la apertura numérica y éste ángulo máximo α es $NA = n\sin(\alpha)$. Una partícula dieléctrica que se encuentre cerca de este foco experimenta una fuerza. Si el índice de refracción de la partícula (n_p) es menor al del medio en que se encuentra (n), esta fuerza la desplazará fuera del punto de enfoque. Pero si su índice de refracción es mayor al del medio, la fuerza será atractiva hacia el punto de enfoque. Para desplazamientos pequeños desde este punto, la fuerza es aproximadamente lineal y puede ser modelada satisfactoriamente como un pozo cuadrado de potencial. El movimiento de la partícula atrapada es similar al movimiento armónico simple producido por un resorte con rigidez κ . Por esto, una trampa se caracteriza por una rigidez κ que determina la proporcionalidad entre la fuerza de restitución y el desplazamiento del objeto atrapado.

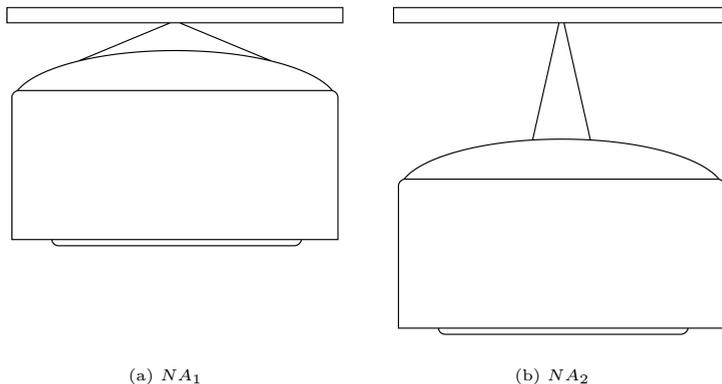


Figura 2.1: La apertura numérica de un objetivo determina el ángulo máximo que hace el láser con la muestra. En esta ilustración, $NA_1 > NA_2$.

En esta investigación se han utilizado partículas esféricas de poliestireno con diámetro de $1.9 \mu m$ e índice de refracción de 1.6 (para una longitud de onda

de 1064 nm) suspendidas en agua. Para formar la trampa se utilizó un láser con longitud de onda de 1064 nm. Idealmente, el láser que produce la trampa se enfoca en la región mínima permitida por la difracción. Como el índice de refracción de las esferas microscópicas es mayor que el del agua, una partícula cercana a la región de enfoque experimenta una fuerza de restitución.

En el régimen geométrico, cuando $R \gg \lambda$ siendo R el radio de la partícula y λ la longitud de onda de la luz incidente, se puede explicar la interacción entre una partícula dieléctrica y el láser utilizando un modelo de rayos. La idea general es que un haz láser puede imaginarse como una infinidad de rayos independientes que inciden en la partícula atrapada y sufren reflexión y refracción. Luego, los rayos transmitidos continúan su camino dentro de la partícula hasta alcanzar de nuevo la interfaz con el medio donde vuelve a reflejarse y refractarse. Este proceso se repite indefinidamente, cada vez con menor intensidad. Cada uno de estos procesos imparte una fuerza al objeto atrapado y la fuerza total que actúa sobre él es la suma de todas las contribuciones de los rayos individuales en todas sus reflexiones y refracciones.

A continuación se describe el cálculo de la fuerza de una trampa con longitud de onda λ que interactúa con un objeto esférico con radio $R \gg \lambda$. Estrictamente, el radio de las partículas en esta investigación es del orden de la longitud de onda de la trampa. Debido a esto, la región de enfoque no puede simplificarse a un solo punto y el modelo geométrico pierde validez. En cambio, debe tomarse en cuenta que las dimensiones del enfoque no son despreciables comparadas con las de la partícula. Esto altera el resultado del cálculo. A pesar de que las dimensiones de la partícula no son lo suficientemente grandes para utilizar el régimen geométrico, hacer el cálculo es útil para entender las propiedades generales de una trampa y su dependencia con la apertura numérica del objetivo.

Un rayo de luz con potencia P incide en una esfera dieléctrica con índice de refracción n_2 transportando una cantidad de momento por segundo $F = n_1 P/c$ donde n_1 es el índice de refracción del medio y c es la velocidad de la luz. La superficie tiene un coeficiente de transmisión T y de reflexión R que dependen del ángulo de incidencia y polarización de la luz y del índice de refracción relativo entre el objeto y el medio $n = \frac{n_2}{n_1}$. Estos coeficientes se calculan de acuerdo a las ecuaciones de Fresnel. Luego de incidir sobre la superficie, el rayo se descompone en una parte transmitida y otra reflejada. Al interior del objeto, se transmite un rayo con potencia PT que lleva una cantidad de momento por segundo $F_t = n_2 PT/c$. El rayo reflejado tiene una potencia PR e imparte una fuerza con magnitud $F_r = n_1 PR/c$. La parte transmitida continúa su camino hasta volver a encontrarse con la interfaz para volver a transmitirse, ahora con potencia PT^2 y reflejarse con potencia PRT (ver figura 2.2). La fuerza total sobre la esfera es la suma vectorial de las contribuciones de cada rayo

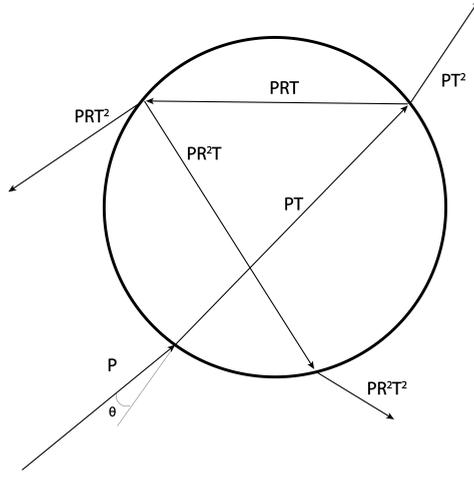


Figura 2.2: Esquema que muestra un rayo de potencia P incidiendo en la partícula. Este rayo sufre reflexión y difracción y el proceso se repite.

transmitido que escapa de la esfera con potencias $PT^2, PT^2R, \dots PT^2R^n$. La fuerza neta que actúa sobre el centro de la partícula es [2]:

$$F_s = \frac{n_1 P}{c} \left[1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2r) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right] \quad (2.1)$$

$$F_g = \frac{n_1 P}{c} \left[R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2r) + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right] \quad (2.2)$$

F_s es la fuerza en la dirección del rayo incidente llamada 'fuerza de dispersión'. Se le llama así porque la suma de las contribuciones F_s de todos los rayos en un haz produce una aceleración en la dirección de su eje. F_g es la fuerza en la dirección normal a la dirección del rayo y se le llama 'fuerza de gradiente' debido a que la suma total de todas las contribuciones F_g en un haz es conservativa y puede expresarse en función de la distancia al punto de equilibrio. La magnitud de la fuerza total que sufre la partícula es $F = \sqrt{F_s^2 + F_g^2}$. Además, θ es el ángulo de incidencia original del rayo con la normal a la superficie de la partícula y r es su ángulo de refracción $r = \arcsin\left[\frac{n_1}{n_2} \sin \theta\right]$.

Es conveniente definir una magnitud que no depende de la potencia del rayo incidente para observar la manera en que se distribuye la fuerza total en sus componentes F_s y F_g . Este factor adimensional es $Q = \frac{cF}{n_1 P}$, llamado *eficiencia*. Utilizando la eficiencia Q es posible comparar la acción de la trampa según su configuración geométrica, sin considerar la potencia incidente o las propiedades del medio.

Utilizando las ecuaciones anteriores para F_s y F_g , se ha calculado la eficiencia Q total, de dispersión y de gradiente para una partícula de poliestireno. Los resultados muestran por qué es necesario utilizar un objetivo de apertura numérica grande ($NA > 0.9$) si se desea obtener una trampa estable: los rayos que inciden con un ángulo pequeño a la partícula, solamente producen una fuerza de dispersión. Únicamente los rayos que inciden con un ángulo grande producen una fuerza de gradiente en la dirección perpendicular a su trayectoria original. Si se utiliza un objetivo de microscopio de apertura numérica pequeña ($NA < 0.9$), la mayor parte del haz incide sobre la partícula con un ángulo menor al necesario para producir una trampa. Solo al utilizar un objetivo con apertura numérica grande es que una parte considerable del haz incide con el ángulo suficiente para que la fuerza que acelera al objeto lejos del objetivo sea equilibrada.

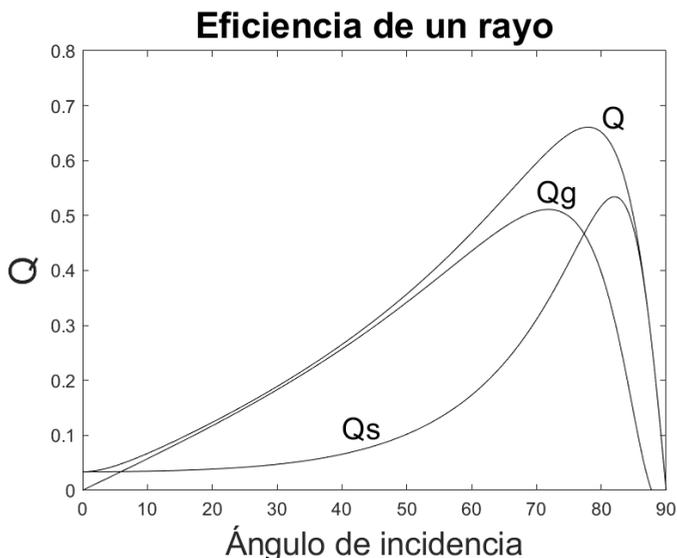


Figura 2.3: Eficiencia Q producida por un rayo incidente. Se observa que la fuerza de gradiente tiene un máximo en $\theta = 71.9^\circ$. Estas curvas han sido calculadas utilizando las ecuaciones presentadas en [2]

El cálculo de la eficiencia de un rayo individual se muestra en la figura 2.3. La fuerza de gradiente ejercida en una partícula de poliestireno es máxima cuando el rayo incide con un ángulo de 71.9° . Este cálculo considera un rayo único, la fuerza real que actúa sobre una partícula atrapada es la suma (integral) de las contribuciones de todos los rayos que conforman el haz.

Para calcular la fuerza que actúa sobre una partícula, separamos el problema en sus componentes vertical y horizontal. Un desplazamiento se considera vertical si es en la dirección de propagación del haz y horizontal si es en la dirección perpendicular a esta propagación. Para encontrar la fuerza que actúa sobre la partícula, se considera el haz incidente como formado por un número muy grande pero finito de rayos individuales. Luego se calcula la contribución de cada rayo a partir de la geometría del sistema. Los detalles del análisis geométrico pueden encontrarse en [2]. En este régimen, la fuerza no depende del radio de la partícula así que en lo que se presenta a continuación se ha tomado un radio unitario y sin dimensiones.

En una trampa óptica tridimensional, existe un punto de equilibrio en donde la fuerza total sobre la partícula es nula. Para que esto suceda en el eje vertical, la incidencia del haz debe ser lo suficientemente oblicua para que la fuerza de gradiente equilibre a la fuerza de dispersión. Considerando cómo inciden los rayos en una partícula desplazada ligeramente del punto de equilibrio, se ha calculado la fuerza vertical ejercida por el haz en función de este desplazamiento.

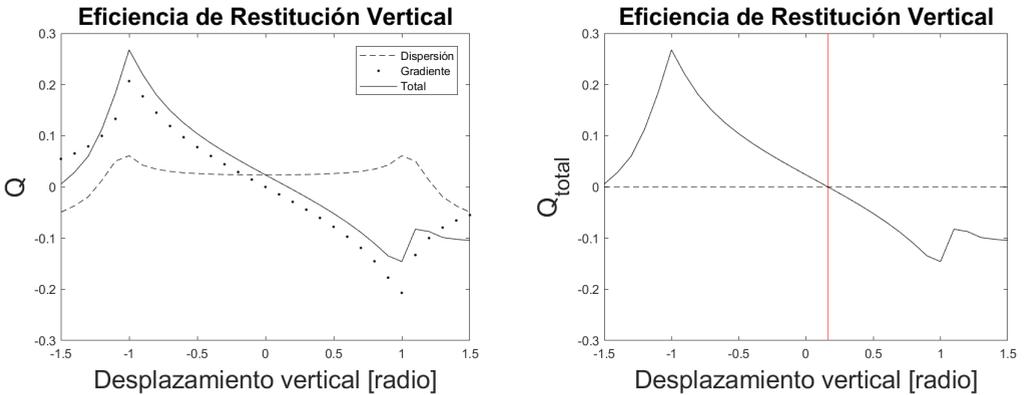


Figura 2.4: Fuerzas sobre una partícula desplazada en el eje vertical. Se muestra la fuerza total, de dispersión y de gradiente. Se muestra también el punto de equilibrio vertical, desplazado del origen.

En la figura 2.4 se puede notar que el punto de equilibrio vertical no está exactamente en el origen de coordenadas, que es el punto de enfoque del haz. Esto es consecuencia de que la presión de radiación del láser produce una aceleración

que debe ser equilibrada. Solo cuando la partícula se ha desplazado del origen, sufre una fuerza de gradiente vertical en sentido contrario lo suficientemente fuerte para lograr el equilibrio.

Del mismo modo, considerando cómo inciden los rayos cuando el desplazamiento es en el plano horizontal, se calcula la fuerza de restitución en función de este desplazamiento. Como se muestra en la figura 2.6, su punto de equilibrio sí está en el origen.

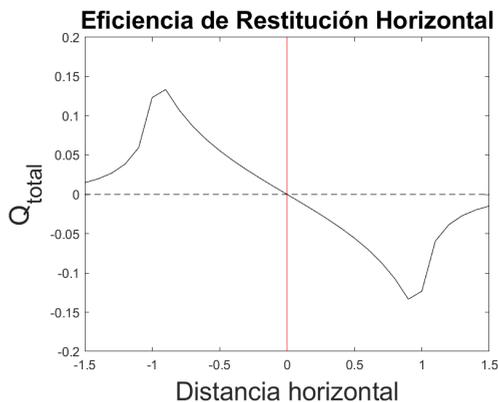


Figura 2.5: Fuerza total sobre una partícula desplazada en el eje horizontal. La línea vertical marca el punto de equilibrio, que es el origen de coordenadas.

El cálculo anterior muestra que una partícula atrapada está bajo el efecto de una fuerza de restitución aproximadamente lineal cuando su desplazamiento del punto de equilibrio es pequeño. Mientras la partícula no se aleje demasiado del punto de equilibrio, el efecto de la trampa puede modelarse como el de un resorte con constante κ . Esta constante de rigidez es la característica fundamental de una trampa. Si no existe alguna fuerza externa sobre la partícula, su desplazamiento del equilibrio es producto de la interacción browniana con el medio, que no es lo suficientemente intensa como para alejar a la partícula una distancia considerable del punto de equilibrio.

2.2 Movimiento browniano libre

Una partícula suspendida en un líquido presenta un movimiento aleatorio llamado movimiento browniano. Se trata de un movimiento irregular en el que la trayectoria de la partícula presenta cambios de dirección y velocidad aleatorios.

Este movimiento es el resultado de las colisiones que suceden constantemente entre la partícula y las moléculas del líquido.

Una partícula libre en movimiento browniano tiene una trayectoria aleatoria debido a que constantemente está siendo modificada por una fuerza también aleatoria. No es posible conocer su posición final en algún instante determinado pero sí la probabilidad de que se haya desplazado cierta distancia en cierto tiempo.

El comportamiento de una partícula libre se describe por la ecuación estocástica de Langevin

$$m\ddot{x}(t) = -\gamma\dot{x}(t) + F(t) \quad (2.3)$$

En donde γ es el coeficiente de fricción, D el coeficiente de difusión y $F(t)$ es una función aleatoria que se describe más adelante. El primer término del lado derecho representa la fricción entre la partícula y el medio. El segundo término representa la fuerza aleatoria producida por la interacción entre las moléculas del medio y la partícula. La función aleatoria es $F(t) = \gamma\sqrt{2D}W(t)$ donde $W(t)$ es la función de ruido blanco y cumple con las siguientes características.

$$\langle W(t) \rangle = 0 \quad \langle W(t)^2 \rangle = 0 \quad \langle W(t)W(t') \rangle = \delta_{tt'} \quad (2.4)$$

Para el caso de partículas esféricas con radio R , el coeficiente de fricción es $\gamma = 6\pi\eta R$ donde η es la viscosidad del medio, conocido como coeficiente de Stokes. Esta aproximación es válida solamente para partículas que se mueven muy lejos de alguna superficie. Una partícula atrapada por una trampa óptica se mueve cerca de la superficie plana de un porta objetos. El efecto que esto tiene sobre el coeficiente de fricción se describe al final de este capítulo. El coeficiente de difusión está dado por $D = \frac{k_B T}{\gamma}$.

La ecuación de Langevin para la velocidad es

$$m\dot{v}(t) = -\gamma v(t) + F(t) \quad (2.5)$$

Estas ecuaciones tienen la solución general

$$x(t) = x_0 + \int_0^t v(s) ds \quad (2.6)$$

$$v(t) = e^{-\frac{\gamma}{m}t}v_0 + \frac{1}{m} \int_0^t e^{-\frac{\gamma}{m}(t-s)} F(s) ds \quad (2.7)$$

Como $F(t)$ es una función aleatoria, estas soluciones no son útiles para predecir la posición o velocidad instantánea de la partícula en algún tiempo dado. En cambio, sirven para conocer la estadística de este movimiento.

Lo primero que se observa de la solución general es que la velocidad original de una partícula en movimiento browniano se disipa rápidamente. El término $e^{-\frac{\gamma}{m}t}v_0$ disminuye rápidamente y es despreciable para valores de t mucho mayores a $\frac{m}{\gamma}$. La cantidad $\tau \equiv \frac{m}{\gamma}$ es el tiempo característico de relajación del sistema. El movimiento en tiempos menores que este tiempo característico se conoce como *balístico*. Aún con velocidades de video ultra rápidas, el movimiento balístico no es observable. Una esfera microscópica con $R \approx 10^{-6}m$ y densidad de $\rho \approx 1g/cm^3$ tiene un $\tau \approx 10^{-7}s$ en agua. Una cámara de alta velocidad capaz de obtener 500k cuadros por segundo, toma una imagen cada $2 \times 10^{-6}s$, lo cual es insuficiente para reconocer movimientos en la escala temporal de τ

Utilizando las soluciones generales para el movimiento browniano se puede calcular la estadística de sus posiciones. La característica más utilizada para estudiar un movimiento browniano es su desplazamiento cuadrático medio $\langle (x(t) - x_0)^2 \rangle$. Utilizando las soluciones anteriores se puede demostrar que, siempre que el tiempo transcurrido sea mucho mayor que τ ,

$$\langle (x(t) - x_0)^2 \rangle = 2Dt \quad (2.8)$$

Esta expresión permite conocer el coeficiente de difusión D a partir de los datos de posición de una partícula libre.

Además, el hecho de que las escalas temporales de un experimento son mucho mayores a τ , justifica que en lugar de utilizar la ecuación de Langevin, se pueda utilizar su versión amortiguada para describir el movimiento. Esta ecuación amortiguada de Langevin es el resultado de ignorar el término inercial $m\ddot{x}(t)$ en la ecuación 2.3:

$$\dot{x} = \sqrt{2D} W(t) \quad (2.9)$$

De aquí se puede conocer el espectro de frecuencias del movimiento browniano. La transformada de Fourier de $W(t)$ cumple con $|\tilde{W}(f)|^2 = 1$. Entonces, tomando la transformada de Fourier de toda la ecuación se obtiene

2.3. MOVIMIENTO BROWNIANO EN UN POTENCIAL CUADRÁTICO 13

$$\tilde{x}(f) = \frac{\sqrt{2D}}{-i2\pi f} \tilde{W}(f) \quad (2.10)$$

Y con esta expresión se puede calcular el espectro de frecuencias $P(f) = |\tilde{x}(f)|^2$. O sea,

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2 f^2} \quad (2.11)$$

Esta expresión para el espectro de frecuencias se grafica en una escala logarítmica como una recta decreciente con pendiente $m = -2$.

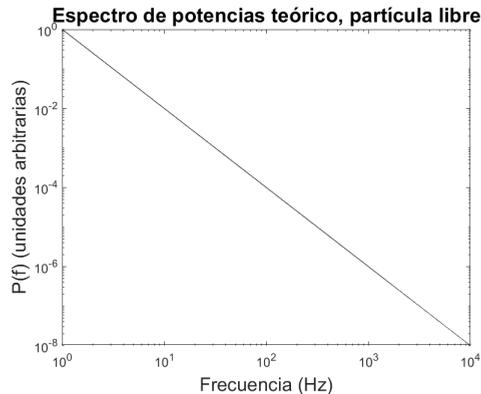


Figura 2.6: Espectro de potencias teórico de una partícula libre.

2.3 Movimiento browniano en un potencial cuadrático

Cuando la partícula estudiada está atrapada, se encuentra en un potencial que puede ser modelado como cuadrático. Además de la fuerza aleatoria, la ecuación amortiguada de Langevin incluye una fuerza de restitución

$$\dot{x}(t) = -\frac{\kappa}{\gamma} x(t) + \sqrt{2D}W(t) \quad (2.12)$$

A partir de esta ecuación se encuentra el espectro de potencias de una partícula atrapada. Acomodando y tomando la transformada de Fourier de toda la ecuación se obtiene

$$-(i2\pi f)\tilde{x}(f) + \frac{\kappa}{\gamma}\tilde{x}(f) = \sqrt{2D}\tilde{W}(f) \quad (2.13)$$

$$\tilde{x}(f) = \frac{\sqrt{2D}\tilde{W}(f)}{-2\pi if + \frac{\kappa}{\gamma}} \quad (2.14)$$

Calculando $P(f)$ y organizando los términos se llega a una expresión para el espectro de frecuencias de una partícula atrapada

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2} \frac{1}{(f^2 + (\frac{\kappa}{2\pi\gamma})^2)} \quad (2.15)$$

El espectro de potencias de una partícula atrapada es una función conocida como *lorentziana*. La forma de esta función está determinada únicamente y por su *frecuencia de corte* $f_c = \frac{\kappa}{2\pi\gamma}$. La gráfica de una función lorentziana, en escala logarítmica, tiene una sección aproximadamente horizontal seguida de una sección decreciente. Entonces, la forma que tiene el espectro de potencias de una partícula atrapada se relaciona con la constante de rigidez de la trampa. Esta relación se puede utilizar para conocer la rigidez de una trampa a partir del movimiento de las partículas que atrapa.

2.4 Correcciones hidrodinámicas

El coeficiente de fricción hidrodinámica γ se utiliza para calcular la rigidez de una trampa $f_c = \frac{\kappa}{2\pi\gamma}$. Una partícula esférica lejos de una superficie tiene un coeficiente de fricción dado por $\gamma = 6\pi\eta R$. Una partícula atrapada por una trampa óptica no se encuentra muy lejos de otras superficies. La región de enfoque de una trampa se encuentra normalmente a algunas micras de la superficie de vidrio del porta objetos, normalmente entre 7 y 9 micras en esta investigación. Esto produce un cambio observable en el coeficiente de fricción y debe realizarse una corrección de γ para tomar en cuenta este efecto. Esta corrección, para una esfera de radio R a una distancia h de la superficie, es [12]

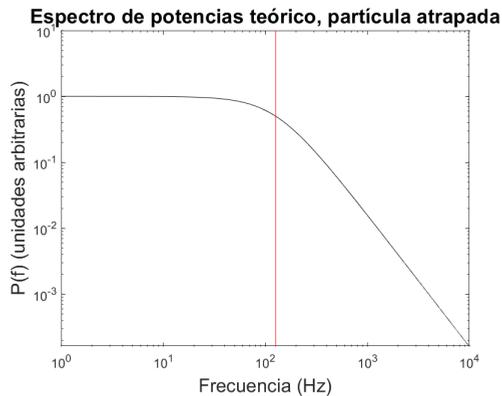


Figura 2.7: Espectro de potencias de una partícula atrapada, calculado para una trampa con $\kappa = 20 \frac{fN}{nm}$. La línea vertical muestra la frecuencia de corte.

$$\gamma_{hidro} \approx \frac{\gamma}{1 - \frac{9}{16} \frac{R}{h}} \quad (2.16)$$

En adelante, el coeficiente γ ya incluye el efecto de la distancia entre la partícula y el porta objetos.

3. Arreglo experimental

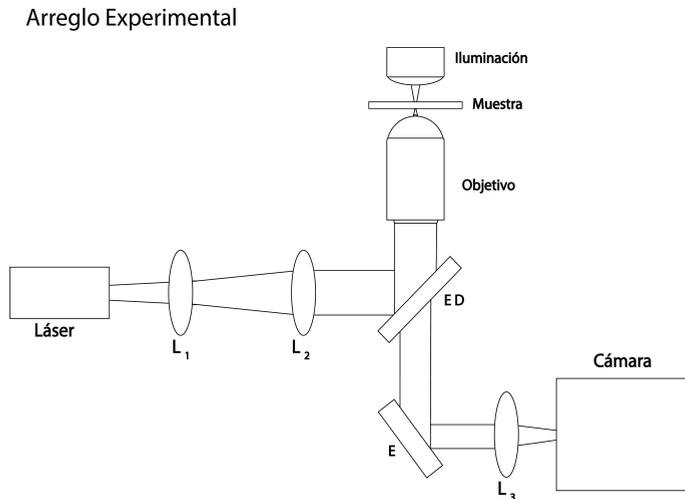


Figura 3.1: Esquema de la trampa óptica con que se hicieron los experimentos.

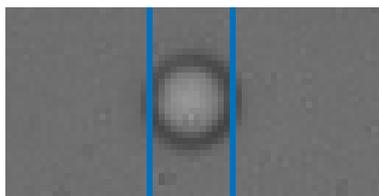
Se ha construido una trampa óptica para llevar a cabo los experimentos. Se utilizó un láser infrarrojo con longitud de onda de 1064 nm. Para formar la trampa se utilizó un objetivo de inmersión en aceite *Nikon 100x* con apertura numérica $NA = 1.25$. Esta apertura numérica permite un ángulo máximo con la normal de la muestra de 80 deg. Se han utilizado dos lentes (L_1 y L_2) planoconvexas con distancias focales de 10 cm y 20 cm para colimar el haz y hacerlo más ancho de modo que llene completamente la apertura trasera del objetivo. La iluminación del sistema consiste en un LED de alta intensidad alimentado por una fuentes de corriente. Un espejo dicróico hace incidir el láser sobre el objetivo y a la vez permite el paso de luz proveniente de la muestra. Esta luz es dirigida hacia la cámara usando un espejo. Se utilizó un lente (L_3) con distancia focal de 10 cm

para formar una imagen en el detector de la cámara. Este arreglo se utilizó para atrapar partículas esféricas de poliestireno con un diámetro de $1.9 \pm .03 \mu m$ a una distancia de $6 \mu m$ de la superficie del porta objetos.

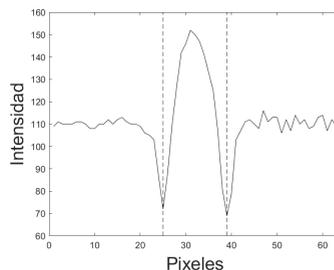
La cámara utilizada es una Photron SA1.1. Se trata de una cámara de alta velocidad con velocidad de obtención de hasta 675,000 cuadros por segundo. Cuenta con un sensor CMOS con pixeles de $20 \mu m$. Las velocidades de obtención utilizadas fueron de 10k, 100k, 300k y 500k cuadros por segundo. Los videos obtenidos fueron procesados cuadro por cuadro en un formato de 8 bits donde la intensidad en cada pixel se representa con un número entero entre 0 y 255.

3.1 Calibración espacial

Al analizar el video de una partícula atrapada se obtiene su trayectoria en pixeles. Para que esta trayectoria tenga sentido físico hay que conocer la equivalencia entre pixeles y nanómetros. Esta equivalencia se encontró desplazando la plataforma que porta la muestra y observando el cambio en la posición de la imagen de una marca. Además, esta medición se confirmó de dos maneras: utilizando la imagen de una partícula atrapada y analizando una imagen de prueba. Según la información del fabricante, la desviación estándar del diámetro de las esferas es $.03 \mu m$ que es muy pequeña comparada con el diámetro promedio de $1.9 \mu m$. Esta consistencia permite hacer una comparación entre el diámetro aparente de una partícula y el número de pixeles que ocupa en una imagen. En este caso el diámetro aparente fue de 14 pixeles.



(a) Partícula

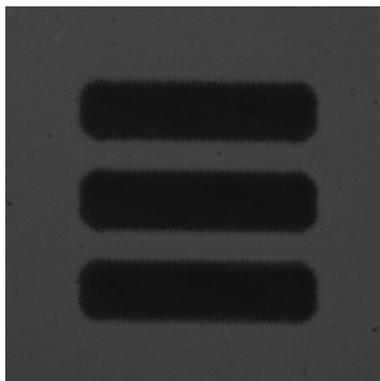


(b) Perfil de intensidad sobre el diámetro horizontal.

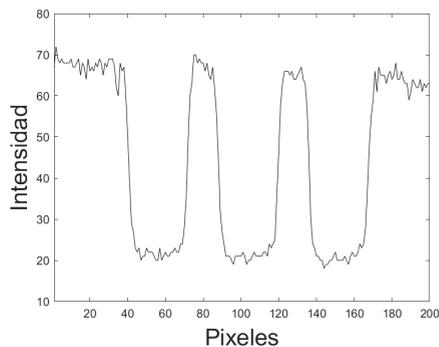
Figura 3.2: El diámetro aparente de la partícula se utiliza para encontrar la equivalencia de pixeles a nanómetros.

Para formar una imagen de prueba se utilizó la *tabla de evaluación USAF 1951*. Se trata de un conjunto de marcas de distintos tamaños utilizadas para conocer

la resolución de un microscopio. La equivalencia se encontró midiendo el ancho en pixeles de las marcas del elemento 7 – 2. Esto es, el elemento 2 del grupo 7, que está formado por tres barras negras con un ancho de $3.48\mu m$. En las imágenes, estas barras aparecen con un ancho de 26 pixeles.



(a) Grupo 7-2 USAF 1951.



(b) Perfil de intensidad.

Figura 3.3: El ancho de las líneas horizontales de es de $3.48\mu m$. El perfil de intensidad de la imagen permite conocer su ancho en pixeles.

Los tres métodos para conocer la equivalencia fueron consistentes. Se determinó una equivalencia de 135 nanómetros por cada pixel.

4. Microscopía Digital

4.1 Algoritmo de detección

Cada cuadro del video es analizado de manera automática para localizar la posición de la partícula. Para lograr esto se ha utilizado un algoritmo propuesto por J. Crocker y D. Grier, conocido actualmente por el nombre de sus creadores [10]. El proceso consiste en perfeccionar cada imagen eliminando el ruido para después identificar a la partícula como el objeto más brillante en cada imagen y calcular su posición como las coordenadas del centro de masa ese objeto. En esta investigación se tomaron videos que contienen únicamente a una partícula así que su trayectoria es simplemente el conjunto de todas las posiciones individuales. Aún así, este algoritmo también es útil cuando en una imagen aparece más de una partícula, e incluso cuando el brillo de cada una es distinto. En estos casos, el brillo aparente de cada una de ellas aporta información sobre su profundidad y se determina cada trayectoria de acuerdo a los desplazamientos de las posiciones calculadas en cada cuadro del video. El método consiste de cuatro etapas: corregir las imperfecciones en la imagen, determinar una coordenada posible para la partícula, perfeccionar ésta primera suposición y concatenar los resultados en una trayectoria.

Una imagen digital contiene imperfecciones como ruido y contraste no uniforme producidas por efectos propios de la cámara o por cuestiones de iluminación. Estas imperfecciones alteran el proceso de detección. Una imagen digital en escala de grises se representa como una matriz con las mismas dimensiones, en donde cada elemento es el valor del brillo del pixel correspondiente. Es decir, una imagen puede ser representada como una matriz $I(x, y)$. Como se verá más adelante, la detección de la partícula se basa en estos valores de I y es necesario eliminar el ruido para que no altere el resultado. A continuación se utiliza una imagen, en la que se observa una partícula atrapada, para mostrar este proceso.

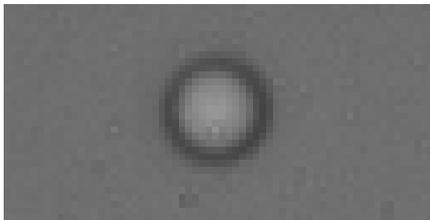


Figura 4.1: Imagen de la partícula antes del procesamiento.

El primer procesamiento pretende eliminar el fondo de la imagen. Este fondo contiene modulaciones de intensidad que producen errores en la detección. Primero debe determinarse un tamaño característico w en pixeles, el cual es mayor que el radio aparente de la partícula. Luego se opera un promedio de caja de tamaño $2w + 1$ sobre la imagen original. Esto produce una nueva imagen que representa el fondo promediado y está dado por.

$$I_w(x, y) = \frac{1}{(2w + 1)^2} \sum_{i, j=-w}^w I(x + i, y + j) \quad (4.1)$$

La operación del promedio se realiza mediante una convolución entre la matriz que representa a la imagen original y el kernel de tamaño $2w + 1$

$$K_w = \frac{1}{(2w + 1)^2} \quad (4.2)$$

El segundo procesamiento busca eliminar el ruido aleatorio que aparece en la imagen producido por la digitalización de la imagen. Este tiene una correlación de un solo pixel y puede ser eliminado operando una convolución de I con un kernel gaussiano para obtener una nueva imagen.

$$I_\lambda(x, y) = \left[\sum_{i=-w}^w \exp\left(-\frac{i^2}{4}\right) \right]^{-2} \sum_{i, j=-w}^w I(x + i, y + j) \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{4}\right) \quad (4.3)$$

En donde el primer término es una constante de normalización. Esta nueva imagen está difuminada y no presenta ruido digital. Es el resultado de una convolución entre la matriz que representa a la imagen original y el kernel de tamaño $2w + 1$:

$$K_\lambda(i, j) = \left[\sum_{k=-w}^w \exp\left(-\frac{k^2}{4}\right) \right]^{-2} \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{4}\right) \quad (4.4)$$

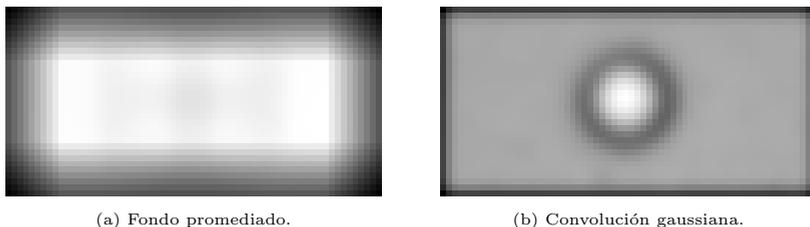


Figura 4.2: Las dos etapas de procesamiento.

La imagen a analizar es la diferencia entre los dos procesos anteriores, $I_f = I_\lambda - I_w$. O sea, la imagen final es el resultado de tomar la imagen difuminada y sustraer de ella el fondo promediado. Luego de hacer esta resta y desechar los resultados negativos, se obtiene una imagen final en la que solamente aparece la región brillante de la imagen original. Este proceso ha conservado únicamente la parte central de la partícula y ha desechado su contorno oscuro.

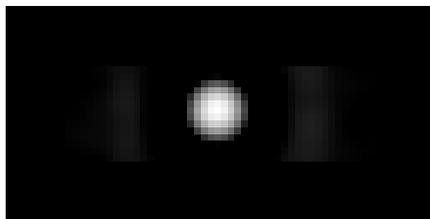


Figura 4.3: Imagen final producida por el procesamiento.

Ahora que se ha obtenido una imagen procesada, se sigue con la detección de la posición. La primera estimación del centro de la partícula es simplemente el par (x, y) del pixel más brillante en la imagen. Con este punto de partida, se calcula una corrección ϵ con precisión mejor que un pixel haciendo un análisis del brillo alrededor del centro. El centro real de la partícula se calcula de forma similar a un centro de masas. El brillo de cada pixel en la que aparece la partícula, expresado como un valor entero entre 0 y 255 se multiplica por su distancia al centro y se divide entre el brillo total. El resultado de esto es una nueva posición relativa al centro con coordenadas:

$$\epsilon_x = \frac{1}{m_0} \sum_{i+j \leq w^2} i I(x+i, y+j) \quad (4.5)$$

$$\epsilon_y = \frac{1}{m_0} \sum_{i+j \leq w^2} j I(x+i, y+j) \quad (4.6)$$

En donde m_0 es el brillo total $m_0 = \sum_{i+j \leq w^2} I(x+i, y+j)$. Si $|\epsilon| > .5$, el pixel del centro de masa de la partícula no coincide con el pixel más brillante. Cuando esto sucede, se determina un nuevo centro (x, y) agregando (o sustrayendo) 1 pixel de la suposición inicial. Luego se vuelve a hacer el cálculo del centro de masas. Este proceso se repite hasta que $|\epsilon| < .5$. Entonces, la posición final será $(x_0, y_0 = x + \epsilon_x, y + \epsilon_y)$.

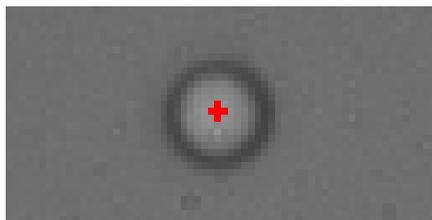


Figura 4.4: Imagen original marcada con la posición encontrada. Las coordenadas en pixeles de la posición calculada son $x = 31.82, y = 16.25$

La posición calculada de la partícula depende de su centro brillante. En algunas ocasiones es posible que esta posición no corresponda exactamente con el centro real de la partícula. Sin embargo, la posición calculada es consistente: cuando la iluminación provoca que se determine una posición ligeramente separada del centro real, esta separación será la misma en todas las imágenes de un video.

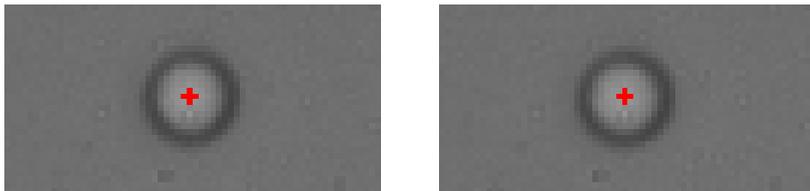


Figura 4.5: Dos imágenes de la misma partícula tomadas con un segundo de diferencia.

Cuando en el video aparecen más de una partícula, existe el problema de trazar correctamente las trayectorias determinando cuál posición de un cuadro corresponde a cuál en uno anterior. En esta investigación solamente aparece una partícula por video, así que determinar la trayectoria es trivial: simplemente se

concatenan las posiciones instantáneas. En la figura 4.11 se muestra la trayectoria de una partícula atrapada, obtenida por el método que se ha descrito. Para el caso más general en que en el video aparezcan varias partículas, se relaciona el conjunto de posiciones en un cuadro del video $\{x_i\}$, con las posiciones en el cuadro siguiente $\{y_j\}$. Si en la imagen aparecen varias partículas atrapadas por distintas trampas separadas por una distancia L , entonces alguna nueva posición y_j corresponde a otra inicial x_i si $|x_i - y_j| \ll L$. Si en cambio se trata de partículas libres, o de más de una partícula atrapadas por la misma trampa, de modo que no pueda fijarse una distancia característica L , cada nueva posición corresponde a una anterior si su desplazamiento $\delta_{ij} = |x_i - y_j|$ maximiza la función de densidad de probabilidad $P(\delta_{ij}, \Delta t)$ dada por la ecuación de Fokker-Planck del sistema en cuestión.

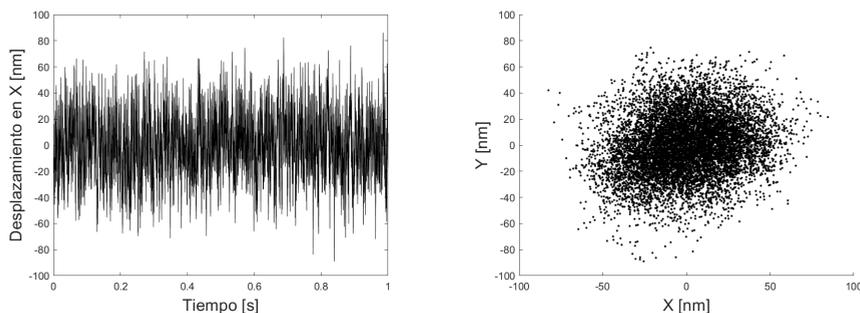


Figura 4.6: Trayectorias en una y dos dimensiones de una partícula atrapada.

4.2 Análisis del ruido

El estudio del movimiento de una partícula atrapada depende de una detección correcta. Para conocer las limitaciones del algoritmo de detección y la validez de sus resultados, es necesario hacer un análisis del ruido presente en las imágenes. Cuando se rastrea la posición utilizando una cámara, el ruido en la imagen se produce principalmente por tres razones: las imperfecciones en el equipo, iluminación no uniforme del fondo y el error de detección propio de formar una imagen digital. El ruido de digitalización es más evidente y significativo en una imagen de baja resolución en la que la partícula ocupa apenas algunas decenas de píxeles.

La presencia de ruido se caracterizó de dos maneras. La primera simplemente mide la diferencia entre la intensidad máxima de la partícula y el promedio

del fondo de la imagen. La segunda consiste en calcular una razón de señal a ruido ($\frac{S}{R}$). Esta razón entre señal y ruido se cuantifica utilizando el valor promedio de intensidad de una ventana centrada en la partícula (μ_{part}) y la desviación estándar (σ_{fondo}) de la intensidad del fondo. Al utilizar un algoritmo de detección de centroide, es necesario que la relación de señal a ruido sea mayor que 10 para obtener un resultado aceptable [9].

$$\frac{S}{R} = \frac{\mu}{\sigma} \quad (4.7)$$

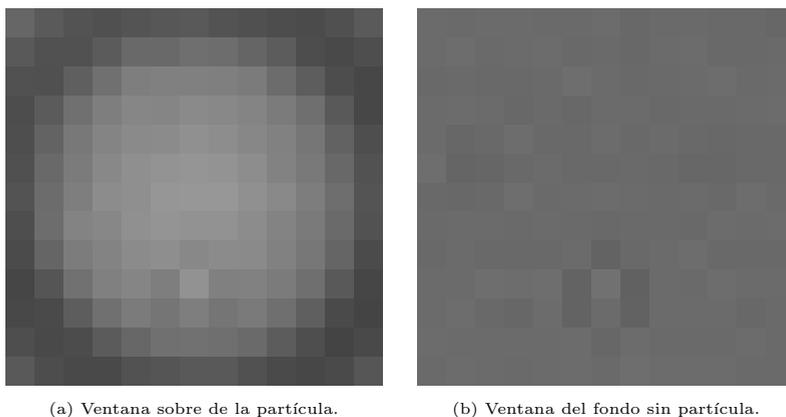


Figura 4.7: Ventanas utilizadas para calcular la razón S/R .

Se han utilizado tres niveles de iluminación, relacionados con la intensidad de la corriente con que se alimentó el LED: baja (hasta $.5 A$), media (entre $.5 A$ y $2 A$) y alta (más de $2 A$). A continuación se analiza el efecto que la iluminación y la velocidad de la cámara tienen sobre las condiciones de ruido. Los resultados se organizan de acuerdo a la velocidad con que se tomó el video.

4.2.1. 10k cuadros por segundo

A esta velocidad de obtención, solamente se utilizó un nivel bajo de iluminación. A simple vista, es el video con imágenes más claras. Aquí, la caracterización de la trampa está limitada por la velocidad de obtención del video y no por la razón de señal a ruido de la imagen.

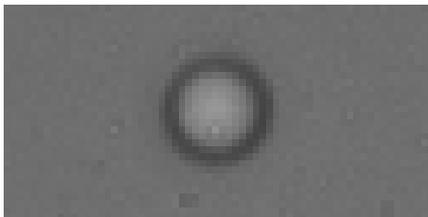


Figura 4.8: Partícula atrapada. Video tomado a 10k cuadros por segundo.

10k					
Iluminación	μ_{fondo}	σ_{fondo}	max_{part}	Diferencia	S/R
Baja	106.11	2.16	151	44.89	49.43

Tabla 4.1: Caracterización del ruido a 10k cps.

Como se verá en la tabla ??, estas mediciones no corresponden a la mejor resolución espacial y temporal a pesar de tener la mejor razón de señal a ruido. Esto se debe a que el tiempo entre cada cuadro es insuficiente para resolver totalmente el movimiento de la partícula atrapada.

4.2.2. 100k cuadros por segundo

A esta velocidad de obtención se utilizaron tres niveles de iluminación. La iluminación menor es deficiente y hace que la partícula casi no se distinga.

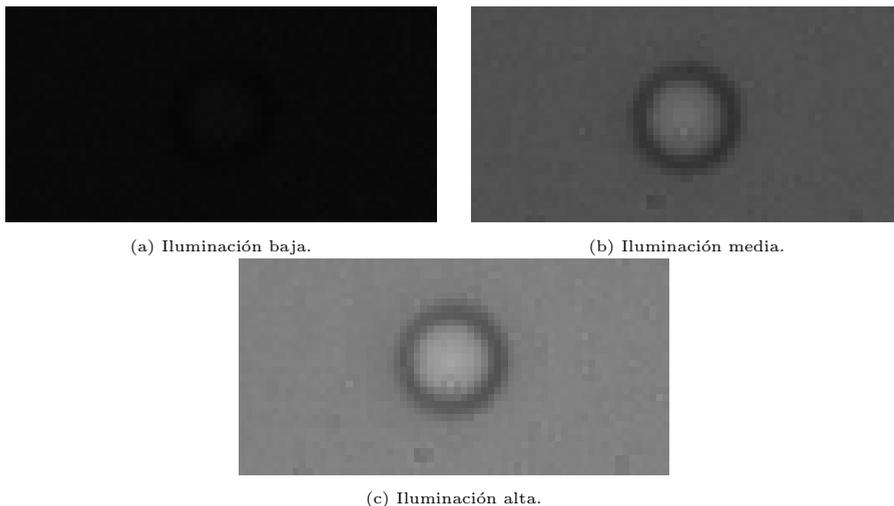


Figura 4.9: Partícula atrapada. Video tomado a 100k cuadros por segundo con tres niveles de iluminación.

100k					
Iluminación	μ_{fondo}	σ_{fondo}	max_{part}	Diferencia	S/R
Baja	9.63	0.85	14	4.37	10.68
Media	93.17	2.03	112	27.93	38.15
Alta	127.73	1.62	165	37.27	74.63

Tabla 4.2: Caracterización del ruido a 100k cps.

En el nivel más bajo de iluminación, la relación de señal a ruido está muy cerca del límite inferior aceptable. Como se puede ver en la tabla 4.5, esto corresponde a la peor resolución teórica de todas las combinaciones que se hicieron. Además, en la tabla ?? se mostrará como esta medición tiene la peor resolución observada experimentalmente.

4.2.3. 300k cuadros por segundo

A esta velocidad de obtención se utilizaron dos niveles de iluminación. La rápida velocidad de obtención del video produce imágenes oscuras a pesar de una iluminación intensa. A pesar de esta alta velocidad, es fácil detectar y rastrear las partículas.



Figura 4.10: Partícula atrapada. Video tomado a 300k cuadros por segundo con dos niveles de iluminación.

300k					
Iluminación	μ_{fondo}	σ_{fondo}	max_{part}	Diferencia	S/R
Media	26.12	.98	31	4.88	21.95
Alta	54.82	1.43	73	18.18	36.76

Tabla 4.3: Caracterización del ruido a 300k cps.

La mejor resolución espacial y temporal se logró con esta velocidad de video, utilizando una iluminación alta. Este y otros resultados pueden leerse en la tabla ??.

4.2.4. 500k cuadros por segundo

A esta velocidad de obtención se utilizaron dos niveles de iluminación. El video no es muy claro a simple vista pero está lo suficientemente iluminado como para que la partícula sea detectada correctamente.



Figura 4.11: Partícula atrapada. Video tomado a 500k cuadros por segundo con dos niveles de iluminación.

500k					
Iluminación	μ_{fondo}	σ_{fondo}	max_{part}	Diferencia	S/R
Media	12.50	.85	16	3.50	12.18
Alta	26.89	.81	36	9.11	31.80

Tabla 4.4: Caracterización del ruido a 500k cps.

En las tablas anteriores se puede observar que tanto la diferencia entre el máximo de intensidad con el fondo como la razón de señal a ruido dependen de la velocidad de obtención del video y del nivel de iluminación. Más adelante se verá el efecto que esto tiene en la resolución temporal de una medición.

4.3 Límite de resolución del algoritmo

Debido a la presencia de ruido, la detección de la posición de la partícula no es perfecta. El algoritmo de detección tiene un límite de resolución dado por el error máximo producido por este ruido. Una partícula con radio aparente s , presente en una imagen con una razón de señal a ruido S/R procesada usando una ventana de radio w tiene una incertidumbre dada por [10]:

$$\Delta\epsilon = \left(S/R\right)^{-1} \left(\frac{2w^2}{s^2}\right) \frac{1}{2\pi^{1/2}} \left[1 - \exp\left(-\frac{2w^2}{s^2}\right)\right] \quad (4.8)$$

Este $\Delta\epsilon$, que en este caso está dado en nanómetros, es una incertidumbre en la posición con precisión subpixel calculada por el algoritmo. Debido a esto, se considera que el límite teórico de resolución de este proceso es $\Delta\epsilon$. Este límite teórico depende de las condiciones de iluminación y velocidad de obtención a través de la razón S/R .

Límites de resolución			
Velocidad	Iluminación	S/R	$\Delta\epsilon$ [nm]
10k	Baja	49.43	2.64
100k	Baja	10.68	12.24
	Media	38.15	3.43
	Alta	74.63	1.75
300k	Media	21.95	5.95
	Alta	36.76	3.55
500k	Media	12.18	10.73
	Alta	31.80	4.11

Tabla 4.5: Límite teórico de la detección.

5. Caracterización

La característica fundamental de una trampa óptica es su rigidez. Esto es, la constante de proporción entre la fuerza de restitución sobre un objeto atrapado y su distancia al punto de enfoque de la trampa. Conocer esta cantidad es fundamental para estudiar el comportamiento de sistemas microscópicos y para manipularlos.

Existen diferentes métodos para caracterizar una trampa, todos ellos basados en analizar el movimiento de una partícula atrapada. Se pueden clasificar en dos tipos: aplicación de una fuerza conocida y análisis del movimiento browniano. Los métodos del primer tipo aplican una fuerza a una partícula atrapada y miden cuánto se desplaza desde un punto de equilibrio inicial a uno final. El nuevo punto de equilibrio provee la información necesaria para conocer la constante de proporcionalidad de la trampa. Los métodos del segundo tipo utilizan la información del movimiento browniano de la partícula atrapada, en la que no actúa otra fuerza más que la de interacción con el medio y la producida por la trampa.

En esta sección se describen y aplican tres métodos basados en el movimiento browniano. El primero consiste en encontrar la forma del potencial en base a la distribución de posiciones. Esto tiene la ventaja de que no asume ninguna forma para el potencial y puede confirmar su carácter cuadrático. El segundo calcula la rigidez en función de la varianza del movimiento. El tercer método es un análisis del espectro de frecuencias de la partícula atrapada.

5.1 Estadística de Boltzmann

Este primer método consiste en encontrar el potencial al que está sujeta la partícula atrapada. Calibrar la trampa de este modo permite confirmar que el potencial que produce es cuadrático. Además de no hacer suposiciones sobre la forma de este potencial, este método tiene la ventaja de que solamente requiere que se conozca un parámetro del sistema: su temperatura [13].

Una partícula en equilibrio térmico con el medio que la rodea tiene un comportamiento descrito por la estadística de Boltzmann. O sea, la densidad de probabilidad $\rho(x)$ de encontrarla en cierta región cuando está sujeta a un potencial $U(x)$, está dada por

$$\rho(x) = Ce^{-\frac{U(x)}{k_B T}} \quad (5.1)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y C es una constante de normalización que se escoge para que $\int_{-\infty}^{\infty} \rho(x) dx = 1$. Si la densidad de probabilidad $\rho(x)$ es conocida, entonces se puede encontrar el potencial que la determina

$$U(x) = -k_B T \ln[\rho(x)] \quad (5.2)$$

En donde se ha ignorado un segundo término constante $k_B T \ln[C]$ que determina un desplazamiento del potencial y no es importante para el cálculo de la rigidez.

La densidad de probabilidad del movimiento se puede conocer a partir del histograma de posiciones de la partícula atrapada. Para realizar la calibración se obtiene la trayectoria de la partícula y se crea un histograma de desplazamientos relativos al punto de equilibrio. Este histograma es una aproximación discreta a la función continua $\rho(x)$.

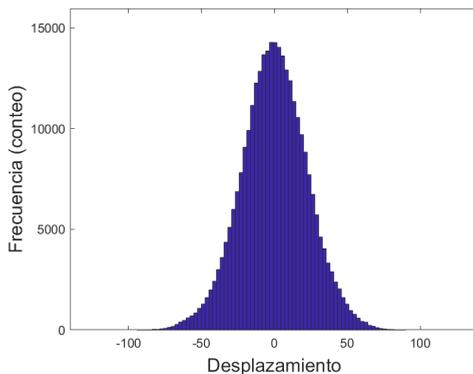


Figura 5.1: Histogramas de los desplazamientos de una partícula atrapada.

Una partícula atrapada se localiza normalmente cerca del centro. La distribución del desplazamiento es, por lo menos aproximadamente, gaussiana como se muestra en la figura 5.1. Para conocer el potencial, se calcula el logaritmo natural de este conjunto discreto de conteos y se multiplica por $k_B T$.

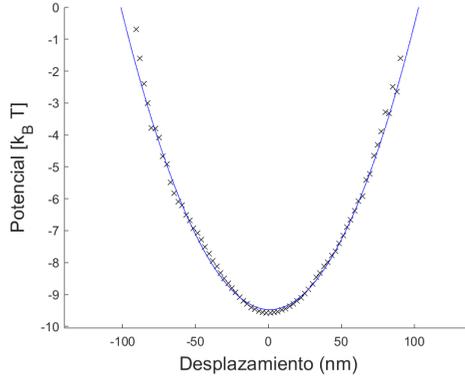


Figura 5.2: Potencial calculado a partir del histograma anterior. La línea muestra el ajuste polinomial con $T=25^\circ\text{C}$.

La rigidez de la trampa se encuentra haciendo un ajuste polinomial al potencial discreto que se obtiene. En este caso, se ha hecho un ajuste con un polinomio de cuarto orden para confirmar que el término cuadrático es mucho mayor a los demás y que el potencial puede considerarse efectivamente cuadrático. En la figura anterior se muestra el potencial calculado en ambas dimensiones y un polinomio $a_4 + x^4 + a_3x^3 + a_2x^2 + a_1x + a_0$ que se ajusta a los datos. Para el potencial, tanto en x como en y , $a_4/a_2 \approx 10^{-5}$ y $a_3/a_2 \approx 10^{-4}$. Esto justifica que en adelante, se considere el potencial de la trampa como cuadrático.

Por último, se calcula la constante de proporcionalidad κ entre el desplazamiento y la fuerza que ejerce la trampa

$$F_x = -\kappa_x x = -\frac{dU(x)}{dx} \quad (5.3)$$

$$F_y = -\kappa_y y = -\frac{dU(y)}{dy} \quad (5.4)$$

O sea, que se conoce la rigidez κ en la dirección deseada por

$$\kappa = 2a_2 \quad (5.5)$$

5.2 Teorema de equipartición

Ahora que se ha confirmado que el potencial formado por la trampa es cuadrático, es posible aplicar otro método de calibración basado en el teorema de equipartición. Este teorema establece que, en equilibrio térmico, cada grado de libertad de un sistema tiene una energía promedio de $\frac{k_B T}{2}$. Como se ha determinado que el potencial es cuadrático, la energía potencial de la partícula está dada por $U(s) = \frac{1}{2}\kappa s^2$. Considerando la trampa en dos dimensiones independientes, es posible calcular la rigidez de la trampa a partir de

$$\frac{1}{2}\kappa_x \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (5.6)$$

$$\frac{1}{2}\kappa_y \langle y^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (5.7)$$

O sea, una rigidez de $\kappa_x = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle}$ y $\kappa_y = \frac{k_B T}{\langle y^2 \rangle}$. Como la trayectoria de la partícula se registra como el desplazamiento desde un centro de equilibrio, su promedio es cero y $\langle x^2 \rangle = \sigma^2$.

5.3 Función de densidad espectral de potencia

Un método más para calibrar la trampa es hacer un análisis de la función de densidad espectral de potencia del movimiento. Consiste en encontrar una función lorentziana que se ajusta a esta densidad espectral. El parámetro a a ajustar contiene la información acerca de la rigidez de la trampa. Teóricamente, el espectro de potencias de una partícula sujeta al movimiento browniano y atrapada por un potencial armónico es una función lorentziana [7]:

$$P(f) = \frac{D}{2\pi^2(f_c^2 + f^2)} \quad (5.8)$$

En donde f_c es su frecuencia de corte y se relaciona con las características del sistema por

$$f_c = \frac{\kappa}{2\pi\gamma} \quad (5.9)$$

Y γ es la constante de Stokes del sistema. O sea, la rigidez de la trampa está dada por $\kappa = \frac{2\pi\gamma}{f_c}$

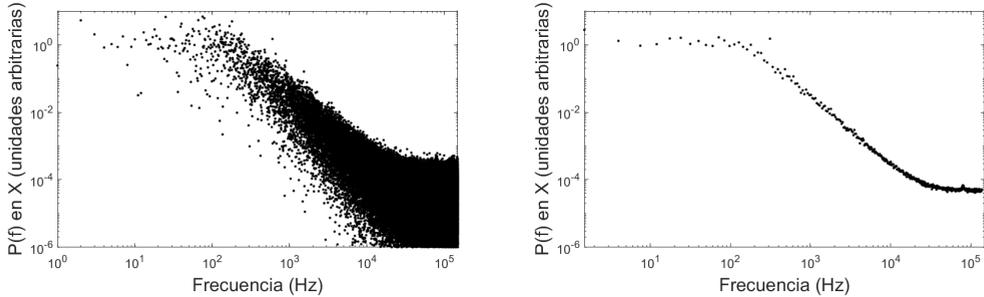
Encontrando la función lorentziana que mejor representa el espectro de potencias experimental, se encuentra una frecuencia de corte para calcular la rigidez de la trampa.

A diferencia de los métodos anteriores, para realizar este análisis es necesario conocer más datos acerca del sistema. La presencia del parámetro γ hace necesario conocer la forma del objeto atrapado y la densidad del medio en que se encuentra. En el caso de partículas esféricas en agua, esto no representa un problema adicional. En cambio, calibrar la trampa de este modo tiene la ventaja de que es poco sensible al ruido. La función de densidad espectral muestra claramente la presencia de vibraciones externas y esto permite evitar que afecten la calibración.

La densidad espectral de potencia $P^{(exp)}(f)$ calculado directamente a partir de la trayectoria tiene un número muy grande de puntos con una distribución exponencial. Para realizar el ajuste, se calcula un promedio de bloques, que reemplaza un bloque de n_b puntos consecutivos por su valor promedio.

$$\bar{f} = \frac{1}{n_b} \sum_{\text{bloque}} f \quad \bar{P}^{(exp)} = \frac{1}{n_b} \sum_{\text{bloque}} P^{(exp)}(f) \quad (5.10)$$

Las nuevas series \bar{f} y $\bar{P}^{(exp)}$ tienen una distribución aproximadamente gaussiana. Estos datos promediados se utilizan para realizar un ajuste de mínimos cuadrados.



(a) Densidad espectral experimental.

(b) Densidad espectral promediada.

Figura 5.3: Promedio de una función de densidad espectral tomada a 300k cps.

Los parámetros de la función que mejor ajusta a los datos promediados f_k y P_k se calculan con [7].

$$f_c = \sqrt{\frac{S_{0,1}S_{2,2} - S_{1,1}S_{1,2}}{S_{1,1}S_{0,2} - S_{0,1}S_{1,2}}} \quad (5.11)$$

$$\frac{D}{2\pi^2} = \frac{S_{0,2}S_{2,2} - S_{1,2}^2}{S_{1,1}S_{0,2} - S_{0,1}S_{1,2}} \quad (5.12)$$

$$S_{p,q} = \sum_k f_k^{2p} P_k^q \quad (5.13)$$

La función de densidad espectral también aporta información sobre el límite de resolución temporal de la medición. Se identifica este límite como la región donde la función observada experimentalmente se vuelve constante. Esta densidad constante significa que el proceso de detección no tienen la capacidad para resolver movimientos con una frecuencia mayor. Para poder cuantificarlo, se ha definido la frecuencia límite de resolución del movimiento como la intersección entre la función de ajuste y el promedio de la región constante de la densidad espectral.

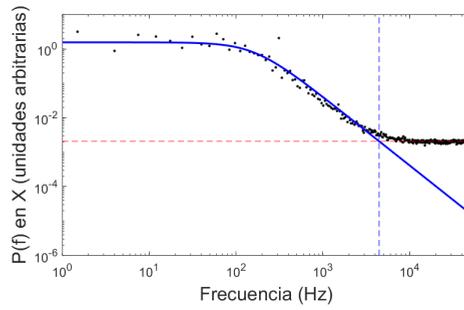


Figura 5.4: Una función de densidad espectral tomada a 100k cps y su ajuste. Las líneas discontinuas marcan el límite de resolución temporal. En este ejemplo, la razón de señal a ruido es de 10.68 y la intersección entre el ajuste y la horizontal es de $4440Hz$.

6. Resultados

En esta sección se presenta la rigidez calculada usando los métodos descritos. Se han caracterizado tres trampas con potencias de 28 mW , 62 mW y 125 mW observadas bajo distintas condiciones de video e iluminación.

6.1 Estadística de Boltzmann

Al caracterizar la trampa por este método, se ha confirmado la forma del potencial. La trampa óptica produce en la región de enfoque un potencial que puede considerarse cuadrático. También se puede observar cómo una partícula en una trampa más potente, tiene un movimiento que se aleja menos del centro de la trampa. Sin embargo, no es posible saber si existen vibraciones externas que alteren el resultado. Si la partícula atrapada estuviese sujeta al efecto de vibraciones externas, podría suceder que su posición se aleje del centro con más frecuencia de lo que se esperaría en ausencia de ruido externo. Un histograma en presencia de ruido sería más ancho que en condiciones ideales. A consecuencia de esto, el potencial calculado sería más ancho y se calcularía una rigidez por debajo de la real.

6.1.1. 10k cuadros por segundo

La caracterización bajo esas condiciones muestra la forma cuadrática del potencial formado por la trampa. A esta velocidad de obtención, el histograma de posiciones es menos gaussiano que lo obtenido bajo otras condiciones. Aún así, es posible hacer un ajuste cuadrático al potencial observado experimentalmente, como se muestra en la figura 6.1.

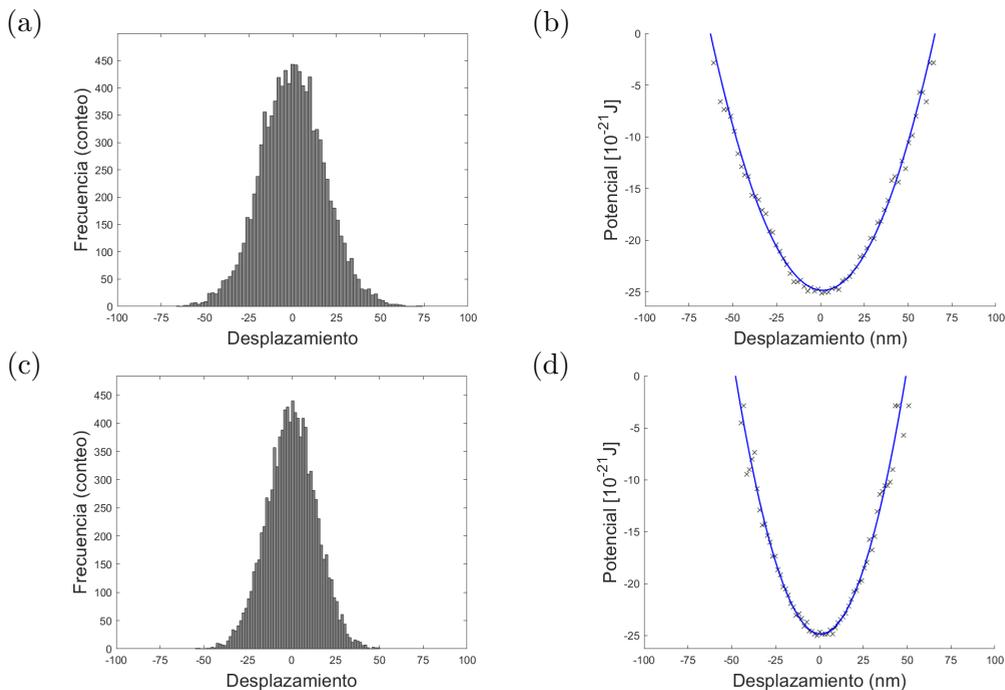


Figura 6.1: Histograma de desplazamiento y su potencial correspondiente, a 10k cps con iluminación baja. Se muestra la caracterización de dos trampas: una de 28 mW (a y b) y otra de 62 mW (c y d).

6.1.2. 100k cuadros por segundo

Con una velocidad de obtención mayor, también se observó un histograma de posiciones aproximadamente gaussiano que permite ajustar una función cuadrática al potencial correspondiente. En las figuras 6.2 se muestran los resultados de dos caracterizaciones con potencias distintas.

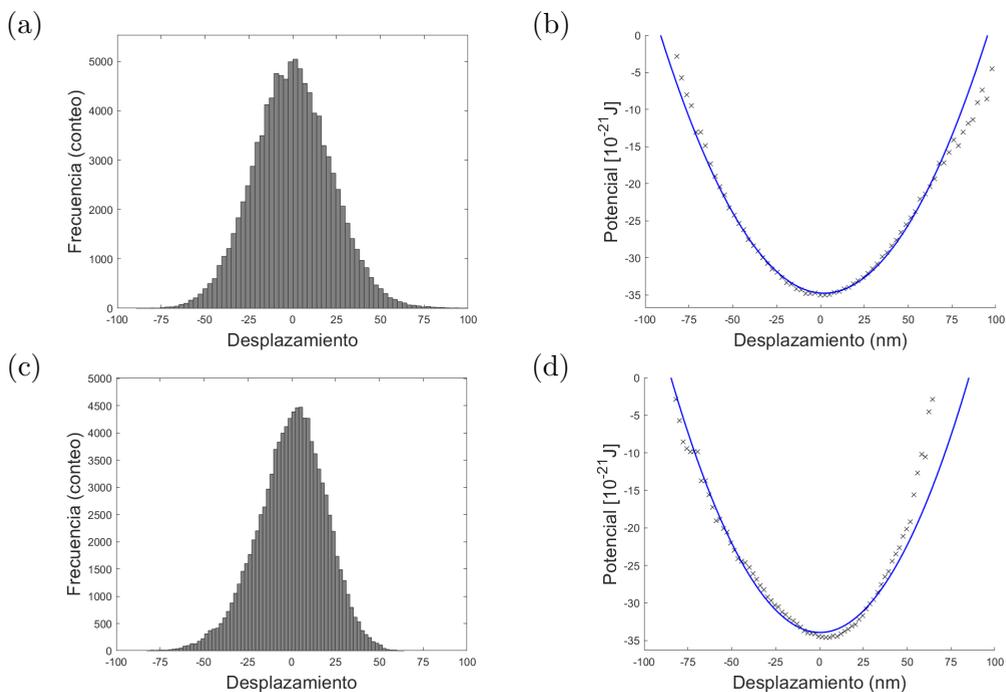


Figura 6.2: Histograma de desplazamiento y su potencial correspondiente, medidos con una velocidad de a 100k cps. Se muestra una trampa de 28 mW , observada con iluminación baja (a y b) y otra de 62 mW observada con iluminación alta (c y d).

6.1.3. 300k cuadros por segundo

Los histogramas de posición obtenidos bajo estas condiciones se presentan en la figura 6.3. Es fácil observar cómo una partícula atrapada en una trampa más potente tiene un movimiento más cercano al centro de equilibrio.

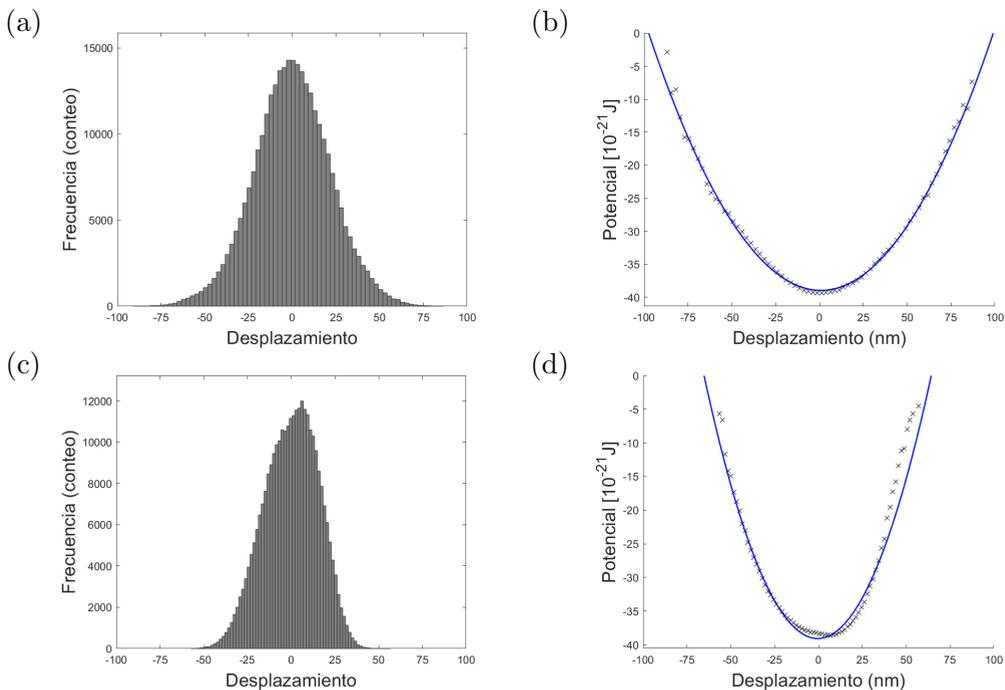


Figura 6.3: Histograma de desplazamiento y su potencial correspondiente, medidos con una velocidad de a 300k cps. Se muestra una trampa de 28 mW , observada con iluminación media (a y b) y otra de 125 mW observada con iluminación alta (c y d).

6.1.4. 500k cuadros por segundo

Esta es la velocidad máxima utilizada para la obtención de video. Es posible identificar la forma aproximadamente gaussiana del histograma de posiciones y el carácter cuadrático del potencial de la trampa.

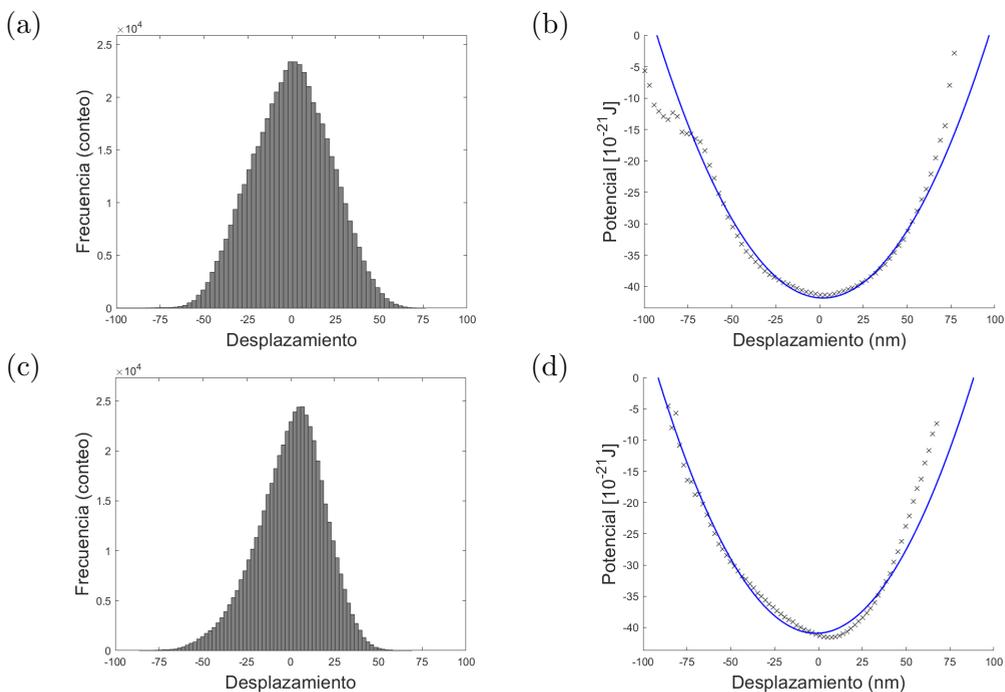


Figura 6.4: Histograma de desplazamiento y su potencial correspondiente, medidos con una velocidad de a 500k cps. Se muestra una trampa de 28 mW , observada con iluminación media (a y b) y otra de 62 mW observada con iluminación alta (c y d).

6.1.5. Rigidez

De los potenciales anteriores se ha calculado la rigidez de las trampas. A continuación se presenta la rigidez obtenida del ajuste polinomial y su error estándar.

Estadística de Boltzmann			
Potencia	Velocidad	Iluminación	Rigidez [fN/nm]
28 mW	10k	Baja	12.12 ± 0.20
	100k	Baja	8.01 ± 0.08
		Media	8.34 ± 0.11
	300k	Media	8.08 ± 0.09
		Alta	11.48 ± 0.11
	500k	Media	7.22 ± 0.05
Alta		9.33 ± 0.18	
62 mW	10k	Baja	21.07 ± 0.47
	100k	Media	21.83 ± 0.30
		Alta	9.41 ± 0.23
	300k	Media	16.17 ± 0.10
		Alta	12.69 ± 0.37
	500k	Media	16.72 ± 0.22
Alta		10.12 ± 0.29	
125 mW	100k	Media	24.26 ± 0.38
	300k	Alta	18.63 ± 0.46

Tabla 6.1: Caracterización por estadística de Boltzmann

Se puede observar que los resultados varían considerablemente al modificar las condiciones de observación. Además, se observa que no hay un incremento notable de la rigidez calculada al incrementar la potencia de la trampa. A pesar

de que esta sensibilidad reducida al incremento de la potencia puede ser una característica propia de la trampa, más adelante se verá que el sistema en realidad está sujeto a movimientos externos. Además, se verá que la relación lineal entre potencia y rigidez calculada por este método no concuerda con lo esperado.

6.2 Equipartición

Como ya se ha confirmado que la forma del potencial es aproximadamente cuadrática, es posible caracterizar la trampa a partir del teorema de equipartición. Al igual que el método anterior, vibraciones externas pueden producir un sesgo en la caracterización por equipartición ya que el movimiento externo produce posiciones observadas con mayor amplitud. Esta amplitud mayor significa una varianza mayor y por lo tanto una rigidez calculada menor que la real. La rigidez calculada por este método es:

Equipartición				
Potencia	Velocidad	Iluminación	Var. [nm^2]	Rigidez [fN/nm]
28 mW	10k	Baja	329.93	12.46
	100k	Baja	496.88	8.28
		Media	495.93	8.29
	300k	Media	475.95	8.64
		Alta	365.35	11.26
	500k	Media	562.02	7.32
Alta		490.47	8.38	
62 mW	10k	Baja	196.25	20.95
	100k	Media	188.97	21.76
		Alta	374.48	10.98
	300k	Media	255.52	16.09
		Alta	360.05	11.42
	500k	Media	246.04	16.71
Alta		369.76	11.12	
125 mW	100k	Media	182.57	22.53
	300k	Alta	236.33	17.40

Tabla 6.2: Caracterización por teorema de equipartición

Al igual que en los resultados de la sección anterior, la rigidez que se muestra en la tabla anterior no es muy sensible a un aumento de potencia. La calibración por equipartición está muy relacionada con la calibración por estadística del Boltzmann y eso se nota en la similitud entre los resultados presentados en esta sección y los de la anterior.

6.3 Densidad espectral de potencia

A diferencia de los anteriores, este método permite identificar vibraciones externas que alteran el resultado. Una función de densidad espectral muestra claramente las frecuencias a las que la partícula se mueve por efectos externos. Como el desplazamiento de una partícula atrapada es muy pequeño comparado con el desplazamiento de todo el arreglo por algún ruido externo, la función de densidad espectral presenta un pico claro en las frecuencias de este movimiento. Además, la caracterización por densidad espectral permite conocer la frecuencia límite de resolución de la medición.

6.3.1. 10k cuadros por segundo

Para esta velocidad de video se utilizó solamente un nivel bajo de iluminación. Debido a la velocidad de obtención, la frecuencia límite de la medición es 5 kHz . Aún con una iluminación baja, no hay un aplanamiento de la densidad espectral antes del límite de la medición.

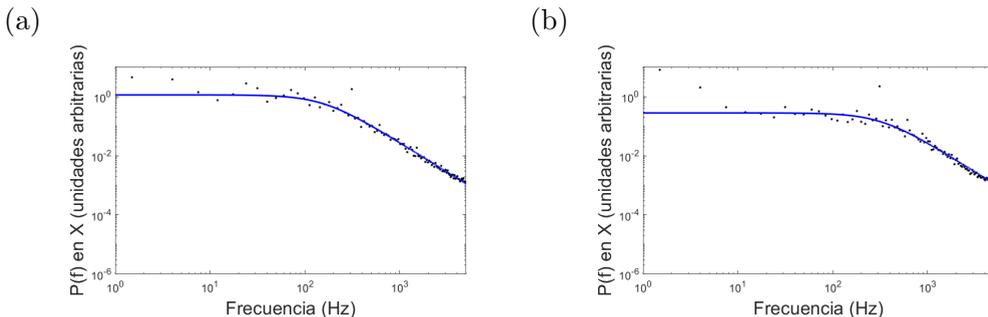


Figura 6.5: Densidad espectral de potencia 10k cps con iluminación baja. Puede observarse cómo la trampa de 28 mW (a) tiene una frecuencia de corte menor que la de 62 mW (b)

6.3.2. 100k cuadros por segundo

Para esta velocidad de video se utilizaron tres niveles de iluminación. La frecuencia máxima de la medición permitida por la velocidad de obtención del video es de 50 kHz . Sin embargo, la frecuencia límite real del experimento es menor debido al ruido presente en la imagen. Se nota claramente una mejora en la resolución al mejorar las condiciones de iluminación y aumentar la razón S/R como se muestra en la figura 6.6.

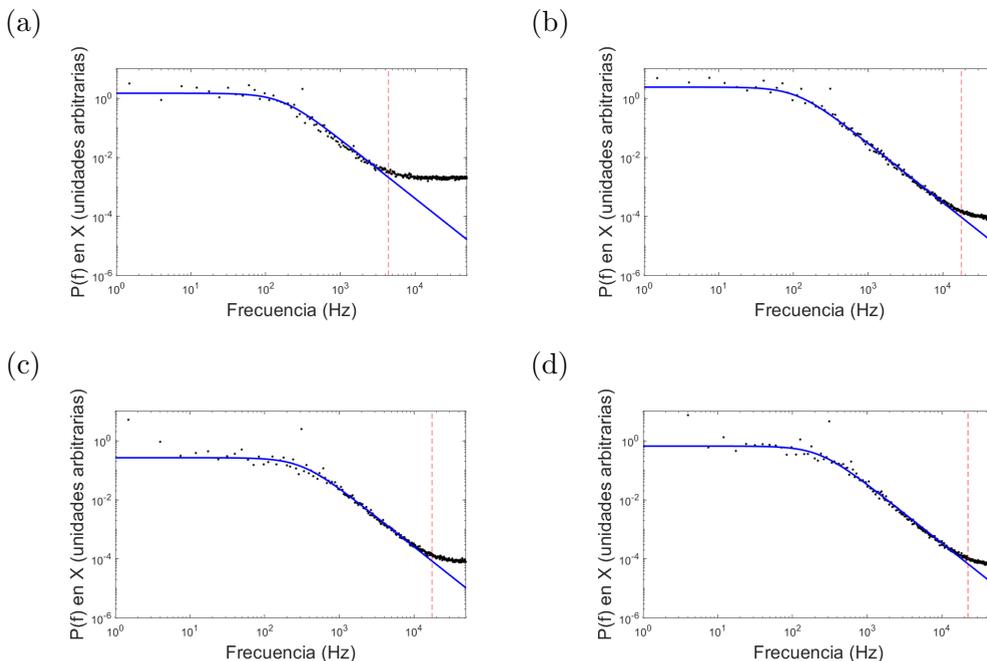


Figura 6.6: Densidad espectral de potencia 100k cps. Se nota claramente cómo la frecuencia máxima de resolución aumenta al mejorar las condiciones de iluminación. Mientras que para la trampa de 28 mW con iluminación baja (a) es de aproximadamente 5 kHz , para la trampa de 28 mW y 62 mW , ambas con iluminación media (b y c) es de cerca de 20 kHz . En el caso de la trampa de 62 mW con iluminación alta (d), este límite es de más de 20 kHz .

6.3.3. 300k cuadros por segundo

Para esta velocidad se utilizaron dos niveles de iluminación. La frecuencia máxima de la medición permitida por la velocidad de la cámara es de 150 kHz . La frecuencia límite real del experimento es menor debido al ruido presente en la imagen. Como se muestra en la figura 6.7, en esta velocidad de obtención se logra la máxima resolución real.

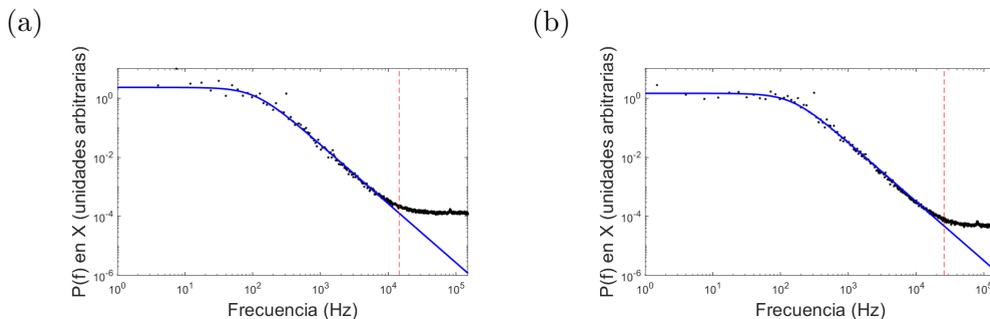


Figura 6.7: Densidad espectral de potencia 300k cps. Mientras que la trampa de 28 mW con iluminación media se mide con un límite de aproximadamente 15 kHz , la trampa de la misma potencia observada con una iluminación alta tiene un límite de resolución de aproximadamente 25 kHz .

6.3.4. 500k cuadros por segundo

La frecuencia máxima de medición que permite la velocidad de obtención es de 250 kHz . El efecto de las condiciones de iluminación es similar a lo que se observó anteriormente. En la figura 6.8 se puede observar cómo la frecuencia máxima observada aún en el caso de un iluminación alta es de aproximadamente 20 kHz , por debajo de la resolución alcanzada a 300 kcps .

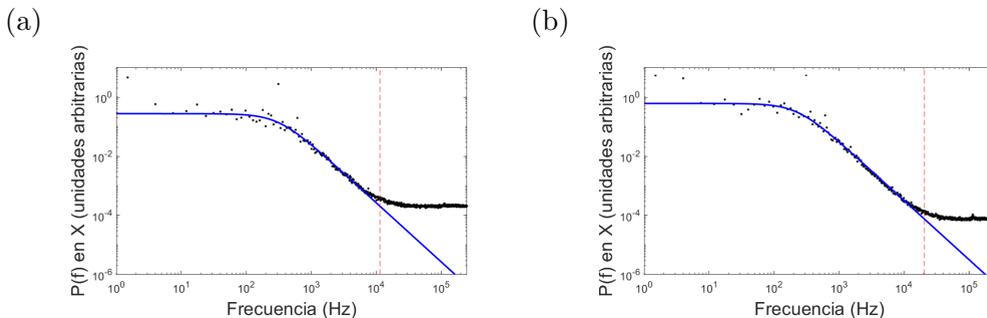


Figura 6.8: Densidad espectral de potencia 500k cps. La frecuencia de resolución máxima en esta velocidad de observación o es mejor que en la velocidad anterior. Ambas imágenes corresponden a una trampa de 62 mW , una observada con iluminación media (a) y la otra con iluminación alta (b)

La caracterización por este método permitió conocer que existe un nivel importante de ruido en el sistema. Debido a esto, la rigidez que se calcula mediante los métodos estadísticos subestima la rigidez real de la trampa. En cambio, el ajuste de una función lorentziana a la densidad espectral permite caracterizar la trampa a pesar de la presencia de vibraciones externas, acercándose más a la rigidez correcta de la trampa. También permitió conocer la frecuencia límite de resolución de la medición. Esta frecuencia límite crece a medida que la velocidad de obtención y la razón S/R aumentan.

6.3.5. Rigidez y frecuencia límite

Densidad espectral					
Potencia	Velocidad	Iluminación	Rigidez [fN/nm]	Límite [Hz]	S/R
28 mW	10k	Baja	17.21 ± 0.87	5,000	49.37
	100k	Baja	18.36 ± 0.92	4,446	10.68
		Media	12.33 ± 0.77	17,908	38.15
	300k	Media	11.83 ± 0.79	14,505	21.95
		Alta	16.22 ± 0.83	25,769	36.76
	500k	Media	10.22 ± 0.75	11,186	12.18
Alta		15.34 ± 0.79	21,349	31.80	
62 mW	10k	Baja	35.35 ± 1.31	5,000	49.37
	100k	Media	34.47 ± 1.31	17,484	38.15
		Alta	25.21 ± 1.05	22,449	74.63
	300k	Media	36.59 ± 1.35	15,119	21.95
		Alta	27.05 ± 1.11	25,242	36.76
	500k	Media	34.22 ± 1.26	11,387	12.18
Alta		25.10 ± 1.06	20,613	31.80	
125 mW	100k	Media	67.90 ± 2.00	19,747	38.15
	300k	Alta	58.16 ± 1.79	24,964	36.76

Tabla 6.3: Caracterización por densidad espectral

7. Discusión

En esta sección se hace una comparación entre los resultados obtenidos experimentalmente y los obtenidos por otras investigaciones similares.

En cuanto a la calibración por estadística de Boltzmann, las observaciones por microscopía digital lograron confirmar el carácter cuadrático de la trampa y son similares a lo que se ha obtenido utilizando detectores de cuadrante. Una de las primeras aplicaciones de este método [13] se compara con los resultados la figura 7.1. Al caracterizar la trampa utilizando una cámara digital de alta velocidad se obtienen resultados muy similares a lo obtenido al utilizar un detector de cuadrantes.

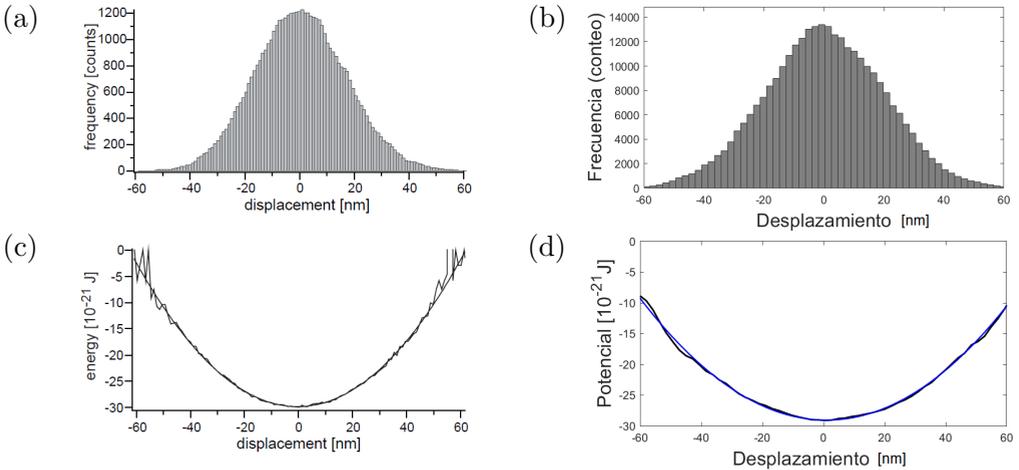


Figura 7.1: Comparación de resultados con Florin *et. al.* [13]. Los resultados observados experimentalmente (b y d) son similares a los obtenidos utilizando un detector de cuadrantes (a y c).

En el artículo citado, la rigidez encontrada fue de 14.5 fN/nm mientras que nuestra caracterización encontró una rigidez de 10.6 fN/nm . Esta diferencia se puede observar en la forma más ancha que tiene nuestro histograma y en un potencial menos pronunciado.

Los resultados también son consistentes con otras calibraciones hechas utilizando una cámara digital CCD de baja velocidad. En la referencia [32] se utilizó una cámara digital con una velocidad de 20 cps para caracterizar una trampa

con potencia de $69mW$ formada por un láser de 980 nm , enfocado por un objetivo de microscopio con $NA = 1.25$ sobre partículas de sílice con diámetro de $2\ \mu m$. Realizando un ajuste a un potencial cuadrático, determinaron una rigidez de 44.5 fN/nm . Para comparar, se presenta nuestra trampa de potencia media, la cual tiene una rigidez de $\kappa \approx 15\text{ fN/nm}$. En la figura 7.2 se puede observar cómo la trampa de rigidez mayor corresponde a un potencial más delgado.

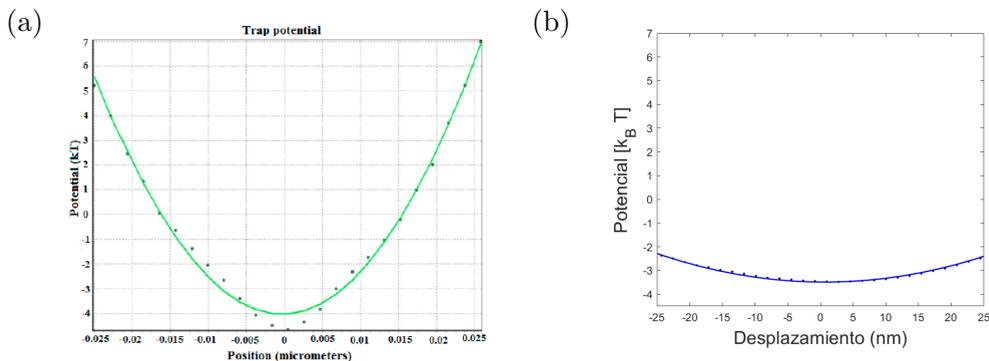


Figura 7.2: Comparación de resultados con Yale *et. al.*[32]. El potencial observado por una cámara de alta velocidad (b) es consistente con lo que se ha observado antes utilizando una cámara CCD (a)

En cuanto a la caracterización por densidad espectral, utilizar una cámara de alta velocidad tiene la ventaja de aumentar la frecuencia límite de resolución siempre y cuando se logre un nivel adecuado de iluminación.

Históricamente, las mediciones con fotodetectores de posición o con detectores de cuadrantes han tenido una resolución temporal mucho mayor que aquellas hechas con una cámara digital, aún cuando la cámara pueda obtener videos con frecuencias de muestreo de varios kHz . La máxima resolución temporal de una calibración realizada con fotodetectores está en el orden de los $10^4 Hz$. A continuación se presentan algunos de estos resultados para compararlos con los propios.

En la referencia [14] se caracteriza una trampa utilizando el arrastre de un fluido. Se formó una trampa para partículas de poliestireno de $2\ \mu m$ utilizando un láser de 1064 nm y un objetivo de $NA=1.25$. La posición de las partículas atrapadas se obtuvo registrando el comportamiento del mismo láser que forma la trampa con un fotodiodo HAD 1100 Å. En la figura 6.3 se muestra la densidad espectral de este artículo, en donde también aparece una medición del ruido registrado por el detector. A partir de la densidad espectral del movimiento encontraron

una frecuencia de corte de aproximadamente 300Hz . En este resultado se puede observar una frecuencia límite alta, de aproximadamente $5 \times 10^4\text{ Hz}$. Este límite es comparable con el máximo encontrado por esta investigación al utilizar una velocidad de video de 300k cps .

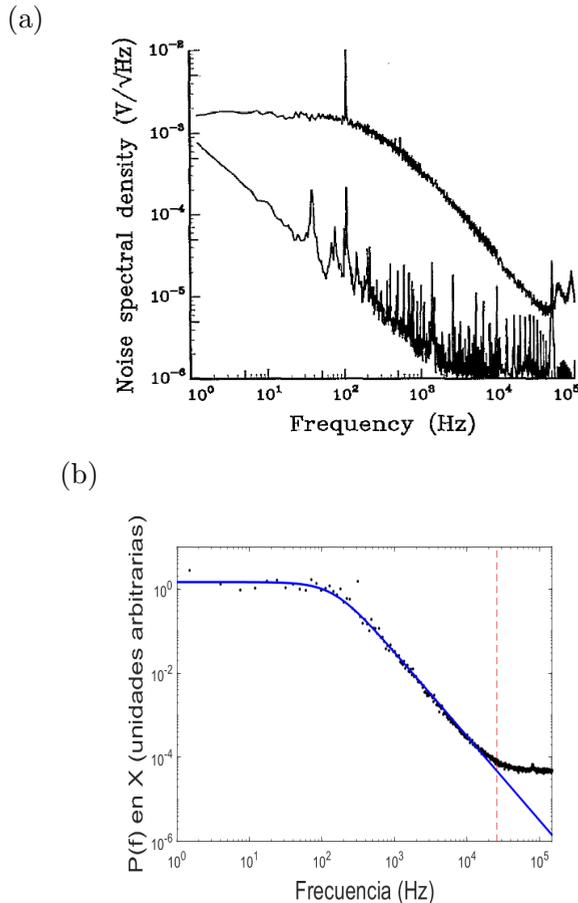


Figura 7.3: Resultados obtenidos por Ghislain *et. al* [14]. La detección utilizando un fotodiodo (a) puede alcanzar una frecuencia máxima de resolución en el orden de 10^4 Hz . Esto es comparable con la detección por cámara de alta velocidad (b) en donde la frecuencia límite es de aproximadamente $2.5 \cdot 10^4\text{ Hz}$

Se ha mostrado en [17] que la caracterización de la trampa depende ligeramente de las características del detector y de la potencia con que el láser incide en él. Debido a la absorción del detector, distintos dispositivos medirán una rigidez distinta para una misma trampa. Usando tres detectores distintos para obtener

la trayectoria y la densidad espectral de una partícula de poliestireno de $2.67\mu\text{m}$ atrapada por un láser de 1064 nm , se determinaron y compararon valores para la rigidez de la trampa. Esto muestra una ventaja de utilizar una cámara digital para la caracterización: la independencia que tiene el resultado de las características del láser utilizado para la trampa. Además, de sus resultados, que se muestran en la figura ??, se observa que la frecuencia límite de la medición es de aproximadamente $5 \times 10^4\text{ Hz}$. Esto es comparable con la resolución máxima que se ha obtenido utilizando velocidad altas de video.

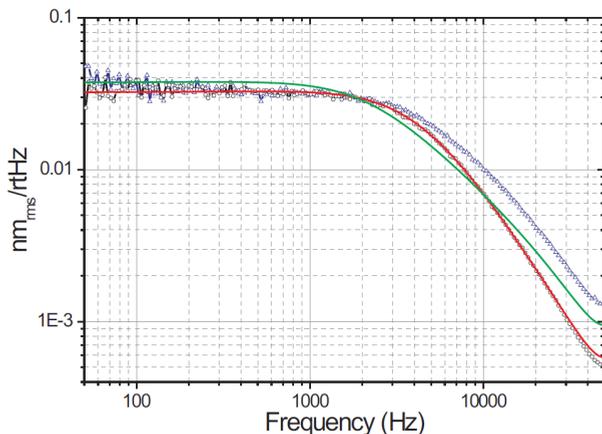


Figura 7.4: Utilizando un fotodetector, en la investigación de Huisstede *et. al.* [18] se logra un límite de resolución similar al que se obtiene usando video de alta velocidad.

En la referencia [29] se calibra una trampa usando el método de densidad espectral. Utilizaron un objetivo con $\text{NA}=1.2$ y un láser de 1064 nm para atrapar partículas de sílice de 1.54 micras de diámetro y otras de poliestireno de 528 nm de diámetro en un líquido oscilante. Para rastrear a la partícula utilizaron un detector fotoeléctrico con frecuencia de muestreo de $65,536\text{ Hz}$ y lograron observar una frecuencia máxima de aproximadamente 3×10^4 con un pico muy pronunciado a la frecuencia de oscilación del líquido. A diferencia de los artículos anteriores, aquí se usó una trampa muy fuerte con una frecuencia de corte de $f_c = 2,065\text{ Hz}$ y una rigidez de $\kappa \approx 175\text{ fN/nm}$. Este resultado se compara en la figura 7.5 con la trampa más fuerte que hemos caracterizado: una trampa de 125 mW con frecuencia de corte de 530 Hz .

En [22] se estudia la detección de pares de partículas atrapadas usando un detector de cuadrantes. El movimiento de las partículas se registró usando un detector con frecuencia de muestreo de 20 kHz . Se atraparon partículas esféricas

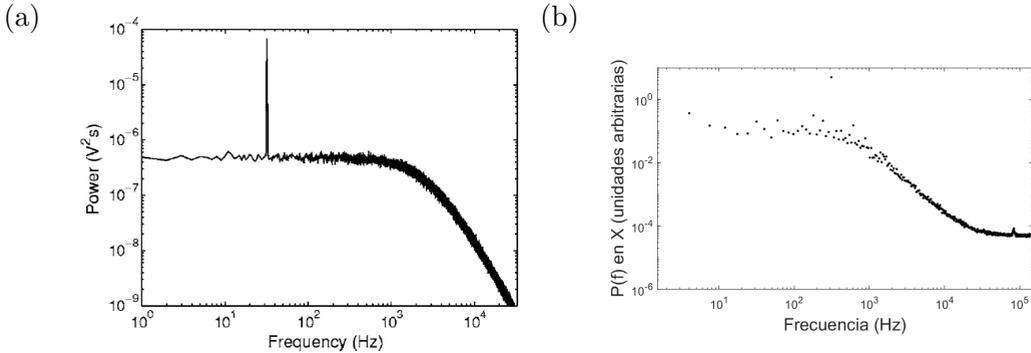


Figura 7.5: Comparación con los resultados obtenidos por Tolic *et. al* [29]. Una cámara de alta velocidad es útil para caracterizar trampas fuertes en las que la frecuencia de corte se desplaza hacia frecuencias más altas.

de poliestireno con diámetro de $1\mu\text{m}$. Para comparar la diferencia en la señal del detector al atrapar una o dos partículas a la vez, primero se atrapó una sola partícula y se le tomó una fotografía utilizando una cámara digital. Luego se buscó una segunda partícula que se atrapó de modo que la trampa tuviera dos partículas al mismo tiempo y se tomó una segunda fotografía.

Los resultados de este artículo muestran que aunque una trampa con dos partículas puede ser distinguida en una fotografía, la presencia de dos partículas atrapadas no es tan obvia si solamente se observan la señal producida por el detector. Aunque una señal de dos partículas es más intensa que para una sola partícula, la forma de su densidad espectral es muy parecida. En realidad, la densidad espectral de dos partículas atrapadas es idéntica a la que se obtendría para una sola partícula en una trampa más débil. Esto muestra una ventaja más de utilizar una cámara digital de alta velocidad pues una trampa con dos partículas atrapadas a la vez puede ser detectada fácilmente a simple vista. La frecuencia máxima de esta medición fue de aproximadamente 10^4Hz , comparable con el límite obtenido al utilizar una cámara con una velocidad de obtención de 300k cps con iluminación media, como se muestra en la figura ??.

La detección de partículas atrapadas utilizando detectores fotoeléctricos permite frecuencias máximas de resolución de por lo menos 10^4Hz y de hasta $5 \times 10^5\text{Hz}$. En cambio, al utilizar una cámara digital para observar a la partícula atrapada, la frecuencia máxima de resolución es de alrededor de 1kHz .

Se utilizó una cámara de alta velocidad CMOS en la referencia [15] para obtener la posición de la partícula. Se usó un láser de 830 nm, un objetivo con $\text{NA}=1.3$ y un modulador espacial para crear varias trampas. Se atraparon partículas de sílice con 2 micras de diámetro y se determinó su trayectoria captando un video

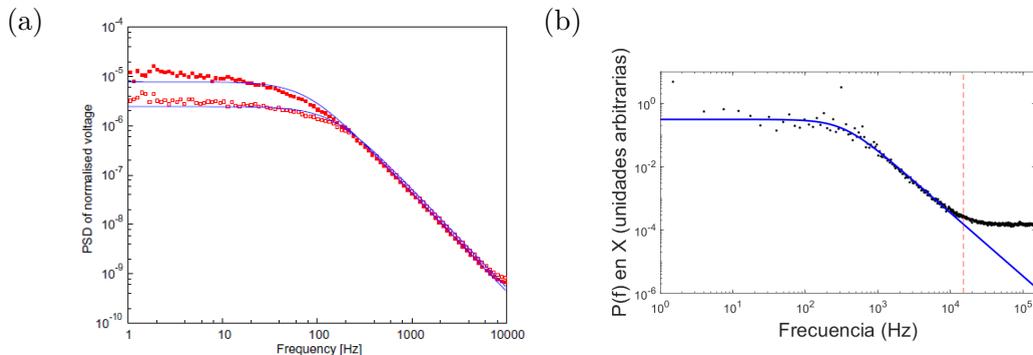


Figura 7.6: Comparación con los resultados obtenidos por Li *et. al* [22]. La función de densidad espectral observada por ellos (a) es comparable con lo que se obtiene al utilizar una velocidad de obtención de 300k cps con iluminación media (b).

con una velocidad de 1,000 cuadros por segundo. Haciendo un análisis espectral de este movimiento, se caracterizó la trampa para dos potencias distintas. La frecuencia máxima de esta medición fue de apenas 500Hz . Como se muestra en la figura 7.9, esta frecuencia límite es muy inferior a la que se logra con una cámara de muy alta velocidad. Aún en la velocidad de obtención más baja que hemos usado, se logró un límite de resolución de 5kHz .

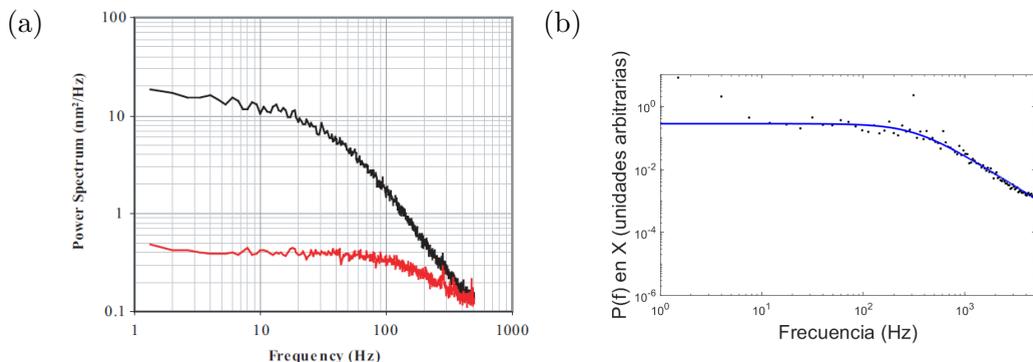


Figura 7.7: Comparación con los resultados obtenidos por Gibson *et. al* [15]. Mientras que una cámara con velocidad relativamente alta (a) puede resolver frecuencias máximas de 500Hz , una cámara de muy alta velocidad (b), aún en una velocidad baja, puede resolver hasta 5kHz .

En [20] se compara el desempeño de un detector de cuadrantes contra una cámara de alta velocidad al calibrar una trampa. Se usó un objetivo de $\text{NA}=1.3$ y un láser de 1064nm para atrapar partículas de sílice de 2micras de diámetro.

Se usó un detector de cuadrantes y una cámara para rastrear a una partícula atrapada. La cámara de alta velocidad tomó videos a 2,000 cuadros por segundo. El detector se ajustó para que la velocidad de muestreo fuera la misma. Ambas mediciones coincidieron en el desplazamiento cuadrático medio calculado. Aún así, la cámara digital parece tener una resolución menor que el foto detector. Se puede observar un límite de aproximadamente 400Hz . Este límite es muy inferior al que se ha logrado en esta investigación. Como se muestra en la figura 7.8, tomada de la referencia anterior, una cámara capaz 2k cps no es un buen sustituto para un detector de cuadrantes, aún cuando se trata de una velocidad de obtención relativamente alta.

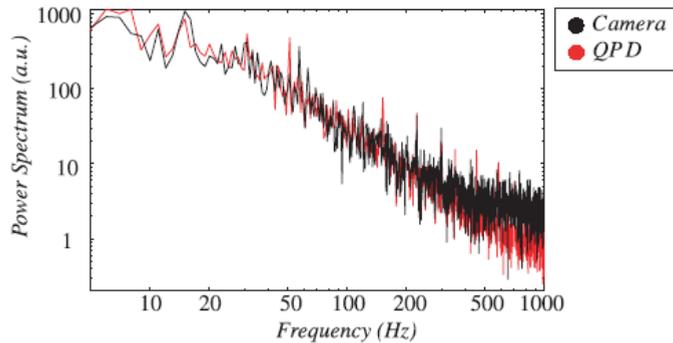


Figura 7.8: Resultados presentados por Keen *et. al* [20]. Aunque una obtención de 2k cps es relativamente alta, el espectro de frecuencias observado tiene un límite mucho menor que el observado por un detector de cuadrantes.

También se ha estudiado un proceso coloidal usando una cámara de alta velocidad [25]. Se usó una cámara CMOS con velocidad de 5,000 cuadros por segundo para observar partículas de poliestireno con diámetros de $2.23\mu\text{m}$. La trampa se formó utilizando un láser de 1064 nm. Se encontró la rigidez de la trampa analizando la densidad espectral del movimiento. A esta velocidad de obtención, se logró una frecuencia límite de medición de aproximadamente $2 \times 10^3\text{Hz}$ la cual es alta pero sería insuficiente para caracterizar la trampa estudiada en [29]. En la figura se compara este resultado con el mejor límite de resolución que se ha podido obtener en esta investigación.

La resolución temporal máxima que se logró en nuestra medición es de aproximadamente 2.5×10^4 . Este límite es comparable con lo que se ha reportado utilizando detectores fotoeléctricos. También es mucho mayor de lo que se ha reportado usando cámaras digitales.

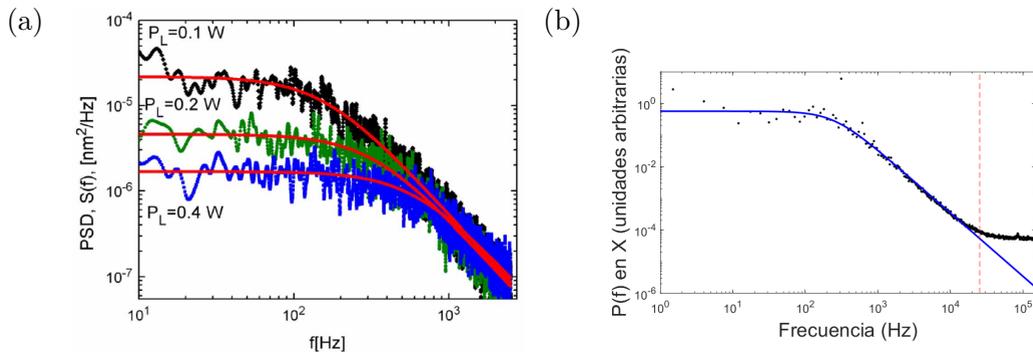


Figura 7.9: Comparación con los resultados obtenidos por Gibson *et. al* [15]. Mientras que una cámara con velocidad relativamente alta (a) puede resolver frecuencias máximas de 500 Hz, una cámara de muy alta velocidad (b), aún en una velocidad baja, puede resolver hasta 5 kHz.

Límites de resolución					
Velocidad	Iluminación	Frecuencia [Hz]	Temporal [μ s]	Espacial [nm]	Teórico [nm]
10k	Baja	5,000	200	9.5	2.64
100k	Baja	4,500	222	10	12.24
	Media	17,500	57	5	3.43
300k	Alta	22,500	44	4.5	1.75
	Media	14,800	68	5.5	5.95
500k	Alta	25,400	39	4	3.55
	Media	11,200	89	6.5	10.73
	Alta	21,000	48	4.5	4.11

Tabla 7.1: Límites de resolución de la medición.

A partir de la frecuencia límite de la medición, es posible conocer el límite de resolución espacial del experimento. El inverso de esta frecuencia límite $\Delta t = 1/f_{lim}$ es un límite de resolución temporal. Y a partir de este dato se calcula un desplazamiento medio $\Delta x = \sqrt{2D\Delta t}$. Este desplazamiento en un intervalo mínimo es el límite de la resolución espacial, es decir, el desplazamiento mínimo que puede detectarse. Los límites de las mediciones se resentan en la tabla 7.1

En condiciones óptimas, el sistema de detección puede resolver movimientos de hasta 4 nanómetros. Aún en las peores condiciones de iluminación y velocidad de obtención, el sistema tiene una resolución de 10 nanómetros. Estos resultados son consistentes con el límite de resolución teórico del algoritmo de detección.

Además de servir como indicador del límite de resolución, el análisis de la densidad espectral produce una calibración de la trampa más consistente y realista porque no es afectada por la presencia de vibraciones externas.

Caracterización					
Medición			Rigidez [fN/nm]		
Potencia	Velocidad	Iluminación	Estadística	Varianza	Densidad esp.
28 mW	10k	Baja	12.12 ± 0.20	12.46	17.21 ± 0.87
	100k	Baja	8.01 ± 0.08	8.28	18.36 ± 0.92
		Media	8.34 ± 0.11	8.29	12.33 ± 0.77
	300k	Media	8.08 ± 0.09	8.64	11.83 ± 0.79
		Alta	11.48 ± 0.11	11.26	16.22 ± 0.83
	500k	Media	7.22 ± 0.05	7.32	10.22 ± 0.75
Alta		9.33 ± 0.18	8.38	15.34 ± 0.79	
62 mW	10k	Baja	21.07 ± 0.47	20.95	35.35 ± 1.31
	100k	Media	21.83 ± 0.30	21.76	34.47 ± 1.31
		Alta	9.41 ± 0.23	10.98	25.21 ± 1.05
	300k	Media	16.17 ± 0.10	16.09	36.59 ± 1.35
		Alta	12.69 ± 0.37	11.42	27.05 ± 1.11
	500k	Media	16.72 ± 0.22	16.71	34.22 ± 1.26
Alta		10.12 ± 0.29	11.12	25.10 ± 1.06	
125 mW	100k	Media	24.26 ± 0.38	22.53	67.90 ± 2.00
	300k	Alta	18.63 ± 0.46	17.40	58.16 ± 1.79

Tabla 7.2: Comparación de la rigidez encontrada por diferentes métodos.

Al comparar la caracterización que se obtiene de los diferentes métodos, se nota que el análisis de la densidad espectral produce resultados más satisfactorios. En la figura siguiente se presenta una gráfica de la rigidez calculada. La rigidez

obtenida del espectro de frecuencias se ajusta mejor a una regresión lineal. Además, este ajuste lineal se comporta como se esperaría de una trampa. Es decir, al duplicar la potencia se duplica aproximadamente la rigidez y ésta se hace nula cuando la potencia es cero. Como puede verse en la tabla de rigidez, los métodos estadísticos no calcula correctamente la rigidez de una trampa muy fuerte en la que el movimiento es muy limitado. En cambio, el método espectral sí calcula correctamente esta rigidez, siempre que la frecuencia de corte este suficientemente separada de la frecuencia límite de la medición.

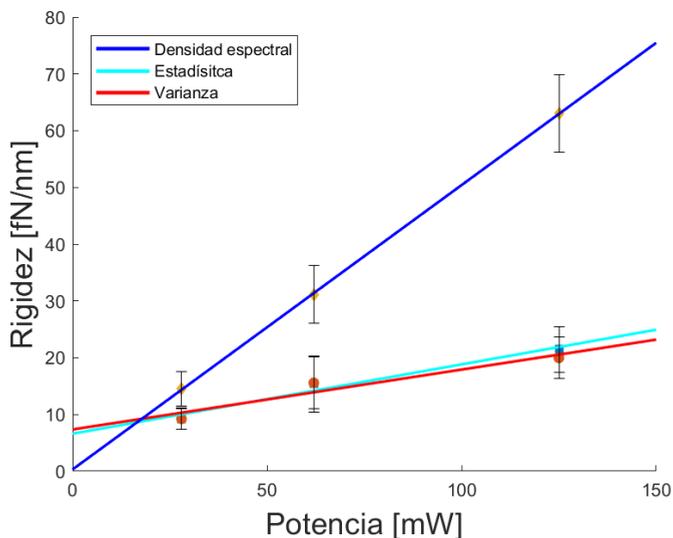


Figura 7.10: Comparación de la rigidez calculada por distintos métodos.

8. Conclusiones

El análisis de videos en donde se observa claramente a una partícula permite conocer su trayectoria y por lo tanto las características de la trampa en la que se encuentra. Al utilizar una cámara digital de alta velocidad para rastrear una partícula atrapada, es posible determinar la rigidez de una trampa óptica de manera similar a que si se utilizara un detector fotoeléctrico. Es posible encontrar una trayectoria de una partícula a atrapada a partir de un video digital de alta velocidad utilizando un algoritmo de detección. El algoritmo de detección de centroide utilizado en esta investigación ha sido suficiente para determinar el movimiento de la partícula a partir de una imagen en donde aparece como un objeto esférico brillante. Como utilizar video de alta velocidad permite una resolución temporal mayor, es posible caracterizar una trampa óptica incluso cuando su frecuencia de corte es alta.

Utilizando las trayectorias obtenidas automáticamente a partir de videos, la caracterización de una trampa puede realizarse por cualquiera de los métodos comúnmente utilizados. En esta investigación se han utilizado la estadística de Boltzmann, el análisis de la varianza de las posiciones y el ajuste a una función de densidad espectral para realizar la calibración. Los resultados obtenidos por los primeros dos métodos son parecidos. En ambos casos, la presencia de movimientos externos afecta la caracterización. Al encontrar la rigidez por estos primeros dos métodos, no se obtiene una relación proporcional entre la potencia de la trampa y su rigidez. El resultado de calibrar la trampa por su función de densidad espectral es notablemente distinto. Al caracterizar por este método es posible identificar ruido externo y evitar que afecte los resultados. En este caso, sí se obtiene una relación proporcional entre la potencia y la rigidez de la trampa. Por lo tanto, consideramos que es conveniente realizar la caracterización a través del análisis de la función de densidad espectral.

Las condiciones de iluminación tienen un efecto importante al observar el movimiento de una partícula atrapada por una trampa óptica utilizando videos digitales. Una mayor velocidad de obtención representa un nivel de ruido mayor en las imágenes obtenidas debido a que la cantidad de luz captada por la cámara en cada cuadro es menor y los efectos de digitalización se hacen más evidentes. Es importante que la intensidad de la iluminación aumente a medida que crece la velocidad de obtención del video para minimizar este ruido. La relación entre señal y ruido puede utilizarse para cuantificar la calidad de las imágenes obtenidas. Se ha encontrado que una relación de señal a ruido mayor corresponde a una mayor capacidad de resolución del movimiento de la partícula.

Al aumentar la velocidad de obtención de video, manteniendo una iluminación adecuada, se aumenta la frecuencia máxima que puede resolverse. Con velocidades de obtención muy altas, es posible resolver frecuencias de hasta 25 kHz que representa una capacidad de resolver desplazamientos de hasta 4 nm . Esta resolución espacial está limitada por el algoritmo de detección y una vez que se ha llegado a su límite, no es posible superarlo aumentando la velocidad de obtención del video o mejorando la relación de señal a ruido. En futuras investigaciones, sería interesante utilizar otros algoritmos de detección para rastrear la partícula. De este modo, se podrían encontrar procesos de detección automática que permitan aumentar el límite de resolución de modo que la función de densidad espectral no se haga constante en frecuencias altas.

Una cámara digital de alta velocidad es una alternativa a un detector fotoeléctrico en el estudio de trampas ópticas. En esta investigación se ha mostrado que una trampa puede caracterizarse de forma satisfactoria utilizando video digital. Además, se ha mostrado que si se logran las condiciones adecuadas de iluminación, el análisis de un video de alta velocidad tiene un límite de resolución similar a la obtenida con un detector fotoeléctrico.

Bibliografia

- [1] Arthur Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4):156, 1970.
- [2] Arthur Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, 61(2):569–582, 1992.
- [3] Arthur Ashkin and James M Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795):1517–1520, 1987.
- [4] Arthur Ashkin, James M Dziedzic, JE Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5):288–290, 1986.
- [5] Arthur Ashkin, James M Dziedzic, and T Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769, 1987.
- [6] DC Benito, DM Carberry, SH Simpson, GM Gibson, MJ Padgett, JG Rarity, MJ Miles, and S Hanna. Constructing 3d crystal templates for photonic band gap materials using holographic optical tweezers. *Optics Express*, 16(17):13005–13015, 2008.
- [7] Kirstine Berg-Sørensen and Henrik Flyvbjerg. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 75(3):594–612, 2004.
- [8] Stanislav Burov, Patrick Figliozzi, Binhua Lin, Stuart A Rice, Norbert F Scherer, and Aaron R Dinner. Single-pixel interior filling function approach for detecting and correcting errors in particle tracking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2):221–226, 2017.
- [9] Brian C Carter, George T Shubeita, and Steven P Gross. Tracking single particles: a user-friendly quantitative evaluation. *Physical biology*, 2(1):60, 2005.
- [10] John C Crocker and David G Grier. Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of colloid and interface science*, 179(1):298–310, 1996.
- [11] D Erenso, A Shulman, J Curtis, and S Elrod. Formation of synthetic structures with micron size silica beads using optical tweezer. *Journal of Modern Optics*, 54(10):1529–1536, 2007.

- [12] Hilding Faxén. Der widerstand gegen die bewegung einer starren kugel in einer zähen flüssigkeit, die zwischen zwei parallelen ebenen wänden eingeschlossen ist. *Annalen der Physik*, 373(10):89–119, 1922.
- [13] E-L Florin, A Pralle, EHK Stelzer, and JKH Hörber. Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 66:S75–S78, 1998.
- [14] Lucien P Ghislain, Neil A Switz, and Watt W Webb. Measurement of small forces using an optical trap. *Review of Scientific Instruments*, 65(9):2762–2768, 1994.
- [15] Graham M Gibson, Jonathan Leach, Stephen Keen, Amanda J Wright, and Miles J Padgett. Measuring the accuracy of particle position and force in optical tweezers using high-speed video microscopy. *Optics Express*, 16(19):14561–14570, 2008.
- [16] Chungil Ha, HD Ou-Yang, and Hyuk Kyu Pak. Direct measurements of colloidal hydrodynamics near flat boundaries using oscillating optical tweezers. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 392(17):3497–3504, 2013.
- [17] JHG Huisstede, Kees O van der Werf, Martin L Bennink, and Vinod Subramaniam. Force constant calibration corrections for silicon position detectors in the near-infrared. *Optics express*, 14(19):8476–8481, 2006.
- [18] JHG Huisstede, KO van der Werf, Martin L Bennink, and Vinod Subramaniam. Force detection in optical tweezers using backscattered light. *Optics express*, 13(4):1113–1123, 2005.
- [19] Junyi Jiao, Aleksander A Rebane, Lu Ma, and Yongli Zhang. Single-molecule protein folding experiments using high-precision optical tweezers. In *Optical Tweezers*, pages 357–390. Springer, 2017.
- [20] S Keen, J Leach, G Gibson, and MJ Padgett. Comparison of a high-speed camera and a quadrant detector for measuring displacements in optical tweezers. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8):S264, 2007.
- [21] Scot C Kuo and Michael P Sheetz. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science*, 260(5105):232–234, 1993.
- [22] Martin Li and Jochen Arlt. Trapping multiple particles in single optical tweezers. *Optics Communications*, 281(1):135–140, 2008.

- [23] Christopher D Mellor, Melissa A Sharp, Colin D Bain, and Andrew D Ward. Probing interactions between colloidal particles with oscillating optical tweezers. *Journal of applied physics*, 97(10):103114, 2005.
- [24] Keir C Neuman and Steven M Block. Optical trapping. *Review of scientific instruments*, 75(9):2787–2809, 2004.
- [25] Oliver Otto, Christof Gutsche, Friedrich Kremer, and Ulrich F Keyser. Optical tweezers with 2.5 khz bandwidth video detection for single-colloid electrophoresis. *Review of Scientific Instruments*, 79(2):023710, 2008.
- [26] Peter J Pauzauskie, Aleksandra Radenovic, Eliane Trepagnier, Hari Shroff, Peidong Yang, and Jan Liphardt. Optical trapping and integration of semiconductor nanowire assemblies in water. *Nature materials*, 5(2):97, 2006.
- [27] Mohammad Sarshar, Winson Wong, and Bahman Anvari. Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers. *Journal of biomedical optics*, 19(11):115001, 2014.
- [28] Iva Marija Tolić-Nørrelykke, Kirstine Berg-Sørensen, and Henrik Flyvbjerg. Matlab program for precision calibration of optical tweezers. *Computer physics communications*, 159(3):225–240, 2004.
- [29] Simon F Tolić-Nørrelykke, Erik Schäffer, Jonathon Howard, Francesco S Pavone, Frank Jülicher, and Henrik Flyvbjerg. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Review of scientific instruments*, 77(10):103101, 2006.
- [30] Ming-Tzo Wei, Angela Zaorski, Huseyin C Yalcin, Jing Wang, Melissa Hallow, Samir N Ghadiali, Arthur Chiou, and H Daniel Ou-Yang. A comparative study of living cell micromechanical properties by oscillatory optical tweezers. *Optics express*, 16(12):8594–8603, 2008.
- [31] Makoto Yada, Jun Yamamoto, and Hiroshi Yokoyama. Direct observation of anisotropic interparticle forces in nematic colloids with optical tweezers. *Physical review letters*, 92(18):185501, 2004.
- [32] Pavel Yale, Jean-Michel Konin, Michel Kouacou, and Jérémie Zoueu. New detector sensitivity calibration and the calculation of the interaction force between particles using an optical tweezer. *Micromachines*, 9(9):425, 2018.